



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

PROGRAMA DE DOCTORADO DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS DE RESPUESTA
EN PACIENTES CON CARCINOMA ESCAMOSO
DE CABEZA Y CUELLO**

Beatriz Cirauqui Cirauqui

Barcelona, 2021



Universitat Autònoma de Barcelona

PROGRAMA DE DOCTORADO DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

**FACTORES PRONÓSTICOS Y PREDICTIVOS DE RESPUESTA
EN PACIENTES CON CARCINOMA ESCAMOSO
DE CABEZA Y CUELLO**

Autora

Beatriz Cirauqui Cirauqui

Directores

Mireia Margelí Vila

Rafael Rosell Costa

Tutor

Manel Monreal Bosch

Barcelona, 2021

A mi abuela Josefina,

Te lo debía, ...

Nadie estaría tan orgulloso de mí, ni se lo contaría a más gente, ...

A todos y cada uno de los pacientes que han hecho posible esta tesis, a los que están, a los que desafortunadamente ya no están, a los que hemos podido analizar y a los que no, ... por dar sentido a todo el trabajo que hago cada día.

A todas las personas que cuidan de ellos, familiares y personal sanitario en general; vuestro trabajo es más importante que el mejor de los fármacos para sacar adelante a los pacientes

A mis directores de tesis. A Mireia Margelí, por tantas cosas, ..., pero, sobre todo, por acompañarme en los mejores y peores momentos y hacerme crecer durante estos últimos 20 años. A Rafael Rosell, por tu ayuda desinteresada cuando me parecía imposible arrancar este proyecto e inculcarme el espíritu investigador.

A Manel Monreal, por toda tu ayuda y por ser un ejemplo de que un gran profesional puede ser una persona cercana con los compañeros y los pacientes.

A Anna Martínez, gracias por tu ayuda desinteresada, tu optimismo, ayudarme a ver que un problema es una oportunidad y sacar todo adelante cuando más lo necesitaba. Eres increíble...

A Ricard Mesía, por creer en mí, por ser un referente, por tu apoyo incondicional y por ser un punto de inflexión en mi carrera profesional. Nunca podré agradecerte todo lo que haces por mí.

A todo el servicio de Oncología Médica, por ser una gran familia y hacer que el día a día sea más fácil. Gracias por todo vuestro apoyo durante estos años y espero que muchos más.

Quiero hacer un agradecimiento especial a mis compañeros del equipo B. A Vanesa Quiroga, por todo, por tu rojo y por estar siempre ahí. A Iris Teruel, por tu gran trabajo en silencio. A Marga Romeo, por tus palabras inmerecidas. A Eudald Felip, por tu frescura y humildad. Sois el *dream team*.

A Teresa Morán y Cris Bugés, por compartir sus experiencias conmigo. Todo ha sido más sencillo gracias a vosotras.

A mis compañeros de la unidad funcional de cabeza y cuello. Gracias por todo lo que me enseñáis cada martes, gracias por vuestra colaboración desinteresada, vuestro espíritu y hacerme disfrutar de esta patología.

En especial, gracias a Ariadna Quer, por todo lo que has hecho en esta tesis y en cada proyecto que hacemos juntas.

A todos los residentes que me han hecho crecer durante estos años, algunos con dedicación al cáncer de cabeza y cuello en la actualidad. Sois un estímulo en mi trabajo.

A todas las personas que han colaborado en el laboratorio, Adrià Bernat, Marta Domenech, Jose Luis Ramírez, Imane Chaib, Itziar Aguirre, Cristina Queralt, ... Sois unos verdaderos ídolos para mí

A las estadísticas Andrea González, Ana Esteve y Ana Drozdowsky, por vuestra rigurosidad y todo lo que he aprendido con vosotras.

A Xavi Martínez, por “salvarme la vida” en el último momento y evitar que esta tesis se quedara encriptada como un jeroglífico.

A mis padres, por enseñarme que con trabajo, amor, honradez, ilusión y una sonrisa en la cara, puedes conseguir todo lo que te propones. Gracias por todos los valores que me habéis transmitido y por todo el apoyo en todas las decisiones que he tomado, algunas difíciles para vosotros.

A mi hermano Roberto, a Laura y al pequeño Daniel. Gracias por vuestra alegría, cariño, sencillez y por estar siempre ahí, aunque sea en la distancia.

A mis familias, los Martínez-Cirauqui, por ser y estar, y los Sánchez-Sánchez, por haberme acogido como una más.

A mis amigos, los de allí, porque no parece haber pasado el tiempo y los de aquí, porque hacen que pase volando.

A Asier, por las horas robadas, por tu inocencia y tu cariño. Te prometo que jugaremos muchas horas.

Y, a Eusebio, por tu paciencia, por intentar comprender, por estar a mi lado cada día, y compartirlo todo. Gracias por todo lo que me das, no se puede expresar con palabras. Gracias por el futuro ...

ABREVIATURAS

ABC: transportadores dependientes de ATP

ADCC: *antibody-dependent cellular cytotoxicity* o citotoxicidad celular mediada por anticuerpo

ADN: ácido desoxirribonucleico

AgtR2: receptor de la angiotensina-II

AKT: gen que codifica la RAC-alfa serina / treonina-proteína quinasa

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ATM: quinasa ataxia telangiectasia mutada

53BP1: proteína 1 de unión a p53

B7.1: CD80 o *cluster of differentiation 80* o cúmulo de diferenciación 80

B7.2: CD86 o *cluster of differentiation 86* o cúmulo de diferenciación 86

BER: *base excision repair* o reparación de escisión de base

bFGF: *basic fibroblast growth factor* o factor de crecimiento básico de fibroblastos

BLM: gen asociado al Síndrome de Bloom

BRT: biorradioterapia

CA: aberraciones cromosómicas

CAF: *cancer-associated fibroblasts* o fibroblastos asociados al cáncer

CECC: carcinoma escamoso de cabeza y cuello

CECC-LA: carcinoma escamoso de cabeza y cuello localmente avanzado

CCEC R/M: CECC recurrente/metastásico

CDK: *cyclin-dependent kinase* o quinasa dependiente de ciclina

CD147: *cluster of differentiation* o grupo de diferenciación 147

CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica

CISH: *chromogenic in situ hybridization* o hibridación *in situ* cromogénica

CLR: control locorregional

CNTF: *ciliary neurotropic factor* o factor neurotrófico ciliar

COF: carcinoma de orofaringe

CPNCP: carcinoma de pulmón no célula pequeña

CPS: *combined positive score* o puntuación positiva combinada

CSC: *cancer stem cells* o células madre tumorales

CSF1R: *colony stimulating factor 1 receptor* o receptor del factor estimulante de colonias-1

CtIP: *c-terminal binding protein 1 (CtBP1) interacting protein* o proteína que interactúa con la proteína de unión c-terminal 1

CTLA-4: *cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4* o antígeno 4 del linfocito T citotóxico

CTR: proteína transportadora de cobre

DBD: *DNA-binding domain* o dominio de unión al ADN

DDR: *DNA damage repair* o reparación del daño de ADN

DHA: dihidroartemisinina

DNA-PK: *DNA-dependent protein kinase* o proteína quinasa dependiente de ADN

DSB: *double strand DNA breaks* o roturas de ADN de doble cadena

E2F1: factor de transcripción E2F1

E6: oncogén E6

E7: oncogén E7

EE: enfermedad estable

EGF: *epidermal growth factor* o factor de crecimiento epidérmico

EGFR: *epidermal growth factor receptor* o receptor del factor de crecimiento epidérmico

EMA: *European Medicines Agency* o Agencia Europea de Medicamentos

EMT: *epithelial mesenchymal transition* o transición epitelio-mesénquima

ERCC1/ ERCC4: *excision repair cross -complementation group 1/4* o proteína de reparación por escisión del grupo de complementación cruzada 1/4

ERK: *extracellular signal- regulated kinase* o quinasa extracelular regulada por señales

FA: anemia de Fanconi

5-FdUMP: 5-fluorodesoxiuridínmonofosfato

FDA: *Food and Drug Administration* o Administración de Alimentos y Medicamentos

FFPE: *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded* o tejidos embebidos en parafina y fijados con formalina

FGF: *fibroblast growth factor* o factor de crecimiento de fibroblastos

GCSF: *granulocyte colony-stimulating factor* o factor estimulante de colonias de granulocitos

GG-NER: *global genomic NER* o ruta NER genómica global

GPCR: *G protein-coupled receptor* o receptor acoplado a la proteína G

IL-6: interleucina-6

H4: histona 4

HGFR: *hepatocyte growth factor receptor* o receptor de factor de crecimiento de hepatocitos

HIF: *hypoxia-inducible factor 1* o factor inducible por hipoxia

HR: *homologous recombination* o recombinación homóloga

HSP90: *heat shock protein 90* o proteína de choque térmico 90

IAP: *inhibitors of apoptosis proteins* o proteínas inhibidoras de la apoptosis

IFN-γ: interferon gamma

IGF: *insulin-like growth factor* o factor de crecimiento parecido a la insulina

IGFR: *insulin-like growth factor receptor* o receptor del IGF

IGFBPs: *insulin-like growth factor-binding proteins* o proteínas de unión con alta afinidad a IGF

IHQ: inmunohistoquímica

IT: inmunoterapia

JAK: Janus quinasa

LIF: *leukemia inhibitory factor* o factor inhibidor de la leucemia

LIG4: ADN ligasa 4

LOH: *loss of heterocigosity* o pérdida de heterocigosidad

LS: largos supervivientes

LT: laringectomía total

MAPK: *mitogen-activated protein kinases* o proteínas quinasas activadas por mitógeno

MDC1: *mediator of DNA damage checkpoint protein 1* o proteína mediadora del punto de control del daño del ADN

MDSC: *myeloid-derived supresor cells* o células supresoras de estirpe mieloide

MET: *hepatocyte growth factor receptor* o receptor del factor de crecimiento de hepatocitos

miR: microARN

MMR: *missmatch repair* o reparación de desajuste

MMSET: *multiple myeloma SET domain*

mTOR: *mammalian target of rapamycin* o diana de rapamicina en células de mamífero

NER: *nucleotide excision repair* o reparación de escisión de nucleótido

NGF: *nerve growth factor* o factor de crecimiento nervioso

NHEJ: *nonhomologous end joining* o unión final no homóloga

OSM: *oncostatin-M*

p16: *cyclin dependent kinase inhibitor 2A* o inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina o CDKN2A

p53: proteína codificada por *TP53*

PARP: *polyADP ribose polymerase* o poli ADP ribosa polimerasa

PCNA: *proliferating cell nuclear antigen* o unión del antígeno nuclear de células en proliferación

PDCD4: *programmed cell death protein 4* o gen que codifica la proteína de muerte celular programada 4

PD1: *programmed death protein 1* o proteína de muerte celular programada 1

PDGF: *platelet derived growth factor* o factor de crecimiento derivado de plaquetas

PD-L1: *programmed death-ligand 1* o ligando de la proteína de muerte programada

PE: progresión de enfermedad

PF: platino y 5-fluorouracilo

PI3K: *phosphoinositide 3-kinase* o fosfatidilinositol-3-quinasa

PIAS: *protein inhibitor of activated STAT* o proteínas inhibidoras de STAT activado

PIK3CA: *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha* o gen que codifica la fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa, subunidad catalítica alfa, también llamada proteína p110 α que es una subunidad catalítica de clase I PI 3-quinasa

PIKK: *phosphoinositide 3-kinase related kinase* o quinasa relacionada con la fosfoinositol 3 quinasa

PKC: *protein kinase C* o proteína quinasa C

PLC γ : *phospholipase C-gamma* o fosfolipasa C gamma

PNKP: *polynucleotide kinase 3'phosphatase* o polinucleotido fosfatasa / quinasa

PRB: proteína del retinoblastoma

PS: *performance status* o estado de rendimiento

pSTAT3: fosfoSTAT3

PTEN: *phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate 3-phosphatase* o fosfatidilinositol-3, 4, 5-trisfosfato 3-fosfatasa

PTIP: *PAX transcription activation domain interacting protein*

PTPs: *protein tyrosine phosphatase* o fosfatasa de proteína tirosina

PTPR: *receptor type tyrosine-protein phosphatase* o fosfatasa de proteína tirosina de tipo receptor

QT: quimioterapia

QRT: quimiorradioterapia

RAP80: *receptor-associated protein 80* o proteína asociada a receptor 80

Rb: retinoblastoma

RC: respuesta completa

RFC: *replication factor C* o factor de replicación C

RIBE: *radiation-induced bystander effect* o efecto espectador inducido por la RT

RIF1: *Replication Timing Regulatory Factor 1*

RP: respuesta parcial

RT: radioterapia

RTK: receptor tirosina quinasa

SBRT: *stereotactic body radiation therapy* o radioterapia estereotáctica del cuerpo

SFK: *Src kinase family* o quinasas de la familia Src

SKI-II: *sphingosine kinase inhibitor 2* o inhibidor no competitivo específico de quinasa 2-(p-hidroxianilino)-4-(p-clorofenil) tiazol

SLP: supervivencia libre de progresión

SG: supervivencia global

SOCS: *supressors of cytokine signalling* o proteínas supresoras de señalización por citoquinas

SP1: *sphingosine-1-phosphate* o esfingosina-1-fosfato

SPHK1: *sphingosine kinase 1* o esfingosina quinasa 1

SSB: *single-stranded DNA binding proteins* o roturas de ADN de cadena simple

STAT: *Signal Transducer and Activator of Transcription* o Transductor de señal y activador de proteínas de transcripción

SUMO: *small ubiquitin-like modifier*

TAD: *transactivation domain* o dominio de transactivación C-terminal

TCGA: *The Cancer Genome Atlas*

TILs: *tumor-infiltrating lymphocytes* o linfocitos infiltrantes de tumor

TNBC: *triple negative breast cancer* o cáncer de mama triple negativo

TTCC: Grupo Español de Tratamiento de Tumores de Cabeza y Cuello

TCC: tumores de cabeza y cuello

TC-NER: *transcription-coupled-NER* o ruta NER acoplada a la transcripción

TEAD: *transcriptional enhancer factor TEF-1* o *TEA domain family member* o factor de transcripción del dominio TEA

TGF- α : *transforming growth factor α* o factor de crecimiento transformante alfa

TGF β : *transforming growth factor β* o factor de crecimiento tumoral beta

TKI: *tyrosine kinase inhibitors* o inhibidores de la tirosina quinasa

TNF: *tumor necrosis factor* o factor de necrosis tumoral

TP53: gen p53

TPS: *tumor proportion score*

TR: tasa de respuesta

TRAF3: TNF receptor-associated factor o gen que codifica el factor asociado al receptor de TNF

Tregs: células T reguladoras

VEGF: *vascular endothelial growth factor* o factor de crecimiento endotelial vascular

VEGFR: *vascular endothelial growth factor* o receptor de factor de crecimiento endotelial vascular

VPH: virus del papiloma humano

WT: wild type o tipo salvaje

XLF: *XRCC4-like factor* o factor parecido a XRCC4

XRCC4: *X-ray repair cross-complementing protein 4* o proteína de reparación de ADN XRCC4

YAP-1: *yes-associated protein 1* o proteína asociada a Yes 1

“Es un error juzgar el pasado con los ojos del presente” Arturo Pérez Reverte

“Estudiar el pasado puede definir el futuro” Confucio

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. HR y NHEJ.....	55
Figura 2. Biología del EGFR.....	63
Figura 3. Efectos asociados a STAT3.....	74
Figura 4. Vía STAT3 e interacción con PTPRT.....	78
Figura 5. Carcinoma escamoso de amígdala p16 positivo.....	102
Figura 6. Imágenes por IHQ de la expresión proteica de pSTAT3.....	103
Figura 7. Resultados de PCR específica de metilación (MSP) del gen <i>PTPRT</i> mediante visualización por gel de agarosa.....	106
Figura 8. Supervivencia global serie de QRT.....	117
Figura 9. Supervivencia global por cáncer de cabeza y cuello en la serie de QRT.....	118
Figura 10. Supervivencia global en los pacientes con segundo tumor primario en la serie de QRT.....	120
Figura 11. Supervivencia global según el control locorregional a los 2 años en la serie de QRT.....	121
Figura 12. Supervivencia global según los niveles de ARNm de 53BP1 en la serie de QRT.....	128
Figura 13. Supervivencia global por cáncer de cabeza y cuello según los niveles de ARNm de 53BP1 en la serie de QRT.....	129
Figura 14. Supervivencia global según los niveles de ARNm de BRCA1 en la serie de QRT.....	130
Figura 15. Supervivencia global por cáncer de cabeza y cuello según los niveles de ARNm de BRCA1 en la serie de QRT.....	131
Figura 16. Supervivencia global según los niveles de ARNm de RAP80 en la serie de QRT.....	132

Figura 17. Supervivencia global por cáncer de cabeza y cuello según los niveles de ARNm de RAP80 en la serie de QRT.....	133
Figura 18. Supervivencia global según los niveles de ARNm de 53BP1 y BRCA1 en la serie de QRT.....	134
Figura 19. Supervivencia global según los niveles de ARNm 53BP1 y RAP80 en la serie de QRT.....	134
Figura 20. Supervivencia global según los niveles de ARNm BRCA1 y RAP80 en la serie de QRT.....	135
Figura 21. Supervivencia libre de progresión en la serie ERBITAX.....	145
Figura 22. Supervivencia libre de progresión según el grado de rash acneiforme por cetuximab en la serie ERBITAX.....	146
Figura 23. Supervivencia global en la serie ERBITAX.....	147
Figura 24. Supervivencia desde el diagnóstico del cáncer de cabeza y cuello en la serie ERBITAX.....	148
Figura 25. Supervivencia global según la exposición previa a cetuximab en la serie ERBITAX.....	149
Figura 26. Supervivencia global según la exposición previa a taxanos en la serie ERBITAX.....	149
Figura 27. Supervivencia global según el grado de rash acneiforme por cetuximab en la serie ERBITAX.....	150
Figura 28. Tiempo a la recidiva según los niveles de ARNm de STAT3 en la serie ERBITAX.....	155
Figura 29. Tiempo a la recidiva según los niveles de ARNm de 53BP1 en la serie ERBITAX.....	157
Figura 30. Supervivencia desde el diagnóstico en los carcinomas de orofaringe según la relación con el VPH en la serie ERBITAX.....	159
Figura 31. Supervivencia libre de progresión según la presencia o ausencia de respuesta en la serie de ERBITAX.....	160

Figura 32. Supervivencia global según la presencia o ausencia de respuesta en la serie de ERBITAX.....	161
Figura 33. Proyecto de investigación futuro.....	204
Figura 34. Supervivencia global según la mutación de <i>TP53</i> en el análisis exploratorio de la serie de ERBITAX.....	260
Figura 35. Respuesta y supervivencia global según la metilación de <i>PTPRT</i> y la sobreexpresión de pSTAT3 por <i>Histoscore</i> en el análisis exploratorio de la serie ERBITAX.....	260
Figura 36. Correlación entre la metilación de <i>PTPRT</i> y la sobreexpresión de pSTAT3 en el análisis del patólogo A en la serie ERBITAX.....	261
Figura 37. Correlación entre la metilación de <i>PTPRT</i> y la sobreexpresión de pSTAT3 en el análisis del patólogo B en la serie ERBITAX.....	262
Figura 38. Supervivencia libre de progresión según la metilación de <i>PTPRT</i> en la serie ERBITAX.....	266
Figura 39. Supervivencia libre de progresión según la sobreexpresión de pSTAT3 en la serie ERBITAX.....	266
Figura 40. Supervivencia libre de progresión según los niveles de ARNm de STAT3 en la serie ERBITAX.....	267
Figura 41. Supervivencia global según la metilación de <i>PTPRT</i> en la serie ERBITAX.....	267
Figura 42. Supervivencia global según la sobreexpresión de pSTAT3 en la serie ERBITAX.....	268
Figura 43. Supervivencia global según los niveles de ARNm de STAT3 en la serie ERBITAX.....	268
Figura 44. Supervivencia desde el diagnóstico según la metilación de <i>PTPRT</i> en la serie ERBITAX.....	269
Figura 45. Supervivencia desde el diagnóstico según la sobreexpresión de pSTAT3 en la serie ERBITAX.....	269

Figura 46. Supervivencia desde el diagnóstico según los niveles de ARNm de STAT3 en la serie ERBITAX.....	270
Figura 47. Supervivencia libre de progresión según los niveles de ARNm 53BP1 en la serie ERBITAX.....	271
Figura 48. Supervivencia global según los niveles de ARNm de 53BP1 en la serie ERBITAX.....	271
Figura 49. Supervivencia libre de progresión en el carcinoma de orofaringe según la relación con el VPH en la serie ERBITAX.....	272
Figura 50. Supervivencia global en el carcinoma de orofaringe según la relación con el VPH en la serie ERBITAX.....	272
Figura 51. Niveles de ARNm de STAT3 según el tipo de tumor en <i>The Human Protein Atlas</i>	273
Figura 52. Niveles de expresión de proteína STAT3 según el tipo de tumor en <i>The Human Protein Atlas</i>	273
Figura 53. Supervivencia global según los niveles de ARNm STAT3 en <i>The Human Protein Atlas</i>	274

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diferencias entre los carcinomas de orofaringe relacionados y no relacionados con el VPH.....	42
Tabla 2. Valor pronóstico y predictivo de EGFR.....	65
Tabla 3. Características basales de los pacientes de la serie de QRT	114
Tabla 4. Respuesta a la quimiorradioterapia en la serie de QRT	115
Tabla 5. Respuesta tras la cirugía de rescate en la serie de QRT.....	116
Tabla 6. Control locorregional a los 2 años en la serie de QRT.....	116
Tabla 7. Características de los pacientes con muestra disponible en la serie de QRT.....	119
Tabla 8. Efecto del control locorregional a los 2 años en la supervivencia global en la serie de QRT.....	120
Tabla 9. Análisis univariado de la supervivencia global según los parámetros clínicos en la serie de QRT.....	122
Tabla 10. Distribución de frecuencia de la respuesta completa a la quimiorradioterapia según los niveles de ARNm de 53BP1 en la serie de QRT.....	123
Tabla 11. Distribución de frecuencia de la respuesta completa a la quimiorradioterapia según los niveles de ARNm de BRCA1 en la serie de QRT	124
Tabla 12. Distribución de frecuencia de la respuesta completa a la quimiorradioterapia según los niveles de ARNm de RAP80 en la serie de QRT.....	124
Tabla 13. Distribución de frecuencia de la respuesta completa a la quimiorradioterapia según los niveles de ARNm de MDC1 en la serie de QRT.....	125
Tabla 14. Distribución de frecuencia de la respuesta completa a la quimiorradioterapia según los niveles de ARNm de RNF8 en la serie de QRT.....	125
Tabla 15. Distribución de frecuencia de la respuesta completa a la quimiorradioterapia según los niveles de ARNm de 53BP1 y BRCA1 en la serie de QRT.....	126

Tabla 16. Distribución de frecuencia de la respuesta completa a la quimiorradioterapia según los niveles de ARNm de 53BP1 y RAP80 en la serie de QRT	126
Tabla 17. Distribución de frecuencia de la respuesta completa a la quimiorradioterapia según los niveles de ARNm de BRCA1 y RAP80 en la serie de QRT.....	127
Tabla 18. Análisis paramétrico y no paramétrico del coeficiente de correlación de Pearson entre los niveles de expresión de ARNm de los distintos biomarcadores en la serie de QRT.....	127
Tabla 19. Efecto de los niveles de ARNm de 53BP1 en la supervivencia global en la serie de QRT.....	128
Tabla 20. Efecto de los niveles de ARNm de 53BP1 en la supervivencia global por cáncer de cabeza y cuello en la serie de QRT.....	129
Tabla 21. Efecto de los niveles de ARNm de BRCA1 en la supervivencia global en la serie de QRT.....	130
Tabla 22. Efecto de los niveles de ARNm de BRCA1 en la supervivencia global por cáncer de cabeza y cuello en la serie de QRT.....	131
Tabla 23. Analisis univariado de la supervivencia global según biomarcadores seleccionados en la serie de QRT.....	136
Tabla 24. Parámetros que pueden influir en la presencia de biopsia disponible en la serie ERBITAX.....	140
Tabla 25. Características clínicas de los pacientes de la serie ERBITAX.....	141
Tabla 26. Respuesta y toxicidad al tratamiento en la serie ERBITAX.....	142
Tabla 27. Respuesta según la exposición previa a cetuximab en la serie ERBITAX....	143
Tabla 28. Respuesta según la exposición previa a taxanos en la serie ERBITAX.....	143
Tabla 29. Respuesta según el PS en el momento de la recurrencia/diseminación en la serie ERBITAX.....	144
Tabla 30. Respuesta según el grado de rash acneiforme por cetuximab en la serie ERBITAX.....	144
Tabla 31. Correlación entre los parámetros de activación de la vía STAT3 en la serie ERBITAX.....	151

Tabla 32. Distribución de frecuencia de la respuesta según la metilación de <i>PTPRT</i> en la serie ERBITAX.....	152
Tabla 33: Distribución de frecuencia de la respuesta según la sobreexpresión de pSTAT3 en la serie ERBITAX.....	152
Tabla 34. Distribución de respuesta de la frecuencia según los niveles de expresión de ARNm de STAT3 en la serie ERBITAX.....	153
Tabla 35. Supervivencia global según los parámetros de activación de la vía STAT3 en la serie ERBITAX.....	154
Tabla 36. Efecto de diferentes parámetros clínicos y biomarcadores en la respuesta al tratamiento en la serie ERBITAX.....	156
Tabla 37. Escalas antiguas de evaluación del <i>performance status</i>	255
Tabla 38. Escalas actuales de evaluación del <i>performance status</i>	256
Tabla 39. Valoración de respuesta en función del comportamiento de las lesiones no medibles y/o la aparición de nuevas lesiones en RECIST 1.1.....	258
Tabla 40. Comparación entre los criterios RECIST 1.0 y 1.1.....	258
Tabla 41. Respuesta según los niveles de expresión de ARNm y las mutaciones de diferentes genes en el estudio preliminar de la serie ERBITAX.....	259
Tabla 42. Correlación entre la metilación de <i>PTPRT</i> y la sobreexpresión de pSTAT3 en el análisis del patólogo A de la serie ERBITAX.....	261
Tabla 43. Correlación entre la metilación de <i>PTPRT</i> y la sobreexpresión de pSTAT3 en el análisis del patólogo B de la serie ERBITAX.....	262
Tabla 44. Distribución de la metilación de <i>PTPRT</i> según los parámetros clínicos en la serie ERBITAX.....	263
Tabla 45. Distribución de la sobreexpresión de pSTAT3 según los parámetros clínicos en la serie ERBITAX.....	264
Tabla 46. Distribución de los niveles de expresión de ARNm de STAT3 según los parámetros clínicos en la serie ERBITAX.....	265

Tabla 47. Respuesta según los niveles de expresión de ARNm de 53BP1 en la serie ERBITAX.....	270
--	-----

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	31
ABSTRACT.....	35
1. INTRODUCCIÓN	39
1.1. CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO (CECC)	41
1.1.1. Epidemiología y factores de riesgo	41
1.1.2. Etiopatogenia	42
1.1.3. Estrategias terapéuticas utilizadas en el CECC.....	44
1.1.3.1. RT	44
1.1.3.2. Quimioterapia (QT).....	45
1.1.3.2.1. Agentes derivados del platino	45
1.1.3.2.2 Taxanos	46
1.1.3.2.3. Agentes antimetabolito: 5-fluorouracilo y metotrexato	46
1.1.3.3. Anticuerpos contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico. Cetuximab y panitumumab.	47
1.1.3.4. Inmunoterapia (IT)	47
1.1.4. CECC localmente avanzado (CECC-LA).....	48
1.1.4.1. Definición	48
1.1.4.2. Tratamiento.....	48
1.1.4.2.1. Quimiorradioterapia (QRT) concomitante	48
1.1.4.2.2. Otros	50
1.1.5. CECC recurrente/metastásico (CECC R/M)	50
1.1.5.1. Definición	50
1.1.5.2. Tratamiento.....	50
1.1.5.2.1. Papel del tratamiento local en la enfermedad recurrente/metastásica	50
1.1.5.2.2. Primera línea de tratamiento.....	51
1.1.5.2.3. Segunda línea de tratamiento	52
1.1.5.2.4. Tercera y posteriores líneas de tratamiento.....	52
1.2. MECANISMOS DE DAÑO Y REPARACIÓN DEL ADN	52
1.2.1. Vías de reparación del ADN.....	53
1.2.1.1. Recombinación homóloga (HR).....	54

1.2.1.2. Unión final no homóloga (NHEJ)	56
1.2.1.3. Reparación de escisión de nucleótido (NER)	56
1.2.2. Relación de las vías de reparación del ADN con la respuesta al tratamiento del CECC	57
1.2.2.1. Daño del ADN inducido por RT	58
1.2.2.2. Daño del DNA inducido por QT	59
1.2.2.3. Daño del DNA inducido por cetuximab	60
1.3. VÍAS ACTIVADAS POR EL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO	61
1.4. MECANISMOS DE RESISTENCIA AL TRATAMIENTO CON AGENTES ANTIEGFR.....	62
1.4.1. Resistencia mediada por la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK): vía del EGFR	64
1.4.2. Resistencia mediada por vías de señalización alternativas	65
1.4.2.1. Vía IGFR/PI3K/AKT	65
1.4.2.2. Vía STAT3	68
1.4.2.2.1. STAT3 y la familia STAT	68
1.4.2.2.2. STAT3 y CECC	69
1.4.2.2.3. Vías de activación de STAT3 en CECC.....	70
1.4.2.2.4. Efectos asociados a la activación de STAT3	72
1.4.2.2.5. Reguladores negativos de STAT3	74
1.4.2.2.6. STAT3 como factor pronóstico.....	77
1.4.2.2.7. STAT3 y resistencia a tratamientos para el CECC	79
1.4.2.2.8. Terapias dirigidas a la vía STAT3	80
1.4.2.3. AXL	81
1.4.2.4. Esfingosina quinasa 1.....	82
1.4.2.5. Proteína asociada a Yes 1 (YAP-1).....	84
1.4.2.6. TP53	85
2. HIPÓTESIS	89
3. OBJETIVOS.....	93
4. MATERIAL Y MÉTODOS	97
3.1. Selección de pacientes y muestras.	99
3.2. Análisis del estado del VPH.....	101

3.3. Análisis por IHQ de la proteína pSTAT3.....	102
3.4. Análisis de expresión génica a nivel de ARN mensajero.....	104
3.5. Análisis de las mutaciones de PTPRT	105
3.6. Análisis de la hipermetilación del promotor de PTPRT.....	105
3.7. Análisis estadístico	106
5. RESULTADOS.....	109
6. DISCUSIÓN	163
7. LIMITACIONES Y FORTALEZAS	187
8. CONCLUSIONES	193
9. LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS.....	197
11. BIBLIOGRAFÍA.....	205
12. ANEXOS.....	253
ANEXO 1. Equivalencias entre las escalas que evalúan el PS.....	255
ANEXO 2. Criterios RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors).....	257
ANEXO 3. Resultados del análisis exploratorio de la serie ERBITAX.....	259
ANEXO 4. Análisis de la correlación entre la metilación de PTPRT y la sobreexpresión de pSTAT3 según los diferentes patólogos	261
ANEXO 5. Anexo de resultados.....	263
ANEXO 6. The Human Protein Atlas	273
ANEXO 7. Publicaciones y comunicaciones en el contexto de la tesis	275
ANEXO 8. Reflexión final de la autora.....	291

RESUMEN

Introducción:

Los carcinomas escamosos de cabeza y cuello (CECC) son tumores que se diagnostican frecuentemente en una fase localmente avanzada, hecho que condiciona un modesto pronóstico. A pesar del manejo multidisciplinar, presentan una supervivencia global (SG) menor al 40% a los 5 años, debida a un 50-60 % de recurrencias locales y un 20-30% de metástasis a distancia a los 2 años. Por todo esto, existe una necesidad de detectar biomarcadores que nos ayuden a seleccionar la mejor modalidad terapéutica para cada paciente y a desarrollar nuevas estrategias que reviertan las resistencias a los tratamientos convencionales.

