

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS DOCTORAL

**Determinación de marcadores moleculares predictivos del
desarrollo de cáncer en lesiones premalignas de laringe**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Diana María Hernanpérez Hidalgo

Directores

**María Cruz Iglesias Moreno
Vanesa García Barberán
Pedro Pérez Segura**

Madrid

© Diana María Hernanpérez Hidalgo, 2023

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**DETERMINACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES
PREDICTIVOS DEL DESARROLLO DE CÁNCER EN LESIONES
PREMALIGNAS DE LARINGE**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Diana María Hernanpérez Hidalgo

DIRECTORES

María Cruz Iglesias Moreno
Vanesa García Barberán
Pedro Pérez Segura

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**DETERMINACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES
PREDICTIVOS DEL DESARROLLO DE CÁNCER EN LESIONES
PREMALIGNAS DE LARINGE**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Diana María Hernanpérez Hidalgo

DIRECTORES

María Cruz Iglesias Moreno
Vanesa García Barberán
Pedro Pérez Segura

DEDICATORIA

A Nuria

Tú fuiste la mayor motivación para terminar esta Tesis

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Mari Cruz Iglesias, Jefe de Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Clínico San Carlos, por darme la oportunidad de participar en este proyecto, por su dedicación de principio a fin y por guiarme como siempre.

Al Dr. Pérez Segura, jefe de Servicio de Oncología, por respaldar y promover este estudio y la confianza depositada.

A la Dra. Vanesa García Barberán, por su incomensurable trabajo, realizado en varias ocasiones por duplicado incluso. Por sacar tiempo de donde no tiene y convertir algo inalcanzable en factible.

A Santiago Cabezas, por ser el principal impulsor de este proyecto, sin su esfuerzo y dedicación, nada hubiera sido posible.

Al Dr. Luis Ortega y al Dr. Melchor Saiz-Pardo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos por su inestimable colaboración para llevar a cabo la sección histopatológica del estudio.

A mis compañeros del Servicio, por ayudarme y apoyarme todos de una manera u otra, con especial mención a Manuel, Adriana y Cristina, por su contribución a la causa.

A Andrea, mi mentora y aún diría más, mi más fiel consejera. Gracias por estar siempre ahí.

A Adrián y Nuria, mi felicidad sois vosotros. Os quiero hasta el infinito y mucho más allá.

Al resto de mi familia, por estar siempre al pie del cañón y haber puesto las bases para poder haber terminado donde estoy hoy.

ABREVIATURAS

CCC: Cáncer de cabeza y cuello

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

TCGA: Atlas del genoma del cáncer humano.

ORL: Otorrinolaringología

OMS: Organización Mundial de la Salud

VPH: Virus del Papiloma Humano

LIN: “Laryngeal Intraepithealial Neoplasia” (neoplasia laríngea intraepitelial)

SIN: “Squamous intraepitelial neoplasia” (neoplasia escamosa intraepitelial)

SIL: “Intraepitelial lesión” (lesión intraepitelial)

CIS: carcinoma *in situ*

IRFs: Interferones

miARN: micro ARN

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

FFPE: Tejidos parafinados fijados con formalina

ÍNDICE

Resumen	13
Summary.....	15
Introducción.....	17
1. Generalidades.....	19
2. Lesiones premalignas.....	19
1. Clasificación de las lesiones premalignas.....	20
1. Clasificación macroscópica.....	20
2. Clasificación microscópica.....	22
3. Nueva clasificación de las displasias.....	23
2. Evolución.....	26
3. Patrón molecular y genético en la evolución de una laringitis crónica	28
1. Genes y vías alterados de la señalización del CCC.....	28
2. Inmunorregulación en el proceso carcinogénico.....	51
3. Genes involucrados en la señalización inmune en el CCC.....	52
4. Tipos de mutaciones estudiadas.....	58
Justificación.....	61
Hipótesis.....	65
Objetivos.....	69
Objetivo principal.....	71
Objetivos secundarios.....	71
Material y Métodos.....	73
1. Material	75
2. Diseño del estudio	75
3. Métodos.....	76
a. Extracción y purificación de ADN con el kit GeneRead ADN FFPE	76
b. Cuantificación de ácidos nucleicos	79
c. Medición de la calidad de las muestras	79
d. Diseño del panel mediante “Illumina Design Studio”.....	79
e. Realización de las librerías usando el TruSeq Custom Amplicon Low Imput Library Prep	80
f. Secuenciación mediante miSeq clustering y sequencing	82
g. Análisis de datos con FASTQ y VCF.....	85
h. Análisis de predicción	86
i. Síntesis de ADN complementario (ADNc) por RT-PCR.....	86
j. Análisis de la expresión de genes inmunorreguladores.....	87
k. Análisis estadístico.....	87
Resultados.....	89
1. Características de la población de estudio.....	91
2. Perfil mutacional de las displasias de laringe.....	94
3. Análisis del perfil mutacional en función de la evolución de las displasias de Laringe.....	95
4. Identificación de alteraciones afectando a la función de la proteína en los genes evaluados.....	98
5. Concordancia con perfil mutacional en CCC.....	114

6. Análisis de la expresión de genes inmunorreguladores en displasias de laringe.....	117
1. Análisis de la relación entre la expresión de genes inmunorreguladores y la evolución de la enfermedad.....	119
2. Análisis de la relación entre la expresión de genes inmunorreguladores y el grado de displasia.....	126
Discusión.....	131
1. Características de la población.....	133
2. Perfil mutacional de las displasias.....	134
3. Expresión de genes inmunorreguladores.....	135
1. Niveles de expresión de genes inmunorreguladores en displasias de alto grado.....	135
1. Niveles de expresión de genes relacionados con el Interferón Gamma.....	136
2. Niveles de expresión de <i>CTLA4</i>	136
3. Niveles de expresión de <i>STAT3</i>	136
2. Niveles de expresión de genes inmunorreguladores según el grado de displasia.....	137
3. Dificultades para la generalización de los resultados.....	138
4. Limitaciones del estudio.....	139
5. Fortalezas del estudio	140
Conclusiones.....	143
Bibliografía	147

Resumen

Introducción: Las lesiones premalignas de laringe apenas han sido estudiadas a nivel molecular. Actualmente no existen biomarcadores aprobados para su uso clínico que permitan identificar aquellas lesiones con peor pronóstico. Nuestro estudio evalúa el espectro de mutaciones en 15 genes relacionados con la carcinogénesis de cabeza y cuello y de niveles de expresión de otros 13 genes relacionados con la regulación inmunológica en pacientes con displasias de laringe con evolución a cáncer y pacientes con displasia sin evolución maligna.

Justificación: Ante la escasez de estudios, pretendemos estudiar las alteraciones genéticas más frecuentes en las displasias laríngeas y discriminar las asociadas a un mayor riesgo carcinogénico.

Hipótesis: Existen perfiles moleculares distintivos de las displasias con evolución a cáncer a nivel de alteraciones genéticas y niveles de expresión de genes inmunorreguladores.

Objetivos: Hallar biomarcadores distintivos de cada población que permitan identificar a las lesiones premalignas de laringe con mayor riesgo de evolución a un cáncer y contribuir al estudio del proceso carcinogénico del cáncer laríngeo.

Material y Métodos: Estudio de cohortes retrospectivas de pacientes con displasias laríngeas diagnosticadas entre 2007 y 2011. Se han analizado las alteraciones genéticas mediante la técnica de NGS en los genes *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *TP63*, *IRF6*, *TP53*, *CASP8*, *PTEN*, *PIK3CA*, *SYNE1*, *SYNE2*, *CDKN2A*, *RB1*, *RIPK4*, *DICER1*. También se han evaluado los niveles de expresión mediante qPCR de los genes inmunorreguladores: *CXCL10*, *CTLA4*, *FOXP3*, *TIM3*, *HLA-DRA*, *PDL1*, *PD1*, *PDL2*, *TLR4*, *TLR7*, *VISTA*, *GZMA* y *PRF1*.

Resultados: Se reclutaron 64 pacientes, 27 con evolución a cáncer, 37 sin evolución. Displasias de *bajo grado*: 43; de *alto grado*: 21. Porcentaje de pacientes con consumo tabáquico medio-alto (>10 paquetes-año) activo o previo: 97%. No se encontraron patrones en las alteraciones de los genes *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *TP63*, *IRF6*, *TP53*, *CASP8*, *PTEN*, *PIK3CA*, *SYNE1*, *SYNE2*, *CDKN2A*, *RB1*, *RIPK4*, *DICER1* que permitieran distinguir ambos grupos (50 displasias analizadas). Sí presentaron diferencias significativas en los niveles de expresión de 6 genes inmunorreguladores: mayor expresión en displasias con evolución a cáncer de *IDO1* ($p=0.001$), *PLD1* ($p<0.001$), *STAT3* ($p=0.003$), *CXCL9* ($p=0.015$), y menor nivel de expresión de *CTLA4* ($p=0.031$). Las displasias de *alto grado*

presentaban niveles elevados de expresión de *PDL1* ($p=0.055$), *PDL2* ($p=0.029$), *STAT3* ($p=0.004$).

Discusión: El proceso carcinogénico en laringe está aún en estudio, y en las lesiones premalignas de laringe, la información disponible es aún más escueta. Actualmente, no existen biomarcadores aptos para su uso clínico en el cáncer de laringe, ni predictores de la evolución de las lesiones displásicas laríngeas. La bibliografía no proporciona resultados reproducibles ni hay una estandarización para los métodos de estudio, lo que hace más compleja la generalización de los pocos resultados encontrados. Nuestro estudio detecta una elevada tasa de mutaciones en las displasias, pero sin alteraciones que pudieran asociarse al proceso neoplásico. El hecho de haber encontrado alteraciones diferenciales en el terreno de la inmunorregulación justifica seguir investigando estos patrones en estudios con mayor población, estandarizando protocolos de análisis que permitan una generalización y reproductibilidad de los resultados, que culmine en su adaptación a la práctica clínica.

Conclusiones: No existen biomarcadores a nivel genético pero sí hay diferencias entre displasias con evolución y sin evolución a cáncer en el perfil de expresión inmunológica, que permite identificar a los pacientes con mayor riesgo de desarrollar un cáncer laríngeo.

Palabras clave: biomarcadores, displasias de laringe, perfil mutacional, inmunorregulación.

Summary

Introduction: The premalignant laryngeal lesions have scarcely been studied on a molecular level. Currently, no biomarker has been approved to clinical use to recognize lesions with worse prognosis. We conducted a study about the mutational landscape of 15 genes involved in head and neck carcinogenesis and the expression levels of another 13 genes related with immune regulations in patients with laryngeal dysplasias with cancer progression and patients with laryngeal dysplasias without progression.

Justification: In this context of scarce bibliography, our aim is to study the most frequent alterations in laryngeal dysplasias and discriminate those associated with a higher carcinogenic risk.

Hypothesis: There are distinctive molecular profiles in laryngeal dysplasias with cancer progression with genetic alterations and altered levels of expression of immune regulator genes.

Objectives: Find distinctive molecular profiles of each population that enable the identification of those laryngeal premalignant lesions with a higher risk of malignant transformation and provide more data about the carcinogenic process of the laryngeal cancer.

Materials and Methods: Retrospective cohort study of patients with laryngeal dysplasias diagnosed between 2007 and 2011. The genetic alterations of *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *TP63*, *IRF6*, *TP53*, *CASP8*, *PTEN*, *PTENP1*, *PIK3CA*, *SYNE1*, *SYNE2*, *CDKN2A*, *RB1*, *RIPK4*, *DICER1* genes were tested using NGS technic. We also tested expression levels using qPCR of the immune regulator genes: *CXCL10*, *CTLA4*, *FOXP3*, *TIM3*, *HLA-DRA*, *PDL1*, *PD1*, *PDL2*, *TLR4*, *TLR7*, *VISTA*, *GZMA* y *PRF1*.

Results: 64 patients, 27 with cancer progression, 37 without progression. *Low grade* dysplasias: 43; *High grade* dysplasias: 21. Medium-high percentage of tobacco use (>10 pack-years) patient percentage: 97%. No patterns were found in the genetic alterations of *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *TP63*, *IRF6*, *TP53*, *CASP8*, *PTEN*, *PTENP1*, *PIK3CA*, *SYNE1*, *SYNE2*, *CDKN2A*, *RB1*, *RIPK4*, *DICER1* genes that let differentiate each group. We found statistical differences in the expression levels of 6 immune regulator genes: high expression levels in patients with cancer progression of *IDO1* ($p=0.010$), *PLD1* ($p<0.001$), *STAT3* ($p=0.003$), *CXCL9* ($p=0.015$), and low expression levels of *CTLA4* ($p=0.001$). *High grade* dysplasias presented high expression levels of *PDL1* ($p=0.055$), *PDL2* ($p=0.029$), *STAT3* ($p=0.004$).

Discussion: The laryngeal carcinogenic process is still under study and concerning laryngeal premalignant lesions, the information is even more sparse. Currently, there are no suitable biomarker for clinical use in laryngeal cancer, nor predictors of the premalignant lesions' evolution. Literature review do not provide reproducible results nor standardization for the studies methodologies, and that hampers the universalization of the few detected outcomes. Our study detects a high mutation rate in dysplasia, but none specifically associated to the neoplastic process. Having found differential alterations in the immunoregulator field legitimates further trials of this patterns in bigger study populations, standardizing analysis protocols that enable universalization and repeatability of the outcomes that could carry its adaptation to the clinical practice.

Conclusions: There are no genetic biomarkers in laryngeal dysplasias that enable to predict cancer progression but there are different profiles of immunoregulator genes expression that allow the identification of patients with a greater risk of larynx cancer development.

Keywords: biomarkers, laryngeal dysplasia, mutational profile, immunoregulation

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades

El cáncer de cabeza y cuello (CCC), según datos del año 2022, es el 7º cáncer en incidencia en el mundo y también la 7ª causa de muerte global por cáncer. Sólo en EEUU, se estima que en 2022, 12.470 personas habrán sido diagnosticadas de cáncer laríngeo y habrá producido 3.820 muertes (1). En España, hasta septiembre del año 2022, hubo 11.114 nuevos casos de CCC y 3.580 muertes por CCC, de los cuales 3.335 casos y 1.181 muertes se debieron al cáncer de laringe (2). Dentro de los CCC, el cáncer de laringe destaca, primero por su incidencia, ya que comprende un 40% de los tumores en estas localizaciones, y también por su mortalidad elevada. (3). Se estima que la supervivencia a 5 años en el cáncer de laringe es del 84%, 52% y 35% para los estadios I, III y IV, respectivamente (4). Lo que es más, entre los años de 1980-1985 y 1990-1992 los registros del SEER (El programa de Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales del Instituto Nacional del Cáncer de los EEUU) y la Base Nacional de Datos del Cáncer de EEUU objetivaron que entre 27 subtipos distintos de cáncer estudiados, el cáncer laríngeo fue el único que presentó un descenso de la supervivencia a 5 años. Dentro de los tumores laríngeos, el 50% aproximadamente tiene su origen en la glotis (cuerdas vocales verdaderas), el 32% en la región supraglótica (epiglotis, repliegues aritenopiglóticos, cartílagos aritenoides y bandas ventriculares) y rara vez lo hacen en la región subglótica (2%) (5). No obstante, a diferencia de los tumores supraglóticos o subglóticos, que suelen diagnosticarse en fases avanzadas, los tumores de la glotis ocasionan disfonía por lo que suelen diagnosticarse en fases precoces de la enfermedad y en muchas ocasiones, sobre lesiones premalignas previamente conocidas (6).

2. Lesiones premalignas

Las lesiones premalignas de laringe son alteraciones tisulares que no constituyen lesiones neoplásicas propiamente dichas, pero que poseen una mayor probabilidad de malignización que un tejido sano.

La historia natural de la enfermedad comienza normalmente con una inflamación crónica de la mucosa de la laringe, conocida como laringitis crónica, que constituye un proceso inflamatorio dilatado en el tiempo, de más de 8 semanas de duración. Es un cuadro clínico típico de hombres (80%) entre los 45 y los 65 años, con exposición tanto a factores endógenos de inflamación crónica, como son las bronquitis, broncorreas, rinosinusitis

crónicas etc.; como a factores exógenos, siendo el tabaco el agente etiológico principal, potenciado además si presentan un hábito enólico sobreañadido. Suele manifestarse como una disfonía mantenida en el tiempo, que puede cursar con fluctuaciones, pero sin llegar a presentar una voz normal, acompañada en ocasiones de sensación de cuerpo extraño faríngeo y carraspeo frecuente. Aun siendo el tabaco el agente carcinogénico principal, tenemos una población importante de mujeres fumadoras durante periodos de más de 20 años, que no presenta las mismas tasas de incidencia. Se deduce que debe existir un factor protector, hormonal probablemente pero aún desconocido (7).

El pico de incidencia de las lesiones premalignas de laringe se sitúa entre la 5ª y 6ª décadas de la vida (6), con predominio de varones (proporción de 2 a 5 varones por cada mujer). Además del tabaco y el alcohol mencionados anteriormente, otros factores de riesgo reconocidos para el desarrollo de las lesiones premalignas son algunas exposiciones ocupacionales como el asbesto, además de un posible papel del reflujo gastroesofágico y del virus del papiloma humano (VPH, cuya frecuencia en cáncer de laringe es baja, oscilando entre el 1.6 y el 6.5% de los casos solamente) (8–10).

2.1 Clasificación de las lesiones premalignas

2.1.1 Clasificación macroscópica

Según la imagen laringoscópica, pueden identificarse dos tipos de laringitis crónicas:

- a) las eritematosas o congestivas: caracterizadas por un aumento de la vascularización y que pueden ir asociadas a hiperplasia o paquidermia (véase la eritroplasia, imagen 1).



Figura 1: Imagen por videolaringoestroboscopia de una laringitis crónica eritematosa de cuerda vocal izquierda. Tomada de la Consulta de Otorrinolaringología (ORL) del Hospital Clínico San Carlos.

b) las blancas o leucoplásicas: cuyo aspecto blanquecino característico se debe a la queratinización del epitelio (11). Este tipo de lesiones son las más frecuentes (Imagen 2).



Figura 2: Imagen por videolaringoestroboscopia de una laringitis crónica leucoplásica de ambas cuerdas vocales. Tomada de la Consulta de ORL del Hospital Clínico San Carlos.

Aunque su diagnóstico puede realizarse a nivel macroscópico, sólo puede revelarse la severidad de la lesión realizando un análisis anatomopatológico de la muestra (6).

La incidencia anual de leucoplasia de cuerdas vocales en EEUU es de 10.2 por cada 100.000 varones y 2.1 por cada 100.000 mujeres. Las leucoplasias suelen presentarse como placas blanquecinas parcheadas que no se desprenden al raspado, con aparición de queratina en la superficie epitelial, generalmente como reacción a la exposición de las cuerdas al tabaco. Constituye una alteración del epitelio glótico ya que el epitelio sano es no queratinizante.

Las eritroplasias se presentan como áreas eritematosas de superficie lisa y deben su aspecto a la pérdida de paraqueratina y ortoqueratina superficial (figura 3). Las leucoeritroplasias son una combinación de ambas lesiones, presentando placas blanquecinas, pero también áreas eritematosas.

2.1.2 Clasificación microscópica

Se han llegado a establecer hasta 20 clasificaciones diferentes de las lesiones premalignas de cabeza y cuello. Existe tanta controversia debido a la falta de un consenso que establezca una equivalencia entre unas y otras y la gran variabilidad de criterio entre un patólogo y otro a la hora de establecer su grado de agresividad y según el mismo, poder predecir su potencial de transformación maligna (6,12–14). Dos de las clasificaciones más empleadas en la clínica son la de Ljubliana (14) y la propuesta por Friedmann en 1986 que extrapola la empleada para las lesiones premalignas del cérvix uterino, dividiendo las lesiones en LIN (“Laryngeal Intraepithealial Neoplasia”, neoplasia laríngea intraepitelial grados 1, 2 y 3 (15).

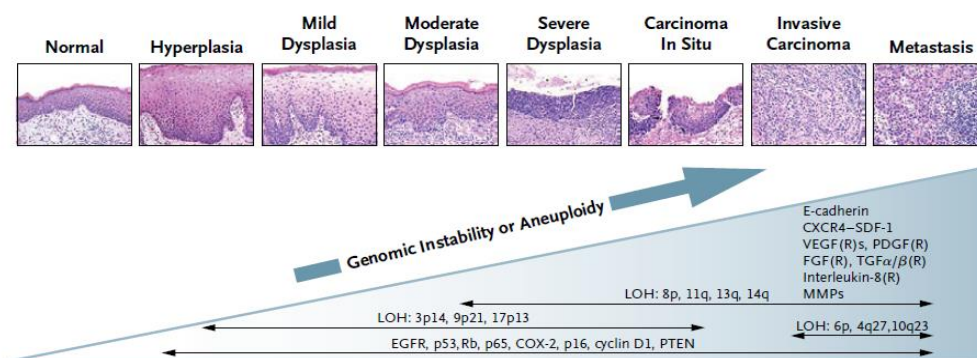


Figura 3. Representación del modelo de carcinogénesis en tumores de cabeza y cuello. Este modelo relaciona la inestabilidad genómica observada en estos tumores con la histología y progresión de lesiones benignas y premalignas hasta la aparición del cáncer. Tomado de Haddad et al (30).

Con el fin de unificar criterios a la hora de diagnosticar el grado de agresividad de la patología premaligna de cabeza y cuello y de estandarizar su manejo, en el año 2005 la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció una clasificación de las lesiones premalignas de cabeza

y cuello como displasia leve, moderada o severa y carcinoma *in situ* (siendo estos dos últimos equivalentes en la práctica), en función de si las alteraciones citológicas y de la arquitectura del epitelio afectaban al 1/3 inferior (leve), 2/3 inferiores (moderada) o a todo el espesor del mismo (severa) (16). No obstante, esta clasificación adolece de una gran variabilidad inter-observador, por lo que algunos autores han propuesto un sistema binario derivado de la clasificación de la OMS a fin de hacerla más reproducible, dividiendo las lesiones en de *alto* o *bajo riesgo*, llegando a obtener de este modo un 85% de sensibilidad y un 80% de especificidad para predecir la transformación maligna (17).

2.1.3 Nueva clasificación de las displasias

El nuevo sistema de clasificación de las displasias de la OMS de 2017, distingue como decíamos dos categorías de displasias únicamente: las de *bajo grado* y las de *alto grado*. Reconoce la categoría de carcinoma *in situ*, pero considera que los criterios para su diagnóstico (pérdida de estratificación completa y/o atipia severa o presencia de mitosis atípicas) siguen permitiendo demasiada flexibilidad y variabilidad inter-observador. El nuevo sistema tiene en cuenta los cambios arquitecturales del epitelio, pero diferencia los dos grados según el espesor del tejido afecto, considerando *bajo grado* la afectación de menos de la mitad del espesor mientras este mantenga una maduración normal de las capas superficiales.

Así, las lesiones de *bajo grado* se definen con “anormalidades reactivas” con mínima o ninguna atipia celular, escasa mitosis y leve disqueratosis (figura 4).

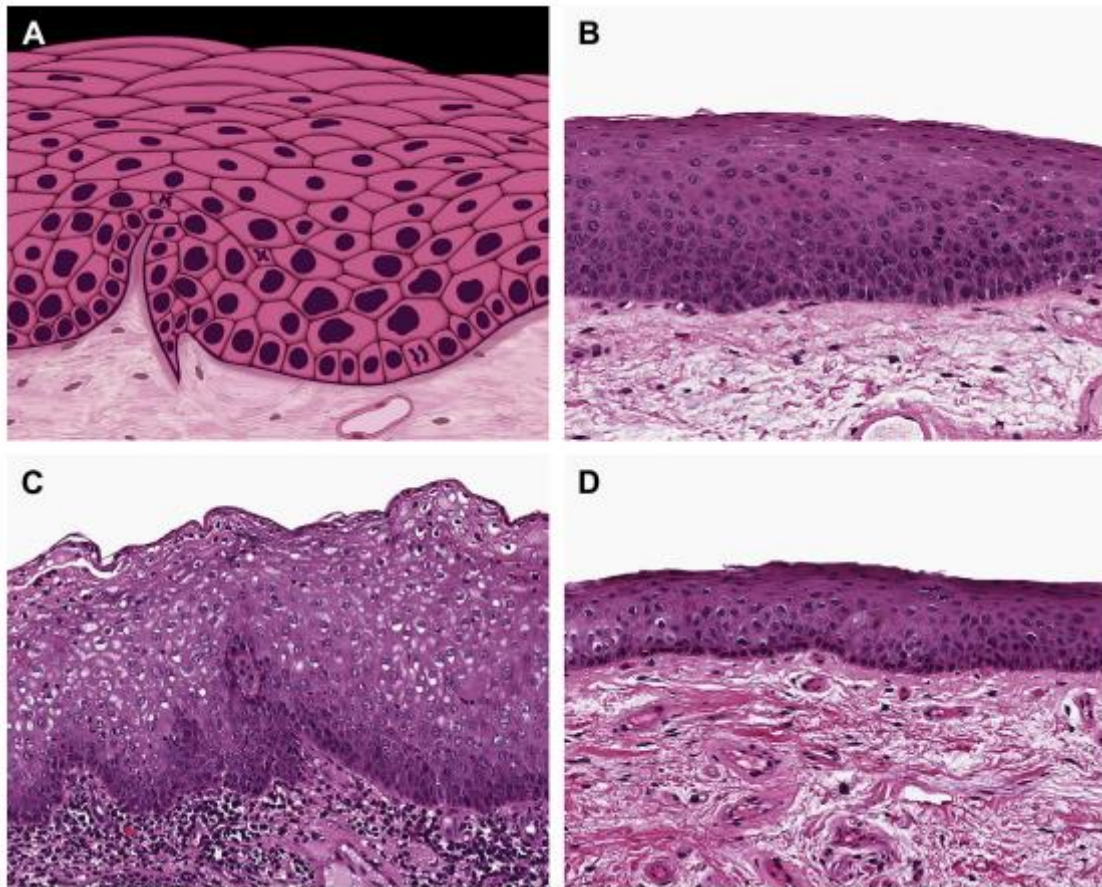


Figura 4: Displasia de *bajo grado*. (A) Esquema mostrando la zona expandida basal.parabasal, hiperchromatosis nuclear e irregularidades con mitosis normales incrementadas. (B) Zona basal desorganizada (tercio inferior) con acumulación nuclear y razón núcleo-citoplasma incrementada, con maduración. (C) Zona para basal expandida con maduración hacia la superficie, con irregularidades nucleares y rosado citoplasmático y expansión de la zona espinosa. (D) Sutil celularidad incrementada con atipia nuclear limitada a la mitad inferior, mostrando maduración superficial. Imagen tomada de Lester D. R. Thompson (18).

Las de *alto grado*, al aunar los criterios que antes definían a las lesiones moderadas y severas, se caracterizan por presentar una desorganización arquitectural de la estratificación del epitelio (figura 5). En el estudio citológico, las displasias de *alto grado* presentan núcleos hiperchromáticos, una ratio citoplasma-núcleo elevado, mitosis atípicas fuera de la lámina basal y disqueratosis con células “rosas”.

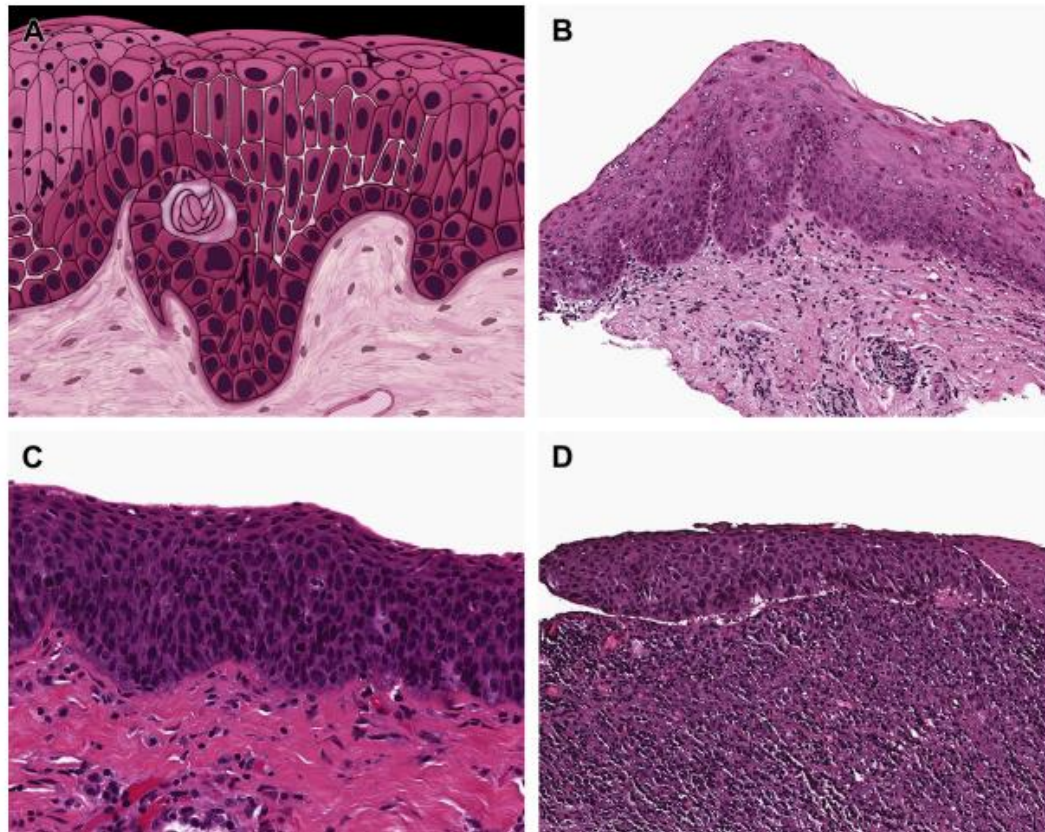


Figura 5: Displasia de *alto grado*. **(A)** Esquema mostrando la pérdida de polaridad y desorganización de la mitad superior, con disqueratosis, formación de perlas de queratina y mitosis atípicas. **(B)** Disqueratosis de la superficie, pérdida de maduración y pleomorfismo celular. **(C)** Atipia casi en la totalidad del espesor, núcleos organizados perpendicularmente, mitosis incrementadas y una razón núcleo-citoplasma muy incrementada. **(D)** Desorganización del total del espesor, pérdida de maduración, razón núcleo-citoplasma muy incrementada t pleomorfismo. Imagen tomada de Lester D. R. Thompson (18).

En la siguiente tabla (tabla 1), podemos apreciar la sistemática de clasificación entre los distintos sistemas que han sido utilizados hasta la fecha.

Niveles de maduración anormal (OMS 2005)	Clasificación OMS 2005	Clasificación SIN	Clasificación Ljubliana	Clasificación Liubliana corregida	OMS 2017
Hiperplasia	Hiperplasia escamosa	Hiperplasia escamosa	Hiperplasia escamosa		
1/3 inferior	Displasia leve	SIN 1	Hiperplasia Basal/parabasal	SIL de bajo grado	Displasia de bajo grado
1/3 a 1/2	Displasia moderada	SIN 1 o 2	Hiperplasia atípica	SIL de alto grado	Displasia de alto grado
1/2-3/4 Superior		SIN 2			
Grosor completo	Displasia severa				
Carcinoma in situ	Carcinoma in situ		Carcinoma in situ	Carcinoma in situ	

Tabla 1. Comparación del sistema de estadiaje para displasias laríngeas tras la OMS 2017, con los niveles corregidos. Traducción sobre original del “European Laryngological Society position paper on laryngeal dysplasia Part I” (19). SIN: “squamous intraepitelial neoplasia” (neoplasia escamosa intraepitelial). SIL: “intraepitelial lesión” (lesión intraepitelial).

2.2 Evolución

Se considera que las laringitis crónicas que presentan engrosamiento de la mucosa, ya sean de tipo congestivas o leucoplásicas, son las lesiones que mayor predisposición presentan a evolucionar a lesiones premalignas o displasias, que se caracterizan por la aparición de atipias celulares (11).

Se estima que en el 50% aproximadamente de las leucoplasias existirán lesiones premalignas o invasivas y se estima que el diagnóstico clínico de leucoplasia conlleva automáticamente una probabilidad de desarrollar un carcinoma invasivo del 6-7% (12). Esta progresión de las lesiones displásicas a lesiones tumorales se observa entre un 9% y un 33% según el grado de displasia y el tratamiento recibido según las series publicadas, habiendo mayor probabilidad

de malignización cuanto mayor sea el grado de displasia y menor sea el período de latencia, con un tiempo promedio que oscila entre los 23 y los 173 meses (12,15,20–26) (Tabla 2).

Referencia	LIN1/displasia leve (DL)	LIN2/displasia moderada (DM)	LIN3/displasia severa (DS) y CIS	Total	Tiempo hasta malignización (rangos descritos)
Blackwell et al., 1995 (18)	3/26 (12%)	5/15 (33%)	5/18 (28%)	13/59 (22%)	-
Leirens et al., 1997 (19)	1/25 (4%)	0/7 (0%)	3/12 (25%)	4/44 (9%)	DL: 120 m DM: NA DS: 33 m (13-72)
Gallo et al., 2001 (20)	4/56 (7%)	6/28 (21%)	3/32 (9%)	13/116 (11%)	LIN1: 173 m LIN2: 43.2 m LIN3: 56.4 m
Ricci et al., 2003 (21)	2/46 (4%)	5/42 (12%)	3/23 (13%)	10/111 (9%)	37 m (18-108)
Henriquez Alarcón et al., 2003 (22)	4/53 (7.6%)	3/10 (30%)	2/6 (33%)	9/69 (13%)	23,5 m (6-43)
Isenberg et al., 2008 (11)	2/38 (5%)	2/38 (5%)	2/31 (6%)	4/69 (6%)	-
Spielmann et al., 2010 (23)	7/30 (23%)		8/15 (53%)	15/45 (33%)	87% en 3 primeros años
Zhang et al., 2012 (24)	0/22 (0%)	5/25 (20%)	2/14 (15%)	17/86(19.8%)	50% en los 3 primeros años
Rohde et al., 2012 (14)	1/18 (6%)	1/16 (6%)	13/67 (19%)	15/101 (15%)	73% en 1er año

Tabla 2. Tasa de transformación a tumor de lesiones premalignas glóticas en las series más relevantes publicadas en las dos últimas décadas. (CIS: carcinoma *in situ*; NA: no aplica).

El diagnóstico definitivo de toda lesión leucoplásica conlleva su escisión, con intención diagnóstica y a la vez terapéutica. Los métodos empleados más habitualmente son la escisión mediante laringoscopia directa (según la técnica de Kleinsasser) con bisturí frío o láser CO2 (6). La tasa de recurrencia de las lesiones premalignas tras el tratamiento con microcirugía se encuentra entre un 13% y un 29% según se trate de displasias leves o moderadas respectivamente (27). Dados los altos índices de incidencia de recidiva, estas lesiones precisan de un seguimiento estrecho: en caso de displasias severas, han de considerarse como si se trataran de carcinomas *in situ*, y existe un consenso de que el seguimiento debería realizarse cada 2-3 meses los tres primeros años, cada 6 meses los 2 años siguientes y posteriormente de forma anual, aunque el periodo exacto entre revisiones es variable según cada centro. Debe desaconsejarse el consumo tanto de tabaco como de alcohol y en caso de existir datos de reflujo gastroesofágico, ofrecer un tratamiento dirigido (28).

Un consenso de especialistas en ORL y Anatomía Patológica de Reino Unido concluyó lo que suele observarse en la práctica clínica, y es que es muy raro poder observar una evolución lineal de las lesiones premalignas de laringe que pase de forma secuencial por los distintos grados de displasia (leve, moderada y severa) hasta evolucionar a un carcinoma *in situ* o a un cáncer invasivo. La evolución puede ser brusca, sin pasar por todos los grados, pero también pueden resolverse espontáneamente, sobre todo si suspenden el hábito tabáquico (28).

Se acepta que muchas de las alteraciones moleculares que se producen no se acompañan de cambios morfológicos en el epitelio y por tanto no es posible predecir clínica o histológicamente el riesgo de recurrencia o de progresión a un cáncer invasivo (28). Por tanto, son necesarios marcadores moleculares que identifiquen aquellas lesiones con potencial maligno y que sean fácilmente trasladables a la práctica clínica (29).

3. Patrón molecular y genético en lesiones premalignas de laringe

Hay autores como Haddad et al. que sí proponen un modelo de carcinogénesis en cabeza y cuello, en el que la transición histomorfológica desde la mucosa normal al cáncer, se debe a un cúmulo de alteraciones genéticas –desconocidas en su mayoría hoy en día- que provocan una inestabilidad cromosómica creciente a medida que progresa la lesión, lo que a su vez da lugar a nuevas alteraciones genéticas y epigenéticas, que la acaban convirtiendo en un tumor (30).

A continuación, se resumen las alteraciones moleculares más relevantes descritas hasta la fecha en CCC y en lesiones premalignas de cavidad oral –por ser las más estudiadas- y de laringe.

3.1 Genes y vías alterados de la señalización de CCC:

El perfil mutacional de los genes de cabeza y cuello sigue siendo relativamente desconocido, especialmente cuando lo comparamos con los perfiles de otros tumores de otras localizaciones. No existen muchos estudios que se hayan centrado en los CCC, y menos aún en el cáncer de laringe exclusivamente. Dos estudios clave publicados en 2011, realizados por Stransky et al. (31) y Agrawal et al. (32), fueron los primeros en aportar el mapa mutacional inicial de los CCC (33).

