

UNIVERSIDAD DE OVIEDO



Universidad de Oviedo

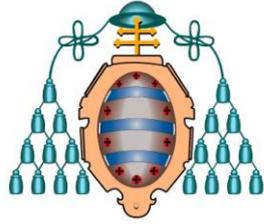
**Instituto Universitario de Oncología del
Principado de Asturias**

**“Análisis de los Genes *EGFR* y *HER2*
en los Carcinomas Epidermoides
Nasosinuales”**

TESIS DOCTORAL

Fernando López Álvarez

Mayo de 2010



UNIVERSIDAD DE OVIEDO



Universidad de Oviedo

**Instituto Universitario de Oncología del
Principado de Asturias**

**“Análisis de los Genes *EGFR* y *HER2*
en los Carcinomas Epidermoides
Nasosinuales”**

TESIS DOCTORAL

(que opta al grado de Doctor por la Universidad de Oviedo)

Autor

D. Fernando López Álvarez

Directores

D. José L. Llorente Pendás

D. Mario Hermsen

D. César A. Álvarez Marcos



AUTORIZACIÓN PARA LA PRESENTACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Curso: 2009/2010

Datos personales:

Apellidos: LOPEZ ALVAREZ
D.N.I. 9429591M

Nombre: FERNANDO

Datos Académicos:

Programa de Doctorado cursado: Investigación en cancer (Mención de Calidad)

Departamento responsable: INSTITUTO UNIVERSITARIO DE ONCOLOGÍA

Departamento en el que presenta la tesis doctoral: INSTITUTO UNIVERSITARIO DE
ONCOLOGÍA

Título definitivo de la Tesis: ANALISIS DE LOS GENES EGFR Y HER2 EN LOS CARCINOMAS
EPIDERMOIDES NASOSINUSALES

Autorización del director/es de la tesis

D/D²: HERMSEN, MARINUS A.J.A

Universidad: CONTRATO FIS. INVESTIGADOR DOCTOR DEL IUOPA

D/D²: LLORENTE PENDAS, JOSE LUIS

Departamento: CIRUGIA Y ESPECIALIDADES MEDICO-QUIRURGICAS

D/D²: ALVAREZ MARCOS, CESAR ANTONIO

Departamento: CIRUGIA Y ESPECIALIDADES MEDICO-QUIRURGICAS

Autoriza la presentación de la tesis doctoral en cumplimiento de lo establecido en el Art. 35.1a de la "Modificación del Reglamento del tercer ciclo de estudios universitarios, la obtención y expedición del título de doctor y otros cursos de postgrado", aprobada por el Consejo de Gobierno, en su sesión del día 23 de octubre de 2008 (BOPA del 19 de diciembre de 2008).

Oviedo, 05 de abril de 2010

Director de la Tesis

Director de la Tesis

Fdo: HERMSEN, MARINUS A.J.A

Fdo: LLORENTE PENDAS, JOSE LUIS

Director de la Tesis

Fdo: ALVAREZ MARCOS, CESAR ANTONIO



AUTORIZACIÓN PARA PRESENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL

Datos del alumno:

Apellidos: LOPEZ ALVAREZ
DNI: 9429591M

Curso: 2009/2010
Nombre: FERNANDO

Datos Académicos:

Programa de Doctorado cursado: Investigación en cancer (Mención de Calidad)
Departamento responsable: INSTITUTO UNIVERSITARIO DE ONCOLOGÍA
Departamento en que presenta la tesis doctoral: INSTITUTO UNIVERSITARIO DE ONCOLOGÍA
Título definitivo de la Tesis: ANALISIS DE LOS GENES EGFR Y HER2 EN LOS CARCINOMAS EPIDERMOIDES NASOSINUSALES

FOR-OFE-VCE-024

Autorización del director/es de la tesis

D/D^a: JOSE LUIS LLORENTE PENDAS
Departamento: CIRUGIA Y ESPECIALIDADES MEDICO-QUIRURGICAS
D/D^a: CESAR ANTONIO ALVAREZ MARCOS
Departamento: CIRUGIA Y ESPECIALIDADES MEDICO-QUIRURGICAS
D/D^a: MARINUS A.J.A. HERMSEN
Universidad: DIVERSOS ORGANISMOS OFICIALES

Resolución

El Departamento INSTITUTO UNIVERSITARIO DE ONCOLOGÍA en su reunión de fecha 8 de Abril de 2010, acordó dar su conformidad para la presentación de la tesis doctoral a la Comisión de Doctorado, en cumplimiento de lo establecido 35.2 de la "Modificación del Reglamento del tercer ciclo de estudios universitarios, la obtención y expedición del título de doctor y otros cursos de postgrado", aprobada por el Consejo de Gobierno, en su sesión del día 23 de octubre de 2008 (BOPA del 19 de diciembre de 2008).

Asimismo el director/directores de la tesis doctoral, cumplen con el requisito establecido en el artículo 2 de la "Modificación del Reglamento del tercer ciclo de estudios universitarios, la obtención y expedición del título de doctor y otros cursos de postgrado", aprobada por el Consejo de Gobierno, en su sesión del día 23 de octubre de 2008 (BOPA del 19 de diciembre de 2008).

Oviedo, 8 de Abril de 2010

El Director del Departamento

Fdo.: CARLOS SUÁREZ NIETO

SR./SRA. PRESIDENTE/A DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO DE LA UNIVERSIDAD DE OVIEDO

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Tras completar los años de licenciatura y el periodo de formación especializada, el momento en el que escribo los agradecimientos de mi Tesis Doctoral es un momento especial, pues aunque sea algo meramente simbólico, supone por un lado culminar una etapa importante de mi vida, durante la cual he iniciado mi formación como profesional en el campo de la medicina y, por otro lado, comenzar a aplicar los conocimientos y habilidades aprendidas, sin olvidarse que para un médico, el periodo de formación nunca se acaba.

El lograr el título de Doctor en mi disciplina supone, aparte de alcanzar el grado académico universitario de nivel más alto, lo cual es un enorme orgullo para mí y para las personas que me aprecian, es una forma de agradecimiento a todas aquellas personas que siempre me apoyaron y confiaron en mí. A todos vosotros **GRACIAS** por estar siempre a mi lado en los buenos y en los malos momentos. Espero seguir contando con vuestro apoyo en este camino que hoy comienza. No dudo que será un camino difícil y complejo, pero no dudéis que intentaré recorrerlo de la mejor forma posible, con compromiso, rectitud, profundizando en el conocimiento médico e intentando devolver a la medicina, a los enfermos y a vosotros todo el apoyo que espero recibir día a día.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que con su participación han hecho posible este trabajo. Este agradecimiento no quisiera que fuera considerado un trámite basado en la costumbre sino un sentimiento verdadero hacia todos los que, de alguna u otra manera, me habéis ayudado.

En primero lugar quiero agradecer su orientación, su estímulo y sus sugerencias a mis tres directores de tesis:

Al **Prof. Dr. José Luis Llorente Pendás**, a quien considero uno de mis referentes de mi carrera profesional, por ser un ejemplo como médico, investigador, profesor y, sobretodo, como persona. El Prof. Llorente encarna al médico que todo estudiante sueña con llegar a ser cuando empieza en las aulas de la Facultad. Él me ha transmitido su profesionalidad, su espíritu inquieto, su inagotable capacidad de trabajo, su insólita dedicación hacia la medicina y los pacientes y la necesidad de profundizar en el saber médico. Mi agradecimiento por su incondicional apoyo, sus sugerencias, sus estímulos y por la confianza depositada en mí desde el primero momento.

Al **Dr. Mario Hermsen** por su ayuda, su paciencia y por haberme ayudado a sumergirme en ese apasionante mundo, poco conocido por mí hasta entonces, que es la biología molecular. Para un médico como yo, es un orgullo haber contado con los consejos y con la experiencia del Dr. Hermsen, un bioquímico con una sólida y brillante carrera profesional.

Al **Dr. César Álvarez Marcos** por su disposición a colaborar en este proyecto desde el primer momento. El Dr. Álvarez es un claro ejemplo de compromiso con la medicina y con la ciencia en general y, de que el ansia de conocimiento y las ganas de enseñar a los demás son más poderosas que las dificultades, pues aún desempeñando su profesión en un hospital comarcal, nunca abandonó su carrera investigadora. Mi agradecimiento por aportarme sus conocimientos, por su visión crítica del trabajo y por su seriedad.

Al **Prof. Dr. Carlos Suárez Nieto** a quien considero la piedra angular de mi formación como otorrinolaringólogo. Él, a pesar de sus múltiples ocupaciones y dificultades siempre se ha preocupado por ofrecerme una sólida formación clínica y científica.

A la **Dra. Vanessa Suárez Fente** por ser la persona que hace años me descubrió el maravilloso mundo de la otorrinolaringología y a la que estaré eternamente agradecido. Gracias a ella, hoy tengo el honor de pertenecer a un grupo profesional y humano excepcional como es el Servicio de Otorrinolaringología.

A todos y cada uno de mis compañeros del **Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA)** por haberme apoyado siempre y haber colaborado en mi formación. Durante esta etapa el hospital ha sido mi segunda casa (y, en ocasiones, por horas, la primera) y siempre me he sentido querido y respetado. Gracias a médicos, enfermeras, auxiliares y todo el personal que de una u otra manera me han ayudado en estos años a crecer como médico y como persona. Es imposible que nombre a todos aquí pero estad seguros que en mí recuerdo y agradecimiento estáis presentes con letras mayúsculas.

A los miembros del **grupo de Otorrinolaringología del Laboratorio del IUOPA** por haberme acogido como uno más y haberme ayudado en el trabajo de experimentación que ha dado como fruto este trabajo. Especialmente quisiera dar las gracias a la Dra. Marta Alonso, con quien comencé este trabajo, me abrió la puerta del trabajo diario en el laboratorio, y a Eva Allonca y Sira Potes, sin cuya ayuda jamás

hubiera podido realizar este trabajo. A todos ellos gracias por su desinteresada labor y su ayuda. Ha sido un gran honor trabajar con vosotros y espero seguir haciéndolo.

No puedo dejar de agradecer al **Dr. Bartolomé Scola** y al **Dr. Carlos Martín del Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Gregorio Marañón (Madrid)** el habernos facilitado las muestras procedentes de su hospital así como toda la documentación clínico-patológica. Gracias por vuestra desinteresada colaboración.

Por último, aunque en primer lugar, esta Tesis va dedicada de una manera especial a mi toda **familia**. Aunque pertenezco a una familia pequeña en número, para mí, es la familia más grande del mundo. Ella es mi apoyo incondicional y sé que jamás me fallarán. Pido perdón si en algún momento no soy todo lo amable, cariñoso y comprensible que ellos esperan, pero que nunca duden que por encima de todo siempre estarán ellos. Han puesto en mí todas las expectativas, me han formado como persona y han puesto a mi disposición, no sin dificultades, todo aquello que ha estado en su mano para que me formara y para que cumpliera mi sueño de ser médico. Por todo ello **GRACIAS** y espero saber corresponder y devolver todo lo que me han dado

A mis **padres**, gracias por estar siempre a mi lado, por haberse dedicado “en cuerpo y alma” a mi formación y a que nunca me faltara de nada. Ellos son un ejemplo a seguir en el caminar por la vida y a ellos les debo ser quien soy y a sentirme orgulloso de cómo soy. Esta Tesis va dedicada a ellos de manera especial.

A mis **abuelos**, mis admiradores incondicionales. Y sí, lo digo en plural porque, aunque tristemente, por escasos meses, mi abuelo no ha podido ver culminado esta etapa, sé que estaría orgulloso de mí. Él era mi mayor admirador y me enseñó los valores de la vida y del trabajo. Y a mi abuela, que haga lo que haga, siempre estará a mi lado porque siempre verá la parte positiva de mis hechos.

Y a mis **tíos** y **primos**, que para mí son familia muy cercana y en quienes siempre podré confiar.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	11
BASES PREVIAS	12
1. INTRODUCCIÓN	14
1.1. Carcinomas epidermoides nasosinuales	15
1.1.1. Epidemiología	15
1.1.2. Factores Etiológicos.....	16
1.1.3. Histopatología.....	17
1.1.4. Clínica.....	18
1.1.5. Diagnóstico.....	19
1.1.6. Estadificación.....	20
1.1.7. Tratamiento.....	23
1.1.8. Pronóstico.....	24
1.2. Estado actual	25
1.2.1 Biología molecular y citogenética de los CECC. Aspectos concretos de los CENS.....	25
1.2.2. Receptores ERBB.....	29
1.2.2.1. Inhibidores de los receptores ERBB	34
1.3. Modelo teórico	37
2. HIPÓTESIS	38
3. OBJETIVOS	40
4. MATERIAL Y MÉTODOS	42
4.1. Sujetos a estudio	43
4.2. Recogida de muestras	43
4.3. Extracción del ADN	44
4.3.1. A partir de tejido fresco	44
4.3.2. A partir de tejido en parafina	45
4.4. Técnica de la MLPA	46
4.4.1. Tipos de kits.....	46
4.4.2. Pasos del experimento.....	50
4.4.3. Interpretación de datos	51
4.5. Técnica de FISH	53
4.5.1. Preparación de la muestra	56
4.5.2. Pretratamiento	56
4.5.3. Hibridación.....	56
4.5.4. Contraste Fluorescente.....	57
4.6. Análisis mediante inmunohistoquímica. “Tissue-arrays”	57
4.6.1. Técnica de los “tissue-arrays”	57
4.6.1.1. Selección de las zonas a muestrear	57
4.6.1.2. Elaboración de la base de datos y esquema del "tissue-array"	58
4.6.1.3. Elaboración del “tissue-array”	59
4.6.1.4. Secciones del bloque	59

4.6.1.5. Requerimientos mínimos estándar del “tissue-array”	60
4.6.2. Técnica inmunohistoquímica.....	60
4.6.2.1. EGFR	61
4.6.2.2. HER2.....	61
4.6.3. Interpretación de la inmunohistoquímica	62
4.6.3.1. EGFR	62
4.6.3.2. HER2.....	62
4.7. Descripción de las variables	63
4.8. Análisis estadístico	64
5. RESULTADOS	65
5.1. Aspectos clínico-patológicos	66
5.2. Aspectos genéticos.....	73
5.2.1. Análisis de la ganancia/amplificación de <i>EGFR</i> y <i>HER2</i> en los CENS	73
5.2.2. Relación entre la amplificación de <i>EGFR</i> y las variables clínico - patológicas	74
5.2.3. Relación entre la amplificación de <i>EGFR</i> y el curso clínico	76
5.2.4. Relación entre la ganancia/amplificación de <i>HER2</i> y las variables clínico- patológicas	77
5.2.5. Relación entre la ganancia/amplificación de <i>HER2</i> y el curso clínico	79
5.2.6. Análisis de la expresión proteica de EGFR y HER2 en los CENS	80
5.2.7. Relación entre la sobre-expresión proteica de EGFR y las variables clínico-patológicas	81
5.2.8. Relación entre la sobre-expresión proteica de EGFR con el curso clínico..	83
5.2.9. Relación entre la sobre-expresión proteica de HER2 y las variables clínico-patológicas.....	84
5.2.10. Relación entre la sobre-expresión proteica de HER2 y el curso clínico....	87
5.2.11. Relación entre la amplificación génica y la sobre-expresión proteica de EGFR	88
5.2.12. Relación entre la ganancia/amplificación génica y la sobre-expresión proteica de HER2	89
6. DISCUSIÓN.....	90
6.1. Justificación	91
6.2. Aspectos clínico-patológicos	91
6.3. Aspectos genéticos.....	93
6.3.1. En relación a <i>EGFR</i>	94
6.3.2. En relación a <i>HER2</i>	97
7. CONCLUSIONES.....	100
8. PROYECTO FUTURO	102
9. BIBLIOGRAFÍA	104
10. ANEXO	116

ABREVIATURAS

- **CECC:** carcinomas epidermoides de cabeza y cuello
- **CENS:** carcinomas epidermoides nasosinusales
- **CGH:** hibridación genómica comparativa (*“Comparative Genomic Hybridization”*)
- **EGFR:** receptor del factor de crecimiento epidérmico (*“Epidermal Grow Factor Receptor”*). El gen se denomina también *HER1* y *ERbB1*
- **FISH:** hibridación *in situ* con fluorescencia (*“Fluorescent in situ Hybridization”*)
- **HER2:** receptor del factor de crecimiento epidérmico humano número 2 (*“Human Epidermal growth factor Receptor 2”*). El gen se denomina también *ERbB2*
- **IHQ:** inmunohistoquímica
- **LOH:** pérdida de heterocigosidad (*“Loss Of Heterozigosity”*)
- **MLPA:** amplificación múltiple de sondas dependiente de ligación (*“Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification”*)
- **QT:** quimioterapia
- **RT:** radioterapia
- **TKIs:** inhibidores de la tirosín-quinasa (*“Tyrosine Kinase Inhibitors”*)
- **VAS:** vías aerodigestivas superiores
- **VPH:** virus del papiloma humano

BASES PREVIAS

Esta tesis doctoral es fruto de la línea de investigación sobre carcinomas nasosinusales que el grupo de Otorrinolaringología del Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA) ha desarrollado en los últimos años. Sus resultados están apoyados por sucesivas aportaciones científicas que exponemos a continuación por orden cronológico.

Comunicaciones a Congresos

Título: Análisis Clínico Molecular de los Carcinomas Epidermoides Nasosinusales.

Autor/es: F. López Álvarez, J. L. Llorente Pendás, M. Hermsen, M^a. P. Cuesta Albalad, C. Suárez Nieto.

Congreso: 59 Congreso Nacional de la SEORL-PCF

Lugar y fecha: Tarragona, 2008

Título: Microsatellite Instability Analysis of Sinonasal Carcinomas

Autor/es: J. García Martínez, J. Pérez-Escuredo, F. López, C. Suárez, C. Álvarez-Marcos, J.L. Llorente, M. Hermsen.

Congreso: American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. 112th Annual Meeting)

Lugar y fecha: Chicago, 2008

Título: Nasal and Paranasal Squamous Cell Carcinoma. Molecular and Genetic Analysis

Autor/es: F. López Álvarez.

Congreso: 9th Congress of the European Skull Base Society

Lugar y fecha: Rotterdam, 2009

Título: Implication on Defects in MMR in Sinonasal Carcinomas

Autor/es: J. García Martínez, J. Pérez-Escuredo, F. López, C. Suárez, C. Álvarez-Marcos, J.L. Llorente, M. Hermsen.

Congreso: 9th Congress of the European Skull Base Society

Lugar y fecha: Rotterdam, 2009

Título: Análisis Genético-Molecular de los Carcinomas Epidermoides Nasosinusales.

Autor/es: F. López Álvarez, J. L. Llorente Pendás, M. Hermsen, M. Alonso Guervós, C. Álvarez Marcos, C. Suárez Nieto.

Congreso: 60 Congreso Nacional de la SEORL-PCF

Lugar y fecha: Madrid, 2009

Artículos

- ✓ García Martínez J, Pérez-Escuredo J, López F, Suárez C, Álvarez-Marcos C, Llorente JL, Hermsen M. Microsatellite Instability Analysis of Sinonasal Carcinomas. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2009;140:55-60.
- ✓ Hermsen MA, Llorente JL, Pérez-Escuredo J, López F, Ylstra B, Alvarez-Marcos C, Suárez C. Genome-wide analysis of genetic changes in intestinal-type sinonasal adenocarcinoma. *Head Neck* 2009;31:290-297.
- ✓ Llorente JL, Pérez-Escuredo J, Alvarez-Marcos C, Suárez C, Hermsen M. Genetic and clinical aspects of wood dust related intestinal-type sinonasal adenocarcinoma: a review. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2009;266:1-7
- ✓ López F, Llorente JL, Hermsen M, Alonso M, Cuesta P, Suárez C. Nasal and paranasal squamous cell carcinoma: Molecular and genetic analysis. *Skull base* 2009;19:56.
- ✓ García J, Pérez J, López F, Suárez C, Álvarez-Marcos C, Llorente JL, Hermsen M. Implication on defects in mmr in sinonasal carcinomas. *Skull Base*;19:56.
- ✓ López F, Llorente JL, García-Inclán C, Alonso-Guervós M, Cuesta-Albalad MP, Fresno MF, Álvarez-Marcos, C, Suárez C, Hermsen MA. Genomic profiling of sinonasal squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2010 (in press).

1

INTRODUCCIÓN

1.1. Carcinomas epidermoides nasosinuales

Los carcinomas epidermoides nasosinuales (CENS) son tumores malignos originados en la mucosa respiratoria de las fosas y senos paranasales, caracterizados por la proliferación neoplásica de estructuras epiteliales no glandulares. Son un grupo de tumores con características clínicas diferentes al resto de carcinomas epidermoides de cabeza y cuello (CECC). Su localización centrofacial y la existencia de estructuras contiguas como la órbita, la cavidad oral, la fosa infratemporal y la base del cráneo, hacen que su tratamiento sea difícil y complejo, conllevando una elevada morbilidad y mortalidad^{1,2}.

Los CENS son neoplasias en las cuales, dada su escasa prevalencia, su tratamiento y factores pronósticos se hallan en continua discusión³. Por la misma razón la biología molecular que subyace su oncogénesis ha sido hasta el momento poco estudiada.

1.1.1. Epidemiología

Las neoplasias nasosinuales son tumores poco frecuentes y representan aproximadamente el 0,2-0,8% del total de tumores malignos de la especie humana y el 3-6% de los tumores de cabeza y cuello^{1,4,5}. En las fosas y senos paranasales se originan tumores con una gran variedad de tipos histológicos, aunque predominan los de estirpe epitelial (más del 75%). En la mayoría de las series el más frecuente es el carcinoma epidermoide, que representa entre el 40-80% del total^{5,6,7}.

En nuestro ámbito la incidencia es de 0,8-1 caso por 100.000 habitantes y año⁴. Los CENS se presentan con mayor frecuencia en varones, con una relación de 2-3/1. Esta proporción es menor que en el resto de neoplasias de cabeza y cuello, probablemente porque en las fosas y senos paranasales los factores de riesgo típico, como alcohol y tabaco, más frecuente en varones, no tienen un potencial carcinogénico tan demostrado como en el resto de la vía aero-digestiva superior (VAS)⁵.

La edad de aparición se sitúa entre la sexta y séptima década de la vida, aumentando a partir de ese momento el número de casos de forma gradual⁵.

El lugar más habitual de origen de los CENS es la cavidad nasal, siendo el seno maxilar la segunda localización más frecuente, si bien en algunas publicaciones este predominio se invierte⁶. No obstante, dada la proximidad de estas regiones

anatómicas y que, frecuentemente, los CENS se presentan en estadios avanzados, no es fácil identificar el lugar exacto de su origen. Además, un número significativo de tumores afecta a más de un sitio contiguo en el momento del diagnóstico.

Dentro de los tumores estrictamente sinusales los más frecuentes son los tumores del seno maxilar, constituyendo el 60-80% de los CENS^{1,8}. Los tumores etmoidales les siguen en frecuencia y los frontales y esfenoidales son excepcionales⁶.

1.1.2. Factores Etiológicos

El mecanismo etiopatogénico exacto de los CENS es desconocido, aunque se han descrito diferentes agentes carcinogénicos en relación a su desarrollo. El riesgo relativo de padecer un CENS aumentaría en aquellas personas con exposición crónica al polvo de maderas blandas (abeto, pino)^{9,10}. Diversos agentes químicos como el asbesto, los cromatos, el níquel y el arsénico podrían estar también implicados^{11,12}. Así por ejemplo, se calculó que la exposición al níquel incrementaría 900 veces el riesgo de desarrollar un CENS respecto a la población no expuesta^{13,14}. Otros agentes como las fibras de algodón y algunas harinas de cereales, cuando están retenidas en la mucosa nasal, podrían favorecer la aparición de los CENS¹³. No obstante, el tiempo de latencia entre la exposición al carcinógeno y la aparición del tumor suele ser de más de 30 años^{4,11}.

A diferencia del resto de los CECC, especialmente en faringe y laringe, el alcohol y el tabaco no parecen jugar un papel importante en el desarrollo de los CENS. No obstante, hay cierta relación epidemiológica^{15,16} y en algunos estudios se indica que los grandes fumadores desarrollan un carcinoma epidermoide con un riesgo triple que en la población general^{15,16}.

El Virus del Papiloma Humano (VPH), sobretodo los serotipos 16 y 18 y, en menor medida los serotipos 6 y 11, han sido aislados en el tejido tumoral de los CENS. Esta asociación se ha intentando demostrar en el proceso de malignización de los papilomas invertidos a carcinoma escamoso, hallándose en el mejor de los estudios una implicación del VPH del 10%^{17,18,19,20,21}. Por ello el papel del VPH en la carcinogénesis de los CENS no parece tener gran importancia, aunque en aquellos tumores que lo presentan el pronóstico a 5 años es mejor²². Otro virus relacionado como el de Epstein-Barr parece tener aún menos importancia^{23,24}.

Otro factor que sí parece tener especial relevancia en la génesis de los CENS es el antecedente de patología nasosinusal previa, observándose hasta en el 25% de

los casos. Una posible explicación a esta relación sería la metaplasia escamosa del epitelio respiratorio y su posterior progresión a carcinoma epidermoide ante el estímulo inflamatorio crónico.

1.1.3. Histopatología

Los CENS se originan en la mucosa respiratoria de las fosas nasales y senos paranasales. Aunque no está comprobado, podrían surgir a partir de una transformación metaplásica del epitelio respiratorio normal. Son carcinomas de tipo epidermoide o escamoso, constituidos por trabéculas o nidos de tamaño variable, citológicamente similares al resto de tumores originados en los epitelios poliestratificados planos. Se observan distintos grados de atipia citológica, así como de queratinización, en forma de disqueratosis o globos córneos (Figura 1). El grado de diferenciación es variable, pudiendo establecerse una relación entre los CENS menos diferenciados, la presencia de mayores tasas de recidiva locorregional y el desarrollo de metástasis a distancia²⁵, si bien estos tumores serían más sensibles a tratamientos con quimio (QT) y radioterapia (RT).

Aunque el diagnóstico histopatológico de carcinoma epidermoide es evidente en la mayoría de las ocasiones, podrían ser utilizados estudios de inmunohistoquímica (IHQ) para distinguirlos de otros tumores de estirpe epitelial originados en las fosas y senos paranasales. Además, los tumores poco diferenciados puede resultar difícil distinguirlos de los estesioneuoblastomas y de los carcinomas neuroendocrinos, por lo que la IHQ sería muy útil en estos casos.