Objetivos:

Con la hipótesis de que los niveles de expresión de genes implicados en las vías de reparación del ADN y la activación de la vía del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) pueden jugar un papel pronóstico y predictivo de respuesta a diferentes tratamientos del CECC, evaluamos la correlación de los primeros con la eficacia a la quimiorradioterapia (QRT) con platino y de la segunda con la de la combinación de paclitaxel y cetuximab.

Material y métodos:

Para evaluar el primer objetivo, determinamos los niveles de expresión de ARNm de los genes *BRCA1*, *RAP80*, proteína 1 de unión a p53 (*53BP1*), mediador del punto de control del daño del ADN 1 (*MDC1*) y *RNF8*, todos ellos relacionados con la reparación del ADN, y los correlacionamos con la respuesta y la SG en 72 pacientes con CECC localmente avanzado (CECC-LA) tratados con carboplatino semanal AUC 2 y radioterapia (RT).

Para evaluar el segundo objetivo, analizamos retrospectivamente las muestras tumorales disponibles de 52 pacientes de una serie con CECC recurrente/metastásico (CECC R/M) tratados con paclitaxel y cetuximab entre 2008 y 2017, y determinamos los niveles transcripcionales de STAT3, la expresión de STAT3 fosforilado (pSTAT3) y la hipermetilación del promotor del gen de la fosfatasa T de proteína tirosina de tipo receptor (*PTPRT*).

Resultados:

En la primera serie, la respuesta completa (RC) a la QRT fue significativamente superior en los pacientes que tenían tumores con niveles bajos de 53BP1 en comparación con

aquellos con tumores con niveles elevados, y se acompañaba de una tendencia a una mejor SG. Para un pequeño grupo de pacientes con tumores con baja expresión de 53BP1 y BRCA1 o RAP80 alto, la tasa de RC todavía era superior.

En la segunda serie, 58,82% de los tumores presentaron metilación del promotor de *PTPRT* y ésta se asoció significativamente con una menor tasa de respuesta (TR) a paclitaxel y cetuximab. La sobreexpresión de la proteína pSTAT3 se detectó en el 66,67% de los tumores y también se correlacionó con resistencia al tratamiento, aunque no se obtuvieron diferencias significativas.

Conclusiones:

En nuestro primer trabajo observamos que la eficacia de la RT en combinación con carboplatino en el tratamiento del CECC-LA se correlaciona con los niveles de expresión de ARNm de 53BP1 y que los niveles de expresión de ARNm de BRCA1 y RAP80 parecen reforzar su valor predictivo.

En nuestro segundo trabajo, la activación de la vía STAT3, valorada por la sobreexpresión de pSTAT3 y mediada por la metilación del promotor de *PTPRT*, predice resistencia a paclitaxel y cetuximab en CECC R/M.

ABSTRACT

Background:

Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) are tumors that are frequently diagnosed in a locally advanced phase, a fact that determines a bad prognosis. Despite multidisciplinary management, they have a 5-year overall survival (OS) of less than 40%, due to 50-60% local recurrences and 20-30% 2-year distant metastases. For this reason, there is a need to detect biomarkers that help us to select the best therapeutic modality for each patient and develop new strategies to reverse resistance to conventional treatments.

Objectives:

With the hypothesis that the expression levels of genes involved in DNA repair pathways and the activation of the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway may play a prognostic and predictive role in response to different HNSCC treatments, we evaluated the correlation of the first ones with the efficacy of chemoradiotherapy (CRT) with platinum and of the second ones with that of the combination of paclitaxel and cetuximab

Material and methods:

To evaluate the first endpoint, we determined the mRNA expression levels of the genes *BRCA1*, *RAP80*, p53-binding protein 1 (*53BP1*), mediator of DNA damage checkpoint 1 (*MDC1*) and *RNF8*, all of them related to DNA repair and correlated them with response and OS in 72 patients with locally advanced HNSCC (LA-HNSCC) treated with weekly AUC 2 carboplatin and radiotherapy (RT).

To evaluate the second endpoint, we retrospectively analyzed the available tumor samples from 52 patients from a series with recurrent / metastatic HNSCC (R / M HNSCC) treated with paclitaxel and cetuximab between 2008 and 2017, and we determined the transcriptional levels of STAT3, the expression of phosphorylated STAT3 (pSTAT3), and the hypermethylation of the receptor-type tyrosine-protein phosphatase T (*PTPRT*) promoter.

Results:

In the first series, the complete response (CR) to CRT was significantly higher in patients who had tumors with low levels of 53BP1 compared to those with tumors with elevated

levels, and a trend towards better OS. For a small group of patients with tumors with low expression of 53BP1 and high BRCA1 or RAP80 expression, the CR rate was still higher.

In the second series, 58.82% of the tumors presented *PRPRT* promoter methylation and it was significantly associated with a lower response rate to paclitaxel and cetuximab. The overexpression of the pSTAT3 protein was detected in 66.67% of the tumors and was also correlated with resistance to treatment, although no significant differences were reached.

Conclusions:

In our first work we observe that the efficacy of RT in combination with carboplatin in the treatment of LA- HNSCC is correlated with the levels of expression of 53BP1 mRNA, and that the levels of expression of BRCA1 mRNA and RAP80 seem to reinforce its predictive value.

In our second work, the activation of the STAT3 pathway measured by the overexpression of pSTAT3 and mediated by the methylation of the *PTPRT* promoter predicts resistance to paclitaxel and cetuximab in R / M HNSCC.

1. INTRODUCCIÓN

1.1.CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO (CECC)

1.1.1. Epidemiología y factores de riesgo

Los tumores de cabeza y cuello (TCC) conforman una de las neoplasias más frecuentes. En 2018, se diagnosticaron aproximadamente 835000 nuevos casos a nivel mundial, por lo que son el sexto tumor en incidencia (1). De ellos, 9600 se diagnosticaron en España, donde son la quinta neoplasia más incidente en varones. La previsión es que aumente su incidencia anual hasta 12000 a 14000 casos en los próximos años (2). De hecho, en el caso del carcinoma escamoso de laringe, la incidencia española es la más alta de toda Europa. En mujeres, la incidencia es mucho menor, pero ha presentado un incremento en los últimos 10 años relacionado, posiblemente, con la evolución de sus hábitos tóxicos (incremento del consumo de tabaco) (1).

Dentro de los TCC, el tipo histológico más común es el CECC, constituyendo un 90% de las lesiones (3,4). Los factores de riesgo más frecuentes de los CECC son el consumo de alcohol y de tabaco, contribuyendo aproximadamente en el 75% de los casos (5–7). Sin embargo, en los últimos años, se ha demostrado, también, que el virus del papiloma humano (VPH) es un agente patógeno de lesiones, fundamentalmente en los carcinomas de orofaringe (COF) (8). La estimación del porcentaje atribuible al VPH en los COF es del 25%, observándose una gran variabilidad según el área geográfica (9). En numerosos estudios se ha observado una tendencia creciente de la proporción de COF, así como de la incidencia de casos relacionados con el VPH. En Cataluña, el porcentaje ha pasado de alrededor del 8% en el periodo 1991-1997 a casi el 20% en el periodo 2007-2014(10,11). Los COF relacionados con el VPH son diferentes en términos epidemiológicos, moleculares y clínicos, a los no asociados al virus, y presentan un mejor pronóstico (Tabla 1) (12). Por este motivo, se están desarrollando múltiples ensayos clínicos para desintensificar el tratamiento en pacientes con tumores relacionados con el VPH, con estrategias como la reducción de la dosis de radioterapia (RT) o la sustitución de cisplatino por cetuximab, alguno de ellos con resultado negativo (13,14).

Se trata de un grupo de neoplasias malignas potencialmente curables si se diagnostican en una etapa precoz, aunque, desgraciadamente, dos terceras partes de los casos se siguen detectando en una fase locorregional avanzada, definida como estadios III y, sobre todo, IV, sin metástasis a distancia (15). Esto condiciona el modesto pronóstico de estos pacientes, con una supervivencia global (SG) menor al 40% a los 5 años, debida a un 50-60 % de recurrencias locales y un 20-30% de metástasis a distancia a los 2 años (16–20).

Tabla 1. Diferencias entre los carcinomas de orofaringe relacionados y no relacionados con el VPH (Adaptada de (21))

	COF relacionado VPH	COF no relacionado VPH
Edad	Más jóvenes (30-50 años)	Menos jóvenes (60-70 años)
Sexo	3:1 varones	3:1 varones
Nivel socioeconómico	Mayor	Menor
Estado general	Bueno	Peor
Factor de riesgo	Sexo oral	Tabaco, alcohol
Localización más Frecuente	Amígdala y base de lengua	Cualquiera
Histología	Pobremente diferenciado, Basaloide	Bien o moderadamente Diferenciado
Cancerización de campo	No	Sí
Biología	P53: catabolismo aumentado (E6) PRB: catabolismo aumentado (E7) P16: expresión aumentada Menor número de mutaciones	P53 mutado e inactivado PRB no degradado P16-ciclina D1/CDK-PRB desactivado EGFR, survivina Mayor número de mutaciones
Alteraciones Cromosómicas	Menos frecuentes	Frecuentes
Estadio	T precoz N avanzada (quística)	Variable (N sólida)
Metástasis a distancia	Raras	Frecuentes
Incidencia	Aumentando	Disminuyendo
Supervivencia global 3 años	82 %	57 %
Segundos tumores	Raros	Frecuentes

1.1.2. Etiopatogenia

En los CECC relacionados con el tabaco, la transformación de la mucosa normal en carcinoma invasivo sigue un modelo de progresión molecular de carcinogénesis de varios pasos. La pérdida de material genético de la región cromosómica 9p21 y la inactivación de la proteína p16 son las primeras alteraciones identificadas en la mucosa hiperplásica. La transición posterior a la displasia, se caracteriza por la pérdida de las regiones cromosómicas 3p y 17p y por la inactivación de la proteína p53. Seguidamente, la pérdida de las regiones 11q, 13q y 14q preceden a la transición a carcinoma *in situ*. Se identifican pérdidas de las regiones 6p, 8p y 4p durante la transformación a carcinoma invasivo (22,23). Paralelamente, el CECC relacionado con el VPH se induce por la alteración en el genoma del huésped de la expresión del factor E2, el represor transcripcional de las proteínas virales E6 y E7. Éstas actúan como oncoproteínas que se unen y degradan la proteína supresora tumoral p53 y la de retinoblastoma (Rb), respectivamente. La degradación de Rb induce la expresión de p16INK4A, que utilizamos en la práctica clínica como marcador subrogado de infección por VPH (24).

El *Cancer Genome Atlas Network* (TCGA) publicó un análisis exhaustivo de las mutaciones somáticas presentes en alrededor de 280 CECC y mostró que los tumores asociados al VPH están dominados por mutaciones de dominio helicoidal del oncogén que codifica la fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa (*PIK3CA*); dichas alteraciones implican la pérdida del gen que codifica el factor asociado al receptor de TNF (*TRAF3*) y la amplificación del gen del ciclo celular *E2F1*, dando lugar a la proliferación celular descontrolada. En cambio, el CECC relacionado con el tabaquismo demuestra mutaciones casi universales de pérdida de función de *TP53* e inactivación de la proteína reguladora de ciclo celular *CDKN2A*, así como frecuentes alteraciones en el número de copias en el genoma, incluidas las amplificaciones de 3q26/28 y de 11q13/22. También existen alteraciones en los genes que codifican para las proteínas del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), del receptor de factor de crecimiento de hepatocitos (MET) y NOTCH, que promueven la proliferación, la migración y la supervivencia celular a través de las vías de señalización RAS / RAF / quinasa extracelular regulada por señales (ERK), fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) / RAC-alfa serina / treonina-proteína quinasa (AKT) / diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR) y Janus quinasa (JAK) / transductor de señal y activador de proteínas de transcripción (STAT), todas habitualmente desreguladas en CECC (25).

La hipermetilación del ácido desoxirribonucleico (ADN) del supresor tumoral *CDKN2A / p16INK4a* es la modificación epigenética más frecuente observada en CECC que conduce a la proliferación celular (26). Así, también se han involucrado diferentes

alteraciones epigenéticas en la progresión del CECC y la resistencia al tratamiento. Por otro lado, los cambios en la estructura de la cromatina conducen a la desacetilación de la histona y la metilación de la lisina en las colas de la histona, lo que resulta en silenciamiento génico (27).

Por último, los micro ARN (miR) funcionan como supresores tumorales o como oncogenes y regulan genes implicados en la tumorigénesis del CECC (28,29). miR-22 actúa como un supresor tumoral, controlando los niveles de la proteína transmembrana multifuncional CD147, y con frecuencia se regula negativamente en CECC, aumentando procesos como la proliferación, la migración y la invasión. miR-21 se acumula en CECC mostrando características oncogénicas al atacar el gen *PDCD4*, que codifica la *Programmed cell death protein 4*, aumentando la resistencia al tratamiento con cisplatino (30).

En los últimos años, también ha habido un creciente conocimiento de la implicación del microambiente en la carcinogénesis del CECC. La hipoxia, el microambiente inmunitario, los fibroblastos asociados al cáncer (CAF) y el microbioma oral juegan un importante papel en la permisividad de todos los mecanismos oncogénicos que inducen el desarrollo tumoral (31–35).

La integración de todos estos factores genéticos, epigenéticos y del microambiente probablemente nos guiará hacia el desarrollo de un tratamiento personalizado.

1.1.3. Estrategias terapéuticas utilizadas en el CECC

1.1.3.1. RT

La RT sigue siendo una de las modalidades de tratamiento más utilizadas en cáncer en general, y en CECC, en particular. Su objetivo final es provocar daño celular o tisular que, si no es reparable, eventualmente mata a las células. Actúa principalmente de dos maneras (36):

- por un lado, produce un daño directo en el ADN en forma de roturas de cadena simple (SSB) o de doble cadena (DSB)
- por otro, también actúa indirectamente, produciendo radicales libres que se derivan de la ionización o excitación del componente acuoso de las células, que también dañan el ADN.

Por lo tanto, el ADN es el objetivo principal de la muerte celular inducida por la RT y existe una considerable redundancia en la capacidad de las células normales para reparar el daño; por ello, las vías de respuesta al daño del ADN son una diana prometedora para la radiosensibilización selectiva de las células tumorales.

También se han descrito efectos de la RT en el microambiente tumoral, como el impacto en las células implicadas en la inmunidad, y el efecto espectador inducido por la RT (RIBE), donde las células no irradiadas adyacentes o ubicadas lejos de las células o tejidos irradiados demuestran respuestas similares a las de las células irradiadas directamente (37–39)

1.1.3.2. Quimioterapia (QT)

Existen diferentes agentes quimioterápicos utilizados en el manejo del CECC. Pueden ser utilizados en monoterapia, en combinación entre sí o con otras modalidades terapéuticas como la RT, la terapia dirigida o la inmunoterapia (IT).

1.1.3.2.1. Agentes derivados del platino

El mecanismo de acción de los agentes derivados del platino consta de 5 pasos principales:

- Captación celular
- Activación
- Lesión del ADN
- Procesamiento celular de las lesiones
- Activación de mecanismos de muerte celular (apoptosis, necrosis, autofagia)

La captación de platinos por parte de la célula se produce tanto por difusión pasiva como a través de los transportadores de cobre (CTR1 y CTR2) u otros transportadores específicos, de forma activa. Una vez que el platino está dentro de la célula, la menor concentración de iones cloruro favorece la sustitución de sus ligandos de cloruro por moléculas de agua. Los complejos de platino acuoso / activado pueden reaccionar con centros nucleofílicos en bases de ácido desoxirribonucleico (ADN) de purina. Normalmente actúa en la misma cadena de ADN (en *cis*), formando aductos entre bases nitrogenadas de guanina adyacentes. En menor medida, pueden actuar en *trans*, coordinándose con bases de guanina de la cadena complementaria de ADN para

formar enlaces cruzados entre cadenas, que induce una distorsión significativa en la doble hélice de ADN. La lesión en el ADN es reconocida por la maquinaria celular, que intenta reparar la lesión, iniciando finalmente el proceso de muerte celular. El mecanismo más significativo por el cual los complejos de platino clásicos inducen la muerte celular es por la inhibición de la transcripción del ADN. Mientras las ácido ribonucleico (ARN) polimerasas transcriben ADN, se estancan en el enlace cruzado de platino y allí se recluta la maquinaria de reparación acoplada a la transcripción. Si esta maquinaria no puede reparar la lesión, la célula activa una vía de muerte celular programada. En el caso de que la maquinaria sea capaz de reparar la lesión, la célula tumoral es viable, dando lugar a la aparición de mecanismos de resistencia al tratamiento (40,41).

1.1.3.2.2 Taxanos

Los inhibidores de microtúbulos (como los alcaloides de la vinca), y los estabilizadores de microtúbulos (como los taxanos), son dos de las familias de quimioterápicos más activas en cáncer en general, y en los TCC en particular. En este contexto, el paclitaxel es uno de los taxanos más usados.

Los microtúbulos son estructuras dinámicas, que experimentan polimerización y depolimerización a través de la adición y pérdida de subunidades de tubulina en sus extremos. Juegan un papel muy importante en gran número de procesos celulares como son la mitosis, el transporte intracelular y la dinámica del citoesqueleto. Los agentes antimicrotúbulos provocan un bloqueo en esta vía, impidiendo que se puedan producir estos importantes procesos, y dando lugar a un arresto del ciclo celular y la activación de los mecanismos de muerte celular. Además, la importante implicación de los microtúbulos en el transporte axonal es la causa de que su bloqueo se asocie frecuentemente con neurotoxicidad derivada del tratamiento con taxanos en la clínica (42).

1.1.3.2.3. Agentes antimetabolito: 5-fluorouracilo y metotrexato

El concepto farmacológico de antimetabolito consiste en la administración de sustancias muy parecidas a las que fisiológicamente participan en procesos celulares esenciales, pero con propiedades químicas lo suficientemente diferentes como para que sean detectables por los mecanismos celulares. De esta manera, se provoca el bloqueo

de dichos procesos hasta un grado en que el deterioro de la maquinaria celular conduzca por sí mismo a la apoptosis de la célula. Una de las dianas más evidentes para estos productos son los procesos de síntesis de los componentes, reparación y duplicación del ADN.

El 5-fluorouracilo es un profármaco que en el interior celular, es transformado en 5-FdUMP que es su forma activa. Éste actúa como un falso sustrato de la timidilato sintasa impidiendo la síntesis de ADN (43).

El metotrexato es un análogo de ácido fólico que inhibe selectivamente la dihidrofolato-reductasa al competir con el dihidrofolato, con más afinidad por la enzima que el propio sustrato natural. Otro mecanismo potencialmente implicado en la citotoxicidad del metotrexato es la posibilidad de inhibir otras enzimas dependientes de folatos como la timidilato sintasa (44).

1.1.3.3. Anticuerpos contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico. Cetuximab y panitumumab.

Cetuximab es un anticuerpo monoclonal quimérico murino humanizado que se une al dominio extracelular del EGFR, bloqueando el sitio de unión con su ligando, el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Esto provoca la inhibición de la función del receptor y bloquea su cascada de señales, lo que conduce a la detención en la fase G1 del recorrido del ciclo celular e incluso a la muerte celular en ciertas circunstancias. Este arresto en la fase G1 potencia el efecto de la RT y de la QT. Además, induce la internalización de EGFR, lo que puede conllevar una disminución de los receptores disponibles en la superficie celular y también dirige a las células efectoras inmunitarias citotóxicas hacia las células tumorales que expresan EGFR (citotoxicidad celular mediada por anticuerpo, ADCC) (45).

A su vez, panitumumab es un anticuerpo IgG2 completamente humano que reconoce un epítipo diferente al cetuximab en el dominio extracelular de EGFR, evitando, también, la unión del ligando al receptor. Es por ese motivo que existe una resistencia cruzada parcial entre panitumumab y cetuximab, ya que hacen la misma función pero en posiciones distintas (46).

1.1.3.4. Inmunoterapia (IT)

La estrategia de IT más utilizada en cáncer hasta la actualidad es la inhibición de los puntos de control inmune, aunque está creciendo, de forma exponencial, el desarrollo de nuevas alternativas.

Las células tumorales evaden la inmunovigilancia y progresan a través de diferentes mecanismos, incluida la activación de las vías de control inmunitario que suprimen las respuestas inmunitarias antitumorales (34). Los inhibidores de los puntos de control inmune revierten las respuestas inmunitarias antitumorales al interrumpir las señales coinhibitorias y promover la eliminación de células tumorales mediada por el sistema inmunitario. La proteína de muerte programada 1 (PD-1) / ligando de la proteína de muerte programada 1 (PD-L1) y antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4) / B7-1/B7-2 son ejemplos de proteínas de puntos de control que están en las células T o en las células tumorales (47).

1.1.4. CECC localmente avanzado (CECC-LA)

1.1.4.1. Definición

Dos terceras partes de los casos de CECC se siguen diagnosticando en una fase locorregional avanzada y corresponden a tumores en estadios III y, sobre todo, IVA y IVB (15), lo que implica una extensión local a estructuras vecinas o la afectación ganglionar.

Este tipo de tumores se divide en dos grupos fundamentalmente: resecables e irresecables. No existe una definición universalmente aceptada de irresecabilidad. La decisión final depende de las capacidades de la institución y del cirujano. Además, se debe considerar que la cirugía no puede ser adecuada si el equipo médico quirúrgico prevé la imposibilidad de lograr una resección completa con márgenes libres, las secuelas funcionales o estéticas de la cirugía no son aceptables, hay pocas expectativas de curación quirúrgica o se trata de una cirugía de alto riesgo debido a la edad o las comorbilidades (48).

El tratamiento va a depender de la ubicación y extensión del tumor.

1.1.4.2. Tratamiento

1.1.4.2.1. Quimiorradioterapia (QRT) concomitante

La estrategia estándar clásica de tratamiento en los CECC-LA resecables ha sido la cirugía seguida de RT. Sin embargo, esta aproximación terapéutica presenta una tasa subóptima de control locorregional (CLR) de la enfermedad o, lo que es lo mismo, un 60% de recaídas locorregionales, además de un 15-20% de metástasis a distancia a los cinco años (49,50).

Por este motivo, se planteó la incorporación de la QT en combinación con los tratamientos anteriores, con la finalidad de intentar mejorar la eficacia terapéutica en los CECC considerados resecables.

En tres metanálisis publicados conjuntamente en el año 2000 se observó que el máximo beneficio en SG de la introducción de la QT se conseguía con la administración concomitante a la RT, con un aumento absoluto del 8% respecto al tratamiento locorregional exclusivo. En cuanto al beneficio obtenido con la adición de la QT en el contexto de adyuvancia o neoadyuvancia, se observaron aumentos absolutos no significativos (51).

A partir de estos datos, en pacientes con CECC-LA irresecables o en estrategias de preservación de órgano en CECC-LA resecable, la QRT concomitante pasó a considerarse el tratamiento de elección. Estas estrategias conservadoras se plantean en los tumores que requieren una laringectomía total (LT) para la resección completa de la neoplasia, y en los tumores avanzados de orofaringe, ya que la cirugía del tumor primario conlleva, en muchas ocasiones, déficits funcionales deglutorios importantes.

Se han investigado opciones menos tóxicas como el carboplatino, que fue una opción aceptada en la práctica clínica (52,53), y fármacos basados en la inhibición de dianas moleculares específicas, como el cetuximab, que ha permitido disponer de una alternativa eficaz y segura a la QRT concomitante.

La hipoxia induce radiorresistencia, directamente, porque el daño al ADN se maximiza en presencia de oxígeno e, indirectamente, al promover la inestabilidad genética (54). La hipoxia induce la expresión y mejora la fosforilación de EGFR regulando así los mecanismos intrínsecos de reparación de ADN, mientras que EGFR puede estabilizar el factor inducible por hipoxia 1ª (HIF1a) (55,56). Es por este motivo que la inhibición del EGFR se ha explorado como un posible complemento terapéutico de la RT en CECC. Un estudio fase III en pacientes con CECC-LA comparó la eficacia y la seguridad de la RT sola, con intención curativa, frente a la combinación de RT y cetuximab (biorradioterapia, BRT) radical. El CLR del tratamiento combinado fue significativamente superior, así como la SG a los cinco años, sin incremento importante en la toxicidad (57).

No disponemos de una comparación directa entre BRT y QRT con cisplatino como tratamiento radical en el global de la población, pero en pacientes con COF relacionado con el VPH, la BRT ha demostrado inferioridad respecto al esquema clásico (13,14). Por ello, la BRT se plantea en caso de contraindicación al tratamiento basado en platinos.

1.1.4.2.2. Otros

En lo que respecta al tratamiento complementario a la resección quirúrgica, se recomienda la QRT concomitante con cisplatino en pacientes con características patológicas de alto riesgo, como son la presencia de extensión extracapsular ganglionar y / o márgenes afectados (58–60).

En cuanto a la QT de inducción, el esquema de elección consiste en la administración de docetaxel en combinación con cisplatino y 5-Fluorouracilo (TPF) (61,62). Pese a que no existen estudios randomizados que demuestren la superioridad frente a la QRT, se considera una opción cuando el objetivo es la preservación de órgano y en CECC-LA irresecables con gran volumen tumoral o riesgo de diseminación a distancia.

1.1.5. CECC recurrente/metastásico (CECC R/M)

1.1.5.1. Definición

El 10% de los pacientes con CECC se diagnostican con enfermedad metastásica. Además, casi un 50% de los pacientes tratados por enfermedad locorregional, desarrollan recurrencias y, de ellos, sólo entre el 15 y el 30% son tributarios de un tratamiento de rescate con intención curativa (4,63).

1.1.5.2. Tratamiento

1.1.5.2.1. Papel del tratamiento local en la enfermedad recurrente/metastásica

Cuando un paciente presenta una recidiva local o ganglionar, o ambas, la primera opción terapéutica es un tratamiento local, bien sea el rescate quirúrgico o la reirradiación en aquellos casos en los que, tras valoración por parte de un equipo multidisciplinar, se considere posible.

De igual forma, también debemos considerar la realización de un tratamiento local en la enfermedad oligometastásica, tanto cirugía de las metástasis como la radioterapia estereotáctica (SBRT) (4).

1.1.5.2.2. Primera línea de tratamiento

El esquema EXTREME (cisplatino o carboplatino/ 5-fluorouracilo/ cetuximab) ha sido el estándar de tratamiento desde el año 2008. Se basa en un estudio fase III publicado por Vermorken, donde se comparó la eficacia y seguridad de PF (con cisplatino o carboplatino) respecto a PF asociado a cetuximab semanal en pacientes CECC R/M no tratados previamente. La rama de PF en combinación con cetuximab resultó significativamente superior a la rama control en términos de SG (mediana de 10,1 meses respecto a 7,4 meses con PF), SLP (5,6 meses y 3,3 meses con PF) y tasa de respuesta (TR) (incremento desde el 20% con PF al 36% con PF en combinación con cetuximab), con aceptable tolerancia (64).

Sin embargo, con mucha frecuencia nos encontramos pacientes no candidatos a recibir platino o 5-fluorouracilo en este escenario, bien sea por contraindicación o por refractariedad (en el caso de pacientes que han recibido tratamiento con platino en fase de enfermedad locorregional, sin beneficio demostrado). En estas situaciones, la combinación de paclitaxel y cetuximab (ERBITAX) es el tratamiento más utilizado en nuestro entorno, si el estado general del paciente lo permite. Este esquema fue evaluado en un estudio fase II del Grupo Español de Tratamiento de Tumores de Cabeza y Cuello (TTCC), en el que se incluyeron 46 pacientes con CECC R/M no tratados previamente para la enfermedad recurrente o metastásica, y en el que se reportó una TR global del 54% y de control de la enfermedad del 80%, además de un buen perfil de tolerancia (65).

También se ha evaluado la IT en primera línea de tratamiento en este escenario. El estudio *Keynote 048* es un estudio fase III que evaluó la eficacia de pembrolizumab (fármaco antiPD-1) en monoterapia, pembrolizumab/ cis o carboplatino /5fluorouracilo o el esquema EXTREME, en pacientes con CECC que no habían recibido ningún tratamiento sistémico en el escenario recurrente/metastásico. En la comparación de pembrolizumab y QT frente a EXTREME, el brazo experimental mejoró la SG en el global de los pacientes (66). Sin embargo, al analizar los resultados de la monoterapia con pembrolizumab frente a EXTREME, el beneficio en SG fue en los pacientes con tumores con *combined positive score* (CPS) >1. El CPS se define como *ratio* entre número de células (tumores, linfocitos y macrófagos) PD-L1 positivas por inmunohistoquímica (IHQ) y el número de células tumorales totales, multiplicado por 100.

Este estudio ha dado la aprobación de pembrolizumab en primera línea de CECC R/M por la FDA y la EMA, lo que ha supuesto un cambio reciente en el estándar de tratamiento. En nuestro entorno, en breve podremos utilizar pembrolizumab solo o en combinación con platino y 5-fluorouracilo en primera línea de tratamiento en pacientes con CECC R/M con CPS > 1.

1.1.5.2.3. Segunda línea de tratamiento

Las opciones terapéuticas clásicas en este escenario consideraban el uso de taxanos (paclitaxel o docetaxel), cetuximab, en este caso en monoterapia (si no se había utilizado en primera línea) y metotrexato. Todos ellos están basados en estudios fases II y obtienen una mediana de SG de unos 6 meses (67,68).

Nivolumab, otro anticuerpo monoclonal antiPD-1, ha sido testado en pacientes refractarios a tratamiento con platino, frente a los esquemas de QT usados clásicamente, con un beneficio en SG independiente del estado del marcador PD-L1 (determinado por TPS o *tumor proportion score*, definido como el porcentaje de células tumorales con sobreexpresión de PD-L1 por IHQ), aunque este beneficio era mayor en la población PD-L1 positiva (69,70).