En el trabajo realizado por Agrawal et al. analizaron el exoma de 32 tumores primarios del área de cabeza y cuello, encontrando mutaciones en los genes tradicionalmente relacionados con la carcinogénesis de cabeza y cuello, como *TP53*, *CDKN2A*, *PIK3CA* y *HRAS*, pero también en genes no estudiados previamente como *NOTCH1* (32).

Stransky et al. (31), también analizaron el exoma de 74 cánceres de cabeza y cuello de diversas localizaciones, incluida la laringe. Compararon la secuenciación del ADN de muestras sanas y tumorales del mismo paciente, y confirmaron mutaciones similares a las descritas por Agrawal et. al. (32).

En otro estudio, el Atlas del Genoma del Cáncer Humano (TCGA) (34) realizó secuenciación exonal de 279 muestras con CCC, con ARN-seq., verificando las mutaciones descritas por los dos estudios mencionados anteriormente. En conjunto, observaron que la tasa de mutaciones en CCC era comparable a la de otras lesiones malignas relacionadas con el tabaco, como los adenocarcinomas o los cánceres microcíticos pulmonares. Sin embargo, a pesar de los recientes avances en la secuenciación del CCC en los trabajos previamente mencionados, aún quedan grandes lagunas de conocimiento sobre el desarrollo exacto de los CCC. A pesar de ello, se han empezado a realizar estudios que van más allá del mero perfil genético basal en los CCC, y que se centra en las diferencias genéticas que existen según los distintos grados de severidad y extensión de la enfermedad, así como si se encuentran asociadas o no a factores de riesgo como el tabaco y el alcohol (33).

Además, según se va haciendo accesible la perfilación genética en los CCC, va siendo posible la categorización de los mismos no sólo atendiendo a sus características clínicas y fisiopatológicas sino también basándose en su expresión génica. De esta manera, se han distinguido ya 4 subtipos de carcinoma escamoso de CCC: *atípico*, *basal*, *clásico* y *mesenquimal*, según los patrones moleculares que presentan cada uno (35).

- El subtipo *atípico* comprende una mayoría de tumores VPH positivos con mutaciones activadoras de *PIK3CA* y una pérdida de amplificaciones del brazo *7p* (que codifica para *EGFR*).
- El subtipo *basal* presenta una inactivación de *NOTCH1*, mutación coexistente tanto de *HRAS* como de *CASP8*, y amplificación de *11q13/q22*, con menores alteraciones en el brazo *3q* (*SOX2*).
- El subtipo *clásico* se distingue por una mutación de *TP53*, pérdida de *CDKN2A*, amplificación del brazo *3q*, cambios en genes de estrés oxidativo (*KEAP1*, *CUL3* y *NFE2L2*) y se correlaciona con un antecedente de

tabaquismo significativo y una mayor proporción de cáncer escamoso laríngeo.

- El subtipo *mesenquimal* presenta un perfil molecular distintivo que involucra modificaciones de genes relacionados con la inmunidad como la expresión aumentada de *CD56* y la baja frecuencia de mutación en *HLAI*.

En este campo, Hedberg et al. (36) realizaron una secuenciación de exomas completo de pacientes con extensión linfática o enfermedad recurrente, encontrando mutaciones similares a las descubiertas en los trabajos anteriores, pero también dominios nuevos asociados a mayor índice de metástasis y extensión pero que no estaban presentes en los tumores primarios.

Conforme ha ido incrementándose la frecuencia de tumores inducidos por el VPH, también han ido apareciendo más estudios centrados en las mutaciones presentes en este subtipo particular, tal y como hicieron los trabajos de Morris et al., que demostraron la presencia de mutaciones distintas en tumores VPH positivos que en negativos (37) y el estudio de Seiwert et al. (38), que identificó un perfil característico y único de los tumores VPH positivos. No obstante, en lo que a lesiones premalignas laríngeas se refiere, es sorprendente la práctica nulidad de trabajos sobre el tema, a diferencia de las lesiones premalignas de cavidad oral, por ejemplo.

A continuación, vamos a proceder a exponer los principales genes y vías alterados en el desarrollo del CCC reconocidos hasta la fecha:

- **CASP8:** el gen codificante de la proteasa caspasa 8, perteneciente a la familia de proteasas cisteín-aspárticas. Consta de 11 exones y se localiza en el cromosoma 2q (39). Estas proteasas tienen un papel fundamental en la ejecución de la fase celular de la apoptosis. Son pro-enzimas inactivas compuestas por un predominio formado por una subunidad grande y otra pequeña. Es necesario un procesamiento proteolítico para desencadenar su activación y generar una enzima heterodimérica constituida por una subunidad grande y otra pequeña. La caspasa 8 participa en la muerte celular inducida por Fas (proteína de membrana presente en linfocitos T activados) y varios estímulos apoptóticos, en lo que se conoce como la vía de apoptosis extrínseca, o mediada por receptores, lo que le permite regular la migración celular, la

invasión y el crecimiento in vivo tumoral. La activación de Fas recluta al factor FADD que activa a la caspasa 8 (40,41).

Changyou et al. (42) observaron que las mutaciones de la procaspasa 8 ocurrían en el 9% de los CCC. También relacionaron la caspasa 8 con funciones no apoptóticas como promover la activación del factor NF kB, que regula la autofagia, altera los cambios endosomales y promueve la adhesión celular y la migración.

Además de las mutaciones, se identificaron determinados polimorfismos que también propiciaban una mayor o menor predisposición a desarrollar distintos tipos de cáncer, como el polimorfismo rs3834129 que parece reducir la susceptibilidad de la población que lo presenta, en este caso china, para el desarrollo de cánceres pulmonares, esofágicos, gástricos, colorrectales, cervicales y mamarios.

En cambio, Tang et al. realizaron un estudio en el que demostraron que el genotipo AA del polimorfismo rs13016963 estaba significativamente asociado al cáncer de orofaringe en no fumadores y no bebedores (43).

La tendencia a la mutación e inactivación de *CASP8* en carcinomas escamosos de cabeza y cuello, concretamente en cáncer de orofaringe VPH negativos, se corrobora también en el proyecto del TCGA (44).

Incluso existen subtipos de tumores orales en los que la inactivación de este gen junto con otros como *HRAS* o *NOTCH1*, pueden ser factores protectores, presentando un pronóstico más favorable (44).

Es interesante señalar que al realizar análisis comparativo de los perfiles mutacionales de cánceres orales frente a laríngeos y faríngeos, el gen *CASP8* suele hallarse mutado con mayor frecuencia en el primer grupo tal y como muestran Vossen et al. en su trabajo (45).

También es frecuente encontrar mutaciones de *CASP8* inactivadoras en el subtipo tumoral basal (35).

- **SOX2**: localizado en la posición 3q26, es un gen comúnmente amplificado, sobreexpresado y mutado en distintos tumores, incluyendo los CCC. *SOX2* ha sido implicado en el mantenimiento de la pluripotencialidad de las células madre embriogénicas y en la reprogramación de las células adultas somáticas a estadios de célula madre (46). También se encarga de la desactivación del

complejo de beta catenina y participa en la vía del sistema inmune innato de señalización. Se han asociado mutaciones en este gen a hipoplasias del nervio óptico, microftalmia síndromica y atresias esofágicas (40). Un estudio reciente, realizado por Granda-Díaz et al., ha demostrado que existe una sobreexpresión de este gen en células displásicas de laringe, en contraposición a células sanas, tanto epiteliales como estromales que rodean estos tejidos. Fueron capaces además de encontrar una asociación estadísticamente significativa entre la amplificación de SOX2 y la expresión proteica y el riesgo de progresión a cáncer laríngeo (46).

- ***CDKN2A***: también denominado *p16*, es el gen codificante para la proteína ciclina-dependiente inhibidora de quinasas 2A. Se localiza en el brazo pequeño del cromosoma 9, en la región 21.3. Se han descrito tres transcritos diferentes que codifican isoformas de la proteína, dos de las cuales, actúan como inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4) (47).

Está implicada en la regulación del ciclo celular, bloqueando el avance de las células de la fase G1 a la fase S (48). Actúa como un gen supresor de tumores, anclándose a la proteína MDM2 y bloqueándola en el nucleolo sin permitir su transporte al citoplasma, donde MDM2 es capaz de unirse a p53 y producir su degradación.

También se comporta como un inhibidor de la regulación de la proliferación normal celular al interactuar con CDK4 y CDK6, impidiendo la unión de las mismas con las ciclinas D y la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (47).

p16 se ha correlacionado con la infección del virus del papiloma humano. Tanto es así, que puede considerarse como un marcador subrogado de infección por VPH. Sin embargo, su positividad no es exclusiva de los tumores VPH. Tal y como Stephen et al. apuntan en su estudio (49), p16 también puede considerarse como un marcador pronóstico, siendo su ausencia un predictor de peor supervivencia.

La proteína p16, inhibe las quinasas ciclina-dependientes 4 y 6, bloqueando el avance de las células de la fase G1 a la S del ciclo celular. Este gen junto con el gen *TP53* fue de los primeros en hallarse mutado de forma habitual en los tumores de CCC. Ya en los primeros estudios de perfiles mutacionales

realizados por los grupos de Stransky et al. (31) y Agrawal et al. (32) aparecía alterado. El tabaco y el alcohol se han asociado con la metilación del gen *CDKN2A* en varios tumores, produciendo una inactivación del mismo. Parece encontrarse más frecuentemente alterado en tumores VPH negativos que positivos (33).

En el trabajo del TCGA, *CDKN2A* es junto con *TP53* el gen más mutado de sus cohortes, sugiriendo ser ambos fundamentales en el proceso de carcinogénesis a este nivel.

Además, es uno de los raros casos en el que el grupo TCGA ha conseguido demostrar que las mutaciones en este gen propician la aparición de displasias, debido a ese papel en la senescencia celular y la disrupción de su actividad (44). En cuanto al perfil genético tumoral, los subtipos clásicos y basales a los que nos referíamos anteriormente, suelen típicamente presentar alteraciones que producen una pérdida de función para p16 (35).

- ***FADD***: también llamado *MORT1*, es el factor asociado a dominio de muerte, efector de la misma. Codifica para una molécula que interactúa con varios receptores de superficie celular mediando la apoptosis. Se localiza en la región 11q13.3, y es capaz de interactuar entre otros con el receptor de Fas y las procaspasas 8 y 10 para formar el complejo de señalización de muerte inducida. Además, participa en la activación de la señalización de los linfocitos T4 y la activación correcta de *FADD* es necesaria para que se produzca una respuesta antiviral eficiente, con aumento de los niveles de IRF7 y de IFN alfa (48). Se asocian a mutaciones de este gen las infecciones recurrentes, disfunción hepática, malformaciones cardiovasculares y displasia otodental (50). En el cáncer de laringe, concretamente en las lesiones premalignas, autores como Bergshoeff et al. (29) han demostrado que la mutación de este gen contribuye a la inestabilidad cromosómica que se relaciona con un riesgo aumentado de progresión tumoral.
- ***DICER1***: localizado en el cromosoma 14q32.13, codifica para la ribonucleasa citoplasmática de tipo III (RNasa III), implicada en la biogénesis de los microARN (miARNs) y parte del complejo del silenciamiento inducido por ARN (RSIC, del inglés “RNA-induced silencing complex”) (40). La

ribonucleasa degrada precursores de ARN bicatenarios convirtiéndolos en ARN pequeños de interferencia (siARN). Este ARN, formados por una secuencia de 20-25 nucleótidos, interfiere por complementariedad con la expresión del gen específico, promoviendo la degradación de los ARNm diana, inhibiendo así su expresión génica (51). En la siguiente figura (figura 6), se representa el procesamiento del miARN.

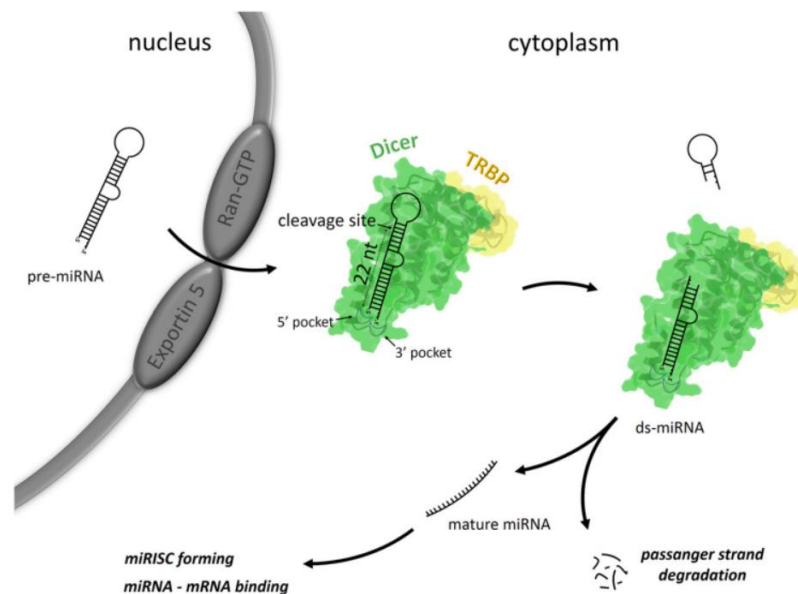


Figura 6: diagrama esquemático del papel de *DICER1* en el procesamiento del miARN. Degrada precursores de RNA de doble hebra en pequeños RNA de interferencia (siARN) y miARN. Tomado de Solarski et al. (51).

Los efectos medidos por los miARN en tumores *DICER1* mutados, pueden ser debidos a la pérdida de función de genes que normalmente participan en la prevención del cáncer (supresores de tumores) o ganancia de función de genes que normalmente contribuyen al desarrollo tumoral de forma activa (oncogenes) (50).

Además de la regulación de los miARN, *DICER1* tiene otros papeles en el procesamiento de ARN y en la biogénesis ribosomal antes de su exportación al núcleo. Al inicio de la apoptosis celular, *DICER1* inicia la ruptura del ADN cromosómico, un paso clave en la muerte celular controlada (52). Existe un síndrome originado a partir de variantes patogénicas del gen *DICER1*, llamado Síndrome tumor hamartoma PTEN, asociado a un riesgo incrementado de desarrollo de blastoma pleuropulmonar, cáncer renal,

tumores ováricos del cordón estromal, bocio multinodular y carcinoma tiroideo (51). Respecto al carcinoma escamoso de laringe, no existe mucha bibliografía sobre la alteración de este gen. Sí que han relacionado las alteraciones de *DICER1* con cánceres de células mesenquimales de mama, y parece presentar una sobreexpresión en el cáncer oral (53). Chaobing Gao et al. (54) son de los pocos autores en estudiar las consecuencias de la alteración de este gen en el cáncer laríngeo. En su estudio, analizaron la expresión de *DICER1* en pacientes con carcinoma escamoso de laringe frente a pacientes con pólipos de cuerdas vocales y demostraron no sólo la sobreexpresión del gen en las muestras oncológicas sino también su relación con el pronóstico, presentando una relación estadísticamente significativa entre el nivel de sobreexpresión y las tasas de supervivencia (54).

- ***BIRC2***: el producto proteico codificado en este gen pertenece a una familia de proteínas que inhibe la apoptosis mediante la unión a los factores TRAF1 y TRAF2 asociados al receptor TNF. Tiene funciones también en la modulación de la respuesta inflamatoria, la inmunidad, la proliferación celular, así como la invasión celular y la metastatización (38). Se encuentra en el cromosoma 11q22.2 y sus mutaciones se asocian al desarrollo de linfomas de Burkitt y cánceres pulmonares (34,40). En el TCGA, encontraron que una caracterización habitual de los tumores VPH+ consistía en una activación de FADD e inhibición concomitante de BIRC2 (44).
- ***IRF6***: este gen codifica en la posición 32.2 del cromosoma 1 para un miembro de la familia de interferones (IRFs), el interferón 6, un factor de transcripción con dominios de unión a proteínas y ADN (40). Estos dominios son comunes a varios IRFs siendo los N-terminales los de unión al ADN, y los dominios C-terminales de unión a proteínas (llamados dominios asociados a IRF o IAD). Mientras que los dominios N-terminales son esenciales para la unión entre las proteínas IRF con las respectivas regiones promotoras de los genes que regulan, los dominios C-terminales del IAD necesitan interacción proteína a

proteína. Varios estudios han comprobado la asociación entre mutaciones en los dominios de unión y la presencia de labio leporino o paladar hendido (55). De los 9 IRFs descubiertos hasta la fecha, *IRF6* ha demostrado jugar un papel vital en el desarrollo de la región craneofacial, regulando la diferenciación celular y la proliferación.

Las mutaciones en las regiones codificantes del gen *IRF6* fueron identificadas por primera vez en el Síndrome de Van der Woude, que es el más común de todos los síndromes de malformaciones mendelianas. Los sujetos que lo padecen, presentan labio leporino, paladar hendido o una combinación de los mismos, y aún más importante, presentan una fosa labial que distingue la forma sindrómica de la no sindrómica.

Se han identificado irregularidades en la familia de factores de transcripción de tipo interferón en varios carcinomas, *IRF7* en tipos pulmonares, *IRF8* en mieloma múltiple y cánceres colónicos e *IRF6* en carcinomas escamosos. *IRF6* también ha sido claramente relacionado con la diferenciación escamosa del epitelio, y según los hallazgos del grupo del TCGA, parece ser otro de los factores fundamentales en el proceso precursor de la carcinogénesis a nivel de la diferenciación celular (44).

Existen algunos estudios como los de Melath et al. (55) en los que encuentran mutaciones de este gen, concretamente en el exón 7, en un 9% de las muestras de su población con cáncer de cavidad oral por lo que sí que podría convertirse en un biomarcador prometedor en lesiones de cabeza y cuello.

- ***CCDN1***: o gen de la Ciclina D1, perteneciente a la familia de las ciclinas, unas proteínas fundamentales en la regulación del ciclo celular y la activación de las proteínas quinasas CDK. En concreto, la Ciclina D1 forma un complejo con las subunidades de CDK4 y CDK6 necesario para el paso de la fase G1 celular a la S. También interactúa con la proteína del retinoblastoma, un reconocido factor supresor tumoral del que luego hablaremos con más detalle. Se ha identificado una desregulación de este gen en numerosos cánceres, ya sea por amplificaciones genómicas a cambios en la metilación de zonas promotoras. Entre las enfermedades que estas alteraciones pueden predisponer se encuentran el mieloma múltiple, el Síndrome de Von-Hippel Lindau, y entre

otros los tumores gástricos y vesicales. Su locus es el 11q13.3 (34,56). Al encontrarse en el cromosoma 11q, pertenece al grupo de genes localizados en ese fragmento del ADN (CCND1, YAP1, FADD, BIRC2, HRAS) relacionados con funciones de ciclo celular, muerte, factor NF kB y otras vías implicadas en el proceso oncogénico. Tener amplificado CCND1 fue uno de los marcadores de mal pronóstico, al igual que tener mutado TP53, según el análisis efectuado por el equipo del TCGA. Su sobreexpresión era más típica de tumores VPH - (44).

- ***NOTCH1, NOTCH2 y NOTCH3***: estos genes codifican la familia de proteínas NOCTH. Esta familia pertenece a las proteínas tipo I transmembrana, que tienen la particularidad de poseer en su porción extracelular, un dominio de repeticiones iguales a las del factor de crecimiento epidérmico (EGF). La vía de señalización NOTCH regula las interacciones de las células físicamente adyacentes mediante la unión de ligando-receptor. La pre-proteína codificada, sufre un proceso de proteólisis en el aparato de Golgi hasta generar dos cadenas polipeptídicas que se unen formando un heterodímero que constituye el receptor de superficie celular maduro (57). A través de sus ligandos, Jagged-1 (JAG1), Jagged-2 (JAG2) y Delta-1 (DLL1), se encarga de regular la supervivencia celular. Al unirse ligando y receptor, se libera un dominio intracelular NOTCH (NCID) que se une con RBPJ/RBPSUH en el núcleo celular para formar un complejo de activación de transcripción de los genes diana. De esta manera, influye sobre la implementación de la diferenciación celular y sobre los programas de proliferación y apoptosis.

Participa en la angiogénesis como inhibidor de la proliferación de células endoteliales y de la migración y los brotes angiogénicos. *NOTCH1* tiene un papel en la maduración tanto de células CD4 (+) como CD8 (+) en el timo. *NOTCH2*, además de participar en las funciones descritas anteriormente de la familia NOTCH, parece tener un papel en el remodelado óseo y la homeostasis, promoviendo la diferenciación de osteoclastos y la auto-renovación de células hepáticas (40).

Por su parte, *NOTCH3* se ha identificado como el causante de la arteriopatía cerebral autosómica dominante, con la leucoencefalopatía e infartos subcorticales y la miofibromatosis tipo 1 y 2 (58).

Existen varios estudios que sugieren que las mutaciones de *NOTCH* pueden tener un efecto oncogénico o supresor tumoral (32,59,60). En las leucemias linfoblásticas agudas de células T, se ha implicado la vía NOTCH como pro-tumoral, mediante mutaciones activadoras y traslocaciones en los receptores NOTCH o sus reguladores, mientras que en los tumores pulmonares, escamosos, CCC y leucemias crónicas mielomonocíticas, se han observado mutaciones inactivadoras de la familia *NOTCH*, lo que aboga por la función supresora de tumores (59).

Este gen se ha confirmado como el gen más comúnmente mutado tras *TP53* en tumores de cabeza y cuello, con autores como Stransky et. al que sitúan su frecuencia mutacional en un 11% (31) o Sun et al, que la sitúan entre el 10 y el 15% (59). Cabe señalar además que se encontraron frecuencias similares en *NOTCH2* y *NOTCH3*. Las mutaciones más habituales según Stransky fueron de tipo “frameshift” (marco de lectura), que truncaban la proteína resultante al faltarle la región C terminal, crítica para el anclaje a otros genes durante el proceso de transducción.

- ***YAP1***: este gen codifica un efector nuclear perteneciente a la vía de señalización Hippo, que está implicada en el desarrollo, crecimiento, reparación y homeostasis celular. Se encuentra en la banda 11q22.1, y está reconocido como uno de los genes involucrados en el desarrollo y progresión de múltiples cánceres, actuando como factor de transcripción de esta vía ya sea como coactivador o como correpresor, controlando por ejemplo el tamaño de los órganos, restringiendo la proliferación y promoviendo la apoptosis. Su alteración puede promover el desarrollo de hemangioendoteliomas epitelioides, coloboma ocular asociado o no a hipoacusia, labio leporino o paladar hendido, y/o retraso mental (34,40). Al pertenecer también al grupo de genes de 11q, las alteraciones en su expresión se han relacionado con tumores VPH negativos y de peor pronóstico (44).

- ***PI3KCA***: las fosfatidilinositol 3-quinazas (PI3K), son enzimas transmembrana que fosforilan lípidos inositol. Están implicadas en la coordinación de un amplio rango de funciones celulares, incluyendo la proliferación y la supervivencia. Se localiza en el brazo largo del cromosoma 3, en la posición 26.32 (61).

El gen *PI3KCA* es el más comúnmente mutado en el cáncer de mama, y se ha encontrado también alterado en muchos cánceres de otras localizaciones, incluyendo los CCC (33). Estas mutaciones, tienden a incrementar el crecimiento celular y la viabilidad, y pueden conducir a una progresión tumoral. Son más frecuentes en tumores VPH positivos que negativos, aunque existen estudios que demuestran que, pese a que exista una amplificación de este gen, no siempre hay un incremento en la señalización de la vía. Esta vía de señalización puede ser activada mediante varios factores de transcripción, como el EGFR, y una vez estimulada, los receptores transmembrana tirosina quinasa fosforilan el sustrato del receptor de insulina (IRS) que a su vez fosforila una subunidad de la PI3K, activándola. La PI3K activa, fosforila el fosfatidil inositol 3,4 difosfato (PIP2) convirtiéndolo en fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PIP3), que conduce a la activación de la proteína AKT.

La activación anormal de esta vía produce la respuesta proliferativa y antiapoptótica que se relaciona con el desarrollo cancerígeno (62). Watanabe et al. (63) reportaron que la expresión de ARN mensajero (ARNm) de PIK3CA era de 2,5 a 11 veces superior en mucosa displásica o tumoral en comparación a tejido sano. Este hallazgo se sostiene también por Kaur et al. (64), quienes midieron por inmunofluorescencia también la expresión de PI sintasa en especímenes con displasia y cáncer y demostraron que el incremento en la expresión de PI era un evento temprano en la tumorigénesis oral.

La activación de AKT se relaciona además con un peor pronóstico en cáncer oral, encontrando en un 55% de los pacientes con displasia oral un aumento de frecuencia de expresión de p-AKT y una activación de AT en los casos que progresaron a cáncer (65).

Cabe señalar también que esta vía suele encontrarse más frecuentemente alterada en tumores VPH positivos que en negativos (33), en concreto, en los dominios helicoidales del oncogén (44). Stransky y Agrawal también apuntaron

en sus trabajos que las alteraciones en este gen eran de las más constantes (31,32).

El TCGA encontró que no sólo las mutaciones, sino también las amplificaciones de este gen son más frecuentes en cánceres VPH positivos (44). Los subtipos tumorales atípicos, que comprenden tumores VPH negativos, suelen tener tendencia a presentar mutaciones activadores tanto en *PI3KCA* como en *EGFR* (35). En el trabajo realizado por Manterola et al., en el que también estudiaron lesiones premalignas de laringe, encontraron que sólo los pacientes con displasias laríngeas con progresión a cáncer presentaban mutación en este gen (66).

- **AJUBA:** en el locus 14q11.2, encontramos este gen codificante para la proteína homónima. La proteína AJUBA participa en el ensamblaje de numerosos complejos proteicos y está implicada en varios procesos celulares como la organización del citoesqueleto, la represión de la transcripción génica, la mitosis, la adhesión celular, así como la diferenciación, proliferación y migración celular. Contribuye a la unión y el fortalecimiento de las uniones de células epiteliales, en parte mediando la unión entre receptores adhesivos y la actina citoesquelética (34,40). Este gen participa en la cascada de señalización de Wnt, al igual que FAT1. Sus mutaciones en el cáncer de laringe se relacionan con tumores VPH negativos y suelen ser desactivadoras (44).
- **PTEN:** gen supresor tumoral localizado en el cromosoma 10q23.3 que se encuentra alterado en muchas lesiones malignas. Codifica para la proteína fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato 3 fosfatasa, que defosforila sustratos de fosfoinositol. Inhibe los niveles de PIP3 celulares y funciona como un supresor tumoral al inhibir la vía de señalización PI3KCA-AKT, modulando así la progresión del ciclo celular, la migración y la supervivencia celular (67,68). Existe un síndrome asociado a la mutación de este gen, llamado el Síndrome de tumor hamartoma PTEN que conlleva un riesgo aumentado de desarrollo de tumores de mama, tiroides, colorrectales, endometriales, renales y melanoma, y que se asocia también con malformaciones vasculares, deficiencia intelectual o autismo (69). Este gen se categoriza como supresor de tumores, siendo especialmente estudiado en cáncer colorrectal. Se encuentra mutado,

delecionado o hipermetilado en muchos tumores, actuando como supresor de las vías PI3K, AKT y mTOR (68). El grupo del TCGA encontró algunas mutaciones aisladas en este gen en tumores de cabeza y cuello pero no parece tener un papel tan predominante en la carcinogénesis de esta localización como en otras líneas tumorales (44).

- **FAT1:** ortólogo del gen FAT de la Drosófila, codifica para un supresor tumoral esencial para el control de la proliferación celular durante el desarrollo de la Drosófila. Su producto pertenece a la superfamilia de las cadherinas, un grupo de proteínas integrales de membrana caracterizadas por la presencia de repeticiones tipo cadherina. El gen tiene 5 dominios de repetición de tipo EFG y se expresa en muy alto nivel en los epitelios fetales. Es un gen que continúa en estudio, pero al que se le atribuyen funciones en la adhesión molecular y la señalización a través de receptores. Se localiza en el cromosoma 4q35.2 y sus mutaciones se asocian con la microftalmia colobomatosa y la glomeruloesclerosis primaria focal segmentaria (34,40). Como hemos mencionado anteriormente, pertenece a la vía de señalización de Wnt. También suelen presentarse en los tumores laríngeos como mutaciones inactivadoras típicas de VPH - (44).

- **RB1:** el gen RB fue el primer gen supresor de tumores identificado y juega un papel fundamental en la regulación de la proliferación celular. Varios autores han reportado la pérdida de la expresión de la proteína RB en humanos en las células tumorales mientras que otros han demostrado elevados niveles de expresión (70). Se encuentra en el brazo largo del cromosoma 13, en la posición 14.2, y entre sus funciones cabe destacar la inhibición de la progresión del ciclo celular, impidiendo por tanto la proliferación celular.

La mutación de este gen se asocia al desarrollo de retinoblastoma y al carcinoma microcítico pulmonar, aunque muchos estudios están demostrando que la expresión de este gen tiene un papel fundamental en la carcinogénesis, entre otras laríngea, y podría ser considerada como un indicador de mal pronóstico en lesiones de laringe (40).

Al tratarse del primer gen supresor tumoral identificado, ha sido un gen ampliamente estudiado sobre el que existen pruebas irrefutables de que varios

componentes de su vía de señalización están alterados en cánceres humanos (70). No obstante, la información que poseemos sobre su expresión en lesiones premalignas es mucho más limitada, aunque hay autores como Soni et al. (71) que publicaron una pérdida de expresión del gen *RB* en la transición de lesiones hiperplásicas a displásicas. Ioachim et al. (72) realizaron un estudio que incluía también lesiones benignas, malignas y premalignas laríngeas y observaron un aumento de la inmunotinción de KI67, el antígeno celular de proliferación celular (PCNA) y el producto del gen *RB*, correlacionando estos hallazgos con la influencia de la alteración de este gen en las lesiones de mal pronóstico laríngeas (73).

- ***E2F1***: la proteína asociada al retinoblastoma 1 perteneciente a la familia E2F de factores de transcripción, crucial para el control del ciclo celular y con funciones de supresores tumorales. Es una diana para las proteínas transformadoras de los virus oncogénicos de ADN pequeño, de ahí que se haya relacionado con la oncogénesis de tumores VPH positivos. Se encuentra en el cromosoma 20q11.22 y las enfermedades asociadas a este gen incluyen el retinoblastoma, Síndrome de Cushing ectópico y cánceres gástricos y vesicales (34,40). En el CCC, este se encuentra mutado predominantemente en tumores VPH+ (44)

- ***RIPK4***: La proteína codificada en este gen es una proteína-quinasa serina-treonina que interactúa con la proteína-quinasa C-delta. También puede activar a NF- κ B, regulan la señalización del factor de necrosis tumoral TNF y es fundamental en la diferenciación de los queratinocitos. Se encuentra en el cromosoma 21, posición 22.3 (40).

En lesiones tumorales, se han observado papeles contrapuestos de este gen en los linfomas B difusos de célula grande, por ejemplo, *RIPK4* promueve la progresión tumoral mediante la activación de la vía NF- κ B, y protege a las células de la muerte inducida por los agentes quimioterápicos. En contraste se ha identificado a *RIPK4* en el cáncer hepático como supresor tumoral (74).

Existen estudios sobre este gen en otras lesiones premalignas de otras localizaciones, como el cérvix, en los que se han observado que la presencia de *RIPK4* se asocia a lesiones más agresivas y a cánceres escamosos (75). Sin

embargo, en tumores linguales prevalece la función supresora del gen, observándose un aumento de expresión del mismo cuanto mayor diferenciación tenga el tumor. En el estudio sobre este tema que realizaron Wang et al., a parte de los hallazgos mencionados, demostraron que *RIPK4* in vitro reducía la migración y la invasión celular sin afectar el ciclo celular o promover la apoptosis. Comprobaron también el papel crucial en la diferenciación epitelial y la cicatrización, y que es capaz de interactuar con la caspasa 8 (76). *RIPK4* ha sido estudiado en cáncer pulmonar, al estar relacionado con la diferenciación epitelial y el remodelado de la matriz extracelular, su alteración facilita la progresión y la dediferenciación tumoral (74). No obstante, su papel parece variar de una localización a otra, habiéndose encontrado niveles sobreelevados de expresión en tumores pancreáticos y de cérvix, y expresión inhibida en tumores nasofaríngeos, hepatocelulares y linguales (77). Se ha postulado incluso la posibilidad de usar este gen como biomarcador de displasias de cérvix, ya que se observa una sobreexpresión en la mayoría de las lesiones de *alto grado* y cánceres escamoso, frente al 19,3% y 3,2% de las cervicitis crónicas (75).

- ***FGFR3***: el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos tipo 3, localizado en el cromosoma 4p16.3. Forma parte de la familia de receptores de factores de crecimiento de fibroblastos (FGFR) y posee una porción extracelular capaz de interactuar con los factores de crecimiento fibroblásticos, de ahí su nombre. Esa unión desencadena una cascada de señalización que influye sobre la mitogénesis y la diferenciación. Se sabe que esta familia de proteínas está implicada en la carcinogénesis, a través de la activación del complejo RAS-MAPK y de la vía ya mencionada PI3K-AKT. Los mecanismos por los que este gen puede desregularse son variados y difieren de unos tumores a otros, pero sí parece claro su papel de potencial oncogénico y existen terapias de autoanticuerpos contra estas proteínas que se están usando actualmente con resultados prometedores espacialmente en pacientes con tumores pulmonares, véase el ponatinib, dovitinib y pazopanib. Además de contribuir al desarrollo de distintos tumores, sus alteraciones génicas pueden producir acondroplasia e hipoacondroplasia (34,40). En el CCC, suele encontrarse mutado en tumores VPH+ de cabeza y cuello (44).

- **HRAS:** Pertenece a la familia de oncogenes *RAS* cuyos miembros se han implicado con los genes transformadores de los retrovirus de sarcomas de mamíferos. *HRAS* participa en las vías de señalización celular que controlan la multiplicación y destrucción de las células. Las mutaciones en este gen causan el Síndrome de Costello caracterizado por el crecimiento incrementado en estadios prenatales, deficitario en estadios postnatales, predisposición al desarrollo de múltiples tumores, deficiencia intelectual, anomalías esqueléticas y epiteliales, y malformaciones cardiovasculares. Se encuentra en el cromosoma 11p15.5 (34,40). Sus mutaciones en el cáncer de orofaringe suelen ser activadores y relacionadas con mejores pronósticos (44).

- **SYNE 1 y 2:** localizados respectivamente en el brazo largo del cromosoma 6, posición 25.2 y cromosoma 14q23.2, reciben también el nombre de nesprinas, genes que codifican para la proteína de membrana nuclear (78,79). En los últimos años, varios estudios han reportado la existencia de una alteración en la composición de las envolturas nucleares de las células de varios cánceres. La estructura y la composición del núcleo, en especial de la membrana nuclear, tiene un papel importante en la mecánica celular y sus funciones, que oscilan entre determinar la deformabilidad y la fragilidad nuclear a la participación en la señalización de la mecanotransducción. Un mecanismo potencial mediante el que la composición de la envoltura nuclear podría contribuir a la progresión tumoral, es que un núcleo más suave y lobulado permite la invasión a través de tejidos más densos, donde las células para conseguirlo deben atravesar constricciones más pequeñas que su propio diámetro nuclear. Además, el acoplamiento entre núcleo y citoesqueleto es crítico para la organización citoesquelética y la polarización celular. En la membrana externa celular, encontramos nesprinas que participan en la conexión entre núcleo y citoesqueleto (*SYNE 1-4*) y la expresión de cada una de ellas puede ser altamente tejido dependiente, con dominios de anclaje a la envuelta nuclear y dominios N terminales para interactuar con las distintas proteínas citoesqueléticas. Las nesprinas 1 y 2 pueden interactuar con los motores microtúbulos-asociados de dineína/dinactina y quinesina (80). En la siguiente figura se representa esquemáticamente la estructura nuclear.