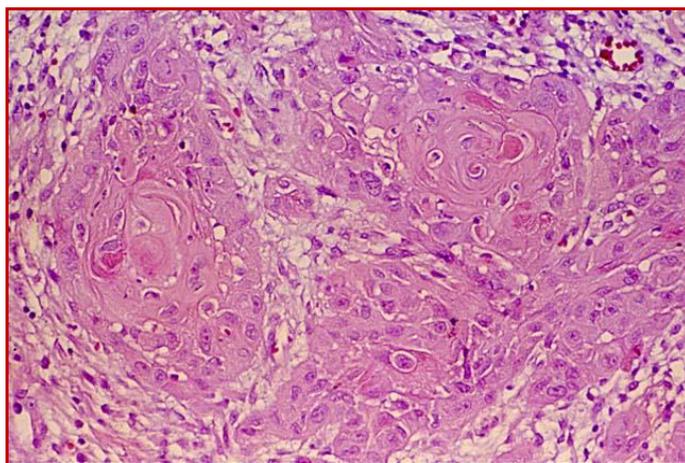


Figura 1. Carcinoma epidermoide bien diferenciado. Obsérvense los globos córneos.
Hematoxilina-Eosina (X200)

1.1.4. Clínica

Los CENS en los estadios iniciales, mientras están confinados en la cavidad del seno, no suelen dar síntomas que permitan sospechar una neoplasia y pueden simular un proceso inflamatorio: dolor local, rinorrea, epistaxis, hiposmia y sensación de presión y ocupación facial. Sólo cuando alcanzan dimensiones significativas o se extienden a estructuras vecinas como la piel de la mejilla (Figura 2), la mucosa oral, la órbita, la fosa infratemporal y la cavidad craneal aparece clínica más llamativa. Ésta consiste en tumoración y deformidad facial, úlceras palatinas, desviación ocular y algiás o parálisis de pares craneales^{1,26,27}. Por ello, debido su clínica inicial silente, los CENS se diagnostican frecuentemente en estadios avanzados (más del 50% T3 y T4)^{1,3}.

La afectación ganglionar al diagnóstico es poco frecuente (2-12%)^{1,3,28,29,30,31,32,33}. De igual modo, la recidiva a nivel regional es infrecuente (5-15%)^{1,7,31,33}, siendo excepcionales las recidivas en los ganglios linfáticos con la enfermedad controlada a nivel local (menos del 5%). Es importante reseñar que la afectación ganglionar, cuando se produce, no se relaciona con el tamaño tumoral, siendo posible observar tumores en estadios precoces (T1-2) que presentan metástasis ganglionares, indicando un comportamiento biológico particular. No obstante, esta situación tendría lugar preferentemente cuando el tumor afecta áreas ricas en vasos linfáticos, como la mucosa oral, la piel de la mejilla y la fosa infratemporal.



Figura 2. CENS con afectación de tejidos blandos faciales

1.1.5. Diagnóstico

Se debe realizar un diagnóstico precoz de los CENS, por lo que se deben sospechar en todo síndrome obstructivo, álgico o secretor unilateral prolongado en el tiempo y que sea refractario a los tratamientos habituales.

La rinoscopia anterior clásica o, actualmente, la endoscopia (rígida o flexible) permiten la valoración clínica de las neoformaciones que ocupan las fosas nasales, generalmente de forma unilateral, además de obtener biopsias del tejido.

Se deben realizar estudios de imagen para valorar su extensión y seleccionar el abordaje terapéutico más adecuado. La tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética (RM) son muy útiles para determinar los límites tumorales, la invasión de zonas adyacentes y la presencia de metástasis ganglionares, que aunque infrecuentes, cuando ocurren, son poco accesibles a la exploración. Se recomienda realizar estudios de imagen antes de la toma de biopsia (Figura 3).

Previamente al tratamiento definitivo es obligado tener una confirmación histopatológica de la naturaleza de la lesión³³.

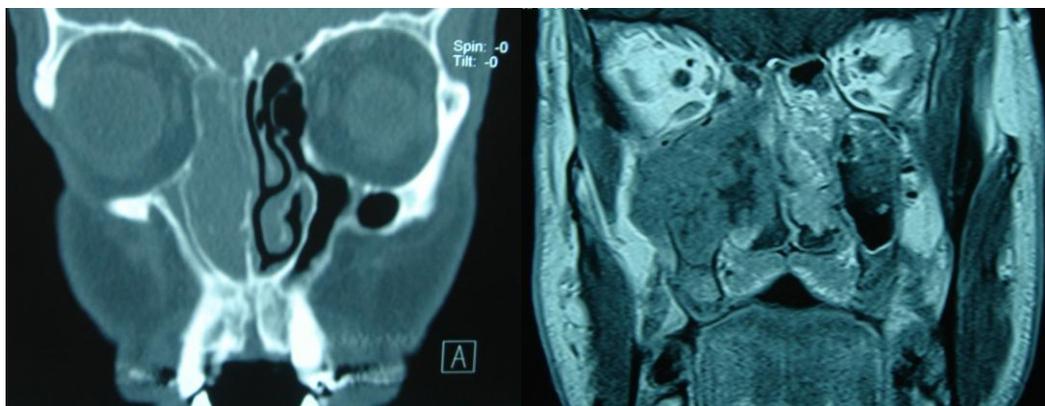


Figura 3. TC y RM de un CENS de seno maxilar derecho

1.1.6. Estadificación

La clasificación de los CENS más utilizada en la clínica es el TNM de la UICC en su sexta edición (2002)³⁴. Se basa en tres categorías: extensión tumoral (T), afectación de ganglios linfáticos regionales (N) y existencia de metástasis a distancia (M). Según se combinen estas categorías se definen siete estadios (Tablas 1, 2 y 3).

Hasta la cuarta edición de la clasificación TNM (1982) no aparecía la localización “senos paranasales” y en la quinta edición (1997) ya se redefinen las localizaciones, separando seno maxilar y seno etmoidal. En la sexta edición, vigente en la actualidad, se clasifican los tumores etmoidales junto a los tumores originados en la fosa nasal. Además, aparecen dos subgrupos dentro de los tumores T4, los T4a que son tumores “resecables” y los T4b que son “irresecables”, lo cual tiene su importancia en el pronóstico.

En los CENS puede ser difícil la estadificación, ya que al diagnosticarse tardíamente suelen estar afectadas zonas extensas, con límites anatómicos mal definidos.

Los tumores originados en los senos frontal y esfenoidal no cuentan con clasificación propia dada su escasa incidencia y a que normalmente el tumor invade precozmente los senos vecinos, siendo difícil distinguir el origen inicial.

Tabla 1. Estadificación TNM en tumores de seno maxilar

SENO MAXILAR	
Categoría T Tumor Primario	
Tx	No se puede asegurar
To	No hay evidencia
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor limitado a la mucosa antral sin erosión ni destrucción de hueso
T2	Tumor con erosión o destrucción de la infraestructura incluyendo el paladar óseo y/o el meato medio. No invasión de la pared posterior, tejido subcutáneo, suelo y pared medial de la órbita, fosa pterigopalatina ni etmoides
T3	Tumor que invade una de las siguientes áreas: pared posterior del seno maxilar, suelo o pared medial de la órbita, etmoides anterior, planos blandos subcutáneos, fosa pterigopalatina
T4a	Tumor que invade el contenido orbital anterior, piel de la mejilla, apófisis pterigoides, fosa infratemporal, lámina cribosa, seno esfenoidal o seno frontal
T4b	Tumor que invade el ápex orbitario, duramadre, cerebro, fosa craneal media, pares craneales excepto la 2ª rama del trigémino (V2), nasofaringe o clivus
Categoría N Ganglios Linfáticos Regionales	
Nx	No se puede asegurar su existencia
N0	Ausencia de ganglios metastásicos
N1	Metástasis en un único ganglio linfático ipsilateral ≤ 3 cm
N2a	Metástasis en único ganglio linfático ipsilateral de > 3 cm pero < 6 cm
N2b	Múltiples ganglio linfáticos ipsilaterales, ninguno $>$ de 6 cm
N2c	Ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales ninguno $>$ de 6 cm
N3	Ganglio linfático de > 6 cm
Categoría M Metástasis a distancia	
Mx	No se puede asegurar su existencia
M0	Ausencia de metástasis
M1	Presencia de metástasis

Tabla 2. Estadificación T en tumores de fosas nasales y seno etmoidal

FOSAS NASALES Y SENO ETMOIDAL	
Categoría T	Tumor Primario
Tx	No se puede asegurar
To	No hay evidencia
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor que afecta a una sola sublocalización con o sin invasión ósea
T2	Tumor que afecta a dos sublocalizaciones en una sola región o que invade una región adyacente etmoidal, con o sin invasión ósea
T3	Tumor que invade el suelo o la pared medial de la órbita, seno maxilar, lámina cribosa o paladar
T4a	Tumor que invade cualquiera de las siguientes regiones: contenido orbitario anterior, piel de la nariz o mejilla, extensión leve a la fosa craneal anterior, apófisis pterigoides, seno frontal o seno esfenoidal
T4b	Tumor que invade cualquiera de las siguientes regiones: ápex orbitario, cerebro, dura, fosa craneal media, nervios craneales, nasofaringe o clivus

Tabla 3. Estadios de la OMS en los carcinomas nasosinusales

ESTADIO	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1 – T3	N1	M0
IVa	T1 – T4a	N2	M0
	T4a	N0 – N1	M0
IVb	T4b	Cualquier N	M0
	Cualquier T	N3	M0
IVc	Cualquier T	Cualquier N	M1

1.1.7. Tratamiento

No hay un consenso establecido respecto del tratamiento óptimo de los CENS. Esta situación se debe a varios motivos entre los que destacan el reducido número de pacientes, la gran variedad histológica de los tumores nasosinuales y, por último, que la complejidad anatómica de la región hace que los tratamientos generen casi siempre morbilidad asociada, lo que condiciona sus continuos replanteamientos⁵.

La opción terapéutica más utilizada es la cirugía seguida de la RT postoperatoria^{1,32}. En los CENS es imprescindible el control local de la enfermedad mediante su exéresis amplia con unos márgenes de seguridad suficientes⁸. Los abordajes quirúrgicos varían en función de la localización tumoral, de su extensión y de las posibilidades reconstructivas²⁸.

La RT se utiliza, sobre todo, tras la cirugía debido a que la mayor parte de los pacientes presentan tumores en estadios avanzados y al reducido control de los márgenes quirúrgicos. Algunos autores no aconsejan su uso en estadios precoces², pero los pacientes con tumores T3 ó T4 se beneficiarían de su aplicación postoperatoria³.

La RT administrada de forma aislada no logra buenos resultados, si bien es cierto que sólo se administra como tratamiento único en tumores avanzados, por lo que el pronóstico inicial ya es desfavorable. No obstante, existen series en las que se administra RT y QT de manera concomitante, como tratamiento único a todos los pacientes, sin disminución de la supervivencia y menor morbilidad³⁵. La RT neoadyuvante podría usarse para disminuir en algunos casos la radicalidad de la cirugía o como tratamiento previo a la cirugía en tumores inicialmente irresecables.

Existen estudios^{33,36,37,38}, hechos en Japón donde la incidencia de los CENS es más elevada, que defienden el uso de la QT en diversos esquemas de administración, intra-arterial o sistémica y neoadyuvante o concomitante. Estos autores propugnan que su uso, aunque aumenta la supervivencia, permite mejores resultados funcionales y estéticos.

La presencia de adenopatías en los CENS, como se ha dicho, es infrecuente y el tratamiento del cuello de manera profiláctica es controvertido. Los pacientes N0 al diagnóstico se beneficiarían de un tratamiento profiláctico con RT si el riesgo de enfermedad cervical subclínica excediese el 15-20%, es decir si se afectara la

mucosa oral, mejilla, rinofaringe o fosa infratemporal³². En los pacientes con ganglios positivos el tratamiento quirúrgico, con RT o combinado del cuello es obligatorio³⁹.

1.1.8. Pronóstico

El pronóstico^{1,8,32,33,36} de los CENS en su conjunto es malo, con una supervivencia global a los 5 años del 30-50%. A diferencia de otros tipos histológicos, los pacientes fallecen tempranamente pues la recidiva local, generalmente, no puede ser controlada.

El peor pronóstico¹ aparece en el carcinoma epidermoide etmoidal con una supervivencia del 48% a los 5 años, frente al 62% en el seno maxilar y al 77% en la fosa nasal. La mayor supervivencia en el carcinoma de fosas nasales está relacionada con su diagnóstico precoz³.

La supervivencia a 5 años está íntimamente relacionada con el tamaño tumoral⁴⁰: 80-90% para los T1, 55% para los T2, 50% para los T3 y 27% para los T4, aunque las cifras varían según las series publicadas^{1,6,33}. La invasión de la base del cráneo, cavum y pterigoides se considera de mal pronóstico^{4,8,32,41}.

La recidiva local es la primera causa del fracaso del tratamiento (50-60% de los casos) y por tanto de su mortalidad^{1,32}. La mayoría de las recidivas aparecen antes de los dos años tras el tratamiento. Las posibilidades de recidiva se duplican en el caso de estadios avanzados^{42,43}.

La frecuencia global de metástasis ganglionares oscila entre el 5-10%. Existe relación entre las metástasis ganglionares y el grado de diferenciación histológica, siendo más frecuentes en los tumores con menos diferenciación⁴⁴. La presencia de metástasis ganglionares es un factor de muy mal pronóstico con supervivencias de 6 a 12 meses^{8,32}.

Las metástasis a distancia son excepcionales (menos del 5%), siendo su pronóstico ominoso³³.

1.2. Estado actual

A continuación sólo haremos mención a los aspectos de citogenética y biología molecular que tienen interés para nuestro trabajo de investigación. En primer lugar haremos una descripción general a las alteraciones observadas en los CECC, puntualizando aquellos aspectos observados en los CENS. Posteriormente nos centraremos en el estudio de los receptores ERBB y en sus inhibidores.

1.2.1. Biología molecular y citogenética de los CECC. Aspectos concretos de los CENS.

En este apartado cuando nos referimos a los CECC estamos describiendo características que han sido estudiadas y descritas en los carcinomas escamosos de laringe y de faringe, que por frecuencia, han sido los CECC más estudiados.

Los CECC y los CENS son neoplasias sólidas heterogéneas caracterizadas por presentar múltiples y complejas alteraciones genéticas y moleculares que afectan a un amplio número de oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores del ADN. Sin embargo, en estadios precoces o en lesiones preinvasivas se observan alteraciones más sencillas en el cariotipo⁴⁵. Además, existen mecanismos epigenéticos que intervienen en su oncogénesis.

El conocimiento de la biología molecular de los CECC aporta valiosa información acerca de la carcinogénesis y progresión tumoral, desde etapas iniciales, lo cual permite diseñar estrategias de diagnóstico precoz. Los marcadores moleculares permiten individualizar tratamientos y monitorizar su respuesta, así como controlar el seguimiento de los pacientes. El desarrollo de fármacos dirigidos a dianas moleculares (Cetuximab) ha permitido ampliar el arsenal terapéutico en el tratamiento de los CECC.

En relación a los CENS, el pequeño número de casos incluidos en la mayoría de las series publicadas no ha permitido establecer correlaciones entre las alteraciones génicas y citogenéticas con el pronóstico, tratamiento y seguimiento. No obstante, a pesar de tener escaso impacto clínico, en algunos estudios se ha observado como los pacientes que tenían tumores con alto número de alteraciones cromosómicas tuvieron peor pronóstico^{46,47}.

Aunque los CECC y los CENS tienen diferencias etiológicas, la mayoría de las aberraciones cromosómicas identificadas hasta la fecha, como veremos a

continuación, afectan a loci cromosómicos similares a los previamente descritos en los CECC^{48,49}. Este hecho podría ser relevante en la aplicación de terapias biológicas en los CENS, como ya se están utilizando en los CECC.

En un principio el estudio de la biología molecular de los tumores tuvo como punto de partida la carcinogénesis colorrectal⁵⁰. Posteriormente se desarrollaron modelos de progresión propios del CECC en los tumores de cavidad oral, laringe y faringe^{51,52}. Todos estos modelos se basan en la acumulación de eventos genéticos y epigenéticos que en la mucosa normal, sobre la cual inciden los agentes carcinogénicos, harían que se desarrollase la progresión hacia una neoplasia maligna. Esta transformación celular es debida a un desbalance entre diversos oncogenes y genes supresores de las células en la mucosa de las VAS por el cual, una célula adquiere un fenotipo tumoral⁵³, se divide incontroladamente y forma un clon que, progresivamente, va acumulando más alteraciones en su genoma, generándose la neoplasia.

Aunque muchos de estos genes, vías metabólicas y mecanismos de acción ya han sido identificados^{46,54}, se siguen proponiendo nuevos genes candidatos en la carcinogénesis de estos tumores, dada la gran cantidad y complejidad de las alteraciones existentes.

Entre las alteraciones moleculares más destacadas en los CECC y CENS tenemos las siguientes:

La amplificación de 11q13 es la activación oncogénica más frecuentemente descrita en los CECC (30-60% de los casos)⁵⁵. Los posibles oncogenes identificados en esta región son el *HST1*, relacionado con el factor de crecimiento fibroblástico; el *INT2*, que codifica el factor de crecimiento fibroblástico 3; el *CCND1/PRAD1*, que codifica la ciclina D1 y el *CTTN (EMS1)*, que codifica una proteína de adhesión celular llamada cortactina. Al estudiar la expresión génica de los CECC, parece que los oncogenes activos del amplicón son *CCND1* y *CTTN*. El *CCND1* es un oncogén conocido que se expresa en la fase G1 del ciclo celular, siendo necesario para que la célula progrese hacia la fase S. En cuanto al gen *CTTN*, dado que su producto participa en los procesos de interacción celular, la alteración de sus propiedades podría conducir a un incremento de la capacidad metastásica. La amplificación de la región 11q13 también ha sido descrita en los CENS⁴⁸, lo cual podría constituir una característica común a todos los CECC.

La pérdida del cromosoma 9p21 es la alteración más frecuente en los CECC (70% casos), produciéndose en las fases iniciales de la progresión tumoral⁵⁶. En este cromosoma se sitúan diversos genes supresores de tumor como *p14*, *p15*, *p16* (*CDKN2A*), *p18* y *p19*, relacionados con la progresión del ciclo celular y los fenómenos de senescencia. Su pérdida facilita, por tanto, la progresión hacia fenotipos de malignidad desde la hiperplasia epitelial. La pérdida de función de *p16* se ha encontrado hasta en un 83% de los casos analizados^{57,58}.

El gen supresor de tumores *TP53* (17p13) se ha encontrado mutado en una gran variedad de tumores y se considera que juega un papel crucial en la patogénesis de muchos, sino de todos, los cánceres humanos⁵⁹. En los CECC se halla una función anormal de *TP53* hasta en el 79% de los casos⁶⁰, siendo, además, un fenómeno de aparición temprana en la carcinogénesis, observándose ya en lesiones displásicas⁶¹. Las mutaciones de *TP53* se han relacionado con el tabaco y el alcohol, los cuales al ser los principales factores etiológicos de los CECC, puede que ejerzan su efecto carcinogénico a través de dicho gen. En los CENS existen mutaciones en *TP53* y sobre-expresión de p53 en el 56% de los casos^{62,63,64}. La mayoría de los autores han demostrado una asociación entre la sobre-expresión de p53 y un peor pronóstico. Además, la sobre-expresión de p53 podría ser considerada como marcador de CENS en la posible transformación de maligna de los papilomas invertidos, puesto que en éstos, su sobre-expresión es infrecuente⁶⁵.

Uno de los estudios más amplios acerca de las alteraciones génicas en los CENS ha sido hecho por Bandoh *et al*⁶³, que sugieren la relación entre la mutación de *TP53* y el bajo índice apoptótico con el peor pronóstico de estos pacientes. Las mutaciones en *TP53* podrían conferir resistencia a la RT y a la QT. Por el contrario, una elevada tasa de apoptosis, con sobre-expresión de BAX, favorecería la respuesta a la RT y mejoraría el pronóstico de los pacientes⁶⁶.

El oncogén *ERBB1* (7p12) se encuentra frecuentemente amplificado y/o sobre-expresado en los CECC, siendo el que codifica el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)⁶⁷. Su activación estimularía el crecimiento y la proliferación celular incontrolada. Las distintas cascadas de señalización originadas en este receptor están mediadas asimismo por oncogenes (*PI3K*, *STAT3*), que pueden estar activados de forma independiente. Se ha observado amplificación y/o sobre-expresión de alguno de los componentes de estas vías en más del 50% de los casos de CECC⁶⁸.

El oncogén *ERBB2* (17q21.1) codifica un receptor asociado a tirosín-quinasa y pertenece a la misma familia de receptores que el EGFR. Su alteración es frecuente en carcinomas de mama y en algunos carcinomas de pulmón. En los CECC se ha visto alterado en el 40% de los tumores de cavidad oral⁶⁹.

También se han descrito en los CECC, aunque con menos frecuencia, activaciones de otros oncogenes como *MYC*, la familia *RAS*, *BCL-2* y *BCL-X⁷⁰*, de vías celulares como la WNT/ β -catenina y ganancias en regiones cromosómicas como 3q, 5p y 20q.

En CENS también se estudiaron *RAS*, *p21*, *p27*, *PCNA*, *BAX* y *BCL*. El gen supresor *CDKN1B* (12p13.1-p12) codifica la proteína p27 que impide el progreso del ciclo celular. Su sobre-expresión se ha relacionado con un mayor índice de apoptosis, mientras que su pérdida produce un incremento en la proliferación celular. Es por tanto un marcador de disregulación de la cinética celular en los CENS⁷¹. De manera análoga, la pérdida de expresión de *CDKN1A* (gen supresor que codifica la proteína p21), bien por alteración de p53 o bien por una ruta independiente, se relaciona con el aumento de la proliferación celular⁷².

Las mutaciones en *KRAS* son infrecuentes en los CENS y ocurren en el 1% de los casos⁷³. Asimismo se ha estudiado la expresión de COX2, encontrándose que es baja, dato que no apoyaría el posible papel de la inflamación crónica en la génesis de los CENS⁶⁴.

Además de las alteraciones descritas en los mencionados genes supresores, también se ha demostrado la existencia de regiones frecuentemente delecionadas en los CECC, lo que hace suponer que en ellas se localizan genes supresores de tumores. Estas regiones son 3p14-21 (*FHIT*, *RASSF1A9*), 4q26-28, 6p, 8p21-23, 11q22-24, 13q14-21, 14q31-32 y 18q21. En los CENS Gotte *et al.* por medio de estudios con LOH han visto pérdidas en 3p, 8p y 18q⁷⁴ y, otros autores, en estudios con reducido número de casos, identificaron aberraciones estructurales que implican múltiples cromosomas (pérdidas en 6q y ganancias en 3q y 11q). Gil *et al.*, además, describen la translocación t(12q13;17p13), con lo que podrían verse alterados 2 genes que mapean en esas regiones como son *TP53* (17p13) y el oncogén *CREB/ATF1* (12q13)⁴⁷.

Se han hecho 2 estudios^{75,76} acerca de la posible implicación de la inestabilidad de microsatélites en la génesis de los CENS, encontrándose tasas que van del 21 al 41% de los casos. Estas cifras, similares a las halladas en el conjunto de los CECC,

no se correlacionan con ninguna variable clínica, aunque indican que la inestabilidad de microsatélites podría estar involucrada en la patogenia de los CENS.

Otros procesos propios de la progresión de los CECC incluyen la invasión y metástasis. Así, por ejemplo, es frecuente la sobre-expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el cual se induce en condiciones de hipoxia y estimula la angiogénesis, favoreciendo la progresión y la metástasis tumoral⁷⁷. En los CENS la expresión de VEGF, dependiente de las alteraciones en p53, se asocia con un aumento en la angiogénesis tumoral, una disminución de la tasa de apoptosis y un incremento en el desarrollo de metástasis⁶².

En los CECC también se ha visto baja expresión de moléculas de adhesión celular como CD44 y el complejo E-cadherina-cateninas⁷⁸, sobre-expresión de la quinasa de adhesión focal (FAK)⁷⁹ y de colagenasas y metaloproteasas, moléculas necesarias para la invasión tumoral⁸⁰.

Finalmente, en nuestro laboratorio hemos realizado un estudio⁸¹ amplio del genoma de los CENS, mediante arrays-CGH y MLPA, para intentar identificar las “zonas calientes” (“hot spot”) del genoma y genes implicados en la carcinogénesis. El número de pacientes incluidos en este estudio podría ser escaso, pero considerando que los CENS son tumores infrecuentes, los resultados obtenidos pueden servir de punto de partida para un estudio molecular más específico.

1.2.2. Receptores ERBB

El conocimiento de los receptores ERBB y sus vías de señalización ha permitido el desarrollo de nuevos enfoques diagnósticos y terapéuticos en diversos tipos tumorales, entre ellos los CECC.

La familia de receptores de crecimiento C-erbB son receptores transmembrana con un dominio intracelular con actividad tirosín- kinasa (TK). Esta familia está formada por 4 miembros: el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o c-erbB-1, c-erbB-2/neu/HER2, c-erbB-3/HER3 y c-erbB-a/HER4. La unión del ligando a su receptor induce una serie de cascadas de señales intracelulares involucradas en el desarrollo y progresión del cáncer, la regulación de la proliferación celular, la diferenciación, el crecimiento, la supervivencia, la angiogénesis, la invasión y el desarrollo de metástasis.

Se han descrito más de 30 ligandos distintos con acción en los distintos receptores. La unión del ligando a su receptor, que se encuentra inactivo en forma

monomérica en la superficie celular, induce bien su homo o heterodimerización y subsiguientemente se autofosforilan o fosforilan a receptores adyacentes, activándolos. Este paso desencadena una serie de cascadas moleculares simultáneas que inducen la transcripción génica.

En las células tumorales se producen múltiples ligandos de manera autocrina, paracrina y yuxtacrina que, junto con la activación del receptor independiente de ligando, favorecen la proliferación celular. Algunos de los ligandos descritos son el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante alfa ($TGF\alpha$), la betacelulina (BTC), el factor de crecimiento epidérmico que une heparina (HB-EGF), la anfirregulina (AR), epirregulinas (EPI), herregulinas (HRG) y neurorregulinas (NRG). Todos ellos se han encontrado sobre-expresados en los CECC. Una vez activado el receptor se desencadenan complejas rutas intracelulares como puede observarse en la figura 4, dentro de las cuales hay que señalar las vías *RAS/RAF/MAPK* y *PI3K/AKT*, que también son susceptibles de ser activadas independientemente de la activación del receptor ERBB. Es importante destacar la interrelación entre las vías, las cuales pueden ser moduladas a su vez por otras rutas como las que implican las proteínas STATs, PTEN y fosfolipasa C. Todas estas moléculas participan en la oncogénesis de los CECC al comportarse bien como oncogenes o como genes supresores de tumores. Asimismo, los receptores ERBB pueden ser activados de manera cruzada por otros receptores como los asociados a proteínas G, que utilizarían las cascadas celulares iniciadas en los receptores ERBB para transducir y amplificar su señal.