1.1.5.2.4. Tercera y posteriores líneas de tratamiento

Las opciones de tratamiento en tercera y posteriores líneas son muy limitadas, y están basadas en estudios fase II de QT en monoterapia, con escaso número de pacientes incluidos y que muestran un modesto beneficio. Es importante seleccionar al paciente tributario a tratamiento en este escenario, en función de su estado general, así como de la respuesta obtenida en líneas de tratamiento previas y, siempre que sea posible, priorizar su inclusión en ensayos clínicos para que pueda beneficiarse de nuevas estrategias que no están disponibles en la práctica clínica habitual.

1.2. MECANISMOS DE DAÑO Y REPARACIÓN DEL ADN

Los CECC no relacionados con el VPH tienen una multitud de alteraciones genéticas somáticas, muchas de las cuales afectan a la capacidad de reparación del daño del ADN en las células. Esto ha llevado a los investigadores a estudiar polimorfismos en los genes de reparación del ADN para determinar si hay un aumento

en la susceptibilidad de un individuo para desarrollar CECC (22,71). Desde una perspectiva terapéutica, también hay un gran interés en vías relacionadas con la eficacia del tratamiento. La piedra angular del tratamiento no quirúrgico del CECC-LA ha sido una combinación de QT basada en platino, agentes biológicos y RT, con el objetivo de provocar daño en el ADN celular, iniciando así una cascada de señales que desencadenan la apoptosis (72). Incluso los estudios con IT se han desarrollado y se están llevando a cabo en combinación con estos tratamientos.

Si bien hay muchos factores asociados con la sensibilidad a estos tratamientos, las alteraciones moleculares en la reparación del ADN pueden, en parte, hacer que las células tumorales sean más sensibles a los agentes que inducen daño en el ADN (73). Del mismo modo, la resistencia a éstos podría estar relacionada, en muchos casos, con la capacidad que tienen las células tumorales de reparar este daño. Existe un conocimiento creciente sobre cómo la maquinaria de reparación de ADN regula la eficacia y la resistencia del tratamiento en el CECC, aunque resulta difícil (por la complejidad de los sistemas de reparación de ADN y la ausencia de subestudios que incluyan biomarcadores de reparación del daño del ADN en los ensayos clínicos).

Las sales de platino ejercen sus efectos citotóxicos mediante la formación de aductos en el ADN (74). La presencia de estos aductos desencadena mecanismos de parada del ciclo celular y de reparación del ADN. Si la reparación no tiene éxito, las células progresan a mitosis aberrante y apoptosis (75). Del mismo modo, la RT a menudo induce sus efectos citotóxicos al inducir DSB. Si bien la combinación de cisplatino y RT puede curar un alto porcentaje de CECC-LA, todavía hay un porcentaje importante de pacientes con tumores que son intrínsecamente resistentes al tratamiento y desarrollan una enfermedad recurrente o metastásica (76).

Por todo lo explicado, es esencial comprender el papel de las vías de reparación del ADN en la resistencia al tratamiento del CECC.

1.2.1. Vías de reparación del ADN

El daño en el ADN representa una amenaza letal para las células vivas. En consecuencia, las células han desarrollado mecanismos celulares de respuesta (DDR) que reconocen y reparan eficientemente el daño (77).

Las DSB son las lesiones en el ADN más perjudiciales debido a la falta de una cadena complementaria intacta para restaurar la secuencia original durante la reparación del ADN (78). Su reconocimiento y el reclutamiento de proteínas de

reparación de ADN se encuentran entre los primeros pasos en la respuesta celular a las DSB (79).

Las vías comunes y sus funciones (80), incluyen la reparación de escisión de base (*base excision repair*, BER) (81), la reparación de escisión de nucleótido (*nucleotide excision repair*, NER) y la reparación de desajuste (*missmatch repair*, MMR) (82); y, en el caso de las DSB, la unión final no homóloga (*nonhomologous end joining*, NHEJ), la recombinación homóloga (*homologous recombination*, HR) y la reparación mediada por el sistema anemia de Fanconi (FA) (83–85). El daño mediado por el cisplatino y la RT, dos de las estrategias más utilizadas en el tratamiento del CECC, se repara, generalmente, mediante la acción de la maquinaria de reparación de DSB y NER (72).

1.2.1.1. Recombinación homóloga (HR)

En las células de mamíferos, las DSB se reparan, principalmente, mediante HR y NHEJ (86,87). La elección entre uno u otro depende de la fase del ciclo celular y de la naturaleza de las DSB (88-90).

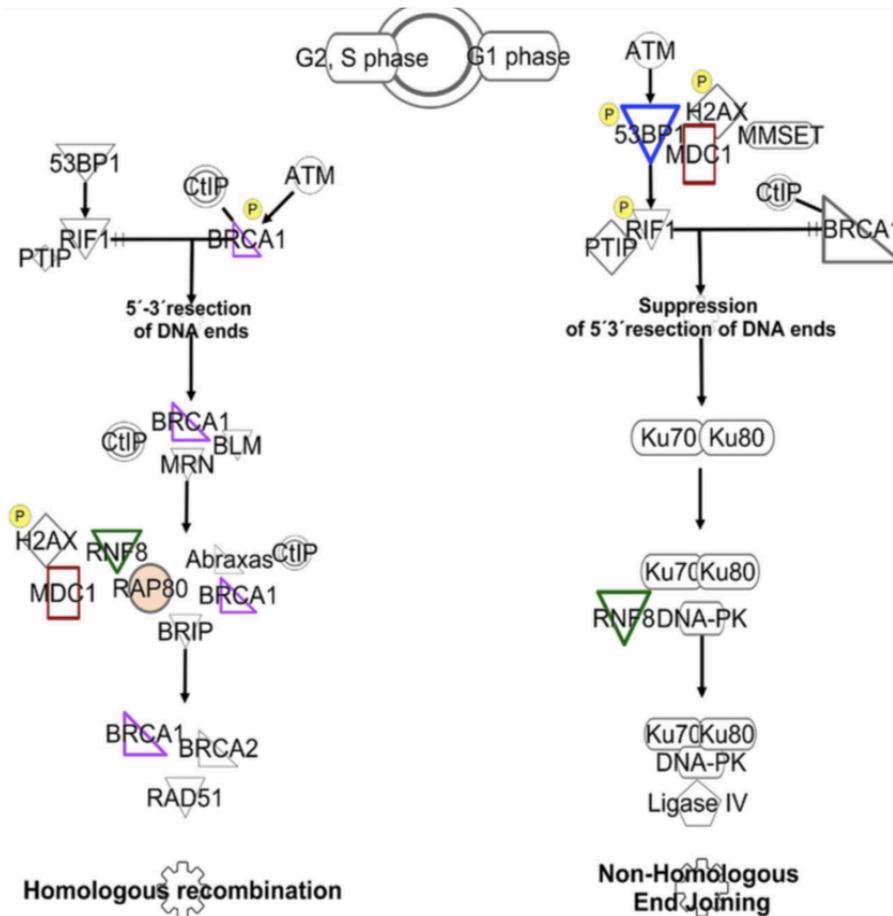
La HR está restringida en gran medida a las fases S y G2 del ciclo celular, cuando las cromátidas hermanas están disponibles (91). La reparación de las DSB a través de HR utiliza secuencias de ADN homólogas (generalmente en la cromátida hermana) como plantillas para restaurar la secuencia original, por lo que a menudo está libre de errores. Si bien este es un sistema robusto en presencia de una lesión aislada, puede causar pérdida de heterocigosidad (LOH) al reemplazar genes de tipo salvaje (WT) con alelos defectuosos en estados desregulados como el cáncer (92).

La HR se inicia cuando la DSB es reseca por nucleasas y helicasas, que generan fragmentos de ADN monocatenario 3', en el que los que la recombinasa RAD51 se ensambla como un filamento de nucleoproteína. Esta estructura invade la plantilla hermana de ADN y la repara (92). La detección inicial de la rotura está mediada por el complejo MRN, compuesto por tres proteínas (MRE11, RAD50 y NBS1). El complejo MRN recluta y activa la quinasa ataxia telangiectasia mutada (ATM), desencadenando paradas en el ciclo celular (94).

BRCA1 es reclutado para sitios de rupturas de ADN DSB a través del complejo MRN, con activación de fosfoinositida-3-quinasas similares a las quinasa (PIKK), que incluyen ATM y la proteína quinasa dependiente de ADN (DNA-PK), y fosforilación de la histona H2AX (95). BRCA1 juega un papel muy importante en la HR pero es modulada por otros compuestos de vías de reparación. Se sabe que el dominio BRCA1 se une al menos a tres fosfoproteínas: Abraxas-RAP80 (96), BRIP1 (también conocido como BACH1 o FANCI) y CtIP.

La unión de la proteína mediadora del punto de control del daño del ADN (MDC1) y la cola fosforilada de la histona H2AX inicia el ensamblaje de complejos de reparación de ADN, pero MDC1 es también un objetivo para la caspasa apoptótica 3: recluta el complejo UBC13-RNF8 y facilita la unión de BRCA1 al ADN dañado (97–99) (Figura 1.)

Figura 1. HR y NHEJ



La integridad de los genomas eucariotas está constantemente amenazada por la formación de DSB, que pueden surgir debido a errores en el metabolismo del ADN o lesiones genotóxicas, como la QT o RT. Las células que se replican usan HR para restaurar la integridad del genoma, mientras que en G1 los DSB se reparan mediante la NHEJ. Una función crítica de 53BP1 es limitar las resecciones 5' de los extremos rotos de una manera dependiente del ciclo celular. Mientras que la resección inapropiada en G1 impedirá la reparación de DSB por NHEJ, se necesita resección para HR en S / G2. La inhibición de la resección del extremo 5' en G1 está mediada principalmente por el RIF1 unido a 53BP1. La eliminación de 53BP1 conduce al acúmulo del factor HR RAD51 en el ADN monocatenario y restaura la HR cuando BRCA1 es deficiente. Las actividades de 53BP1 están mediadas por el reclutamiento de RIF1 y PTIP. RNF8 se recluta para los DSB y se requiere para el proceso de cascada de la HR. RNF8 también regula la abundancia de Ku80 en sitios de daño en el ADN y su agotamiento perjudica al NHEJ. Durante NHEJ, el heterodímero Ku70 / Ku80 se une directamente a los extremos rotos del ADN y recluta proteínas como DNAPKs, lo que resulta en un procesamiento final seguido de ligasa IV (100)

1.2.1.2. Unión final no homóloga (NHEJ)

La NHEJ une dos extremos de ADN independientemente de su secuencia y, por lo tanto, es propensa a introducir errores, por lo que puede provocar daño adicional en el ADN, incluido el inicio de eventos de translocación. Ocurre en la fase G1 del ciclo celular (101).

En el sistema de reparación NHEJ, el heterodímero Ku78 / Ku80 realiza el reconocimiento inicial de la rotura, que se une directamente a los extremos 5' del ADN. Estas proteínas reclutan más tarde la DNA-PK, y este complejo trimérico, alinea los dos extremos rotos. Las enzimas de procesamiento final generan más tarde fragmentos terminales adecuados para el ensamblaje, seguidos de PNKP para asegurar la fosforilación adecuada. Finalmente, XLF y el complejo XRCC4 / LIG IV juntos cierran el corte.

La proteína 1 de unión a p53 (53BP1) contribuye a la NHEJ al interactuar con la cromatina en los sitios DSB y mantener la estabilidad genómica (102–105). La fosforilación de 53BP1 se disipa a medida que las células pasan a la fase G1 y la participación de 53BP1 en la reparación de DSB se restablece por completo. 53BP1 regula negativamente la reparación de HR por inhibición de CtIP y lo promueve creando un complejo con BRCA1 (106,107). 53BP1 es reclutado inicialmente por MDC1 y retenido en la región de cromatina que rodea la ruptura. Sin embargo, se ha propuesto un modelo alternativo mediado por la metiltransferasa MMSET. RIF1 y PTIP son efectores de 53BP1 reclutados de una manera dependiente de fosforilación, que bloquea la resección a través de un mecanismo desconocido. Posiblemente, RIF1 puede inhibir la capacidad de la helicasa BLM de desenrollar el ADN para la resección o bien, RIF1 y / o PTIP pueden estabilizar proteínas de la vía NHEJ, como el heterodímero Ku en los extremos del ADN, lo que impediría el acceso de los extremos para las nucleasas de resección. La estructura final del ADN puede ayudar a determinar las actividades de RIF1 y PTIP. Una diferencia clave entre los dos efectores es que el PTIP parece específico de los eventos inapropiados de NHEJ de fase S que caracterizan a las células que carecen de BRCA1, mientras que RIF1 se requiere adicionalmente para la recombinación de cambio de clase, una forma especializada de NHEJ que ocurre en las DSB generadas por la desaminación de citosina en el desarrollo de células B (91,108–110) (Figura 1.)

1.2.1.3. Reparación de escisión de nucleótido (NER)

Hay dos subtipos principales de NER:

1. La ruta NER genómica global (GG-NER) que usa proteínas de reconocimiento específicas que escanean el genoma para identificar cualquier lugar de daño en el ADN (111).
2. La ruta NER acoplada a la transcripción (TC-NER) (112), cuyo mecanismo reconoce las regiones del genoma que son transcripcionalmente activas.

Ambas convergen en factores posteriores como el complejo ERCC1-XPF (ERCC4). El dímero ERCC4 reconoce el ADN dañado y corta el extremo 5' de la lesión (113,114). Este es, a menudo, un paso crítico de limitación de velocidad en el proceso de reparación. El dominio catalítico de la nucleasa se encuentra en ERCC4, y ERCC1 es responsable de la unión y estabilización del ADN (115). En paralelo, XPG escinde el extremo 3' de la lesión. Posteriormente se elimina la base defectuosa y, la unión del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) y el factor de replicación C (RFC) permiten que las ADN polimerasas sitúen en el sitio y, posteriormente, llenen el espacio. El cierre final de la lesión está mediado por XRCC1-LIG3 o un complejo de ligadura alternativo que involucra FEN1-LIG1. ERCC1 y ERCC4 han sido estudiadas ampliamente en CECC como biomarcadores de actividad de la vía NER y potencial predictivo de respuesta a terapias que dañan el ADN (116–120).

1.2.2. Relación de las vías de reparación del ADN con la respuesta al tratamiento del CECC

La respuesta tumoral a la RT y la QT depende de la DDR, que es crucial para mantener la integridad, la estabilidad y las funciones normales del genoma. Las funciones anormales de proteínas en la red DDR contribuyen a la aparición y progresión de varios tumores, así como a la resistencia al tratamiento (80,121).

53BP1 es un componente clave de la red DDR ya que es un efector temprano importante en la reparación del ADN involucrado en la apoptosis celular, la remodelación cromática, la estabilidad genética y la progresión tumoral. La pérdida de 53BP1 se asocia con el desarrollo tumoral y el mal pronóstico en algunos casos (122). Además, se ha demostrado que la expresión aberrante de 53BP1 influye en la eficacia de la QT y la RT en algunos tumores (123,124).

La baja expresión de BRCA se ha correlacionado con una mejor respuesta al cisplatino en el cáncer de pulmón (125); el cáncer de mama con mutación de *BRCA* ha mostrado un beneficio en SLP, pero no en SG con la inhibición de poli ADP ribosa polimerasa (PARP) sintéticamente letal en los ensayos de fase III (126–128).

La importante implicación del daño en el ADN en los tratamientos del CECC y los datos obtenidos en otros tumores, hacen que se haya valorado la implicación de estos mecanismos como factores predictivos de respuesta.

1.2.2.1. Daño del ADN inducido por RT

La RT induce varios tipos de lesión, como: enlaces cruzados de ADN-proteína, alteraciones de base y glucosa, SSB y DSB que eventualmente conducen a la formación de aberraciones cromosómicas (CA). La DSB es uno de los efectos nocivos más importantes de la RT, ya que supone una grave amenaza para la integridad del genoma. Si las DSB no se reparan o se reparan mal, pueden contribuir a la mortalidad celular, las mutaciones y las aberraciones cromosómicas (129).

Cuando se produce un daño en las fases G1 o S del ciclo celular, la transición a través de la fase S se bloqueará o sucederá lentamente y si se generan DSB en la fase G2 del ciclo celular, la entrada a la mitosis se retrasará. La sensibilidad celular a la RT difiere en cada fase del ciclo celular. El grado más alto de radiosensibilidad pertenece a la fase G2 / M después de la fase G1 y el grado más bajo está cerca de los extremos de la fase S. El bloqueo de G2 / M es el objetivo principal de la muerte celular inducida por fármacos anticancerígenos y agentes radiosensibilizantes. La activación de los puntos de control del ciclo celular G2 / M es necesaria para la entrada celular a la fase M. Estos puntos de control aseguran la precisión de la progresión celular. Las vías involucradas en la reparación de las DSB inducidas por RT son las mismas que las encontradas en la reparación de las DSB que ocurren naturalmente. La variabilidad en los genes involucrados en estas vías puede explicar la radiosensibilidad tanto en las células tumorales como en los tejidos normales circundantes. Pacientes con síndromes que son resultado de mutaciones hereditarias en genes de reparación del ADN muestran hipersensibilidad a agentes como la RT (130,131).

Los modelos predictivos de radiosensibilidad disponibles para varios tipos de tumores utilizan diferentes parámetros clínicos. Teniendo en cuenta las diferentes respuestas en pacientes con las mismas características clínicas, otro tipo de técnicas que evalúen otros indicadores como la sangre (por ejemplo, las proteínas), el ADN (por

ejemplo, modificaciones epigenéticas), las imágenes (por ejemplo, imágenes de hipoxia) o biomarcadores, podrían mejorar esta predicción (132–135).

El papel de la vía NHEJ en la reparación de las DSB inducidas por RT está bien establecido y, aunque el mecanismo de sensibilización al cisplatino para la RT permanece en gran medida indefinido, la evidencia sugiere que dicha vía también está involucrada (136).

1.2.2.2. Daño del DNA inducido por QT

Aunque ERCC1 está implicado en NER, diferentes ensayos aleatorizados dirigidos por niveles de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de ERCC1 en carcinoma de pulmón no célula pequeña (CPNCP) no mostraron un beneficio de SG para el tratamiento dirigido sobre la QT no seleccionada (137,138).

BRCA1 funciona como un modulador diferencial de supervivencia con cisplatino y agentes antimicrotúbulos, como taxanos y vinorelbina. Varios modelos experimentales han demostrado que BRCA1 induce un aumento de 10 a 1000 veces en la resistencia a los platinos, pero una sensibilidad al paclitaxel, docetaxel y vinorelbina (139–141). Los niveles de expresión de BRCA1 se han relacionado con la resistencia al cisplatino y la sensibilidad a los taxanos en el cáncer de pulmón, ovario, vejiga, mama y gástrico, aunque algunos ensayos encontraron resultados discordantes (142,143).

Los niveles más altos de ARNm de BRCA1 se asociaron con una mayor respuesta y una SLP más prolongada en pacientes con CPNCP tratados con docetaxel en combinación con gemcitabina y con una SG más prolongada en pacientes con cáncer gástrico que recibían docetaxel de segunda línea (143). En un estudio fase II dirigido por biomarcadores del Grupo Español de Cáncer de Pulmón, donde los pacientes fueron tratados con cisplatino/gemcitabina, cisplatino/docetaxel o docetaxel como agente único, no se encontraron diferencias en la SG según los niveles de BRCA1 (144).

RAP80 juega un papel importante en la HR y se asocia con varias proteínas. En el estudio anteriormente mencionado (144), la SG estuvo influenciada por los niveles de ARNm de RAP80. Los niveles de BRCA1 y RAP80 se mostraron como predictores de la respuesta a platino, sin embargo, estos resultados no fueron validados en el ensayo de fase III (145).

Se ha podido demostrar el valor predictivo de la expresión de ARNm de 53BP1 y BRCA1 en pacientes con CPNCP avanzado tratados con QT de primera línea basada

en platino (99) Los niveles bajos de ARNm de 53BP1 son esenciales para mantener la sensibilidad al cisplatino en presencia de niveles bajos de BRCA1. En ausencia de BRCA1, la reparación de enlaces cruzados entre cadenas puede ocurrir de manera independiente de la HR, lo que podría verse afectado por 53BP1. Por el contrario, en pacientes que expresan niveles altos de BRCA1, la expresión de 53BP1 no afectó el resultado de la QT basada e platino, lo que significa que en presencia de una alta expresión de BRCA1, que confiere una mayor resistencia tumoral a la terapia con platino, 53BP1 podría no ser esencial para determinar la sensibilidad al platino. Esto también explicaría por qué en las células con deficiencia de BRCA1, 53BP1 mejora los eventos de NHEJ que crean cromosomas radiales letales en respuesta a los inhibidores de PARP.

1.2.2.3. Daño del DNA inducido por cetuximab

En los CECC humanos, existe una clara relación inversa entre los niveles de expresión de EGFR y la respuesta a la RT. La RT induce la relocalización nuclear de EGFR y ese EGFR nuclear interactúa y aumenta la actividad de DNA-PKcs, una enzima clave en la vía NHEJ de reparación de las DSB (146).

Un estudio en modelos celulares demostró que cetuximab afectaba la supervivencia celular a través de la inducción de DSB (147). Este tratamiento fue especialmente eficaz para las células de CECC con importante sobreexpresión de EGFR, mientras que no se observó ningún efecto para las células con niveles bajos de expresión de EGFR.

Varios grupos han demostrado que el cetuximab bloquea la importación nuclear de EGFR, dando como resultado un complejo de EGFR-ADN-PKcs que es secuestrado en el citoplasma y, por lo tanto, se vuelve disfuncional (56,148). Estos y otros resultados, que muestran la inhibición de la activación de DNA-PKcs y la reparación de DSB con el tratamiento con cetuximab y también con inhibidores tirosina quinasa (TKI) de EGFR, proporcionaron una base para el efecto radiosensibilizador de los inhibidores de EGFR. Clínicamente, se ha demostrado que la BRT es más efectiva que la RT sola para el tratamiento del CECC-LA (57).

Es importante señalar que no todos los tumores que sobreexpresan EGFR responden igualmente bien a la terapia anti-EGFR. Sin embargo, esto no es sorprendente, ya que la efectividad de la terapia anti-EGFR puede verse comprometida por factores como la coactivación de otros receptores tirosina quinasa (RTK) que inciden en las vías de señalización de la cascada de EGFR, o la adquisición de mutaciones secundarias en el dominio de quinasa del EGFR que impiden la unión de los TKI, como

sucede a menudo en los CPNCP. Además, la activación de la señalización de PI3K-AKT puede ocurrir por mecanismos distintos, como mutación o amplificación de *PI3K*, la amplificación de *AKT*, la activación de oncogenes como *Ras* o la pérdida de fosfatidilinositol-3, 4, 5-trisfosfato 3-fosfatasa (*PTEN*) (149).

EGFR también se encuentra claramente implicado en la reparación de DSB a través de la HR (150). EGFR, en un complejo de proteínas con BRCA1, tiene un rol esencial en la reparación de DSB a través de la HR. Tras la irradiación, ATM se asocia con EGFR y se fosforila en el sitio de DSB (151). Del mismo modo, EGFR regula la fosforilación de ATM, lo que lleva a la actividad de Chk2 (152), que puede afectar la detención del ciclo celular G1, un requisito previo para NHEJ. Además, también se ha demostrado que la fosforilación del antígeno nuclear de células proliferativas unidas a cromatina (PCNA) depende de la actividad de tirosina quinasa de EGFR en el núcleo, lo que estabiliza la proteína unida a la cromatina y sus funciones asociadas (153). EGFR también media en la fosforilación de la histona 4 (H4), lo que conduce a la metilación de L4-20 de H4 y a la aceleración de la síntesis y reparación del ADN (154). En el contexto de la regulación epigenética por RTK, también se conoce que la acetilación de EGFR participa en la función del receptor, lo que lleva a la resistencia de las células tumorales a los inhibidores de la histona desacetilasa (155).

Estas y otras líneas de evidencia indican fuertemente que EGFR está involucrado en la regulación de la respuesta DDR estimulando la reparación de DSB a través de HR y NHEJ, por lo que su expresión está inversamente correlacionada con la sensibilidad a la RT y la SG de los pacientes tras la misma.

1.3. VÍAS ACTIVADAS POR EL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO

EGFR es un receptor de superficie celular de glucoproteína transmembrana de la familia ErbB / HER. Se sabe que seis ligandos principales se unen a EGFR:

- factor de crecimiento epidérmico
- heparina de unión a EGF
- factor de crecimiento transformante (TGF)- α
- anfiregulina
- betacelulina
- epirregulina

Cuando EGFR se une a su ligando, causa homo o heterodimerización con otros receptores HER u otros RTK como el receptor MET o IGF-1 (factor de crecimiento insulina-like 1).

El EGFR activado afecta a cuatro vías principales de señalización

- la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK),
- la PI3K / AKT / mTOR
- la vía PLC γ (fosfolipasa C gamma) / PKC (proteína quinasa C)
- la vía JAK / STAT (156)

(Figura 2., adaptada de (157) en página 63):

1.4. MECANISMOS DE RESISTENCIA AL TRATAMIENTO CON AGENTES ANTIEGFR

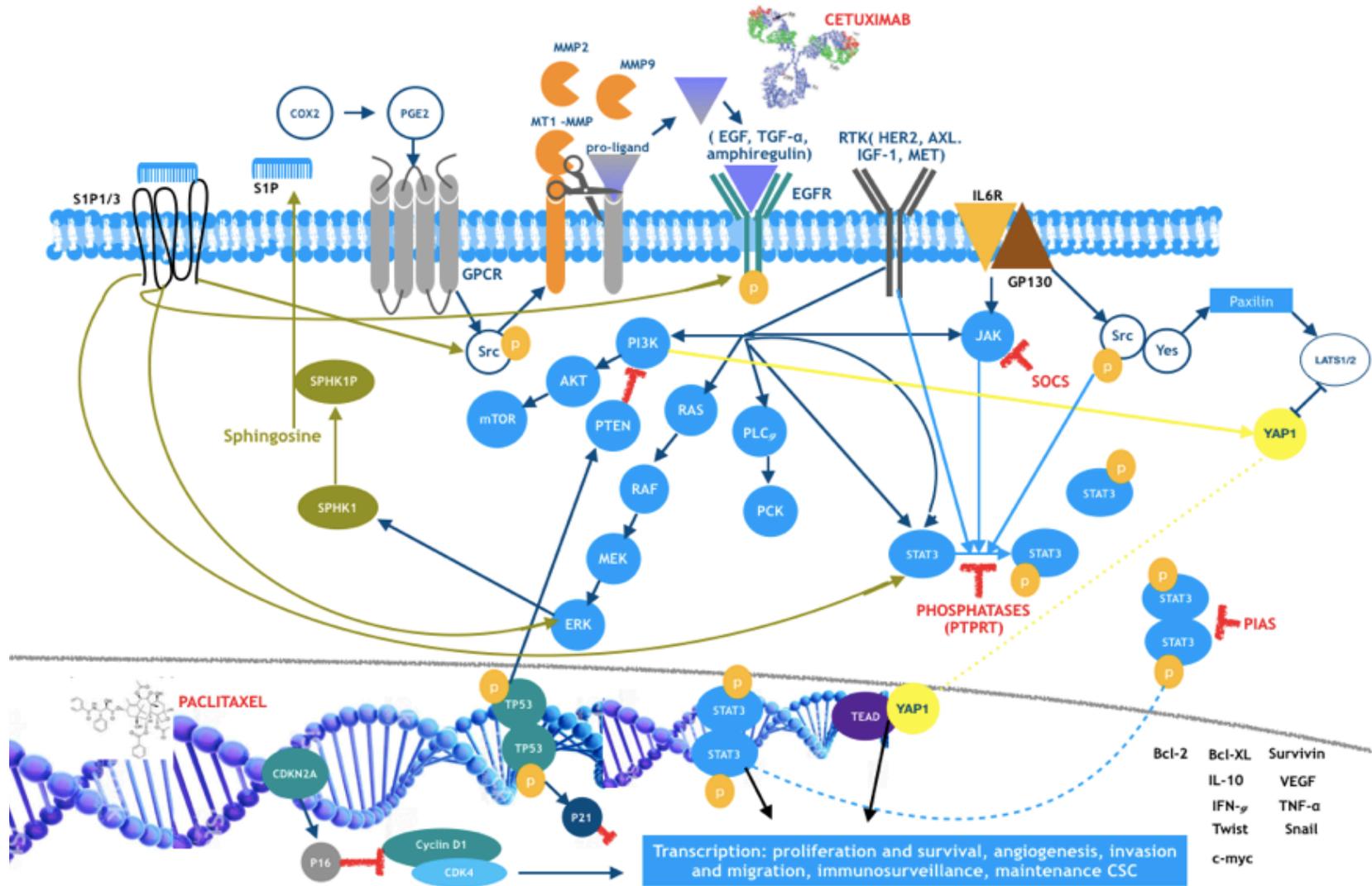
El EGFR se sobreexpresa en el 80-90% de los casos de CECC y se correlaciona con un peor pronóstico y eficacia del tratamiento (158,159). Los datos obtenidos mediante los estudios del TCGA han detectado la alteración de EGFR en 14 % de los casos, con un 65,0% de amplificaciones (25). El potencial de esta vía como diana terapéutica es muy importante y representa tanto un desafío como una atractiva oportunidad para la investigación en CECC.

El uso de EGFR como diana terapéutica puede lograrse, fundamentalmente de dos formas:

- a) bloqueando el dominio extracelular de unión a ligando mediante anticuerpos monoclonales.
- b) inhibiendo la actividad del dominio citoplasmático de tirosina quinasa usando inhibidores tirosina quinasa.

Cetuximab, un anticuerpo monoclonal quimérico con alta especificidad y afinidad por EGFR, sigue siendo la única terapia dirigida aprobada en el tratamiento del CECC (57,64). A pesar de las altas tasas de sobreexpresión de EGFR, cetuximab ha demostrado una eficacia limitada. Según las hipótesis que se han barajado para justificar este hecho, son las aberraciones en otros miembros de la familia HER y sus ligandos, y/o la activación de otros componentes de la cascada de señales, los procesos más destacados, aunque, los mecanismos exactos continúan sin conocerse (160,161).

Figura 2. Biología del EGFR



Se han desarrollado nuevas terapias dirigidas a EGFR y, sin embargo, hasta el momento, éstas han mostrado un modesto beneficio en la SLP y ninguna ha sido aprobada para el tratamiento en CECC. Aunque inicialmente algunos estudios de combinación con otros fármacos parecían ser prometedores, los TKIs se han mostrado ineficaces tanto en monoterapia, como en combinación. Erlotinib, por ejemplo, demostró un escaso beneficio en SLP cuando se usó en combinación con el agente antiangiogénico bevacizumab en CECC R/M (162). Afatinib, un pan-HER TKI, también ha sido testado en este escenario en un estudio; se comparó con metotrexate, donde se observó que los pacientes se beneficiaban de afatinib tenían amplificación de EGFR, bajos niveles de HER3, falta de expresión de p16 y altos niveles de PTEN, destacando la importancia de la identificación de biomarcadores en pacientes que muestran una respuesta favorable (163,164). En CECC- LA, afatinib en combinación con cisplatino y RT tampoco demostró ningún beneficio.