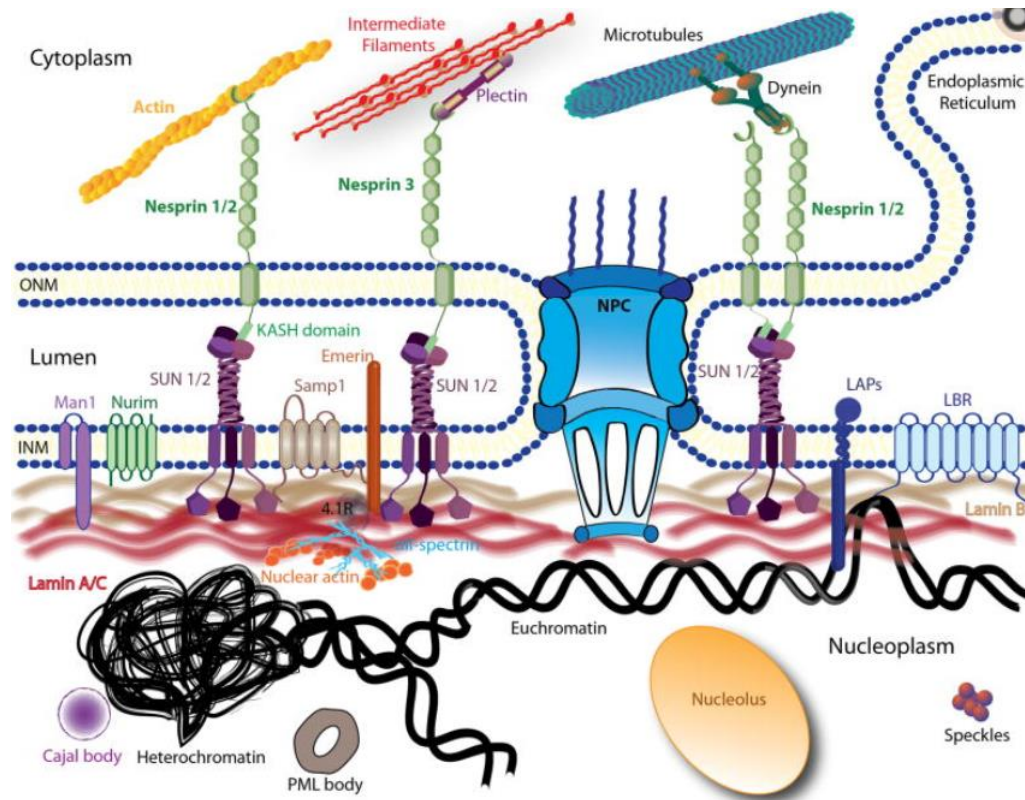


Figura 7: Vista esquemática de la estructura nuclear y del complejo conector entre núcleoesqueleto y citoesqueleto (LINC). La envoltura nuclear se compone de una membrana interna nuclear y otra externa, perforada por complejos de poros nucleares. La membrana externa nuclear se continúa con el retículo endoplásmico. Se pueden observar en la imagen varias de las estructuras confinadas en el interior nuclear: nucleolo, cuerpos de Cajal, cuerpos de leucemia promielocítica y motas nucleares. La cromatina se presenta en sus dos estados, muy condensada (heterocromatina) y suelta sin condensar (eucromatina). Sólo se representa una subunidad de las proteínas de membrana nuclear: el receptor de laminina B, la emerina, MAN1 y la nurima. Este esquema también ilustra algunas de las interacciones de estas proteínas con la lámina de malla (lamininas B y A/C). El complejo LINC se representa con las nesprinas, las proteínas Sad1p/UNC-84 (SUN) y Samp1. En la membrana externa, las nesprinas 1 y 2 pueden anclarse directamente a filamentos de actina, o interactuar indirectamente con microtubulos mediante las proteínas motoras (dineínas o quinesinas). La nesprina 3 se muestra interactuando con los filamentos intermedios vía plectina. Imagen tomada de Denais et al. (80).

El grupo de Stransky encontró también mutaciones recurrentes de estos genes en CCC, en un 20% y un 8% respectivamente (60). Sin embargo, no existe mucha bibliografía al respecto de las alteraciones de este gen y el desarrollo de neoplasias en laringe.

- **LATS1:** la proteína codificada por este gen es una quinasa serina-treonina putativa, que se localiza a nivel del aparato mitótico y participa en el control del ciclo celular

en estadios tempranos del mismo con la CDK2. Se ha asociado con la vía de señalización Hippo, siendo un inhibidor del gen *YAP1* del que ya hemos hablado, controlando de la misma manera el tamaño de los órganos, y actuando como supresor tumoral al inhibir la proliferación y promover la apoptosis. Parece estar implicado también en el control del *TP53*, que ahora comentaremos. Se encuentra en el cromosoma 6q25.1 y su alteración se asocia con tetraploidías y desarrollo de sarcomas de tejidos blandos (34,40). No existe mucha información sobre su participación individual en los CCC.

- ***TP53***: el gen supresor tumoral más conocido y más comúnmente inactivado en cánceres humanos (70). Localizado en el cromosoma 17p13.1, ha sido analizado en numerosos estudios y ensayos que han comprobado que los individuos con mutación o supresión del mismo, tienen mayor tendencia a desarrollar tumores. Es conocido el Síndrome de Li Fraumeni, causado por la mutación en líneas germinales del gen *TP53*, cuyos enfermos presentan un riesgo aumentado de desarrollo de casi cualquier tumoración (81).

Codifica para la proteína p53, que posee una función crucial para la progresión del ciclo celular, la diferenciación nuclear, la reparación del ADN y la apoptosis, es considerado el “guardián del genoma”. La pérdida de su función, disminuye la regulación del ciclo celular y la apoptosis, alterando por tanto la habilidad de la célula a responder al estrés o al daño (véase daño del ADN, hipoxia y activación de oncogenes).

En las células sanas normales, los niveles de p53 son bajos, debido a la baja vida media del tipo no mutado de la proteína, y es básicamente indetectable mediante inmunohistoquímica. La estabilización de mutaciones acumuladas en el gen *TP53*, conlleva frecuentemente un incremento en la expresión de un p53, con una vida media más larga, detectable con inmunohistoquímica (70). La forma mutante de *TP53* se considera como un oncogén dominante negativo (82).

En cualquier caso, las mutaciones de *TP53* se asocian con una supervivencia más pobre y se ha encontrado relación entre las mutaciones adquiridas del gen y el consumo de alcohol y tabaco (83). La pérdida misma de heterocigosidad parece también predisponer al desarrollo de tumores mamarios, ováricos, pulmonares y cerebrales. El tipo de mutación más habitual en este gen son las de tipo “missense”,

con sustitución de una única base. Los puntos calientes mutacionales incluyen los codones 175, 245, 248, 273, y 337 que afectan a la región central de la proteína, implicada en el anclaje al ADN. Al afectar a esta región, p53 deja de ser capaz de realizar sus actividades de transactivación (81).

Se han encontrado este tipo de mutaciones en un amplio rango de tumores, y se ha observado que sí afectan a líneas germinales, se relacionan con tumores de aparición en edad temprana. Hasta la fecha, *TP53* es el gen más comúnmente inactivado en cánceres humanos (84). No obstante, la consideración de p53 como un biomarcador en pacientes con cáncer oral escamoso sigue siendo controvertida, dada la heterogeneidad de técnicas de laboratorio unida a los limitados datos clínicos de varios estudios. Es más, el amplio espectro de mutaciones de p53 observado en las muestras tumorales sugiere que las mutaciones varían según su potencial pronóstico. Varios estudios han establecido un papel para p53 como biomarcador en lesiones displásicas (44,85), sin embargo, no hay consenso aún en los detalles. También hay estudios como el realizado por Linggen et al. (70) que han reportado el análisis de p53 mediante inmunohistoquímica basándose en el porcentaje de células positivas, la distribución de las mismas en la capa epitelial y la intensidad de la señal. Pero la correlación entre el grado de displasia y la expresión de p53 sigue siendo inconsistente (70). Cruz et al. (86) no encontraron diferencias entre la expresión de p53 y el grado de displasia pero sí que la expresión suprabasal de p53 era un evento temprano de la malignización y tenía un valor predictivo en el desarrollo de cáncer oral. Frente a esto, Murti et al. (87) no encontraron valor predictivo en la expresión de p53, con niveles similares de p53 en pacientes que progresaron a cáncer y que no, en un periodo de hasta 25 años. Kodani et al. (88). reportaron que p53 incrementado podría correlacionarse con el aumento del riesgo de transformación maligna mientras que Shah et al. (89). encontraron que la sobreexpresión de p53 era el mayor riesgo de malignización. Smith et al. (90) revisó la literatura sobre las displasias y concluyó el riesgo era mayor cuando había inmunoseñal en las capas suprabasales.

En los CCC, el subtipo tumoral clásico se distingue tanto por la mutación de *TP53* como por la pérdida de *CDKN2A* (35). En el trabajo realizado por Manterola et al. (91) realizado sobre displasias tanto con progresión a tumor como sin ella, todos presentaban predisposición a tener mutaciones en el gen *TP53*. No obstante sí existían diferencias en los grupos respecto a los dominios mutados del gen, estando presentes en 5 de cada 7 casos en el dominio H2 del p53 en los pacientes con

progresión frente a ninguna de los pacientes sin progresión. En definitiva, la expresión de p53 se observa en lesiones displásicas y su expresión se correlaciona con un incremento en el grado histológico, si bien existen datos enfrentados respecto al valor de p53 como predictor de progresión en cáncer oral.

- **TP63:** homólogo del *TP53*, y fundamental para el desarrollo de epitelios estratificados. Cooperación con p53 para inducir la apoptosis, lo que sugiere que tengan un papel en la regulación de la muerte celular autoinducida por daño en el ADN. Se localiza en el 3q27-29 y presenta 6 isoformas, 3 de las cuales poseen un dominio de transactivación N-terminal que puede inducir la apoptosis y las otras tres parecen tener una función inhibidora de oncoproteínas (70).

TP63 tiene una función clave en el desarrollo y se han reconocido síndromes asociados a malformaciones craneofaciales y alteración en la estructura y desarrollo de epitelios escamosos estratificados, que presentan mutaciones germinales del gen *TP63*, véase el Síndrome Hay-Wells, el síndrome EEC (Electrodactilia-Displasia ectodérmica- Labio o paladar hendido) o el síndrome Acro-Cardio-Facial (ACFS) (81). La amplificación del p63 se ha asociado al pronóstico en cáncer oral escamoso (92). En cambio, Oliveira et al. (93) encontraron que p63 estaba sobre expresado en la mayoría de los cánceres orales escamosos pero con resultados incongruentes sobre su asociación con la supervivencia. Chen et al. (94), encontraron en mucosa sana e hiperplásica, la expresión de la proteína p63 estaba limitada a las capas basales y parabasales con incremento del grado de displasia. Frente a esto, Bortoluzzi (85) no encontró diferencia estadísticamente significativa en la inmunoseñal entre los 3 grados de displasia.

En el TCGA, al igual que ocurría en el gen *PIK3CA*, se encontró que mutaciones a este nivel son más frecuentes en los tumores VPH positivos frente a los negativos (44).

- **EGFR:** Este gen codifica para el receptor tyrosin Kinasa de TGF alfa. Este receptor tiene la capacidad de traslocarse al núcleo y actuar como un factor de transcripción o factor coactivador de otros factores de transcripción como STAT (acrónimo del inglés “Signal Transducer and Activator of Transcription”), que también están implicados en el crecimiento celular.

Varios estudios han descrito la amplificación de *EGFR* en displasias de cavidad oral, correlacionándose el grado de amplificación con el grado de la displasia (95,96), no existiendo evidencia actualmente para lesiones displásicas de laringe. Otro estudio mostró que el aumento en el número de copias del gen *EGFR* en lesiones de leucoplasia oral se asoció a mayor riesgo de desarrollar cáncer de cavidad oral (97).

A pesar de estos hallazgos, es llamativa la práctica ausencia de estudios sobre genes y vías de señalización en lesiones premalignas de laringe. No obstante, parece deducirse que a pesar de las distinciones anatómicas en que se basa el manejo actual de los CCC, a nivel molecular no parecen existir diferencias entre una localización u otra (31).

El proyecto del TCGA ha sido fundamental para poder contar con una base de referencia sobre la que comparar las distintas mutaciones que se han ido encontrando en los múltiples estudios de investigación. Consiste en un repositorio de datos moleculares (alteraciones a nivel de ADN y de ARN) en distintos tipos de cáncer basado en la combinación de la secuenciación del genoma humano y la bioinformática (figura 8).

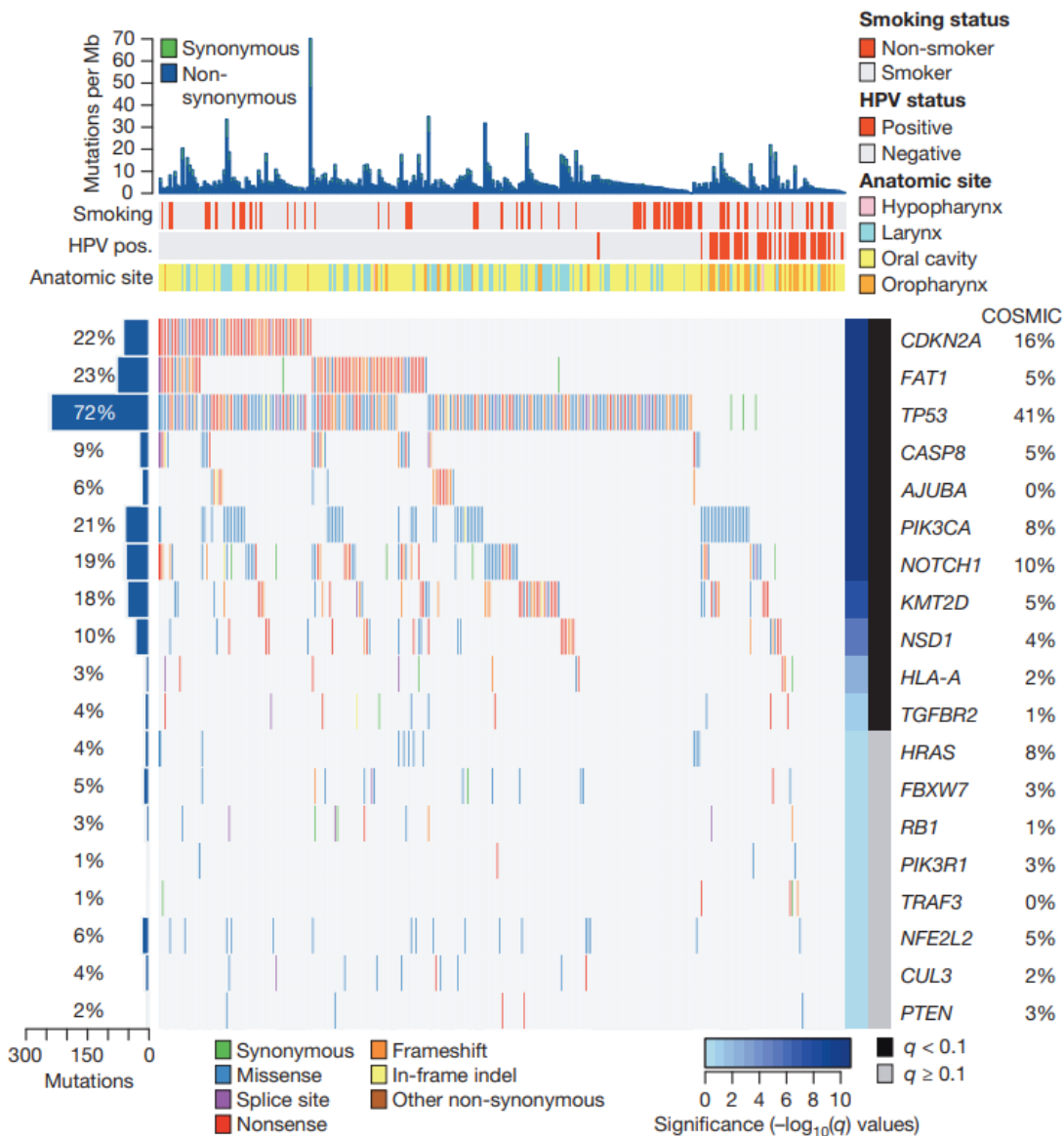


Figura 8. Genes mutados en CCC. La figura muestra los genes (filas) en los que se han identificado mutaciones con el algoritmo MutSigCV; $(q, 0,1)$ ordenados según los valores; se muestran también genes adicionales con tendencia hacia la significancia. Las muestras (columnas), están ordenadas para enfatizar la exclusividad mutua entre las mutaciones. A la izquierda, el porcentaje de mutación en el TCGA. A la derecha, el porcentaje de mutación en COSMIC. Arriba, el número total de mutaciones por megabase. El color indica el tipo de mutación. Tomado de “The Cancer Genome Network” (44).

Tal y como expone Pierini en su estudio (48) la singularidad que presenta el cáncer de laringe, es que pese a los grandes avances terapéuticos, los esfuerzos por desarrollar métodos de detección temprana han sido infructuosos. La tasa de supervivencia a los 5 años se mantiene sobre el 50%, principalmente por la recurrencia local, y constituye una de las tasas más bajas registradas en cáncer, sin haberse alterado en los últimos 40 años.

3.2 Inmunorregulación en el proceso carcinogénico

Actualmente, una de las estrategias de tratamiento más prometedoras para el cáncer de laringe, al igual que en otras localizaciones, es la inmunoterapia. Se ha demostrado que existe un microambiente proinflamatorio en las lesiones tumorales, ya presente incluso en las lesiones premalignas de laringe, y que la disfunción de las células del sistema inmune se relaciona con carcinomas invasores y con mayor riesgo de progresión. Los mecanismos por los que se permite esta inmunosupresión son variados, e incluyen tanto cambios cuantitativos como cualitativos, afectando a los puntos de control del sistema inmune, provocando defectos en la maquinaria presentadora de antígenos y generando una secreción de citoquinas que favorecen el crecimiento tumoral (98).

Un tumor no sólo se compone de las células cancerígenas sino también lo conforman células inmunológicas, vasos linfáticos, sanguíneos, nervios, los fibroblastos tumorales, la matriz extracelular y las moléculas de señalización. Este conjunto es lo que se entiende como “microambiente tumoral”. La intensa investigación que se ha llevado a cabo en este campo, permitió abrir nuevas líneas terapéuticas, empezando en 2016 con la aprobación por parte de la FDA de Pembrolizumab y Nivolumab, sendos anticuerpos monoclonales anti PD-1 como segunda línea de tratamiento del CCC (99). Esto pone de manifiesto la importancia de este factor en el proceso carcinogénico y lo útil que sería disponer de un marcador inmunológico que nos permitiera distinguir las lesiones premalignas con mayor potencial de malignización.

Los mecanismos de evasión del cáncer del sistema inmune son muy variados y difieren según el tipo de tumor. En el caso del CCC, la evasión se lleva a cabo fundamentalmente a través de la disminución de la expresión de los antígenos de leucocitos humanos (HLAs), errores en la detección de las células cancerígenas por parte de los linfocitos T y activación de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK), transductores de señal y activadores de la transcripción (STAT), y vías de señalización de B-catenina y Wnt (99).

El aumento en la regulación de puntos de control del sistema inmune, incluyendo PD-L1, CTLA4, TIM-3 y LAG-3, se hace evidente en las poblaciones tumorales. Éstos, además, pueden ir acompañados de la presencia de células inmunosupresoras, incluyendo linfocitos T reguladores, macrófagos asociados a tumor y células supresoras derivadas de mieloides. La producción de citoquinas inmunosupresoras también como VEGF, IL-10, TGF- β o IL-6 propician ese ambiente inmunosupresor (98).

3.3 Genes involucrados en la señalización inmune en el CCC

A continuación, se mencionan varios de los genes implicados en la inmunorregulación sobre los que se ha centrado parte de nuestro estudio.

- ***CXCL9***: gen involucrado en la vía de señalización CCR5 de los macrófagos y la señalización ERK, ubicado en el brazo largo del cromosoma 4, región 21.1. Perteneciente a la superfamilia codificante de proteínas tipo citoquinas y parece estar involucrada en el tráfico de células T, quimioatrayente para los linfocitos pero no los neutrófilos (40). Varios estudios han demostrado la influencia de este gen y la citoquina para la que codifica en diversos tumores incluyendo el cáncer de pulmón, de mama, colorrectal, melanoma o algunos linfomas (100–102). Autores como Li et al. detectaron que la inyección de Il-12, citoquina antitumoral, aumentaba la expresión de *CXCL9* (100). También comprobaron que la inyección del gen en pacientes con tumores de CCC promovía significativamente la infiltración de linfocitos T CD4. Por otra parte, Dorsey et al. comprobaron que la sobreexpresión de *CXCL9* y *CXCL10* inhibían la angiogénesis (103). Chang et al. realizaron un trabajo de investigación en el que demostraron que la concentración sérica de este factor podría usarse como indicador diagnóstico predictor de la progresión tumoral y de la supervivencia total en cáncer escamoso oral (102). Su expresión estaba además marcadamente relacionada con el estadio tumoral, y los datos de supervivencia mostraron que los pacientes con altos niveles de expresión de *CXCL9* se asociaban con mejores índices de supervivencia total (101).
- ***STAT3***: perteneciente a la familia de proteínas STAT, que en respuesta a citoquinas y factores de crecimiento como los Interferones, IL5 o IL6, son fosforiladas por el receptor asociado a kinasas y son traslocadas al núcleo celular donde actúan como factores de transcripción. Regulan de esta manera la expresión de varios genes involucrados en apoptosis y crecimiento celular. Este gen posee un papel también en la respuesta del huésped a infecciones virales y bacterianas. Se encuentra en la posición 21.2 del brazo largo del cromosoma 17 (40). Autores como Yang et al. han demostrado que las células escamosas cancerígenas podían promover la activación y morbilidad de los neutrófilos a través de la activación de la vía de señalización

JAK/STAT3 entre otras, y que su inhibición mediante IL-17, podía bloquear la proliferación, migración e invasión de las células tumorales (104). Du et al. en su trabajo demuestran también la implicación de este gen en la proliferación y migración tumoral además de en la secreción de VEGF (105).

- ***IDO1***: codifica para la proteína 2,3-dioxigenasa. Esta enzima actúa sobre diversos sustratos de triptófano desarrollando funciones en la defensa antimicrobiana y antitumoral, participando en la inmunorregulación. A través de su expresión en las células dendríticas, monocitos y macrófagos, esta enzima modula el comportamiento de las células T. Se localiza en el brazo corto del cromosoma 8, posición 11.21 (40). La expresión incrementada de *IDO1* puede provocar la inmunosupresión de las células T antitumorales, la diferenciación de las células T CD4 en reguladoras inmunosupresoras y la polarización de las células presentadoras de antígenos a un fenotipo más tolerante. La sobreexpresión de *IDO1* se asocia con una peor supervivencia en varios tumores además de los CCC (106). Conviene puntualizar no obstante, que al revisar la literatura como hicieron Lin et al., se demuestra que la sobreexpresión de este gen se asocia más a tumores VPH positivos (107).
- ***CXCL10***: gen ubicado en el brazo largo del cromosoma 4, banda 21.1, codifica otro componente de la familia de las citoquinas, subtipo CXC, al igual que mencionamos en el caso de *CXCL9*. Ligando del receptor CXCR3, produce efectos pleiotrópicos al unirse al mismo, induciendo la estimulación de monocitos, células T-NK y la migración y modulación de la expresión de las moléculas de adhesión. Parece ser un factor regulador de las tormentas de citoquinas que se producen en respuesta a la infección con el SARS-CoV-2. Esta citoquina ejerce un papel en una amplia variedad de procesos como son la quimiotaxis, diferenciación y activación de las células periféricas inmunes, crecimiento celular, apoptosis y modulación de los efectos angiostáticos (40). Al igual que ocurría con *CXCL9*, se ha demostrado experimentalmente la sobreexpresión de este gen en tumores de CCC (101). Li et al. comprobaron que cuando se comparaban los niveles de expresión de este gen con tejido sano, se encontraban significativamente incrementados en el grupo de tejidos tumorales. Los niveles de ARNm se relacionaban con el estadio tumoral y al igual que ocurría con *CXCL9*, los niveles altos de expresión se asociaban con supervivencias globales mayores (101).

- **CTLA4:** acrónimo del inglés antígeno 4 del linfocito T citotóxico, Banda citogenética 2q33.2, es un gen perteneciente a la superfamilia de las Inmunoglobulinas y codifica una proteína que transmite señales inhibitorias a las células T. Las mutaciones en este gen se han asociado con diabetes mellitus insulino-dependiente, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad celíaca, lupus sistémico eritematoso y otras enfermedades autoinmunes. También entre las vías de señalización en las que participa, se encuentran las interacciones entre las células del sistema inmune y los microARNs en el microambiente tumoral (40). Erfani et al. entre otros, han demostrado la sobreexpresión de CTLA4 en la superficie de los linfocitos en pacientes con carcinoma escamoso de laringe en comparación a controles sanos, contribuyendo al ambiente inmunosupresor que propicia el proceso carcinogénico (108).
- **FOXP3:** gen perteneciente a la familia de reguladores transcripcionales, cuyo defecto es causa de poliendocrinopatía con inmunodeficiencia y del síndrome ligado al cromosoma X. Está implicado en la vía de señalización dependiente de IL2 mediada por STAT5, y se encuentra en el cromosoma Xp11.23 (40). Su papel en el CCC es todavía controvertido aunque existen datos que apuntan a una probable predisposición a peores supervivencias en aquellos pacientes con altos niveles de expresión de este gen (109).
- **TIM3:** también conocido como *HAVCR2*, perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas, específica de linfocitos T CD4 Th1 que regula la activación de macrófagos y promueve la tolerancia inmunológica inhibiendo las respuestas aloinmunes mediadas por Th1. Situado en el cromosoma 5q33.3 (40). No existe mucha revisión en la literatura sobre este gen en el carcinoma laríngeo, pero existen algunos estudios como el de Liu et al. que atribuyen a este gen la capacidad de inhibir la secreción del Interferón γ , inhibiendo así el efecto inmunosupresor de este factor (110).
- **HLA-DRA:** situado en el cromosoma 6, brazo corto, posición 21.32. Esta molécula se expresa en la superficie de varias células presentadoras de antígenos como los linfocitos B, las células dendríticas y en los monocitos, desarrollando un papel

fundamental en el rol del sistema inmune mediante la presentación de péptidos derivados de proteínas extracelulares(40). El producto de este gen, pertenece a la clase II de los HLA, y es el que con más frecuencia es expresado. Su relación con el cáncer de laringe es conocida desde los primeros trabajos sobre este campo, realizados por grupos como Esteban et al. o Sikorska et al., en los que correlacionan la presencia del HLA-DRA en las células tumorales con pronósticos muy favorables del cáncer laríngeo (111,112).

- ***PDL1***: también conocido como gen *CD274*, codifica un ligando de receptor inhibidor del sistema inmune expresado por las células B, T y algunos tipos tumorales. La proteína resultante es una proteína transmembrana con dominios de inmunoglobulinas tipo V y tipo C, cuyas interacciones con los receptores correspondientes, inhiben la activación de las células T y la producción de citoquinas. En el microambiente tumoral, esta interacción proporciona una vía de escape para las células tumorales a través de la inactivación de las células T citotóxicas. Se encuentra en el cromosoma 9p24.1(40). Este gen es una de las dianas terapéuticas con fármacos aprobados para su uso por la FDA como Durvalumab, Avelumab y Atezolizumab. Su expresión se correlaciona con mejores pronósticos (113), y comparando los niveles de esta proteína en pacientes con displasias frente a tumor, es significativamente mayor en estos últimos, aumentando su expresión conforme progresa el estadio tumoral (114).

- ***PDI***: en el cromosoma 2q37.3, es el gen que da lugar a la proteína de muerte celular programada (PDCD1). Es un receptor expresado en las células T inhibidor de la respuesta inmune (40). Se expresa en una gran variedad de tumores y su papel en la inmunidad anti-tumoral ha sido ampliamente estudiado y demostrado, tanto es así que constituye la diana terapéutica de Pembrolizumab y de Nivolumab, dos fármacos biológicos usados ampliamente en el CCC. No obstante, hay que añadir que el efecto terapéutico de estos fármacos suele ser más marcado en pacientes p16+ que en negativos (98).

- ***PDL2***: gen involucrado en la regulación inhibidora de las células T activadas, inhibiendo la producción tanto de Interferón γ como de IL-10, se encuentra en el brazo pequeño del cromosoma 9, posición 24.1 (40). PDL2 es igual que PDL1, un

ligando de PD1, y su interacción con el mismo propicia la evasión del sistema inmune, siendo de utilidad en pacientes PDL1 negativos. Aunque lo habitual es que los niveles de PDL1 y PDL2 se correlacionen, existen casos en los que sólo expresan PDL2 y esta expresión tanto en células inmunes como tumorales es predictora de buena respuesta y mayor tiempo de supervivencia libre de enfermedad en pacientes tratados con Pembrolizumab (98).

- **TLR4:** la proteína codificada en este gen pertenece a la familia de los receptores “Toll-like”, con un papel decisivo en el reconocimiento de antígenos y activación de la inmunidad innata. Se localiza en el cromosoma 9q33.1 (40). Sin embargo, en lugar de desarrollar una función protectora como realiza en las infecciones por patógenos, su expresión en las células tumorales promueve la progresión tumoral. Grupos como el Szczepanski et al. han demostrado que las de CCC tanto in vivo como in vitro, expresan casi en su totalidad TLR4, y su nivel de expresión depende de la diferenciación que presente el tumor, siendo elevado en tumores bien diferenciados y pobre en mal diferenciados (115).
- **TLR7:** ubicado en el cromosoma Xp22.2, este gen también codifica para otro receptor “Toll-like”, en este caso, especializado en el reconocimiento de ARN virales de una hélice (40). No existe tanta bibliografía sobre su papel en el cáncer de laringe como el caso de TLR4, pero sí se ha comprobado en laboratorio que la administración intratumoral de agonistas de TLR7 promueven las funciones presentadoras de antígenos, incrementando la infiltración tumoral por parte de células T CD8+ tanto local como a distancia y por tanto, que la terapia combinada de estos agonistas de TLR y anti PD1 es efectiva tanto en tumores VPH positivos como en negativos (116).
- **VISTA:** este gen habilita la actividad del activador de endopeptidasas. También se le conoce como *V SIR* y participa tanto en la inhibición de producción de citoquinas como en la activación del proceso metabólico macromolecular y la activación de las células T activadoras. Participa en la vía de señalización del NF-KappaB y su mutación se asocia al cáncer de paladar duro. Se encuentra en el cromosoma 10q22.1 (40). *VISTA* constituye otro punto de control del sistema inmune clave que además es independiente del eje PDL1/PD1. Autores como Katabathula et al. han

confirmado que se expresa no sólo en células inmunes sino también tumorales, asociándose a peores pronósticos en algunos subtipos cancerígenos como el carcinoma escamoso de cavidad oral o el ovárico (117).

- ***GZMA***: en el cromosoma 5q11.2, codifica para una proteasa sérica específica para células T y T-NK, necesaria para la lisis de aquellas células señalizadas por los linfocitos T citotóxicos o las T-NK. Participa en la vía de señalización de NF-KappaB y la de IL9 (40). Este gen permite cuantificar la actividad citolítica inmune en tumores, puesto que se encuentra sobreexpresado con la activación de los linfocitos T CD8 y durante las respuestas clínicas productivas con las terapias anti-CTLA4 y anti-PDL1 (118).
- ***PRFI***: este gen codifica para una proteína con similitudes estructurales al componente C9, formando poros membranosos que permiten la liberación de granzimas y la subsecuente lisis de células marcadas. Las mutaciones en este gen se han asociado a un gran número de enfermedades como la diabetes, esclerosis múltiple, linfomas etc. Participa en las vías de señalización de la IL2 mediada por STAT5 y en la de TNFR1. Se localiza en el brazo largo del cromosoma 10, posición 22.1 (40). Al igual que ocurría con *GZMA*, este es otro de los genes que permite cuantificar la actividad citolítica y la respuesta a la inmunoterapia con anti-CTLA4 y anti-PDL1 (118).

Conocer los perfiles inmunológicos, y los factores reguladores implicados en la progresión tumoral es uno de los puntos clave tanto para su control como para su prevención. La aparición de la inmunoterapia ha supuesto un hito en el tratamiento del cáncer de laringe, al igual que ha ocurrido en otras localizaciones. Sin embargo, existe poca información sobre las alteraciones presentes en las lesiones premalignas y menos aún sobre el impacto que podría tener la detección y el control de las mismas, por lo que resultan de gran interés los avances que puedan realizarse en este campo.

4. Tipos de mutaciones estudiadas

A nivel mutacional, existen diversos tipos de alteraciones según la consecuencia que produzca en la traducción a ARN mensajero y posteriormente, en los aminoácidos de la proteína resultante (utilizaremos la nomenclatura anglosajona para distinguir el tipo de mutación al que nos referimos debido al consenso que existe en el uso de la misma).

- Las mutaciones más frecuentes son las de tipo “intrónico”, localizadas en intrones, las regiones no codificantes genómicas, que no afectan al producto final al no afectar a los exones del ADN, (figura 9)

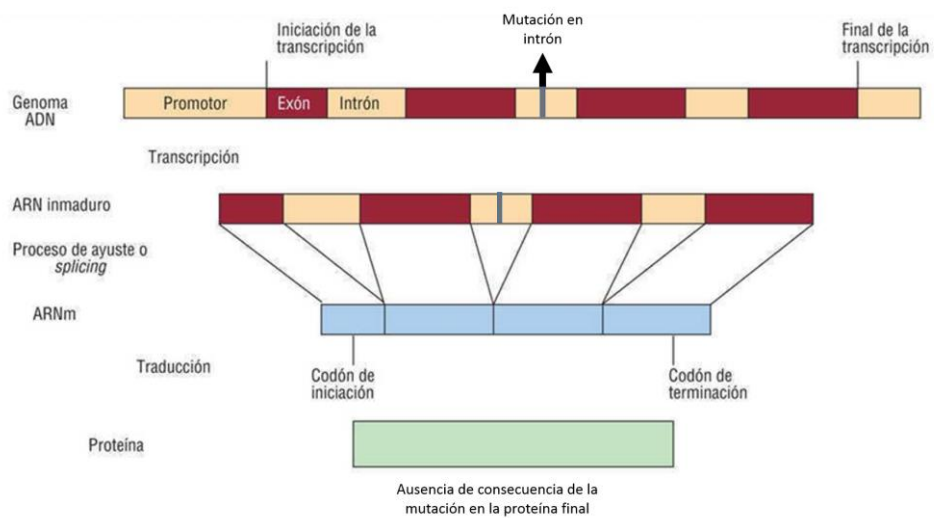
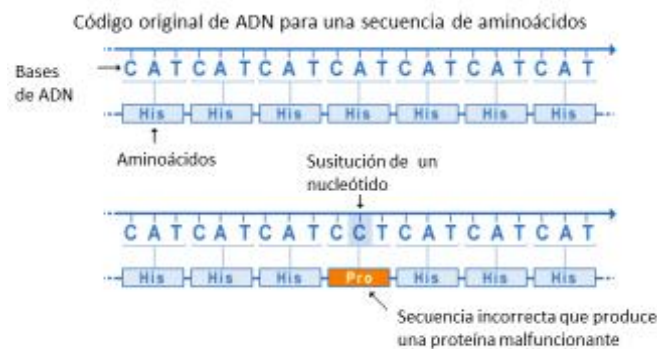


Figura 9. Representación una mutación intrónica, adaptada de Civeira et al. (119)

Las mutaciones que afectan a los exones, producen diversos cambios en la proteína resultante, dependiendo de la zona y forma a la que afecten a los mismos.

- Las de tipo “missense” o cambio de sentido, mutaciones puntuales no sinónimas en las cuales cambia un único nucleótido, provocando la aparición de un aminoácido distinto) son también muy frecuentes (figura 10).



U.S. National Library of Medicine

Figura 10. Adaptada y traducida de “la librería Nacional de Medicina de EEUU” representando una mutación “missense” (120).

- Otro tipo de mutaciones que suelen encontrarse son de tipo “splicing”, que produce un cambio de nucleótidos en una zona de “splicing” o empalme de ARN (figura 11).

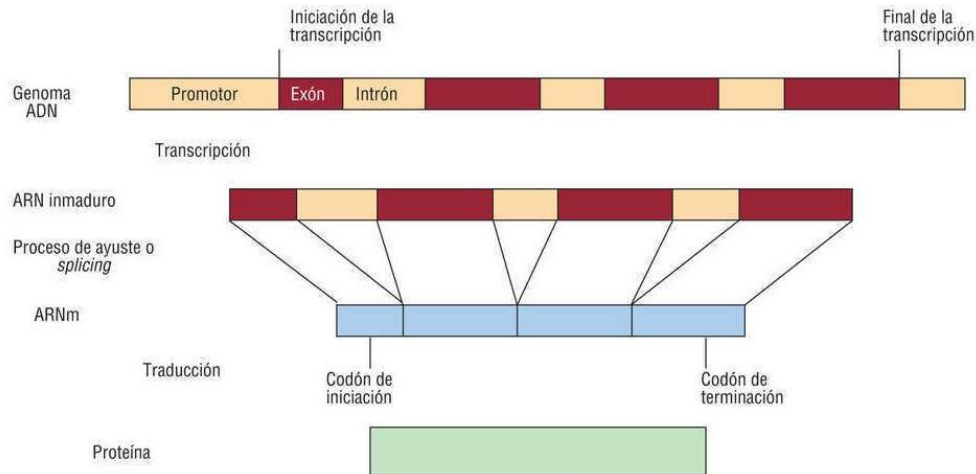


Figura 11. Representación una proceso de “splicing” tomada de Civeira et al. (119)

- De tipo “frameshift”, alteración que se produce por inserción o pérdida de pares de bases, produciendo un cambio de marco de lectura (figura 12).

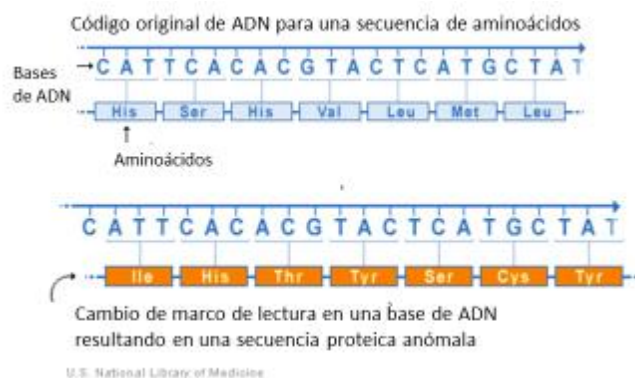


Figura 12. adaptada y traducida de “la librería Nacional de Medicina de EEUU” representando una mutación “frameshift” (120).