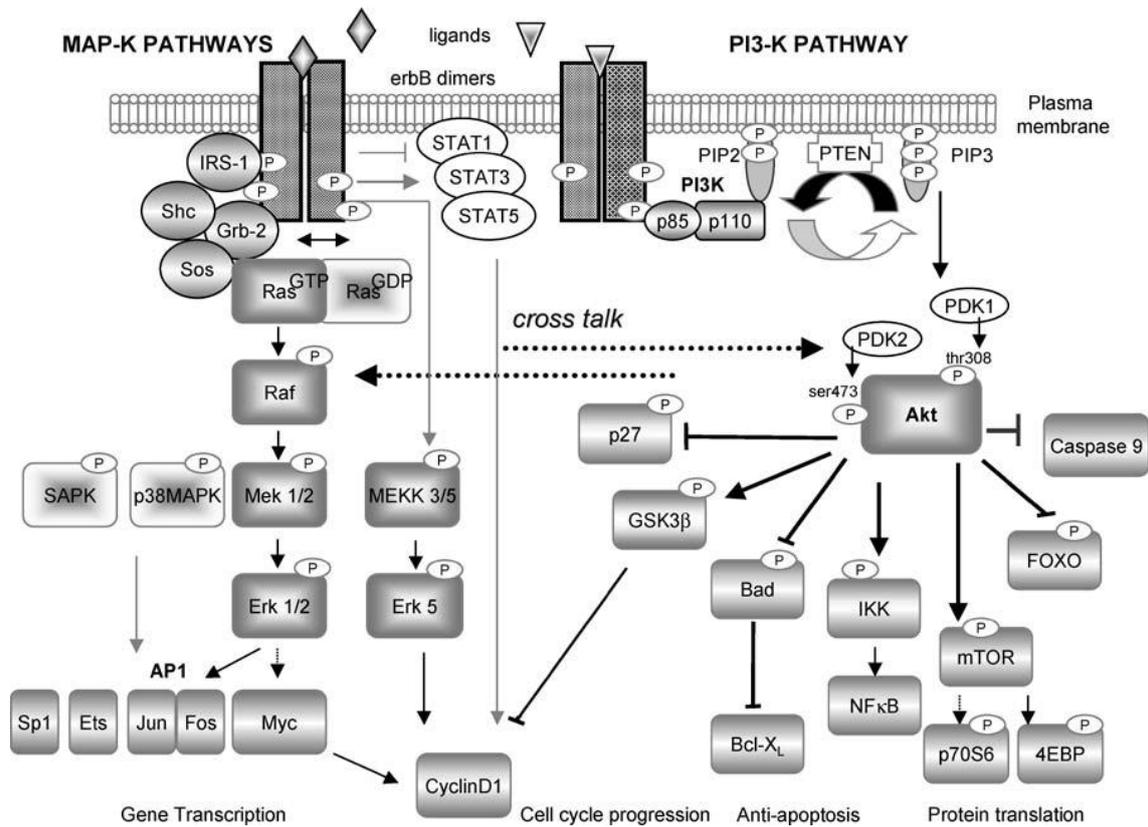


Figura 4. Rutas de señalización intracelular de los receptores de la familia ERBB
 Tomada de *Cancer and Metastasis Reviews* 2005;24:47–69

Aparte de su funcionamiento como receptores de membrana, se han identificado moléculas de EGFR, HER2 y HER3 con acción directa en el núcleo, en donde interactuarían con diversas moléculas como STAT3, activando genes como el de la óxido nítrico sintetasa (iNOS).

Dentro de los receptores de la familia ERBB, el receptor más estudiado es el EGFR y las diferentes cascadas de señalización intracelular derivadas de su activación. La actividad oncogénica de esta ruta molecular tiene un papel destacado en el desarrollo de la mayoría de las neoplasias epiteliales, incluyendo los CECC⁸².

La sobre-expresión del EGFR y de uno de sus ligandos principales, el TGF α , se identifica hasta en un 50% de los CECC. Sus niveles son más elevados en tumores pobremente diferenciados y en estadios avanzados, por lo que se correlaciona con un mal pronóstico. Se puede apreciar un aumento de EGFR en la mucosa adyacente a las áreas tumorales, lo que apoyaría la teoría del campo de cancerización y, además, el paso de displasia a carcinoma *in situ* se relaciona con un importante aumento de los niveles de EGFR.

La sobre-expresión de EGFR en los CECC se produce como resultado de un incremento en su síntesis y/o en una disminución de los fenómenos “downregulation”. El incremento de la síntesis de EGFR se debe a fenómenos de disregulación de p53, a polimorfismos del gen y, en menor medida, a su amplificación. La disminución de los fenómenos de “downregulation” podría estar causada por la sobre-expresión de cortactina, hecho frecuente en los CECC. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en otros carcinomas escamosos, las mutaciones activadoras en *EGFR* son infrecuentes, lo que condiciona las terapias moleculares.

El otro mecanismo importante de activación del EGFR es la autocrina o paracrina por ligandos (EGF, HB-EGF, TGF α , AR, BC, HR), los cuales se sobre-expresan en los CECC.

La activación de la vía del *EGFR* también se ha relacionado con la exposición al humo del tabaco ya que éste induce la síntesis de enzimas como la ciclooxigenasa 2 (COX2). Esta enzima favorece la síntesis de mediadores de la inflamación como la prostaglandina E2, que activa receptores asociados a proteínas G y transactivan el *EGFR*. Además, incrementa los niveles de ligandos como el TGF α y la AR, relacionando así al EGFR con la inflamación.

Por todo lo dicho la participación del EGFR en el proceso de carcinogénesis de los CECC está bien definida, pero no se puede decir lo mismo en cuanto a los CENS.

Respecto a los CENS se debe recordar que la fosa nasal y los senos paranasales son la primera barrera atravesada por el aire y las sustancias inhaladas durante la respiración, por lo que su mucosa está expuesta a un elevado número de potenciales agentes lesivos. En la mucosa nasal se ha identificado una gran expresión de los receptores de la familia ERBB (a excepción de *HER4*) y de varios de sus ligandos, tanto en células basales como en el resto del epitelio, dado que desempeñan un papel importante en el mantenimiento y reparación de los epitelios⁸³. Además, se ha comprobado que, en los procesos inflamatorios crónicos nasosinuales, existe una activación de la vía del EGFR por sobre-expresión, tanto del receptor como de sus ligandos, que promueve la secreción de mucinas para mantener la homeostasis del epitelio⁸⁴.

En 1991 Furuta *et al.* asociaron por primera vez la amplificación de *EGFR* con los CENS, aunque no pudieron establecer ninguna relación con las variables clínicas⁸⁵. Posteriormente en 1993, Miyaguchi *et al.* relacionaron la sobre-expresión del EGFR en

carcinomas epidermoides de seno maxilar con un mayor índice de recidivas locales⁸⁶ y con la adquisición de resistencia a la RT⁸⁷.

En los papilomas invertidos, como supuesta lesión precursora de los CENS, se ha intentado identificar marcadores de esa transformación. Así, se observó un aumento de la expresión de EGFR en relación a la mucosa normal, pero no hubo incremento respecto a los CENS, por lo que no se considera marcador de malignización⁸⁸. Esto difiere de lo encontrado en los CECC, particularmente en la laringe, donde EGFR aumenta su expresión al pasar de mucosa normal a mucosa displásica y de ésta a carcinoma.

El otro receptor de la familia ERBB más estudiado es el HER2. La amplificación y/o sobre-expresión de este receptor es más frecuente en los adenocarcinomas. Así, en los adenocarcinomas de mama han sido identificadas formas truncadas de este receptor que lo mantienen constitucionalmente activo y que se relacionan con el desarrollo de metástasis ganglionares y peor pronóstico. En los CECC⁶⁷ se aprecia una ganancia del receptor en el 3-60% de los casos, la mayor parte de las veces, asociado a sobre-expresión de otros receptores ERBB, lo que sugeriría la formación de heterodímeros. Sin embargo, no se han encontrado amplificaciones de este receptor en estos tumores.

El receptor HER2 (así como el HER3) podría estar implicado en los mecanismos de sensibilización a los inhibidores de la tirosín-quinasa (TKIs) y favorecería la estabilidad y actividad del EGFR en la superficie celular. El HER2 formaría heterodímeros con el EGFR, favoreciendo la activación continua de la ruta PI3K/Akt. Las pequeñas moléculas inhibitoras de la tirosín-quinasa (TKIs) impedirían la activación de dicha ruta y de ese modo inhibirían el crecimiento celular. Sin embargo, cuando HER2 no se expresa en la superficie celular, la activación de la vía es independiente de EGFR y por tanto los TKIs pierden efectividad.

La participación de HER2 en la génesis de los CENS no está aclarada, si bien su expresión en la mucosa nasal ha sido demostrada, como se dijo anteriormente, y existe un estudio en el que se observa su sobre-expresión en los carcinomas de seno maxilar⁸⁹.

En el estudio realizado previamente en nuestro laboratorio hemos observado casos con amplificación de la región 7p12 en la cual se localiza el gen que codifica EGFR. Asimismo, en algunas muestras, hemos visto amplificación del gen *HER2*⁸¹. El estudio de la participación de estos dos genes en la carcinogénesis de los CENS

podría ser de utilidad para su uso como dianas terapéuticas en el tratamiento de este tipo tumoral.

1.2.2.1. Inhibidores de los receptores ERBB

La implicación de EGFR en la patogénesis de los CECC está bien demostrada, aunque no lo está aún la de HER2. Su sobre-expresión se correlaciona con factores de mal pronóstico e incluso se usa para indicar la utilización de terapias moleculares dirigidas contra dicho receptor. Estos datos hacen referencia a los CECC más frecuentes como son los de laringe y faringe, no existiendo hasta el momento actual datos respecto a estas terapias moleculares en los CENS.

Desde los años 80 se han diseñado varias estrategias de tratamiento dirigido contra los receptores de la familia ERBB, dada su gran implicación en la carcinogénesis. Existen 2 familias de moléculas que han sido testadas con éxito y con aplicaciones terapéuticas: los anticuerpos monoclonales anti-EGFR y las TKIs⁹⁰.

El anticuerpo anti-EGFR utilizado en los CECC es el Cetuximab, el cual se une al receptor de manera específica y previene unión de otros ligandos y su dimerización. El anticuerpo induce la internalización del receptor, los fenómenos de “downregulation”, su degradación y desencadena una respuesta inmune citotóxica dependiente de anticuerpo.

Existen 2 moléculas principales del grupo de las TKIs, el Erlotinib y el Gefitinib, aunque sólo está aprobado el primero para su uso terapéutico en los CECC. Los TKIs compiten de manera reversible con el ATP por el sitio de unión al dominio intracelular del receptor, por lo que impiden la autofosforilación y por tanto su activación. No inducen su degradación ni desencadenan respuesta inmune en el huésped.

A pesar de la sobre-expresión de EGFR (y/o HER2) y de su importante papel en la patogénesis de los carcinomas epiteliales en general y en los CECC en particular, las terapias biológicas dirigidas contra estos receptores tienen una efectividad limitada, con tasas globales de respuesta del 5-15%, como tratamientos únicos⁹¹. Esto se debería al reducido número de mutaciones activadoras en estos genes en las VAS y a la activación de vías intracelulares independientes del EGFR, a diferencia de lo que ocurre en otras localizaciones como el pulmón.

La sensibilidad al Cetuximab en los carcinomas de colon, donde ha sido ampliamente estudiada, se asocia con la presencia de elevados niveles del ARN mensajero de las anfirregulinas y epirregulinas, las cuales son ligandos de estos

receptores, la ausencia de mutaciones en *K-RAS* y el incremento en el número de copias de *EGFR*⁹².

Como se ha mencionado anteriormente, entre las causas por las que el tratamiento con Cetuximab no es efectivo en determinados pacientes, la presencia de mutaciones en el exón 2 del oncogén *K-RAS* es la más frecuente y la más estudiada, sobre todo en los carcinomas colorrectales y carcinomas de pulmón^{93,94}. En los CECC las mutaciones en *K-RAS* son infrecuentes, aunque se han observado en determinados grupos de pacientes con carcinomas orales⁹⁵. Además, las mutaciones en este oncogén se han relacionado con fenómenos de resistencia a QT y RT convencional en carcinomas de pulmón y colorrectales, lo cual no ha sido demostrado en los CECC⁹⁴.

Además, la mutación de *EGFRvIII*, la disregulación de la internalización del receptor y el incremento de la dimerización de los receptores HER2 y HER3, son marcadores de la resistencia al tratamiento con Cetuximab.

En los CECC la sensibilidad a los TKIs en general, y al Gefitinib en particular, se asocia con la presencia de amplificaciones de *EGFR* y de mutaciones de *HER2*, respectivamente. La resistencia al Gefitinib en los CECC se asocia incrementos en la expresión de HER2 y HER3, la cortactina y la ciclina D1.

En general, aunque se han intentado buscar marcadores comunes de sensibilidad y resistencia a estos fármacos en diversos tipos de tumores, se ha visto que estos mecanismos son distintos entre los distintos tumores y localizaciones.

Para **resumir** los puntos clave de la introducción sobre los que formularemos nuestras hipótesis estos se concretan en:

1) Los CENS tienen escasa incidencia en nuestro medio, su diagnóstico suele ser tardío y su tratamiento complejo, permaneciendo las cifras de supervivencia estancadas en los últimos años.

2) El aspecto fenotípico (histopatológico) de los CENS es similar al del resto de los CECC, sin embargo en su etiología no se registra habitualmente el consumo de tabaco y alcohol.

3) El aspecto genotípico de los CENS (perfil génico) no ha sido aún suficientemente estudiado, aunque parece presentar, a grandes rasgos, un patrón similar al de los CECC.

4) Se han venido desarrollando diversos tipos de terapias moleculares que inhiben los receptores ERBB que se están aplicando a los CECC, pero no hay ninguna experiencia de su uso en los CENS.

1.3. Modelo teórico

Los agentes carcinógenos inhalados actuarían sobre las células de la mucosa respiratoria de las fosas y senos paranasales produciendo cambios a nivel génico. Estas células sufrirían un proceso lento y progresivo de transformación neoplásica, que podría reflejarse en cambios histopatológicos, como metaplasia y displasia, previos a la adquisición del fenotipo tumoral de carcinoma epidermoide, o bien llegar a éste directamente a partir de células madre tumorales. El cúmulo de daños en el material genético celular precipitaría el proceso de carcinogénesis y la progresión propia de la neoplasia (Figura 5).

Entre las alteraciones génicas observadas en la carcinogénesis, el aumento en el número de receptores de crecimiento es un fenómeno frecuente que puede estar relacionado no sólo con los fenómenos de iniciación tumoral, sino también con los de progresión, como son la invasión y metástasis. Estos receptores confieren a la célula tumoral epitelial una condición especial de agresividad (invasión local a SNC, órbita, recidivas, metástasis en ganglios y/o a distancia) que condiciona el pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, la presencia de estos receptores podría ser de utilidad al poder administrar sus inhibidores como terapia biológica complementaria. Ampliaríamos así el arsenal terapéutico frente los CENS y probablemente contribuiríamos a mejorar el pronóstico de la enfermedad y la supervivencia de los pacientes.

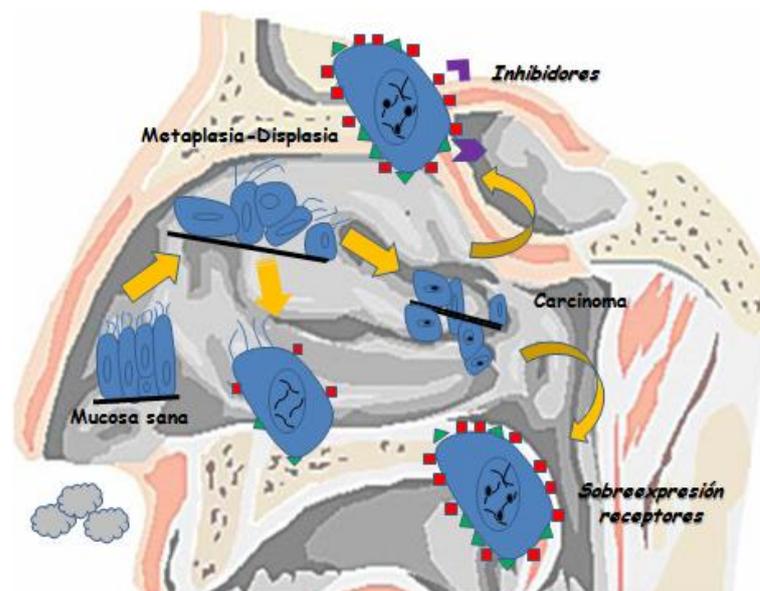


Figura 5. Esquema del modelo teórico de carcinogénesis de los CENS

2

HIPÓTESIS

1. Los CENS tienen unas características epidemiológicas, etiológicas y clínicas marcadamente distintas al resto de CECC, sin embargo su patrón histopatológico es similar.
2. El conocimiento del perfil génico de los CENS permitiría establecer similitudes y diferencias respecto a los carcinomas de faringe y laringe, que podrían estar condicionadas por los agentes etiológicos y condicionar el resto de sus características clínicas.
3. En los tumores epiteliales (pulmón, mama, gastrointestinales, vejiga) los receptores ERBB (EGFR, HER2) tienen un papel importante en la carcinogénesis y en la progresión tumoral. La participación del EGFR ha sido confirmada en los carcinomas de faringe y laringe y se ha relacionado con el crecimiento tumoral, los fenómenos de invasión, metástasis y angiogénesis. Todos estos factores condicionan el pronóstico y la supervivencia, sin embargo estos receptores no han sido demostrados en los CENS.
4. Los resultados obtenidos con fármacos antagonistas de estos receptores ha permitido que entren en los protocolos terapéuticos de los tumores epiteliales, incluidos los carcinomas de faringe y laringe, pero aún no se han ensayado en los CENS, donde podrían tener indicaciones precisas.
5. El conocimiento de la expresión del EGFR y del HER2 en los CENS permitiría establecer relaciones con las variables clínico-patológicas y seleccionar aquellos casos susceptibles de ser tratados con los antagonistas de los receptores.

3

OBJETIVOS

1. Describir los aspectos clínico-patológicos más importantes de nuestra serie de pacientes con CENS.

2. Identificar los casos con alteraciones en el número de copias de los genes *EGFR* y *HER2*, mediante análisis con MLPA (amplificación múltiple de sondas dependiente de ligación) y FISH (hibridación *in situ* con fluorescencia), en las muestras tumorales de los pacientes de nuestra serie.

3. Determinar, mediante IHQ la expresión de EGFR y/o HER2 en las mismas muestras tumorales.

4. Relacionar las alteraciones génicas con la expresión proteica con el fin de determinar si el mecanismo responsable de la sobre-expresión de EGFR y HER2 se encuentra a nivel genómico.

5. Relacionar las alteraciones génicas y los patrones de expresión proteica con las variables clínico-patológicas, especialmente con el pronóstico de la enfermedad y la supervivencia de los pacientes.

4

**MATERIAL Y
MÉTODOS**

4.1. Sujetos a estudio

Se estudiaron de forma retrospectiva 50 casos de CENS tratados en los Servicios de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Central de Asturias (29) y del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid (21).

Todos los pacientes fueron intervenidos con fines curativos entre noviembre de 1989 y octubre de 2006, decidiendo entonces, según la estadificación tumoral y del resultado quirúrgico, la necesidad o no de recibir tratamientos complementarios (RT, QT o cirugía). Algunos de los pacientes (27) habían recibido tratamiento quirúrgico previo sobre el tumor primario en su hospital de referencia. Ningún caso fue tratado con QT o RT preoperatoria.

En todos los pacientes se constató un historial clínico bien documentado y el diagnóstico anatomopatológico de carcinoma epidermoide fue realizado sobre la pieza de resección quirúrgica por un patólogo experimentado en cabeza y cuello en el Servicio de Anatomía Patológica.

El seguimiento mínimo fue de 13 meses o hasta la muerte del paciente, con una mediana de 17 meses.

De esta muestra inicial de 50 pacientes se realizaron algunos subgrupos sobre los cuales se realizaron diversas técnicas de biología molecular. La separación de estos subgrupos se debió principalmente a la cantidad y calidad de material tisular disponible, a la incorporación progresiva de pacientes y a la búsqueda de resultados específicos según los procedimientos empleados.

4.2. Recogida de muestras

Las muestras estudiadas procedían de 50 CENS primarios, excluyendo los tumores originados en el septum y en el vestíbulo nasal. El trabajo de laboratorio se realizó en el Laboratorio de Otorrinolaringología del Instituto Universitario de Oncología de la Universidad de Oviedo (IUOPA).

Para el estudio génico se realizó la técnica de MLPA en los 50 casos con el fin de identificar las posibles ganancias y/o amplificaciones en los genes *EGFR* y *HER2*. Además, en 29 casos se realizó la técnica citogenética de FISH para analizar las posibles alteraciones en *EGFR* y en 19 casos para analizar las de *HER2*.

Tras el estudio a nivel genético se hicieron estudios de expresión proteica de EGFR y HER2 en los 50 casos de CENS. En 29 casos la IHQ se llevó a cabo por medio de un “tissue-array” y en los 21 casos restantes se hizo de manera convencional.

Para la realización de los estudios mediante FISH e IHQ todas las muestras del tumor primario fueron obtenidas a partir de los bloques de parafina. Para el estudio por MLPA se recogieron de dos maneras:

1- *Muestras en fresco*. Se obtuvieron de 7 casos durante la intervención quirúrgica, extrayendo una por paciente. La muestra tenía un tamaño mínimo de 3 mm³ y procedía de una zona tumoral sin necrosis, evitando el tejido sano de los bordes, con el fin de alcanzar un mínimo del 70% de pureza en células tumorales. Una vez extraída se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido hasta que fue procesada, o se almacenó en RNA-later (en los casos más recientes).

2- *Muestra en parafina*. Se obtuvo de 43 casos de los bloques de parafina, una vez procesada la pieza para su estudio histopatológico en el Servicio de Anatomía Patológica.

Las muestras control para la realización de la MLPA se obtuvieron de ganglios linfáticos libres de tumor incluidos en parafina pertenecientes a dos pacientes.

4.3. Extracción del ADN

Para la realización de los estudios de MLPA se procedió a la extracción del ADN a partir de las muestras obtenidas.

Los protocolos de extracción de ADN para todas las muestras se realizaron en base al uso de columnas de afinidad (QIAamp®, QIAgen, Valencia, CA, USA). Este “kit” contiene dos tampones de lisis (ATL y AL), dos tampones de lavado (AW1 y AW2) y un tampón de elusión (AE).

4.3.1. A partir de tejido fresco

Las muestras tumorales se descongelan a temperatura ambiente en una placa Petri y, con ayuda de dos bisturís, se disgregan mecánicamente cortándolas en pequeños fragmentos que son depositados en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.

A continuación se realiza el lisado añadiendo 200 μ L del tampón de lisis ATL (QIAamp tissue extraction kit, Qiagen) y 20 μ L de proteinasa K (concentración de almacenamiento: 10mg/mL). Se mezcla bien en un agitador y se deja incubando a 56°C en una placa térmica con agitación. Por la tarde se vuelven a añadir otros 20 μ L de proteinasa K, se mezcla bien y se deja incubando a 56°C toda la noche.

A la mañana siguiente se añaden 200 μ L de tampón AL (Qiagen), se agita enérgicamente y se incuba a 70°C durante 10 minutos. A continuación se añaden 200 μ L de etanol absoluto y se agita enérgicamente durante 15 segundos para precipitar el ADN. Posteriormente se aplica el contenido del tubo de microcentrífuga a una columna de afinidad (QIAamp®) que se coloca en un tubo de recolección de 2 mL. La columna y el tubo de recolección se centrifugan durante 1 minuto a 8.000 rpm y el filtrado es eliminado. Posteriormente se procede a la purificación del ADN añadiendo sobre la columna 500 μ L del tampón AW1, centrifugando a 8.000 rpm durante 1 minuto. Tras eliminar el filtrado se continúa con un segundo lavado añadiendo a la columna 500 μ L del tampón AW2 y centrifugando a 14.000 rpm durante 3 minutos. Se coloca la columna de afinidad en un nuevo tubo de microcentrífuga y se añaden 200 μ L de agua destilada para eluir el ADN de la columna. Se incuba durante 1 minuto y se centrifuga 1 minuto a 8.000 rpm. Finalmente se almacena el ADN a 4°C.

La concentración y la pureza del ADN obtenido se determinan midiendo su absorbancia a 260 nm y a 280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (versión 3.1.0), (NanoDrop Technologies Inc.). La absorbancia a 260 nm nos indica la concentración de ADN que tenemos en nuestra muestra y la relación A260/A280 el grado de pureza de la muestra. Se consideran aceptables purezas con valores mayores de 1,5 (óptimo 1,7-1,9).

Mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% se puede comprobar que la extracción de ADN ha sido correcta.

4.3.2. A partir de tejido en parafina

De las muestras incluidas en parafina se obtienen 3 cortes de 50 μ m. También se hace un corte de 5 μ m que se tiñe con hematoxilina-eosina con el fin de observar la muestra al microscopio óptico para seleccionar la zona tumoral más pura, evitando contaminaciones por necrosis, tejido y células sanas como linfocitos y fibroblastos. Según esta selección se realiza la microdisección en los tres portas de 50 μ m, recogiendo el material en un tubo de microcentrífuga.

El primer paso consiste en desparafinar la muestra. Se incubó la muestra en 1 mL de xilol a 55°C durante 10 minutos, centrifugando a 14.000 rpm otros 10 minutos para eliminar los restos de parafina. Repetimos dos veces más la incubación con xilol y a continuación añadimos 1 mL de metanol, incubando la muestra 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 2 ciclos de centrifugación a 14.000 rpm durante 10 minutos a 45° descartando el sobrenadante. Añadimos 1 mL de etanol absoluto, agitamos bien y centrifugamos a 14.000 rpm otros 5 minutos. Tras decantar el sobrenadante, dejamos secar al aire el tejido depositado en el fondo del tubo de microcentrifuga.

A continuación se añade 1 mL de tiocianato sódico, 1M para limpiar el ADN y, tras mezclar bien en un agitador, se deja incubando toda la noche a 37°C en una placa térmica con agitación. A la mañana siguiente se centrifugan los tubos durante 5 minutos a máxima velocidad y se decanta el sobrenadante. Seguidamente se añade 1 mL de PBS para lavar y eliminar los restos de tiocianato sódico de los tubos, se mezcla bien, se centrifuga y se decanta el sobrenadante. Tras repetir una vez más este lavado con PBS, los tubos son centrifugados de nuevo para retirar todo el posible PBS que quedara retenido en el tejido.

Una vez limpia y desparafinada la muestra, el protocolo de extracción es similar al utilizado para tejido fresco, que describimos previamente.

4.4. Técnica de la MLPA⁹⁶

Para los experimentos de MLPA se utilizó ADN control procedente de ganglios linfáticos de sujetos sanos y ADN de los tumores primarios. Las muestras de ADN fueron extraídas según los protocolos anteriormente citados (apartado 4.3.).

En cada experimento se prepararon un mínimo de 8 muestras, incluyendo siempre una de ellas con ADN control. Todas las muestras se procesaron al menos dos veces en distintos experimentos.

4.4.1. Tipos de kits

Existen comercializados diversos “kits” de MLPA según el tumor que se quiera estudiar (MRC-Holland, Amsterdam, Holanda). En el presente estudio se utilizó el “kit” P105-C1” que contiene 45 sondas para detectar alteraciones en uno o más exones de 5 genes concretos: *EGFR*, *TP53*, *PTEN*, *ERBB2* y *CDKN2A* (Tabla 4).

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

La mezcla de sondas de cada “kit” contiene además sondas de control interno llamadas DQ (“DNA Quality”). En la amplificación por PCR estas sondas control generan productos más pequeños que los amplificados por las 45 sondas de genes. El control interno determina si la calidad y la concentración del ADN de la muestra son las necesarias para obtener un resultado óptimo. El control interno está formado por dos tipos de sondas:

1- Cuatro fragmentos de ADN que generan productos amplificados de 64, 70, 76 y 82 pares de bases (pb), incluso si se omite el proceso de ligación (Figura 6).