1.4.1. Resistencia mediada por la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK): vía del EGFR

Cetuximab ha logrado beneficio en SG en combinación con QT basada en platino en el contexto de la primera línea R / M. Sin embargo, solo un porcentaje de CECC es sensible al cetuximab. El uso de la expresión de EGFR como biomarcador de respuesta a sus inhibidores está limitado por la naturaleza semicuantitativa de su detección, la subjetividad de la valoración IHQ, en el caso de su sobreexpresión, y al diseño e inexactitud de los ensayos donde se valora el papel de su amplificación (165,166). Estos hechos provocan que sea un marcador biológico poco robusto en comparación con la presencia de mutaciones activadoras en su dominio TK como biomarcador de inhibidores dirigidos a éste (167). Varios estudios exploraron los patrones moleculares y los de respuesta a los anticuerpos de bloqueo del receptor EGFR, como el cetuximab, para identificar biomarcadores potenciales. Los resultados obtenidos no han conseguido, hasta la fecha, que se disponga de un buen biomarcador (166, 168,169); por ello, el análisis de alteraciones moleculares relacionadas con EGFR no ha sido incorporado en la evaluación patológica de CECC en la práctica clínica.

Los estudios genómicos realizados, han sugerido que la alteración del receptor EGFR es más común en los CECC no relacionados con el VPH en comparación con los CECC VPH relacionados (25,170). En la clínica, se ha demostrado la positividad del VPH como un biomarcador de resistencia a anticuerpos anti-EGFR (13,14,64).

Por esto, el desarrollo de inhibidores de EGFR podría ser más relevante en el tratamiento del CECC no relacionado con el HPV.

A modo de resumen, se adjunta una tabla adaptada de una revisión bibliográfica sobre el valor pronóstico y predictivo de diferentes alteraciones en EGFR en el CECC (171) (Tabla 2.)

Tabla 2. Valor pronóstico y predictivo de EGFR

EGFR														
	Expresión		Activación		Nº copias		Polimorfismos		Mutación		EGFRvIII		Ligandos	
	Px	Pred	Px	Pred	Px	Pred	Px	Pred	Px	Pred	Px	Pred	Px	Pred
RT	✓	✓	✗	?	✗	?	?	?	?	?	?	?	✓ ✗	?
													TGF- α	
Cirugía RT QT	✓	?	✓	?	✓ ✗	?	✓ R521K	?	✗	?	✓ ✗	?	✓ ✗	?
													TGF- α	
Inh. EGFR	✓ ✗	✗	?	?	✗	✗	✓ R521K	?	Escasa Evidencia	?	✓ ✗	?	✓ AREG	?

RT: radioterapia; QT: quimioterapia; Inh. EGFR: inhibidores de EGFR; Px: factor pronóstico; Pred: factor predictivo; ✓: sí; ✗: no; ?: no investigado; ✓✗: resultados discordantes; AREG: anfirregulina

1.4.2. Resistencia mediada por vías de señalización alternativas

1.4.2.1. Vía IGF1R/PI3K/AKT

La vía de señalización mediada por IGF consiste en la activación mediada por varios ligandos (insulina, IGF-1 e IGF-2) y diferentes receptores (INSR, IGF-1R, IGF-2R y receptores híbridos IGF-1R / INSR). Los ligandos de IGF se unen a sus receptores y proteínas de unión con alta afinidad (IGFBPs), que influyen en su capacidad de unión al receptor. Las proteasas de IGFBP escinden la proteína en fragmentos con menor afinidad por los ligandos, aumentando así la biodisponibilidad de IGF-1 e IGF-2 libre.

IGF-1, IGF-2 y la insulina se pueden unir de manera cruzada al receptor del otro. La activación de la vía promueve el crecimiento celular, la proliferación, la supervivencia y la metástasis (172–174).

Se ha observado una mayor expresión del receptor IGF-1R, así como un aumento de los niveles circulantes de ligandos de IGF relacionados con diversos tipos de cáncer. Esta sobreexpresión se asocia con una progresión más rápida de la enfermedad y un peor pronóstico (175,176).

Además, se ha demostrado que la presencia de IGF-1R funcional es esencial para la transformación maligna (177). La sobreexpresión de IGF-1R puede ser el resultado de la pérdida de supresores tumorales como p53 y BRCA1 (178,179). No obstante, la señalización de la vía IGF en las células tumorales es principalmente debida a la sobreexpresión de ligandos, y no por alteraciones en los receptores (178).

La activación de esta vía resulta en la activación de diferentes cascadas de señales como las vías Ras / Raf / MAPK y PI3K / AKT (180), altamente relacionadas con procesos de carcinogénesis y resistencia terapéutica.

Diferentes datos preliminares avalan la posible eficacia de inhibidores de estas vías en monoterapia o en combinación con otras terapias en el CECC. En un estudio, se demostró que el tratamiento con el anticuerpo anti-IGF-1R A12 en combinación con cetuximab fue más efectivo que el anti-EGFR en monoterapia en reducir la proliferación celular y la migración de las líneas celulares de CECC (181). Además, en xenoinjertos de células de cáncer de lengua, se demostró mayor frecuencia de respuesta completa con la combinación. Con respecto a la RT, el anticuerpo anti-IGF-1R mejoró la radiosensibilidad en líneas celulares de CECC, así como la respuesta terapéutica de los xenoinjertos FaDu (182). También se ha descrito que la activación de la vía mediada por IGF-1R está involucrada en la resistencia al gefitinib (TKI de EGFR) y RT (183,184). Los resultados en modelos preclínicos han demostrado que la inhibición dual de los receptores EGFR e IGF-1R es más eficaz en comparación con la administración como agentes únicos (185). Finalmente, aunque los datos preclínicos respaldan la eficacia de la inhibición de IGF-1R en líneas celulares de CECC, figitumumab (186) o cixutumumab (187), anticuerpos monoclonales dirigidos a IGF-1R, no han mostrado eficacia en poblaciones de pacientes no seleccionados en el contexto de estudios clínicos.

Respecto a la vía PI3K / AKT, ésta desempeña un papel central en una variedad de funciones celulares como supervivencia, proliferación, motilidad, crecimiento celular, apoptosis y metabolismo.

Las quinasas PI3K son heterodímeros formados por una subunidad catalítica (p110) y una subunidad reguladora (p85). Cuando EGFR es activado por sus ligandos,

PI3K es reclutada a la membrana celular para unirse al receptor, presentando más afinidad con el receptor HER3 que con EGFR. La subunidad catalítica del receptor fosforila PIP2 a PIP3 para iniciar la cascada de señalización. La proteína PTEN cataliza la reacción opuesta, inhibiendo la señalización de la vía. PIP3 recluta posteriormente AKT y PDK, siendo la fosforilación de la primera un paso clave en la activación de importantes vías para la supervivencia celular (188,189).

Por esta razón, alteraciones genéticas como la pérdida de la función *PTEN* por mutación o metilación del promotor, y la amplificación o mutación del gen *PI3KCA*, principalmente en los exones 9 y 20 están frecuentemente presentes en los procesos tumorigénicos. Estas alteraciones dan lugar a la activación constitutiva de *AKT* y la proliferación y supervivencia de la célula tumoral (190,191).

Las mutaciones de *PIK3CA* están presentes en el 6%-11% de los CECC y están asociadas con la activación de la vía de señalización de *AKT* (192). En relación con la resistencia a cetuximab, se vio que el tratamiento con el anticuerpo anti-EGFR de las células de CECC resistentes a al mismo no produjo la disminución de los niveles de fosforilación de *AKT* que se observaba en las células CECC sensibles a cetuximab. Esto era debido a una mutación en el exón 20 del gen *PIK3CA* en la línea celular CECC resistente, lo que provocaba una activación persistente de *AKT* (193). La activación persistente de *AKT* y/o de otras proteínas de la vía MAPK en líneas celulares de CECC y de colon han demostrado una eficacia limitada de la terapia con cetuximab (194).

Por el contrario, el tratamiento con cetuximab de las células Cal27 de CECC con *PTEN* silenciado, sí condujo a una disminución de los niveles de pAKT y pERK1/2. No obstante, en el cribado de 16 líneas celulares de CECC para detectar mutaciones en *PIK3CA* y *PTEN* (12,5% de casos mutados), no se encontró correlación directa entre estas mutaciones y la respuesta al tratamiento con cetuximab (195).

Los primeros resultados de ensayos clínicos dirigidos a la vía PI3K / AKT / mTOR con inhibidores no selectivos fueron decepcionantes. En los ensayos de fase II, no se observaron respuestas con inhibidores de mTOR como everolimus o temsirolimus (196,197). La combinación de erlotinib con ambos resultó en una mayor toxicidad sin ninguna eficacia adicional (198,199). PX-866, un inhibidor oral, irreversible, panisoforma de PI3K, se evaluó en combinación tanto con docetaxel como con cetuximab, sin aportar, tampoco, ningún beneficio en eficacia (200, 201). El buparlisib, un inhibidor selectivo de PI3K de la subunidad p110 α / β / δ / γ , se probó como un agente único en CECC R/M pretratado. Los resultados preliminares mostraron una tasa de control de la enfermedad del 39% a los 2 meses en pacientes cuyo tumor no tenía mutación de *PIK3CA*.

Posteriormente, se evaluó en segunda línea en combinación con paclitaxel semanal en el estudio BERIL-1, un ensayo aleatorizado de fase II controlado con placebo. La mediana de SLP fue significativamente mayor en el brazo de buparlisib (4,6 frente a 3,5 meses, $p = 0,01$), así como en la SG (10,4 frente a 6,5 meses, $p = 0,041$). Sin embargo, la toxicidad severa también fue superior (202). Un análisis exploratorio planificado previamente mostró que la combinación parecía beneficiar a un subgrupo de pacientes con alteraciones de *TP53*, ausencia de relación con el VPH, baja carga mutacional o alta presencia de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) o células CD8 positivas.

Es importante destacar que la eficacia de buparlisib no se asoció con la desregulación de la vía PI3K / AKT / mTOR (mutación / amplificación *PIK3CA*, pérdida de *PTEN*) (203). Actualmente está en curso un ensayo de fase III en el que se evalúa el valor predictivo de estos biomarcadores.

1.4.2.2. Vía STAT3

1.4.2.2.1. STAT3 y la familia STAT

STAT comprende una familia de factores de transcripción citoplasmáticos, mediadores clave de la señalización de citoquinas. Actúan como transductores de señal y factores de transcripción, y participan en respuestas celulares normales a las citoquinas y factores de crecimiento. La familia STAT consta de siete proteínas en humanos (STAT1-STAT4, STAT5A, STAT5B y STAT6) (204). Todas ellas están formadas por un dominio de aminoácidos (NH₂), un dominio en espiral (CCD) para la unión con proteínas interactivas, un dominio de unión al ADN (DBD), un conector principal, un dominio homólogo SRC 2 (SH2) para fosforilación y dimerización, y un dominio de transactivación C-terminal (TAD) (205,206). La mayoría de estos dominios están altamente conservados entre las proteínas STAT siendo sólo TAD divergente, contribuyendo principalmente a su diversidad estructural. Para realizar su función, migran desde la membrana plasmática al núcleo celular con el fin de activar la transcripción (204,207).

Los componentes de la familia STAT están implicados en la regulación de la expresión génica para eventos biológicos como el desarrollo embrionario, la muerte celular programada, la organogénesis, la inmunidad innata y adaptativa y la regulación del crecimiento celular en muchos organismos (208,209). STAT2, STAT4 y STAT6 son activados por citoquinas y tienen un papel importante en el desarrollo de las células T y en la señalización de interferón gamma (IFN- γ). STAT1, STAT3 y STAT5 se activan en

varios tipos de tejidos. STAT1 actúa principalmente como un supresor tumoral, promoviendo la apoptosis y contrarrestando los efectos de STAT3 y STAT5. STAT5 y, sobre todo, STAT3 están implicados con mayor frecuencia en la progresión del cáncer humano ya que controlan la progresión del ciclo celular y la apoptosis (210–212).

En células normales, tras modular la expresión génica, STAT3 es desfosforilada por tirosina fosfatasas y queda libre para un nuevo ciclo de estimulación. Esta regulación negativa de la activación de STAT3, asegura un control preciso de su transcripción (204). Además de su función transcripcional, STAT3 tiene otras funciones. Una de ellas es que puede localizarse en la mitocondria y estar implicado en el metabolismo celular; y la segunda es que puede interactuar con estructuras del citoesqueleto y modular la función de los microtúbulos y la motilidad celular.

STAT3 está constitutivamente activo en muchos tipos tumorales, entre los cuales se encuentra el CECC (213).

1.4.2.2.2. STAT3 y CECC

Se ha estimado que la actividad aumentada aberrante de STAT3 está presente en más del 70% de los cánceres humanos y que se correlaciona con un mal pronóstico (214–216).

También la activación de STAT3 a través de un ciclo de retroalimentación positiva constituye un mecanismo primario de resistencia a fármacos en las células adictas al oncogén (217). Estos datos preclínicos sugieren que los enfoques terapéuticos que bloquean la actividad de STAT3 en las células tumorales podrían tener un valor adicional sustancial para prevenir o revertir la resistencia a los tratamientos contra el cáncer.

La activación de la familia STAT juega un papel importante en la patogénesis del CECC, tanto en el relacionado con el virus VPH, ya que p53 y Rb regulan el ciclo celular a través de la cascada de la vía Jak / STAT e incluso STAT3 también puede mediar la actividad de las proteínas del virus E6 y E7 (218), como en el CECC no relacionado con el VPH, donde múltiples proteínas STAT han sido implicadas en la carcinogénesis inducida por el alcohol y el tabaco (219).

Grandis y col. descubrieron que la activación de STAT3 ocurre de forma temprana durante la carcinogénesis del CECC debido a la activación autocrina de la señalización de TGF- α / EGFR, que se observa entre el 80 y el 100% de estos tumores (157). Estudios en células tumorales de pacientes con CECC mostraron actividad, tanto

constitutiva como inducida por TGF- α , de los dímeros STAT3 (homodímeros STAT3 y heterodímeros STAT3 / STAT1). Además, se observó una mayor expresión y fosforilación de STAT3, no sólo en las células tumorales, sino también en las células de las mucosas no tumorales cercanas, en comparación con el epitelio de controles sanos, lo que sugiere que la activación de STAT3 es un evento temprano en el desarrollo del CECC (220).

La transferencia de STAT3 constitutivamente activo en células de CECC dio como resultado una mayor proliferación *in vitro* y mayores tasas de crecimiento tumoral *in vivo* en modelos murinos, mientras que la inhibición de STAT3 condujo a una inhibición del crecimiento e inducción de la apoptosis (157,221,222). En un modelo de xenoinjerto de CECC, la administración de un inhibidor de STAT3 resultó en una disminución del volumen del tumor y la inducción de apoptosis (223,224) y la activación de STAT3 se correlacionó significativamente con un peor pronóstico (221,225). Todos estos hallazgos proporcionan evidencia de que el CECC depende significativamente de la señalización de STAT3 para el mantenimiento del fenotipo maligno.

A pesar de la activación de señalización de STAT3 casi universal en CECC, no se han observado mutaciones de *STAT3* de ganancia de función ni mutaciones activadoras en los receptores que se encuentran en la parte superior de la cascada de señalización, como EGFR o JAK (226,227).

1.4.2.2.3. Vías de activación de STAT3 en CECC

La activación de la señalización STAT3 puede ocurrir a través de diversas vías: unas inespecíficas y otras asociadas a CECC.

Dentro de las vías comunes a otros tumores tenemos las formadas por complejo receptor de citocinas - complejo quinasa / complejo factor de crecimiento-receptor y las tirosina quinasa no receptoras.

Los STAT se activan a través de la cascada de fosforilación de tirosina después de la unión del ligando y la estimulación del **complejo receptor de citocinas - complejo quinasa y complejo de factor de crecimiento - receptor** como TGF- α /EGF, VEGFR (receptor de factor de crecimiento endotelial vascular), IGFR (receptor de factor de crecimiento similar a la insulina- like), HGFR (receptor de factor de crecimiento de hepatocitos), FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), GCSF (factor estimulante de colonias de granulocitos), IL-6

(interleucina-6), CNTF (factor neurotrófico ciliar), OSM (Oncostatin-M), LIF (Factor inhibidor de la leucemia), CSF1R (receptor del factor estimulante de colonias-1), c-kit, receptor de insulina, c-Met, GPCR (receptor acoplado a la proteína G) y AgtR2 (receptor de la angiotensina-II).

Dentro de estas vías, destacan TGF- α /EGFR/JAK/STAT (156) e IL- 6/JAK /STAT (228–231).

También se ha reportado que otras clases de proteínas **tirosina quinasas no receptoras** estimulan la activación de STAT3. La familia de quinasas Src pueden activar STAT3 directamente o pueden funcionar en la cascada de señales de la activación de RTK o GPCR (232). Otras proteínas como son mTOR, MAPK, p38 y cascadas de señalización de quinasa MEK (quinasa MAPK / ERK) también conducen a la fosforilación y activación de STAT3.

Varios investigadores han identificado recientemente vías de activación de STAT3, que parecen estar altamente asociadas con la carcinogénesis del CECC (233,234). En los queratinocitos orales, la nicotina, un carcinógeno importante en el tabaco, puede activar STAT3 **a través del receptor de acetilcolina nicotínico alfa**. Esta activación de STAT3 relacionada con el tabaco, al menos en parte, explica la tasa marcadamente alta de activación de STAT3 (> 80%) en muestras clínicas de carcinoma oral de células escamosas que se desarrollan en masticadores de tabaco (233,234).

En estado inactivo, STAT3 actúa como un monitor ubicado en el citoplasma. Después de la fosforilación de tirosina mediada por JAK, el dominio SH2 de STAT3 reconoce y se une a estos sitios de acoplamiento de fosfotirosina, colocando STAT3 cerca de las enzimas JAK activas, que posteriormente fosforilan STAT3 en Tyr705. La fosforilación de Tyr705 da como resultado la dimerización de la cabeza a la cola y la translocación del dímero STAT3 al núcleo. Una vez allí, STAT3 se une a elementos de respuesta en los promotores de genes diana, induciendo así la transcripción de un amplio panel de genes que codifican reguladores de la proliferación celular (como la ciclina D1 y MYC) y la supervivencia (como BCL-xL y survivina), así como factores de crecimiento inmunosupresores y citocinas (como IL-6) que promueven la angiogénesis (como VEGF) (196,235).

La fosforilación de Ser727, aunque menos estudiada que la fosforilación de Tyr705, puede estar mediada por varias quinasas, incluidas JNK y otras MAPK y la proteína quinasa C, y generalmente promueve la actividad STAT3 (235, 236).

Las múltiples y diversas vías de activación de STAT3 parecen proporcionar una protección para su activación, en caso de que una o varias se alteren con los eventos genéticos o epigenéticos que ocurren durante la progresión del tumor. En este contexto, la inhibición directa y la focalización de STAT3 se postula como un método mucho más racional y poderoso para la prevención y tratamiento del cáncer, en lugar de la inhibición indirecta de las múltiples moléculas activadoras de STAT3 en la parte superior de la cascada.

1.4.2.2.4. Efectos asociados a la activación de STAT3

a. STAT3 acelera la proliferación y la supervivencia celular

La actividad de STAT3 se ha correlacionado con el aumento de la expresión de ciclina D1 y del factor de transcripción c-myc, que ocurre en las primeras etapas de la carcinogénesis del CECC (221,235, 237–240).

También se ha demostrado que la vía de señalización STAT3 suprime la apoptosis en las células tumorales mediante el aumento de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, Bcl-XL y Mcl1 de la familia del inhibidor de la apoptosis (IAP). La inhibición de STAT3 en CECC y otros cánceres conduce a una expresión reducida de múltiples proteínas antiapoptóticas y una rápida inducción de apoptosis. Las lesiones precursoras como las establecidas en CECC muestran una sobreexpresión frecuente de estas proteínas y esta sobreexpresión se asocia significativamente con un estadio más avanzado y un peor pronóstico. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que también se ha descrito una asociación paradójica entre el aumento de la expresión de Bcl-2 y el pronóstico favorable en pacientes con CECC (241,242).

b. STAT3 promueve la angiogénesis

STAT3 induce directamente el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y HIF-1 α , ambos reguladores de la angiogénesis (243). Durante condiciones de hipoxia en el núcleo de las células tumorales, STAT3 y HIF1 α se unen al promotor VEGF, lo que conduce a la angiogénesis (244). Además, otros factores proangiogénicos, como el bFGF (factor de crecimiento básico de fibroblastos) y el HGF (factor de crecimiento de hepatocitos), también están regulados por STAT3 (245,246).

c. STAT3 favorece la evasión inmune

STAT3 actúa regulando negativamente los neutrófilos, las células *Natural Killer*, las células T efectoras y las células dendríticas, mientras que regula positivamente las poblaciones de células supresoras de estirpe mieloide (MDSC) y las células T reguladoras (Tregs) (247–257).

Citoquinas derivadas de células tumorales, incluidas IL-6, IL-10, VEGF, HGF o GCSF, que inducen la señalización de STAT3, promueven una acumulación anormal de MDSC y estimulan su actividad inhibitoria para las células T citotóxicas (258,259). La señalización STAT3 inducida por células tumorales promueve la acumulación de células dendríticas inmaduras y la expresión de PD-L1 en células tumorales. La activación de STAT3 suprime eficazmente la polarización de los macrófagos M1, bloquea sus funciones citotóxicas y proinflamatorias y favorece la acumulación de macrófagos M2 con un fuerte potencial inmunosupresor y proangiogénico. Además, los macrófagos M2 y las MDSC secretan IL-6 (259,260).

d. STAT3 favorece la transición epitelio-mesénquima (EMT) y el desarrollo de metástasis

Las células tumorales epiteliales cambian de una morfología epitelial altamente diferenciada a un fenotipo invasivo migratorio durante la EMT, experimentando una baja regulación de las moléculas adherentes, incluidas la e-cadherina y las citoqueratinas y la regulación positiva de las moléculas mesenquimatosas, incluidas la vimentina y la N-cadherina, lo que provoca la pérdida del contacto célula-célula y la ganancia de motilidad celular (261,262).

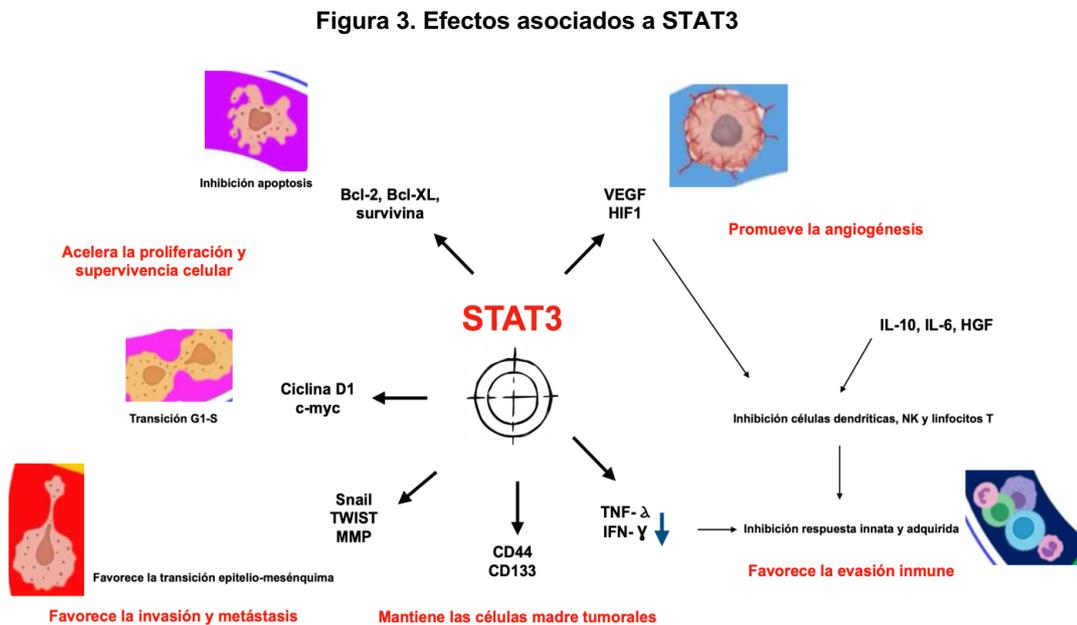
STAT3 regula de forma positiva LIV-1, que funciona como un transportador nuclear de la proteína Snail, un regulador maestro de EMT (263). También induce la expresión de FoxM1, que favorece la sobreexpresión de Snail y promueve la EMT inducida por EGF / EGFR al aumentar la expresión de TWIST (264). Por último, conduce a la expresión regulada por incremento de metaloproteinasas de matriz, como MMP2, MMP9 y MMP1 (235).

e. STAT3 mantiene las células madre tumorales

Las células madre tumorales (CSC) tienen un papel importante en la iniciación y progresión del cáncer y la resistencia al tratamiento. Las CSC tienen características de autorrenovación y capacidad para generar diversas células tumorales, lo que proporciona heterogeneidad tumoral (265).

STAT3 aumenta marcadores de CSC como CD44 y CD133 (266). Debido a la importancia de que STAT3 mantenga las propiedades de CSC (como las capacidades de renovación automática en la carcinogénesis), el bloqueo de esta vía de señalización podría eliminar las CSC y jugar un papel importante en prevención del cáncer.

Llama la atención que la activación de un factor de transcripción simple esté ampliamente asociada con diversos pasos que son críticos para el desarrollo y la progresión del CECC (Figura 3. adaptada de (242)), por lo que sugiere que éste es adicto a la activación de STAT3 y, por lo tanto, se ha definido que podría ser el *talón de Aquiles* de este tipo de neoplasia.



1.4.2.2.5. Reguladores negativos de STAT3

La activación de STAT3 puede controlarse mediante, al menos, tres clases diferentes de reguladores negativos:

- 1) **proteínas inhibidoras de STAT activado (PIAS)**
- 2) **proteínas supresoras de señalización por citoquinas (SOCS)**
- 3) **fosfatasa celulares (SHP1, SHP2, DUSP22, PTPRD, PTPRT y PTPN1-2)**

La inhibición o la expresión reducida de estos reguladores negativos pueden conducir a la activación constitutiva de STAT3, un efecto que a menudo se observa en pacientes con cáncer.

También se ha demostrado que varios miR amortiguan la señalización de IL-6/JAK/ STAT3 al reducir la expresión de los componentes de esta ruta, ya sea en células tumorales o en células inmunes infiltrantes de tumores (232,267).

1.4.2.2.5.1. Familia proteínas inhibidoras de STAT activado (PIAS)

Hay cuatro genes PIAS en mamíferos: *PIAS1*, *PIAS2*, *PIAS3* y *PIAS4*. Las proteínas PIAS se identificaron inicialmente como inhibidores de la transcripción de STAT (268) pero pueden regular una gama más amplia de procesos biológicos, incluido el tráfico nuclear y la reparación del daño en el ADN (269).

Debido al efecto inhibidor de PIAS3 sobre la activación de STAT3, la regulación negativa de la expresión de PIAS3 puede desempeñar un papel crítico en el desarrollo del cáncer. De hecho, muchos estudios han demostrado que la expresión de PIAS3 se reduce en varios tipos de cáncer (270–272).

Por el contrario, muchos estudios han demostrado que la regulación positiva de la expresión de PIAS3 puede inhibir la proliferación celular y aumentar la quimiosensibilidad en varios tumores. Por ejemplo, la inhibición de STAT3 por la curcumina atenúa el crecimiento de las células tumorales mediante la regulación positiva de PIAS3 en las células de cáncer de ovario y endometrio (273); por otra parte, la sobreexpresión de PIAS3 contribuye a la supresión del crecimiento de células de cáncer de pulmón (274), restaura la quimiosensibilidad a los fármacos (275), induce apoptosis de células de cáncer de próstata tanto *in vitro* como en modelos de ratones (276), y puede reducir la transcripción de STAT3 e inhibir la proliferación de células de glioblastoma (270).

Todos estos hallazgos indican que PIAS3 puede ser un candidato atractivo para intervenir en la vía de señalización JAK/STAT y restaurar la sensibilidad a los fármacos quimioterápicos.

Sin embargo, la sobreexpresión de los genes *PIAS* también se ha observado en algunos tipos de cáncer, como próstata, mieloma y colorrectal ; puede estar en relación con su papel en la sumoilación, que es un proceso de cambios postraduccionales en donde determinadas proteínas se unen covalentemente con un péptido llamado SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) similar a la ubiquitina, motivo por el que la función biológica de PIAS en la tumorigénesis y la terapia antitumoral es algo controvertida (277).

1.4.2.2.5.2. Familia de proteínas supresoras de la señalización por citoquinas (SOCS)

SOCS consta de ocho miembros: SOCS 1-7 y una proteína que contiene SH2 inducible por citoquinas. Inhiben la señalización de JAK-STAT por mecanismos de bloqueo del reclutamiento de STAT al receptor de citoquinas al proteger los sitios de unión, unirse a JAK e inhibir su actividad quinasa, y dirigirse a proteínas receptoras o a JAK para la degradación proteosómica mediante ubiquitinación (278,279). Se ha demostrado una correlación positiva entre la desregulación de SOCS y la progresión tumoral. Varios miembros de la familia SOCS han sido identificados como supresores de tumores, y la desregulación de sus funciones biológicas en el control de las citoquinas y la señalización de factores de crecimiento puede contribuir al desarrollo de muchos cánceres humanos (280,281).

SOCS-1 está hipermetilado en hasta un tercio de las muestras de CECC, y la hipermetilación de los genes *SOCS-1* y *SOCS-3* se ha asociado con disminución de la activación de STAT3 (231,282, 283). Los datos en el análisis de otros tipos de cáncer han demostrado que *SOCS-3* reduce los niveles de pSTAT3 al ocupar los sitios de unión JAK (284).

1.4.2.2.5.3. Familia de fosfatasas celulares

La superfamilia de PTPs o fosfatasas de proteína tirosina son un grupo amplio de enzimas que, en estrecha correlación con tirosina quinasas, regula diferentes vías de señalización mediante la eliminación de un grupo fosfato de determinadas proteínas (285).

La fosforilación aberrante de la proteína tirosina es un sello distintivo del cáncer humano. De todas las fosfatasas de proteína tirosina, las fosfatasas de proteína tirosina de tipo receptor (PTPR) comprenden la familia más grande. Se ha informado que algunos *PTPR*, incluidos *PTPRD* y *PTPRT*, funcionan como supresores de tumores porque sus mutaciones genéticas o su metilación contribuyen al crecimiento y la supervivencia en modelos preclínicos (286). Esto sugiere que muchos miembros de la familia PTPR pueden estar involucrados en la supresión tumoral al desfosforilar STAT3. Interesantemente, se han descrito mutaciones en la familia de genes *PTPR* en el 31% de los CECC, independientemente de la relación con el VPH, mientras que la metilación de *PTPRD* o *PTPRT* se ha observado en el 60% de los casos de los CECC en los estudios del TCGA (287). Muchos *hot-spots* mutacionales se agrupan en el dominio de la fosfatasa catalítica, lo que respalda que la desfosforilación de la oncoproteína STAT3

puede ser importante para la hipotética función supresora de tumores (288) de *PTPRT*. Dicha función se corroboró mecánicamente en muestras de CECC, donde algunas mutaciones de *PTPRT* se correlacionaron con la regulación positiva *in situ* de la expresión de fosfoSTAT3 (pSTAT3), en comparación con los tumores que eran *PTPRT* de tipo salvaje. Además, cuando las células de CECC se modificaron para sobreexpresar *PTPRT*, se observó una disminución de la fosforilación de STAT3, mientras que la transfección de la forma mutada en el dominio fosfatasa de *PTPRT* dio como resultado un aumento de la fosforilación de STAT3 (288).