- “Stop codon gained or lost”, secuencia que resulta alterada por el cambio de una base de un codón y que ocasiona la ganancia o pérdida de un codón de terminación.
- “Variante 3’- y 5’- UTR”, correspondientes a las regiones sin traducción del ARN mensajero 3 prima y 5 prima.
- De tipo “inframe”, alteración que se produce por inserción o pérdida de pares de bases en múltiplos de 3, por lo que no afecta al marco de lectura.

- De tipo “start codon lost”, pérdida del codón de inicio de traducción por una variación en las bases del mismo.
- “Variante no codificante”, alteración en la región no codificante del gen.
- “Upstream and downstream gene variant”, alteraciones en regiones localizadas hasta 1kb del extremo 3 prima o 5 prima de un gen.

En la siguiente figura (figura 13), podemos visualizar mejor el tipo de alteración y la zona que se afecta en cada mutación.

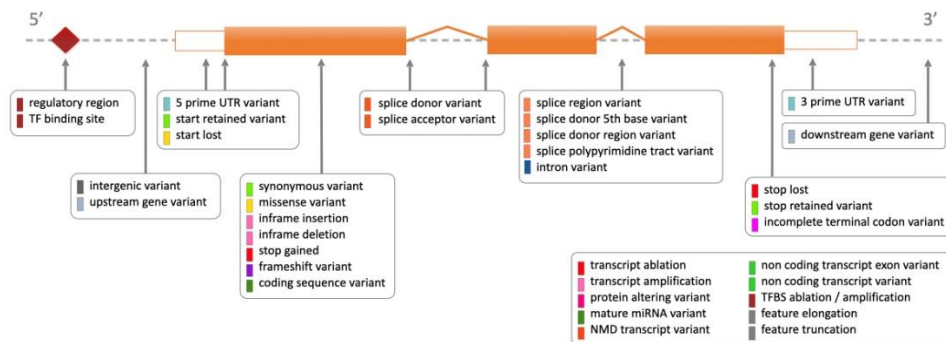


Figura 13. Localización de las mutaciones en la estructura de un gen modelo. Tomada de la página web Ensembl.org (121).

La posible variación a nivel de estructura tridimensional de la proteína puede conllevar una pérdida de todas las funciones de la misma, puesto que la conformación espacial de la proteína es fundamental para desarrollar su actividad sin percances.

JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACIÓN

El proceso de la carcinogénesis de los tumores de cabeza y cuello está aún en estudio. A diferencia de tumores de otras localizaciones, no se conoce cuál es el mapa de mutaciones habitual, ni existen marcadores que permitan reconocer las lesiones con mayor predisposición a malignizarse. Existen muy pocos trabajos que analicen cuál es el perfil mutacional de las lesiones premalignas laríngeas. Con este estudio, pretendemos colaborar a reconocer las mutaciones más frecuentes en las displasias laríngeas y discriminar las asociadas a un mayor riesgo carcinogénico.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

Existen perfiles moleculares o biomarcadores a nivel genético en las lesiones premalignas laríngeas que permiten discriminar a los pacientes con mayor riesgo de evolucionar a un cáncer de laringe y que podrían usarse en la práctica clínica en la prevención de la progresión a cáncer.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Principal:

Definir un perfil molecular de las lesiones premalignas de laringe, que distinga las lesiones con mayor potencial de evolución a cáncer de las de menor potencial.

2. Secundarios:

- 1) Encontrar un biomarcador específico que permita identificar qué lesiones premalignas de laringe van a evolucionar a cáncer.
- 2) Establecer un criterio de expresión de marcadores moleculares además del aspecto morfológico microscópico de la lesión que permita clasificar las displasias laríngeas según su potencial de malignización.
- 3) Identificar dianas terapéuticas que permitan prevenir el desarrollo de la enfermedad neoplásica a nivel de las cuerdas vocales sobre lesiones premalignas.
- 4) Crear una base racional de trabajo para futuros estudios o líneas de investigación.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material

Seleccionamos de la base de datos de nuestro servicio de ORL del Hospital Clínico San Carlos, pacientes diagnosticados entre el año 2007 y el año 2011 de laringitis crónica (leuco o eritroplásica) con diagnóstico anatomopatológico de displasia de diferente grado. Los pacientes habían sido valorados presentando como motivo de consulta disfonía de más de seis semanas de evolución.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico San Carlos.

Criterios de inclusión:

- Pacientes valorados y diagnosticados en nuestro centro
- Lesión procedente del epitelio de cuerdas vocales, bandas ventriculares o cara laríngea de epiglotis
- Presentar una lesión con diagnóstico anatomopatológico de displasia laríngea leve, moderada o severa
- Presentar seguimiento durante 5 años en revisiones sucesivas en nuestro centro.

Criterios de exclusión:

- Presentar lesión laríngea sin confirmación anatomopatológica de displasia
- Haber tenido un seguimiento inferior a los 5 años
- Ausencia de consentimiento informado para el estudio
- Muestra insuficiente para su estudio
- Haber sido diagnosticado previamente de carcinoma laríngeo

2. Diseño del estudio

Estudio descriptivo y analítico retrospectivo sobre una muestra de 64 pacientes, divididos en dos cohortes de pacientes, una que presentó evolución a cáncer (N=27) y otra que no evolucionó (N=37). Este estudio recoge los resultados de un Proyecto de Investigación

realizado en nuestro centro, financiado por la Asociación Española Contra el Cáncer, en la sección de Proyectos de Prevención.

Para el análisis mutacional, se incluyeron 50 displasias y se analizaron los genes *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *TP63*, *IRF6*, *TP53*, *CASP8*, *PTEN*, *PIK3CA*, *SYNE1*, *SYNE2*, *CDKN2A*, *RB1*, *RIPK4*, *DICER1*, mediante un panel de NGS (“Next Generation Sequencing”, técnica de secuenciación que permite la identificación de variantes y mutaciones en el exoma o genoma completo).

El análisis de los niveles de expresión de genes inmunoreguladores mediante qPCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real) se llevó a cabo en 64 displasias. Se analizaron los ARNm de los siguientes genes: *CXCL10*, *CTLA4*, *FOXP3*, *TIM3*, *HLA-DRA*, *PDL1*, *PD1*, *PDL2*, *TLR4*, *TLR7*, *VISTA*, *GZMA* y *PRF1*.

3. Métodos

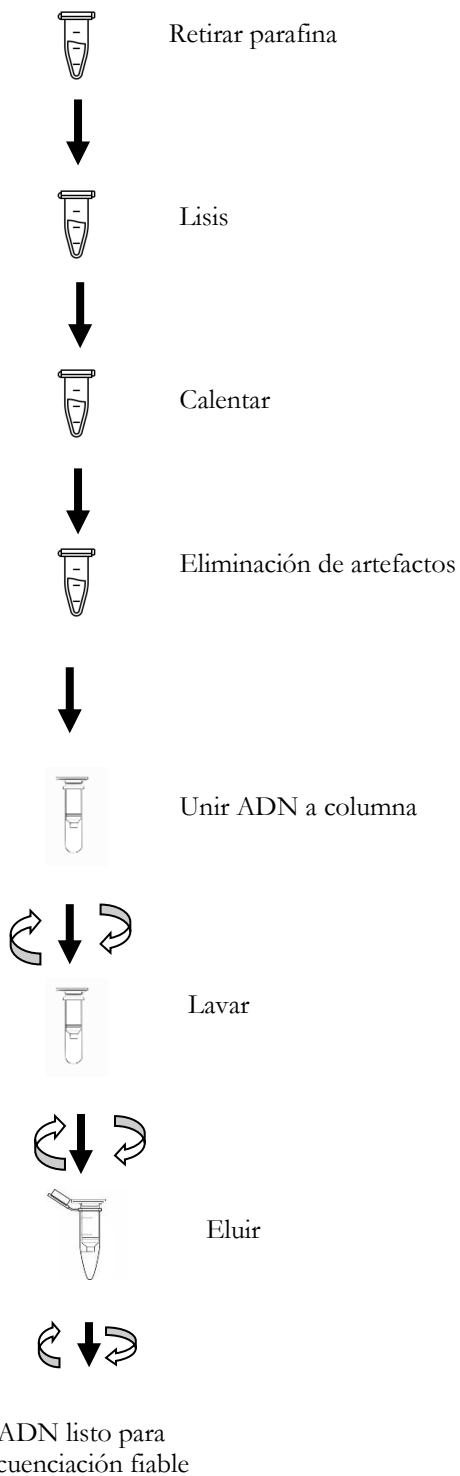
a. Extracción y purificación de ADN

Se obtuvieron cortes de 5 a 10 micrómetros de las muestras parafinadas de las distintas biopsias. A partir de los cortes, se realizó la extracción del ADN de las muestras mediante el Kit “GeneRead DNA FFPE” de Qiagen (esquema 1). Este kit permite la eliminación de la parafina y revertir los entrecruzamientos que se producen en las hebras de ADN debido a la fijación de las muestras con formalina. De esta forma, permite actuar a la enzima UNG sobre los residuos de citosinas deaminadas. Posteriormente, el ADN es capturado en una membrana donde se eliminan los contaminantes que puedan quedar mediante unos pasos de lavado para finalmente eluir el ADN.

Este kit está diseñado específicamente para la purificación del ADN genómico de tejidos parafinados fijados con formalina (FFPE), ya que esta forma de conservación de las muestras puede comprometer el estado y la calidad del ADN. Esto, unido a los largos periodos de almacenamiento a los que suelen dejarse las muestras, hace que se produzcan alteraciones moleculares, como la deaminación de las bases nitrogenadas de citosina a deoxiuracilo. Esto lleva a la conversión de citosina a timina en las reacciones de secuenciación y puede provocar problemas para la correcta traducción de la misma. Con este kit, es posible extraer altas cantidades de ADN a partir de muestras pequeñas y además incluye la eliminación de las citosinas desaminadas para prevenir resultados falsos en la secuenciación final.

En primer lugar, se legran las muestras imbuidas en la parafina, intentando retirar toda la parafina libre de tejido posible. Se añaden 160 µl de la Solución de Desparafinización, se agita durante 10 segundos, y se centrifuga brevemente hasta coleccionar la muestra en la base del tubo. Se introduce en un baño a 56°C durante 3 minutos para posteriormente enfriarse a temperatura ambiente. A continuación, se añaden 55 µl de agua libre de RNasas, 25 µl del Buffer FTB y 20 µl de proteinasa K. Después de agitar y centrifugar brevemente, se deja en el baño a 56°C entre 16 y 20 horas. Posteriormente, se incuba a 90°C durante una hora en un termobloque. Una vez cumplidos los tiempos de incubación, se transfiere la fase más inferior y clara, que es donde se encuentra el ADN, a un tubo nuevo. Se añaden 115 µl de agua libre de RNasas y se mezcla. Se añaden 35 µl de uracil-N-Glicosilasa a la muestra, se agita, y se incuba a 50°C durante una hora. Tras esto, se añaden 2 µl de la enzima RNasa A para eliminar la posible contaminación con ARN. Se mezcla y se incuba durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se añaden después 250 µl del Buffer AL, se mezclan y se añaden 250 µl de etanol absoluto. Se transfiere todo el lisado a la columna QIAamp MinElute y se centrifuga a 20,000xg durante 1 minuto. El ADN quedará unido a la membrana de la columna. Se desecha el filtrado y a continuación, se retiran los posibles contaminantes mediante varios lavados de la columna usando 500 µl del Buffer AW1 y 500 µl del Buffer AW2. Posteriormente, se añaden 250 µl de etanol absoluto, se centrifuga durante un minuto y se transfiere la columna a un tubo nuevo. Se centrifuga para retirar los líquidos residuales que puedan quedar, y se traslada la columna QIAamp MinElute a un tubo de microcentrifugación limpio. Por último, se aplican de 20 a 40 µl del Buffer ATE al centro de la membrana para eluir el ADN. Se incuba a temperatura ambiente 1 minuto y se centrifuga a 20,000xg otro minuto.

Esquema del procedimiento del kit GeneRead FFPE



Esquema 1. adaptado y traducido de “GeneRead™ DNA FFPE Handbook” de Qiagen.

La extracción del ARN se realizó usando la misma metodología de columnas mediante el kit “RNeasy FFPE Kit” de Qiagen. En vez del tratamiento con la enzima RNasa A, se han tratado con la enzima DNasa I para la eliminación de posible contaminación de ADN en la muestra.

b. Cuantificación de ácidos nucleicos

Antes de proceder a analizar el ADN extraído de las muestras, es necesario cuantificar la cantidad de ADN extraída de las mismas. Para cuantificarla, se usó el Fluorómetro Invitrogen Qubit 3.0. Debido a las técnicas que se van a utilizar para el análisis de ADN, es necesario tener una estimación lo más real posible de la cantidad de ADN en las muestras. Por ello, es necesario cuantificarlo fluorométricamente, y no a través de espectrometría con, por ejemplo, el Nanodrop, ya que éste posee una discriminación mucho menor en casos de escasez de muestra (<40ng/uL) y puede cuantificar contaminantes, sobreestimando la muestra. El fluorómetro de Qubit se basa en la utilización de fluoróforos que se intercalan específicamente entre las moléculas de interés, en este caso el ADN, y permite minimizar así los efectos de los contaminantes.

En el caso del ARN, no es necesario una medición tan precisa, así que fue cuantificado usando el Nanodrop.

c. Medición de la calidad de las muestras

Mediante el kit “TruSeq FFPE DNA Library Prep QC Kit” de Illumina, se determinó el estado de fragmentación y el potencial de amplificación del ADN extraído de las muestras parafinadas fijadas con formalina. Este kit utiliza un análisis de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real. Este resultado, más la cuantificación en Qubit serán usados para determinar la concentración de partida de ADN en la preparación de las librerías.

d. Diseño del panel mediante “Illumina Design Studio”

Para poder analizar los genes correctamente, se diseñaron los cebadores para cubrir todas las regiones de interés mediante el programa online “Illumina Design Studio”. Se estableció un tamaño de amplicón menor de 175 pares de bases, debido a que el ADN que se va a evaluar ha sido extraído de parafina, y por tanto estará fragmentado.

Fueron necesarios 1254 amplicones para cubrir todas las regiones a analizar, proporcionando una cobertura total del 99%.

e. Realización de las librerías usando el TruSeq Custom Amplicon Low Input Library Prep

Llevamos a cabo el análisis mutacional de los genes seleccionados utilizando un panel personalizado y generando las librerías usando el kit “Truseq Custom Aplicon Low Input Library Prep Kit” de la compañía Illumina.

Consiste en un protocolo multiplex basado en PCR en el que se generan un conjunto de amplicones que cubren específicamente el ADN en todas las regiones que queremos estudiar. Se realiza una librería por muestra y se identifica con una combinación específica de nucleótidos llamados “index” para cada muestra. Estos index permiten identificar que amplicones provienen de cada muestra. La generación de librerías consta de los siguientes pasos:

- Cuantificación y dilución del ADN. Utilizando el método fluorométrico Qubit, y el Qc kit (apartado c) analizando la calidad y cantidad de partida para cada muestra, se diluyeron hasta una concentración apropiada para este protocolo (10-100ng).
- Selección y amplificación de las regiones de interés mediante Hibridación al ADN de la mezcla de cebadores diseñados específicamente para nuestros amplicones de interés. Estos cebadores están delimitados por secuencias requeridas en el paso de amplificación.
- Eliminación de los cebadores que no se han unido al ADN mediante esferas magnéticas que retienen el ADN (“Sample Purification Beads”), las cuales fueron lavadas tres veces con etanol al 80% para asegurarse la eliminación total de los cebadores no unidos.
- Extensión desde los cebadores a través de toda la región diana usando una ADN polimerasa, y unión al extremo 5' del oligo “downstream” usando una ADN ligasa. De este modo se generan todos los amplicones de interés, los cuales además tienen los extremos adaptados para el paso posterior (figura 14).

- Amplificación de los amplicones producidos en el paso de extensión-ligación. Se unen los adaptadores i5 e i7 a los extremos de los amplicones (figura 15). Estos adaptadores están formados por 3 regiones:
 - a) P5 o P7 (necesarios para la unión a la celda de flujo en el proceso de secuenciación)
 - b) “Index”, secuencias únicas de 6 nucleótidos que sirven para la identificación de la muestra
 - c) secuencia cebadora para la reacción de secuenciación.

Después de la amplificación, se purifican los productos eliminando otros componentes de la reacción mediante esferas magnéticas (“Sample Purification Beads”).

- Estimación de la calidad mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%. Banda de 280-310 pb en base al tamaño medio de los amplicones más los adaptadores.
- Normalización de la cantidad de cada librería para que exista una representación balanceada de todas en la mezcla final que se secuenciará mediante esferas magnéticas (“Library Normalization Beads 1”).
- Combinación de todas las librerías mezclando volúmenes iguales de cada librería.

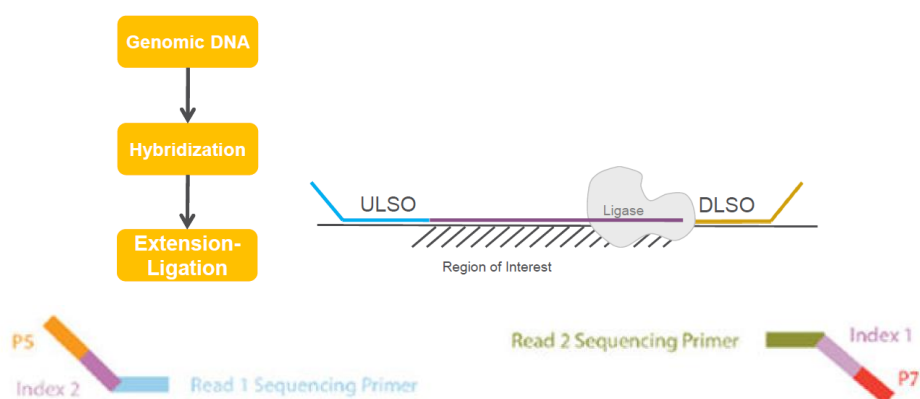


Figura 14. Representación obtenida del grupo Illumina del proceso de extensión-ligación. Imagen usada bajo licencia de Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

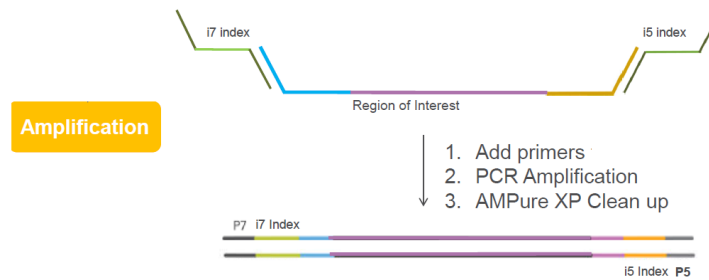


Figura 15. Representación del grupo Illumina, Inc. Del proceso de amplificación. Imagen usada bajo licencia de Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

f. Secuenciación mediante MiSeq clustering y sequencing

Esta metodología se caracteriza por el uso de nucleótidos marcados con fluoróforos que bloquean de forma reversible la elongación de la cadena. De este modo, tras la detección e incorporación del fluoróforo y la eliminación del mismo, es posible continuar con un nuevo ciclo de adición de un nuevo nucleótido, conocido como secuenciación por síntesis. Una cámara recoge la fluorescencia en los nucleótidos y determina qué nucleótido se encuentra en qué posición.

El procedimiento comienza tras la mezcla de las librerías del paso anterior, diluyendo la librería total a 1:40 y desnaturalizándola mediante temperatura (98°C durante 2 minutos, e inmediatamente después colocándola en hielo durante 5 minutos). Para poder poseer un control de calidad del proceso de la secuenciación, se añade un 1% de ADN del bacteriófago PhiX (12.5pM). Se transfieren 600 µl a un cartucho de MiSeq v2 300 ciclos, que permite una longitud de lectura de 2x150 pb. La secuenciación se realizó en la plataforma de secuenciación MiSeq System (Illumina). En esta plataforma se realizan 3 pasos:

- Generación de grupos. Los amplicones de la librería total se fijan en la superficie de la celda de flujo mediante complementariedad de sus extremos P5 y P7. Mediante amplificación en puente se generan grupos para cada amplicón. Esto permite amplificar la señal de fluorescencia de cada posición (figura 16).

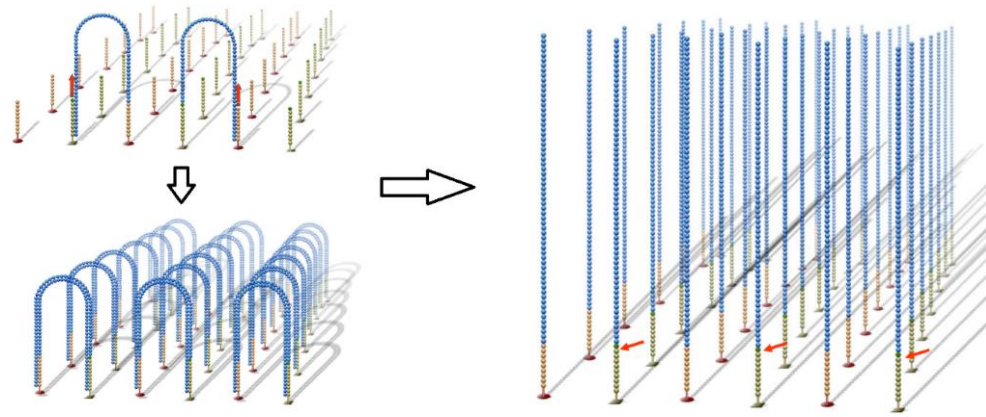


Figura 16. Representación tomada del grupo Illumina, Inc. De la generación de grupos. Imagen usada bajo licencia de Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

- Secuenciación paired-end (151 ciclos x2). Basada en dNTPs modificados unidos a terminadores reversibles conteniendo colorantes fluorescentes. Esto permite secuenciar a gran escala detectando bases individuales. En cada ciclo se añaden los 4 dNTPs-terminadores, por lo que la competencia natural minimiza la tendencia a la incorporación. Los colorantes fluorescentes de los terminadores se fotografían con la adición de cada dNTP y, a continuación, se eliminan para permitir la incorporación de la siguiente base (figuras 17-19).

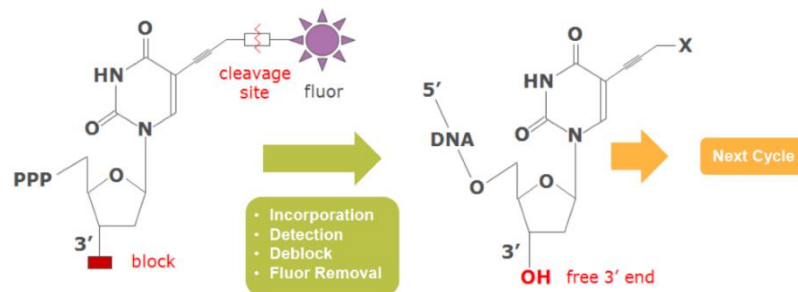


Figura 17. Representación del grupo Illumina, Inc. De la reacción de terminación reversible. Imagen usada bajo licencia de Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

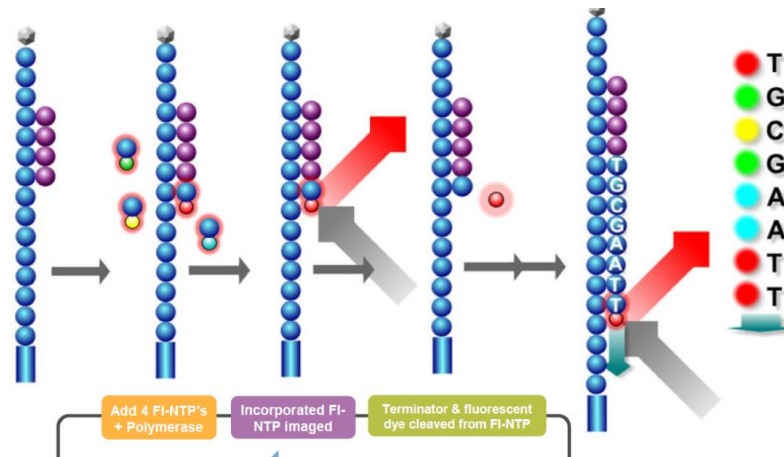


Figura 18. Representación del grupo Illumina, Inc. De la secuenciación por síntesis. Imagen usada bajo licencia de Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

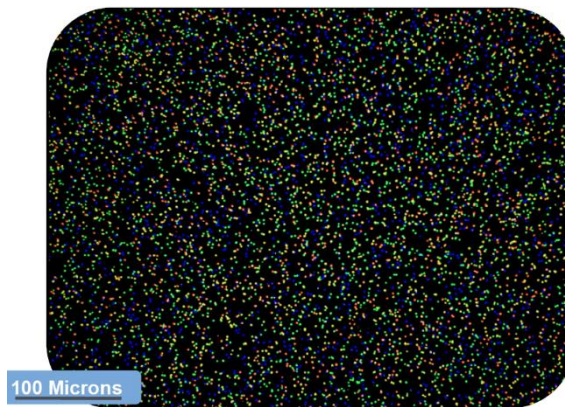


Figura 19. Representación del grupo Illumina, Inc. De los clusters. Imagen usada bajo licencia de Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

- Primeros pasos del análisis de datos. Las llamadas de base se efectúan a partir de la intensidad de señal en todos los ciclos. El resultado final es una secuenciación base por base precisa. En el MiSeq System está integrado los primeros pasos para el análisis de los datos brutos de secuenciación: “*trimming*” (eliminación de todas aquellas secuencias que no interesan como índice y dímeros de cebadores), identificación de las muestras, alineamiento (archivos BAM) e identificación de variantes frente a un genoma humano de referencia, en nuestro caso, el GR (h37) para identificar alteraciones.

Para identificar y clasificar las variantes detectadas, usamos el software VariantStudio (Illumina), dando información relevante de las mismas como, por ejemplo, si las alteraciones se encontraban descritas en “ClinVar” (NCBI), realizando una clasificación según varios programas *in silico* de patogenicidad, la frecuencia detectada en población sana, etc. La

visualización de secuencias se realizó con el visualizador IGV (“Integrative Genomics Viewer”).

Las variantes que se detectaron fueron sometidas a un primer filtrado, en función de:

- Calidad. El propio MiSeq System establece un filtro de calidad.
- Localización. Se seleccionarán las variantes situadas en la zona codificante o a 15 nucleótidos de distancia del extremo del exón, las cuales podrían afectar al splicing.
- Profundidad. Sólo se tendrán en cuenta aquellas variantes con más de 500 lecturas en esa posición.
- Biotipos de la variante: se seleccionarán variantes de sentido erróneo, sin sentido e inserciones y deleciones (cambios en el marco de lectura), descartándose las variantes sinónimas.
- Frecuencia de la variante descrita en las bases de datos públicas en población sana: ExAC (“Exome Aggregation Consortium”) y EVS (“ExomeVariant Server”). Se descartarán aquellas variantes con una frecuencia alélica mayor del 1% en la población sana.
- Frecuencia del alelo mutado mayor del 4% para evitar falsos positivos debidos a errores de la polimerasa.

g. Análisis de datos con FASTQ y VCF

Estos archivos son formato de texto que contiene las secuencias de nucleótidos y sus correspondientes puntuaciones de calidad (“Phred quality score”), el procesamiento de datos que realiza el propio MiSeq, genera los archivos FASTQ (formato de archivo). Tanto la letra de secuencia como la calificación están codificadas mediante un único carácter del sistema de codificación electrónica ASCII (figura 20). Consideramos válidos los valores con $Q > 30$.

ASCII_BASE=33 Illumina, Ion Torrent, PacBio and Sanger											
Q	P_error	ASCII	Q	P_error	ASCII	Q	P_error	ASCII	Q	P_error	ASCII
0	1.00000	33 !	11	0.07943	44 ,	22	0.00631	55 7	33	0.00050	66 B
1	0.79433	34 "	12	0.06310	45 -	23	0.00501	56 8	34	0.00040	67 C
2	0.63096	35 #	13	0.05012	46 .	24	0.00398	57 9	35	0.00032	68 D
3	0.50119	36 \$	14	0.03981	47 /	25	0.00316	58 :	36	0.00025	69 E
4	0.39811	37 %	15	0.03162	48 0	26	0.00251	59 ;	37	0.00020	70 F
5	0.31623	38 &	16	0.02512	49 1	27	0.00200	60 <	38	0.00016	71 G
6	0.25119	39 '	17	0.01995	50 2	28	0.00158	61 =	39	0.00013	72 H
7	0.19953	40 (18	0.01585	51 3	29	0.00126	62 >	40	0.00010	73 I
8	0.15849	41)	19	0.01259	52 4	30	0.00100	63 ?	41	0.00008	74 J
9	0.12589	42 *	20	0.01000	53 5	31	0.00079	64 @	42	0.00006	75 K
10	0.10000	43 +	21	0.00794	54 6	32	0.00063	65 A			

ASCII_BASE=64 Old Illumina											
Q	P_error	ASCII	Q	P_error	ASCII	Q	P_error	ASCII	Q	P_error	ASCII
0	1.00000	64 @	11	0.07943	75 K	22	0.00631	86 V	33	0.00050	97 a
1	0.79433	65 A	12	0.06310	76 L	23	0.00501	87 W	34	0.00040	98 b
2	0.63096	66 B	13	0.05012	77 M	24	0.00398	88 X	35	0.00032	99 c
3	0.50119	67 C	14	0.03981	78 N	25	0.00316	89 Y	36	0.00025	100 d
4	0.39811	68 D	15	0.03162	79 O	26	0.00251	90 Z	37	0.00020	101 e
5	0.31623	69 E	16	0.02512	80 P	27	0.00200	91 [38	0.00016	102 f
6	0.25119	70 F	17	0.01995	81 Q	28	0.00158	92 \	39	0.00013	103 g
7	0.19953	71 G	18	0.01585	82 R	29	0.00126	93]	40	0.00010	104 h
8	0.15849	72 H	19	0.01259	83 S	30	0.00100	94 ^	41	0.00008	105 i
9	0.12589	73 I	20	0.01000	84 T	31	0.00079	95 _	42	0.00006	106 j
10	0.10000	74 J	21	0.00794	85 U	32	0.00063	96 `			

Figura 20. Tabla del Phred Quality Score con el sistema de codificación electrónica ASCII. Tomada del manual de usuario de Illumina.

El VCF es otro formato de texto que contiene información sobre las variantes que se encuentran en posiciones específicas al compararlo a un genoma de referencia.

h. Análisis de predicción

Se realizará la predicción de todas las alteraciones en la función de la proteína mediante programas *in silico*: PolyPhen (“Polymorphism Phenotyping”), SIFT (“Sorts Intolerant From Tolerant”) y FATHH-MKL.

Predicción de alteración en el proceso de “splicing” mediante HSF (“Human Splicing Finder”) en el caso de las alteraciones en regiones de “splicing”.

La selección final la realizamos utilizando la base de datos “ClinVar” analizando las variantes con probabilidad patogénica. Las alteraciones “cambio de marco de lectura” y “codón de inicio o fin” se consideraron patogénicas ya que son mutaciones que provocan alteraciones en la proteína resultante.

i. Síntesis de ADN complementario (ADNc) por RT-PCR y extracción del ARN

Empleando el kit PrimeScript RT-PCR (TaKaRaBio, Clontech, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante, realizamos la síntesis del ADNc a partir del ARN total (1 µl), utilizando hexámeros aleatorios y Oligo dT como iniciadores de la síntesis.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp PCR system 2720 (LifeTechnologies) mediante el programa: extensión de 15' a 37°C, seguido de inactivación de la retrotranscriptasa a 85°C durante 10”.

j. Análisis de la expresión de genes inmunorreguladores

Se evaluaron los niveles de expresión a partir del ADNc mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Se utilizaron sondas TaqMan (ThermoFisher Sci) para amplificar específicamente región codificante de cada gen estudiado (*CXCL9*, *STAT3*, *IDO1*, *CXCL10*, *CTLA4*, *FOXP3*, *TIM3*, *INFG*, *HLA-DR4*, *PDL1*, *PD1*, *PDL2*, *GZMA*, *TLR4*, *TLR7*, *VISTA* y *B-ACTINA*), así como cebadores directo y reverso situados en exones diferentes para poder discriminar posibles contaminaciones de ADN por tamaño de amplicon. Se realizó la PCR cuantitativa utilizando el kit “TaqMan Fast Advanced Master Mix” (ThermoFisher Sci) y el termociclador Light Cycler®96 (Roche), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los resultados se analizaron con el software LightCycler® 96 SW 1.

k. Análisis estadístico

Los datos se analizaron con IBM SPSS Statistics 247.0.1.0. Comenzamos con el análisis de variables cualitativas frente a cuantitativas, se emplearon las pruebas no paramétricas U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis según el número de grupos de la variable cualitativa (2 y 3 o más, respectivamente). A continuación, se establecieron puntos de corte para la expresión de cada gen estudiado, categorizando así cada variable en niveles bajos y altos de expresión. Los puntos de cortes usados fueron establecidos mediante los índices de Youden ((llamado J, cuya fórmula es $J = \text{Sensibilidad} + \text{Especificidad} - 1$). Realizando las curvas ROC (usando como poblaciones con evolución y sin evolución), se obtuvieron los valores de sensibilidad y especificidad para cada punto. Con dichos valores, se calcularon los índices de Youden, seleccionando los puntos de corte más específicos y sensibles para la expresión de cada gen. Se analizó la asociación entre los niveles de expresión génica dicotomizados y la evolución o no a cáncer, además del grado de displasia mediante la prueba Chi cuadrado (χ^2).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Características de la población de estudio

Se reclutaron 64 pacientes con displasia de laringe para realizar un análisis comparativo, subdividiéndolos en dos grupos según la progresión durante el seguimiento a carcinoma. Debido a la mala calidad de la muestra anatomopatológica de algunos casos tras realizar el estudio bioquímico, el tamaño de cada población se redujo a 17 pacientes que evolucionaron a cáncer y 33 que no presentaron progresión (tabla 3). La media de edad de nuestra población fue de 67,3 años. Sólo 2 pacientes carecían de antecedente de tabaquismo (ambos pertenecientes al grupo sin evolución, gráfico 2). Del total, 8 tenían antecedente de enolismo (4% de los pacientes sin evolución, 31% de los pacientes con evolución, gráfico 4), 20 poseían otras comorbilidades (siendo las más frecuentes la hipertensión arterial, diabetes mellitus tipo II y EPOC, gráfico 3). Catorce eran mujeres (el 15 % de los pacientes con evolución, 26% de los pacientes sin evolución, gráfico 1) y 50 varones. El 18,3% % presentaron tumores en otras localizaciones durante el seguimiento, incluyendo tumores uroteliales pulmonares, de próstata y mama como los más frecuentes, un caso de melanoma y otro de papilar de tiroides. La media de evolución desde el momento del diagnóstico de la displasia hasta el diagnóstico de tumor en los pacientes que progresaron, fue de 0.95 años. En la siguiente tabla (tabla 3), se muestra la división de evolución según el grado de displasia presentado en el momento del diagnóstico.

Evolución a cáncer	No	Sí	Total de pacientes
Displasias de bajo grado	26	8	34
Displasias de alto grado	7	9	16
Total	33	17	50

Tabla 3. Distribución de grados de displasia según la evolución a cáncer.

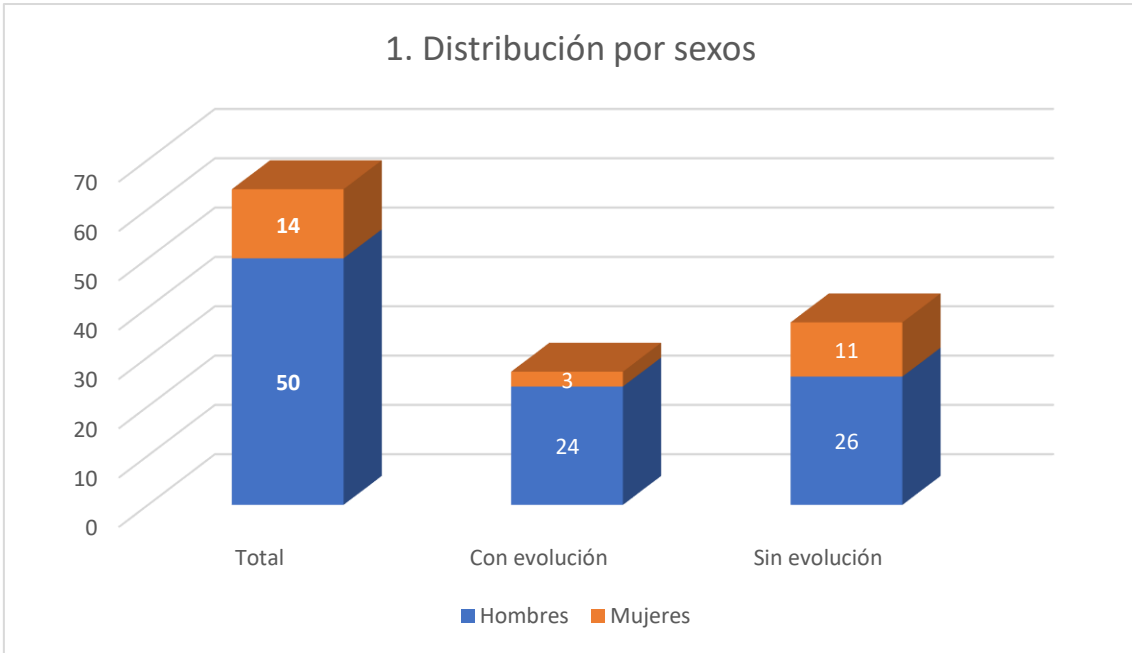


Gráfico 1. Representación de la distribución por sexos.