2- Un producto de amplificación de 94 pb dependiente del proceso de ligación y del ADN de la muestra.

El tamaño de los cuatro picos del control interno (64-82 pb), una vez amplificados por PCR, depende de la cantidad de ADN de la muestra. Serán difícilmente visibles si el ADN es >100 ng y tendrán un tamaño menor que el fragmento amplificado de 94 pb si la cantidad de ADN es de 50 ng aproximadamente. Si estos 4 fragmentos tienen un tamaño similar o mayor que el fragmento de 94 pb y los productos de PCR de 130-482 pb, significa que la reacción de ligación ha fallado o que la cantidad de ADN es escasa y los resultados obtenidos no tienen validez. El tamaño del pico de 94 pb debe ser similar al obtenido por los productos amplificados de las sondas de genes y nos sirve de control para saber que el experimento ha sido satisfactorio (Figura 6).

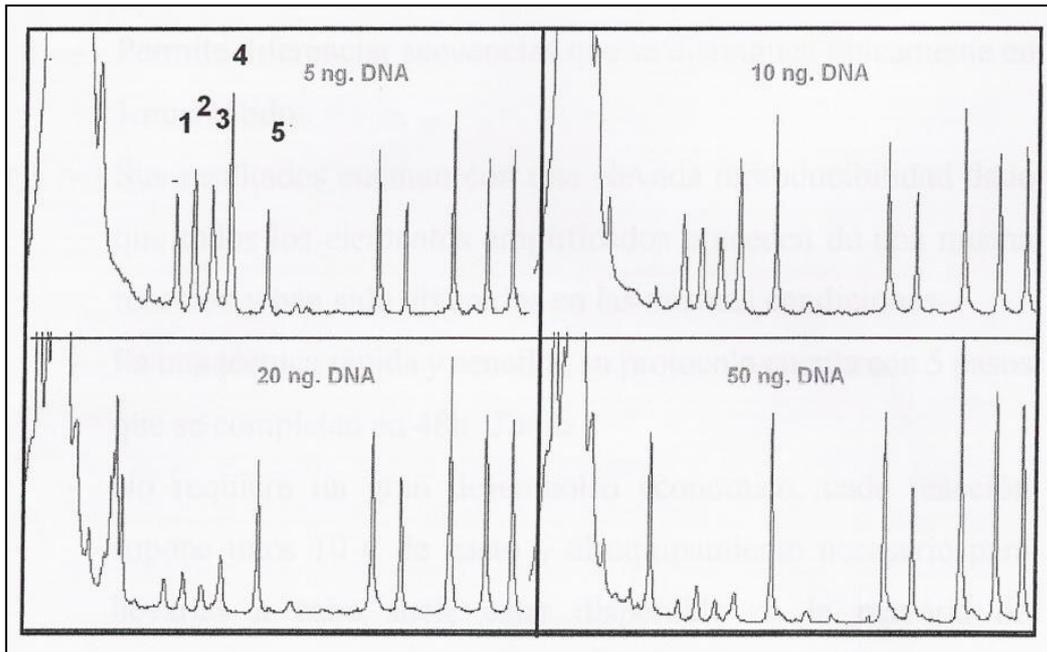


Figura 6. Calidad el ADN. Si los cuatro primeros picos -de control- (1,2,3,4) son más altos que los picos del producto de amplificación de 94 pb (5) el ADN de la muestra es insuficiente o bien hay fracaso en la reacción de ligación

Tabla 4. Descripción de las sondas del “kit” P105-C1. Longitud de los fragmentos, nombre de los genes y sus exones y localización cromosómica

Longitud	Exón	Cromosoma
	<i>PTEN</i>	
292	1	
328	1	
337	2	
190	2	
178	3	
232	4	10q23.31
364	5	
319	6	
148	7	
400	8	
436	9	
	<i>CDKN2A</i>	
265	<i>p14ARF</i> promotor	
160	<i>p14ARF</i> promotor	
355	intrón entre exón 1 de <i>p16</i> y exón 1 de <i>p14</i>	9p21
202	<i>p16</i> exón 2	
274	<i>p16</i> exón 3	
	<i>TP53</i>	
301	1	
166	1	
196	2	
220	4	17p13.1
247	5	
256	6	
283	8	
346	12	
	<i>ERBB2</i>	
142	<i>ERBB2</i>	17q21.1
409	<i>ERBB2</i>	
	<i>EGFR</i>	
373	1	
418	2	
391	3	
310	4	
154	5	
136	6	7p12
184	7	
427	8	
214	13	
454	16	
238	22	
	Sondas de referencia	
128	<i>IL4</i>	5q31
172	<i>TGFBR2</i>	3p22
208	<i>DYSF</i>	2p13
226	<i>HNF1A</i>	12q14
382	<i>MSH6</i>	2p16
445	<i>ING1</i>	13q34
463	<i>SIX3</i>	2p21
472	<i>CTNNB1</i>	3p21

4.4.2. Pasos del experimento

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

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

Una vez añadidos los “primers”, se colocan de nuevo las muestras en el termociclador y se corre el programa de PCR aplicando 1 minuto a 60°C, 33 ciclos, (35 en los casos en los que la concentración de ADN era muy baja: inferior a 30 ng/μl) con tres pasos cada ciclo de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 60 segundos a 72°C, y enfriando finalmente a 4°C. Las muestras son almacenadas a 4°C hasta realizar el análisis de fragmentos (Figura 7).

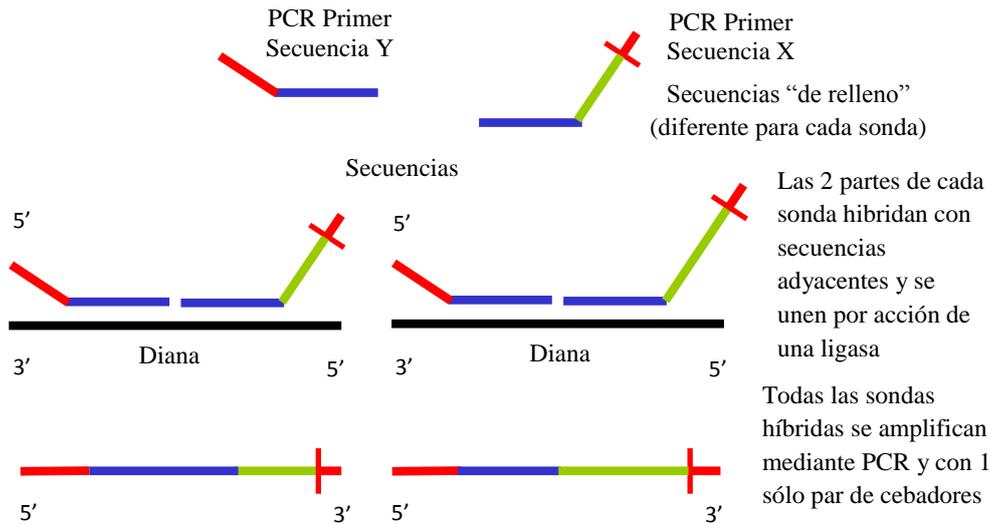


Figura 7. Bases moleculares de la MLPA

Cada sonda da lugar a un producto de amplificación de tamaño único de entre 130 a 482 pb debido a la diferencia en tamaño de la secuencia relleno. Los productos amplificados de las sondas se analizan mediante electroforesis capilar. Para ello mezclamos 2 μ L del producto de amplificación con 10 μ L de formamida y 0,5 μ L de marcador interno. La mezcla se desnaturaliza por calor y se somete a electroforesis capilar en un equipo "ABI Prism 3100" (Applied Biosystems, Warrington, UK). Los capilares están rellenos de un polímero que ofrece dificultad a la migración permitiendo separar los fragmentos por su tamaño, corriendo los fragmentos más pequeños más rápido que los grandes. Al final del recorrido hay un láser y un sistema de captura de la señal de fluorescencia que permite detectar los distintos productos. Estos productos finales serán analizados con el software "GeneScan v3.7" (Applied Biosystems, Warrington, UK), que permite determinar su tamaño por interpolación con distintos fragmentos de tamaño conocido del marcador interno y cuantificar cada producto en función de la intensidad de fluorescencia. Cada sonda vendrá representada por un pico. La señal relativa de cada sonda se define dividiendo la medida del área de cada pico entre la suma de todas las áreas de todos los picos de sondas de una muestra.

4.4.3. Interpretación de datos de MLPA

Para definir la existencia de una ganancia o una pérdida de material génico en cada una de las sondas de una muestra hay que normalizar los datos obtenidos. Para ello se calcula la mediana, la desviación estándar y el valor mínimo y máximo para las

muestras control y para cada una de las muestras de tumor primario. La relación entre el valor del tumor y el control se calcula aplicando las siguientes fórmulas:

1) Relación mínima = cociente entre el valor mínimo del tumor y el valor máximo del control.

2) Relación máxima = cociente entre el valor máximo del tumor y el valor mínimo del control.

3) Relación tumor/control = media de la relación mínima y la relación máxima.

4) Desviación estándar de la relación tumor/control = diferencia entre la relación tumor/control y la relación mínima.

Con este análisis normalizado se obtiene un diagrama de barras de las 45 sondas estudiadas en el ADN tumoral (Figura 8). Cuando la relación tumor/control es mayor de 1,2 y la desviación estándar es >1 se interpreta como ganancia, si es menor de 0,8 y la desviación estándar es <1 se interpreta como pérdida. Por último, si la relación tumor/control es >2 se interpreta como amplificación.

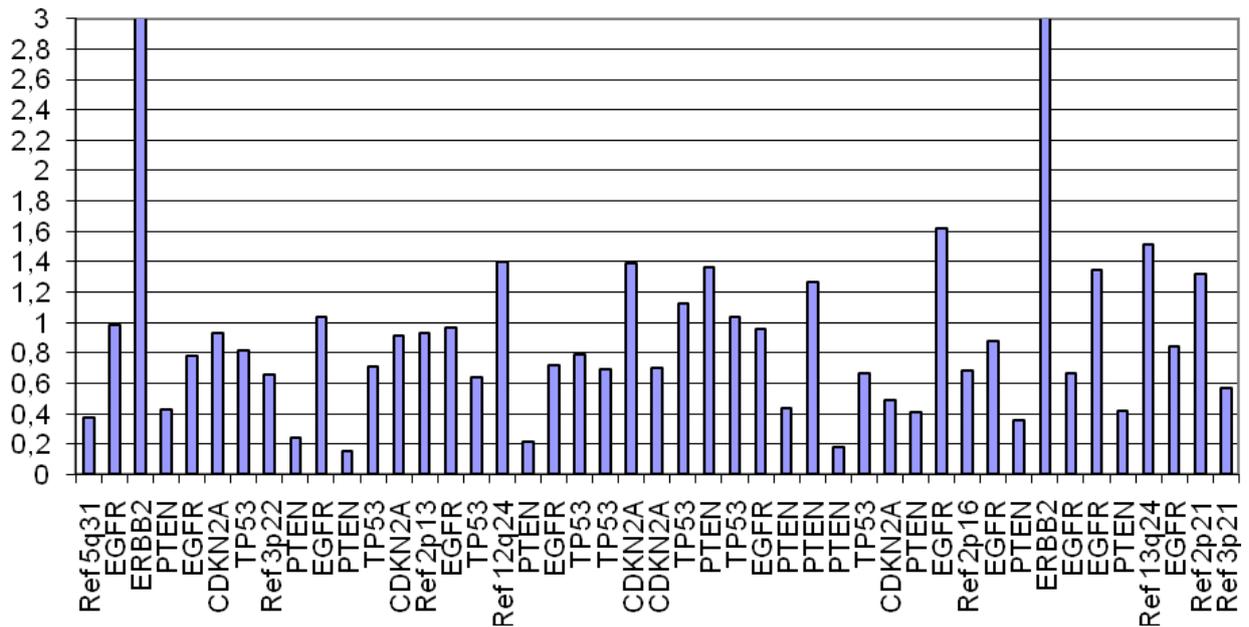


Figura 8. Diagrama de barras del resultado final obtenido por MLPA de un caso de CENS. Las barras representan la relación tumor/control normalizada para cada sonda. En este caso se puede apreciar una ganancia en *ERBB2*

4.5. Técnica de FISH

La FISH nos da información sobre el número de copias de regiones cromosómicas específicas. Consiste una sonda de ADN normal de secuencia conocida, marcada con fluorescencia, que hibrida sobre la muestra problema revelando la posición de dicha zona en el cromosoma. Las sondas pueden marcar cromosomas completos, centrómeros, telómeros, regiones específicas e incluso genes (Figura 9).

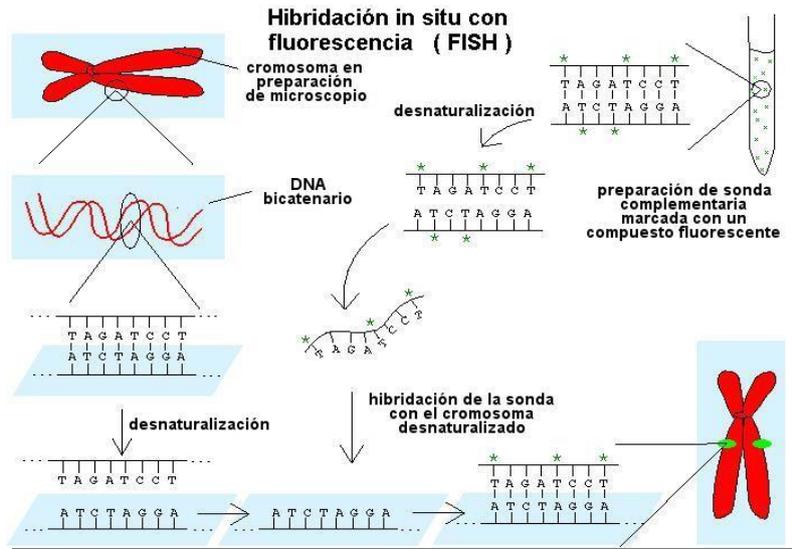


Figura 9. Técnica de FISH

La FISH fue realizada en muestras obtenidas de bloques de parafina, 29 muestras para detectar posibles ganancias y/o amplificaciones del *EGFR* y 19 muestras de *HER2*. Para ello se usó una sonda comercial para *EGFR* y otra para *HER2*, procedentes de la casa Kreatech Diagnostics® y se realizó sobre muestras de tejido tumoral colocadas en un "tissue-array".

Las sondas están diseñadas para detectar el número de copias del oncogén (rojo) (ej. *EGFR*), respecto al número de copias del cromosoma en el que se localiza (verde) (ej. Cromosoma 7) (Figura 10).

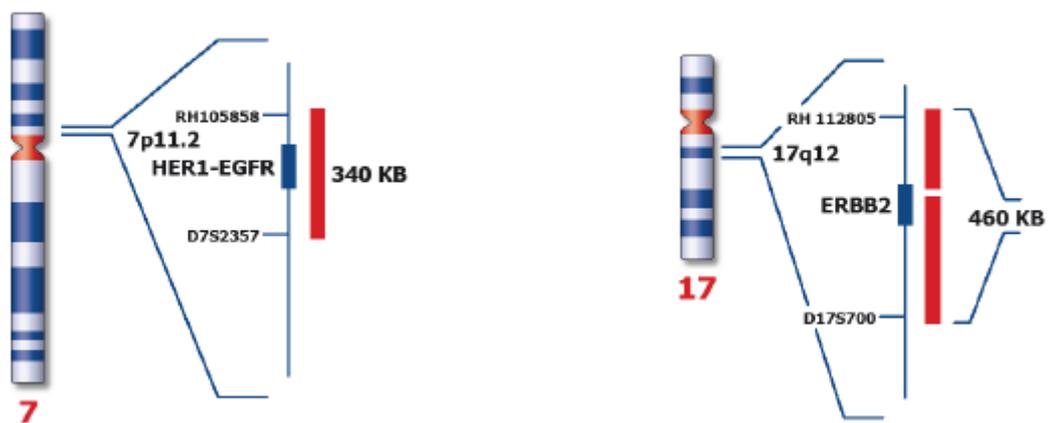


Figura 10. Se muestran los cromosomas 7 y 17 y las posiciones en que se encuentran las regiones cromosómicas del oncogén *EGFR* (7p11.2) y *HER2* (17q12)

Consideramos que existe una ganancia génica cuando hay más señales rojas que verdes y una amplificación cuando la ratio rojo/verde es 2,5 ó más, o cuando la señal roja es más fuerte de lo normal (Figuras 11 y 12).

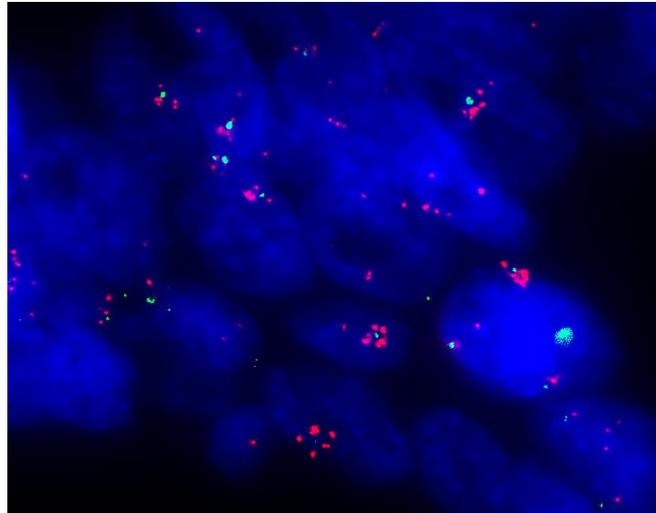


Figura 11. Imagen obtenida de un ensayo por FISH para detectar alteraciones en el gen *EGFR*. El mayor número de señales de color rojo muestra la amplificación del gen en la muestra

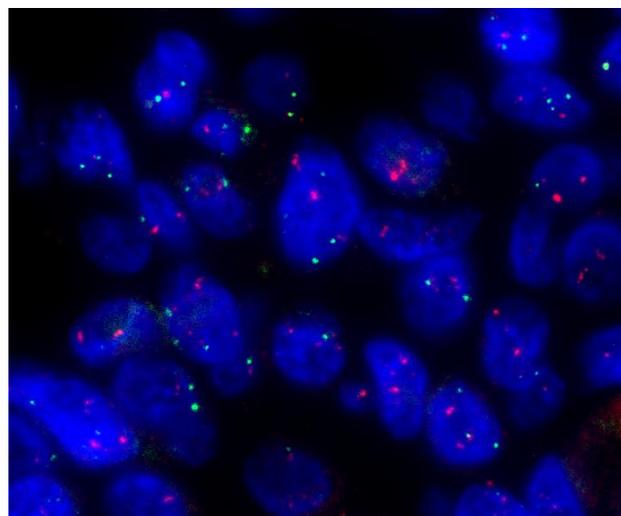


Figura 12. Imagen obtenida de un ensayo por FISH para detectar alteraciones en el gen *HER2*. El mayor número de señales de color rojo muestra la amplificación del gen en la muestra

El protocolo de FISH sobre tejidos embebidos en parafina ha sido llevado a cabo siguiendo las recomendaciones de la casa comercial VITRO.

4.5.1. Preparación de la muestra

Se utilizaron muestras de tejido tumoral colocadas en un "tissue-array" fijadas en formol al 10% y embebidas en parafina, que se cortaron en secciones de 5 µm y se aplicaron en portaobjetos silanizados. Los cortes se adhirieron al cristal mediante calentamiento en estufa. Los cortes se desparafinaron mediante inmersión en xylol a temperatura ambiente durante 10 minutos y dos lavados posteriores de 5 minutos en etanol al 100%. Posteriormente se introdujeron las muestras en concentraciones decrecientes de etanol al 80 y al 70%, durante 5 minutos cada una, para seguidamente lavarlas con agua destilada durante 40 a 60 minutos. A continuación se sumergen las preparaciones en una jarra Coplin con ácido clorhídrico 0,2N durante 20 minutos a temperatura ambiente y luego se lavan con agua destilada durante 3 minutos.

4.5.2. Pretratamiento

El pretratamiento de las muestras consiste en adecuarlas para poder llevar a cabo una buena hibridación. Está basado en la digestión proteica de las secciones para facilitar tanto la desnaturalización del ADN como el acceso de la sonda al núcleo celular.

- Pretratamiento del tejido. Se colocan los portas en una solución de tiocianato de sodio al 8% a 80°C durante 30 minutos manteniendo la temperatura. Después, los portas se lavan con el tampón 2xSSC durante 3 minutos a temperatura ambiente.

- Digestión. Se prepara en una jarra Coplin una solución de trabajo de pepsina al 10% y se calienta a 37°C durante al menos 30 minutos antes de meter las muestras. Inmediatamente después, se sumergen las preparaciones en la solución de pepsina, calentándola a 37°C, durante 10 minutos. Tras la digestión, las preparaciones se lavan en 2xSSC durante 5 minutos, se deshidratan en 70%, 80% y 100% de etanol a temperatura ambiente durante 3 minutos cada vez y, finalmente, se dejan secar al aire.

4.5.3. Hibridación

1. La sonda se precalienta a 37°C durante 5 minutos. Se colocan 10 µl de la sonda en un tubo dependiendo de la superficie a hibridar.
2. Procedimiento. Se coloca la sonda sobre la muestra del tejido y se cubre con un cubreobjetos de cristal. El conjunto se coloca en una placa térmica a 75°C

durante 10 minutos. De ahí, tras envolver el porta en parafilm, se pasa a una cámara húmeda donde se incuban a 37°C durante 16 horas. Se retira el cubreobjetos sumergiendo los portas en una solución de lavado posthibridación a temperatura ambiente y, posteriormente se lava a 75°C en la solución de lavado precalentada durante 2 minutos. Finalmente se lava sumergiendo en un Coplin las preparaciones en agua destilada, a temperatura ambiente y se deja secar a oscuras.

4.5.4. Contraste Fluorescente

Las preparaciones se tiñen con DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol, 350ng/mL) disuelto en AntiFade (Vectashield, Vector Laboratories) y se procede a su observación al microscopio óptico equipado con luz fluorescente y dotado de los filtros adecuados.

4.6. Análisis mediante IHQ. “Tissue-arrays”

La IHQ es un estudio histopatológico que permite localizar e identificar una determinada proteína sobre muestras biológicas, basándose en una reacción inmune antígeno-anticuerpo.

En nuestro trabajo hemos estudiado la expresión de 2 proteínas localizadas en la membrana como son los receptores EGFR y HER2 en los 50 casos de la serie. En 29 casos el estudio IHQ se realizó sobre un “tissue-array” mientras que en los 21 casos restantes se realizó de la manera convencional.

Describiremos inicialmente la técnica de los “tissue-array” y posteriormente la técnica de IHQ, que es similar en todos los casos.

4.6.1. Técnica de los “tissue-arrays”

4.6.1.1. Selección de las zonas a muestrear

Se realizan cortes de rutina de los bloques incluidos en el estudio que se tiñen con hematoxilina-eosina. Las laminillas teñidas correspondientes a cada bloque son revisadas por el patólogo que elige las áreas representativas que se marcarán con círculos (mínimo 3) de 2 mm de diámetro para poder identificar las zonas correspondientes en cada bloque (Figura 13).

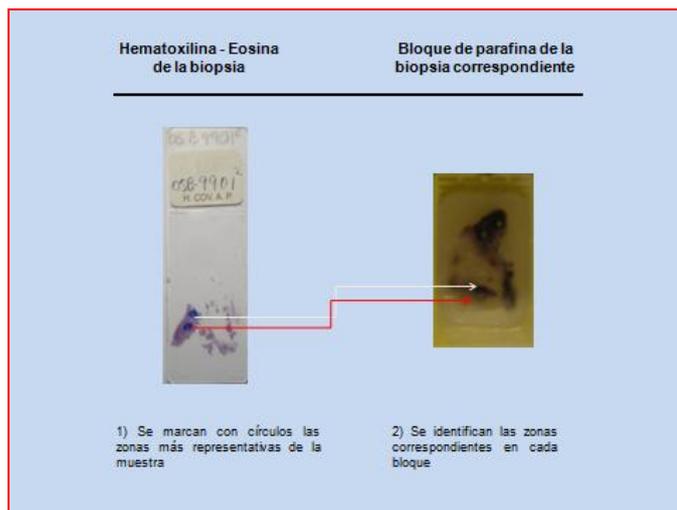


Figura 13. Selección de la zona en los “tissue-arrays”

4.6.1.2. Elaboración de la base de datos y esquema del tissue-array

El esquema topográfico del “tissue-array” se elabora en una tabla de Word que disponga de tantas casillas como cilindros de tejido. En cada casilla se pone el número de biopsia, asimismo se puede especificar en cada casilla la topografía y morfología del tumor.

El número de casos por bloque y el tamaño del bloque varían en función del número de casos, del diámetro de las agujas perforadoras y de la distancia entre perforaciones.

En nuestro estudio se realizó un bloque de “tissue-array” de 2 x 2,5 cm. con pocillos de tumor de 1 mm separados por 1,5 mm. En total 87 pocillos en cada bloque y 29 casos (Figura 14).

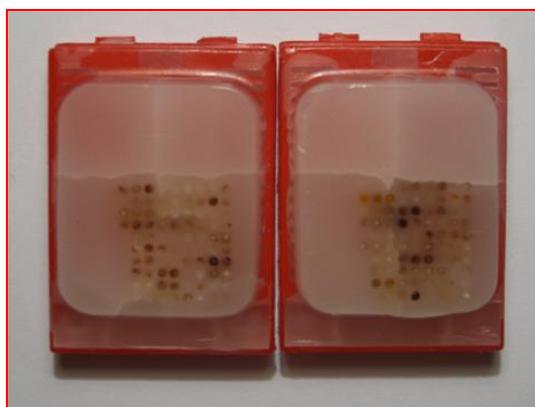


Figura 14. Bloques “tissue arrays” de 2 x 2,5 cm con 87 muestras por bloque

4.6.1.3. Elaboración del “tissue-array”

Para la elaboración de los bloques se seguirán las instrucciones técnicas del proveedor del aparato. Una vez se han extraído los cores de tejido de 1 mm de diámetro, se van colocando en el bloque receptor según el esquema previamente definido. Una vez completado este proceso se procederá a la homogenización del bloque. Se hará en la estufa a 60°C durante 12-15 minutos colocándolo boca abajo sobre un porta y nunca directamente sobre el metal. Posteriormente se dejará enfriar a temperatura ambiente en el tiempo que necesite, introduciéndolo en la nevera para endurecerlo antes de proceder a cortarlo.

4.6.1.4. Secciones del bloque

Se recomienda hacer todas las secciones de una sola tanda, para evitar la pérdida de tejido que supone reorientar el bloque. Los cortes son de 3 µm. Se realizará una tinción de hematoxilina-eosina de control en el primer corte útil. En caso de que sean necesarias más de 20 secciones, hacer un corte de control por cada 20 secciones y teñirlo con hematoxilina- eosina (Figura 15).