La metilación del promotor *PTPRT* ha demostrado que aumenta la expresión de pSTAT3 y está asociada con la sensibilidad a inhibidores de STAT3 en las células de CECC (289).

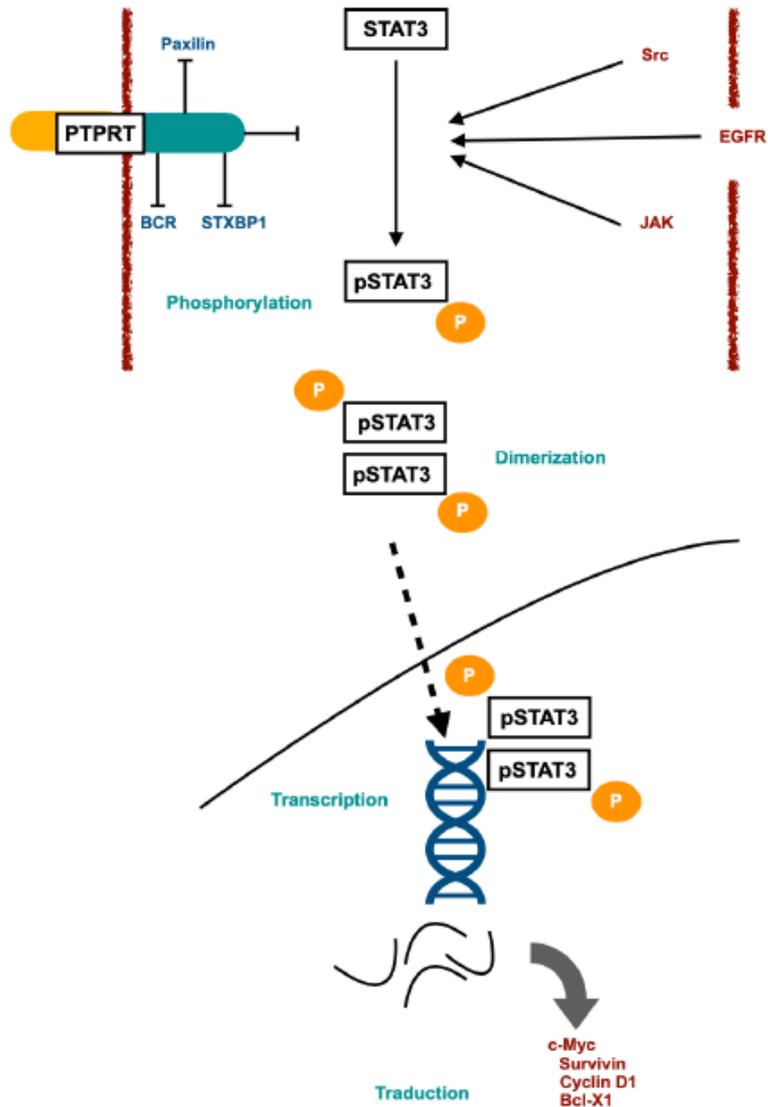
Por el contrario, las mutaciones en *PTPRD* conducen a la pérdida de su función y la hiperfosforilación posterior de sus sustratos, observando que las líneas celulares de CECC que albergan mutaciones de *PTPRD*, son más sensibles a la inhibición de STAT3 (290).

El silenciamiento epigenético o genético de los *PTPR*, puede representar un estímulo para el crecimiento tumoral en CECC por hiperactivación de STAT3. Este descubrimiento sugiere que los tumores que albergan eventos de pérdida de función (mutación o metilación del promotor) de *PTPR* pueden ser susceptibles de bloqueo de la vía de STAT3 (Figura 4., pág 78)

1.4.2.2.6. STAT3 como factor pronóstico

La activación de STAT3 puede no sólo ser relevante para el desarrollo del CECC, sino que también puede proporcionar un valioso indicador pronóstico para esta enfermedad. El análisis de ARNm e IHQ de 20 biopsias de CECC reveló que los niveles de STAT3 se elevaron en los tumores CECC más pobremente diferenciados, mientras que se encontraron niveles elevados de STAT1 en tumores bien diferenciados; esto sugiere que las relaciones STAT3 / STAT1 pueden ser indicativas del estado de diferenciación tumoral (291). Además, los niveles elevados de pSTAT3 se correlacionaron con metástasis ganglionares y estadios más avanzados, así como tasas reducidas de supervivencia específica de la enfermedad en biopsias de CECC de lengua (221). Esta relación con la SG se ha confirmado en estudios adicionales de carcinoma escamoso de cavidad oral (225).

Figura 4. Vía STAT3 e interacción con PTPRT



Las moléculas de STAT3 son activadas por fosforilación de un residuo tirosina por receptores tirosina quinasa activados como EGFR o tirosina quinasa no receptores como JAK y Src. Los PTPRs inducen su inactivación por desfosforilación. La dimerización espontánea de dos moléculas STAT3 fosforiladas hace que se formen homodímeros que se traslocan al núcleo y se unen a secuencias de las regiones promotoras de genes diana, conllevando su transcripción y posterior traducción en proteínas que inducen la proliferación y supervivencia celular. Existen terapias diana que inhiben esta vía en diferentes puntos.

1.4.2.2.7. STAT3 y resistencia a tratamientos para el CECC

Además de su función como oncogén en el CECC, *STAT3* también representa un mecanismo de resistencia clave para el tratamiento estándar que incluye QT con platino y RT.

La activación sostenida de *STAT3* puede conducir a la proliferación tumoral, en parte, al aumentar la expresión de proteínas antiapoptóticas, lo que disminuye significativamente la sensibilidad de las células tumorales a la QT y la RT. Se ha demostrado que la inhibición de *STAT3* aumenta notablemente la sensibilidad *in vitro* e *in vivo* de las células de CECC a los agentes quimioterápicos, 5-fluorouracilo y cisplatino, mediante la regulación negativa de la expresión de Bcl-2 y Bcl-XL (292, 293). La sobreexpresión de Bcl-2 o Bcl-XL también se correlaciona con un mal pronóstico en estadios precoces de CECC tratados con RT (294).

STAT3 se ha descrito como un mediador clave de la resistencia a la QRT en numerosos tipos de cáncer, incluidos los gliomas, el cáncer de mama, el cáncer colorrectal y los cánceres de próstata y cuello uterino, además del CECC (295).

STAT3 también participa en la quimiorresistencia inducida por hipoxia. En este contexto, la absorción intracelular de la QT, especialmente del cisplatino, se reduce drásticamente debido a la expresión regulada al alza de los transportadores dependientes de ATP (ABC). Se ha descubierto que *STAT3* aumenta los niveles de expresión de los transportadores ABC, en células de cáncer de mama triple negativo (TNBC) en condiciones de hipoxia, por lo que confieren quimiorresistencia a cisplatino (296). Otro estudio reveló que la activación de *STAT3* mediada por IL-6 induce la expresión de HIF-1 α en células de TNBC (297), lo que, en consecuencia, atenúa la citotoxicidad inducida por QT y la apoptosis celular mediante la regulación de la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis (Bax y Bcl-2) y transportadores de fármacos (glicoproteína P y MRP1). Además, el tratamiento combinado con inhibidores de HIF-1 α y *STAT3* mejora significativamente la citotoxicidad del cisplatino contra las células de TNBC y supera la quimiorresistencia inducida por hipoxia (298).

Los agentes antimicrotúbulos producen un arresto y la apoptosis celular. Experimentos en líneas celulares de cáncer de mama, ovario y próstata tratadas con paclitaxel, han demostrado su papel en la desfosforilación de *STAT3* (299,300). Se ha observado un efecto similar con otros agentes antimicrotúbulos como es la vinorelbina,

pero no con fármacos clásicos como las antraciclinas (295,301). En el caso del paclitaxel, se ha demostrado su implicación en la fosforilación de STAT3 y, además, en la disminución de su actividad transcripcional (302). No existe evidencia, sin embargo, sobre la importancia de esta inhibición dentro de la citotoxicidad del fármaco ni el mecanismo por el que la produce.

Además, se ha demostrado el papel de la vía STAT3 en la resistencia a inhibidores de EGFR en CECC. La sobreexpresión de EGFR ocurre en la mayoría de CECC y se asocia con estadios avanzados y una peor SG. La regulación positiva de STAT3 y la activación a través de vías dependientes e independientes de EGFR contribuyen a la resistencia intrínseca o adquirida a estos fármacos en CECC y otros tumores sólidos (204). La activación de STAT3 se ha encontrado en el contexto de resistencia a los TKI del EGFR en modelos preclínicos de CECC (222,303). También se ha demostrado que la inhibición indirecta de STAT3 por los inhibidores de EGFR puede promover significativamente la sensibilidad de las células CECC a la RT (304,305).

1.4.2.2.8. Terapias dirigidas a la vía STAT3

Dado que STAT3 tiene un papel central en la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis, la angiogénesis, la respuesta inmune y los procesos de metástasis, modular su función supone una estrategia racional para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer (203,210,232,246,306)

Los inhibidores de STAT3 pueden tener dos estrategias principales: la inhibición directa o la indirecta. Los inhibidores directos bloquean el dominio SH2, el dominio de unión al ADN y el dominio N-terminal, que regulan la activación de STAT3 al bloquear su fosforilación, dimerización, su translocación nuclear y la unión al ADN. Los inhibidores indirectos se dirigen a los reguladores de la parte superior de la vía STAT3, como la unión del receptor-ligando y los dominios quinasa.

De las moléculas en investigación actuales, hasta ahora los inhibidores de EGFR, los anticuerpos anti-IL-6, la inhibición de Jak mediante la curcumina, los inhibidores de molécula pequeña del dominio STAT3 SH2 y las terapias antisentido STAT3 han progresado a ensayos clínicos, aunque no todos incluyen pacientes con CECC. Sin embargo, estos ensayos también proporcionan las bases para una posible investigación para el tratamiento del CECC. Las limitaciones de la posible aplicación clínica de estas terapias incluyen la falta de selectividad y de eficacia. Además, como la

heterogeneidad tumoral es común en los CECC, más de una vía oncogénica puede estar implicada en cada paciente.

Un ensayo clínico, actualmente en la fase de reclutamiento, tiene como objetivo evaluar la eficacia de Ruxolitinib, un inhibidor selectivo de JAK1 y JAK2, en CECC (NCT03153982).

Danvatirsén (AZD9150), una molécula de oligonucleótido antisentido sintética dirigida a STAT3 mediante la inhibición de la traducción de ARNm, ha demostrado actividad antitumoral en modelos de xenoinjerto. Se ha evaluado en ensayos clínicos que incluyen pacientes con CECC R/M, ya sea administrado en monoterapia o en combinación con el agente antiPD-L1 durvalumab. Un ensayo de fase Ib / II con esta última combinación, no reveló toxicidades sinérgicas aparentes. Además, la trombocitopenia reversible y la transaminitis (previamente asociadas con la monoterapia con danvatirsén) se manejaron fácilmente. Se observó una actividad antitumoral alentadora, con respuestas parciales prolongadas (TR 23%, DOR 11,1 meses y 47% de supervivencia a los 6 meses de tratamiento) en pacientes sin tratamiento previo con IT anti PD- L1(307).

1.4.2.3. AXL

AXL es miembro de la familia TAM de RTK. La unión del ligando a los receptores TAM en la superficie celular conduce a la dimerización del receptor, la activación del dominio quinasa mediante la auto/transfosforilación de los residuos de tirosina ubicados en la cola citoplasmática de cada receptor. La activación de los receptores TAM estimula las cascadas de señalización PI3K / AKT y RAS / RAF / MEK / ERK (MAPK) que conducen a una mayor supervivencia celular, proliferación, migración, invasión y angiogénesis. La sobreexpresión y activación de la familia TAM se han observado en muchos tipos tumorales (308–310).

En el caso del CECC, se ha identificado que AXL está altamente expresado y esto se asocia con un peor pronóstico (309). Por otra parte, se ha descrito su implicación en la resistencia de las células tumorales a los TKI anti-EGFR y a agentes quimioterápicos. *Brand y col.* lograron inhibir las vías de proliferación y metastatización en CECC mediante la inhibición de AXL, y revertir la resistencia al cetuximab en modelos *in vitro* (311). También identificaron sobreexpresión e hiperactivación de AXL en líneas celulares de CECC y modelos murinos PDX que eran resistentes a la RT. Se obtuvieron

datos similares en modelos de CPNCP, con AXL sobreexpresada, y se asoció estrechamente con la expresión de EGFR en células resistentes a cetuximab. La activación de AXL estimulaba la proliferación celular, la activación de EGFR y la señalización MAPK en estos modelos. En particular, EGFR regulaba directamente la expresión de ARNm de AXL a través de la señalización MAPK y el factor de transcripción c-Jun, creándose un circuito de retroalimentación positiva que mantenía la activación de EGFR mediante AXL. Estos datos indican que la doble inhibición de AXL y EGFR puede proporcionar respuestas antitumorales beneficiosas independientemente de la sensibilidad inicial a la terapia anti-EGFR. Asimismo, se ha identificado AXL como un mediador clave de la resistencia adquirida al TKI erlotinib en CECC (312).

Rosell y col. exploraron *in vitro* e *in vivo* el efecto del inhibidor del EGFR osimertinib, solo y en combinación con el inhibidor de STAT3 dihidroartemisinina (DHA) en CECC. Otros compuestos que inhiben STAT3, las quinasas de la familia Src (SFK), la esfingosina quinasa 1 (SPHK1) o AXL también se combinaron con osimertinib *in vitro*. Osimertinib ejerció citotoxicidad sinérgica hacia las células de CECC cuando se combinó con DHA *in vitro*. DHA revirtió la expresión de STAT3 inducida por osimertinib y la fosforilación de Src. Esta doble combinación también inhibió la expresión de AXL. El potencial anticancerígeno de la combinación de osimertinib más DHA fue validado *in vivo* en xenoinjertos CECC en ratones, sin efectos secundarios notables (313).

AXL se ha investigado como diana terapéutica. AXL se sobreexpresó o se inhibió selectivamente con BGB324 en líneas celulares de CECC para evaluar su papel en la proliferación, migración y capacidad de invasión. Además, la sobreexpresión de AXL aumentó la migración y la capacidad de invasión, y ambas propiedades eran reducidas mediante el tratamiento con BGB324. Por el contrario, la proliferación no se vio afectada por la sobreexpresión de AXL ni por la inhibición con BGB324 *in vitro*, aunque se observó una sobreexpresión de la proteína AXL durante la progresión tumoral con niveles de expresión más altos en tumores recurrentes. Esto indica que AXL es importante para la progresión a etapas tumorales más avanzadas (309).

En conjunto, estos datos sugieren que AXL funciona como un potente oncogén que puede modular la resistencia a las terapias convencionales y dirigidas contra el cáncer.

1.4.2.4. Esfingosina quinasa 1

Los esfingolípidos juegan un papel crucial en la patogénesis del cáncer, al modular las vías de transducción de señales celulares que influyen en múltiples procesos biológicos como la senescencia celular, la diferenciación, la apoptosis, la migración y la proliferación (314,315).

La SPHK1 es una quinasa que cataliza la conversión de la esfingosina en esfingosina-1-fosfato (S1P). Se ha demostrado que la expresión de ARNm de SPHK1 está significativamente elevada en varios tipos de tumores (316). El aumento de los niveles de S1P, resultado de la expresión / actividad elevada de SPHK1, se ha asociado con la supresión de la apoptosis (317), el aumento del crecimiento y la migración celular (318), la angiogénesis aumentada (319), la resistencia a la RT (320) y a la QT (321,322).

Los mecanismos de activación de SPHK1 a menudo implican una variedad de factores de crecimiento, entre ellos el PDGF, EGF, factor de crecimiento nervioso (NGF), IGF y el factor de crecimiento tumoral beta ($TGF\beta$) (316). La interacción del RTK de estos factores con SPHK1 / S1P da como resultado una red de señalización intracelular compartida (323).

La SPHK1 es importante en el metabolismo de los esfingolípidos, que regula el crecimiento tumoral en CECC. El silenciamiento de SPHK1 produce una menor proliferación celular con menor crecimiento tumoral (324), y aumenta la sensibilidad a la RT. Del mismo modo, se ha encontrado una correlación entre un mayor estadio tumoral y la expresión elevada de SPHK1 (325).

En un estudio en CECC, se inhibió SPHK1 usando el inhibidor no competitivo específico de quinasa 2-(p-hidroxianilino)-4-(p-clorofenil) tiazol (SKI-II). Este inhibidor redujo el crecimiento tumoral en modelos murinos (326).

Además de su papel bien documentado en la proliferación celular del CECC, SPHK1 también regula la invasión (327). En muestras tumorales de CECC, la expresión de SPHK1 fue significativamente mayor, en comparación con la mucosa normal, y esto también se asoció con una mayor profundidad de la invasión tumoral, mayor riesgo de metástasis y una peor SG (328).

No hay evidencia de si SPHK1 está directamente involucrada en la activación del EGFR en CECC. Sin embargo, se observó que la expresión de SPHK1 se correlacionaba con genes de la cascada de la vía EGFR (anfiregulina, integrina $\alpha 5$, epirregulina). De hecho, mediante tinción IHQ, se demostró una correlación positiva entre la expresión de EGFR y SPHK1. Además, modelos celulares con sobreexpresión de SPHK1 presentaban una mayor fosforilación de EGFR, mientras que las células con SPHK1 silenciada mostraron una fosforilación de EGFR reducida (327).

Además, otro trabajo también demostró que EGFR participa en el proceso de invasión, junto con STAT3, en CECC (329). La eliminación de S1P1 redujo significativamente la señalización de IL-6 / STAT3; SPHK1 reguló positivamente la señalización de EGFR y STAT3 para aumentar la capacidad invasiva (330).

Juntos, estos estudios sugieren que puede existir una relación entre SPHK1, EGFR y STAT3 para afectar la capacidad invasiva.

Se ha estudiado el impacto de SPHK1 sobre la eficacia *in vitro* de la RT en CECC, con especial interés en la señalización de EGFR. Líneas celulares sensibles a la irradiación mostraron una pobre respuesta al cetuximab y a inhibidores de SPHK1 (SKI-II), pero una reducción de la migración celular y la supervivencia tras la selección simultánea de EGFR y SPHK1 (331).

También se ha observado que SPHK1 está implicada en la cascada de señales de IGF-1 y desempeña un papel crítico en la EMT inducida por IGF-1, la migración y la resistencia al paclitaxel en células de CPNCP, lo que postula a SPHK1 como potencial diana terapéutica (332).

1.4.2.5. Proteína asociada a Yes 1 (YAP-1)

La vía Hippo-YAP ha sido identificada como una vía de señalización alterada en muchos tumores, incluyendo el CECC (333). YAP-1 es el principal efector de esta vía y actúa como un cofactor de transcripción que regula la expresión de genes involucrados en las señales de proliferación, supervivencia y migración celular; lo que contribuye al genotipo tumorigénico (334). También se ha observado que determinadas características tumorales, como las propiedades de sus CSC y la EMT, están reguladas por YAP-1(335). Esto se corrobora en evidencias recientes que muestran que algunos tipos de tumores podrían depender de la regulación transcripcional de YAP (336).

El contacto célula-célula promueve la activación de quinasas que fosforilan a YAP, que es degradada y no puede traslocarse al núcleo. En ausencia de contacto célula-célula o en presencia de señales de crecimiento, los componentes del complejo central de Hippo no están activos y YAP no fosforilado puede translocarse al núcleo, uniéndose a TEAD (factor de transcripción del dominio TEA) y activar la expresión de genes involucrados en la proliferación, supervivencia y migración celular (337).

Paralelamente, FAT1 ha sido identificado como un regulador de la vía Hippo/YAP en CECC. Más del 25% de los CECC tienen mutaciones inhibitorias o deleciones en este regulador, aproximadamente dos veces la frecuencia de presencia de alteraciones en EGFR en este tipo de cáncer. La pérdida de FAT1 dificulta la formación del complejo

de señalización multimérico de la vía Hippo, hecho que conduce a la activación de YAP y a la progresión del tumor (338).

Otras vías, como la de PI3K-PDK1 también se han asociado con la activación de la transcripción dependiente de YAP (339).

Además, se ha demostrado que la sobreexpresión de YAP en CECC es significativamente mayor que en el tejido benigno, correlacionándose con una peor diferenciación tumoral (340). Varios estudios confirmaron que la activación de YAP promovía la tumorigénesis en CECC y que se correlacionaba con mal pronóstico (341).

En cuanto a la relación de YAP con la respuesta a fármacos, se ha asociado el aumento de su expresión con la resistencia al cisplatino (342). La amplificación de YAP también se ha identificado como biomarcador de resistencia al cetuximab (343), así como a TKIs de EGFR. La inhibición de YAP resultó en la resensibilización de las células resistentes a inhibidores de EGFR (gefitinib y erlotinib) en células de CPNCP (344), por lo que los inhibidores de YAP podrían tener un papel como diana terapéutica (345).

1.4.2.6. TP53

TP53 es el principal gen supresor de tumores, que codifica para un factor de transcripción con funciones en el mantenimiento de la estabilidad genómica, el ciclo celular, la reparación del ADN, la apoptosis y la senescencia (346).

Debido a la heterogeneidad en CECC y a las diferentes tecnologías utilizadas para detectarlas, la prevalencia de mutaciones en *TP53* reportada en esta neoplasia es bastante variable. Estudios de secuenciación de última generación más recientes han confirmado que *TP53* es el gen supresor de tumores más frecuentemente mutado en CECC, con una frecuencia en casos no asociados al VPH que varía de 75% a 85% (25,226,227). Los tumores de laringe e hipofaringe tienen la tasa de mutación más alta (83.5%) y los de orofaringe la más baja (28.6%). Este hallazgo no es sorprendente dado que un porcentaje importante de los COF está asociado con el VPH y es bien conocida la relación inversa entre la presencia de ADN del virus VPH en el COF y la presencia de mutaciones de *TP53*. Casi un tercio de los tumores de orofaringe en los CECC de los datos del TCGA son VPH relacionados y WT para *TP53*, mientras que los tumores en otras localizaciones son menos propensos a ser VPH relacionados y tienen tasas más altas de mutaciones de *TP53*.

Este resultado sugiere que en pacientes con infección por VPH, p53 se inactiva al unirse a las proteínas virales E6 en lugar de por mutación (25).

En contraste con muchos otros tipos de cáncer, la mayoría de las mutaciones en *TP53* en CECC son mutaciones *missense*, que ocurren con frecuencia dentro de la región central de la proteína, que sirve como dominio de unión de la misma al ADN (347).

Los resultados derivados de estudios del TCGA confirmaron que las alteraciones de *TP53* a menudo ocurren en etapas tempranas del proceso carcinogénico del CECC, ya que pueden detectarse en lesiones premalignas (348). Además, un estudio mediante técnicas de secuenciación directa, no demostró diferencias en las mutaciones de *TP53* presentes en tejidos de CECC primarios y las lesiones metastásicas ganglionares (349). Tomados en conjunto, estos resultados indican que la aparición temprana de mutaciones en *TP53* contribuye a la expansión y progresión clonal en la carcinogénesis del CECC.

Todavía es controvertido si los factores de riesgo, como el uso de tabaco o alcohol y la exposición a productos químicos, pueden afectar la frecuencia de las mutaciones de *TP53* en pacientes con CECC (347). Estos resultados inconsistentes pueden resultar del uso de diferentes métodos para detectar estas mutaciones. Del mismo modo, también existen datos discordantes sobre su asociación con la edad (350,351).

Muchos estudios han sugerido que las mutaciones de *TP53* se correlacionan con el pronóstico del CECC. *Poeta y col.* clasificaron estas mutaciones como disruptivas, cuando producen la proteína p53 truncada o un cambio en los aminoácidos en el dominio de unión al ADN, o no disruptivas. Encontraron mutaciones de *TP53* en 224 casos de 420 pacientes (53,3%) con CECC. En comparación con *TP53* WT, la presencia de cualquier mutación disruptiva en *TP53* se asoció con una disminución de la SG de forma significativa en el análisis uni y multivariado (347).

Usando esta clasificación funcional, varios estudios han confirmado la relación de las mutaciones disruptivas con un crecimiento tumoral más rápido, presencia de metástasis ganglionares y a distancia, y menores tasas de SG.

En cuanto a su papel como biomarcador predictivo, se ha demostrado su implicación en la respuesta a la terapia basada en platino (352). En un estudio se clasificaron las mutaciones de *TP53* en función de la actividad de transactivación de las proteínas mutadas como funcionales, parcialmente funcionales o no funcionales. Las mutaciones no funcionales se correlacionaron con una baja tasa de respuesta patológica completa a la QT neoadyuvante basada en cisplatino. A pesar de estos resultados, todavía se tiene que hallar un sistema efectivo de evaluación del estado de *TP53* para estratificar a los pacientes en diferentes grupos de respuesta.

Adicionalmente, *Lyu y col.* observaron que p53 junto con la proteína RAS pueden desempeñar un papel importante en la regulación de la inmunidad en el CECC, y que el estado mutacional de ambos genes podría ser un biomarcador útil para seleccionar a los pacientes con CECC sensibles a la IT (353).

Se han desarrollado varias estrategias para las terapias dirigidas a TP53 (354), como

- la terapia génica adenoviral
- pequeñas moléculas para restaurar la función de p53
- estrategias para promover la degradación de la proteína mutada, como los inhibidores de *heat shock protein 90* (HSP90)
- estrategias para actuar en rutas de señalización afectadas por la presencia de mutaciones en de *TP53*, induciendo la letalidad sintética

2. HIPÓTESIS

Como hemos descrito anteriormente, los pacientes con CECC tienen un pronóstico modesto. Adicionalmente, los tratamientos utilizados en estos tumores son muy agresivos y conllevan un alto porcentaje de efectos secundarios agudos, pero también crónicos, que empeoran de forma importante su calidad de vida.

Existe una necesidad de detectar biomarcadores que nos ayuden a seleccionar la mejor modalidad terapéutica para cada paciente y a desarrollar nuevas estrategias que reviertan las resistencias a los tratamientos convencionales. La vía de STAT3, así como los genes implicados en la reparación del ADN han demostrado participar en el mecanismo de acción de la mayoría de tratamientos administrados.

En esta línea, nos planteamos la **hipótesis** de que **los niveles de expresión de genes implicados en las vías de reparación del ADN y la vía de STAT3 pueden jugar un papel pronóstico y predictivo de respuesta a diferentes tratamientos del CECC.**

3. OBJETIVOS

Para explorar la hipótesis expuesta en el apartado anterior, planteamos como **objetivos** de esta tesis los que se exponen a continuación.

Objetivo principal

- Correlacionar los niveles de expresión de los genes implicados en las vías de reparación del ADN con la eficacia de la QRT con platino, y la activación de la vía de STAT3 con la eficacia de la combinación de paclitaxel y cetuximab.

Objetivos secundarios

1. Analizar la tasa de respuesta, el control locorregional a los 2 años y la supervivencia global en una serie de pacientes con CECC LA, tratados mediante la administración concomitante de RT y platino según los niveles de expresión de ARNm de genes implicados en la reparación del ADN (*53BP1*, *BRCA1*, *MDC1*, *RAP80* y *RNF8*).

2. Analizar la tasa de respuesta y la supervivencia global en una serie de pacientes con CECC R/M tratados con el esquema basado en paclitaxel y cetuximab en relación a la metilación de *PTPRT*, la sobreexpresión de pSTAT3 y los niveles de expresión de ARNm de STAT3.

3. Describir las características de los pacientes y analizar factores clínicos o epidemiológicos en relación a su potencial valor pronóstico y predictivo de respuesta en ambas series de pacientes con CECC.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación detallaremos la metodología llevada a cabo para intentar demostrar la hipótesis de nuestro trabajo.

3.1. Selección de pacientes y muestras.

Para la valoración del primer objetivo, se seleccionaron 72 pacientes con CECC-LA reseccable e irreseccable con muestra histológica disponible en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Germans Trias i Pujol tratados en nuestro servicio entre 1994 y 2010 con RT convencional o hiperfraccionada concomitante a carboplatino AUC 2 semanal. Denominamos a esta serie de pacientes serie de quimiorradioterapia (serie de QRT).

Para la valoración del segundo objetivo, se seleccionaron los pacientes con CECC R/M tratados en nuestro servicio con la combinación de paclitaxel y cetuximab, entre los años 2008 y 2017. Se detectaron en nuestra base de datos 52 pacientes que habían recibido este esquema de tratamiento en este período, pero sólo 34 de los anteriores tenían muestra histológica disponible en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Germans Trias i Pujol. Denominamos a esta serie de pacientes serie ERBITAX.

La selección de los pacientes, la recogida de datos clínicos y las muestras de tejido tumoral previamente conservado y fijado en formol e incluido en parafina (FFPE) se realizó de forma retrospectiva.

3.1.1. Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC), Banco de Tumores y consentimiento informado

Se obtuvieron las aprobaciones pertinentes del Banco de Tumores y del CEIC antes de iniciar el estudio.

En referencia al consentimiento informado para la recopilación de datos clínicos y la utilización de las muestras histológicas, obtuvimos el consentimiento de todos los pacientes vivos, pero debido a que se trata de un estudio retrospectivo en una patología con una alta tasa de mortalidad, la gran mayoría de los pacientes que se incluyeron habían muerto. En este caso, si no disponíamos de un consentimiento firmado por el

paciente con anterioridad para este propósito, se intentó conseguir el de sus representantes mediante un esfuerzo razonable (llamadas telefónicas, etc.).

El uso de las muestras fue realizado bajo las directrices nacionales e internacionales (Código Deontológico y Declaración de Helsinki) y la normativa legal vigente (Ley Orgánica 3/2018, de Protección de Datos de carácter personal (LOPD) y la Ley Orgánica 14/2007, del 3 de Julio, de Investigación Biomédica).

3.1.2. Recogida de datos clínicos

Los datos clínicos considerados de relevancia para el estudio de la serie de QRT que fueron seleccionados y registrados fueron: edad, sexo, hábitos tóxicos (tabaco y alcohol), *performance status* (PS), localización del tumor, fecha del diagnóstico, TNM clínico, estadio clínico, resecabilidad, requerimiento o no de cirugía de rescate, TNM patológico en aquellos que se realizó cirugía de rescate, fecha de inicio y fin del tratamiento, tipo de RT, respuesta a la QRT, progresión al tratamiento, fecha de progresión, existencia de un segundo tumor primario, fecha del último control, estado en el último control y fecha de la muerte.