Gráfico 2. Representación del antecedente de tabaquismo.

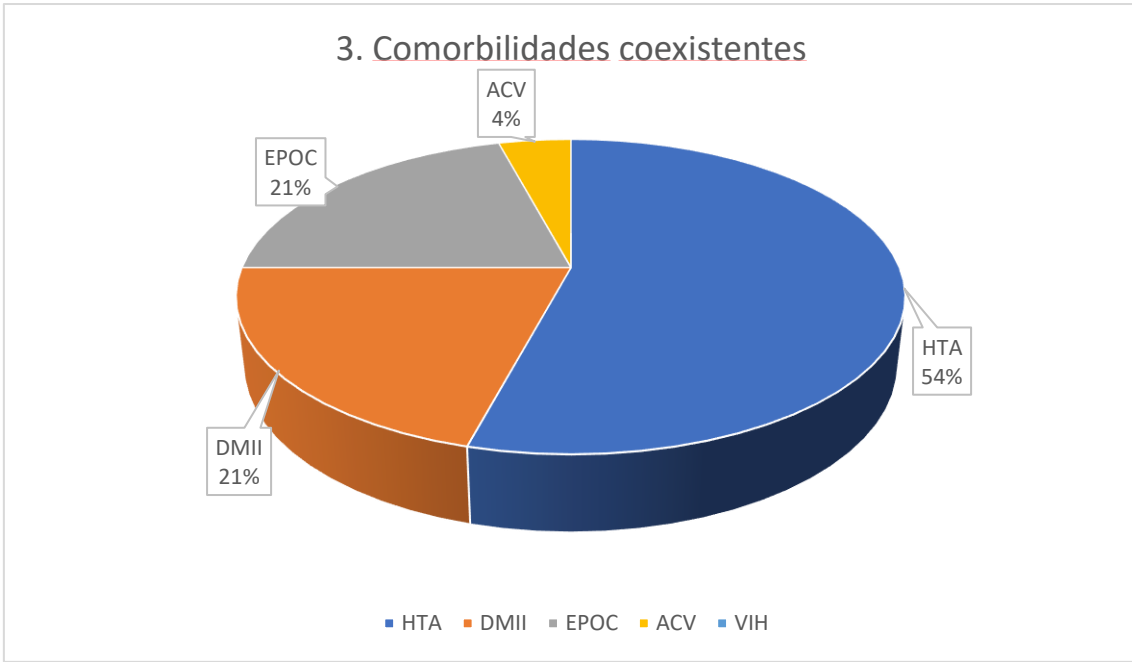


Gráfico 3. Representación de las comorbilidades presentadas por los pacientes.

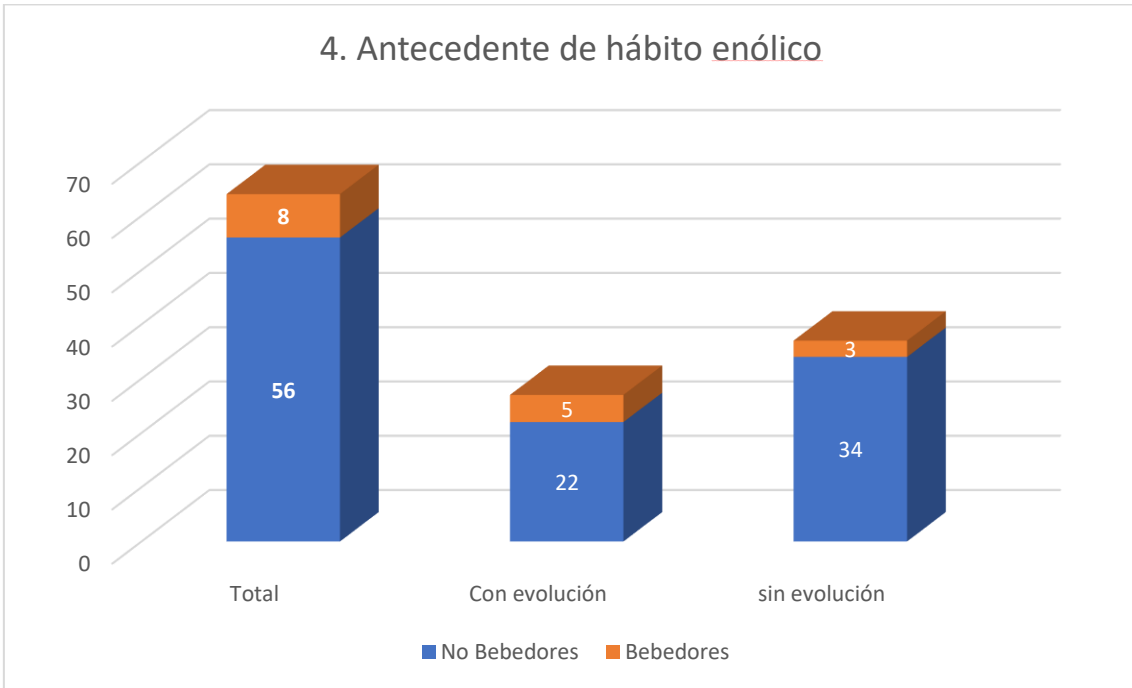


Gráfico 4. Representación de las comorbilidades presentadas por los pacientes.

2. Perfil mutacional de las displasias de laringe

Se analizó el perfil mutacional de los genes *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *TP63*, *IRF6*, *TP53*, *CASP8*, *PTEN*, *PIK3CA*, *SYNE1*, *SYNE2*, *CDKN2A*, *RB1*, *RIPK4*, *DICER1*, en el ADN extraído de 50 muestras de displasias mediante secuenciación de tercera generación. Se identificaron un total de 124.759 alteraciones. Aunque en la extracción del ADN se incluyó un paso para la eliminación de deaminaciones producidas por la parafina, existe la posibilidad de detectar alteraciones debidas a este proceso que podrían dar falsos positivos como resultado. Por ese motivo, se analizaron las dos hebras de ADN. De este modo, sólo aquellos cambios de citosina por timina detectados en ambas hebras eran considerados como verdaderos. Tras la desestimación de cambios detectados sólo en una hebra, se redujo el número de alteraciones detectadas a 116.731. También se desestimaron las mutaciones sinónimas (cuya alteración no produce un cambio de aminoácido en la proteína resultante), las variantes “stop retained” (en las que cambia una base correspondiente a la secuencia del codón de terminación, pero se mantiene la terminación) y las mutaciones halladas en una proporción mayor del 1% en población sana (por considerarlas variantes que no afectan a la función de la proteína). Además, se eliminaron aquellas alteraciones con menos de 10 lecturas de profundidad o mala calidad (filtros proporcionados en el análisis secundario Realizado en el miSeq), y las variantes detectadas en regiones con menos de 20 lecturas totales, reduciendo el número total a 78.001. En la siguiente tabla (tabla 4), se muestra el número de alteraciones halladas en cada gen.

Gen	Nº de alteraciones
CASP8	1505
CDKN2A	942
DICER1	4959
IRF6	1465
NOTCH1	6583
NOTCH2	7132
NOTCH3	6672
PIK3CA	2906
PTEN	1034
RB1	3049
RIPK4	2121
SYNE1	23532
SYNE2	17789
TP53	2048
TP63	2847

Tabla 4. Número de alteraciones halladas en cada gen.

3. Análisis del perfil mutacional en función de la evolución de las displasias de laringe

A continuación, se evaluó la distribución de las alteraciones respecto a la población a la que pertenecían, encontrando 6139 presentes en ambos grupos, 11573 presentes únicamente en la población con displasias que evolucionaron a cáncer y 40460 presentes sólo en la población sin evolución (gráficos 5 y 6, tablas 4 y 5).

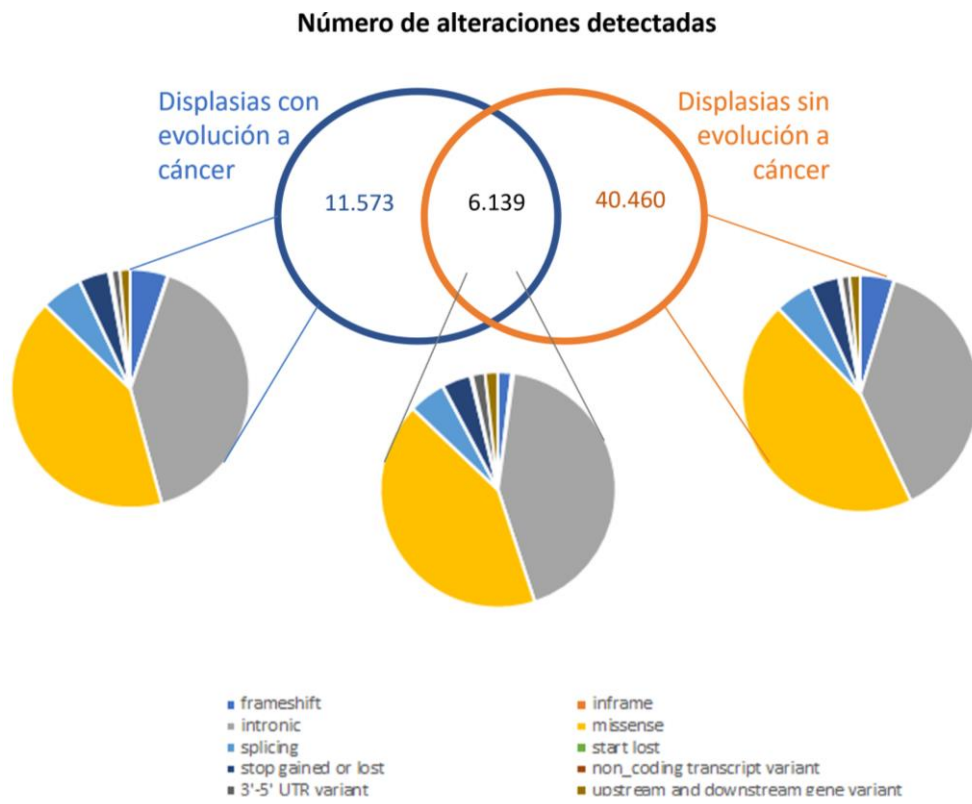


Gráfico 5. Distribución del tipo de alteraciones encontradas según cada población.

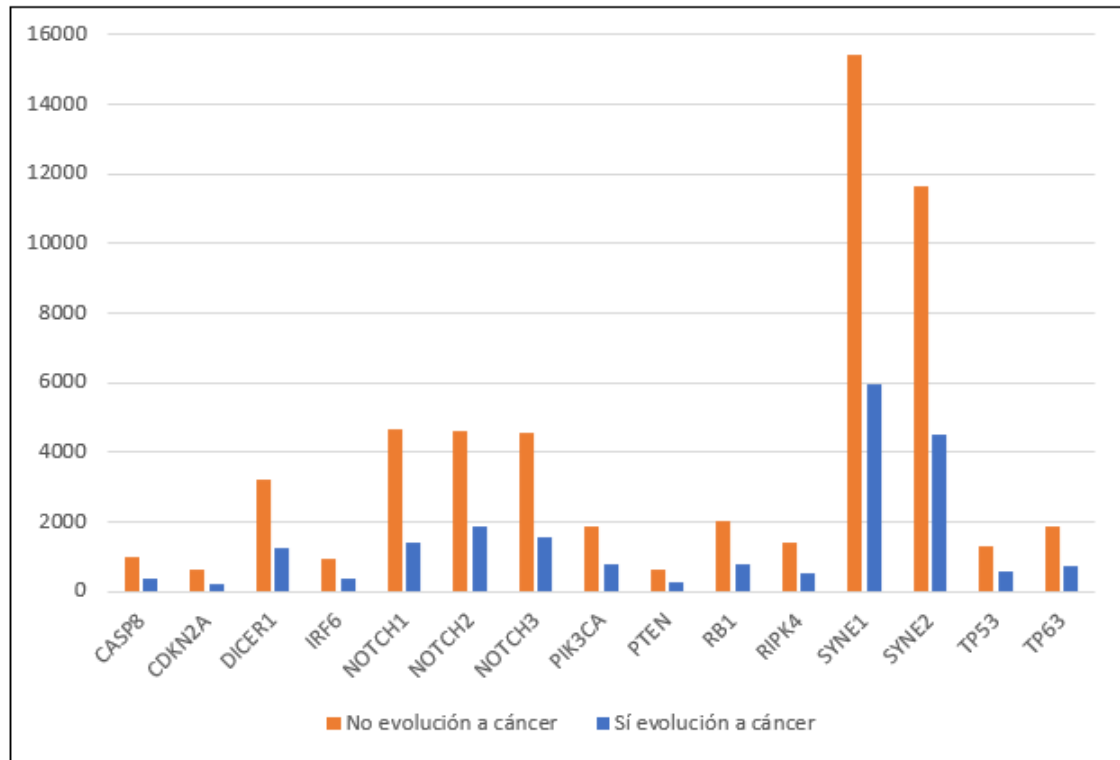


Gráfico 6. Distribución de alteraciones según cada población en cada gen.

Evolución	CASP8	CDKN2A	DICER1	IRF6	NOTCH1	NOTCH2	NOTCH3	PIK3CA
Sin	983	641	3223	958	4651	4622	4554	1852
Con	377	212	1276	368	1406	1879	1561	780

Evolución	PTEN	RB1	RIPK4	SYNE1	SYNE2	TP53	TP63	Total
Sin	647	2006	1424	15420	11661	1316	1870	55828
Con	266	784	510	5952	4489	557	730	21147

Tablas 4 y 5. Distribución de alteraciones según cada población en cada gen.

Al tratarse de poblaciones con una diferencia de tamaño muestral significativa, se dividió el número de alteraciones según la N total de cada población, con el fin representar la frecuencia de las alteraciones de una manera más real (gráfico 7, tablas 6 y 7).

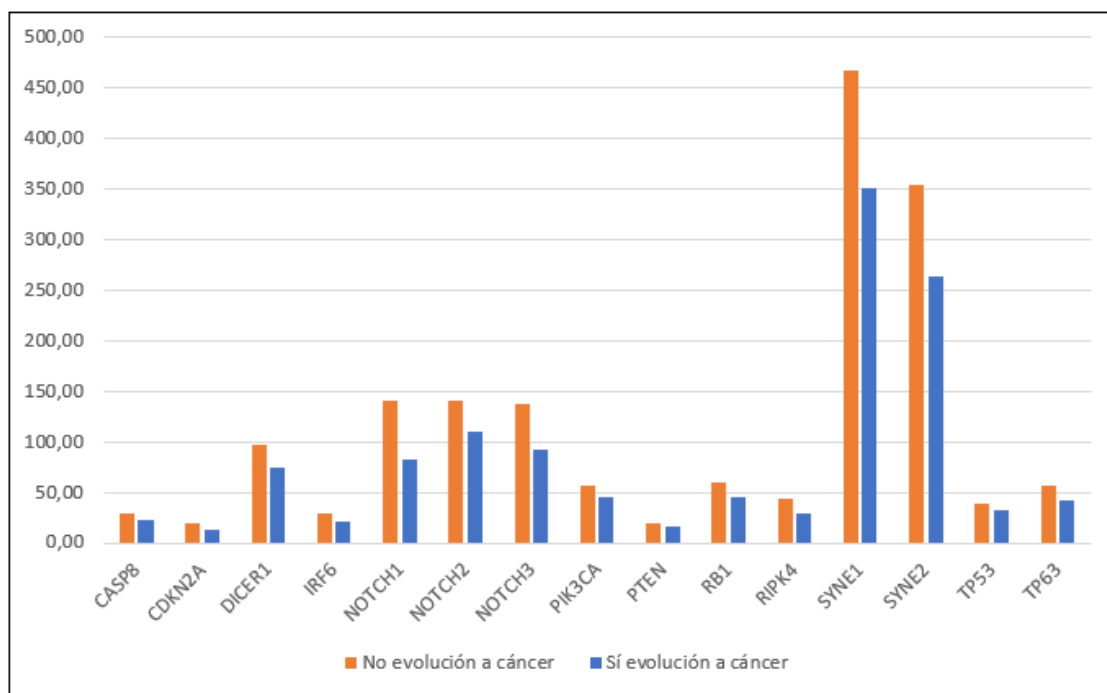


Gráfico 7. Distribución de la media de alteraciones según cada población en cada gen.

Evolución	CASP8	CDKN2A	DICER1	IRF6	NOTCH1	NOTCH2	NOTCH3	PIK3CA
Sin	29,79	19,42	97,67	29,03	140,94	140,06	138	56,12
Con	22,18	12,47	75,06	21,65	82,71	110,53	91,82	45,88

Evolución	PTEN	RB1	RIPK4	SYNE1	SYNE2	TP53	TP63	Total
Sin	19,61	60,79	43,15	467,27	353,36	39,88	56,67	1691,76
Con	15,65	46,12	30	350,12	264,06	32,76	42,94	1243,94

Tablas 6 y 7. Distribución de la media de alteraciones según cada población en cada gen.

4. Identificación de alteraciones afectando a la función de la proteína en los genes evaluados

La importancia de las alteraciones en la secuencia de los genes se debe a su efecto en la secuencia de la proteína, afectando a su función. Así, se pueden detectar alteraciones en un gen que no impliquen ningún cambio en la función de la proteína. Dichas alteraciones no tienen valor clínico. Por este motivo, de las alteraciones detectadas en nuestra serie de pacientes se evaluaron cuáles de ellas producían un cambio en la función de la proteína. Para ello, se estudió la información existente de todas las alteraciones detectadas en la base de datos ClinVar. Además, todas las mutaciones tipo “frameshift” y “stop/start codón” fueron consideradas como probablemente patogénicas debido a su alta capacidad de afectar a la estructura final de la proteína. De esta manera, se identificaron 7.118 alteraciones que probablemente afectan a la función de la proteína de los 15 genes evaluados, de las cuales

2483 se encontraban en la población que presentó evolución de la displasia a carcinoma y 4635 en la población sin evolución (tabla 8 y 9, gráficos 8 y 9).

Genes	Probablemente patogénicas	Patogénicas	Patogénicas/ P. Patogénicas	Significado Incierto	Total alteraciones
CASP8					46
CDKN2A	1				3
DICER1	1	11			144
IRF6		4	2		31
NOTCH1		3	1		112
NOTCH2	1	8	2		190
NOTCH3		12			147
PIK3CA	5	6	2	1	123
PTEN	4	10	2		39
RB1	1	19			63
RIPK4					43
SYNE1	6	11		1	777
SYNE2	1			1	616
TP53	8	25	4		63
TP63	3	9			86
Total genes	31	118	13	3	2483

Tabla 8. Alteraciones patogénicas detectadas en cada gen en la población con evolución a cáncer.

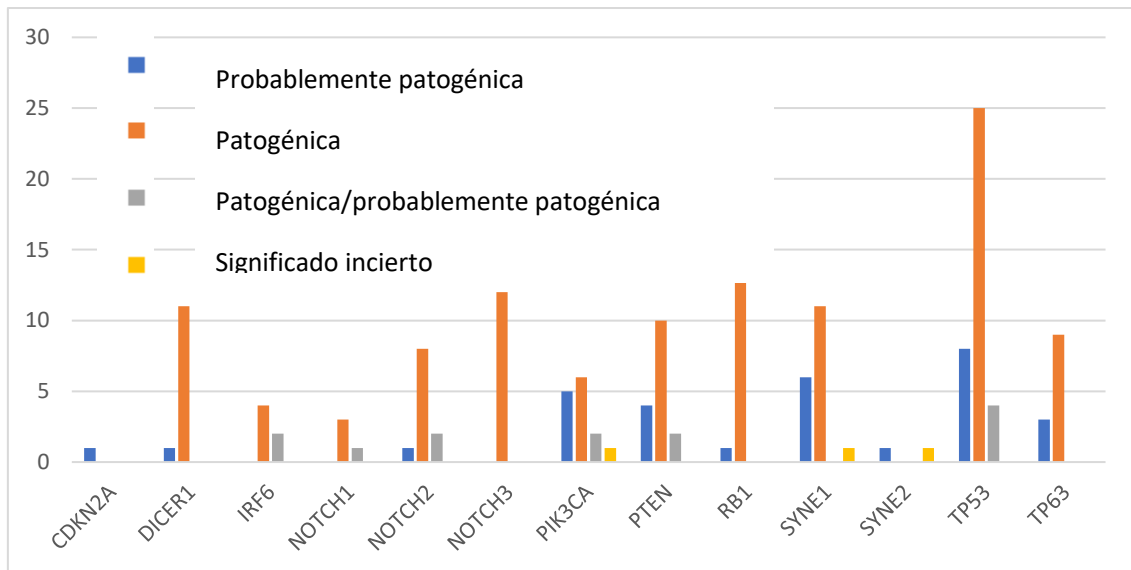


Gráfico 8. Representación de las alteraciones patogénicas detectadas en cada gen en la población sin evolución a cáncer.

Genes	Probablemente Patogénicas	Patogénicas	Patogénica/P. Patogénicas	Significado Incierto	Total alteraciones
CASP8					76
CDKN2A	1				7
DICER1	2	31		1	269
IRF6	4	4			62
NOTCH1	8	13	1	2	252
NOTCH2		12	1		347
NOTCH3	9	24	7		379
PIK3CA	10	9	7		199
PTEN	10	22			60
RB1		32			108
RIPK4		2			100
SYNE1	8	15		1	1392
SYNE2	3			2	1147
TP53	11	38	17	1	117
TP63	7	15			120
Total genes	73	217	33	7	4635

Tabla 9. Resumen de las alteraciones patogénicas detectadas en cada gen en la población sin evolución a cáncer.

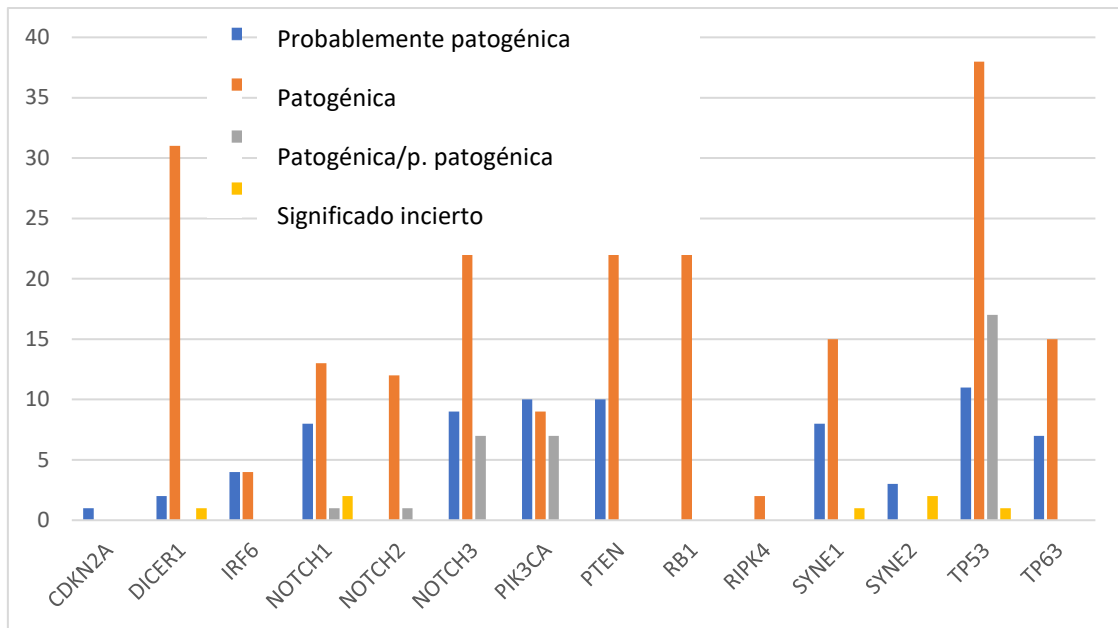


Gráfico 9. Número de alteraciones por pacientes en la población con evolución a cáncer.

Como se ha expuesto anteriormente, el número de casos estudiados en cada población estudiada es diferente. Por tanto, a continuación, se detalla la media de alteraciones detectada en cada gen para cada población (tablas 10 y 11, gráficas 10 y 11):

Pacientes	Probablemente patogénicas	Patogénicas	Patogénicas / P. Patogénicas	Significado incierto	Total general
13599A	2	2	1		107
17020A	11	22	2		450
2324A					3
2531					4
8618A	1				4
19700B	1	9	1		198
12003C	2	2			94
12120C		5			34
14735C	1	12	1		262
17505C	3	7	3	1	155
17798C	3	5	1		126
18321C	2	17	1		419
21990C					1
1668D		1			16
16233E	2	6		1	204
16244E	1	12	1		76
20662E	2	16	2	1	315
4290C		2			15
Total general	31	118	13	3	2483

Tabla 10. Número de alteraciones por pacientes en la población sin evolución a cáncer.

Pacientes	Probablemente Patogénicas	Patogénicas	Patogénicas/P. patogénicas	Significado incierto	Total general
A12097	1	6			7
A13112	2	3	2		7
A14047	1	13			14
A1980	2	8	1		11
A22178	1	2	2		5
A22697		1			1
A442	1	5			6
A9677	1	6	5	1	13
B13576	8	20	1		29
B15491	6	9	3		18
B18148	3	2			5
B21252			1		1
C11996	3	2	1	1	7
C14336	1	6	2		9
C14339	3	7			10
C23420	1	10			11
C23701	3	16		2	21
C6922	1	4	1		6
C7022	6	14	1	1	22
C8282	4	4			8
C8838		3			3
C9106	1	8			9
D10406	1				1
D16596			1		1
D1967	4	5	4		13
D4586	4	14	2	1	21
D5312	3	9	1		13
D5449	2	5	2		9
E15374	4	9	2	1	16
E6701	6	22	1		29
C4571		4			4
Total general	73	217	33	7	330

Tabla 11. Número de alteraciones por pacientes en la población sin evolución a cáncer.

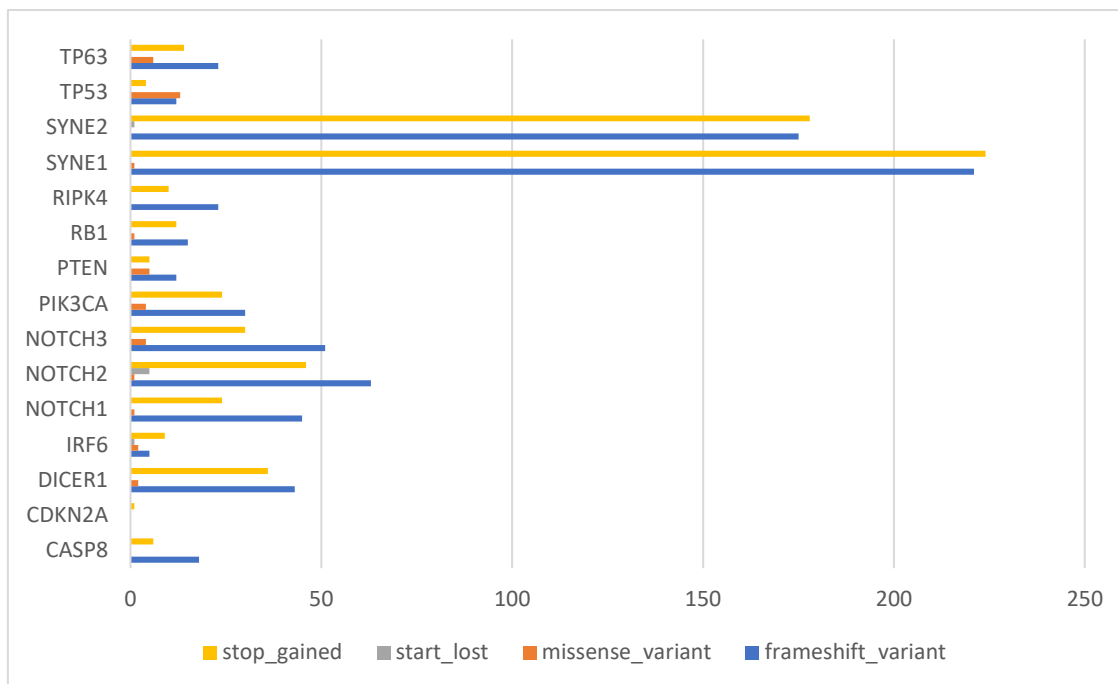


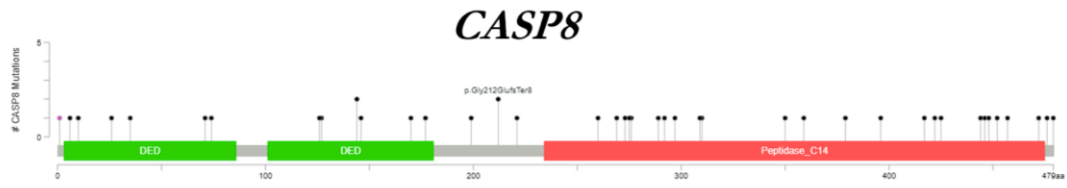
Gráfico 10. Tipos de alteraciones según los genes en las displasias de *alto grado* de la población con evolución a cáncer.

Gen	“Frameshift”	“Missense”	“Stop lost”	“Stop gained”	Total del gen
CASP8	18			6	24
CDKN2A				1	1
DICER1	43	2		36	82
IRF6	5	2	1	9	17
NOTCH1	45	1		24	70
NOTCH2	63	1	5	45	116
NOTCH3	51	4		31	86
PIK3CA	30	5		24	60
PTEN	12	5		5	22
RB1	15	1		12	29
RIPK4	23			10	33
SYNE1	221	1		224	456
SYNE2	175		1	178	359
TP53	12	13		4	29
TP63	23	6		14	43
Total del tipo de mutación	736	41	7	623	1427

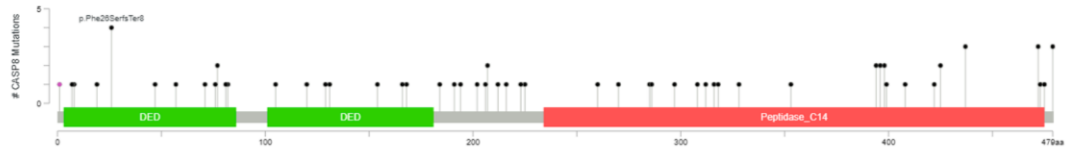
Tabla 12. Número de alteraciones según los genes en las displasias de *alto grado* en la población con evolución a cáncer.

Se puede observar que en todas las representaciones existe un mayor número de alteraciones registradas en los genes SYNE1 y SYNE2 en comparación con el resto de genes estudiados, pero hay que tener en cuenta que se trata de genes con una longitud mucho mayor que la media, y por tanto, con mucha mayor probabilidad de acumular alteraciones.

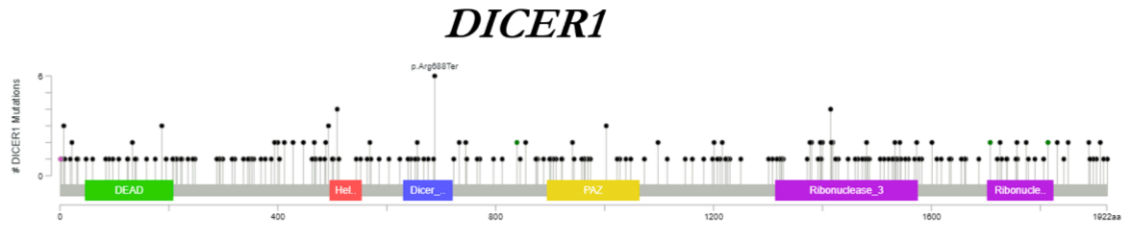
A continuación, se muestra la localización de las alteraciones probablemente patogénicas identificadas para cada gen en la secuencia de la proteína, señalando los distintos dominios proteicos que intervienen en la función de la proteína (se ha utilizado la herramienta web “MutationMapper” de cbioportal.org, figuras 17-25).



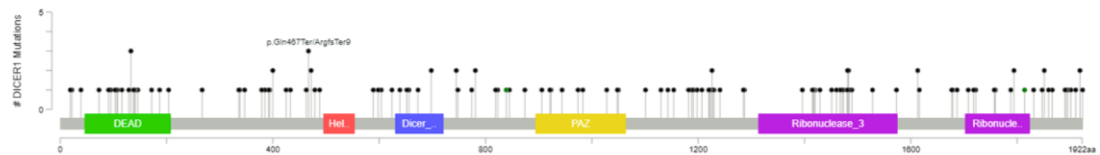
Pacientes con evolución a cáncer



Pacientes sin evolución a cáncer



Pacientes con evolución a cáncer



Pacientes sin evolución a cáncer

Figura 17. Representación de las mutaciones patológicas en los distintos dominios de los genes *CASP8* y *DICER1*.

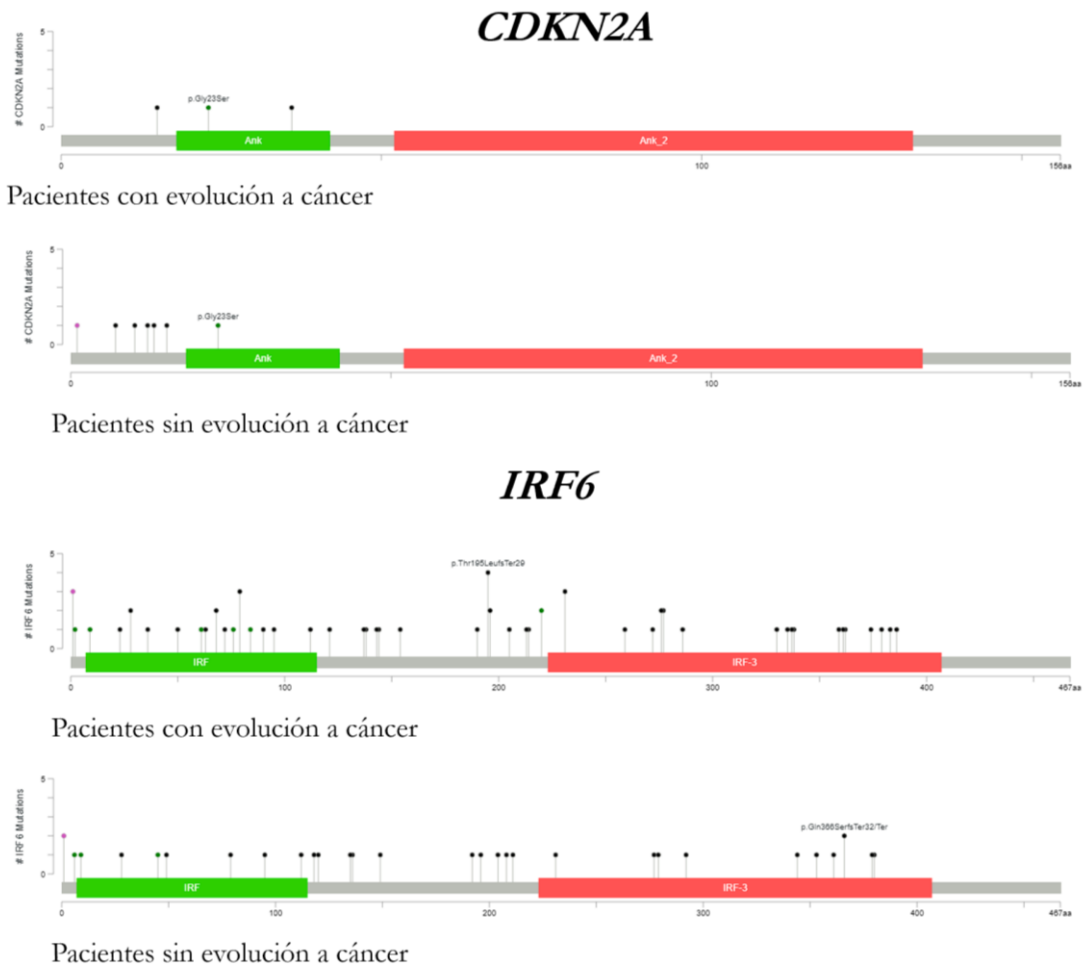
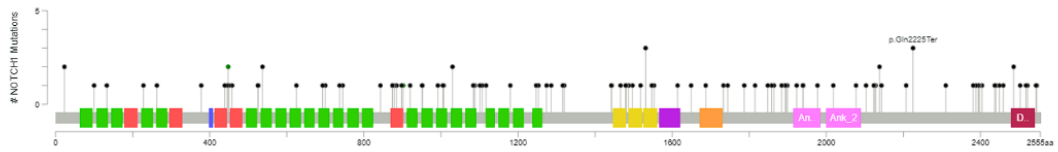
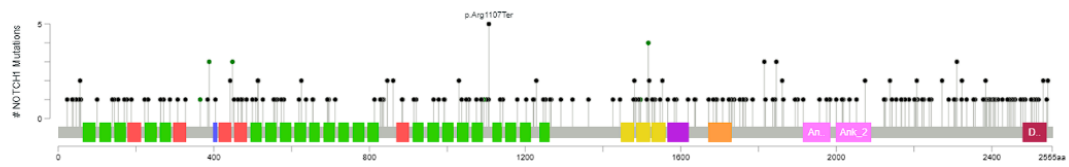


Figura 18. Representación de las mutaciones patológicas en los distintos dominios de los genes *CDKN2A* e *IRF6*.