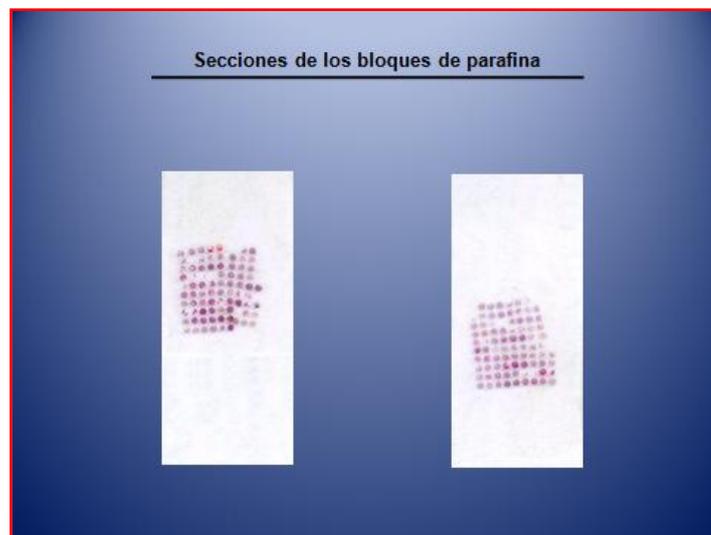


Figura 15. Tinción hematoxilina-eosina de control

Si las secciones no se van a utilizar de inmediato, los portas deben cubrirse con una fina capa de parafina y se guardarán refrigerados en una caja en la nevera de -3°C.

4.6.1.5. Requerimientos mínimos estándar del “tissue-array”

- 1) Todos los tumores muestreados deben estar representados en las secciones, o al menos en un número superior al 90%.
- 2) Los cilindros una vez seccionados deben estar intactos o si se han perdido algunos, deben estar representados al menos el 50% del caso.
- 3) Si el número de casos perdidos fuese superior a 3 se procederá a la repetición del “tissue-array”.

4.6.2. Técnica inmunohistoquímica

Los tejidos fijados en formol e incluidos en parafina se cortan en secciones de 3 µm que son adheridos a portas siliconizados (Dako® S2024) y se dejan en la estufa a 56°C- 58°C (mínimo 2 horas y máximo 18).

Después se realiza el desparafinado de las muestras con xilol y su hidratación con alcoholes de graduación decreciente. A continuación se efectúa el desenmascaramiento antigénico con solución recuperadora de antígenos en el Ptlík de Dako® a 95° durante 20 minutos, manteniendo las preparaciones dentro de la solución recuperadora de antígenos hasta que baje la temperatura a 60°C. Posteriormente se colocan las preparaciones en un recipiente que contenga un buffer de lavado.

A partir de este paso, la técnica se realiza en el Inmunoteñidor Autostainer plus de Dako®. En primer lugar se introducen las muestras en un buffer de lavado y en una solución bloqueante de peroxidasa durante 5 minutos. Se añade el anticuerpo monoclonal primario dirigido hacia la proteína que deseamos detectar durante un tiempo variable, según el tipo de anticuerpo utilizado.

La inmunodetección fue realizada con el sistema EnVision Plus “anti-mouse” empleando como substrato el cromógeno diaminobenzidina (DakoCytomation).

Un paso clave para que los resultados sean reproducibles, comparables y de una calidad apropiada, es la elección del método de detección. En nuestro estudio, se ha utilizado el sistema de polímeros de dextrano EnVision™ Plus (PDE) Dako, una técnica IHQ desarrollada recientemente. El sistema EnVision™ Plus es una técnica de tinción en dos pasos en la que al anticuerpo primario le sigue un polímero conjugado. Este es un polímero de alto peso molecular, el dextrano, al que se conjugan de manera covalente un gran número de moléculas de enzima (por ejemplo la peroxidasa

de rábano) y de anticuerpo secundario. Este sistema aumenta la sensibilidad, lo que permite incrementar las diluciones del anticuerpo primario y produce menos fondo que las técnicas tradicionales de avidina-biotina.

Como último paso se contrasta la preparación mediante hematoxilina durante un minuto. Tras la tinción, las preparaciones se deshidratan mediante alcoholes de graduación ascendente y se montan con un cubreobjetos.

Como se ha dicho anteriormente nuestro estudio se dirigió a la detección de EFGR y HER2 por lo que se utilizaron los siguientes reactivos en cada caso.

4.6.2.1. EGFR

Para el estudio de EGFR se utilizó una solución recuperadora de antígenos basada en proteinasa K, el anticuerpo primario utilizado fue un anticuerpo monoclonal humano EGFR, clon 2-18C9 (“kit” EGFR pharm Dx®, code K1494) y el tiempo de incubación fue de 30,5 minutos.

4.6.2.2. HER2

El estudio de HER2 requiere un proceso diferente. Se emplea el TechMate y el “kit” (K5206) de Dako®.

Una vez desparafinadas e hidratadas las muestras se debe realizar el desenmascaramiento antigénico con solución recuperadora de antígenos 1/10 a 95-99°C durante 40 minutos. Posteriormente se saca del baño la jarra Coplin con las muestras y dejar enfriar 20 minutos a temperatura ambiente.

Inmediatamente se colocan las preparaciones en el TechMate, donde se ponen en contacto con el anticuerpo primario: Rabbit Anti-Human HER 2 Protein. Luego, se añade una solución bloqueante de peroxidasa, un reactivo visualizador y por último se ponen en contacto con un sustrato cromógeno. Entre los diferentes pasos se realizaron varios lavados con el buffer del “kit” diluido al 1/10.

Finalmente se deshidratan las muestras con alcohol en concentraciones crecientes, se aclaran con xilol y se cubren con Entellan.

En las Figuras 16 y 17 se muestran 2 ejemplos de sobre-expresión de EGFR y HER2.

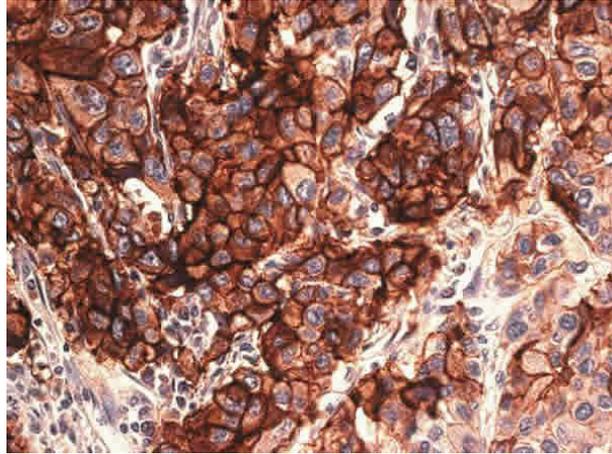


Figura 16. Expresión de EGFR mediante inmunohistoquímica (X400)

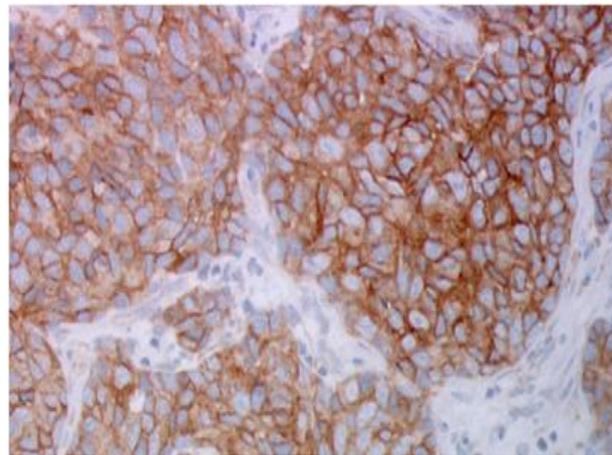


Figura 17. Expresión de HER2 mediante inmunohistoquímica (X400)

4.6.3. Interpretación de la inmunohistoquímica

Los resultados de la técnica IHQ fueron valorados por dos investigadores sin el conocimiento de datos clínico-patológicos.

4.6.3.1. EGFR

Tinción de membrana citoplasmática con o sin tinción del citoplasma. Se discriminó entre los negativos o débilmente teñidos y los que presentaban un nivel de tinción intenso que fueron considerados positivos.

4.6.3.2. HER2

Tinción de membrana citoplasmática y más débil en citoplasma. Las muestras control revelaron escasa positividad con lo que la mínima tinción en células tumorales

se consideró positiva y negativos los casos que no presentaban ningún grado de tinción.

4.7. Descripción de las variables

Las variables clínico-patológicas que se seleccionaron y estudiaron fueron las siguientes:

- 1) Edad.
- 2) Sexo.
- 3) Localización tumoral: seno maxilar, etmoides.
- 4) Grado histológico: bien, moderadamente, poco o indiferenciado.
- 5) Estadio TNM: I, II, III, IV.
- 6) Categoría T: T1, T2, T3, T4.
- 7) Categoría N: N0, N+.
- 8) Categoría M: M0, M+.
- 9) Afectación orbitaria.
- 10) Invasión intracraneal
- 11) Radioterapia postoperatoria
- 12) Supervivencia libre de enfermedad.
- 13) Supervivencia global.
- 14) Supervivencia específica para tumor.
- 15) Estado del paciente (vivo, muerto por tumor, muerto por otra causa, vivo con recidiva)

Las variables génicas estudiadas por MLPA fueron la pérdida o ganancia de *EGFR* y *HER2*. La relación tumor/control se interpreta como ganancia si es mayor de 1,2 y su desviación estándar es >1 y como pérdida si es menor de 0,8 y la desviación estándar es <1 . Si la relación tumor/control es >2 se interpreta como amplificación.

Las variables génicas estudiadas por FISH fueron la ganancia o amplificación de *EGFR* y *HER2*. Cuando se observan más señales rojas que verdes se interpreta como ganancia. Si la relación señales rojas/verdes es de 2,5 ó más, o cuando la señal roja es mucho más intensa de lo normal, se interpreta como amplificación

La variable estudiada mediante IHQ en el EGFR fue la positividad o negatividad de la tinción citoplasmática. Se consideraron 2 categorías: ausencia o inmunotinción débil y tinción intensa. En relación al HER2 se consideró positiva cualquier mínima tinción observada.

4.8. Análisis estadístico

El análisis estadístico sobre las distintas variables estudiadas se ha llevado mediante el programa informático SPSS (“Statistical Package for Social Science”), versión 12.0 para Windows (SPSS® Inc. Illinois, EE.UU).

La asociación de caracteres cualitativos se llevó a cabo mediante la prueba de correlación χ^2 de Pearson o la prueba del estadístico exacto de Fisher. El nivel de significación se fijó para una $p \leq 0,05$.

Para estimar la supervivencia se utilizaron las curvas Kaplan-Meier, comparando las distribuciones de supervivencia mediante la Prueba del Logaritmo del Rango « Log-Rank Test ». Los valores con una $p \leq 0,05$ fueron considerados significativos.

5

RESULTADOS

5.1. Aspectos clínico-patológicos

Las variables descritas clínico-patológicas descritas no tratan de definir los aspectos generales de los CENS, sino las características de los sujetos seleccionados para ver si se ajustan o desvían de lo esperado en este tipo de tumores. También tienen interés para intentar establecer asociaciones con el resto de variables obtenidas por medio de las técnicas de biología molecular utilizadas.

De los 50 pacientes incluidos en el estudio el 72% fueron varones (36) y el 28% mujeres (14). La media de edad al diagnóstico fue de 65 años y la mediana de 66 años. La persona más joven diagnosticada tenía 47 años y la de más edad tenía 85 años. En ninguno de los casos se pudo identificar una clara exposición previa a los carcinógenos implicados en la génesis de estos tumores.

En cuanto a la localización tumoral se encontró que en el 78% (39) el origen era el seno maxilar y en el 22% (11) el seno etmoidal.

Todos los pacientes tenían un diagnóstico histopatológico de carcinoma epidermoide, siendo el grado histológico más frecuente el pobremente diferenciado (23 casos; 46%), seguido del bien diferenciado (18 casos; 36%) y, finalmente, el moderadamente diferenciado (9 casos; 18%).

En la categoría tumoral T (tamaño tumoral) se observó un predominio de pacientes con tumores localmente avanzados (T3-T4) (15 pacientes (30%) T3; 22 pacientes (44%) T4a; 8 pacientes (16%) T4b), frente a tumores en estadios iniciales (T2) (5 pacientes; 10%). El desarrollo de metástasis ganglionares cervicales (N+) se constató en 13 pacientes (26%), de los cuales 1 tenía un tumor T2 y 12 eran T4.

Teniendo en cuenta el estadio global, 4 pacientes (8%) presentaban estadio inicial (II) y 46 (96%) tenían estadios avanzados (14 pacientes (28%) eran estadio III; 24 pacientes (48%) estadio IVa y 8 pacientes (16%) estadio IVb).

Se consideraron asimismo dos aspectos importantes en el estudio de estos tumores pues suponen dos de los factores pronósticos más destacados, la afectación orbitaria y la invasión intracraneal. El 56% de los pacientes (28) no mostraba afectación orbitaria en el momento de la cirugía, mientras que el 30% (15) tenía afectada la periórbita y el 14% (7) presentaba clara invasión orbital. En 9 pacientes (18%) se constató la presencia de invasión intracraneal.

La RT complementaria postoperatoria se indicó en 38 pacientes (76%). Los pacientes a los cuales no se les administró tenían tumores en estadios precoces y sin factores de riesgo o fallecieron antes de recibir el tratamiento.

El tiempo medio de seguimiento fue de 32 meses, con una mediana de 17 y un rango entre 13 y 211 meses.

Los datos clínico-patológicos mencionados se exponen con detalle, de acuerdo a su localización en la tabla 5.

Tabla 5. Características clínico-patológicas de los pacientes

	Maxilar (n=39)	Etmoides (n=11)	Total (n=50)
<i>Categoría T</i>			
T2	4	1	5 (10%)
T3	12	3	15 (30%)
T4a	17	5	22 (44%)
T4b	6	2	8 (16%)
<i>Grado histológico</i>			
Pobre	15	8	23 (46%)
Moderado	9	0	9 (18%)
Bien	15	3	18 (36%)
<i>Categoría N</i>			
N0	29	8	37 (74%)
N+	10	3	13 (26%)
<i>Metástasis</i>			
M0	34	11	45 (90%)
M+	5	0	5 (10%)
<i>Afectación orbitaria</i>			
No	21	7	28 (56%)
Periórbita	12	3	15 (30%)
Órbita	6	1	7 (14%)
<i>Invasión intracraneal</i>			
No	34	7	41 (82%)
Sí	5	4	9 (18%)
<i>Radioterapia postoperatoria</i>			
No	10	2	12 (24%)
Sí	29	9	38 (76%)

El 82% de los pacientes (41) presentaron una recidiva local en el transcurso del seguimiento y 5 (10%) desarrollaron metástasis a distancia que coincidieron con recidivas locorregionales no tratables.

La supervivencia libre de enfermedad fue del 27% en el primero año y del 7% a los 5 años. Actualmente, 8 pacientes permanecen libres de enfermedad (Figura 18).

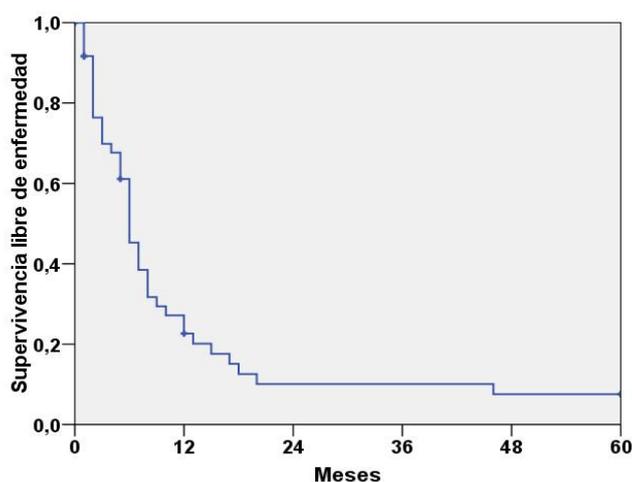


Figura 18. Supervivencia libre de enfermedad en los CENS

La supervivencia global de los pacientes fue del 15% a los 5 años de seguimiento. La principal causa de muerte en nuestra serie fue la presencia de recidiva local y el desarrollo de metástasis a distancia. No obstante 5 de los pacientes fallecieron debido a procesos intercurrentes o durante el postoperatorio (Figura 19).

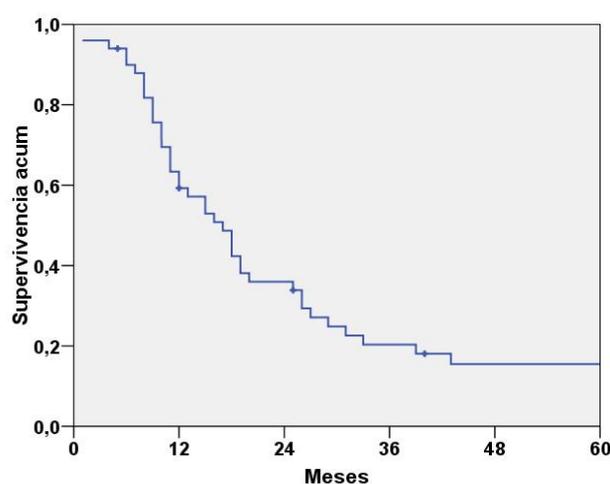


Figura 19. Supervivencia global en los CENS

La supervivencia específica para tumor fue del 18 % a los 5 años (Figura 20).

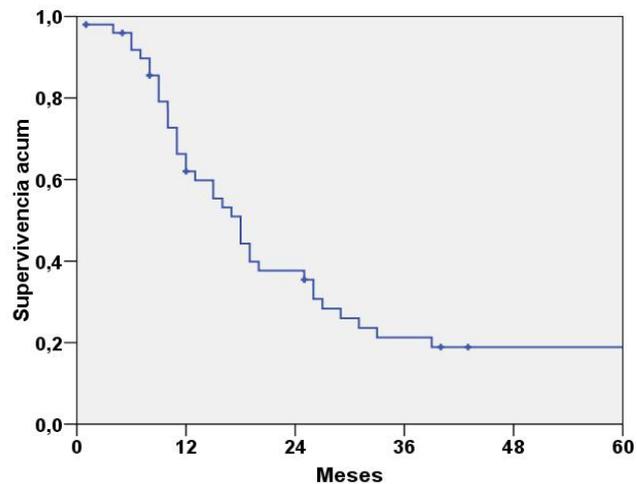


Figura 20. Supervivencia específica para tumor en los CENS

En relación con la supervivencia, de todas las variables clínico-patológicas analizadas (categoría T, N, estadio global, grado histológico, afectación orbitaria, invasión intracraneal, recidiva locorregional y metástasis a distancia), el único que mostró valor pronóstico significativo ($p=0,033$) fue la extensión intracraneal (Figura 21). Aunque las diferencias no fueron significativas, la categoría T4 ($p=0,335$) y la N+ ($p=0,287$), es decir los estadios avanzados, se asociaron con peor pronóstico ($p=0,456$).

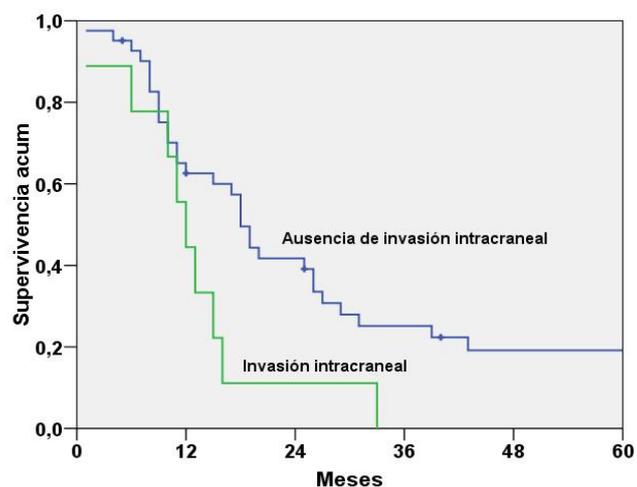


Figura 21. Supervivencia en relación a la afectación intracraneal en los CENS

Se observó también una relación estadísticamente significativa entre la presencia de recidiva tumoral y algunas de las variable clínico-patológicas analizadas.

Los pacientes con tumores de mayor tamaño (T3 y T4) ($p=0,020$) y con adenopatías metastásicas (N+) ($p=0,021$) en el momento del diagnóstico presentaban recidivas precoces (Figuras 22 y 23).

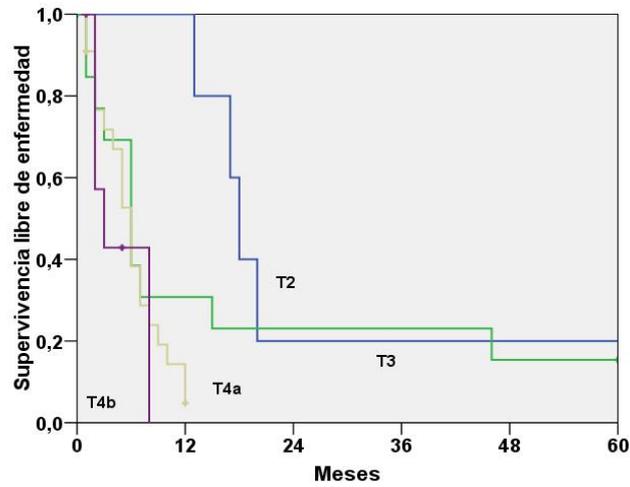


Figura 22. Supervivencia libre de tumor según la categoría T

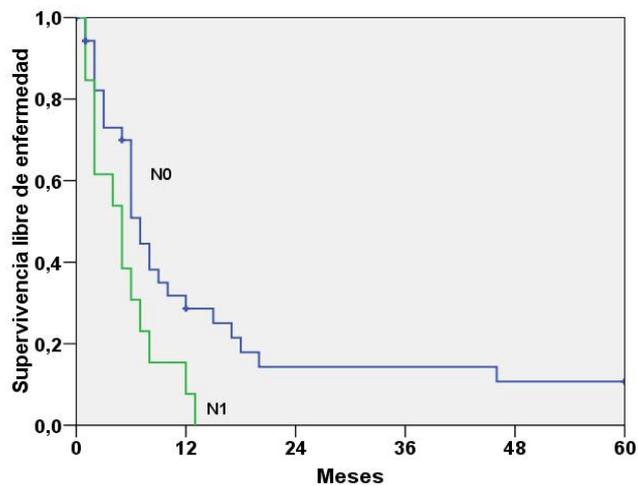


Figura 23. Supervivencia libre de tumor según la categoría N (N0, N+)

Se observó relación estadísticamente significativa en la aparición de recidivas tumorales en aquellos pacientes con afectación de la órbita ($p=0,004$) o invasión intracraneal ($p=0,012$) (Figuras 24 y 25).

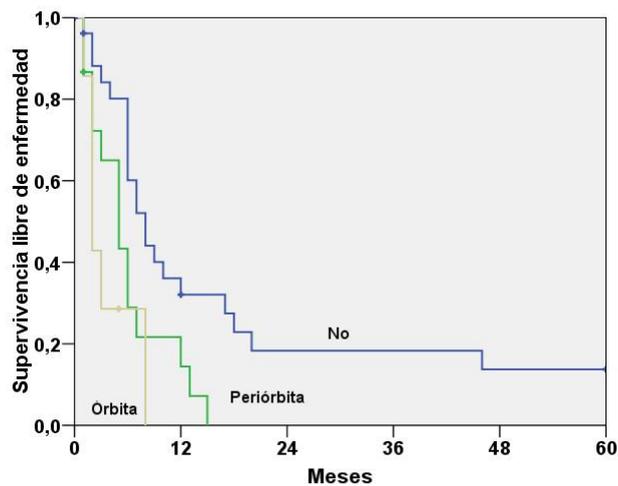


Figura 24. Supervivencia libre de tumor según la afectación orbitaria

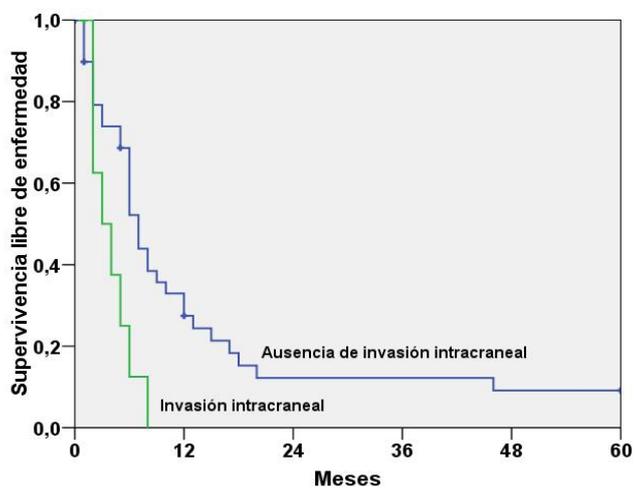


Figura 25. Supervivencia libre de tumor según la invasión intracraneal

5.2. Aspectos genéticos

5.2.1. Análisis de la ganancia/amplificación de *EGFR* y *HER2* en los CENS

La técnica de análisis genético con MLPA fue realizada en los 50 casos, obteniendo resultados válidos en 37 casos, pues en los 13 restantes no fueron concluyentes por la mala calidad del ADN de las muestras. Para corroborar los datos obtenidos, realizamos un estudio citogenético mediante FISH en 29 casos, obteniendo resultados válidos en todos los casos para el *EGFR* y en 19 para el *HER2*.

Si computamos las 2 técnicas de análisis genético obtuvimos datos sobre la amplificación de *EGFR* en 44 casos, 15 exclusivamente mediante MLPA, 7 sólo con FISH y 22 con ambos procedimientos. En cuanto a la ganancia/amplificación de *HER2*, obtuvimos datos en 41 casos, 22 exclusivamente mediante MLPA, 4 sólo con FISH y en 15 con ambas técnicas (Tabla 6).

Tabla 6. Número de casos en los que se emplearon las técnicas de MLPA y FISH

	MLPA	FISH	FISH + MLPA	FISH y/o MLPA
<i>EGFR</i>	15	7	22	44
<i>HER2</i>	22	4	15	41

Mediante el estudio con MLPA observamos la amplificación del *EGFR* en 3 de las 37 muestras (8,1%), y con FISH en 5 de las 29 (17,24%), confirmando todos los casos amplificados con MLPA por medio de FISH. Además, con FISH se observó una amplificación no detectada con MLPA y otra en la que la MLPA no obtenía resultados concluyentes. En todos los casos en los que se observó una ganancia en el número de copias del gen, los resultados obtenidos permitieron definir una amplificación del mismo.

La MLPA demostró una ganancia de *HER2* en 6 de los 37 casos (16,2%), presentando 4 de ellos amplificación de dicho gen. Estos resultados fueron confirmados en el estudio mediante FISH, correlacionando completamente los resultados de ambas técnicas.

Al agrupar las 2 técnicas utilizadas observamos una amplificación del gen *EGFR* en 5 de 44 casos analizados (11,4%) y una ganancia de *HER2* en 6 casos de los 41 (14,6%), presentando 4 de ellos una clara amplificación génica (Figura 26).