La recogida de los datos clínicos se realizó a partir de las historias clínicas en papel de los pacientes. Todos los datos fueron codificados al ser introducidos en la base de datos, siguiendo las normas de protección de datos.

Como datos clínicos de relevancia para el estudio de la serie ERBITAX, se registraron: edad, sexo, hábitos tóxicos (tabaco y alcohol), localización del tumor, fecha del diagnóstico y estadio al diagnóstico, tratamientos previos, respuesta al tratamiento previo, fecha de recidiva, línea de tratamiento, tipo de recidiva, PS en el momento de la recidiva, respuesta a paclitaxel / cetuximab, grado de rash acneiforme (sólo se analizó este parámetro de toxicidad por su posible relación con la eficacia del tratamiento), fecha de inicio de tratamiento, fecha fin de tratamiento, progresión (sí/no), fecha de progresión, tratamientos tras la progresión (si la había), fecha del último control, estado en el último control y fecha de la muerte.

La recogida de los datos clínicos se realizó a partir del programa informático SAP. Todos los datos fueron codificados al ser introducidos en la base de datos, siguiendo la normativa vigente.

Se recogieron los datos clínicos de todos los pacientes, independientemente de si tenían muestra histológica disponible o no, para poder comparar ambas poblaciones y valorar la representatividad de la población de estudio.

3.1.3. Manejo de las muestras

Todas las muestras fueron anonimizadas en el Biobanco-IGTP y enviadas al laboratorio. Los cortes de 10 micras en laminilla para cada muestra se obtuvieron a partir del bloque de parafina, por métodos estándar. Una patóloga especialista discriminó entre las células tumorales y estromales: si la infiltración tumoral resultaba < 85%, el área tumoral se aislaba por microdissección láser; en caso contrario, se hacía por macrodissección con un micrótomo.

Sólo se pudo realizar el análisis molecular en 32 de los 72 casos seleccionados en el estudio de la serie de QRT debido a la antigüedad de las muestras.

3.2. Análisis del estado del VPH

En la primera serie (serie de QRT) se evaluó el estado del VPH en 63 de las 72 muestras tumorales, debido a la calidad de las mismas. Se utilizaron las técnicas de IHQ e hibridación *in situ* cromogénica (CISH).

En el estudio la segunda serie (serie ERBITAX), sólo se evaluó el estado del VPH en las muestras tumorales localizadas en la orofaringe mediante IHQ. No se utilizó estudio de ADN del VPH porque la IHQ era el estudio considerado estándar por las guías y la comunidad científica en ese momento, y en un intento de preservar la mayor cantidad posible de tejido.

3.2.1. Análisis de expresión proteica mediante IHQ

p16INK4a es una proteína codificada por el gen supresor tumoral *CDKN2A*, que se encuentra funcionalmente inactiva en numerosos tumores. Actúa como inhibidor de CDK y desacelera el ciclo celular inactivando la función del complejo ciclina D/ CDK4-6. Este complejo regula el punto de control de la fase G1 del ciclo celular mediante la fosforilación y la subsiguiente inactivación de pRb, que permite la liberación del factor de transcripción E2F y permite a la célula entrar en fase S.

La proteína E7 del VPH se une a la forma hipofosforilada de pRb, causando la liberación de E2F y la posterior degradación de pRb, lo cual provoca un aumento de p16. Por esto, la sobreexpresión de p16 ha sido propuesta como un marcador biológico subrogado de infección por el VPH.

El análisis de IHQ de p16INK4a (IHQ-p16) se realizó con el anticuerpo CINtec® Histology (E6H4), Ventana Medical Systems, IncRoche. El complejo inmune formado por el anticuerpo unido a la proteína se visualizó con el sistema BenchMark Ultra (Ventana). Se utilizó como control positivo una muestra de amígdala palatina.

Todas las tinciones fueron valoradas por un patólogo especialista, y se definieron como tumores p16 positivos aquellos que presentaban tinción intensa y difusa, nuclear y citoplasmática, en 70% o más de las células tumorales (Fig.5).

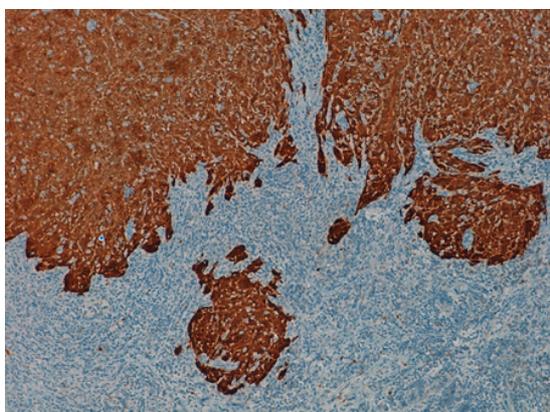


Figura 5. Carcinoma escamoso de amígdala p16 positivo

3.2.2 Análisis de VPH mediante CISH

El análisis mediante CISH para la detección del ADN viral del VPH se realizó con el test *INFORM HPV III Family 16* (Ventana Medical Systems, IncRoche), que detecta los serotipos oncogénicos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 66. El complejo inmune generado se visualizó con el sistema *BenchMark XT* (Ventana). Se consideró positiva la tinción puntiforme nuclear en las células tumorales.

Se encontraron dificultades en la valoración de esta técnica, ya que se objetivó positividad débil e inespecífica en células inflamatorias, estromales y epiteliales (estructuras glandulares y mucosa).

3.3. Análisis por IHQ de la proteína pSTAT3

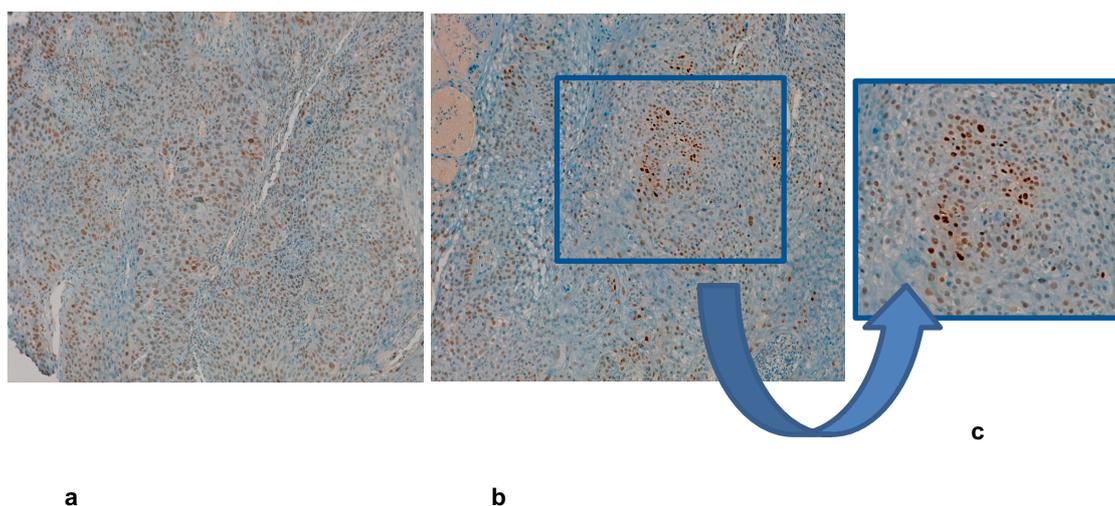
Por cuestiones logísticas, la determinación de pSTAT3 se llevó a cabo en dos fases en el tiempo, con dos anticuerpos diferentes y valorada por dos patólogos distintos.

Las primeras 22 muestras, correspondientes a un análisis preliminar, fueron analizadas con el anticuerpo *Phospho-Stat (Tyr705) (3E2). Mouse mAb. (Cell Signaling Technology)*, y las 12 siguientes, como cohorte de ampliación, con el *antiSTAT3 (phosphoY705) antibody (EP2147Yab171358) de Abcam*. El complejo inmune se visualizó con el sistema *BenchMark Ultra (Ventana)*. Secciones tumorales incubadas sin el anticuerpo sirvieron como control negativo.

En cada sección, el núcleo y el citoplasma de las células tumorales fueron graduados por la intensidad de la reacción (0 o ausente, 1+ o débil, 2+ o moderado, y 3+ o intenso).

Se había planificado realizar un coeficiente *histoscore*, calculado mediante la suma de $(1 \times \% \text{ células } 1+) + (2 \times \% \text{ células } 2+) + (3 \times \% \text{ células } 3+)$, con un resultado máximo de 300. Debido a las diferencias técnicas y consecuentes diferencias en resultados obtenidas entre el primer y el segundo análisis, ambas poblaciones no fueron comparables y decidimos valorar como sobreexpresión de pSTAT3 la presencia de áreas 2 y/o 3+ en la valoración independiente por cada uno de los patólogos.

Figura 6. Imágenes por IHQ de la expresión proteica de pSTAT3



- a. Carcinoma escamoso sin sobreexpresión de pSTAT3 (1+)
- b. Carcinoma escamoso con sobreexpresión de pSTAT3 (2+)
- c. Detalle foco pSTAT3 (2+)

3.4. Análisis de expresión génica a nivel de ARN mensajero

En el estudio de la serie de QRT, se realizó la extracción de ARN de las muestras parafinadas, siguiendo un procedimiento patentado de nuestro laboratorio (número de patente europea EP1945764-B1), basado en la optimización del aislamiento de ARN procedente de tejidos parafinados, mediante extracción con el método fenol-cloroformo modificado.

Se determinó la expresión a nivel de ARNm de los genes *53BP1*, *BRCA1*, *MDC1*, *RAP80* y *RNF8* mediante técnicas de PCR cuantitativa a tiempo-real (RT-qPCR), después del proceso de retrotranscripción inversa (MMLV y *Random Hexamers*). Se usaron TaqMan Gene Expression assays (Thermofisher) prediseñados, para el estudio de los genes, siguiendo los protocolos del fabricante.

En el estudio derivado de la serie ERBITAX, se realizó la extracción de ARN de las muestras parafinadas siguiendo el protocolo de los kits comerciales EZNA FFPE RNA easy de Omega.

Para el estudio de la expresión de STAT3, los *primers* y la sonda de tipo MGB (tecnología TaqMan) de amplificación fueron diseñadas usando *Primer Express 3.0 Software* (Applied Biosystems), de acuerdo con su código en la base de datos Ref Seq (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink>). Específicamente, las secuencias de los *primers* y de la sonda de amplificación fueron: forward primer, 5'- CACCTTCAGGATGT CCGGAA-3', reverse primer, 5'-ATCCTGGAGATTCTCT ACCACTTTCA-3', sonda 5'- FAM AGAGTGCAGGATC TAGA-MGB 3'. Debido a la escasez de material, sólo se pudo realizar esta determinación en 21 de las 34 muestras inicialmente disponibles.

La cuantificación de la expresión génica se realizó mediante ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Thermofisher). Los niveles de expresión génica se calcularon mediante el método comparativo $\Delta\Delta C_t$, ampliamente descrito en la bibliografía. En todos los análisis, se usó el gen GAPDH como control interno de muestra (gen *housekeeping*), por ser el que demostró menos variabilidad intermuestra en su expresión.

3.5. Análisis de las mutaciones de *PTPRT*

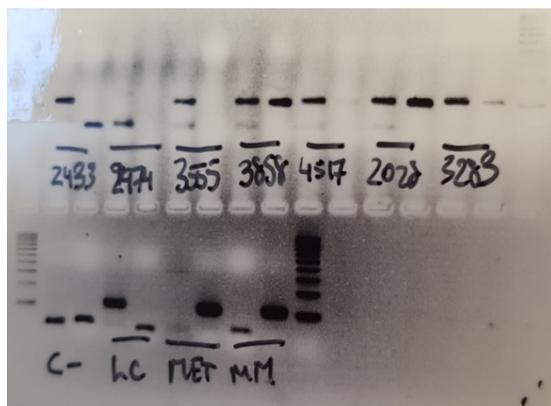
La evaluación de dichas mutaciones se realizó mediante el abordaje por secuenciación masiva de todo el gen. Se aisló el ADN a partir de la selección previa de la zona tumoral, realizando la macrodissección o microdissección de dicha zona, como hemos comentado previamente, y se purificó el ADN mediante un método basado en ultrasonidos (Covaris) que preserva en mejores condiciones el ADN extraído de material parafinado. Acto seguido, mediante amplicones de tamaño de 150 bp, que cubrían todo el gen *PTPRT*, se realizaron las librerías con todas las muestras. Se realizó el análisis de las muestras en el equipo MiSeq de Illumina. Una vez analizadas, se procedió al análisis bioinformático de los resultados obtenidos, usando un programa específico (*Ingenuity program*).

Realizamos el análisis en los primeros 22 pacientes, hallando alguna mutación en *PTPRT* en 3 de ellos. Debido a la escasa frecuencia en este reducido número de muestras, no realizamos la determinación en las 11 muestras restantes debido a que consideramos que no impactaría en los resultados.

3.6. Análisis de la hipermetilación del promotor de *PTPRT*

De la misma extracción de ADN obtenida anteriormente se procedió al estudio de la metilación del ADN de la región promotora del gen *PTPRT*. Se realizó la modificación química del ADN por el método de conversión por bisulfito, donde todas las citosinas se transforman en timinas, excepto aquellas citosinas que están metiladas, que pierden sólo su grupo metilo y son resistentes al cambio. El análisis de metilación se realizó mediante la técnica MSP (*Methylation-Specific PCR*): Se diseñaron oligonucleótidos específicos para las regiones metiladas y otros para las no metiladas, mediante el programa *MethPrimer Software*. Posteriormente se realizó la amplificación por la técnica de PCR, y se analizaron los productos a través de un gel de agarosa al 2,5%. Se consideró como muestras metiladas o no metiladas según si presentaban una banda en la PCR específica para regiones metiladas o no metiladas, respectivamente, y hemimetiladas cuando presentaban banda para ambas reacciones (ver Figura 7).

Figura 7. Resultados de PCR específica de metilación (MSP) del gen *PTPRT* mediante visualización por gel de agarosa



Ejemplos de pacientes con tumores con *PTPRT* no metilado (num 2433, 3555, 4517), metilado o hemimetilado (num 3858, 2020, 3283), y no amplificado (num 2974). Los pacientes hemimetilados, tienen una copia del gen metilada y la otra copia no metilada: se consideran como pacientes metilados. A nivel de controles: C- corresponde a control negativo sin amplificación, hC a control de no metilación, MET y MM a control de metilación.

3.7. Análisis estadístico

El análisis incluyó todos los datos descritos de los pacientes, del tumor y los datos moleculares experimentales.

La respuesta radiológica se evaluó de acuerdo con los criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (RECIST) versión 1.0., en el análisis de la serie de QRT, y 1.1. en la serie ERBITAX. (Ver anexo 2.)

Se determinaron:

- la supervivencia global (SG), que se calculó desde el inicio del tratamiento hasta la muerte del paciente por cualquier causa o la fecha del último seguimiento.
- la supervivencia libre de progresión (SLP), que se definió como el tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento hasta la progresión o, en caso de que no la hubiera, el último seguimiento.
- la tasa de control locorregional (CLR) a los dos años, definida como la ausencia de progresión locorregional a los 2 años desde el inicio del tratamiento.
- la tasa de segundo tumor primario, definida como el porcentaje de pacientes con otro tumor primario sincrónico o metacrónico.

- la supervivencia global relacionada con el cáncer de cabeza y cuello, que se calculó desde el inicio de tratamiento hasta la muerte por cáncer de cabeza y cuello
- supervivencia desde el diagnóstico, que se calculó desde el diagnóstico hasta la muerte del paciente por cualquier causa o la fecha del último seguimiento.
- tiempo a la recidiva, que se calculó desde el diagnóstico hasta la recidiva y/o muerte
- la tasa de respuesta (TR), que se calcula como el porcentaje de pacientes que alcanzan la respuesta completa (RC) y parcial (RP) por la exposición al tratamiento comparado con el número total de pacientes expuestos al tratamiento.

La SG y la SLP se estimaron mediante el método de Kaplan-Meier y se compararon con la prueba log-rank. Se calculó el coeficiente de correlación de Spearman para determinar la correlación entre variables continuas, la prueba de U de Mann-Whitney para comparar variables continuas según los distintos niveles de las variables categóricas, y la prueba Chi-cuadrado o Prueba exacta de Fisher para comparar variables categóricas. En la serie de QRT, la asociación entre cada factor pronóstico potencial y la SLP y la SG se evaluaron mediante modelos de Cox univariados. En la serie ERBITAX, se realizaron modelos de regresión logística univariados y multivariados para la variable respuesta. La cuantificación del efecto se estimó mediante la odds ratio (OR) y su correspondiente intervalo de confianza (IC) al 95%. En el modelo multivariado se incluyeron las variables que presentaron un nivel de significación estadística <0.25 en los modelos univariados.

Todos los análisis de la serie de QRT se realizaron utilizando el programa SAS V9.3 y los de la serie ERBITAX se llevaron a cabo mediante el Software R v3.4.2.

5. RESULTADOS

Como hemos explicado en el apartado anterior, se seleccionaron 2 series de pacientes, la serie de QRT y la serie ERBITAX. A continuación, describiremos los resultados del análisis de ambas.

Durante el desarrollo de la tesis, hemos comunicado resultados preliminares de este análisis en forma de un artículo, un póster y una comunicación oral en congreso, que adjuntamos en el anexo 7.

4.1. Objetivo: Correlacionar los niveles de expresión de los genes implicados en las vías de reparación del ADN con la eficacia de la QRT con platino.

Los resultados de esta serie se describen en la siguiente publicación:

Cirauqui B, Margelí M, Quiroga V, Quer A, Karachaliou N, Chaib I et al. **DNA repair pathways to regulate response to chemoradiotherapy in patients with locally advanced head and neck cancer.** Tumour Biol. 2016 Oct; 37(10):13435-13443.

doi: 10.1007/s13277-016-5149-0. Epub 2016 Jul 27. PMID: 27465548.

4.1.1. Características clínicas de la serie de QRT

4.1.1.1. Características clínicas basales de los pacientes

Recordemos que 72 pacientes con CECC LA fueron incluidos en la serie de QRT.

Observamos un claro predominio de pacientes varones, con una mediana de edad de 60 años. La gran mayoría había estado expuesto a hábitos tóxicos y presentaba un PS 0 ó 1. Casi la mitad de los tumores estaban localizados en la orofaringe y más del 90% se diagnosticaron en estadio IV y fueron considerados irresecables.

En cuanto a la relación con el VPH, sólo 4 de los 72 pacientes (6,35%) tuvo sobreexpresión de p16: dos pacientes con el tumor localizado en la orofaringe, uno en seno maxilar y uno en cavidad oral. La determinación por CISH mostró amplificación en uno de los casos y los otros 3 fueron dudosos.

Detallamos toda esta información en la Tabla 3.

Tabla 3. Características basales de los pacientes de la serie de QRT

		Total (N=72)
Sexo		
Hombre	N (%)	67 (93,06)
Mujer	N (%)	5 (6,94)
Edad (años)		
	Mediana (mín-máx)	60,19 (42-79)
PS		
0	N (%)	26 (36,11)
1	N (%)	45 (62,50)
2	N (%)	1 (1,39)
Factores de riesgo		
Ninguno	N (%)	5 (6,94)
Tabaco	N (%)	6 (8,33)
Tabaco y alcohol	N (%)	61 (84,72)
Histología		
Carcinoma escamoso	N (%)	70 (97,22)
Carcinoma pobremente diferenciado	N (%)	2 (2,78)
Localización		
Cavidad oral	N(%)	8 (11,11)
Orofaringe	N(%)	34 (47,22)
Hipofaringe	N(%)	13 (18,05)
Laringe	N(%)	12 (16,66)
Otros	N(%)	5(6,94)
Estadio		
III	N (%)	7 (9,72)
IVA	N (%)	36 (50,00)
IVB	N (%)	29 (40,28)
Resecabilidad		
Resecable	N(%)	5 (6,94)
Irresecable/inoperable	N(%)	67 (93,05)

4.1.1.2. Tratamiento

Todos los pacientes fueron tratados con QRT concomitante. La QT recibida fue carboplatino AUC 2 semanal. 83% de los pacientes fueron tratados con RT convencional y un 17% con hiperfraccionada, con dosis de 70 Gy sobre el tumor y las áreas de drenaje ganglionar afectas, 50 Gy sobre el resto del cuello y con protección de médula espinal a 45 Gy. No se recogieron los datos para evaluar la intensidad de dosis del tratamiento (reducciones, retrasos y suspensiones de dosis de carboplatino ni interrupciones, tiempo y dosis total de la RT). 17% de los pacientes requirieron un vaciamiento ganglionar cervical de rescate.

4.1.1.3. Respuesta a la QRT

La tasa de respuesta completa tras la QRT fue del 43,1% y la TR del 86,2%. Un 10% de los pacientes progresaron durante el tratamiento (Tabla 4.).

Tabla 4. Respuesta a la quimiorradioterapia en la serie de QRT

	Total		
	N	%	IC 95%
RC	31	43,1	[30,6-54,2]
No RC	40	55,6	[44,4-66,7]
RP	31	43,1	[31,9-54,2]
EE	1	1,4	[0-4,2]
PE	8	11,1	[4,2-19,4]
No evaluable	1	1,4	[0-4,2]

4.1.1.4. Respuesta tras cirugía de rescate

Se realizó cirugía de rescate en un 17% de los pacientes. Tras la misma, se obtuvo una tasa de respuesta completa en un 61,1% de los pacientes.

A continuación detallamos la respuesta al tratamiento tras la misma (Tabla 5.)

Tabla 5. Respuesta tras la cirugía de rescate en la serie de QRT

	Total		
	N	%	IC 95%
RC	44	61,1	[50- 72,2]
No RC	27	37,5	
RP	18	25	[15,3- 34,7]
EE	2	2,8	[0- 6,9]
PE	7	9,7	[4,2-16,7]
No evaluable	1	1,4	[0-4,2]

4.1.1.5. CLR a los 2 años

El 38,89% de los pacientes no progresaron a nivel locorregional a los 2 años de iniciar el tratamiento (Tabla 6.).

Tabla 6. Control locorregional a los 2 años en la serie de QRT

Control locorregional a los 2 años	N	%
No	30	41,67
Sí	28	38,89
No evaluable	14	19,44
Total	72	100,0

4.1.1.6. Tipo de recidiva

Todos los pacientes que no alcanzaron una RC presentaron una progresión de la enfermedad, a excepción de 4 pacientes que fallecieron por otras causas. 14 de los 44 (31,82%) pacientes que obtuvieron una RC recayeron y 4 (9,1%) se perdieron del seguimiento.

La mayoría de estas recidivas fueron locorregionales. Sólo un 20% fueron únicamente a distancia.

4.1.1.7. Segundo tumor primario

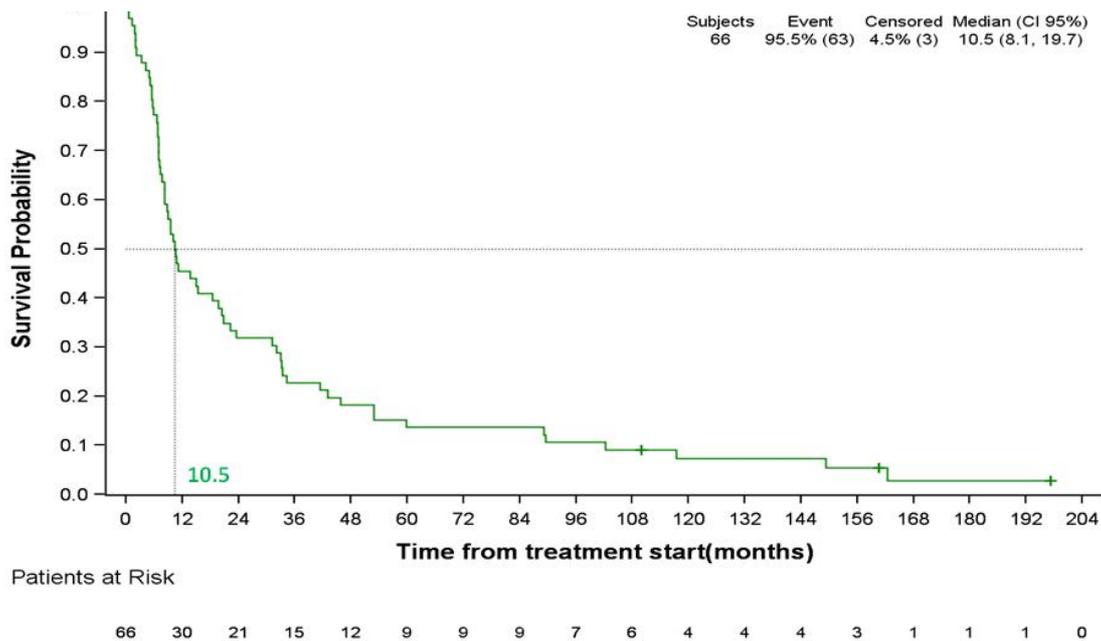
17 pacientes (23,61%) presentaron un segundo tumor primario ya fuera sincrónico o metacrónico, bien como antecedente o bien en el seguimiento.

4.1.1.8. SG

La mediana de SG fue 10,5 meses, con un IC 95% [8,1-19,7] (Figura 8.)

La causa de la muerte fue la neoplasia en un 56% de los casos, un segundo tumor en un 17%, toxicidad al tratamiento en un 8% y otras causas en 19%. Entre estas últimas destacan los accidentes cerebrovasculares y las muertes inesperadas en domicilio sin causa aclarada. El suicidio fue causa de la muerte en un paciente.

Figura 8. Supervivencia global en la serie de QRT

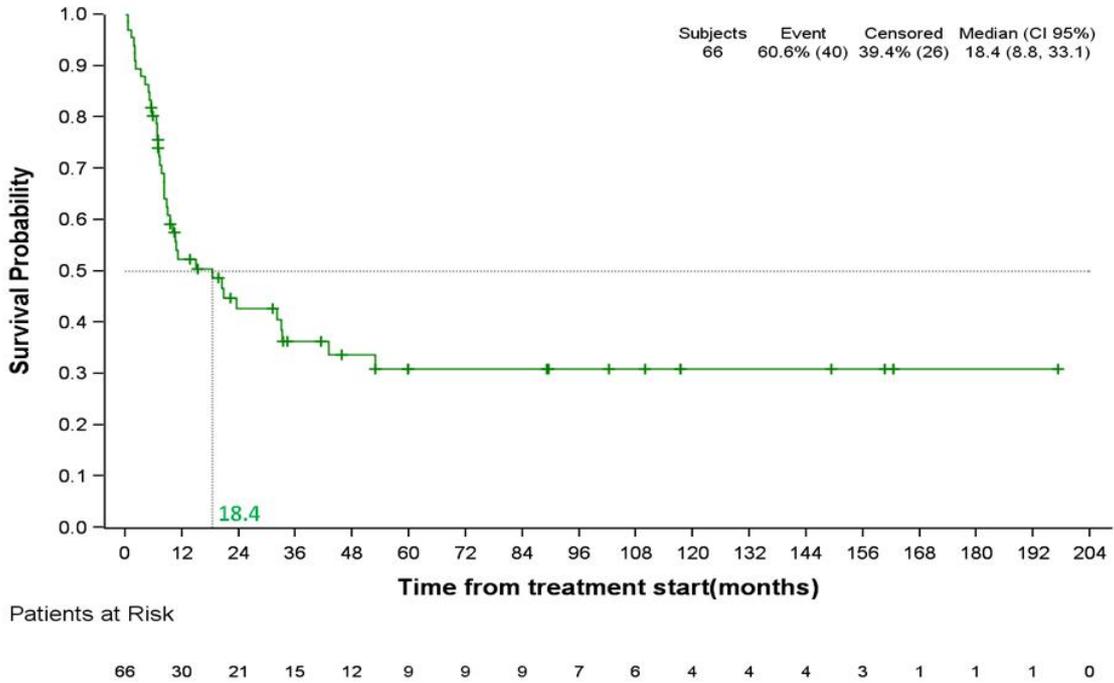


* Los números decimales están expresados en puntos porque la gráfica es la original del artículo publicado por Cirauqui y col. en la revista Tumor Biology

4.1.1.9. Supervivencia global por cáncer de cabeza y cuello

La mediana de supervivencia global por cáncer de cabeza y cuello fue 18,4 meses con IC 95% [8,8-33,1] (Figura 9.)

Figura 9. Supervivencia global por cáncer de cabeza y cuello en la serie de QRT



* Los números decimales están expresados en puntos porque la gráfica es la original del artículo publicado por Cirauqui y col. en la revista Tumor Biology

4.1.1.10. Características basales de los pacientes con muestra valorable en la serie de QRT

Debido a la antigüedad de las muestras, sólo se pudo realizar el análisis molecular completo de las mismas en 32 pacientes. A continuación, detallamos las características de esos pacientes con muestra tumoral valorable (Tabla 7.). Observamos que no existen diferencias significativas con las características de la población general que hemos descrito en el apartado 4.1.1.1.

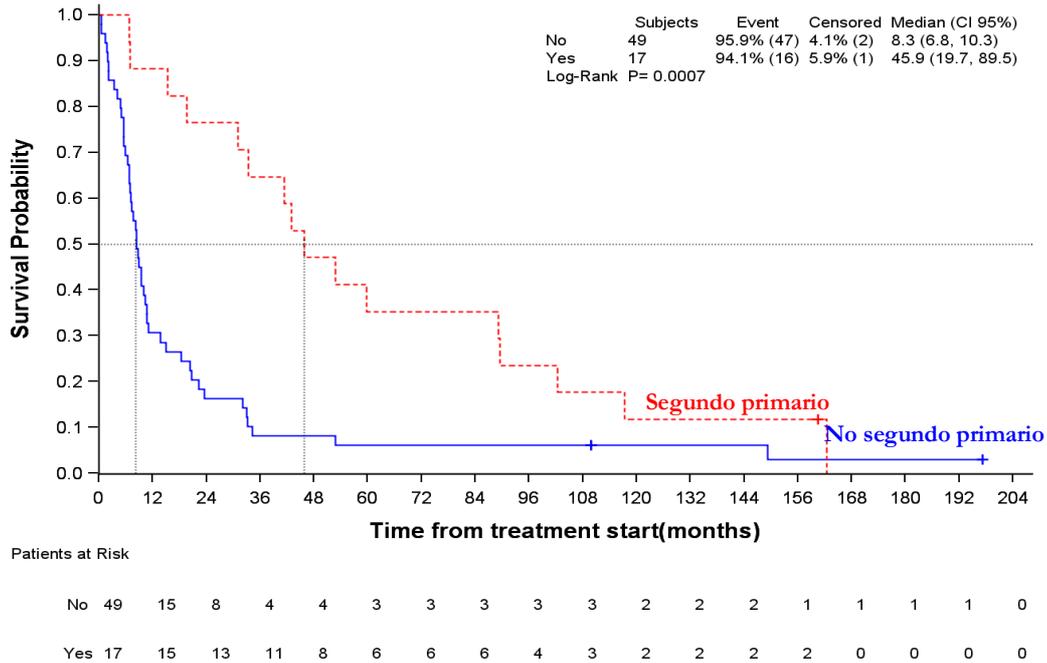
Tabla 7. Características de los pacientes con muestra disponible en la serie de QRT

		Total (N=32)
Sexo		
Hombre	N (%)	29 (90,6)
Mujer	N (%)	3 (9,4)
Edad (años)		
	Mediana (mín-máx)	61,16 (44-79)
PS		
0	N (%)	12 (37,5)
1	N (%)	19 (59,37)
2	N (%)	1 (3,13)
Factores de riesgo		
Ninguno	N (%)	2 (6,3)
Tabaco	N (%)	3 (9,4)
Tabaco y alcohol	N (%)	27 (84,4)
Histología		
Carcinoma escamoso	N (%)	32(100)
Localización		
Cavidad oral	N(%)	4 (12,5)
Orofaringe	N(%)	15 (46,9)
Hipofaringe	N(%)	5 (15,6)
Laringe	N(%)	4 (12,5)
Otros	N(%)	4 (12,5)
Estadio		
III	N (%)	2 (6,3)
IVA	N (%)	17 (53,1)
IVB	N (%)	13 (40,6)
Resecabilidad		
Resecable	N(%)	2 (6,3)
Irresecable	N(%)	30 (93,7)

4.1.1.11. SG en los pacientes con un segundo tumor primario

La SG fue significativamente superior en aquellos pacientes que desarrollaron un segundo tumor primario (Figura 10.)