NOTCH1

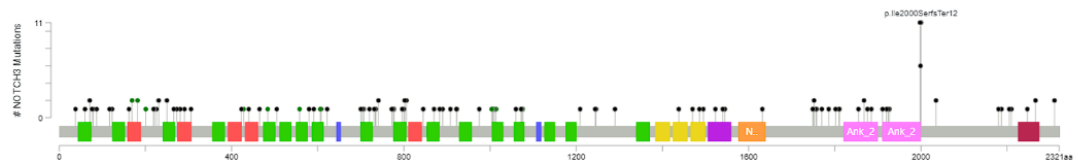


Pacientes con evolución a cáncer

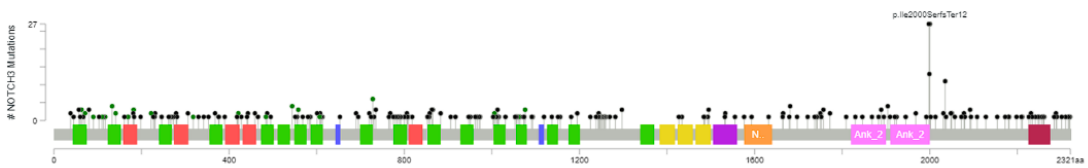


Pacientes sin evolución a cáncer

NOTCH3



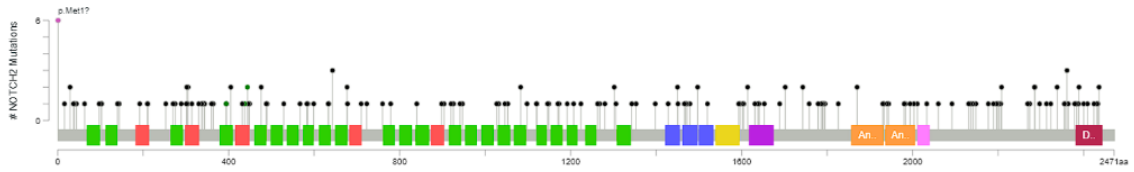
Pacientes con evolución a cáncer



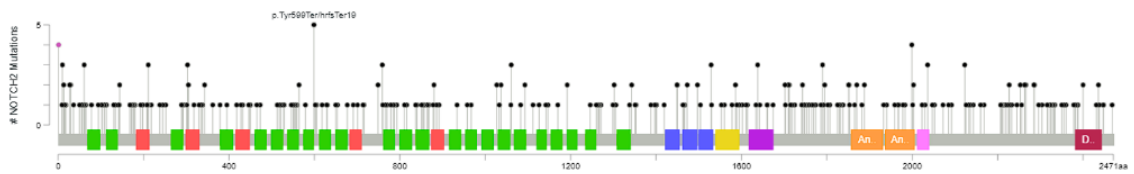
Pacientes sin evolución a cáncer

Figura 19. Representación de las mutaciones patogénicas en los distintos dominios de los genes *NOTCH1* e *NOTCH3*.

NOTCH2

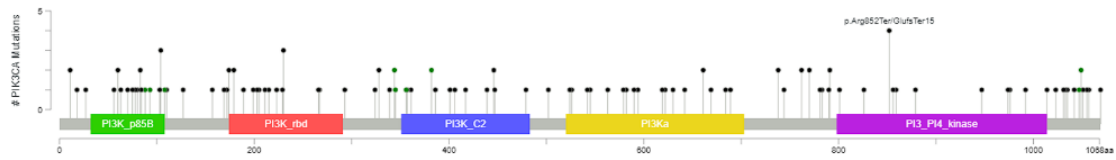


Pacientes con evolución a cáncer

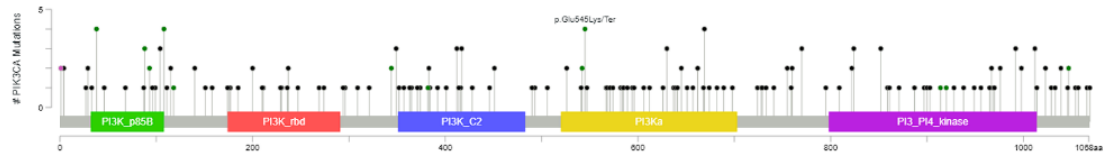


Pacientes sin evolución a cáncer

PIK3CA



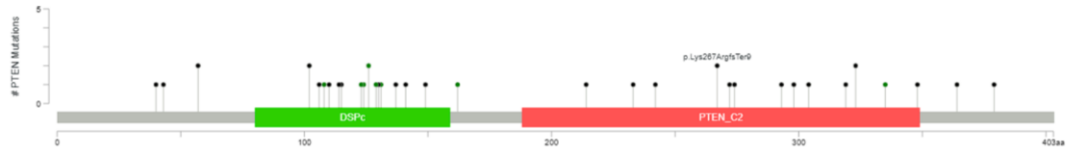
Pacientes con evolución a cáncer



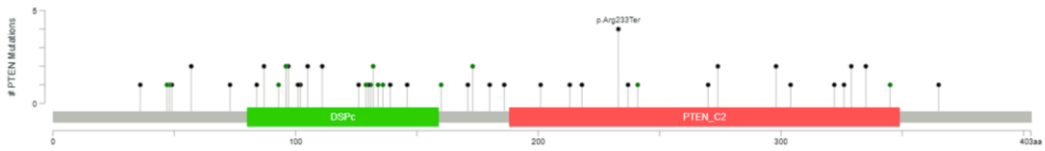
Pacientes sin evolución a cáncer

Figura 22. Representación de las mutaciones patológicas en los distintos dominios de los genes *NOTCH2* y *PIK3CA*.

PTEN

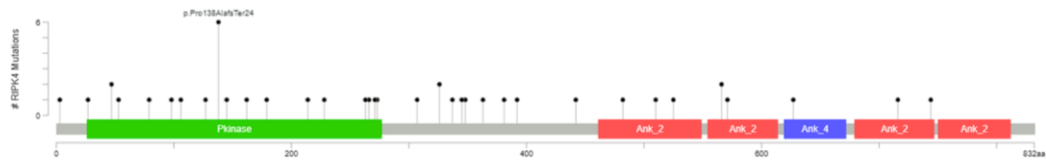


Pacientes con evolución a cáncer

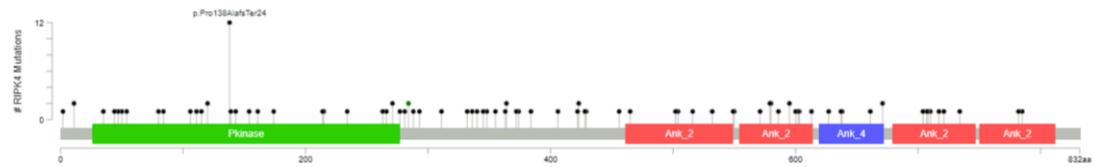


Pacientes sin evolución a cáncer

RIPK4



Pacientes con evolución a cáncer



Pacientes sin evolución a cáncer

Figura 23. Representación de las mutaciones patológicas en los distintos dominios de los genes *PTEN* y *RIPK4*.

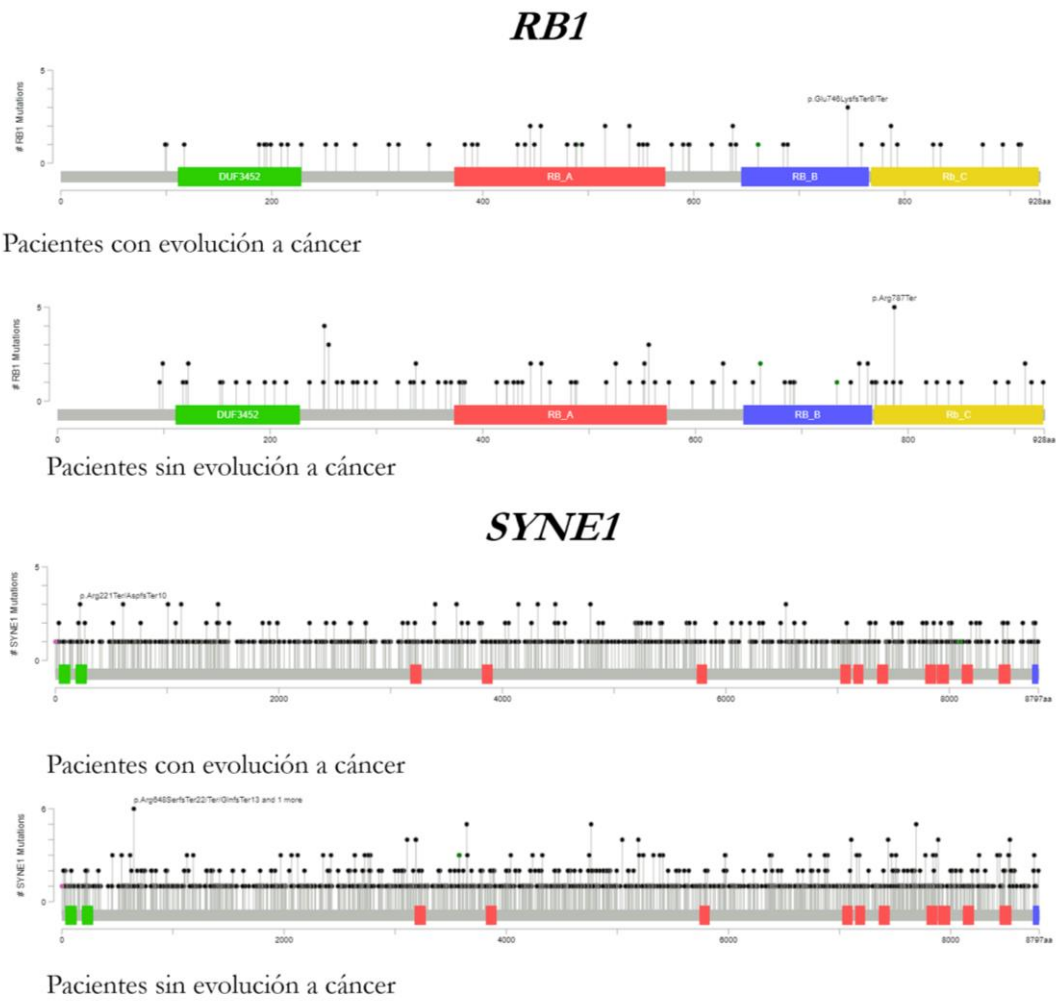
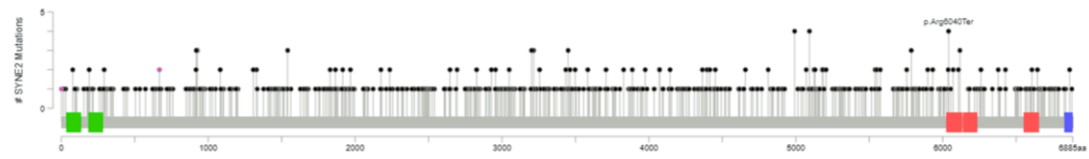
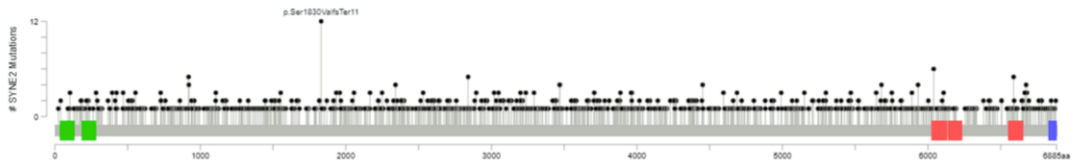


Figura 24. Representación de las mutaciones patogénicas en los distintos dominios de los genes *RB1* y *SYNE1*.

SYNE2

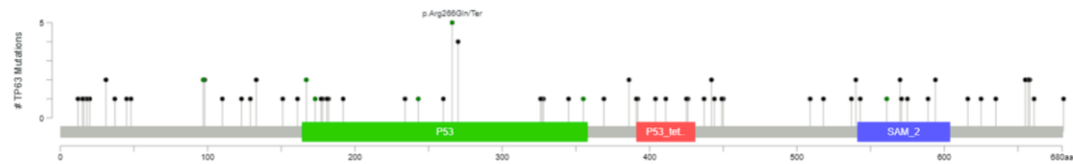


Pacientes con evolución a cáncer

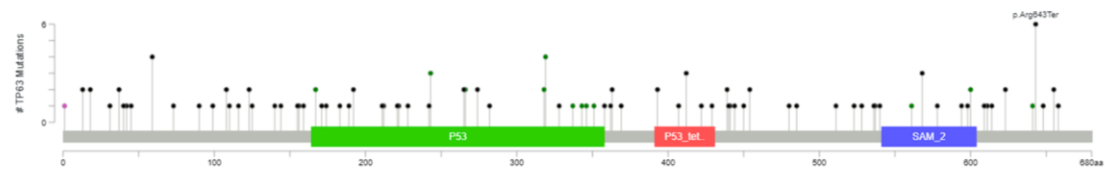


Pacientes sin evolución a cáncer

TP63

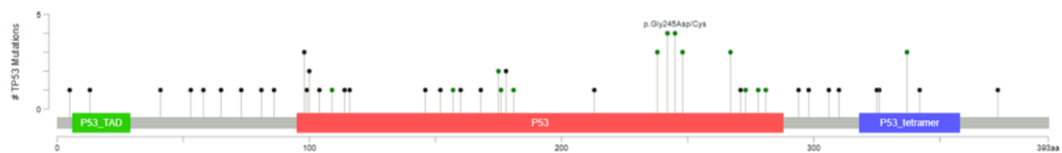


Pacientes con evolución a cáncer

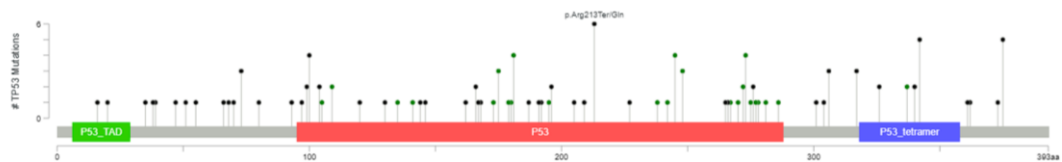


Pacientes sin evolución a cáncer

TP53



Pacientes con evolución a cáncer



Pacientes sin evolución a cáncer

Figura 25. Representación de las mutaciones patológicas en los distintos dominios de los genes *SYNE2*, *TP63* y *TP53*.

Dentro de las alteraciones patogénicas identificadas, se evaluó la presencia de alteraciones específicas para cada grupo de población estudiado. Se encontraron dos variantes repetidas en 4 muestras del grupo con evolución a cáncer, de tipo “frameshift” y “stop gained” respectivamente, ambas pertenecientes a *SYNE2*. Existen otras 6 variantes, localizadas en los genes *SYNE1* y *NOTCH2* que se detectaron en 3 muestras en el grupo con evolución a cáncer (tabla 13).

Gen	ID Variante	Tipo de alteración	Con evolución	Sin evolución
SYNE2	64606784_AT>AT/A	“Frameshift”	4	0
SYNE2	64608777_C>C/T	“Stop gained”	4	0
SYNE1	152565754_TC>TC/T	“Frameshift”	3	0
SYNE1	152786506_TG>TG/T	“Frameshift”	3	0
NOTCH2	120458264_G>G/A	“Stop gained”	3	0
SYNE1	152651458_G>G/A	“Stop gained”	3	0
SYNE1	152675952_G>G/A	“Stop gained”	3	0
SYNE1	152755025_C>C/A	“Stop gained”	3	0

Tabla 13. Variantes detectadas repetidas sólo en la población con evolución a cáncer.

Además, se compararon las variantes existentes entre las displasias de *alto grado* y de *bajo grado*, encontramos 4 variantes solamente presentes en las displasias de *alto grado* repetidas hasta en 3 muestras, localizadas en los genes *NOTCH1*, *NOTCH2*, *TP63* y *SYNE1* (tabla 14).

Gen	ID de Variante	Tipo de mutación	Displasia bajo grado	Displasia alto grado
NOTCH1	139399551_AG>AG/A	“Frameshift”	0	3
NOTCH2	120458037_C>C/T	“Stop gained”	0	3
TP63	189612028_C>C/T	“Stop gained”	0	3
SYNE1	152473270_G>G/A	“Stop gained”	0	3

Tabla 14. Variantes detectadas repetidas sólo en la población sin evolución a cáncer.

5. Concordancia con perfil mutacional en CCC

Para analizar la concordancia de nuestros resultados con datos publicados en repositorios, se utilizaron los datos de secuenciación del exoma completo del estudio TCGA PanCancer Atlas (descargados de cbiportal a fecha de 27/02/2023). En dicho estudio se analizaron 523 pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello. Para homogeneizar la muestra con la usada en nuestro estudio, se eliminaron aquellos pacientes VPH+ o sin información al respecto, así como pacientes afroamericanos, asiáticos, indios americanos, nativos de Alaska y latinos. Tras esto, el tamaño muestral fue de 313 pacientes, de los cuales 20 fueron estadios I, 49 estadios II, 51 estadios III, 162 estadios IV y 31 sin información disponible. La distribución de la localización fue la siguiente:

Sitio Primario	N
Surco alveolar	11
Base de lengua	9
Mucosa bucal	16
Suelo de la boca	38
Paladar duro	6
Hipofaringe	6
Laringe	74
Labio	2
Cavidad oral	52
Lengua	91
Orofaringe	2
Amígdala	6
Total	313

Tabla 15. Número de casos con CCC analizados en la serie TCGA PanCancer en función de la localización.

A continuación, se muestra el número de alteraciones detectadas en la región codificante y de splicing en la serie PanCancer según el tipo de variante (tabla 16):

Tipo de Variante	N alteraciones detectadas
Delección Frameshift	1490
Inserción Frameshift	652
Delección Inframe	283
Inserción Inframe	26
Missense	46468
Stop gained o lost	3922
Splicing	1789
Start lost	65

Tabla 16. Número de alteraciones para cada tipo de variante en la serie TCGA PanCancer.

En la serie de pacientes con CCC de TCGA PanCancer, se detectaron alteraciones en la secuencia de 14209 genes. Los genes más frecuentemente mutados (en más del 10% de los pacientes) fueron:

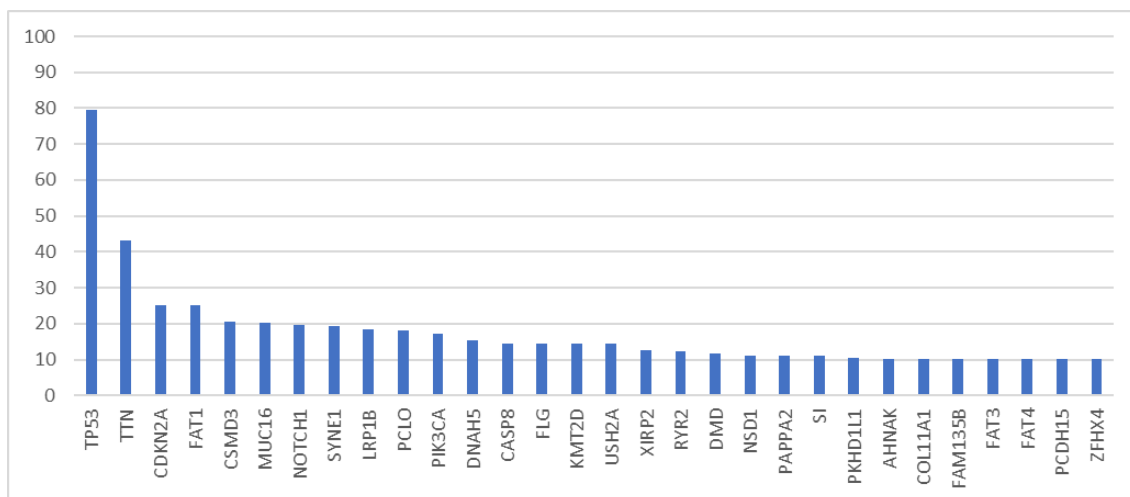


Gráfico 11. Porcentaje de pacientes con CCC con alteraciones en los genes más frecuentemente mutados en la serie TCGA PanCancer.

En el caso de los genes evaluados en nuestro estudio, la frecuencia de alteración en la serie TCGA PanCancer fue la siguiente:

Gen	% muestras con alteración
TP53	79,6
CDKN2A	25,2
NOTCH1	19,8
SYNE1	19,5
PIK3CA	17,3
CASP8	14,4
SYNE2	9,6
NOTCH2	5,8
NOTCH3	4,8
TP63	3,2
RB1	2,9
DICER1	2,6
PTEN	2,2
RIPK4	1,6
IRF6	1,3

Tabla 17. Porcentaje de pacientes con CCC de la serie TCGA PanCancer con alteraciones en los genes evaluados en nuestro estudio.

En la serie TCGA PanCancer se incluyeron 74 casos de CCC localizado en laringe. Dado que en nuestro estudio se evaluaron displasias de laringe, evaluamos el estado mutacional en esta cohorte (tabla 18). En nuestra serie se observó un número mucho más elevado de

alteraciones que en la serie TCGA PanCancer. Esto podría ser debido a la diferente metodología usada, exoma en el caso del TCGA y un panel de NGS en nuestro estudio. Este diferente abordaje afecta a la profundidad que se puede obtener para cada alteración, siendo mucho menor en el caso del exoma, lo que repercute en la pérdida de información para aquellas variantes con baja MAF (frecuencia de alelo mutado).

Gen	Frecuencia en muestras CCC en laringe de la serie TCGA PanCancer	Frecuencia en muestras de displasias de nuestro estudio	Frecuencia en muestras de displasias CON evolución a cáncer de nuestro estudio	Frecuencia en muestras de displasias SIN evolución a cáncer de nuestro estudio
TP53	85,1	90,0	82,4	93,9
SYNE1	35,1	94,0	88,2	97,0
PIK3CA	24,3	84,0	76,5	87,9
CDKN2A	20,3	70,0	70,6	69,7
NOTCH1	17,6	98,0	94,1	100,0
SYNE2	9,5	96,0	88,2	100,0
NOTCH3	8,1	98,0	94,1	100,0
RB1	6,8	88,0	76,5	93,9
DICER1	5,4	88,0	76,5	93,9
PTEN	4,1	80,0	70,6	84,8
CASP8	2,7	82,0	58,8	93,9
NOTCH2	2,7	96,0	88,2	100,0
RIPK4	2,7	90,0	82,4	93,9
TP63	1,4	94,0	82,4	100,0

Tabla 18. Porcentaje de pacientes con alteraciones en la regiones codificantes de los genes evaluados en nuestro estudio

6. Análisis de la expresión de genes inmunorreguladores en displasias de laringe

Se evaluaron los niveles de expresión de 16 genes involucrados en funciones de inmunorregulación en 64 displasias (37 de ellas sin evolución a cáncer y 27 con evolución). Se detectó ARNm de todos los genes en más del 45% de las muestras de displasia (gráfico 12).

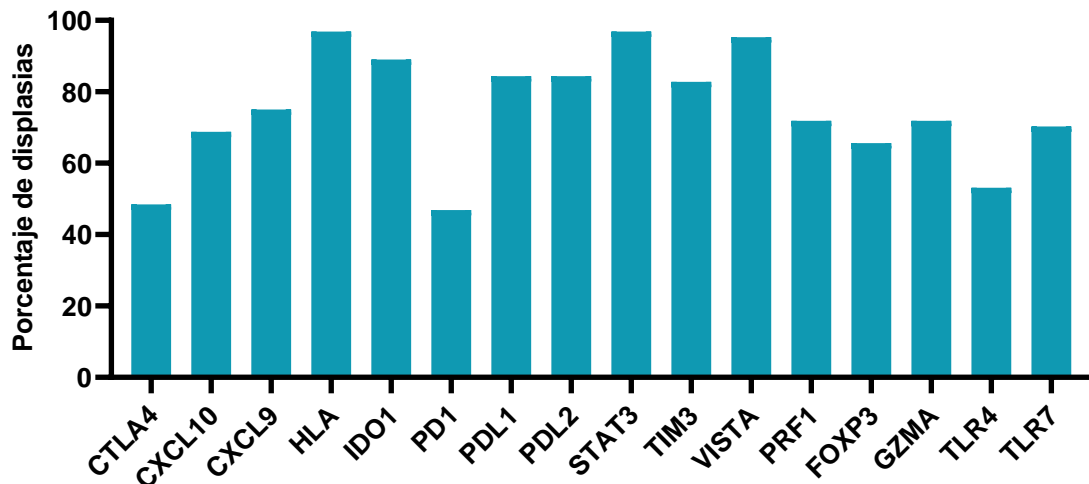


Gráfico 12. Porcentaje de displasias con detección de ARNm para cada gen

Los mayores porcentajes de detección en las displasias se observaron para los ARNm de los genes *HLA*, *STAT3* y *VISTA*, superando el 90% de las muestras analizadas. Mientras que el ARNm de los genes *CTLA4* y *PD1* eran detectados en menos del 50% de las muestras.

A continuación, se muestran los niveles de expresión para cada gen teniendo en cuenta aquellas muestras en las que los ARNm eran detectados (gráfico 13). *CXCL9*, *HLA*, *VISTA* y *STAT3* fueron los genes con mayores niveles detectados, mientras que *CTLA4* y *PD1* mostraron los niveles más bajos.

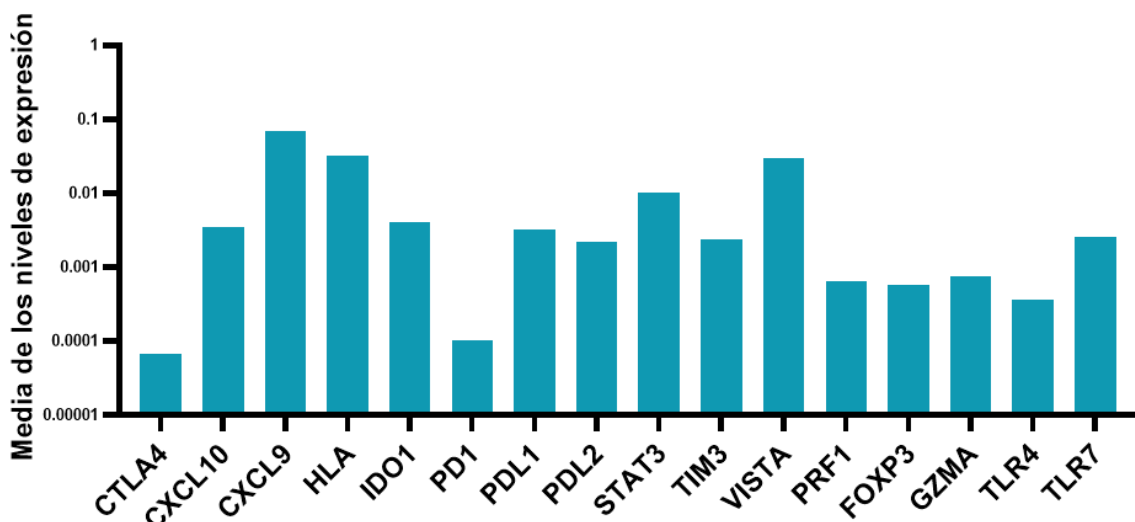


Gráfico 13. Media de los niveles de expresión (log¹⁰) de los genes evaluados teniendo en cuenta aquellas displasias con detección para cada gen

6.1 Análisis de la relación entre la expresión de genes inmunoreguladores y la evolución de la enfermedad.

Cuando se evaluó la presencia/ausencia de ARNm de los 16 genes en función de la evolución de las displasias, se observó que tanto para *CTLA4* como para *PD1* el % de detección de ARNm era menor en el subgrupo de displasias que evolucionaron a cáncer (gráfico 14). La ausencia de ARNm para el gen *CTLA4* se asoció significativamente con displasias que evolucionaron a cáncer ($p=0.039$; gráfico 15).

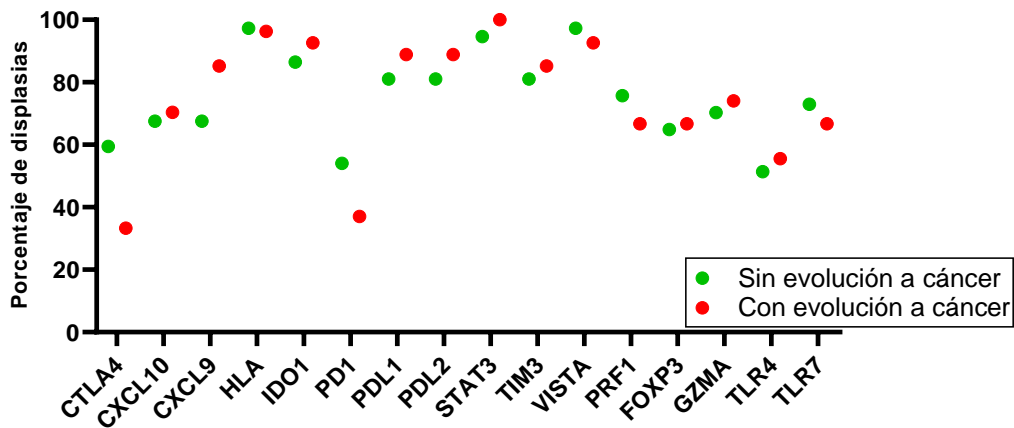


Gráfico 14. Porcentaje de displasias con detección de ARNm para cada gen en función de la evolución.

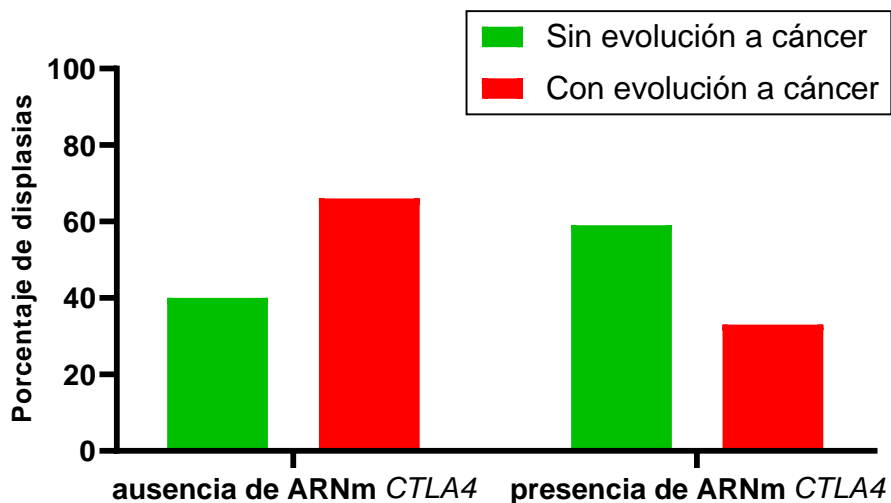


Gráfico 15. Relación entre la detección del ARNm del gen *CTLA4* y la evolución de las displasias.

Cuando los niveles de expresión fueron evaluados (gráfico 16) teniendo en cuenta la evolución de las displasias, los genes con una media de expresión mayor fueron *CXCL9*, *HLA*, *VISTA* y *STAT3*, tanto en aquellas que evolucionaron a cáncer, como en aquellas que no.

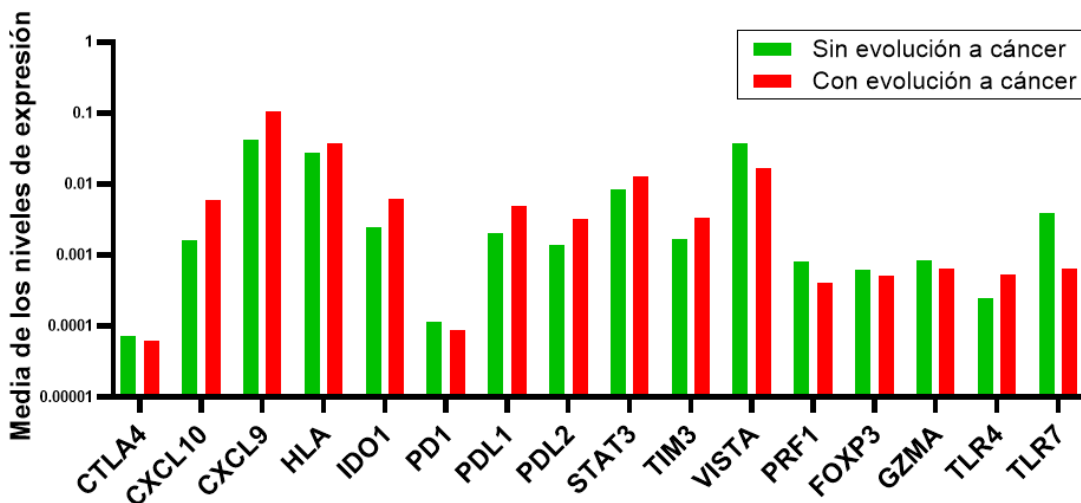


Gráfico 16. Media de los niveles de expresión (log¹⁰) de los genes evaluados en función de la evolución de las displasias.

Se observó una asociación estadísticamente significativa entre displasias con evolución a cáncer y niveles de expresión elevados de los genes *IDO1* ($p=0.010$), *PDL1* ($p=0.023$) y *STAT3* ($p=0.005$) (gráfico 17). También se observó una tendencia hacia la significación para elevados niveles de ARNm del gen *CXCL9* ($p=0.068$). Por otro lado, se observó una tendencia hacia la significación para la relación entre bajos niveles de expresión de *CTLA4* y displasias con evolución a cáncer ($p=0.079$).

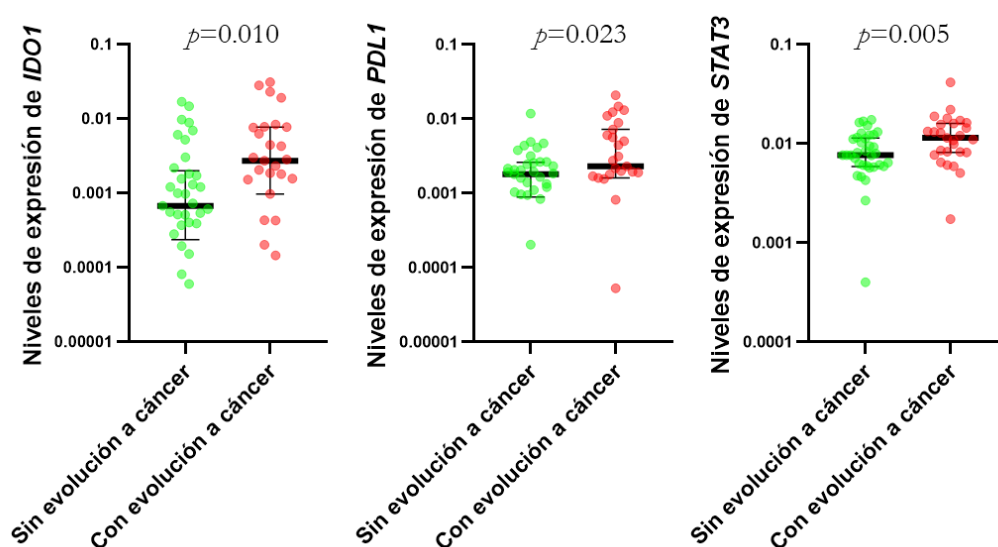


Gráfico 17. Mediana y rango intercuartil (\log^{10}) para los niveles de expresión de cada gen en los grupos de displasias sin y con evolución a cáncer.

A continuación, se establecieron puntos de corte para la expresión de cada gen inmunoregulador. Para ello, se empleó como punto de corte el percentil 50 de los valores de expresión para cada gen, dicotomizando las variables en altos y bajos niveles de expresión. Usando el test χ^2 se observó una asociación estadísticamente significativa entre displasias con evolución a cáncer y altos niveles de *IDO1* ($p=0.003$) y *STAT3* ($p=0.023$), así como con bajos niveles de *CTLA4* ($p=0.039$). Como otra aproximación para la selección de los puntos de corte, se usaron las curvas COR (gráficos 18 y 19) y los índices de Youden para seleccionar los puntos de corte que diferenciaran con mayor sensibilidad y especificidad las poblaciones que evolucionaron o no a cáncer. Sólo los niveles de expresión de los genes *IDO1*, *PDL1*, *STAT3* fueron significativos, con áreas bajo la curva mayores de 0.6 (gráfico 18). En el caso del ARNm de *CXCL9* se observó una tendencia a la significación.

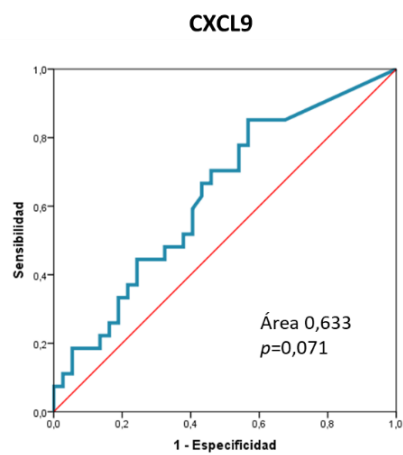
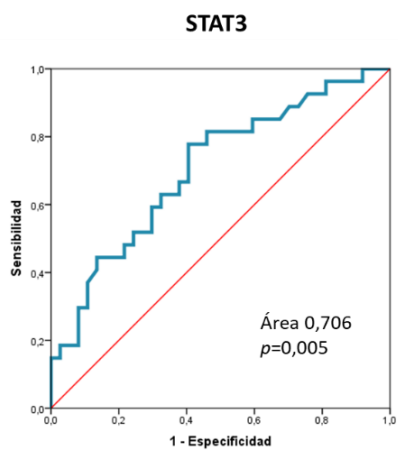
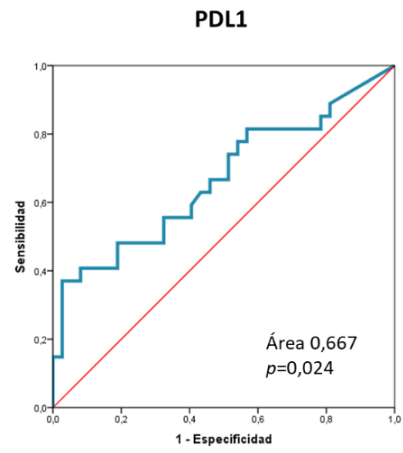
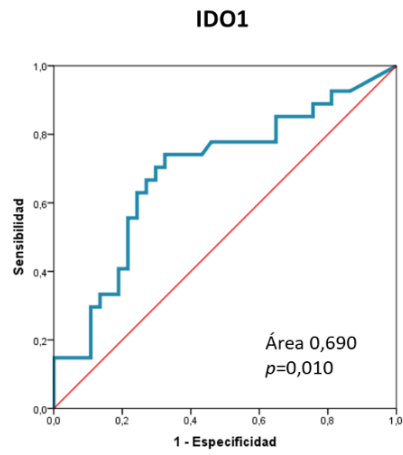


Gráfico 18. Curvas COR analizando los niveles de ARNm para los genes *IDO1*, *PDL1*, *STAT3* y *CXCL9*.