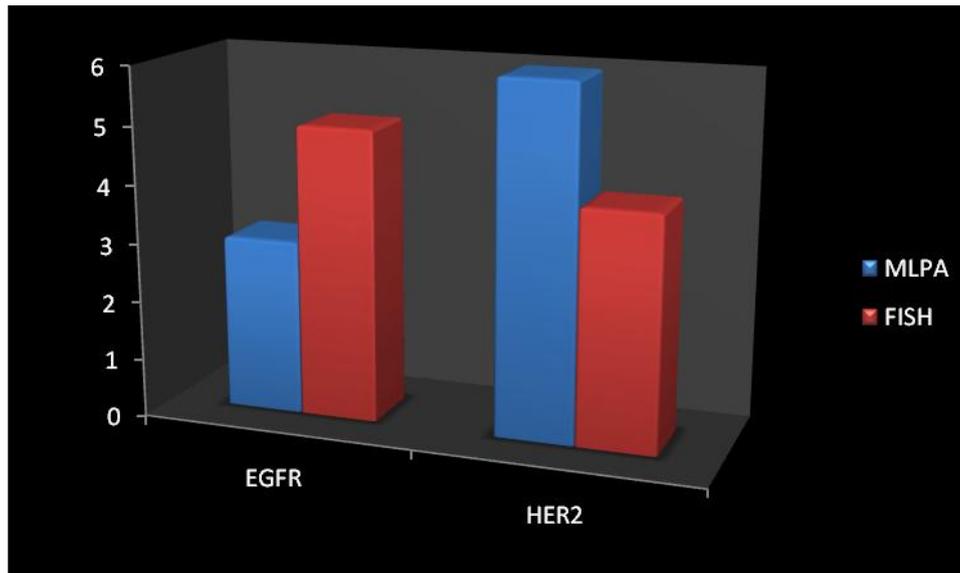


Figura 26. Ganancias/amplificaciones de *EGFR* y *HER2*

5.2.2. Relación entre la amplificación de *EGFR* y las variables clínico-patológicas

En la tabla 7 representamos la correlación entre la amplificación de *EGFR* y la localización, categoría T, categoría N, estadio tumoral, grado histológico, afectación orbitaria, invasión intracraneal y desarrollo de metástasis a distancia.

Existe una asociación estadísticamente significativa ($p=0,015$) entre la amplificación de *EGFR* y la presencia de adenopatías metastásicas (N+), teniendo los CENS que las desarrollaron mayor número de amplificaciones. El 80% de las muestras en las que se demostró una amplificación del gen, pertenecían a pacientes catalogados como N+. Además, los pacientes con un tumor que afectaba la órbita o periórbita tenían mayor número de amplificaciones, siendo este dato significativo ($p=0,025$). Así, el 100% de los pacientes con afectación orbitaria presentaban amplificaciones de *EGFR* (60% de la periórbita y 40% de la órbita).

Se observa una tendencia a la amplificación génica de *EGFR*, pero que no llega a ser significativa, en los tumores de mayor tamaño (T), en los tumores peor diferenciados y, en concordancia con lo anterior, también en pacientes con estadios más avanzados ($p=0,863$, $p=0,154$, $p=0,884$, respectivamente).

Es importante destacar que, en nuestro estudio, ninguno de los pacientes con invasión tumoral intracraneal al diagnóstico o que desarrolló metástasis a distancia durante el seguimiento presentaba ganancia o amplificación del gen *EGFR*.

Tabla 7. Relación entre la amplificación de *EGFR* y las variables clínico-patológicas

Variable	Número de casos	Amplificación de <i>EGFR</i>		p
		Negativa	Positiva	
<u>Categoría T</u>				
T2	4	4 (10,3%)	0 (0%)	
T3	11	10 (25,6%)	1 (20%)	0,863
T4a	22	19 (48,7%)	3 (60%)	
T4b	7	6 (15,4%)	1 (20%)	
<u>Categoría N</u>				
N0	32	31 (79,5%)	1 (20%)	0,015
N+	12	8 (20,5%)	4 (80%)	
<u>Estadio</u>				
II	4	4 (10,2)	0 (0%)	
III	10	9 (23,1%)	1 (20%)	0,884
IVa	23	20 (51,3%)	3 (60%)	
IVb	7	6 (15,4%)	1 (20%)	
<u>Grado histológico</u>				
Bien	18	17 (43,6%)	1 (20%)	
Moderada	8	8 (20,5%)	0 (0%)	0,154
Pobre	18	14 (35,9%)	4 (80%)	
<u>Afectación orbitaria</u>				
No	24	24 (61,5%)	0 (0%)	
Periórbita	14	11 (28,2%)	3 (60%)	0,025
Órbita	6	4 (10,3%)	2 (40%)	
<u>Invasión intracraneal</u>				
No	35	30 (76,9%)	5 (100%)	0,299
Sí	9	9 (23,1%)	0 (0%)	
<u>Metástasis</u>				
No	39	34 (87,2%)	5 (100%)	0,530
Sí	5	5 (12,8%)	0 (0%)	

5.2.3. Relación entre la amplificación de *EGFR* y el curso clínico

En el grupo 44 pacientes donde estudiamos la amplificación de *EGFR*, 8 pacientes continuaban vivos sin tumor al final del seguimiento, 32 pacientes fallecieron por causas debidas al tumor y 4 por causas intercurrentes, no encontrando diferencias significativas en relación a la presencia de amplificación del gen ($p=0,218$). No hemos observado una correlación estadísticamente significativa entre la supervivencia y la amplificación de *EGFR* (Figura 27). Sin embargo, apreciamos de manera estadísticamente significativa que los pacientes con amplificación de *EGFR* presentan recidivas antes que aquellos sin amplificación ($p=0,020$) (Figura 28). Además, siempre que se demostró una amplificación del gen el paciente presentó una recidiva (Tabla 8).

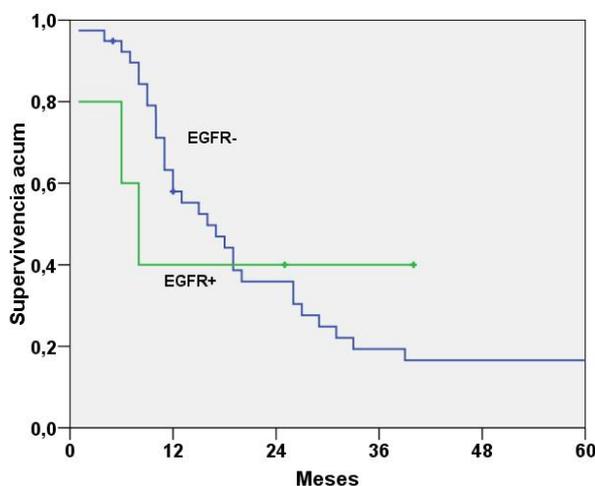


Figura 27. Supervivencia global según la amplificación de *EGFR*

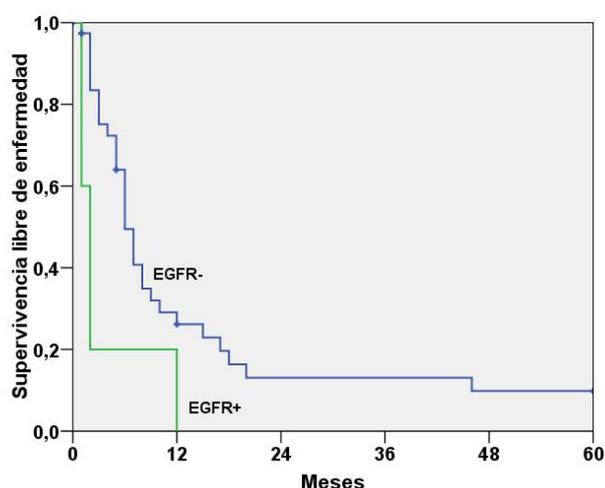


Figura 28. Supervivencia libre de enfermedad según la amplificación de *EGFR*

Tabla 8. Comparación de la amplificación de *EGFR* entre los pacientes libres de tumor (36) y los pacientes con recidiva (5) (Fisher's Exact Test, $p=0,347$)

Amplificación de <i>EGFR</i>	Sin tumor	Recidiva	Total
Negativa	8 (20,5%)	31 (79,5%)	39
Positiva	0 (0%)	5 (100%)	5
Total	8	36	44

5.2.4. Relación entre la ganancia/amplificación de *HER2* y las variables clínico-patológicas

En este grupo más reducido de 41 pacientes decidimos estudiar las ganancias y amplificaciones de *HER2* conjuntamente. Las correlaciones entre la ganancia/amplificación de *HER2* y la categoría T, categoría N, estadio tumoral, grado histológico, afectación orbitaria e invasión intracraneal se exponen en la tabla 9. Existe una relación estadísticamente significativa entre la ganancia/amplificación de *HER2* y la presencia de invasión intracraneal ($p=0,001$). Es decir, todos los pacientes (6) con ganancia/amplificación del gen presentaron dicha invasión. Los tumores de mayor estadio tumoral y categoría T tenían más tendencia a tener ganancia/amplificación del gen, sin llegar ésta a ser significativa.

Se observó así mismo que, la mayor parte de los pacientes con tumores con ganancia/amplificación de *HER2*, no presentaban afectación de la órbita (83,3%) ni desarrollaron metástasis a distancia (66,7%), aunque sin alcanzar estos datos valores significativos.

Tabla 9. Relación entre la ganancia/amplificación de *HER2* y las variables clínico-patológicas

Variable	Número de casos	Ganancia /Amplificación de <i>HER2</i>		p
		Negativa	Positiva	
<u>Categoría T</u>				
T2	4	4 (11,4%)	0 (0%)	
T3	11	11 (31,4%)	0 (20%)	0,232
T4a	19	15 (42,9%)	4 (66,7%)	
T4b	7	5 (14,3%)	2 (33,3%)	
<u>Categoría N</u>				
N0	30	27 (77,1%)	3 (50%)	0,184
N+	11	8 (22,9%)	3(50%)	
<u>Estadio</u>				
II	4	4 (11,4)	0 (0%)	
III	10	10(28,6%)	0 (20%)	0,267
IVa	20	16 (45,7%)	4 (66,7%)	
IVb	7	5 (14,3%)	2 (33,3%)	
<u>Grado histológico</u>				
Bien	16	14 (40%)	2 (33,3%)	
Moderada	8	7 (20%)	1 (16,7%)	0,900
Pobre	17	14 (40%)	3 (50%)	
<u>Afectación orbitaria</u>				
No	24	19 (54,3%)	5 (83,3%)	
Periórbita	13	13 (37,1%)	0 (0%)	0,191
Órbita	4	3 (8,6%)	1 (16,7%)	
<u>Invasión intracraneal</u>				
No	35	32 (91,4%)	0 (0%)	0,001
Sí	9	3 (8,6%)	6 (100%)	
<u>Metástasis</u>				
No	37	33 (94,3%)	4 (66,7%)	0,095
Sí	4	2 (5,7%)	2 (33,3)	

5.2.5. Relación entre la ganancia/amplificación de *HER2* y el curso clínico

En el grupo analizado de 41 pacientes donde estudiamos la ganancia/amplificación de *HER2*, 6 permanecían vivos y sin tumor al final del seguimiento, 31 fallecieron a causa del tumor y 4 lo hicieron por otras causas, no hallándose diferencias significativas entre estos grupos y la ganancia/amplificación de *HER2* ($p=0,322$).

No observamos diferencias significativas ($p=0,236$) entre la supervivencia global de los pacientes y la ganancia/amplificación de *HER2* (Figura 29). Sin embargo, sí observamos que los pacientes con ganancia/amplificación de *HER2* suelen tener menor supervivencia.

Apreciamos una correlación significativa entre la ganancia/amplificación de *HER2* y la aparición de recidivas tumorales ($p=0,020$). Así, los pacientes con esa alteración génica desarrollaron recidivas de la enfermedad antes que aquéllos en los que no se hallaron (Figura 30). Además, todos los pacientes con ganancia/amplificación de *HER2* presentaron recidiva de la enfermedad (Tabla 10).

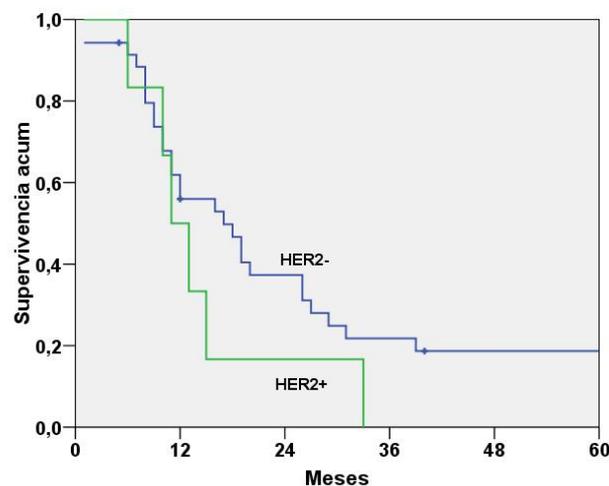


Figura 29. Supervivencia global según la ganancia/amplificación de *HER2*

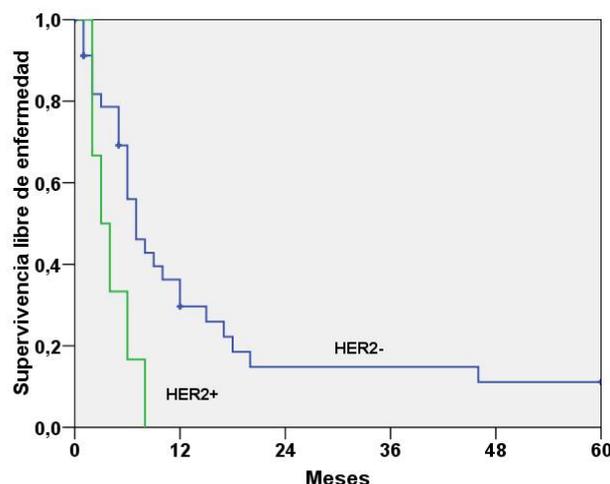


Figura 30. Supervivencia libre de enfermedad según la ganancia/amplificación de *HER2*

Tabla 10. Comparación de la ganancia/amplificación de *HER2* entre los pacientes libres de tumor (8) y los pacientes con recidiva (33) (Fisher's Exact Test, $p=0,246$)

Amplificación de <i>HER2</i>	Sin tumor	Recidiva	Total
Negativa	8 (22,9%)	27 (77,1%)	35
Positiva	0 (0%)	6 (100%)	6
Total	8	33	41

5.2.6. Análisis de la expresión proteica de EGFR y HER2 en los CENS

Se analizó la expresión de las proteínas EGFR y HER2 mediante IHQ en el grupo completo de 50 pacientes.

Todas las muestras tumorales analizadas fueron satisfactoriamente teñidas y mostraban algún grado de expresión de las EGFR y HER2. La tinción en la masa tumoral en cada caso era homogénea.

EGFR resultó estar sobre-expresada en 12 de los 50 casos, es decir en el 24% mostró una inmunotinción positiva para esa proteína. HER2 se identificó como sobre-expresada en 6 de los 50 casos analizados, es decir en el 12%.

5.2.7. Relación entre la sobre-expresión proteica de EGFR y las variables clínico-patológicas

En la tabla 11 se representa la correlación de la expresión de EGFR con la categoría tumoral (T), la presencia de metástasis ganglionares (N+), el estadio tumoral, el grado histológico, la afectación de la órbita, la invasión intracraneal y el desarrollo de metástasis a distancia.

Hemos observado diversas relaciones estadísticamente significativas entre la expresión de EGFR y determinadas variables clínico-patológicas. Así, apreciamos una correlación significativa entre la presencia de ganglios linfáticos metastásicos (N+) y la expresión de EGFR ($p=0,001$). En nuestra serie el 83,3% de las muestras en las que se observó una inmunotinción fuerte de EGFR, pertenecían a pacientes con adenopatías metastásicas (N+). También obtuvimos una relación significativa entre la expresión proteica y la presencia de afectación orbitaria, que es un importante marcador pronóstico en los CENS ($p=0,001$). El 100% de los pacientes de nuestra serie que presentaban afectación orbitaria mostraban una intensa expresión de EGFR en las muestras estudiadas, no discriminando entre afectación de la órbita o de la periórbita.

Como se puede apreciar en la tabla 11, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la expresión de EGFR según la categoría T, el estadio, el grado histológico, la invasión intracraneal y el desarrollo de metástasis a distancia. No obstante, se observa que aquellos pacientes con expresión de EGFR intensa, presentan tumores con categoría T más avanzada, ya que en el 75% de los casos con inmunotinción para EGFR intensa eran T4. Análogamente, si tenemos en cuenta el estadio global, observamos que en el 84,3% de las muestras con expresión intensa de EGFR pertenecían a tumores en estadio IV.

Aunque tampoco existe una relación estadísticamente significativa entre la expresión y el grado histológico, las muestras menos diferenciadas tienden a mostrar una expresión intensa de EGFR ($p=0,114$).

Por último, destacar que no se observó expresión intensa de EGFR en ninguna de las muestras pertenecientes a pacientes con invasión intracraneal o metástasis a distancia.

Tabla 11. Relación entre la sobre-expresión proteica de EGFR y las variables clínico-patológicas

Variable	Número de casos	Expresión de EGFR		p
		Débil	Intensa	
<u>Categoría T</u>				
T2	5	4 (10,5%)	1 (8,3%)	
T3	15	13 (34,2%)	2 (16,7%)	0,334
T4a	22	14 (36,8%)	8 (66,7%)	
T4b	8	7 (18,4%)	1 (8,3%)	
<u>Categoría N</u>				
N0	37	35 (92,1%)	3 (16,7%)	0,001
N+	13	3 (7,9%)	10 (83,3%)	
<u>Estadio</u>				
II	4	4 (10,5%)	0 (0%)	
III	14	12 (31,6%)	2 (16,7%)	0,174
IVa	24	15 (39,5%)	9 (75%)	
IVb	8	7 (18,4%)	1 (8,3%)	
<u>Grado histológico</u>				
Bien	18	14 (36,8%)	4 (33,3%)	
Moderada	9	9 (23,7%)	0 (0%)	0,114
Pobre	23	15 (39,5%)	8 (66,7%)	
<u>Afectación orbitaria</u>				
No	28	28 (73,7%)	0 (0%)	
Periórbita	15	5 (13,2%)	10 (83,3%)	0,001
Órbita	7	5 (13,2%)	2 (16,7%)	
<u>Invasión intracraneal</u>				
No	41	29 (76,3%)	12 (100%)	0,065
Sí	9	9 (23,7%)	0 (0%)	
<u>Metástasis</u>				
No	45	33 (86,8%)	12 (100%)	0,237
Sí	5	5 (13,2%)	0 (0%)	

5.2.8. Relación entre la sobre-expresión proteica de EGFR con el curso clínico

No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas ($p=0,139$) en la expresión de EGFR entre los pacientes que habían fallecido y los que permanecían vivos al final del seguimiento (Figura 31). De los 12 pacientes en los que se observó una expresión intensa de EGFR, 7 fallecieron a causa del tumor, 3 fallecieron por otras causas y 2 permanecían vivos, sin signos de recidiva, al final del seguimiento, no hallándose correlaciones significativas ($p=0,130$ Test de Chi-cuadrado). Sin embargo, aquellos pacientes con una inmunotinción intensamente positiva de EGFR presentaban, de forma significativa ($p=0,010$), recidivas de su enfermedad antes que los pacientes sin sobre-expresión de la proteína (Figura 32). Todos los pacientes en los que la enfermedad recidivó, mostraban una intensa expresión de EGFR ($p=0,065$) (Tabla 12).

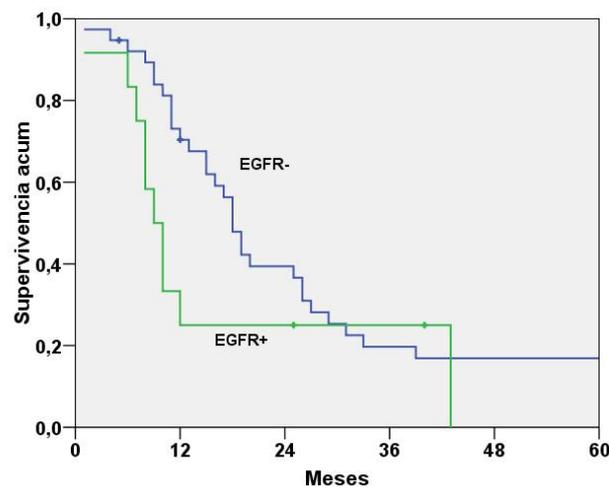


Figura 31. Supervivencia global según la expresión de EGFR

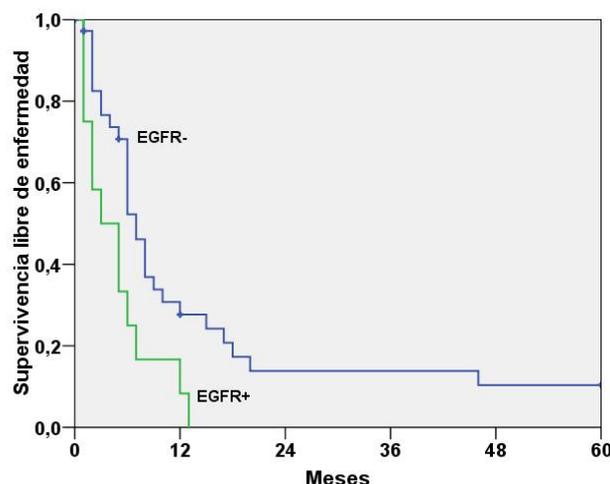


Figura 32. Supervivencia libre de enfermedad según la expresión de EGFR

Tabla 12. Comparación de la expresión de EGFR entre los pacientes libres de tumor (9) y los pacientes con recidiva (41) (Fisher's Exact Test, $p=0,065$)

Intensidad de la expresión de EGFR	Sin tumor	Recidiva	Total
Negativa	9 (23,7%)	29 (76,3%)	38
Intensa	0 (0%)	12 (100%)	12
Total	9	41	50

5.2.9. Relación entre la sobre-expresión proteica de HER2 y las variables clínico-patológicas

Representamos en la tabla 13 la correlación entre la expresión de HER2 y la categoría tumoral (T), la categoría N, el estadio tumoral, el grado histológico, la afectación de la órbita, la invasión intracraneal y el desarrollo de metástasis a distancia.

Observamos una asociación significativa entre la presencia de invasión intracraneal y la expresión de HER2 ($p=0,001$). El 67% de los pacientes que presentaban invasión intracraneal tenían la proteína HER2 sobre-expresada y todos los pacientes ($n=6$) con inmunotinción positiva de HER2 tenían invasión intracraneal.

No encontramos asociación estadísticamente significativa entre la expresión de HER2 y la categoría T, la presencia de adenopatías metastásicas (N+), el estadio, el grado histológico, la afectación orbitaria y el desarrollo de metástasis a distancia. No obstante, sí observamos que los pacientes con expresión de HER2 tenían tendencia a

presentar tumores en un estadio más avanzado, ya que en el 100% de los casos en los que la inmunotinción con HER2 era positiva, los tumores pertenecían a la categoría T4 y al estadio IV.

El resto de asociaciones, como se observa en la tabla 13, además de no ser significativas, no muestran tendencias destacables.

Tabla 13. Relación entre la sobre-expresión proteica de HER2 y las variables clínico-patológicas

Variable	Número de casos	Expresión de HER2		p
		Débil	Intensa	
<u>Categoría T</u>				
T2	5	5 (11,4%)	0 (0%)	
T3	15	15 (34,1%)	0 (0%)	0,187
T4a	22	18 (40,9%)	4 (66,7%)	
T4b	8	6 (13,6%)	2 (33,3%)	
<u>Categoría N</u>				
N0	37	34 (77,3%)	3 (50%)	0,173
N+	13	10 (22,7%)	3 (50%)	
<u>Estadio</u>				
II	4	4 (9,1%)	0 (0%)	
III	14	14 (31,8%)	0 (0%)	0,238
IVa	24	20 (45,5%)	4 (66,7%)	
IVb	8	6 (13,6%)	2 (33,3%)	
<u>Grado histológico</u>				
Bien	18	16 (36,4%)	2 (33,3%)	
Moderada	9	8 (18,2%)	1 (16,7%)	0,978
Pobre	23	20 (45,5%)	3 (50%)	
<u>Afectación orbitaria</u>				
No	28	23 (52,3%)	5 (83,3%)	
Periórbita	15	15 (34,1%)	0 (0%)	0,224
Órbita	7	6 (13,6%)	1 (16,7%)	
<u>Invasión intracraneal</u>				
No	41	41 (93,2%)	0 (0%)	0,001
Sí	9	3 (6,8%)	6 (100%)	
<u>Metástasis</u>				
No	45	41 (93,2%)	4 (66,7%)	0,103
Sí	5	3 (6,8%)	2 (33,3%)	

5.2.10. Relación entre la sobre-expresión proteica de HER2 con el curso clínico

La sobre-expresión de HER2 no se relacionó con la supervivencia al final del seguimiento ($p=0,169$) (Figura 33). Todos los pacientes en los que se observó sobre-expresión de HER2 fallecieron a causa del tumor, no hallándose correlaciones significativas con la mortalidad ($p=0,302$ Test de Chi-cuadrado). Sin embargo, se observó que los pacientes con inmunotinción positiva para HER2 presentaban, de forma significativa ($p=0,047$), recidivas de su enfermedad (Figura 34). Todos los pacientes en los que la enfermedad recidivó, mostraban expresión de HER2 ($p=0,283$) (Tabla 14).

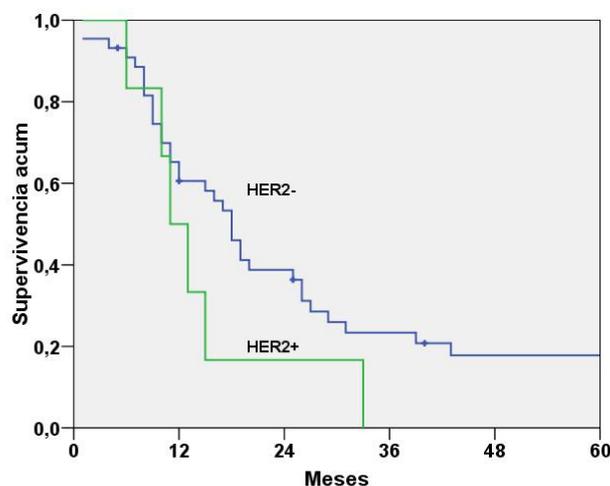


Figura 33. Supervivencia global según la expresión de HER2

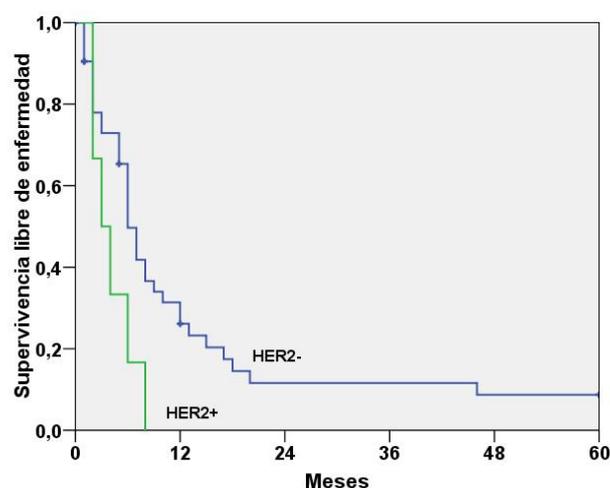


Figura 34. Supervivencia libre de enfermedad según la expresión de HER2

Tabla 14. Comparación de la expresión de HER2 entre los pacientes libres de tumor (9) y los pacientes con recidiva (41) (Fisher's Exact Test, $p=0,283$)

Intensidad de la expresión de HER2	Sin tumor	Recidiva	Total
Débil	9 (20,5%)	35 (79,5%)	44
Intensa	0 (0%)	6 (100%)	6
Total	9	41	50

5.2.11. Relación entre la amplificación génica y la sobre-expresión proteica de EGFR

Para determinar si el mecanismo responsable de la sobre-expresión de EGFR en los CENS era la amplificación de su gen, se compararon los resultados obtenidos del análisis génico de *EGFR* mediante MLPA y FISH con los datos obtenidos de la expresión proteica mediante IHQ.