Figura 10. Supervivencia global en los pacientes con segundo tumor primario en la serie de QRT



* Los números decimales están expresados en puntos porque la gráfica es la original del artículo publicado por Cirauqui y col. en la revista Tumor Biology

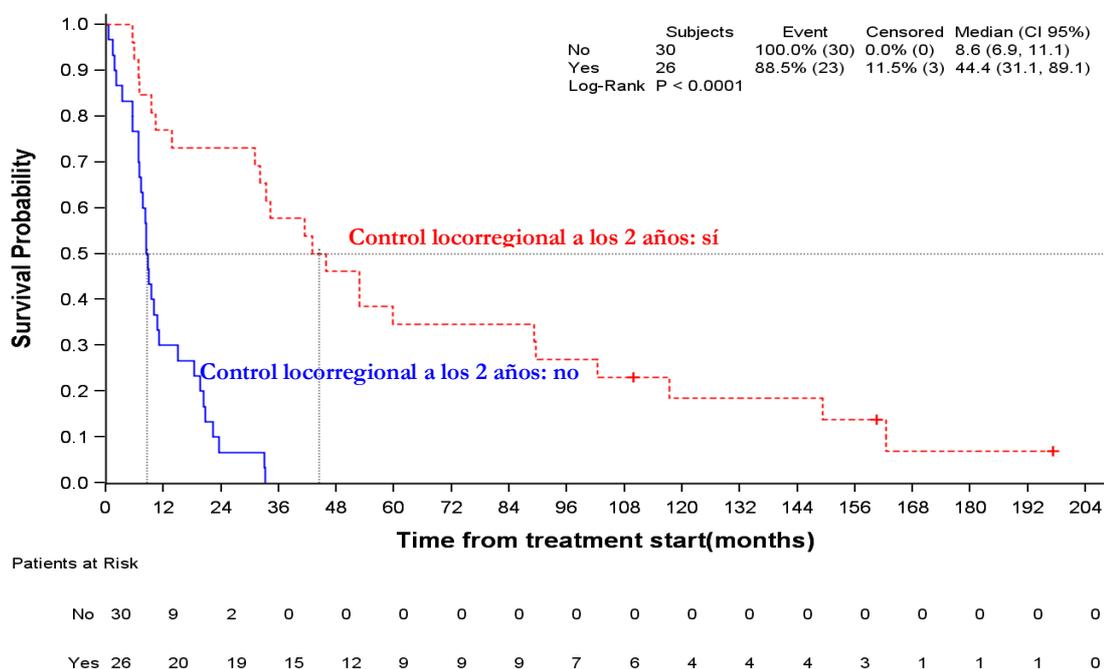
4.1.1.12. SG según el CLR a los 2 años

El CLR a los 2 años se correlacionó significativamente con una mejor SG (Tabla 8 y Figura 11)

Tabla 8. Efecto del control locorregional a los 2 años en la supervivencia global en la serie de QRT

Contrast	HR p value	HR Estimate	CI 95% LL	CI 95% UL
No vs sí	<.0001	7.064	3.187	15.662

Figura 11. Supervivencia global según el control locorregional a los 2 años en la serie de QRT



* Los números decimales están expresados en puntos porque la gráfica es la original del artículo publicado por Cirauqui y col. en la revista Tumor Biology

4.1.1.13. Análisis univariado de la SG según parámetros clínicos

En el análisis univariado de la relación de los parámetros clínicos con la SG, detectamos que los pacientes que desarrollaban un segundo tumor primario obtenían una RC a la QRT y fallecían por otra causa distinta a la neoplasia de cabeza y cuello, alcanzaban una SG significativamente superior a los que no presentaban estas características.

En la Tabla 9. detallamos el análisis univariado de la SG.

Tabla 9. Análisis univariado de la supervivencia global según los parámetros clínicos en la serie de QRT

Variable			Modelo Kaplan-Meier				Regresión de Cox			
	Valor	N	Eventos N (%)	Censurados N (%)	Mediana (IC 95%)	Log-rank (p-valor)	N		Pr > ChiSq	Hazard Ratio (CI 95%)
Sexo	Mujer	4	4 (100)	0	24,18 (5,49-59,76)	0,8756	66	Varón vs mujer	0,8761	1,084 (0,392-3)
	Varón	62	59 (95,16)	3 (4,84)	10,20 (7,69-19,71)					
ECOG	0	25	22 (88)	3 (12)	10,64 (6,77-52,79)	0,1850	66	ECOG 1-2 vs 0	0,1882	1,429 (0,840-2,434)
	1-2	41	41 (100)	0	10,35 (7,69-20,4)					
Edad	< 65 a	46	44 (95,65)	2 (4,35)	10,71 (7,33-20,40)	0,8676	66	Edad ≥ 65 a vs < 65 a	0,8691	0,955 (0,555- 1,644)
	≥65 a	20	19 (95)	1 (5)	10,20 (6,50-45,86)					
Riesgo	Alcohol y/o tabaco	61	58 (95,08)	3 (4,92)	10,64 (7,69-20,40)	0,7529	66	Ninguno vs Alcohol y/o tabaco	0,7539	1,159 (0,462- 2,908)
	Ninguno	5	5 (100)	0	10,35 (5,49-59,76)					
Resecabilidad	No	61	59 (96,72)	2 (3,28)	10,35 (7,33-19,71)	0,1133	66	Resecable vs irresecable	0,1232	0,442 (0,157- 1,248)
	Sí	5	4 (80)	1 (20)	18,4 (8,31- 162,52)					
2º Tumor	No	49	47 (95,92)	2 (4,08)	8,31 (6,77-10,35)	0,0007	66	Sí vs No	0,0011	0,375 (0,208- 0,675)
	Sí	17	16 (94,12)	1 (5,88)	45,86 (19,71- 89,52)					
P16 positiva	No	54	52 (96,3)	2 (3,7)	9,79 (7-19,71)	0,1219	58	Sí vs No	0,1353	0,406 (0,124-1,326)
	Sí	4	3 (75)	1 (25)	49,93 (8,15- ...)					
RC a QRT	Sí	30	27 (90)	3 (10)	32,75 (10,35- 59,76)	< ,0001	65	No RC vs RC	< ,0001	3,563 (1,992- 6,371)
	No	35	35 (100)	0	7,69 (5,88- 10,64)					
Causa de la muerte	CECC	35	35 (100)	0	8,31 (6,77-10,05)	0,0005	63	Otro vs CECC	0,0008	0,378 (0,214-0,668)
	Otra	28	28 (100)	0	21,01 (9,53-41,33)					

4.1.2. Análisis de la respuesta completa asociada a biomarcadores

4.1.2.1. Análisis de la respuesta completa a la QRT según los niveles de ARNm de 53BP1

La RC a la QRT en los pacientes con niveles bajos de expresión de ARNm de 53BP1 fue significativamente superior a la de los que tenían niveles iguales o superiores a la mediana (50 vs 6,25 %) (Tabla 10)

Tabla 10. Distribución de frecuencia de la respuesta completa a la quimiorradioterapia según los niveles de ARNm de 53BP1 en la serie de QRT

	53BP1 nivel expresión de ARNm < mediana			53BP1 nivel expresión de ARNm ≥ mediana			Total		
	N	%	IC 95%	N	%	IC 95%	N	%	IC 95%
RC	8	50,00	[24,65- 75,35]	1	6,25	[0,16- 30,23]	9	28,13	[13,75- 46,75]
no RC	7	43,75	[19,75- 70,12]	15	93,75	[69,77-99,84]	22	68,75	[49,99- 83,88]
no valorable	1	6,25	[0,16- 30,23]	0	0		1	3,13	[0,08- 16,22]

Fisher: 0,0059

También exploramos la relación de la respuesta a la QRT y los niveles de expresión de ARNm mensajero de 53BP1 mediante un modelo logístico, obteniendo un odds ratio de 20,3 (IC 95% 1,328-310,318). Debido al pequeño tamaño muestral, el intervalo de confianza es muy amplio, por lo que la interpretación de los resultados debe tomarse con cautela.

4.1.2.2. Análisis de la respuesta completa a la QRT según los niveles de ARNm de BRCA1

La RC a la QRT en los pacientes con niveles altos de expresión de ARNm de BRCA1 fue superior a la de los que tenían valores inferiores a la mediana (41,18 vs 29,41%), pero no de forma estadísticamente significativa, probablemente debido al escaso número de pacientes (Tabla 11).

Tabla 11. Distribución de frecuencia de la respuesta completa a la quimiorradioterapia según los niveles de ARNm de BRCA1 en la serie de QRT

	BRCA1 nivel expresión ARNm < mediana			BRCA1 nivel expresión ARNm ≥ mediana			Total		
	N	%	IC 95%	N	%	IC 95%	N	%	IC 95%
RC	5	29,41	[10,31- 55,96]	7	41,18	[18,44- 67,08]	12	35,29	[19,75- 53,,51]
no RC	11	64,71	[38,33- 85,79]	10	58,82	[32,92- 81,56]	21	61,76	[43,56- 77,83]
no valorable	1	5,88	[0,15-28,.69]	0	0,00		1	2,94	[0,07-15,33]

Fisher: 0,72

4.1.2.3. Análisis de la respuesta completa a la QRT según los niveles de ARNm de RAP80

No existieron diferencias significativas en el porcentaje de RC en función de los niveles de ARNm de RAP80 (Tabla 12).

Tabla 12. Distribución de frecuencia de la respuesta completa a la quimiorradioterapia según los niveles de ARNm de RAP80 en la serie de QRT

	RAP80 nivel expresión ARNm < mediana			RAP80 nivel expresión ARNm ≥ mediana			Total		
	N	%	IC 95%	N	%	IC 95%	N	%	IC 95%
RC	5	31,25	[11,02- 58,66]	5	29,41	[10,31- 55,96]	10	30,30	[15,59- 48,71]
no RC	10	62,50	[35,43- 84,80]	12	70,59	[44,04- 89,69]	22	66,67	[48,17- 82,04]
no valorable	1	6,25	[0,16-30,23]	0	0,00		1	3,03	[0,08- 15,76]

Fisher: 0,848

4.1.2.4. Análisis de la respuesta completa a la QRT según los niveles de ARNm de MDC1

No existieron diferencias significativas en el porcentaje de RC en función de los niveles de MDC1(Tabla 13.)

Tabla 13. Distribución de frecuencia de la respuesta completa a la quimiorradioterapia según los niveles de ARNm de MDC1 en la serie de QRT

	MDC1 nivel expresión ARNm < mediana			MDC1 nivel expresión ARNm ≥ mediana			Total		
	N	%	IC 95%	N	%	IC 95%	N	%	IC 95%
RC	6	30,00	[11,89-54,28]	8	40,00	[19,12-63,95]	14	35,00	[20,63-51,68]
no RC	13	65,00	[40,78-84,61]	12	60,00	[36,05-80,88]	25	62,50	[45,80-77,27]
no valorable	1	5,00	[0,13-24,87]	0	0,00		1	2,50	[0,06-13,16]

Fisher: 0, 7411

4.1.2.5 Análisis de la respuesta completa a la QRT según los niveles de ARNm de RNF8

No existieron diferencias significativas en el porcentaje de respuestas completas en función de los niveles de RNF8 (Tabla 14).

Tabla 14. Distribución de frecuencia de la respuesta completa a la quimiorradioterapia según los niveles de ARNm de RNF8 en la serie de QRT

	RNF8 nivel expresión ARNm < mediana			RNF8 nivel expresión ARNm ≥ mediana			Total		
	N	%	IC 95%	N	%	IC 95%	N	%	IC 95%
RC	7	38,89	[17,30- 64,25]	6	33,33	[13,34-59,01]	13	36,11	[20,82- 53,78]
no RC	10	55,56	[30,76- 78,47]	12	66,67	[40,99-86,66]	22	61,11	[43,46- 76,86]
no valorable	1	5,56	[0,14-27,29]	0	0,00		1	2,78	[0,07-14,53]

Fisher: 0,7332

4.1.2.6. Análisis de la respuesta completa a la QRT según los niveles de ARNm de 53BP1 y BRCA1

El subgrupo de pacientes con tumores que tenían niveles altos de ARNm de BRCA1 y niveles bajos de 53BP1 son los que presentaron una mayor tasa de RC a la QRT. Los pacientes con niveles de 53BP1 elevados fueron los que menos respondieron al tratamiento, independientemente de los niveles de BRCA1. (Tabla 15)

Tabla 15. Distribución de frecuencia de la respuesta completa a la quimiorradioterapia según los niveles de ARNm de 53BP1 y BRCA1 en la serie de QRT

	BRCA1< mediana & 53BP1< mediana			BRCA1< mediana & 53BP1≥ mediana			BRCA1≥ mediana & 53BP1< mediana			BRCA1≥ mediana & 53BP1≥ mediana			Total		
	N	%	IC 95%	N	%	IC 95%	N	%	IC 95%	N	%	IC 95%	N	%	IC 95%
RC	4	40	[12,16-73,76]	0	0,00		4	66,67	[22,28-95,67]	1	12,50	[0,32-52,65]	9	30,00	[14,73-49,40]
no RC	5	50	[18,7-81,29]	6	100	[54,07-100]	2	33,33	[4,33-77,72]	7	87,50	[47,35-99,68]	20	66,67	[47,19-82,71]
no val	1	10	[0,25-44,50]	0	0,00		0	0,00		0	0,00		1	3,33	[0,08-17,22]

Fisher: 0,0547

4.1.2.7. Análisis de la respuesta completa a la QRT según los niveles de ARNm de 53BP1 y RAP80

El subgrupo de pacientes con tumores que presentaban niveles altos de ARNm de RAP80 y niveles bajos de 53BP1 fueron los que mostraron una mayor tasa de RC a la QRT. De nuevo, los pacientes con niveles de 53BP1 elevados fueron los menos respondedores al tratamiento, independientemente de los niveles de RAP80. (Tabla 16)

Tabla 16. Distribución de frecuencia de la respuesta completa a la quimiorradioterapia según los niveles de ARNm de 53BP1 y RAP80 en la serie de QRT

	53BP1< mediana & RAP80< mediana			53BP1< mediana & RAP80 ≥ mediana			53BP1 ≥ mediana & RAP80< mediana			53BP1 ≥ mediana & RAP80 ≥ mediana			Total		
	N	%	IC 95%	N	%	IC 95%	N	%	IC 95%	N	%	IC 95%	N	%	IC 95%
RC	2	28,57	[3,67-70,96]	5	71,43	[29,04-96,33]	0	0,00		0	0,00		7	25,93	[11,11-46,38]
no RC	4	57,14	[18,41-90,10]	2	28,57	[3,67-70,96]	6	100,00	[54,07-100]	7	100,00	[59,04-100]	19	70,37	[49,82-86,25]
No val.	1	14,29	[0,36-57,87]	0	0,00		0	0,00		0	0,00		1	3,70	[0,09-18,97]

Fisher: 0,0062

4.1.2.8. Análisis de respuesta completa a la QRT según los niveles de ARNm de BRCA1 y RAP80

No existen diferencias significativas en los subgrupos en función de la combinación de los niveles de BRCA1 y RAP80 (Tabla 17).

Tabla 17. Distribución de frecuencia de la respuesta completa a la quimiorradioterapia según los niveles de ARNm de BRCA1 y RAP80 en la serie de QRT

	BRCA1 < mediana & RAP80 < mediana			BRCA1 < mediana & RAP80 ≥ mediana			BRCA1 ≥ mediana & RAP80 < mediana			BRCA1 ≥ mediana & RAP80 ≥ mediana			Total		
	N	%	IC 95%	N	%	IC 95%	N	%	IC 95%	N	%	IC 95%	N	%	IC 95%
RC	2	28,57	[3,67-70,96]	3	33,33	[7,49-70,07]	2	25	[3,19-65,09]	2	33,33	[4,33-77,72]	9	30,00	[14,73-49,40]
no RC	4	57,14	[18,41-90,10]	6	66,67	[29,93-92,51]	6	75	[34,91-96,81]	4	66,67	[22,28-95,67]	20	66,67	[47,19-82,71]
No val.	1	14,29	[0,36-57,87]	0	0,00		0	0		0	0,00		1	3,33	[0,08-17,22]

Fisher: 0.9556

4.1.3. Correlación entre los niveles de expresión de ARNm de los distintos biomarcadores

Decidimos analizar la correlación entre los niveles de ARNm de 53BP1, BRCA1 y RAP80, genes que habían obtenido resultados significativos en relación con la respuesta al tratamiento. En este caso, no encontramos asociación entre los mismos (Tabla 18).

Tabla 18. Análisis paramétrico y no paramétrico del coeficiente de correlación de Pearson entre los niveles de expresión de ARNm de los distintos biomarcadores en la serie de QRT

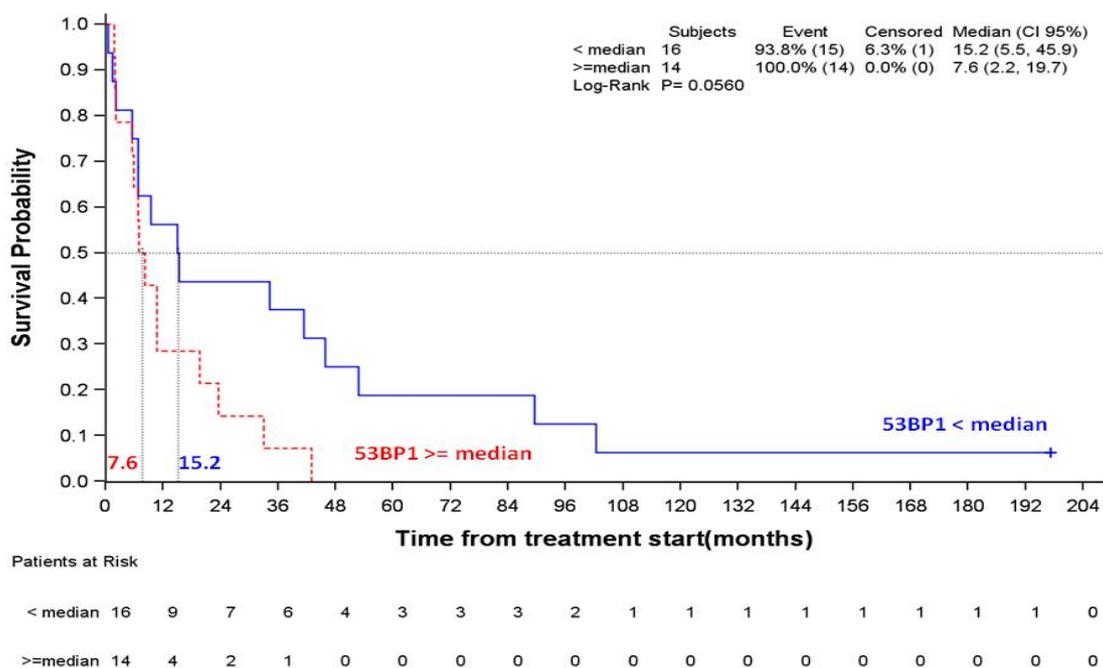
	BP153	BRCA1	RAP80		BP153	BRCA1	RAP80
BP153 BP153	1.00000 32	0.63327 0.0002 30	0.14008 0.4859 27	BP153 BP153	1.00000 32	0.30545 0.1007 30	0.35242 0.0714 27
BRCA1 BRCA1	0.63327 0.0002 30	1.00000 34	-0.09285 0.6256 30	BRCA1 BRCA1	0.30545 0.1007 30	1.00000 34	0.05697 0.7649 30
RAP80 RAP80	0.14008 0.4859 27	-0.09285 0.6256 30	1.00000 33	RAP80 RAP80	0.35242 0.0714 27	0.05697 0.7649 30	1.00000 33

4.1.4. Análisis de la SG por biomarcadores

4.1.4.1. Análisis de la SG según los niveles de ARNm 53BP1

Evidenciamos una tendencia a una SG mayor en los pacientes con niveles bajos de ARNm 53BP1 (Figura 12; Tabla 19). La diferencia numérica fue muy importante, duplicándose la mediana de SG de 7,6 a 15,2 meses según los niveles de expresión, por lo que probablemente el reducido número de la muestra justifique la ausencia de significación estadística.

Figura 12. Supervivencia global según los niveles de ARNm de 53 BP1 en la serie de QRT



* Los números decimales están expresados en puntos porque la gráfica es la original del artículo publicado por Cirauqui y col. en la revista Tumor Biology

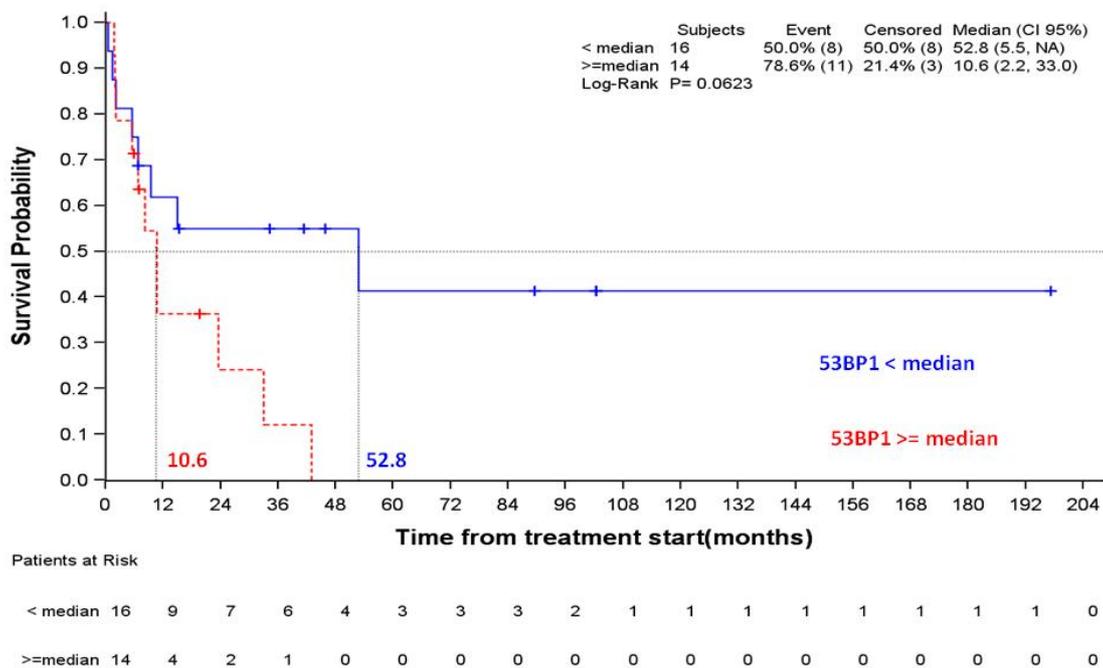
Tabla 19. Efecto de los niveles de ARNm de 53BP1 en la supervivencia global en la serie de QRT

Contraste	HR p valor	HR Estimado	CI 95% LI	CI 95% LS
53BP1>=mediana vs 53BP1< mediana	0.0620	2.178	0.962	4.934

4.1.4.2. Análisis de la supervivencia global por cáncer de cabeza y cuello según los niveles de ARNm 53BP1

De la misma manera que en la SG por cualquier causa de muerte, evidenciamos también una tendencia a una mayor supervivencia por muerte relacionada con el CECC en el grupo de pacientes con niveles bajos de ARNm 53BP1 (Figura 13; Tabla 20). En este caso, la diferencia numérica fue todavía superior (52,8 vs 10,6 meses), por lo que el reducido tamaño muestral puede impactar en la significación estadística.

Figura 13. Supervivencia global por cáncer de cabeza y cuello según los niveles de 53BP1 en la serie de QRT



* Los números decimales están expresados en puntos porque la gráfica es la original del artículo publicado por Cirauqui y col. en la revista Tumor Biology

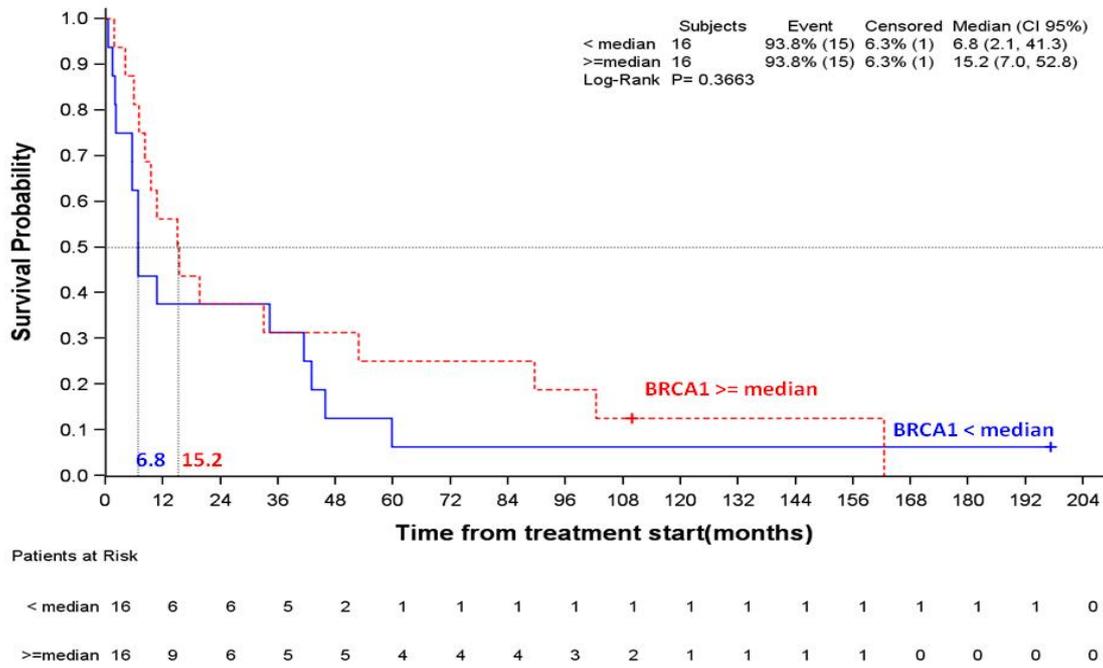
Tabla 20. Efecto de los niveles de ARNm de 53BP1 en la supervivencia global por cáncer de cabeza y cuello en la serie de QRT

Contraste	HR p valor	HR Estimado	CI 95% LI	CI 95% LS
53BP1>=mediana vs 53BP1< mediana	0.0711	2.442	0.926	6.441

4.1.4.3. Análisis de la SG según los niveles de ARNm BRCA1

No encontramos diferencias significativas en la SG en función de los niveles de expresión de ARNm BRCA1, aunque los pacientes con niveles altos obtuvieron SG numéricamente superiores (15,2 vs 6,8 meses) (Figura 14; Tabla 21).