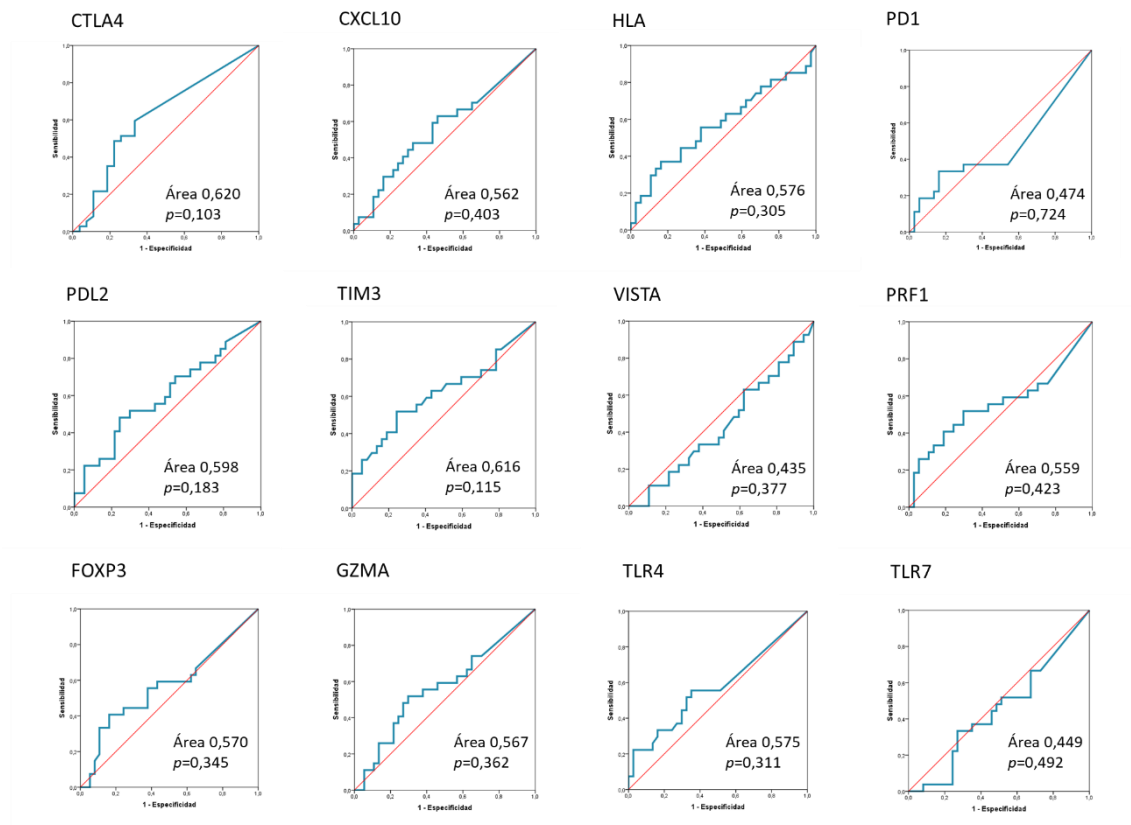


Gráfico 19. Curvas COR analizando los niveles de ARNm para el resto de los genes evaluados (p no significativa).

Usando el valor con el mayor índice de Youden como punto de corte para cada gen evaluado, se detectó una asociación entre displasias con evolución a cáncer y elevados niveles de *IDO1* ($p=0.001$), *PDL1* ($p<0.001$), *STAT3* ($p=0.003$) y *CXCL9* ($p=0.015$) (gráfico 20). Como ocurría en los análisis previos, niveles bajos de *CTLA4* se asociaron con displasias que evolucionaron a cáncer ($p=0.031$). Los percentiles que se han usado como punto de corte para estos genes mediante las curvas ROC y los índices de Youden son los siguientes: 49.2 para *IDO1*, 83.1 para *PDL1*, 43.1 para *STAT3*, 30.8 para *CXCL9* y 61.5 para *CTLA4*.

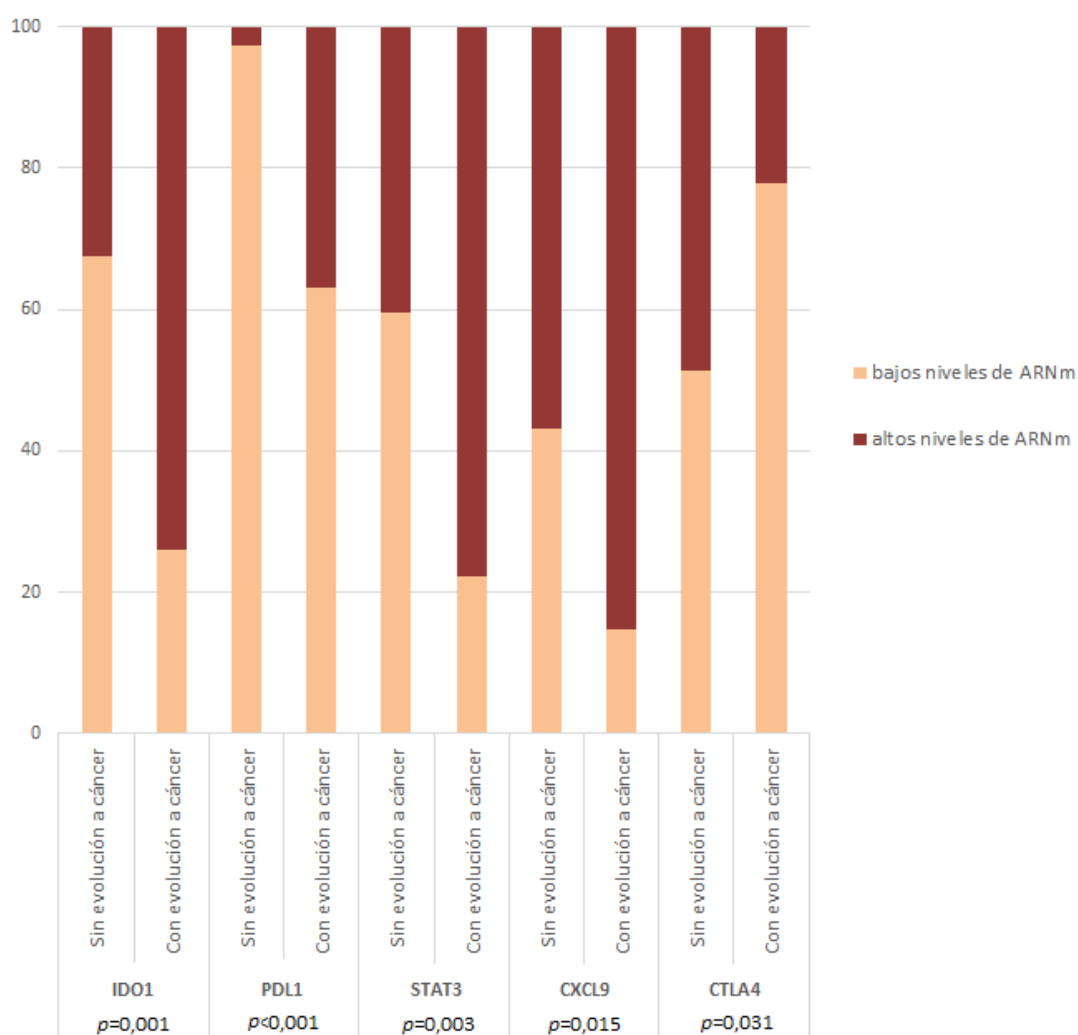


Gráfico 20. Porcentaje de muestras agrupadas en bajos o altos niveles de expresión para cada gen usando como punto de corte el máximo valor de Youden.

Por tanto, nuestros resultados sugieren que la expresión de *IDO1*, *PDL1*, *STAT3* y *CXCL9* y *CTLA4* en displasias podrían tener un potencial uso como biomarcadores pronósticos. El siguiente paso ha sido evaluar si una firma de expresión génica formada por estos 5 genes tendría un mayor peso en su capacidad de discriminar las displasias que evolucionan a cáncer y las que no. Así, teniendo en cuenta altos niveles de expresión de *IDO1*, *PDL1*, *STAT3* y *CXCL9*, y bajos niveles de expresión de *CTLA4*, se agruparon aquellas displasias con 2 o menos de estos marcadores y aquellas con más de tres. Con esta división, se observó una asociación robusta entre la firma inmunológica identificada y la evolución de la enfermedad ($p < 0.001$; gráfico 21). Cuando se comparó la firma inmunológica con los niveles de expresión

de *PDL1* (el cual era el gen individual con mayor valor estadístico), se observó una mayor sensibilidad, pero una menor especificidad en el caso de la firma inmunológica (tabla 19).

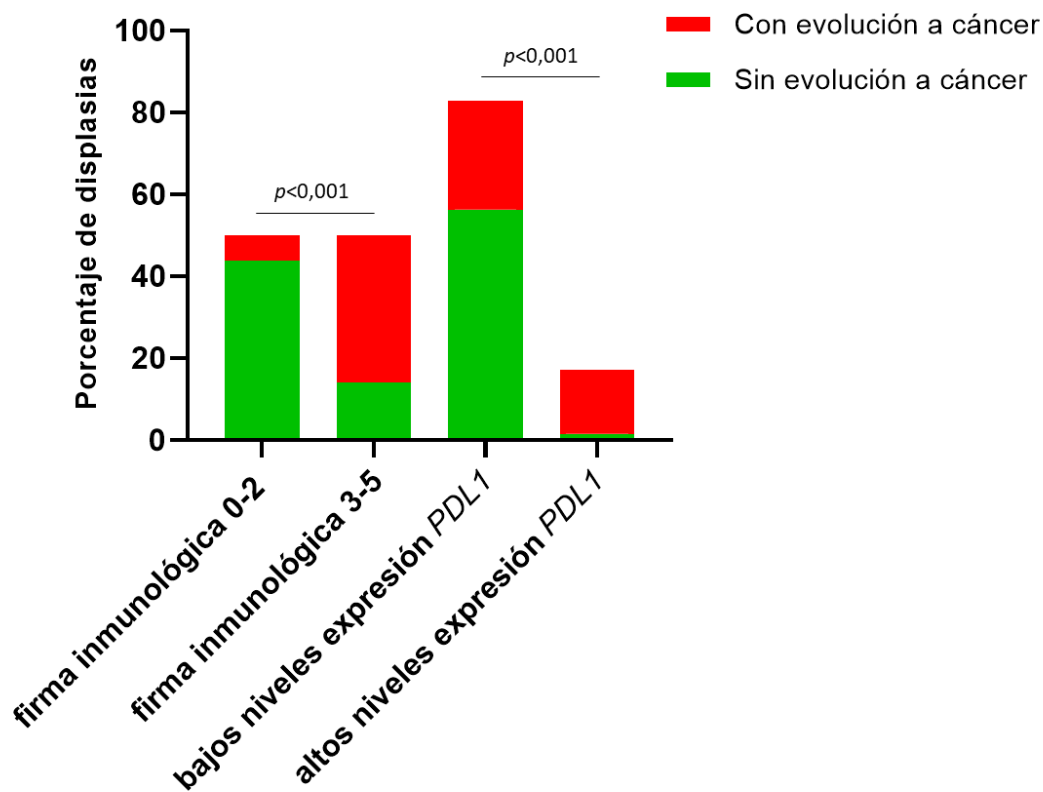


Gráfico 21. Porcentaje de displasias agrupadas por su evolución y clasificadas en función de la firma inmunológica y la expresión del gen *PDL1* (punto de corte: índice de Youden).

	Firma inmunológica	Expresión PDL1
Concordancia positiva	85,2	37
Concordancia negativa	75,7	97
Concordancia global	79,7	71,9

Tabla 19. Porcentajes de concordancia positiva, negativa y global cuando la firma inmunológica y los niveles de expresión del gen *PDL1* eran evaluados.

6.2 Análisis de la relación entre la expresión de genes inmunoreguladores y la el grado de displasia.

El número de casos de displasias analizadas en función del grado fue de 43 leves, 8 moderadas y 13 severas, asociándose significativamente el grado con la evolución de la enfermedad ($p=0.001$; tabla 20).

	Leve	Moderada	Severa
Sin evolución a cáncer	31	4	2
Con evolución a cáncer	12	4	11
Total	43	8	13

Tabla 20. Número de casos en función del grado de displasia y su evolución.

A continuación, se muestra el porcentaje de displasias con detección de ARNm para cada gen, así como sus niveles, en función del grado de displasia (gráfico 22). No se detectó ninguna asociación entre la presencia de los genes evaluados y el grado de displasia. CTLA4 y PD1 fueron los genes con menor porcentaje de detección de ARNm en los tres grados de displasia.

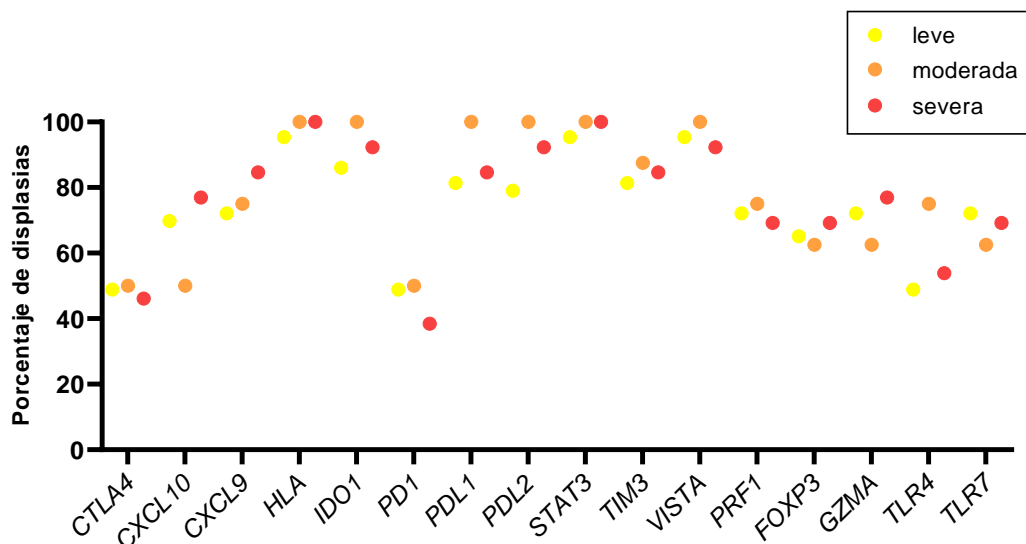


Gráfico 22. Porcentaje de displasias con detección de ARNm para cada gen en función del grado.

En aquellas displasias con detección de ARNm para cada gen, los genes con mayores niveles de expresión en todos los tipos de grado fueron *CXCL9*, *HLA*, *VISTA* y *STAT3*, de igual modo que en el apartado anterior evaluando la progresión de las displasias (gráfico 23).

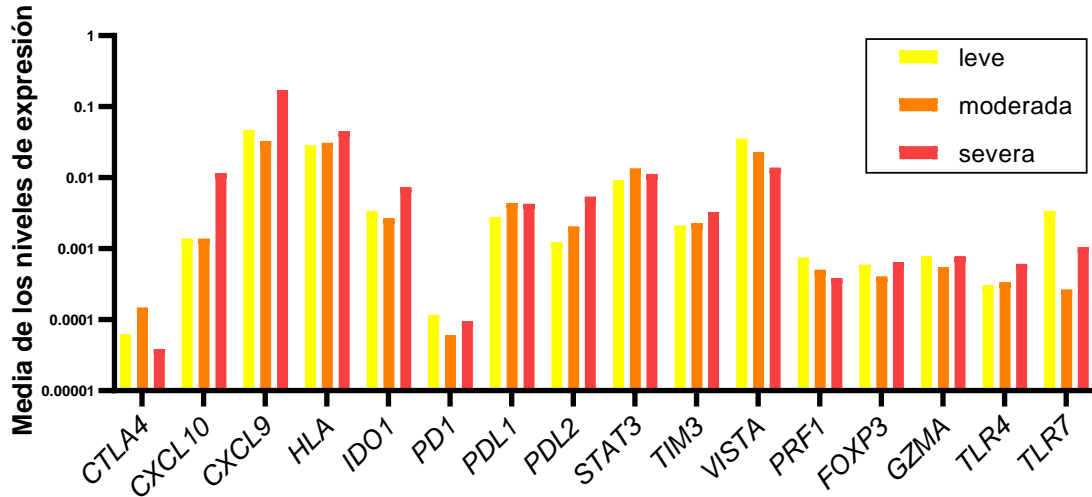


Gráfico 23. Media de los niveles de expresión (\log^{10}) de los genes evaluados en función del grado.

Con respecto a los niveles de ARNm, se observó una asociación entre altos niveles de *STAT3* y displasias severas ($p=0.012$), así como una tendencia para elevados niveles de *PDL2* ($p=0.084$) (gráfico 23 A). Dado que en el grupo de displasias moderadas el pronóstico es más heterogéneo, se evaluaron las displasias leves *versus* las severas, observándose una clara asociación entre elevados niveles de *STAT3*, *PDL2* ($p=0.038$ y $p=0.037$, respectivamente) y una tendencia para los niveles de ARNm del gen *IDO1* ($p=0.084$) (gráfico 24 B). Aunque los niveles medios del gen *CXCL9* eran mucho mayores en displasias severas, no se encontró una asociación significativa debido a la gran desviación de los datos.

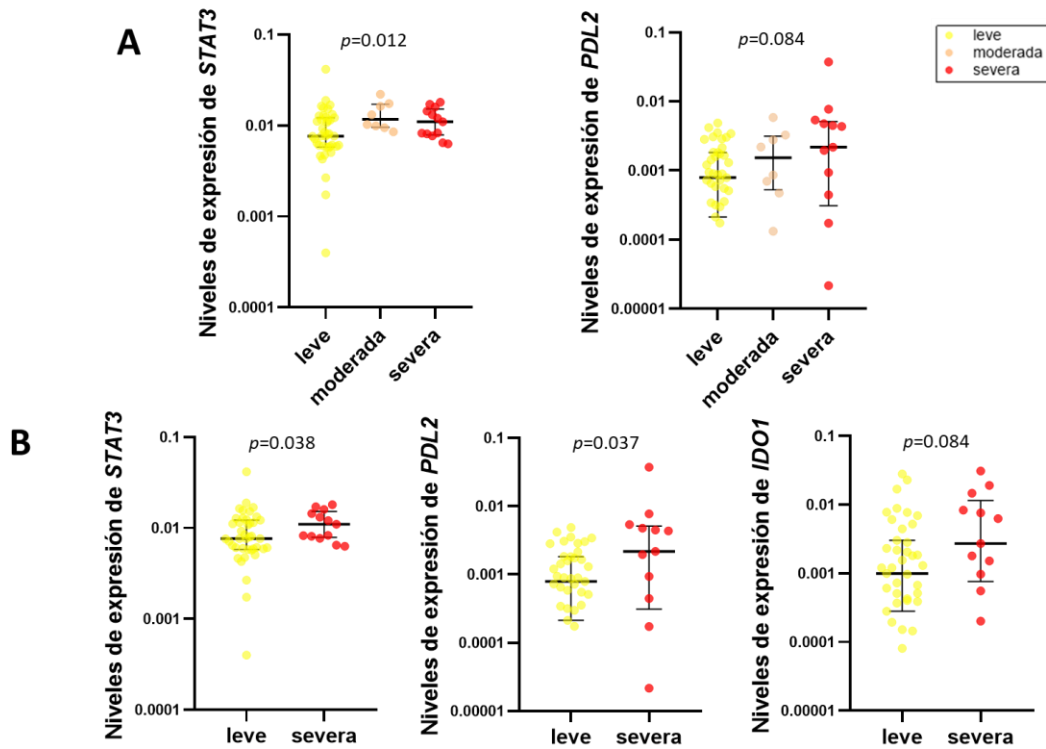


Gráfico 24. Mediana y rango intercuartil para los niveles de expresión (\log_{10}) en los grupos de displasias en función del grado. **Panel A**, teniendo en cuenta displasias leves, moderadas y severas. **Panel B**, teniendo en cuenta únicamente displasias leves y severas.

En el estudio de genes inmunoreguladores, se evaluaron 8 displasias de grado moderado, 4 de las cuales evolucionaron a cáncer y 4 no. Aunque son pocos casos para evaluar si existen diferencias en la expresión de *STAT3*, *PDL2* e *IDO1*, en el siguiente gráfico se muestra un comportamiento similar de este tipo de displasias en relación a los niveles de ARNm para cada gen en función de la evolución de la enfermedad (gráfico 25).

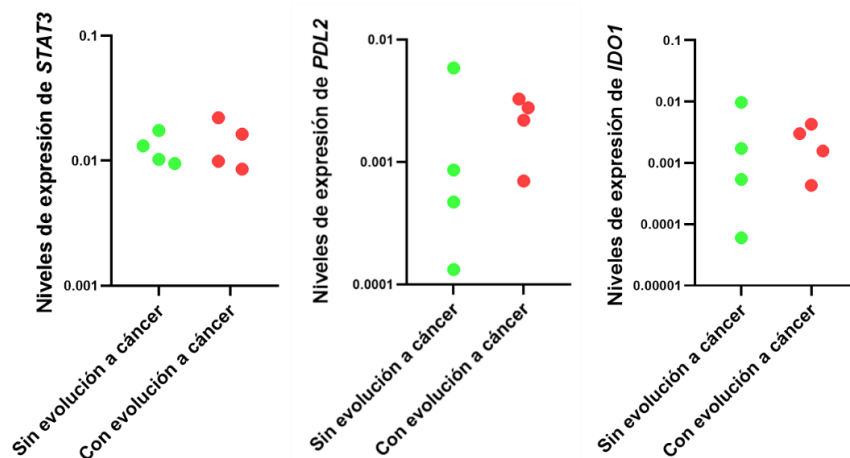


Gráfico 25. Niveles de ARNm (\log_{10}) para los genes *STAT3*, *PDL2* e *IDO1* en displasias moderadas en función de la evolución que han mostrado.

Seguando los criterios de clasificación de las displasias de laringe según la OMS de 2017 (19) y al tamaño muestral de nuestro estudio, se agruparon las displasias moderadas con las severas para representar las displasias de *alto grado*. Se observó una asociación significativa entre displasias de *alto grado* y altos niveles de expresión de los genes *STAT3*, *PDL2* y *PDL1* ($p=0.004$, $p=0.029$ y $p=0.055$, respectivamente; gráfico 26). Sin embargo, no se detectó una asociación para el gen *IDO1* ($p=0.109$).

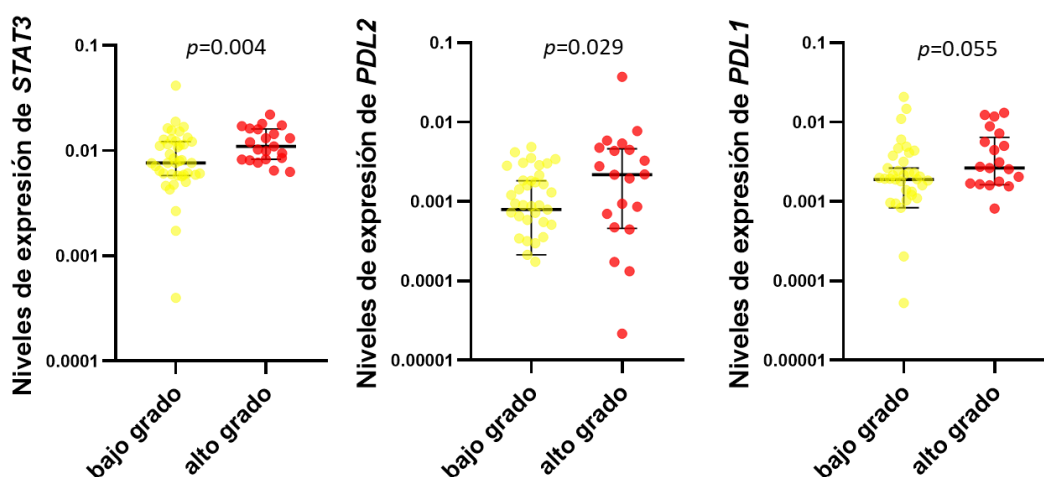


Gráfico 26. Niveles de ARNm (\log^{10}) para los genes *STAT3*, *PDL2* y *PDL1* en displasias de *bajo* y *alto grado*.

Cuando los niveles de expresión fueron dicotomizados usando como punto de corte la mediana, se observó una asociación entre altos niveles de *STAT3* y displasias de *alto grado* según la clasificación de la OMS de 2017 ($p=0.017$, test χ^2). En el mismo sentido, se observó una tendencia hacia la significación entre altos niveles de *IDO1* y *alto grado* ($p=0.062$) (tabla 21).

	Displasias de bajo grado	Displasias de alto grado
Bajos niveles de expresión de <i>STAT3</i>	40,6	9,4
Altos niveles de expresión de <i>STAT3</i>	26,6	23,4

Tabla 21. Porcentaje de casos en función del grado de displasia y los niveles de expresión de *STAT3*.

Como se ha comentado en la introducción, existe una mayor probabilidad de malignización cuanto mayor sea el grado de displasia, aunque la clasificación del grado de severidad sigue permitiendo demasiada flexibilidad y variabilidad inter-observador. Por tanto, analizamos si

los niveles de expresión dicotomizados con los puntos de corte establecidos en función de la evolución de la enfermedad (apartado 6.1) en base a los índices de Youden mostraban una asociación con el grado de displasia. Se detectó una asociación entre displasias agrupadas en altos niveles de expresión tanto para *PDL1* como para *STAT3* y *alto grado* ($p=0.017$ y $p=0.005$, respectivamente).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Si realizamos una revisión bibliográfica centrada sobre los biomarcadores, en especial los que se encuentran en las displasias laríngeas, nos encontraremos con resultados muy escuetos. Dentro del CCC, el cáncer de laringe sigue teniendo un largo recorrido por delante para conseguir dilucidar su proceso oncogénico. En el caso de las lesiones premalignas, el desafío es todavía mayor. Más allá de los hallazgos diagnósticos, sería muy interesante disponer de biomarcadores pronósticos, que nos permitan distinguir las lesiones en función de su potencial de malignización. Analizando las conclusiones de las revisiones más destacadas hasta la fecha, como las realizadas por Falco et al., Manterola et al., Basheeth et al. o Farah et al. (35,66,122,123), se han explorado distintos tipos de biomarcadores:

- Mutación genómica y expresión aberrante de proteínas
- Presencia de miARNs
- ADN tumoral circulante
- Cambios epigenéticos

En nuestro trabajo, nos hemos centrado en analizar las mutaciones genéticas por una parte de genes con un papel ya conocido y demostrado en otras localizaciones de cabeza y cuello, y por otra parte, hemos valorado las variaciones de expresión de otro grupo de genes relacionados con la respuesta inmune a nivel tumoral.

1. Características de la población

Las características de nuestra población coinciden con la descripción habitual de las series de pacientes con laringitis crónica descritas en la literatura: se trata de una población mayoritariamente masculina, con antecedente de tabaquismo casi al 100% y edad media comprendida en la 5a y 6a década de la vida (8,9,11).

Observamos progresión en un 33 % de nuestra población, tasa en rango con las publicadas como mencionábamos anteriormente, que suelen situarse entre el 9 y el 33 % (13,20,21).

2. Perfil mutacional de las displasias

En nuestro trabajo, nos hemos centrado en analizar las mutaciones de genes con un papel ya conocido y demostrado en otras localizaciones de cabeza y cuello, basándonos especialmente en los perfiles que establecieron los primeros trabajos sobre este tema (32,60).

Se pueden dividir los genes seleccionados en 3 categorías principales, según las funciones con las que están relacionados:

- Implicados en la proliferación celular: los genes *DICER1*, *PI3KCA*, *PTEN*, *RB1*, *RIPK4*, *SYNE 1* y *2* y *TP63*.
- Reguladores del ciclo celular: *CASP8*, *CDKN2A* y *TP53*.
- Relacionados con funciones de adhesión celular e invasión: *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3* e *IRF6*.

Los genes más estudiados en la literatura y más frecuentemente mutados en el CCC son *EGFR*, *PIK3CA*, *PTEN*, *CDKN2A* y *TP53*.

Es muy interesante por tanto que en nuestro trabajo hayamos encontrado mutaciones en estos mismos genes aún en estados de premalignidad como son las displasias, y que además parecen tener repercusión funcional patogénica, teniendo en cuenta el tipo de mutaciones y la predicción de patogenicidad comparando nuestros hallazgos con los publicados en la literatura. No obstante, es cierto que no hemos encontrado ninguna alteración singular que podamos reconocer como una firma de progresión. No hemos llegado a identificar un patrón de mutación que permita diferenciar una displasia que va a evolucionar a cáncer de una que no vaya a tener evolución, pero este resultado es congruente con la literatura (32,35,60,122,123), porque a día de hoy, incluso en lesiones tumorales ya declaradas, todavía no se ha reconocido ningún biomarcador omnipresente y reproducible en distintos estudios. Siendo este el panorama en la enfermedad neoplásica, no es de extrañar la variabilidad que encontramos en las lesiones displásicas.

Nankivell et al. y Rodrigo et al. (124,125) han realizado sendos metaanálisis centrándose en las mutaciones presentes en displasias de laringe y ambos son firmes en sus conclusiones: no sólo no existen biomarcadores señalizadores de las lesiones con propensión a progresar a cáncer, sino que la escueta evidencia que se publica en esa dirección carece de la calidad necesaria como para generalizar los resultados. Incluso centrándonos en p53, el gen más relacionado con la carcinogénesis hasta la fecha. De la misma manera que observamos en

nuestro trabajo, Nankivell y Rodrigo señalan que se trata del gen con mayor información y datos sugerentes de implicación en la tumorigénesis, pero al realizar revisiones sistemáticas y establecer puntos de medida que comparen unos estudios con otros, los resultados resultan inconcluyentes, sin poder demostrar un patrón mutacional distintivo (124,125).

Sin embargo, sí es relevante el hecho de haber encontrado mutaciones consistentes con las estudiadas en la literatura en cánceres de cabeza y cuello, en genes reconocidos en el proceso, especialmente en genes como *PIK3CA*, *CDKN2A* y *TP53* (32,35,60,122,123). Estos resultados sugieren que estos genes están implicados en la progresión tumoral laríngea, aunque su alteración no sea necesariamente el desencadenante definitivo para el desarrollo neoplásico a este nivel.

3. Expresión de genes inmunoreguladores

En cuanto al análisis de los niveles de expresión de los genes inmunoreguladores, los resultados que obtenemos sí son estadísticamente significativos. No obstante, nos enfrentamos al mismo escenario que describíamos con las mutaciones genéticas: no existe prácticamente literatura en lesiones premalignas de laringe con las que comparar nuestros resultados. Existen trabajos en cáncer de laringe, pero las últimas revisiones realizadas, como las de Falco et al., Solomon et al. (98,122), concluyen que al no existir un protocolo estándar para el estudio y análisis de los resultados, resulta muy difícil respaldar su uso como biomarcadores. En nuestro estudio, sí demostramos que exista un perfil genético inmunoregulador distinto en caso de pacientes que acaban presentando cáncer laríngeo frente a los que presentan resolución completa de las lesiones displásicas.

3.1 Niveles elevados de expresión de genes inmunoreguladores en displasias de alto grado

Encontramos niveles de expresión elevados de *IDO1*, *PLD1*, *STAT3* y *CXCL9* y niveles bajos de *CTLA4* en las lesiones con evolución a cáncer; y un aumento también de los niveles de expresión de *IDO1*, *PDL2*, *STAT3* y *CXCL9* en el caso de las displasias de *alto grado*. Estos genes se relacionan con funciones de presentación antigénica, maduración de células dendríticas y otras células presentadoras de antígenos como es el caso de *IDO1*, *STAT3*; activación de células T (*CXCL9*); supresión de células T (*PDL2* y *CTLA4*); y con la activación de células T reguladoras inmunosupresoras (*IDO1* y *STAT3*). Comparando

nuestros resultados con los descritos en el estudio del cáncer de laringe, nuestros hallazgos son congruentes con la literatura previa (35,98,102,105,107,113,115,122,126).

3.1.1 Niveles de expresión de genes relacionados con el Interferón Gamma

Los niveles de expresión elevados de genes que se relacionan con el Interferón Gamma, como es el caso de *STAT1*, *IDO1*, *CXCL9*, *CXCL10*, *HLA-DR* e *INFG* no sólo se asocian al microambiente tumoral laríngeo sino que también se relacionan con una mejor respuesta a la inmunoterapia con anticuerpos antiPD1 (126). Esto demuestra el impacto en el manejo de la enfermedad y en la supervivencia en última instancia que tiene el poseer conocimiento sobre las alteraciones a este nivel. Como hemos mencionado, Nivolumab y Pembrolizumab son dos fármacos dirigidos contra la vía PD1/PDL1, y su uso se ha permitido en EEUU y también en España gracias a haberse demostrado el incremento de supervivencia usando estos agentes en lugar de quimioterapia tradicional. (126). Sabiendo que existen ya alteraciones en estas vías de señalización en displasias, sería interesante conocer los efectos que inmunoterapias similares pudieran tener en lesiones premalignas que presentaran un perfil con potencial agresivo y presentaran estos marcadores, ya que podríamos no sólo mejorar la supervivencia, sino en evitar directamente el desarrollo de la enfermedad neoplásica.

3.1.2 Niveles de expresión de *CTLA4*

Encontramos bajos niveles de *CTLA4* en pacientes con evolución a cáncer. No obstante, en el CCC este punto de control parece tener menos relevancia que en otras entidades, como puede ser el melanoma donde tratamientos con anticuerpos anti-CTLA4 como Ipilimumab, están aprobados y se usan en combinación con los anti-PD1. La unión de los receptores C80/CD86 de la célula dendrítica con *CTLA4*, inhibe la función de los linfocitos T efectores. Al bloquear esta unión con agentes anti-CTLA4, se impide la inhibición linfocitaria. Siu et al. realizaron un ensayo clínico fase II en pacientes con CCC en el que demostraron que al añadir un antiCTLA4 (Tremelimumab) al tratamiento con anti-PD1/PDL1 (Durvalumab) no se incrementaba la supervivencia de los pacientes (127).

3.1.3 Niveles de expresión de *STAT3*

Observamos la actividad de *STAT3* aumentada en displasias de laringe, y este resultado coincide con la mayor parte de la bibliografía puesto que esta alteración se objetiva casi en el

50% de los CCC, como parte del sistema de evasión inmunológico (126). Xiao Xiao et al. (105) publicaron en 2021 un estudio en el que demostraban que la sobreexpresión tanto de *STAT3* como de *YAP* en carcinoma laríngeo promovían la proliferación, migración además de la secreción de PD-L1 en macrófagos asociados al tejido tumoral. De hecho, este aumento de expresión puede constituir una diana terapéutica efectiva, tal y como demostraron Bharadwaj et al. (126) en su trabajo, en el que usaron un inhibidor molecular que logró reducir la expresión de este gen. De esta manera, publicaron una disminución del crecimiento celular independiente e independiente de anclaje de las células tumorales de CCC. Este aumento de expresión de *STAT3* en las displasias de laringe que evolucionan a cáncer, nos sugiere que los mecanismos de evasión inmunológica tumorales se empiezan a desarrollar desde las fases premalignas. Por tanto, *STAT3* podría constituir una diana terapéutica con un buen potencial de respuesta para tratamientos preventivos del cáncer de laringe.

No debemos olvidar que la presencia de lesiones displásicas no predice de forma fiable el comportamiento biológico. Hay lesiones diagnosticadas como leves que aún así evolucionan a carcinomas invasivos, al igual que hay lesiones clasificadas como severas o de alto grado, que nunca llegan a convertirse en carcinomas a pesar de su mayor potencial (Rodrigo et al. (125). No obstante, el hecho de haber encontrado perfiles distintos de expresión génica según el grado de displasia presentado y su correspondiente evolución nos plantea la posibilidad de conseguir un método más fiable y reproducible que el mero análisis anatomopatológico para discriminar entre lesiones con potencial de malignización y lesiones de perfil más benigno.