Así, en el grupo de CENS ($n=44$), en los que analizamos la amplificación génica y realizamos el estudio IHQ, todas las muestras tumorales analizadas mostraban algún grado de expresión de EGFR, siendo la tinción homogénea en cada caso. Se obtuvo un grado de tinción débil en 33 casos y de tinción intensa en 11 casos.

Se observa una correlación estadísticamente significativas entre la expresión proteica de EGFR y la ganancia del gen *EGFR* (Fisher's Exact Test, $p=0,001$). En todos los casos en los que la inmunotinción era débil no se identificaron alteraciones a nivel génico, mientras que de los 11 casos en los que se obtuvo una tinción intensa, en 6 de ellos no se observaron alteraciones génicas (Tabla 15).

Tabla 15. Comparación entre la expresión de la proteína EGFR y los niveles de la ganancia génica en los CENS (Fisher's Exact Test, $p=0,001$)

Expresión de EGFR (IHQ)	Niveles de ADN (MLPA y FISH)		Total
	No ganancia	Ganancia	
Expresión débil	33	0	33
Expresión fuerte	6	5	11
Total	39	5	44

5.2.12. Relación entre la ganancia/amplificación génica y la sobre-expresión proteica de HER2

Hemos comparado los resultados obtenidos del análisis génico de *HER2* mediante MLPA y FISH con los datos obtenidos de la expresión proteica mediante IHQ.

Realizamos un estudio IHQ en las muestras de CENS en los que analizamos la ganancia/amplificación génica (n=41). Todas las muestras tumorales analizadas mostraban algún grado de expresión de HER2 y la tinción en cada caso fue homogénea. Se obtuvo un grado de tinción débil en 35 casos y de tinción intensa en 6 casos.

Después de analizar los datos obtenidos del estudio IHQ y del estudio génico, los resultados revelan que existe una correlación completa entre la expresión proteica de HER2 y la ganancia del gen *HER2* (Fisher's Exact Test, $p=0,001$). En todos los casos en los que la inmunotinción era débil no se identificaron alteraciones a nivel génico, mientras que todos los casos con tinción intensa tenían ganancias génicas, representando el 100% de correspondencia (Tabla 16).

Tabla 16. Comparación entre la expresión de la proteína HER2 y los niveles de la ganancia génica en los CENS (Fisher's Exact Test, $p=0,001$)

Expresión de HER2 (IHQ)	Niveles de ADN (MLPA y FISH)		Total
	No ganancia	Ganancia	
Expresión débil	35	0	35
Expresión fuerte	0	6	6
Total	35	6	41

6

DISCUSIÓN

6.1. Justificación

Los CENS son los tumores malignos más frecuentes originados en las fosas nasales y senos paranasales. Su incidencia es escasa en relación con otras neoplasias, pero su localización centrofacial y la proximidad a importantes estructuras neurovasculares, la órbita y el sistema nervioso central, hace que su tratamiento sea complejo y desalentador. A pesar de que en las últimas décadas se han realizado importantes esfuerzos por conocer la enfermedad y en introducir nuevas orientaciones terapéuticas (técnicas quirúrgicas, modalidades de RT, protocolos de QT) la alta morbimortalidad que generan hace nos planteemos desarrollar nuevos métodos diagnósticos, pronósticos y terapéuticos basados en la biología molecular.

Hasta la fecha, son escasos los estudios publicados acerca de la biología molecular de los CENS, por lo que en ocasiones la discusión no ha podido ser contrastada. Nuestro grupo tiene abiertas varias líneas de investigación en este campo entre las que se incluyen los carcinomas de faringe y laringe y los tumores originados en las fosas y senos paranasales. El presente estudio es más una etapa más a cubrir en el curso de estas investigaciones.

Refiriéndonos ya de forma concreta al propio trabajo, podemos decir que el número de pacientes estudiados, aunque no muy elevado, al ser los CENS tumores infrecuentes, constituye una serie interesante como punto de partida para realizar ulteriores estudios.

Para llevar a cabo este estudio hemos unido los casos del HUCA a los del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid), confiando que el aumento del tamaño muestral supla algunos sesgos propios del manejo de los CENS, al tratarse de dos instituciones de ubicación y características distintas pero con un *ars medica* similar.

6.2. Aspectos clínico-patológicos

El estudio de estas variables clínico-patológicas en un número limitado de CENS no pretende establecer resultados de tipo epidemiológico, sino definir la muestra estudiada y comprobar que se ajusta a las características descritas para estos tumores en series más amplias.

Las variables epidemiológicas, clínicas y patológicas estudiadas en los 50 pacientes concuerdan, en general, con los rasgos descritos en otras series de CENS previamente publicadas^{1,5,33,36}.

Así, los CENS estudiados afectan predominantemente a varones en la sexta o séptima décadas de la vida, aunque el número de mujeres afectadas es mayor que en los carcinomas epidermoides de las VAS, como han descrito otros autores⁹⁷. No hemos podido identificar, de forma evidente, la exposición previa a diversos carcinógenos que han sido implicados en la etiología de los CENS, pero esto coincide también con la mayor parte de los trabajos publicados^{11,12,15}.

En nuestro área geográfica la localización anatómica más afectada por los CENS son los senos paranasales y en concreto el seno maxilar, teniendo las fosas nasales una frecuencia ligeramente menor^{5,6}. Nuestra serie cumple este criterio según puede observarse en la Tabla 5. El grado histológico también está dentro de lo descrito en los CENS, con predominio de los pobremente diferenciados²⁵. Otro de los rasgos clínicos encontrados, que también ha sido previamente reseñado^{1,3}, es que la mayoría de los CENS se diagnostican en estadios avanzados, 90% son T3 y T4 y 26% N+, cifra ligeramente superior a lo descrito por otros autores³². El hecho de realizar diagnósticos con la enfermedad avanzada ha condicionado que, en nuestra serie, el 76% de los pacientes recibiese RT postoperatoria.

La supervivencia específica de los pacientes de nuestra muestra fue del 18% a los 5 años de seguimiento, ligeramente inferior a la publicada en otras series occidentales^{1,33,36} y claramente peor a la observada en algunos estudios japoneses³⁸. Esta discordancia podría deberse a que nuestra muestra se compone, principalmente, de tumores en estadios avanzados, con un pronóstico peor, ya que procede de centros de referencia a los que no se remiten tumores en estadios precoces, mientras que en series más amplias se incluyen tumores en todos los estadios.

La mayor parte de los pacientes presentan recidivas locales de forma precoz, que son la causa principal de muerte, siendo el desarrollo de metástasis a distancia un hecho poco frecuente (10%), dato que también coincide con lo publicado¹.

Hemos comprobado que la invasión intracraneal se relaciona significativamente con una disminución de la supervivencia. Observamos algunas tendencias que relacionan a los pacientes con tumores de mayor tamaño (T4) y metástasis ganglionares al diagnóstico (N+) con una peor supervivencia, aunque sin alcanzar significación estadística en ninguno de estos aspectos. Otros autores sí encuentran significativos estos datos al presentar series más amplias^{1,4,8,32,41}. Nosotros hemos observado que los pacientes con estadios avanzados, metástasis ganglionares al diagnóstico, invasión intracraneal y afectación de la órbita por el tumor, presentaban

recidivas tumorales precoces, pero esta vez de forma significativa, como también se ha sido publicado en estudios previos^{1,3,4,8}.

Por todo anteriormente expuesto consideramos que nuestra serie es representativa de los CENS, ya que las variables estudiadas se ajustan, en líneas generales, a lo esperado y exhiben las tendencias habituales en estos tumores. En algunas variables no se alcanzan valores significativos al ser una muestra reducida. No obstante, las tendencias marcadas permiten suponer que estos valores se conseguirían si aumentásemos el número de casos, con las lógicas reservas que ello supone.

6.3. Aspectos genéticos

Los receptores de factores de crecimiento de la familia ERBB (especialmente *EGFR* y *HER2*) han sido implicados en la progresión tumoral y en el pronóstico^{98,99} de una gran variedad de carcinomas humanos, como los del tracto gastrointestinal¹⁰⁰, colorrectales¹⁰¹, mama¹⁰², pulmón¹⁰³, próstata¹⁰⁴ y de cabeza y cuello¹⁰⁵.

El oncogén *c-ErbB1* o *EGFR* sobre-expresado se ha visto en el 40-80% de los CECC¹⁰⁶, siendo un elemento clave en su patogénesis al activar diversas vías de señalización intracelular, relacionadas con la adquisición de un fenotipo tumoral. El *EGFR* ha sido citado en numerosos trabajos como un marcador pronóstico negativo, independiente de otras variables. Se ha demostrado que su amplificación está relacionada con el desarrollo de recidivas post-tratamiento y con menor supervivencia. Hay que tener en cuenta que la mayoría de los estudios en CECC se han realizado en los tumores de laringe y faringe, que son los más frecuentes, existiendo, hasta el momento actual, escasos datos acerca de su participación en la carcinogénesis y progresión de los CENS^{85,86,87}.

El oncogén *c-ErbB2* o *HER2* codifica es el otro receptor de la familia c-erbB más estudiado en la patogénesis de los CECC, aunque está menos implicada su participación que en otros tipos tumorales^{67,98}. Se ha demostrado su expresión en la mucosa nasal normal, pero apenas existen estudios en los CENS.

Con el fin de aportar mayor conocimiento de la acción de estos dos genes en la carcinogénesis y progresión de los CENS, además de explorar sus posibilidades como marcadores pronósticos y terapéuticos, realizamos estudios de amplificación génica y de expresión proteica en muestras de esos tumores.

6.3.1. En relación a *EGFR*

En un estudio realizado por nosotros mediante “arrays-CGH” en CENS, observamos amplificaciones (10%) de la región 7p12, donde se localiza el gen *EGFR*, siendo este el motivo que nos llevó a profundizar en los estudios génicos y de expresión⁸¹.

En el presente trabajo hemos estudiado la presencia de amplificaciones del gen en nuestra serie mediante MLPA y FISH, hallando una clara amplificación del gen en 5 de las 44 muestras estudiadas (11,4%). Encontramos una relación significativa entre las alteraciones génicas y la sobre-expresión de la proteína pues en todos los casos con amplificación, la proteína se sobre-expresó. Estos datos, difieren de lo publicado en relación al resto de CECC, donde los fenómenos de amplificación son escasos. Así, los CENS podrían constituir un subgrupo dentro de los CECC, en los que la amplificación del gen y su expresión pueden tener más valor. Sin embargo, en 6 muestras en las que se observó sobre-expresión proteica no encontramos alteraciones a nivel génico, por lo que, en determinados casos, el mecanismo que altera la expresión proteica puede ser distinto.

Hemos observado una correlación significativa entre la amplificación de *EGFR* con la afectación orbitaria y el desarrollo de metástasis ganglionares, además de una tendencia a presentar tumores más indiferenciados y en estadios avanzados. Asimismo, la presencia de amplificación del gen se relacionó con el desarrollo de recidivas precoces. Estos datos, aparte de corroborar los obtenidos mediante la IHQ con los que mantiene una buena correlación y que serán citados a continuación, permitirían suponer que la amplificación de *EGFR* podría ser un marcador pronóstico, tanto desde su alteración génica como desde su expresión proteica.

Además, de confirmarse la amplificación de *EGFR* en los CENS, ésta podría ser utilizada como marcador para la utilización de Cetuximab y Gefitinib en estos pacientes, pues el aumento en el número de copias del gen es un marcador de sensibilidad al tratamiento con dichos fármacos.

No hemos estudiado la existencia de mutaciones activadoras de *EGFR*, las cuales son frecuentes en los carcinomas de pulmón y en los glioblastomas multiformes, pero infrecuentes en los CECC⁹⁸. Sin embargo, Willmore-Payne *et al.* describen tasas del 7%¹⁰⁷, hallando un caso en un carcinoma epidermoide de seno maxilar. El hallazgo de mutaciones en el gen *EGFR* (especialmente en los exones 18-21) podría agrupar a determinados pacientes que no responden a la terapia con

anticuerpos inhibidores del receptor y sí a los TKIs. No obstante, dado que la proporción de pacientes que presentan la mutación es muy pequeña y la secuenciación del gen es muy compleja, al tener un elevado número de exones (28), no estaría justificada su utilización rutinaria, al menos de momento.

Además, a diferencia de lo que ocurre en otras localizaciones como el pulmón, es infrecuente en los CECC la presencia de mutaciones en el oncogén *KRAS*⁹². Este gen está en la ruta molecular desencadenada por la activación de *EGFR*, por lo que su secuenciación en todos los casos tampoco nos parece justificada.

En nuestro estudio hemos observado mediante IHQ que la proteína EGFR estaba sobre-expresada en el 24% de los casos, cifra inferior a la que se aprecia globalmente en los CECC (38-47%)⁸². Como se ha visto previamente, estas cifras difieren entre los diferentes subsitios de cabeza y cuello, siendo la cavidad oral y la faringe las localizaciones que más sobre-expresan EGFR. Los adenocarcinomas nasosinusales, que son tumores de localización similar a los CENS, pero con distinta extirpe histopatológica, sobre-expresan EGFR hasta el 32% de los casos¹⁰⁸. Estos datos reflejan que en el área sinonasal la sobre-expresión de EGFR podría estar involucrada en la carcinogénesis de un subgrupo de pacientes, potenciales beneficiarios de su uso como herramienta diagnóstica y terapéutica.

Los mecanismos que alteran la expresión de la proteína EGFR son varios. Hay estudios publicados donde concluyen que la sobre-expresión de EGFR se debe fundamentalmente al incremento de la síntesis del ARNm¹⁰⁹. Los factores descritos en relación al aumento de la síntesis del ARNm son alteraciones en la p53, polimorfismos en el gen *EGFR* y, en menos casos, amplificación de dicho gen¹¹⁰. Otra alternativa para explicar la expresión aumentada de EGFR es que ésta se deba a fenómenos de “down-regulation” del receptor. Este último aspecto puede ser modulado por la cortactina, codificada por el gen *CTTN1* localizado en la región 11q13, cuya ganancia se ha observado en el 37% de los pacientes, como nuestro grupo ha publicado previamente⁸¹.

La sobre-expresión de EGFR en nuestro estudio de IHQ se correlacionó de manera significativa con el desarrollo de adenopatías metastásicas y con la afectación de estructuras orbitarias, estando ambas situaciones ya implicadas con el mal pronóstico de estos tumores³². La relación entre la sobre-expresión de EGFR y el desarrollo de adenopatías metastásicas podría ayudar a seleccionar pacientes para el tratamiento de las áreas ganglionares potencialmente afectadas. No obstante, en la

actualidad no existe consenso entre los diferentes autores en relación a la necesidad de realizar vaciamentos profilácticos en pacientes con CENS^{30,33}.

Todos los pacientes con afectación orbitaria mostraron sobre-expresión de EGFR aunque, como ya fue descrito por nosotros con anterioridad, no sería útil para indicar la exenteración orbitaria profiláctica, al no discriminar entre afectación de la periórbita y de la órbita propiamente dicha¹¹¹.

Existen estudios acerca de la participación de EGFR en el desarrollo del tejido óseo y las metástasis óseas¹¹². Aunque en los CENS no son frecuentes las metástasis óseas, su origen en estructuras rodeadas de hueso y su progresión a través de dicho tejido puede hacernos suponer que la vía de señalización de EGFR podría tener importancia y justificar la mayor agresividad de los tumores con sobre-expresión de EGFR. Sin embargo, se desconoce si esta actividad osteolítica podría ser frenada por inhibidores de dicho receptor.

Se observó que la sobre-expresión intensa de EGFR era más frecuente en tumores con estadios avanzados y poco diferenciados que, en principio como ocurre con otros CECC (faringe y laringe) responderían mejor al tratamiento con QT y RT⁸². Sin embargo, hay estudios donde se relaciona la sobre-expresión de EGFR con resistencia a la QT y RT, siendo estos pacientes candidatos al tratamiento complementario con inhibidores selectivos del EFGR¹¹³.

Un dato interesante observado en nuestro estudio es la ausencia de expresión de *EGFR* en todos los pacientes con invasión intracraneal y que desarrollaron metástasis a distancia. Este dato difiere de lo publicado en los carcinomas de mama¹¹⁴ y en los adenocarcinomas de pulmón¹¹⁵, donde sí se han relacionado las metástasis con la sobre-expresión de EGFR. Nuestros datos también estarían en desacuerdo con la teoría comentada anteriormente sobre la relación de EGFR con la invasión a través del tejido óseo.

Nosotros no hemos comprobado una correlación entre la sobre-expresión de EGFR y la supervivencia de los pacientes, dato que contrasta con lo observado en el resto de los CECC. No obstante, sí encontramos relación entre la sobre-expresión de EGFR y el desarrollo de recidivas locales, como también han visto otros autores, aunque con series menores a la nuestra⁸⁶.

Las recidivas locales y regionales son los factores pronósticos más importantes en los CENS. Por ese motivo, la determinación de EGFR podría ser un marcador

pronóstico para seleccionar a los pacientes con alto riesgo de recidiva local y regional. Así, se podrían diseñar estrategias terapéuticas más agresivas o con nuevas alternativas como los inhibidores selectivos de EGFR, tipo Cetuximab.

6.3.2. En relación a *HER2*

El estudio génico de *HER2* trató de demostrar la existencia de la ganancia/amplificación del gen que justificara el aumento de su expresión. Esta ganancia se observó en 6 casos (14,6%), 4 de los cuales mostraron amplificación. En los 6 casos en los que se observó ganancia/amplificación de *HER2*, la proteína estaba sobre-expresada, con una concordancia del 100%, no observándose amplificación ni sobre-expresión en el resto de muestras. Esto significa que el mecanismo por el que se sobre-expresa la proteína es exclusivamente la amplificación génica, coincidiendo con lo publicado previamente por otros autores en mama y ovario¹¹⁶. Sin embargo, en el adenocarcinoma de próstata el mecanismo de sobre-expresión proteica es independiente de la amplificación génica¹¹⁷.

La amplificación de *HER2* se relacionó significativamente con el desarrollo de invasión intracraneal y se observa más en los tumores con estadios avanzados. La ganancia/amplificación génica se relaciona con la ausencia de afectación orbitaria y de metástasis a distancia. Este último dato difiere de lo publicado en los carcinomas de mama donde la amplificación/sobre-expresión de *HER2* se correlaciona con el desarrollo de metástasis hematógenas y tiene mal pronóstico¹¹⁸.

En nuestro estudio los pacientes con ganancia/amplificación de *HER2* tuvieron una supervivencia más baja además de desarrollar recidivas precoces. Estos datos también coinciden con los publicados en los carcinomas de mama¹²² y estómago¹¹⁹.

Nosotros estudiamos la expresión de *HER2* en los CENS observando su sobre-expresión en el 12% (6 de los 50 casos), cifra inferior a la publicada en los CECC donde se llega al 70% de los casos^{120,121}. Hay que tener en cuenta que debido a la heterogeneidad del gen, no siempre que hay amplificación se expresa la proteína. No obstante, la contribución de la expresión de *HER2* a la patogénesis del CECC está menos definida que en otros tumores como los de mama y ovario. Además, se ha comprobado que cuando se produce la heterodimerización del receptor *HER3* se desencadenaría la ruta *pl3K/AKT*.

En los CENS no existen estudios concluyentes acerca de la participación de la expresión de *HER2* en la carcinogénesis y sólo el trabajo de *Li et al.* demostró su

sobre-expresión en una serie de 31 pacientes⁸⁹, aunque la expresión no se correlacionaba con ninguna característica clínica ni patológica, siendo un estudio meramente descriptivo.

Nosotros observamos que la sobre-expresión de HER2 se relacionaba de manera significativa con el desarrollo de invasión intracraneal que es uno de los factores pronósticos más importantes. Los pacientes de nuestra serie con invasión intracraneal tenían en el 70% una expresión intensa de HER2, presentando todos los que tenían sobre-expresión de HER2 una invasión intracraneal.

Esta relación entre HER2 y la invasión intracraneal concuerda con los datos obtenidos en los carcinomas de mama metastásicos¹²². También es consistente con la tendencia observada, aunque no significativa, de que los pacientes con expresión intensa de HER2 presentaban tumores en estadios avanzados, como fue también observado por otros autores en CECC¹²³. Debido a que los pacientes con expresión intensa de HER2 presentaban factores pronósticos desfavorables, era de esperar que desarrollasen recidivas precoces, como así pudo observarse de manera significativa, y que fallecieran por causa del tumor. No obstante, no deben sacarse conclusiones precipitadas, ya que en el pronóstico intervienen múltiples factores y éste no depende sólo de la expresión de un gen.

Comparando nuestros datos con los de los escasos estudios realizados hasta el momento en los CECC, comprobamos que las conclusiones obtenidas por diferentes autores acerca del valor pronóstico de la sobre-expresión de HER2 son diversas. Mientras algunos autores concluyen que la expresión de HER2 no se correlaciona con el grado histológico, la presencia de metástasis y la supervivencia, no siendo por tanto una diana molecular útil en los CECC^{120,124}, otros sí la correlacionan con un buen pronóstico en pacientes con adenopatías metastásicas¹²¹. Estos datos contradictorios hacen necesarios estudios con mayor número de pacientes para intentar aclarar el papel definitivo de la expresión de HER2 en la biología molecular de estos tumores.

Asimismo, dada la existencia de un subgrupo de pacientes con aumento en la expresión de HER2, y como este fenómeno ha sido considerado como un marcador de resistencia al tratamiento con TKIs, su análisis previo sería recomendable antes de iniciar un tratamiento con estos fármacos.

Por último, debemos señalar que no hemos encontrado ningún caso con amplificación/ganancia de *EGFR* y *HER2* de forma simultánea en el mismo paciente, al igual que tampoco observamos esta circunstancia en el estudio de expresión proteica. No obstante, este fenómeno ha sido descrito con relativa frecuencia (30-50%) en los carcinomas de pulmón y mama¹²⁴, produciendo mayor agresividad del tumor, ya que la formación de heterodímeros EGFR-HER2 activa la tirosín-quinasa de EGFR de forma más potente que la homodimerización. Además, los tumores que sobre-expresan ambos receptores son más sensibles a los TKIs que si sólo expresasen EGFR. Por tanto, la sobre-expresión de ambos genes podría sería útil como factor pronóstico y terapéutico. Sin embargo, en los CENS la sobre-expresión simultánea de EGFR y HER2 no parece ser un fenómeno frecuente.

7

CONCLUSIONES

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

1. Los pacientes estudiados en nuestra serie de CENS tenían unas características clínico-patológicas similares a las descritas en la literatura.
2. La supervivencia media fue del 18%, correlacionándose, de manera significativa, con la invasión intracraneal. El 82% de los pacientes (41) presentó una recidiva precoz de su enfermedad, siendo los estadios avanzados, la presencia de adenopatías, la afectación orbitaria y la invasión intracraneal, variables asociadas de forma significativa con su desarrollo.
3. Los CENS de nuestra serie presentaron en el 11,4% de los casos (5/44) una amplificación del gen *EGFR* y en el 14,6% de los casos (6/41) una ganancia del gen *HER2*.
4. La sobre-expresión de la proteína EGFR se demostró en el 24% de los casos y la de HER2 en el 12%, sin observar en ningún caso sobre-expresión simultánea.
5. La amplificación y la sobre-expresión de *EGFR* se relacionan significativamente con las adenopatías metastásicas, la afectación orbitaria y la aparición de recidivas precoces.
6. La ganancia/amplificación de *HER2* y su sobre-expresión se relacionan significativamente con la invasión intracraneal y la aparición de recidivas precoces.
7. La amplificación de *EGFR* se relaciona significativamente con la sobre-expresión de su proteína, aunque no parece ser el único mecanismo responsable.
8. La ganancia/amplificación de *HER2* se relaciona significativamente con la sobre-expresión de su proteína y parece ser el único mecanismo responsable.

8

PROYECTO FUTURO

Como ya se indicó en las bases previas, esta tesis doctoral es el producto de una línea de investigación iniciada por nuestro grupo en los carcinomas nasosinuales. Sin embargo, la línea de investigación lógicamente no se termina aquí, siendo este trabajo una etapa más que ha sido cubierta.

En una primera fase de investigación hemos realizado un estudio panorámico general (“screening”) del genoma de los CENS mediante el empleo de “microarrays-CGH”. Esto nos ha permitido rastrear todos los cromosomas en busca de zonas calientes (“hot spot”), que fueron estudiadas, posteriormente, de forma selectiva con FISH y MLPA⁸¹.

En este estudio dirigimos nuestra investigación hacia dos genes posiblemente implicados, el *EGFR* y el *HER2*, tanto a nivel génico como a nivel proteico. Estos genes habían sido involucrados en la carcinogénesis-progresión de los carcinomas de faringe y de laringe, pero apenas habían sido estudiados en los CENS. Su interés no sólo radica en su relación con el pronóstico, sino también en su posible utilidad terapéutica, al tener inhibidores específicos frente a los receptores que expresan.

El paso siguiente en futuras investigaciones sería disponer de modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* para estudiar estos tumores. Hasta la fecha hay muy pocas líneas celulares registradas de CENS y los modelos animales para estos tumores son escasos y con muchas limitaciones. Los modelos animales (sobre todo los modelos ortotópicos) serían una herramienta experimental clave para rentabilizar los datos de la biología molecular que hemos obtenido en los CENS, así como para la evaluación de nuevas estrategias de tratamiento.

Actualmente, nuestra línea de investigación se dirige hacia la caracterización de líneas celulares específicas de los CENS para conocer mejor el genoma tumoral y las vías metabólicas alteradas. Dichas líneas celulares reproducirían *in vitro* el comportamiento de las células tumorales frente a posibles inhibidores específicos, con lo que podríamos seleccionar así dianas terapéuticas. Además, a partir de las líneas celulares se podrían segregar células madre tumorales y estudiar su comportamiento *in vitro* e *in vivo* (en modelo animal). Por último, aunque complejo, sería conveniente desarrollar un modelo animal ortotópico, que permitiese caracterizar y observar las formas de progresión macroscópica y microscópica del tumor en todas sus etapas.