3.2 Niveles de expresión de genes inmunorreguladores y grado de displasia

Al realizar el estudio sobre muestras tomadas y analizadas entre los años 2007 y 2011, el sistema de clasificación que se usaba en nuestro hospital era el de la OMS 2005, que clasificaba las displasias en leves, moderadas y severas, aunque posteriormente se agruparon las displasias moderadas y severas en alto grado para ser más congruentes con los últimos criterios de clasificación de la OMS de 2017 de clasificación de las displasias.

Al realizar el análisis basándonos en el sistema de clasificación más antiguo, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de ARNm en ningún gen, aunque si había un aumento homogéneo en todos los grados de *CXCL9*, *HLA*, *VISTA* y *STAT3*.

Al comparar únicamente displasias leves y severas, sin considerar las displasias moderadas, sí observamos un claro aumento de los niveles de expresión de *STAT3* y *PDL2*. También encontramos niveles de expresión altos de *PDL1*, *PDL2* y *STAT3* asociados a displasias de *alto grado*.

Estos hallazgos nos permiten corroborar la pertinencia del nuevo sistema de clasificación de la OMS, pues es posible observar un comportamiento de expresión distintivo de las lesiones de alto grado frente a las de bajo grado frente a la diversificación de resultados al dispersar las muestras en otro estrato intermedio, con la incrementada variabilidad inter-observador que significa.

3.3 Dificultades para la generalización de los resultados

Como hemos mencionado, apenas existen estudios publicados que se centren en expresión genética en lesiones premalignas de laringe, por lo que resulta difícil comparar nuestros resultados con estudios similares para identificar patrones. Los pocos trabajos sobre alteraciones moleculares de displasias laríngeas que se han publicado, como los de Manterola et al., Rodrigo et al, Nankivell et al. o Wan et al. (89,91,124,125,128), han basado sus investigaciones en otro conjunto genético, distinto al que hemos seleccionado nosotros para el análisis del sistema inmunorregulador. No obstante, como hemos señalado anteriormente, realizamos esta selección de genes por su comprobada participación en el desarrollo tumoral en el CCC. Por lo tanto, haber encontrado alteraciones y asociaciones con un aumento de predisposición a tumor conforme mayor sea la agrupación de alteraciones a este nivel, es consistente con el proceso carcinogénico. Centrándonos en revisiones sobre neoplasias declaradas, lo más aproximado que existe entre los resultados publicados comparables y los de nuestro estudio, es el trabajo de revisión realizado por Solomon et al. (98), en el que también reconocen una firma de genes relacionados con el Interferón γ (concretamente *IDO1*, *CXCL10*, *CXCL9*, *HLA-DRA*, *STAT1*, *INFG*) que presentaban sobreexpresión en tumores de CCC y que además presentaban mejores tasas de supervivencia globales con el uso de Pembrolizumab respecto a células que no presentaran sobreexpresión.

Conociendo no sólo las alteraciones individuales sino la firma inmunológica global, daría una mayor fiabilidad diagnóstica a la hora de clasificarla como displasia de *alto grado*.

4. Limitaciones del estudio

Los resultados que aportamos son prometedores, pero somos conscientes de las limitaciones que presenta nuestro estudio:

- Contamos con un tamaño muestral reducido y al haberse realizado de forma retrospectiva, no hemos podido contar con grupos equivalentes en tamaño muestral en ambos casos de evolución o no evolución.
- La influencia de la parafina en las muestras y el hecho de disponer de cantidades muy reducidas de tejido biopsiado también han hecho difícil llevar a cabo la investigación. Un estudio prospectivo, allanaría el camino para permitir obtener resultados más robustos.
- Debemos tener en cuenta además que no hemos comparado nuestros resultados con población sana, sino que todos los pacientes estudiados habían desarrollado ya displasias. Es posible que al comparar el análisis con población sana, la distinción que aporte el perfil de alteraciones genéticas sea más claro todavía. Al igual que al comparar nuestras muestras con pacientes con neoplasias laríngeas ya declaradas, probablemente haya una firma molecular distintiva de lesión premaligna laríngea
- En el apartado de análisis del perfil molecular, utilizamos una metodología distinta a la de las principales revisiones sobre el tema, lo que dificulta la comparación y extrapolación de nuestros resultados.
- No hemos podido estudiar el resto de biomarcadores que mencionábamos al inicio de este apartado: la presencia de miARNs, y los cambios epigenéticos (el ADN tumoral circulante no estaría indicado al tratarse de lesiones premalignas aún). Es muy probable que al investigar en estos campos, encontráramos hallazgos que distinguieran todavía más los perfiles con mayor predisposición a tumor de aquellos con menor potencial. Y aun en caso de no encontrar datos estadísticamente significativos, como nos ocurre en nuestro trabajo en la parte del análisis de genes alterados no inmunorreguladores, la mera contribución al conocimiento sobre el

proceso carcinogénico laríngeo ya supondría un avance en un campo todavía por definir plenamente.

A diferencia de tumores de otras localizaciones y a pesar de los sucesivos ensayos realizados, seguimos como ya hemos mencionado sin ningún biomarcador validado. Sería de gran interés establecer unos estándares fijos y unívocos a la hora de analizar las alteraciones genéticas, la selección de pacientes, los métodos realizados, los predictores usados etc.

Los autores de los últimos grandes metaanálisis sobre el tema que mencionábamos antes, que revisan los estudios realizados hasta la fecha, coinciden en que la ausencia de una estandarización, que impide generalizar ningún resultado (35,66,122,123) ya que la mayor debilidad que tenemos en esta área es la enorme variabilidad y la imposibilidad de extrapolar cualquier resultado a la práctica clínica diaria. Ni siquiera las últimas revisiones bibliográficas como las de Basheet et al., Falco et al. o Manterola et al. (66,122,123) son capaces de identificar un marcador constante o alguna alteración singular repetida entre todos los ensayos realizados hasta la fecha. Es necesario por tanto concretar unas bases sobre las que poder seguir realizando estudios para conseguir unos resultados que puedan ser validados para la práctica clínica.

5. Fortalezas del estudio

De la misma manera que se han expuesto las limitaciones del estudio, nuestro trabajo tiene unas fortalezas que no deberían menospreciarse.

1- Como se ha mencionado anteriormente, no existe apenas información sobre nuestros objetivos de estudio, por lo que nuestros resultados resultan destacables por el mero hecho de contribuir a arrojar más luz sobre el proceso carcinogénico de cabeza y cuello.

2- Sumado al punto anterior, al no estudiar sólo pacientes con cáncer laríngeo declarado sino estadios de premalignidad, nuestros hallazgos permiten sentar las bases que culminen

en una detección de la enfermedad en estadios tratables y prevenibles, por lo que el impacto clínico puede resultar mucho más significativo.

3- A pesar de contar con las limitaciones que hemos expuesto en el apartado anterior, hemos sido capaces de encontrar resultados estadísticamente significativos y establecer un perfil distinguible de las displasias con alto riesgo de evolución a cáncer.

4- Los resultados sobre el perfil mutacional, coinciden con las revisiones más destacables hasta fecha, a pesar de no haber encontrado un perfil distinguible de cada una de nuestras poblaciones de estudio.

Realizar estudios en un futuro basados en este trabajo, en el que se ampliara el tamaño muestral de la población estudiada y se centrara el estudio en las vías de señalización relacionadas con la inmunorregulación, podrían añadir robustez y permitir dilucidar un biomarcador efectivo en la práctica clínica para la prevención precoz del desarrollo del cáncer de laringe.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1) En estados de premalignidad, como son las displasias, ya existen alteraciones genéticas presentes en el CCC, aunque no hemos encontrado ninguna alteración específica que podamos reconocer como signo de progresión.
2. Existe un nivel de expresión de genes inmunorreguladores diferente entre las displasias con evolución a cáncer y las displasias sin evolución, y también según el grado de displasia de las lesiones, que podría usarse como criterio diagnóstico de clasificación de las lesiones además del criterio morfológico puro.
3. Las displasias con evolución a cáncer presentan unos niveles de expresión mayores de *IDO1*, *PDL1*, *STAT3* y *CLXCL9* y unos niveles de expresión menores de *CTLA4* que las displasias sin evolución, cuya modulación podría constituir una diana terapéutica para la prevención de la progresión a cáncer laríngeo, ya que no sólo se podría mejorar la supervivencia, sino que también podríamos frenar el desarrollo de enfermedad.
4. Puesto que hay vías de señalización alteradas en displasias de *alto grado* frente a las displasias de *bajo grado*, véase *PDL1*, *PDL2* y *STAT3*, estos marcadores podrían establecerse como nuevos criterios de clasificación de severidad de las displasias además del diagnóstico anatomopatológico del grado de displasia.
5. La firma de expresión génica formada por *CXCL9*, *IDO1*, *PDL1*, *STAT3* y *CTLA4*, presenta una mayor especificidad con el riesgo de evolución a cáncer que el nivel de expresión de cada uno de estos genes en particular, y podría utilizarse como biomarcador de riesgo de progresión a neoplasia en las displasias de laringe.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Cancer Statistics Facts [Internet]. Disponible en: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/laryn.html>
2. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Las cifras del cáncer en España 2022 [Internet]. 2022. Disponible en: <https://seom.org/publicaciones/el-cancer-en-espanyacom>
3. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014;64(1):9–29.
4. Edge BS, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. *Ann Surg Oncol.* 2010;17:1471–4.
5. Hoffman HT, Porter K, Karnell LH, Cooper JS, Weber RS, Langer CJ, et al. Laryngeal cancer in the United States: Changes in demographics, patterns of care, and survival. *Laryngoscope.* 2006;116(9 SUPPL. 2):1–13.
6. Panwar A, Lindau R 3rd, Wieland A. Management of premalignant lesions of the larynx. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2013;13(9):1045–1051.
7. Poch Broto J, Pérez Carretero M, Iglesias Moreno M. C., Saiz Ayala A., Rodríguez Gómez F., Arrazola García J. MPG. *Otorrinolaringología y Patología Cervicofacial.* Capítulo 35. Cáncer de Laringe. Editorial Médica Panamericana; 2006. 299–308 p.
8. Grasp MC, Neuwirth-Riedl K, Vutuc C, Horak F, Vorbeck F, Banyai M. Risk of vocal chord dysplasia in relation to smoking, alcohol intake and occupation. *Eur J Epidemiol.* 1990;6(1):45–8.
9. Menvielle G., Luce D., Goldberg D. LA. Smoking, alcohol drinking, occupational exposures and social inequalities in hypopharyngeal and laryngeal cancer. *Int J Epidemiol.* 2004;33:799–806.
10. Young, R. J., Urban D., Angel C., Corry J., Lyons B., Vallance N., Kleid S., Iseli T.A., Solomon B. RD. Frequency and prognostic significance of p16 INK4A protein overexpression and transcriptionally active human papillomavirus infection in

- laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2015;112:1098–104.
11. Poch Broto J., Pérez Carretero M., Iglesias Moreno M. C., Saiz Ayala A., Rodríguez Gómez F., Arrazola García J. MPG. Capítulo 33 Laringitis. In: *Otorrinolaringología y Patología Cervicofacial*. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2006. p. 291–3.
 12. J.S. Isenberg, D.L. Crozier SHD. Institutional and comprehensive review of laryngeal leukoplakia. *Ann Otol Rhinol Laryngol* [Internet]. 2008;117(1):74–9.
 13. Crissman JD. Laryngeal keratosis. *Head Neck Sugery*. 1979;1:386–91.
 14. Kambič V, Gale N, Ferluga D. Laryngeal hyperplastic lesions, follow-up study and application of lectins and anticytokeratins for their evaluation. *Pathol Res Pract*. 1992;188(8):1067–77.
 15. Rohde M, Grøntved ÅM, Krogdahl A, Godballe C. Aggressive elimination of precancerous lesions of the vocal cords to avoid risk of cancer. *Dan Med J*. 2012;59(5).
 16. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & Genetics. Head and Neck Tumours. International Agency for Research on Cancer (IARC). 2005;177–80.
 17. Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol*. 2006;42(10):987–93.
 18. Thompson LDR. Laryngeal Dysplasia, Squamous Cell Carcinoma, and Variants. *Surg Pathol Clin* [Internet]. 2017;10(1):15–33.
 19. Odell E, Eckel HE, Simo R, Quer M, Paleri V, Klussmann JP, et al. European Laryngological Society position paper on laryngeal dysplasia Part I: aetiology and pathological classification. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology* [Internet]. 2021;278(6):1717–22.
 20. Blackwell K.E., Calcaterra T.C. FY. Laryngeal Dysplasia: Epidemiology and treatment outcome. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1995;104.
 21. Leirens J., Vidts G., Schmelzer B., Della Faille D., Katz S. VCP. Premalignant Lesions of the Vocal Cords. *Acta Otolaryngol*. 1997;117:903–8.

22. Gallo A, de Vincentiis M, Rocca C Della, Moi R, Simonelli M, Minni A, et al. Evolution of precancerous laryngeal lesions: A clinicopathologic study with long-term follow-up on 259 patients. *Head Neck*. 2001;23(1):42–7.
23. Ricci G, Molini E, Faralli M, Simoncelli C. Retrospective study on precancerous laryngeal lesions: long-term follow-up. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2003;23(5):362–7.
24. Henríquez Alarcón M, Altuna Mariezkurrena X, Estéfano Rodríguez J, Vaquero Pérez M, Algaba Guimera J. Tratamiento con láser CO 2 de las lesiones glóticas leucoplásicas premalignas. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2003;54(9):625–32.
25. Spielmann PM, Palmer T, McClymont L. 15-Year review of laryngeal and oral dysplasias and progression to invasive carcinoma. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*. 2010;267(3):423–7.
26. Zhang HK, Liu HG. Is severe dysplasia the same lesion as carcinoma in situ? 10-Year follow-up of laryngeal precancerous lesions. *Acta Otolaryngol*. 2012;132(3):325–8.
27. Dispenza F., De Stefano A., Marchese D., Martines F. DC. Management of laryngeal precancerous lesions. *Auris Nasus Larynx*. 2012;39:280–3.
28. Mehanna H, Paleri V, Robson A, Wight R, Helliwell T. Consensus statement by otorhinolaryngologists and pathologists on the diagnosis and management of laryngeal dysplasia. *Clin Otolaryngol*. 2010;35(3):170–6.
29. Bergshoeff VE, Van Der Heijden SJA, Haesevoets A, Litjens SGH, Bot FJ, Voogd AC, et al. Chromosome instability predicts progression of premalignant lesions of the larynx. *Pathology*. 2014;46(3):216–24.
30. Haddad R. I. SD. M. Recent advances in head and neck cancer reconstruction. *New Engl J Med*. 2008;359:1143–54.
31. Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. The Mutational Landscape of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Science (80-)*. 2011;333(6046):1157–60.
32. Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, Bettegowda C, Chang K, Li RJ, Fakhry C, Xie TX, Zhang J, Wang J, Zhang N, El-Naggar AK, Jasser SA, Weinstein JN, Treviño L, Drummond JA, Muzny DM, Wu Y, Wood LD, Hruban RH, Westra WH, Koch

- WM, Califano JA, Gibbs RA, Sidransky D, Vogelstein B, Velculescu VE, Papadopoulos N, Wheeler DA, Kinzler KW, Myers JN. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science*. 2011 Aug 26;333(6046):1154-7.
33. Hoesli R. C., Ludwig M.L., Michmerhuizen N.L., Rosko A.J., Spector M.E., Brenner J.C. BAC. Genomic sequencing and Precision Medicine in Head and Neck Cancers. *Eur J Sur Oncol*. 2017;43(5):884–92.
 34. Network GA. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*. 201AD;517(7536):576–82.
 35. Farah CS. Molecular landscape of head and neck cancer and implications for therapy. *Ann Transl Med*. 2021;9(10):915–915.
 36. Hedberg ML, Goh G, Chiosea SI, Bauman JE, Freilino ML, Zeng Y, et al. Genetic landscape of metastatic and recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Invest*. 2016;126(1):169–80.
 37. Morris L. G. CRWL et al. The molecular landscape of recurrent and metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *JAMA ONCOL*. 2016;3(2):244–55.
 38. Seiwert TY, Zuo Z, Keck MK, Khattri A, Pedomallu CS, Stricker T, Brown C, Pugh TJ, Stojanov P, Cho J, Lawrence MS, Getz G, Brägelmann J, DeBoer R, Weichselbaum RR, Langerman A, Portugal L, Blair E, Stenson K, Lingen MW, Cohen EE, Vokes EE, White KP, Hammerman PS. Integrative and comparative genomic analysis of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2015 Feb 1;21(3):632-41.
 39. Ando M, Kawazu M, Ueno T, Fukumura K, Yamato A, Soda M, et al. Cancer-associated missense mutations of caspase-8 activate nuclear factor- κ B signaling. *Cancer Sci*. 2013;104(8):1002–8.
 40. Weizmann Institute of Science. Gene Cards: The Human Gene Database [Internet]. Disponible en: <https://www.genecards.org/>
 41. Mandruzzato S, Bresseur F, Andry G, Boon T, Bruggen P van der. A CASP-8 Mutation Recognized by Cytolytic T Lymphocytes on a Human Head and Neck Carcinoma. *J Exp Med*. 2002;186(5):785–93.

42. Li C, Egloff AM, Sen M, Grandis JR, Johnson DE. Caspase-8 mutations in head and neck cancer confer resistance to death receptor-mediated apoptosis and enhance migration, invasion, and tumor growth. *Mol Oncol*. 2014;8(7):1220–30.
43. Tang Y, Liu Y, Zhao W, Yu T, Yu H. Caspase-8 polymorphisms and risk of oral squamous cell carcinoma. *Exp Ther Med*. 2015;10(6):2267–76.
44. Lawrence MS, Sougnez C, Lichtenstein L, Cibulskis K, Lander E, Gabriel SB, et al. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*. 2015;517(7536):576–82.
45. Vossen DM, Verhagen CVM, Verheij M, Wessels LFA, Vens C, van den Brekel MWM. Comparative genomic analysis of oral versus laryngeal and pharyngeal cancer. *Oral Oncol [Internet]*. 2018;81(December 2017):35–44.
46. Granda-Díaz R, Menéndez ST, Mallo DP, Hermida-Prado F, Rodríguez R, Suárez-Fernández L, et al. The novel role of SOX2 as an early predictor of cancer risk in patients with laryngeal precancerous lesions. *Cancers (Basel)*. 2019;11(3):1–11.
47. Science WI of. Gene Cards CDKN2A [Internet]. Disponible en: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CDKN2A&keywords=cdkn2a>
48. Pierini S., Jordanov S. H., Mitkova A. V., Chalakov I. J., Melnicharov M. B., Kunev K. V., Mitev V. I., Kaneva R. P. GTE. Promoter hypermethylation of CDKN2A, MGMT, MLH1 and DAPK genes in laryngeal squamous cell carcinoma and their associations with clinical profiles of the patients. *Head Neck*. 2014;36(10):1391.
49. Josena K. Stephen, George Divine, Kang Mei Chen, Dhananajay Chitale S, Havard and MJW. Significance of p16 in Site-specific HPV Positive and HPV Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Clin Oncol*. 2013;2(1):51–61.
50. Weizmann Institute of Science. Gene Cards FADD [Internet]. Disponible en: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FADD&keywords=fadd>
51. Solarski M, Rotondo F, Foulkes WD, Priest JR, Syro L V, Butz H, et al. DICER1 gene mutations in endocrine tumors. *Endocr Relat Cancer*. 2018;25(3):R197–208.
52. Robertson JC, Jorcyk CL, Oxford JT. DICER1 syndrome: DICER1 mutations in rare

- cancers. *Cancers* (Basel). 2018;10(5):1–17.
53. Cantini LP, Andino LM, Attaway CC, Butler B, Dumitriu A, Blackshaw A, et al. Identification and characterization of Dicer1e, a Dicer1 protein variant, in oral cancer cells. *Mol Cancer*. 2014;13(1):1–15.
 54. Gao C, Li X, Tong B, Wu K, Liu Y, Anniko M, et al. Up-regulated expression of Dicer reveals poor prognosis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol*. 2014;134(9):959–63.
 55. Melath A, Santhakumar GK, Madhavannair SS, Nedumgottil BM, Ramanathan A. A novel heterozygous mutation (F252Y) in Exon 7 of the IRF6 gene is associated with oral squamous cell carcinomas. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2013;14(11):6803–6.
 56. Weizmann Institute of Science. Gene Cards CCDN1 [Internet]. Disponible en: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CCND1&keywords=ccd1>
 57. Science WI of. Gene Cards NOCTH 1 [Internet]. p. Gene Cards. Disponible en: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NOTCH1&keywords=notch,1>
 58. Science WI of. Gene Cards NOTCH 3. :Gene Cards. Disponible en: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NOTCH3&keywords=notch,3>
 59. Sun W, Gaykalova DA, Ochs MF, Mambo E, Arnaoutakis D, Liu Y, Loyo M, Agrawal N, Howard J, Li R, Ahn S, Fertig E, Sidransky D, Houghton J, Buddavarapu K, Sanford T, Choudhary A, Darden W, Adai A, Latham G, Bishop J, Sharma R, Westra WH, Hennessey P, Chung CH, Califano JA. Activation of the NOTCH pathway in head and neck cancer. *Cancer Res*. 2014 Feb 15;74(4):1091-104.
 60. Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* (80-). 2011;333(6046):1157–60.
 61. Science WI of. Gene Cards PI3KCA [Internet]. Disponible en: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PIK3CA&keywords=PI3KCA>

62. Pinzón CE, Serrano ML, Sanabria MC. Role of phosphatidylinositol 3-kinase pathway (PI3K/Akt) in humans. *Rev Ciencias la Salud*. 2009;7(2):47–66.
63. Watanabe S., Sato K., Okazaki Y., Tonogi M., Tanaka Y. YG. Activation of PI3K-AKT Pathway in Oral Epithelial Dysplasia and Early Cancer of Tongue. *Bull Tokyo Dent Coll*. 2009;50(3):125–33.
64. Kaur J., Sawhney M., DattaGupta S., Shukla N. K., Srivastava A. RR. Clinical significance of Phosphatidyl Inositol Synthasa overexpression in oral cancer. *BMC Cancer*. 2010;10(168).
65. Massarelli E, Liu DD, Lee JJ, El-Naggar AK, Muzio L Lo, Staibano S, et al. Akt activation correlates with adverse outcome in tongue cancer. *Cancer*. 2005;104(11):2430–6.
66. Manterola L., Aguirre P., Larrea E., Arestin M., Gaafar A., Elorriaga K., Goicochea I. AM. Mutational profiling can identify laryngeal dysplasia at risk of progression to invasive carcinoma. *Sci Rep*. 2018;8:6613.
67. Science WI of. Gene Cards PTEN [Internet]. Disponible en: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PTEN&keywords=pten>
68. Karameris A, Ragos V, Peschos D, Mastronikolis SN, Papadas AT, Liatsos C, et al. Deregulation of PTEN Expression in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Based on Tissue Microarray Digital Analysis. *Anticancer Res*. 2017;37(10):5521–4.
69. Schultz KAP, Rednam SP, Kamihara J, Doros L, Achatz MI, Wasserman JD, et al. PTEN, DICER1, FH, and their associated tumor susceptibility syndromes: Clinical features, genetics, and surveillance recommendations in childhood. *Clin Cancer Res*. 2017;23(12):e76–82.
70. Lingen M, Pinto A, Mendes R, Franchini R, Czerninski R, Tilakaratne W, et al. Genetics/epigenetics of oral premalignancy: Current status and future research. *Oral Dis*. 2011;17(SUPPL. 1):7–22.
71. Soni S, Kaur J, Kumar A, Chakravarti N, Mathur M, Bahadur S, et al. Alterations of Rb pathway components are frequent events in patients with oral epithelial dysplasia and predict clinical outcome in patients with squamous cell carcinoma. *Oncology*. 2005;68(4–6):314–25.

72. Ioachim E. Glycoprotein CD44 expression in benign, premalignant and malignant epithelial lesions of the larynx: An immunohistochemical study including correlation with Rb, p53, Ki-67 and PCNA. *Histol Histopathol.* 1999;14(4):1113–8.
73. Sadri M, McMahon J, Parker A. Laryngeal dysplasia: aetiology and molecular biology. *J Laryngol Otol.* 2006 Mar;120(3):170-7.
74. Koppam J, Chiffelle J, Angelino P, Piersigilli A, Zangger N, Delorenzi M, et al. RIP4 inhibits STAT3 signaling to sustain lung adenocarcinoma differentiation. *Cell Death Differ* [Internet]. 2017;24(10):1761–71.
75. Liu DQ, Li FF, Zhang JB, Zhou TJ, Xue WQ, Zheng XH, et al. Increased RIPK4 expression is associated with progression and poor prognosis in cervical squamous cell carcinoma patients. *Sci Rep* [Internet]. 2015;5(June):1–13.
76. Wang X, Zhu W, Zhou Y, Xu W, Wang H. RIPK4 is downregulated in poorly differentiated tongue cancer and is associated with migration/invasion and cisplatin-induced apoptosis. *Int J Biol Markers.* 2014;29(2).
77. Gong Y, Luo X, Yang J, Jiang Q, Liu Z. RIPK4 promoted the tumorigenicity of nasopharyngeal carcinoma cells. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2018;108(August):1–6.
78. Science WI of. Gene Cards SYNE 1 [Internet]. Disponible en: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SYNE1&keywords=syne,1>
79. Science WI of. Gene Cards SYNE 2. Disponible en: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SYNE2&keywords=syne,2>
80. Denais C. LJ, Biol M. Nuclear Mechanics in Cancer. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2014;773:435–70.
81. K.Tomkova, M. Tomka VZ. Contribution of p53, p63, and p73 to the developmental diseases and cancer. *Neoplasma* [Internet]. 2008;55(3):177–81.
82. Munck-Wikland E, Kuylenstierna R, Lindholm J, Auer G. p53 Immunostaining and image cytometry DNA analysis in precancerous and cancerous squamous epithelial lesions of the larynx. *Head Neck.* 2002;19(2):107–15.
83. Tuna M, Amos CI, Mills GB. Genome-Wide Analysis of Head and Neck Squamous

- Cell Carcinomas Reveals HPV, TP53, Smoking and Alcohol-Related Allele-Based Acquired Uniparental Disomy Genomic Alterations. *Neoplasia (United States)* [Internet]. 2019;21(2):197–205.
84. Vousden KH LD. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;(4):275–83.
 85. Bortoluzzi MC, Yurgel LS, Dekker NP, Jordan RCK, Regezi JA. Assessment of p63 expression in oral squamous cell carcinomas and dysplasias. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2004;98(6):698–704.
 86. Cruz IB, Snijders PJF, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Snow GB, Walboomers JM, et al. A novel heterozygous mutation (F252Y) in Exon 7 of the IRF6 gene is associated with oral squamous cell carcinomas. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 1998;14(11):150–8.
 87. Murti PR, Warnakulasuriya KAAS, Johnson NW, Bhonsle RB, Gupta PC, Daftary DK, et al. P53 Expression in Oral Precancer As a Marker for Malignant Potential. *J Oral Pathol Med.* 1998;27(5):191–6.
 88. Kodani I, Osaki M, Shomori K, Araki K, Goto E, Ryoke K, Ito H. Minichromosome maintenance 2 expression is correlated with mode of invasion and prognosis in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 2003 Sep;32(8):468-74..
 89. Shah NG, Trivedi TI, Tankshali RA, Goswami JA, Shah JS, Jetly DH, Kobawala TP, Patel KC, Shukla SN, Shah PM, Verma RJ. Molecular alterations in oral carcinogenesis: significant risk predictors in malignant transformation and tumor progression. *Int J Biol Markers.* 2007 Apr-Jun;22(2):132-43..
 90. Smith J, Rattay T, McConkey C, Helliwell T, Mehanna H. Biomarkers in dysplasia of the oral cavity: A systematic review. *Oral Oncol* [Internet]. 2009;45(8):647–53.
 91. Manterola L, Aguirre P, Larrea E, Arestín M, Gaafar A, Elorriaga K, et al. Mutational profiling can identify laryngeal dysplasia at risk of progression to invasive carcinoma. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–9.
 92. Thurfjell N, Coates PJ, Boldrup L, Lindgren B, Bäcklund B, Uusitalo T, Mahani D, Dabelsteen E, Dahlqvist A, Sjöström B, Roos G, Vojtesek B, Nenutil R, Nylander K. Function and importance of p63 in normal oral mucosa and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Adv Otorhinolaryngol.* 2005;62:49-57..

93. Oliveira LR, Ribeiro-Silva A, Costa JPO, Simões AL, Matteo MAS Di, Zucoloto S. Prognostic factors and survival analysis in a sample of oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2008;106(5):685–95.
94. Yan B., Broek R. V., Saleh A. D., Mehta A., Van Waes C. CZ. Signaling Networks of Activated Oncogenic and Altered Tumor Suppressor Genes in Head and Neck Cancer. *J Carcinog Mutagen*. 2015;7(4).
95. Nagatsuka H, Ishiwari Y, Tsujigiwa H, Nakano K, Nagai N. Quantitation of epidermal growth factor receptor gene amplification by competitive polymerase chain reaction in pre-malignant and malignant oral epithelial lesions. *Oral Oncol*. 2001 Oct;37(7):599-604.
96. Grandis J.R. TDJ. Elevated Levels of Transforming Growth Factor alpha and Epidermal Growth Factor Receptor Messenger RNA Are Early Markers of Carcinogenesis in Head and Neck Cancer. *Cancer Res*. 1993;53:3579–84.
97. Benchekroun M. T., Saintigny P., Thomas S. M., El-Naggar A. K., Papadimitrakopoulou V., Ren H., Lang W., Fan Y., Huang J., Feng L., Lee J. J., Kim E. S., Hong W. K., Johnson F. M., Grandis J. R. ML. Epidermal Growth Factor Receptor Expression and Gene Copy Number in the Risk of Oral Cancer. *Cancer Prev Res*. 2010;3(7):800–9.
98. Solomon B, Young RJ, Rischin D. Head and neck squamous cell carcinoma: Genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2018;52(October 2017):228–40.
99. Georgia Karpathiou JMD and MP. Laryngeal Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*. 2020;(1296):79–101.
100. Li S, Xia X, Mellieon FM, Liu J, Steele S. Candidate genes associated with tumor regression mediated by intratumoral Il-12 electroporation gene therapy. *Mol Ther* [Internet]. 2004;9(3):347–54.
101. Li Y, Wu T, Gong S, Zhou H, Yu L, Liang M, et al. Analysis of the Prognosis and Therapeutic Value of the CXC Chemokine Family in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Front Oncol*. 2021;10(January):1–13.

102. Chang KP, Wu CC, Fang KH, Tsai CY, Chang YL, Liu SC, et al. Serum levels of chemokine (C-X₂-C motif) ligand 9 (CXCL9) are associated with tumor progression and treatment outcome in patients with oral cavity squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* [Internet]. 2013;49(8):802–7.
103. Li S, Xia X, Zhang X, Suen J. Regression of tumors by IFN- \pm electroporation gene therapy and analysis of the responsible genes by cDNA array. *Gene Ther.* 2002;9(6):390–7.
104. Yang CW, Wang SF, Yang XL, Wang L, Niu L, Liu JX. Identification of gene expression models for laryngeal squamous cell carcinoma using co-expression network analysis. *Med (United States)*. 2018;97(7).
105. Du XX, He C, Lu X, Guo YL, Chen ZH, Cai LJ. YAP/STAT3 promotes the immune escape of larynx carcinoma by activating VEGFR1-TGF β signaling to facilitate PD-L1 expression in M2-like TAMs. *Exp Cell Res.* 2021 Aug 15;405(2):112655
106. Sailer V, Sailer U, Bawden EG, Zarbl R, Wiek C, Vogt TJ, et al. DNA methylation of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) in head and neck squamous cell carcinomas correlates with IDO1 expression, HPV status, patients' survival, immune cell infiltrates, mutational load, and interferon γ signature. *EBioMedicine* [Internet]. 2019;48:341–52.
107. Lin DJ, Ng JCK, Huang L, Robinson M, O'Hara J, Wilson JA, Mellor AL. The immunotherapeutic role of indoleamine 2,3-dioxygenase in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review. *Clin Otolaryngol.* 2021 Sep;46(5):919-934..
108. Erfani N, Khademi B, Haghshenas MR, Mojtahedi Z, Khademi B, Ghaderi A. Intracellular CTLA4 and regulatory T cells in patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *Immunol Invest.* 2013;42(2):81-90.
109. Weller P, Bankfalvi A, Gu X, Dominas N, Lehnerdt GF, Zeidler R, et al. The role of tumour FoxP3 as prognostic marker in different subtypes of head and neck cancer. *Eur J Cancer.* 2014;50(7):1291–300.
110. Liu Z, McMichael EL, Shayan G, Li J, Chen K, Srivastava R, et al. Novel effector phenotype of Tim-3⁺ regulatory T cells leads to enhanced suppressive function in head and neck cancer patients. *Clin Cancer Re.* 2018;24(18):4529–4538.

111. Sikorska B, Danilewicz M, Wagrowska-Danilewicz M. HLA-DR expression is a significant prognostic factor in laryngeal cancer. A morphometric study. *Apmis*. 1999;107(4):383–8.
112. Esteban F, Ruiz-Cabello F, Concha A, Pérez Ayala M. JAS-R and FG. HLA-DR expression is associated with excellent prognosis in squamous cell carcinoma of the larynx. *CLIN EXPL METASTAS*. 1990;8(4):319–28.
113. Birtalan E, Danos K, Gurbi B, Brauswetter D, Halasz J, Piurko VK, et al. Expression of PD-L1 on immune cells shows better prognosis in laryngeal, oropharygeal, and hypopharyngeal cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2018;26(7):e79–85.
114. Yu D, Cheng J, Xue K, Zhao X, Wen L, Xu C. Expression of Programmed Death-Ligand 1 in Laryngeal Carcinoma and its Effects on Immune Cell Subgroup Infiltration. *Pathol Oncol Res*. 2019;25(4):1437–43.
115. Szczepanski MJ, Czystowska M, Szajnik M, Boyiadzis M, Kruk-zagajewska A, Szyfter W, et al. Triggering of Toll-like Receptor 4 Expressed on Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Promotes Tumor Development and Protects the Tumor from Immune Attack. *Cancer Res*. 2009;69(7):3105–13.
116. Sato-Kaneko F, Yao S, Ahmadi A, Zhang SS, Hosoya T, Kaneda MM, et al. Combination immunotherapy with TLR agonists and checkpoint inhibitors suppresses head and neck cancer. *JCI Insight*. 2017;2(18):1–18.
117. Katabathula R, Joseph P, Singh S, Zhao S, Kumar B, Gaule P, et al. Multi-scale Pan-cancer Integrative Analyses Identify the STAT3-VSIR Axis as a Key Immunosuppressive Mechanism in Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Res*. 2022;28(5):984–92.
118. Rooney MS, Shukla SA, Wu CJ, Getz G, Hacohen N. Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell*. 2015 Jan 15;160(1-2):48-61
119. Civeira F, Rodríguez-Rey JC, Pocoví M. Introducción a la genética y su utilidad en el diagnóstico de las enfermedades cardiovasculares: conceptos básicos y el ejemplo de la hipercolesterolemia familiar. *Rev Española Cardiol Supl*. 2009;9(2):14–23.
120. Medicine NL of. Mutations and genetic disorders. Disponible en:

<https://medlineplus.gov/genetics/understanding/mutationsanddisorders/possible-mutations/>

121. Ensembl [Internet]. Disponible en: https://www.ensembl.org/info/genome/variation/prediction/predicted_data.html
122. Falco M, Tammaro C, Takeuchi T, Cossu AM, Scafuro G, Zappavigna S, et al. Overview on Molecular Biomarkers for Laryngeal Cancer: Looking for New Answers to an Old Problem. *Cancers (Basel)*. 2022;14(7).
123. Basheeth N, Patil N. Biomarkers in Head and Neck Cancer an Update. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg* [Internet]. 2019;71(s1):1002–11.
124. Nankivell P, Weller M, McConkey C, Paleri V, Mehanna H. Biomarkers in laryngeal dysplasia: A systematic review. *Head Neck* [Internet]. 2011 Aug;33(8):1170–6.
125. Rodrigo JP, García-Pedrero JM, Suárez C, Takes RP, Thompson LDR, Slootweg PJ, et al. Biomarkers predicting malignant progression of laryngeal epithelial precursor lesions: A systematic review. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*. 2012;269(4):1073–83.
126. Pisani LP, Estadella D, Ribeiro DA, Mehra R, Seiwert TY, Gupta S, et al. Efficacy and safety of pembrolizumab in recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma: Pooled analyses after long-term follow-up in KEYNOTE-012. *Anticancer Res* [Internet]. 2022;119(7):153–9.
127. Siu LL, Even C, Mesía R, Remenar E, Daste A, Delord JP, Krauss J, Saba NF, Nabell L, Ready NE, Braña I, Kotecki N, Zandberg DP, Gilbert J, Mehanna H, Bonomi M, Jarkowski A, Melillo G, Armstrong JM, Wildsmith S FJ. Safety and Efficacy of Durvalumab With or Without Tremelimumab in Patients With PD-L1–Low/Negative Recurrent or Metastatic HNSCCThe Phase 2 CONDOR Randomized Clinical Trial. *JAMA ONCOL*. 2019;5(2):195–203.
128. Wan P, Ongkasuwan J, Martinez J, Sandulache V, Deng D, Jiang J, et al. Biomarkers for Malignant Potential in Vocal Fold Leukoplakia: A State of the Art Review. *Otolaryngol - Head Neck Surg (United States)* [Internet]. 2021;164(4):751–8.