9

BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹ Dulguerov P, Jacobsen M, Allal A, Lehman W, Calcaterra T. Nasal and paranasal sinus carcinoma: are we making a progress? A serie of 220 patients and systematic review. *Cancer* 2001; 92:3012-3029.
- ² Cantú G, Bimbi G, Miceli R, Mariani L, Colombo S, Riccio S, Squadrelli M, Battisti A, Pompilio M and Rossi M. Lymph node metastases in malignant tumors of paranasal sinuses. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008; 134:170-177.
- ³ Bhattacharyya N. Factors affecting survival in maxillary sinus cancer. *J Oral Maxillofac Surg* 2003;61:1016-1021.
- ⁴ Nuñez F, Suárez C, Álvarez I, Losa JL, Barthe P, Fresno MF. Sino-nasal adenocarcinoma: epidemiological and clinicopathological study of 34 cases. *J Otolaryngol* 1993;22: 86-90.
- ⁵ Gras Cabrerizo JR, Sarandeses García A, Montserrat i Gili JR y Orús Dotú C. Revisión de los carcinomas de senos paranasales. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2007;58:266-275.
- ⁶ Suárez Nieto C y Llorente Pendás JL. Tumores malignos de fosas nasales y senos paranasales. En: Suárez Nieto C: *Oncología de Cabeza y Cuello*, Barcelona: Ars Médica; 2002:75-90.
- ⁷ Giri SP, Eashwer HR, Gemer LS, Krishnan L, Smalley SR, Evans RG. Management of advanced squamous cell carcinomas of the maxillary sinus. *Cancer* 1992;69:657-661.
- ⁸ Álvarez I, Suárez C, Rodrigo JP, Núñez F, Caminero MJ. Prognosis factors in paranasal sinus cancer. *Am J Otolaryngol* 1995;16:109-114.
- ⁹ Wolf J, Schmezer P, Fengel D, Schroeder HG, Scheithauer H, Woeste P. The role of combination effects on the etyology of malignant nasal tumors in the wood-working industry. *Acta Otolaryngol* 1998;535:1-16.
- ¹⁰ Demers PA, Kogevinas M, Boffetta P, Leclerc A, Luce D, Gerin M, Battista G, Belli S, Bolm-Audorf U, Brinton LA. Wood dust and sino-nasal cáncer: pooled reanalysis of twelve case-control studies. *Am J Ind Med* 1995;28:151-166.
- ¹¹ Götte K, Hörmann K. Sinonasal malignancy: what's new? Review. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2004;66:85-97.
- ¹² Luce D, Leclerc A, Begin D, Demers PA, Gerin M, Orlowski E, Kogevinas M, Belli S, Bugel I, Bolm-Audorff U, Brinton LA, Comba P, Hardell L, Hayes RB, Magnani C, Merler E, Preston-Martin S, Vaughan TL, Zheng W, Boffetta P. Sinonasal cancer and occupational exposures: a pooled analysis of 12 case-control studies. *Cancer Causes Control* 2002;13:147-157.

-
- ¹³ Holt GR. Sinonasal neoplasm and inhaled air toxics. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;11:12-14.
- ¹⁴ Kenady DE. Cancer of the paranasal sinuses. *Surg Clin North Am* 1986;66:119-131.
- ¹⁵ Mannelje A, Kogevinas M, Luce D, Demers PA, Begin D, Bolm-Audorff U, Comba P, Gérin M, Hardell L, Hayes RB, Leclerc A, Magnani C, Merler E, Tobías A, Boffetta P. Sinonasal cancer, occupation, and tobacco smoking in European women and men. *Am J Ind Med* 1999;36:101-107.
- ¹⁶ Zheng W, McLaughlin JK, Chow WH, Chien HT, Blot WJ. Risk factors for cancers of the nasal cavity and paranasal sinuses among white men in the United States. *Am J Epidemiol* 1993;138:965-972.
- ¹⁷ Syrjanen KJ. HPV infections in benign and malignant sinonasal lesions. *J Clin Pathol* 2003;56:174-181.
- ¹⁸ Yamaguchi KT, Shapshay SM, Incz JS. Inverted papillomas and squamous cell carcinomas. *J Otolaryngol* 1979;8:171-178.
- ¹⁹ Weber RS, Schllitoe EJ, Robins T, Luna MA, Batsakis JG, Donovan DT, Adler-Storhthz K. Prevalence of human papilloma virus in inverted papillomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1988;114:23-26.
- ²⁰ Brandwein M, Steinberg B, Thung S, Biller H, Dilorenzo T, Galli R. Human papilloma virus 6/11 and 16/18 in Schneiderian inverted papillomas. *Cancer* 1989;63:1708-1713.
- ²¹ Batsakis JG, Suárez P. Schneiderian papillomas and carcinomas: a review. *Adv Anat Pathol* 2001; 8:53-64.
- ²² Alos L, Moyano S, Nadal A, Alobid I, Blanch JL, Ayala E, Lloveras B, Quint W, Cardesa A, Ordi J. Human papillomaviruses are identified in a subgroup of sinonasal squamous cell carcinomas with favorable outcome. *Cancer* 2009;115:2701-2709
- ²³ Leung SY, Yuen ST, Chung LP, Kwong WK, Wong MP, Chan SY. Epstein-Barr virus is present in a wide histological spectrum of sinonasal carcinomas. *Am J Surg Pathol* 1995;19:994-1001.
- ²⁴ Dunn ST, Clark GD, Cannon TC, Min KW. Survey of sinonasal inverted papilloma for Epstein-Barr virus. *Head Neck* 1997;19:98-106.
- ²⁵ Hoppe BS, Stegman LD, Zelefsky MJ, Rosenzweig KE, Wolden SL, Patel SG, Shah JP, Kraus DH, Lee NY. Treatment of nasal cavity and paranasal sinus cancer with modern

radiotherapy techniques in the postoperative setting-the MSKCC experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;67:691-702.

²⁶ Donald PJ. Surgical evaluation of tumors of the paranasal sinuses and nasal cavity. Thawley SE, Panje WR, Editors. *Comprehensive Management of Head and Neck Tumors*. Philadelphia: WB Saunders Co; 1998;941-954.

²⁷ Ernest a, Weymuller JR. Neoplasm of the paranasal sinuses. En: Cummings CW, et al, Editors. *Otolaryngol Head Neck Surgery*, St. Louis: Mosby-Year Book; 1992: 941-954.

²⁸ Gras Cabrerizo JR, Orus Dotu C, Montserrat Gili JR, Fabra Llopis JM, Leon Vintro X, De Juan Beltran J. Epidemiologic analysis of 72 carcinomas of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2006;57: 359-363.

²⁹ Tiwari R, Hardillo JA, Mehta D, Slotman B, Tobi H, Croonenburg E, van der Waal I, Snow GB. Squamous cell carcinoma of maxillary sinus. *Head Neck* 2000;22:164-169.

³⁰ Le QT, Fu KK, Kaplan MJ, Terris DJ, Fee WE, Goffinet DR. Lymph node metastasis in maxillary sinus carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;46:541-549.

³¹ Kim GE, Chung EJ, Lim JJ, Keum KC, Lee SW, Cho JH, Lee CG, Choi EC. Clinical significance of neck node metastasis in squamous cell carcinoma of the maxillary antrum. *Am J Otolaryngol*. 1999;20:383-90.

³² Nazar G, Rodrigo JP, Llorente JP, Baragaño L, Suárez C. Pronostic factors of maxillary sinus malignancies. *Am J Rhinology* 2004; 18:233-238.

³³ Dulguerov P, Allal AS. Nasal and Paranasal sinus carcinoma: how can we continue to make progress? *Current Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 14:67-72.

³⁴ Sobin LH, Wittekind C. *UICC TNM classification of malignant tumors (sixth edition)*. Wiley-Liss ; New York,2002.

³⁵ Nishimura G, Tsukuda M, Mikami Y, Matsuda H, Horiuchi C, Satake K, Taguchi T, Takahashi M, Kawakami M, Hanamura H, Watanabe M, Utsumi A. The efficacy and safety of concurrent chemoradiotherapy for maxillary sinus squamous cell carcinoma patients. *Auris Nasus Larynx* 2008;36:547-554.

³⁶ Konno A, Ishikawa K, Terada N, Numata T, Nagata H, Okamoto Y. Analysis of long-term results of our combination therapy for squamous cell cancer of the maxillary sinus. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1998; Suppl 537: 57-66.

-
- ³⁷ Nishino H, Miyata M, Morita M, Ishikawa K, Kanazawa T, Ichimura K. Combined therapy with conservative surgery, radiotherapy, and regional chemotherapy for maxillary sinus carcinoma. *Cancer* 2000; 89:1925-1932.
- ³⁸ Nibu K, Sugasawa M, Asai M, Ichimura K, Mochiki M, Terahara A, Kawahara N, Asato H. Results of multimodality therapy for squamous cell carcinoma of maxillary sinus. *Cancer* 2002; 94:1476-1482.
- ³⁹ Mendenhall WM, Amdur RJ, Morris CG, Kirwan J, Malyapa RS, Vaysberg M, Werning JW, Mendenhall NP. Carcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Laryngoscope* 2009;119:899-906.
- ⁴⁰ Samant S, Robbins KT, Vang M, Wan J, Robertson J. Intra-arterial cisplatin and concomitant radiation therapy followed by surgery for advanced paranasal sinus cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130: 948-955.
- ⁴¹ Lund VJ, Howard DJ, Wei WI, Cheesman AD. Craniofacial resection for tumors of the nasal cavity and paranasal sinuses. A 17-year experience. *Head Neck* 1998;20:97-105.
- ⁴² Suárez C, Llorente JL, Fernández de León R, Maseda E, López A. Prognostic factors in sinonasal tumors involving the anterior skull base. *Head Neck* 2004;26:136-144.
- ⁴³ Myers LL, Nussenbaum B, Bradford CR, Teknos TN, Esclamado RM, Wolf GT. Paranasal sinus malignancies: an 18-year single institution experience. *Laryngoscope* 2002; 112:1964-1969.
- ⁴⁴ Ketcham AS, Van Buren JM. Tumors of the paranasal sinuses: a therapeutic challenge. *Am J Surg* 1985;150:406-413.
- ⁴⁵ Jin Y, Mertens F, Arheden K, Mandahl N, Wennerberg J, Dictor M, Heim S, Mitelman F. Karyotypic features of malignant tumors of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Int. J. Cancer* 1995;60:637-641.
- ⁴⁶ Gollin SM. Chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of the head and neck; window to the biology of disease. *Head Neck* 2001;23:238-253.
- ⁴⁷ Gil Z, Orr-Urtreger A, Voskoboinik N, Trejo-Leider L, Spektor S, Shomrat R, Fliss DM. Cytogenetic analysis of sinonasal carcinomas. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;134:654-660.
- ⁴⁸ Jin Y, Higashi K, Mandahl N, Heim S, Wennerberg J, Björklund A, Dictor M, Mitelma F. Frequent rearrangement of chromosomal bands 1p22 and 11q13 in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Genes Chrom Cancer* 1990;2:198-204.
-

-
- ⁴⁹ Jin C, Jin Y, Wennerberg J, Dictor M, Mertens F. Nonrandom pattern and cytogenetic abnormalities in squamous cell carcinoma of the larynx. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;28:66-76.
- ⁵⁰ Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319:525-532.
- ⁵¹ Kim MM, Califano JA. Molecular pathology of head and neck cancer. *Int J Cancer* 2004;112:545-553.
- ⁵² Álvarez Marcos C, Alonso Guervós M, Rodríguez Prado N, Sampedro Gimeno T, Domínguez Iglesias F, Hensen M, Llorente JL. Genetic model of transformation and neoplastic progression in laryngeal epithelium. *Head Neck* 2010 (in press).
- ⁵³ Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
- ⁵⁴ Smith BD, Haffty BG, Sasaki CT. Molecular markers in head and neck squamous cell carcinoma: their biological function and prognostic significance. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2001;110:221-228.
- ⁵⁵ Rodrigo JP, García LA, Ramos S, Lazo PS, Suárez C. EMS1 gen amplification correlates with poor prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2000;6:3177-3182.
- ⁵⁶ Le Q-T, Giaccia AJ. Therapeutic exploitation of the physiological and molecular genetic alterations in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:4287-4295.
- ⁵⁷ Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, Ahrendt S, Eby Y, Sewell D, Nawroz H, Bartek J, Sidransky D. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996;56:3630-3633.
- ⁵⁸ van der Riet P, Nawroz H, Hruban RH, Corio R, Tokino K, Koch W, Sidransky D. Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. *Cancer Res* 1994;54:1156-1158.
- ⁵⁹ Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. P53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253:49-53.
- ⁶⁰ Balz V, Scheckenbach K, Gotte K, Bockmühl, U, Petersen I, Bier H. Is the p53 inactivation frequency in squamous cell carcinomas of the head and neck underestimated? Analysis of p53 exons 2-11 and human papilloma virus 16/18 E6 transcripts in 123 unselected tumor specimens. *Cancer Res* 2003;63:1188-1191.

-
- ⁶¹ Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piandosi S, Corio R. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996;56:2488-2492.
- ⁶² Bandoh N, Hayashi T, Takahara M, Kishibe K, Ogino T, Katayama A, Imada M, Nonaka S, Harabuchi Y. VEGF and bFGF expression and microvessel density of maxillary sinus squamous cell carcinoma in relation to p53 status, spontaneous apoptosis and prognosis. *Cancer Lett* 2004;208:215-225.
- ⁶³ Bandoh N, Hayashi T, Kishibe K, Takahara M, Imada M, Nonaka S, Harabuchi Y. Prognostic value of p53 mutations, bax, and spontaneous apoptosis in maxillary sinus squamous cell carcinoma. *Cancer* 2002;94:1968-1980.
- ⁶⁴ Holmila R, Cyr D, Luce D, Heikkilä P, Dictor M, Steiniche T, Stjernvall T, Bornholdt J, Wallin H, Wolff H, Husgafvel-Pursiainen K. COX-2 and p53 in human sinonasal cancer: COX-2 expression is associated with adenocarcinoma histology and wood-dust exposure. *Int J Cancer* 2008;122:2154-2159.
- ⁶⁵ Zhu D, Wang S, Wang W. Expression of ras, p53, proliferating cell nuclear antigen in squamous cell carcinoma of maxillary sinus and their significance. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 1998;33:94-96.
- ⁶⁶ Ito T, Fujieda S, Tsuzuki H, Sunaga H, Fukuda M, Saito H. Appearance of bax protein after preoperative chemoradiotherapy is a prognostic factor in maxillary cancer. *Acta Otolaryngol* 2001;121:967-972.
- ⁶⁷ Rodrigo JP, Ramos S, Lazo P, Álvarez I, Suárez C. Amplification of ERBB oncogenes in squamous carcinoma of the head and neck. *Eur J Cancer* 1996;32:2004-2010.
- ⁶⁸ García Pedrero J, García Carracedo D, Muñoz Pinto C, Herrero A, Rodrigo JP, Suárez C, González Meana MV. Frequent genetic and biochemical alterations of the PI3K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2005;114:242-248.
- ⁶⁹ Xia W, Lau YZ, Zhang HZ, Liu AR, Li L, Kiyokawa N, Clayman GL, Katz RL, Hung MC. Strong correlation between c-erbB-2 overexpression and overall survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1997;3:3-9.
- ⁷⁰ Rodrigo JP, Gonzalez MV, Lazo PS, Ramos S, Coto E, Álvarez I, García LA, Suárez C. Genetic alterations in squamous cell carcinomas of the oropharynx with correlations to clinicopathological features. *Oral Oncology* 2002;38:357-363.
-

-
- ⁷¹ Keleş N, Erdamar B, Kaur A, Değer K. p21, p53, and p27 Kip1 alterations in benign and malignant tumors of sinonasal epithelium. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129:77-84.
- ⁷² Bando N, Hayashi T, Takahara M, Kishibe K, Ogino T, Katayama A, Imada M, Nonaka S, Harabuchi Y. Loss of p21 expression is associated with p53 mutations and increased cell proliferation and p27 expression is associated with apoptosis in maxillary sinus squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol* 2005;125:779-785.
- ⁷³ Bornholdt J, Hansen J, Steiniche T, Dictor M, Antonsen A, Wolff H, Schlünssen V, Holmila R, Luce D, Vogel U, Husgafvel-Pursiainen K, Wallin H. K-ras mutations in sinonasal cancers in relation to wood dust exposure. *BMC Cancer* 2008;8:53.
- ⁷⁴ Götte K, Riedel F, Schäfer C, Coy J, Hörmann K. Cylindrical cell carcinomas of the paranasal sinuses do not show p53 alterations but loss of heterozygosity at 3p and 17p. *Int J Cancer* 2000;85:740-742.
- ⁷⁵ Martínez JG, Pérez-Escuredo J, López F, Suárez C, Alvarez-Marcos C, Llorente JL, Hermsen MA. Microsatellite instability analysis of sinonasal carcinomas. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2009;140:55-60.
- ⁷⁶ Uryu H, Oda Y, Shiratsuchi H, Oda S, Yamamoto H, Komune S, Tsuneyoshi M. Microsatellite instability and proliferating activity in sinonasal carcinoma: molecular genetic and immunohistochemical comparison with oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2005;14:1133-1142.
- ⁷⁷ Homer JJ, Prentice MG, Cawkwell L, Birchall M, Greenman J, Stafford ND. Angiogenesis and the expression of vascular endothelial growth factors A and C in squamous cell carcinoma of the piriform fossa. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129:1110-1114.
- ⁷⁸ Rodrigo JP, Dominguez F, Alvarez C, Herrero A, Suarez C. Expression of E-cadherin, CD44s, and CD44v6 in laryngeal and pharyngeal carcinomas. *Am J Otolaryngol* 2003;24:384-389.
- ⁷⁹ Rodrigo JP, Dominguez F, Suárez V, Canel M, Secades P, Chiara MD. Focal adhesion kinase and E-cadherin as markers for nodal metastasis in laryngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;133:145-150.
- ⁸⁰ Cazorla M, Hernández L, Nadal A, Balbín M, López JM, Vizoso F, Fernández PL, Iwata K, Cardesa A, López-Otín C, Campo E. Collagenase-3 expression is associated with advanced local invasion in human squamous cell carcinomas of the larynx. *J Pathol* 1998;186:144-150.

-
- ⁸¹ López F, Llorente JL, García-Inclán C, Alonso-Guervós M, Cuesta-Albalad MP, Fresno MF, Álvarez-Marcos, C, Suárez C, Hermsen MA. Genomic profiling of sinonasal squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2010 (in press).
- ⁸² Kalyankrishna S, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:2666-2672.
- ⁸³ Polosa R, Prosperini G, Tomaselli V, Howarth PH, Holgate ST, Davies DE. Expression of c-erbB receptors and ligands in human nasal epithelium. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:1124-1131.
- ⁸⁴ Ding GQ, Zheng CQ, Bagga SS. Up-regulation of the mucosal epidermal growth factor receptor gene in chronic rhinosinusitis and nasal polyposis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;133:1097-1103.
- ⁸⁵ Furuta Y, Takasu T, Asai T, Yoshimura S, Tokuchi F, Shinohara T, Nagashima K, Inuyama Y. Clinical significance of the epidermal growth factor receptor gene in squamous cell carcinomas of the nasal cavities and paranasal sinuses. *Cancer* 1992;69:358-362.
- ⁸⁶ Miyaguchi M, Sakai S, Olofsson J, Kuwabara H, Sakamoto H. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinoma of the maxillary sinus. *Eur Arch Otorhinolaringol* 1993;249:478-481.
- ⁸⁷ Miyaguchi M, Takeuchi T, Morimoto K, Kubo T. Correlation of epidermal growth factor receptor and radiosensitivity in human maxillary carcinoma cell lines. *Acta Otolaryngol* 1998;118:428-431.
- ⁸⁸ Chao JC, Fang SY. Expression of epidermal growth factor in the inverted papilloma and squamous cell carcinoma of nasal cavity. *Eur Arch Otorhinolaringol* 2008; 265:917-922.
- ⁸⁹ Li J, Wang B, Guo L. Expressions and significances of EGFR, C-erbB2 and Ki-67 in nasal squamous cell carcinomas. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2007;21:501-506.
- ⁹⁰ Ciardello F, Tortora G. EGFR Antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 2008;358:1160-1174.
- ⁹¹ Cohen EEW. Role of epidermal growth factor pathway-targeted therapy in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 2006;24:2659-2665.
- ⁹² Cooper JB, Cohen EEW. Mechanisms of resistance to EGFR inhibitors in head and neck cancer. *Head Neck* 2009; 34:106-1094.
-

-
- ⁹³ Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au HJ, Langer C, Moore MJ, Zalberg JR. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008;359:1757-1765.
- ⁹⁴ Loriot Y, Mordant P, Deutsch E, Olausson KA, Soria JC. Are RAS mutations predictive markers of resistance to standard chemotherapy? *Nat Rev Clin Oncol* 2009;6:528-534.
- ⁹⁵ Saranath D, Panchal RG, Nair R, Mehta AR, Sanghavi V, Sumegi J, Klein G, Deo MG. Oncogene amplification in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Jpn J Cancer Res* 1989;80:430-437.
- ⁹⁶ Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acid Res* 2002;30:e57
- ⁹⁷ Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Ki Hong W. Head and neck cancer. *N Engl J Med* 1993;328:184-194.
- ⁹⁸ Rogers SJ, Harrington KJ, Rhys-Evans P, O-Charoenrat P, Eccles SA. Biological significance of c-erbB family oncogenes in head and neck cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 2005;24:47-69.
- ⁹⁹ Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:127-137.
- ¹⁰⁰ Kimura M, Tsuda H, Morita D, Ichikura T, Ogata S, Aida S, Yoshizumi Y, Maehara T, Mochizuki H, Matsubara O. A proposal for diagnostically meaningful criteria to classify increased epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 gene copy numbers in gastric carcinoma, based on correlation of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemical measurements. *Virchows Arch* 2004;445:255-262.
- ¹⁰¹ Ooi A, Takehana T, Li X, Suzuki S, Kunitomo K, Iino H, Fujii H, Takeda Y, Dobashi Y. Protein overexpression and gene amplification of HER-2 and EGFR in colorectal cancers: an immunohistochemical and fluorescent in situ hybridization study. *Mod Pathol* 2004;17: 895-904.
- ¹⁰² DiGiovanna MP, Stern DF, Edgerton SM, Whalen SG, Moore II D, Thor AD. Relationship of epidermal growth factor receptor expression to ErbB-2 signaling activity and prognosis in breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2005;23:1152-1160.

-
- ¹⁰³ Hirsch FR, Scagliotti GV, Langer CJ, Varella-Garcia M, Franklin WA. Epidermal growth factor family of receptors in preneoplasia and lung cancer: perspectives for targeted therapies. *Lung Cancer* 2003;41:S29–S42.
- ¹⁰⁴ Di Lorenzo G, Tortora G, D'Armiento FP, De Rosa G, Staibano S, Autorino R, D'Armiento M, De Laurentiis M, De Placido S, Catalano G, Bianco AR, Ciardiello F. Expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8: 3438–3444
- ¹⁰⁵ Hynes NE, Lane HA: ERBB receptors and cancer: The complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2005;5:341-354.
- ¹⁰⁶ Quon H, Liu FF, Cummings BJ. Potential molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. *Head and Neck* 2001;2:147-159.
- ¹⁰⁷ Willmore-Payne C, Holden JA, Layfield LJ. Detection of EGFR- and HER2-activating mutations in squamous cell carcinoma involving the head and neck. *Mod Pathol* 2006;19:634-640.
- ¹⁰⁸ Franchi A, Fondi C, Paglierani M, Pepi M, Gallo O, Santucci M. Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number in sinonasal intestinal type adenocarcinoma. *Oral Oncol* 2009;45:835-838.
- ¹⁰⁹ Grandis JR, Tewardy DJ. Elevated levels of TGF- α and EGFR messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res* 1993;53:3579-3584.
- ¹¹⁰ Irish JC, Bernstein A. Oncogenes in head and neck cancer. *Laryngoscope* 1993;103:42-52.
- ¹¹¹ Suárez C, Ferlito A, Lund VJ, Silver CE, Fagan JJ, Rodrigo JP, Llorente JL, Cantù G, Politi M, Wei WI, Rinaldo A. Management of the orbit in malignant sinonasal tumors. *Head Neck* 2008;30:242-250.
- ¹¹² Lu X, Kang Y. Epidermal growth factor signalling and bone metastasis. *Br J Cancer* 2010;102:457-461.
- ¹¹³ Baumann M, Krause M. Targeting the epidermal growth factor receptor in radiotherapy: radiobiological mechanisms, preclinical and clinical results. *Radiother Oncol* 2004;72:257-266.
- ¹¹⁴ Bos PD, Zhang XH, Nadal C, Shu W, Gomis RR, Nguyen DX, Minn AJ, van de Vijver MJ, Gerald WL, Foekens JA, Massagué J. Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature* 2009;459:1005-1009.

-
- ¹¹⁵ Sun M, Behrens C, Feng L, Ozburn N, Tang X, Yin G, Komaki R, Varella-Garcia M, Hong WK, Aldape KD, Wistuba II. HER family receptor abnormalities in lung cancer brain metastases and corresponding primary tumors. *Clin Cancer Res* 2009;15:4829-4837.
- ¹¹⁶ Schlüter B, Gerhards R, Strumberg D, Voigtmann R. Combined detection of Her2/neu gene amplification and protein overexpression in effusions from patients with breast and ovarian cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 9 [Epub ahead of print]
- ¹¹⁷ Minner S, Jessen B, Stiedenroth L, Burandt E, Köllermann J, Mirlacher M, Erbersdobler A, Eichelberg C, Fisch M, Brümmendorf TH, Bokemeyer C, Simon R, Steuber T, Graefen M, Huland H, Sauter G, Schlomm T. Low level HER2 overexpression is associated with rapid tumor cell proliferation and poor prognosis in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:1553-1560.
- ¹¹⁸ Leyland-Jones B. Human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer and central nervous system metastases. *J Clin Oncol* 2009;:5278-5286.
- ¹¹⁹ Grabsch H, Sivakumar S, Gray S, Gabbert HE, Müller W. HER2 expression in gastric cancer: Rare, heterogeneous and of no prognostic value - conclusions from 924 cases of two independent series. *Cell Oncol* 2010;32:57-65.
- ¹²⁰ Ali MA, Gunduz M, Gunduz E, Tamamura R, Beder LB, Katase N, Hatipoglu OF, Fukushima K, Yamanaka N, Shimizu K, Nagatsuka H. Ali MA, Gunduz M, Gunduz E, Tamamura R, Beder LB, Katase N, Hatipoglu OF, Fukushima K, Yamanaka N, Shimizu K, Nagatsuka H. Expression and Mutation Analysis of Her2 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Invest* 2009;16 [Epub ahead of print].
- ¹²¹ Tse GM, Yu KH, Chan AW, King AD, Chen GG, Wong KT, Tsang RK, Chan AB. HER2 expression predicts improved survival in patients with cervical node-positive head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2009;141:467-473.
- ¹²² Leyland-Jones B. Human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer and central nervous system metastases. *J Clin Oncol* 2009;:5278-5286.
- ¹²³ Cavalot A, Martone T, Roggero N, Brondino G, Pagano M, Cortesina G. Prognostic impact of HER-2/neu expression on squamous head and neck carcinomas. *Head Neck* 2007;29:655–664.
- ¹²⁴ Hirsch FR, Varella-Garcia M, Cappuzzo F. Predictive value of EGFR and HER2 overexpression in advanced non-small-cell lung cancer predictive value of EGFR/HER2. *Oncogene* 2009;28:S32-S37.
-