Figura 14. Supervivencia global según los niveles de ARNm de BRCA1 en la serie de QRT



* Los números decimales están expresados en puntos porque la gráfica es la original del artículo publicado por Cirauqui y col. en la revista Tumor Biology

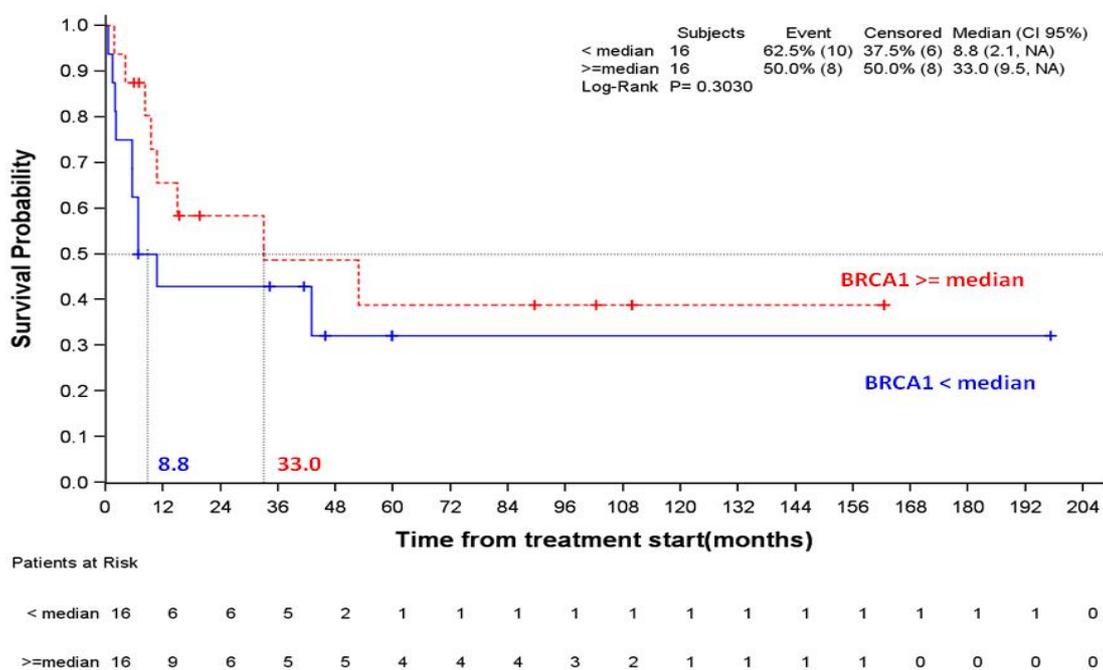
Tabla 21. Efecto de los niveles de ARNm de BRCA1 en la supervivencia global en la serie de QRT

Contraste	HR p valor	HR Estimado	IC 95% LI	IC 95% LS
BRCA1 \geq mediana vs BRCA1< mediana	0.3692	0.717	0.347	1.481

4.1.4.4. Análisis de la supervivencia global por cáncer de cabeza y cuello según los niveles de ARNm BRCA1

No encontramos diferencias significativas en la supervivencia por muerte relacionada con el CECC en función de los niveles de expresión de ARNm BRCA1, aunque los pacientes con niveles altos obtuvieron supervivencias numéricamente superiores (33 vs 8,8 meses) (Figura 15; Tabla 22)

Figura 15. Supervivencia global por cáncer de cabeza y cuello según los niveles de ARNm de BRCA1 en la serie de QRT



* Los números decimales están expresados en puntos porque la gráfica es la original del artículo publicado por Cirauqui y col. en la revista Tumor Biology

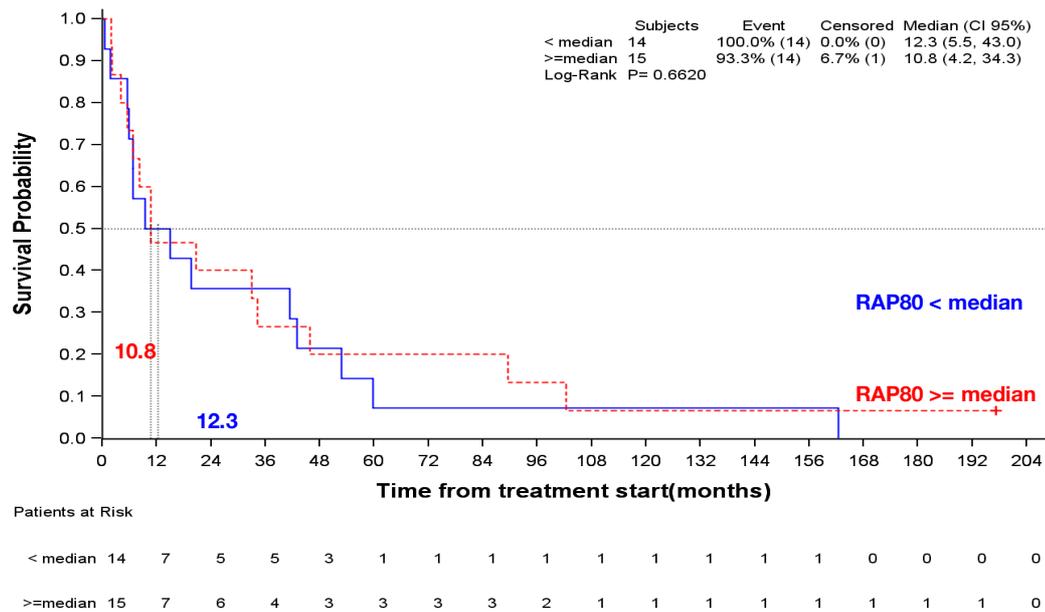
Tabla 22. Efecto de los niveles de ARNm de BRCA1 en la supervivencia global por cáncer de cabeza y cuello en la serie de QRT

Contraste	HR p valor	HR estimado	IC 95% LI	IC 95% LS
BRCA1 \geq mediana vs BRCA1< mediana	0.3088	0.615	0.242	1.568

4.1.4.5. Análisis de la SG según los niveles de ARNm de RAP80

No se obtuvieron diferencias significativas ni numéricas según los niveles de expresión de ARNm RAP80 (Figura 16.)

Figura 16. Supervivencia global según los niveles de ARNm de RAP80 en la serie de QRT

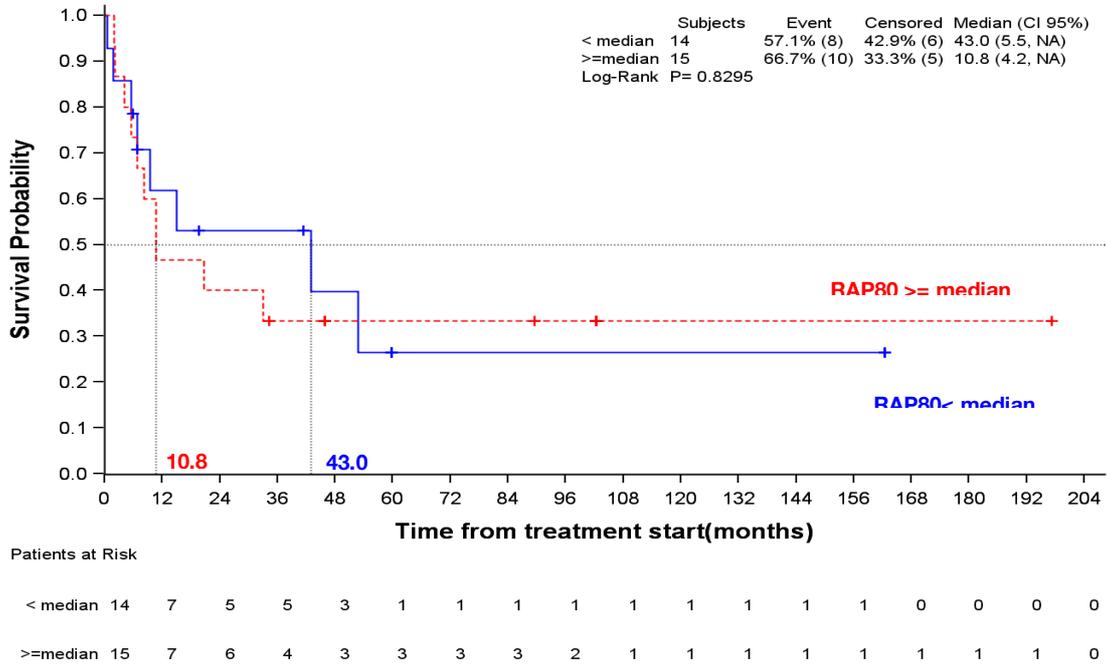


* Los números decimales están expresados en puntos porque la gráfica es la original del artículo publicado por Cirauqui y col. en la revista Tumor Biology

4.1.4.5. Análisis de la supervivencia global por cáncer de cabeza y cuello según los niveles de ARNm RAP80

Sin embargo, al analizar la supervivencia por muerte relacionada con el CECC según los niveles de ARNm RAP80, las diferencias no fueron estadísticamente significativas, pero los pacientes con tumores con niveles bajos tenían medianas más altas (43 vs 10,8 m) (Figura 17.)

Figura 17. Supervivencia por muerte relacionada con cáncer según los niveles de ARNm de RAP80 en la serie de QRT



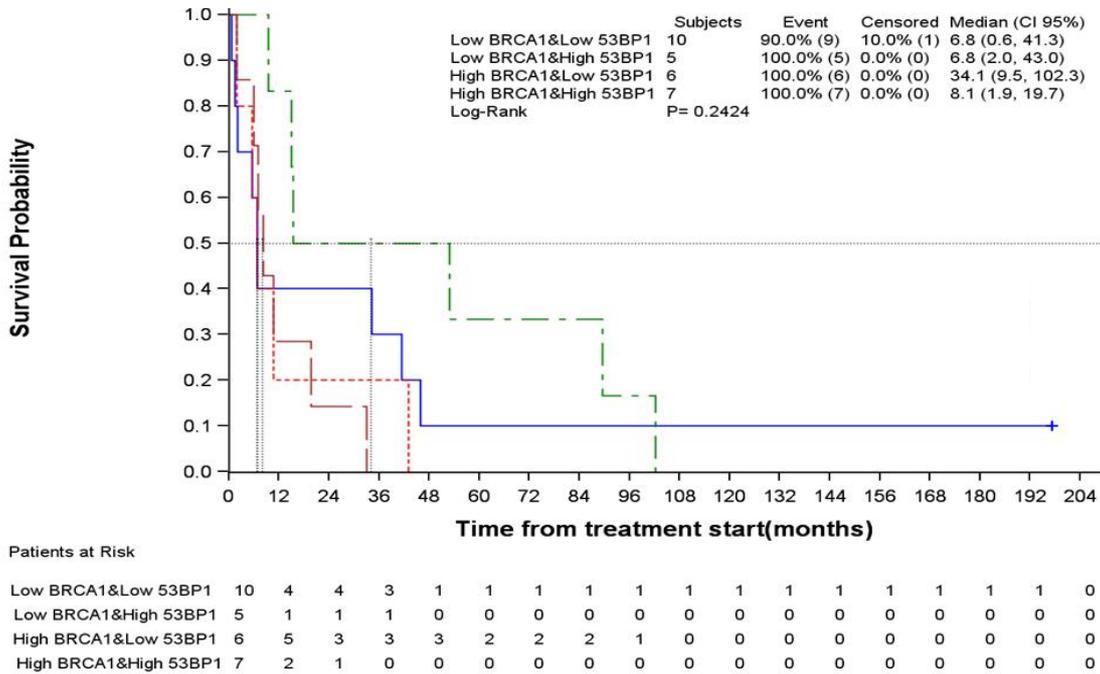
* Los números decimales están expresados en puntos porque la gráfica es la original del artículo publicado por Cirauqui y col. en la revista Tumor Biology

4.1.4.5. Análisis de la SG según los niveles de biomarcadores agrupados

Al agrupar los diferentes biomarcadores y analizar la SG no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, hecho que relacionamos con el limitado tamaño de la muestra para cada uno de los biomarcadores. Sin embargo, los pacientes con tumores con niveles de expresión bajos de ARNm de 53BP1 y niveles altos de ARNm BRCA1 o RAP80 fueron los que alcanzaron SG más prolongadas.

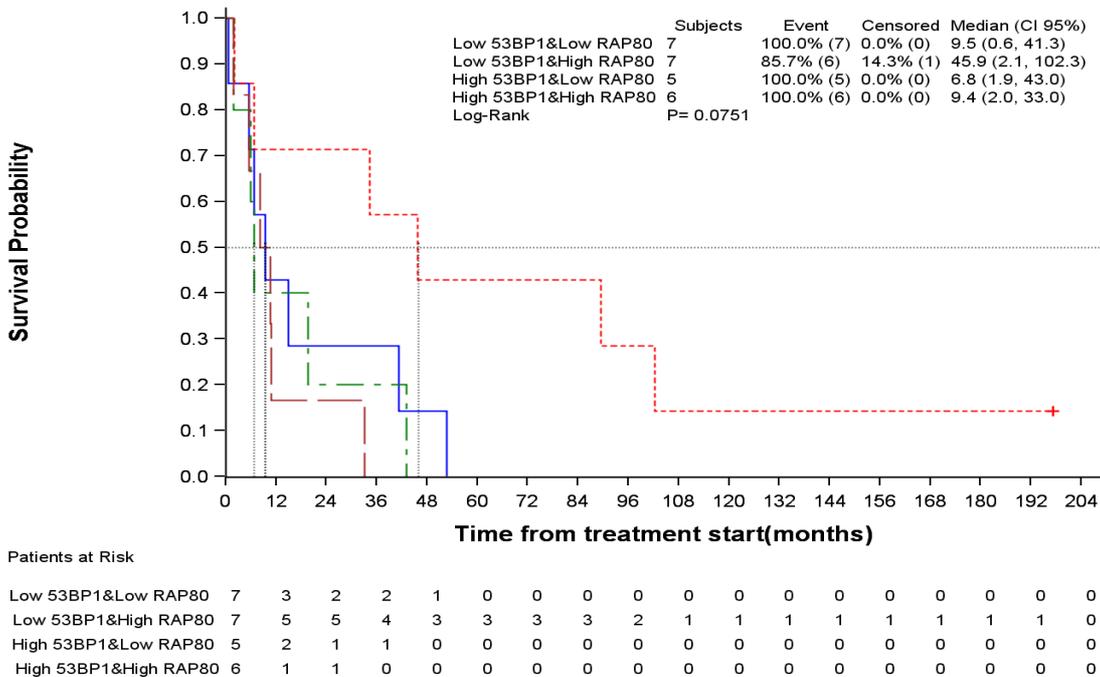
A continuación, exponemos estos resultados en las figuras 18 a 20.

Figura 18. Supervivencia global según los niveles de ARNm de 53BP1 y BRCA1 en la serie de QRT



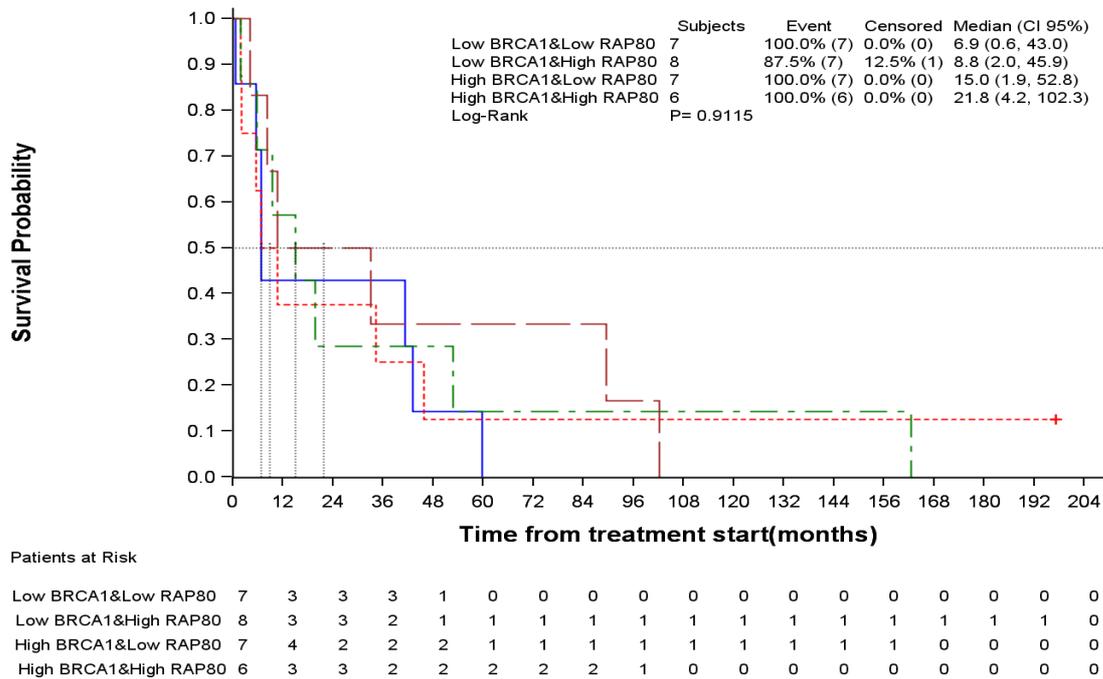
* Los números decimales están expresados en puntos porque la gráfica es la original del artículo publicado por Cirauqui y col. en la revista Tumor Biology

Figura 19. Supervivencia global según los niveles de ARNm de 53BP1 y RAP80 en la serie de QRT



* Los números decimales están expresados en puntos porque la gráfica es la original del artículo publicado por Cirauqui y col. en la revista Tumor Biology

Figura 20. Supervivencia global según los niveles de ARNm BRCA1 y RAP80 en la serie de QRT



* Los números decimales están expresados en puntos porque la gráfica es la original del artículo publicado por Cirauqui y col. en la revista Tumor Biology

4.1.5. Analisis univariado de la SG según biomarcadores seleccionados

Para realizar este análisis, se crearon tres categorías para cada biomarcador, basadas en la distribución del valor de expresión del ARNm (Tabla 23).

Las categorías se denominaron como:

- Bajo: si el valor de la expresión era menor que el primer tercil. es decir, <Q33
- Intermedio: si el valor de la expresión se encontraba en el intervalo [Q33, Q66)
- Alto si el valor de la expresión era \geq Q66

Se seleccionaron 53BP1, BRCA1 y RAP80 en función de los resultados expuestos anteriormente, sin obtener resultados significativos.

Tabla 23. Analisis univariado de la supervivencia global según biomarcadores seleccionados en la serie de QRT

Variable		Modelo Kaplan-Meier					Regresion Cox			
		N	Eventos N (%)	Censurados N (%)	Mediana (IC 95%)	Log-rank (p-valor)	N	Contraste	Pr > ChiSq	Hazard Ratio (IC 95%)
Niveles BRCA1	Altos	11	10 (90,9)	1 (9,09)	15,05 (5,88-89,52)	0,3529	32	Bajos/ Intermedios vs altos	0,3561	1,434 (0,667-3,084)
	Bajos/ Intermedios	21	20 (95,24)	1 (4,76)	9,53 (5,49-34,33)
Niveles 53BP1	Altos	9	9 (100,00)	0 (0,00)	7,00 (1,97-33,02)	0,1724	30	Bajos/ Intermedios vs altos	0,1787	0,567 (0,248-1,297)
	Bajos/ Intermedios	21	20 (95,4)	1 (4,76)	15,05 (6,77-34,33)
Niveles RAP80	Altos	10	9 (90,00)	1 (10,00)	9,40 (1,97-45,86)	0,7672	29	Bajos/ Intermedios vs altos	0,7677	1,129 (0,504-2,532)
	Bajos/ Intermedios	19	19 (100,00)	0 (0,00)	19,71 (5,88-41,33)

4.1.6. Análisis del sistema operativo multivariado

Después de los resultados del análisis univariado, se podría aplicar un modelo de regresión de Cox, incluyendo los parámetros:

Segundo primario (sí/no)

Respuesta a la QRT (RC/No CR)

Causa de muerte (CECC/Otros)

La presencia de un segundo primario presentaba colinealidad con la respuesta y la causa de la muerte, por lo que el modelo multivariante no era adecuado y no se realizó.

4.1.7. Resumen resultados primera serie

Si recordamos el objetivo que nos habíamos planteado de correlacionar los niveles de expresión de genes implicados en las vías de reparación del ADN con la eficacia de la QRT con platino, concluimos.

- que el porcentaje de pacientes con tumores con niveles bajos de ARNm de 53BP1 que alcanzaron la RC fue significativamente superior al de aquellos con tumores con niveles altos.
- que la coexistencia de niveles bajos de ARNm de 53BP1 y niveles altos de ARNm de BRCA1 o RAP80 en el tumor definió el subgrupo de pacientes con mayor tasa de RC.
- que la SG de los pacientes con esos tumores con niveles bajos de ARNm de 53BP1 fue superior a la de aquellos con niveles altos, al límite de la significación estadística.

También observamos la correlación entre la SG y el desarrollo de un segundo tumor primario.

4.2. Objetivo: Correlacionar la activación de la vía de STAT3 con la eficacia de la combinación de paclitaxel y cetuximab (ERBITAX)

Los resultados de esta serie se describen en las siguientes comunicaciones:

- B. Cirauqui Cirauqui, A. Bernat Peguera, A. Quer Pi-Sunyer, J.L. Ramírez Serrano, M. Domenech Viñolas, I. Teruel García, et al

965P Role of STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) activation and its regulation by PTPRT (protein receptor tyrosine phosphatase type T) and response to paclitaxel and cetuximab in patients (P) with recurrent/metastatic (R/M) head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC),

Annals of Oncology, Volume 31, Supplement 4, 2020, Page S681,

ISSN 0923-7534

[\(https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.08.1080\)](https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.08.1080) (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923753420410762>)

- Beatriz Cirauqui Cirauqui, Ariadna Quer Pi-Sunyer, Adrià Bernat Peguera, José Luis Ramírez Serrano, Iris Teruel García, Marta Domenech Viñolas, et al

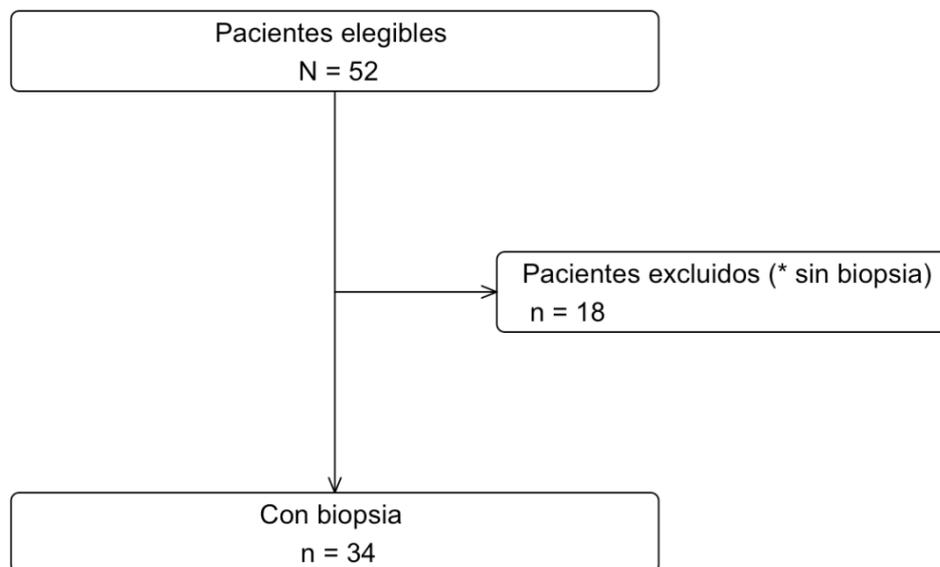
O-59. Papel de la activación de STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) y su regulación por PTPRT (Protein Receptor Tyrosine Phosphatase Type T) en la respuesta a paclitaxel y cetuximab (ERBITAX) en pacientes (p) con carcinoma escamoso de cabeza y cuello (CECC) recurrente/ metastásico (R/M).

Libro de comunicaciones Congreso SEOM 2020 (ISBN: 978-84-09-27261-7)

Recordemos que el análisis de este objetivo se realizó en una serie de 52 pacientes con CECC R/M tratados con paclitaxel y cetuximab denominada con anterioridad serie ERBITAX.

4.2.1. Características clínicas de la serie ERBITAX

De los 52 pacientes tratados con paclitaxel y cetuximab, obtuvimos muestra tumoral en 34 casos.



Consideramos diferentes factores como hipotéticas causas de la falta de disponibilidad de muestra tumoral: el estadio al diagnóstico, la participación en otro ensayo clínico o proyecto de investigación, lugar de diagnóstico y la realización de cirugía en algún momento de la evolución de la enfermedad.

En la Tabla 24 comparamos esos parámetros entre la población con o sin muestra tumoral disponible y no encontramos diferencias significativas, aunque destacamos que los pacientes del grupo con biopsia habían sido sometidos a cirugía con más frecuencia.

En base a esto, concluimos que no encontrábamos ningún dato que pudiera influir significativamente en que los resultados de la serie de pacientes con biopsia presentaran diferencias a los de la serie global.

Tabla 24. Parámetros que pueden influir en la presencia de biopsia disponible en la serie ERBITAX

	Total	Sí	No	p
	N=52	N=34	N=18	
Estadio al diagnóstico, n (%):				.
I	1 (2.9%)	1 (2.9%)	0 (.%)	
II	3 (8.8%)	3 (8.8%)	0 (.%)	
III	8 (23.5%)	8 (23.5%)	0 (.%)	
IVA	16 (47.1%)	16 (47.1%)	0 (.%)	
IVB	6 (17.6%)	6 (17.6%)	0 (.%)	
Participación EC/Proyecto de investigación, n (%):				1.000
Sí	6 (11.5%)	4 (11.8%)	2 (11.1%)	
No	46 (88.5%)	30 (88.2%)	16 (88.9%)	
Dx en HGTIP, n (%):				1.000
Sí	47 (90.4%)	31 (91.2%)	16 (88.9%)	
No	5 (9.6%)	3 (8.8%)	2 (11.1%)	
Cirugía previa, n (%):				0.052
Sí	38 (73.1%)	28 (82.4%)	10 (55.6%)	
No	14 (26.9%)	6 (17.6%)	8 (44.4%)	

La media de edad fue de 64,11 años [41,71-84,39].

Se trata de una serie en la que la mayoría de los pacientes fueron varones, con importante exposición a hábitos tóxicos. Las localizaciones tumorales más frecuentes fueron la laringe, la orofaringe y la hipofaringe (por este orden). Existía afectación locorregional en más de tres cuartas partes de los casos. La mayoría habían recibido previamente RT, pero menos de un tercio habían recibido cetuximab y/o taxanos. ERBITAX fue el primer tratamiento en el escenario recurrente/metastásico en la casi totalidad de los casos, y, hay que destacar, que la mayoría de los pacientes no recibieron ningún tratamiento posteriormente. Dos pacientes pudieron beneficiarse de estrategias locales por la buena respuesta al esquema terapéutico (Tabla 25).

Las características clínicas de los pacientes con biopsia disponible fueron muy similares a las de la serie global. Las únicas diferencias observadas fueron un mayor porcentaje de tumores localizados en la laringe y un menor porcentaje de pacientes con PS 2 en el momento de inicio del tratamiento en la serie con biopsia disponible, ambas sin significación estadística.

Tabla 25. Características clínicas de los pacientes de la serie ERBITAX

	N=52	N=34
Sexo, n (%):		
Varón	45 (86.5%)	28 (82.4%)
Mujer	7 (13.5%)	6 (17.6%)
Hábitos tóxicos, n (%):		
Tabaco	9 (17.3%)	6 (17.6%)
Tabaco + Alcohol	39 (75.0%)	24 (70.6%)
Ninguno	4 (7.7%)	4 (11.8%)
Localización, n (%):		
Cavidad oral	9 (17.3%)	4 (11.8%)
Orofaringe	13 (25.0%)	8 (23.5%)
Hipofaringe	12 (23.1%)	6 (17.6%)
Laringe	17 (32.7%)	15 (44.1%)
Otros	1 (1.9%)	1 (2.9%)
Cetuximab previo, n (%)	11 (21.2%)	5 (14.7%)
Taxano previo, n (%)	17 (32.7%)	10 (29.4%)
Radioterapia previa, n (%)	43 (82.7%)	30 (88.2%)
Tipo de recidiva, n (%):		
Locorreccional	35 (67.3%)	23 (67.6%)
A distancia	7 (13.5%)	7 (20.6%)
Ambas	10 (19.2%)	4 (11.8%)
PS en el momento de la recidiva, n (%):		
0	9 (17.3%)	9 (26.5%)
1	28 (53.8%)	21 (61.8%)
2	15 (28.8%)	4 (11.8%)
Número de tratamientos posteriores, n (%):		
0	34 (68.0%)	19 (59.4%)
1	10 (20.0%)	9 (28.1%)
2	2 (4.0%)	2 (6.2%)
3 o más	2 (4.0%)	2 (6.2%)
Cirugía	1 (2.0%)	
Radioterapia + cetuximab	1 (2.0%)	
Línea de tratamiento, n (%):		
Primera	50 (96.2%)	33 (97.1%)
Segunda	2 (3.8%)	1 (2.9%)

4.2.2. Respuesta y toxicidad al tratamiento en la serie ERBITAX

La TR en la serie global fue cercana al 40%, con un 18% de RC. La mayoría de los pacientes habían fallecido en el momento del análisis (92,5%), siendo la progresión de la neoplasia la causa más frecuente de muerte. La TR en la serie de los pacientes con biopsia fue similar a la global, con un porcentaje algo superior debido a un mayor número de RC. La duración de la respuesta fue de 8,8 meses, tanto en la serie global (7,9-9,6) como en los pacientes con biopsia disponible (2,25-15,35).

En la Tabla 26., exponemos los resultados de respuesta y toxicidad al tratamiento en la serie ERBITAX

Tabla 26. Respuesta y toxicidad al tratamiento en la serie ERBITAX

	N=52	N=34
Respuesta, n (%):		
Respuesta	20 (38.5%)	15 (44.1%)
No respuesta o no valorable	32 (61.5%)	19 (55.9%)
Respuesta a tratamiento, n (%):		
Respuesta completa	9 (18.0%)	8 (23.5%)
Respuesta parcial	11 (22.0%)	7 (20.6%)
Enfermedad estable	11 (22.0%)	7 (20.6%)
Progresión	19 (38.0%)	12 (35.3%)
Estado en el último control, n (%):		
Vivo	4 (7.7%)	3 (8.8%)
Muerto	48 (92.3%)	31 (91.2%)
Reacción acneiforme, n (%):		
0	11 (21.2%)	5 (14.7%)
1	14 (26.9%)	9 (26.5%)
2	19 (36.5%)	15 (44.1%)
3	8 (15.4%)	5 (14.7%)
Progresión, n (%)	43 (82.7%)	30 (88.2%)
Evento, n (%):		
Progresión y vivo	1 (1.9%)	
Muerte	6 (11.5%)	1 (2.9%)
Progresión y muerte	42 (80.8%)	30 (88.2%)
Vivo	3 (5.8%)	3 (8.8%)

4.2.2.1 TR según los parámetros clínicos en la serie ERBITAX

Analizamos la correlación de la respuesta clínica con diferentes variables: la edad, el sexo, la presencia de hábitos tóxicos, el *PS*, la localización de la neoplasia, el tipo de recidiva, la exposición previa a tratamientos (cetuximab, taxanos, RT), la línea de tratamiento y la presencia de rash acneiforme. Las correlaciones estadísticamente significativas que se obtuvieron, tanto en la serie global como en la serie de pacientes con muestra disponible, son expuestas en las Tablas 27., 28., 29. y 30. En el resto de parámetros no hallamos diferencias.

Observamos que los pacientes con exposición previa a cetuximab y/o taxanos, *PS* 2 y ausencia de rash acneiforme tuvieron TR inferiores.

Tabla 27. Respuesta según la exposición previa a cetuximab en la serie ERBITAX

	Total	Sí	No	p	Total	Sí	No	p
	N=52	N=11	N=41		N=34	N=5	N=29	
Respuesta, n (%):				0.004				0.053
Respuesta	20 (38.5%)	0 (0.0%)	20 (48.8%)		15 (44.1%)	0 (0.0%)	15 (51.7%)	
No respuesta o no valorable	32 (61.5%)	11 (100.0%)	21 (51.2%)		19 (55.9%)	5 (100.0%)	14 (48.3%)	
Respuesta a tratamiento, n (%):				0.011				0.148
Respuesta completa	9 (18.0%)	0 (0.0%)	9 (23.1%)		8 (23.5%)	0 (0.0%)	8 (27.6%)	
Respuesta parcial	11 (22.0%)	0 (0.0%)	11 (28.2%)		7 (20.6%)	0 (0.0%)	7 (24.1%)	
Enfermedad estable	11 (22.0%)	3 (27.3%)	8 (20.5%)		7 (20.6%)	1 (20.0%)	6 (20.7%)	
Progresión	19 (38.0%)	8 (72.7%)	11 (28.2%)		12 (35.3%)	4 (80.0%)	8 (27.6%)	

Tabla 28. Respuesta según la exposición previa a taxanos en la serie ERBITAX

	Total	Sí	No	p	Total	Sí	No	p
	N=52	N=17	N=35		N=34	N=10	N=24	
Respuesta, n (%):				0.002				0.020
Respuesta	20 (38.5%)	1 (5.9%)	19 (54.3%)		15 (44.1%)	1 (10.0%)	14 (58.3%)	
No respuesta o no valorable	32 (61.5%)	16 (94.1%)	16 (45.7%)		19 (55.9%)	9 (90.0%)	10 (41.7%)	
Respuesta a tratamiento, n (%):				0.012				0.057
Respuesta completa	9 (18.0%)	0 (0.0%)	9 (25.7%)		8 (23.5%)	0 (0.0%)	8 (33.3%)	
Respuesta parcial	11 (22.0%)	1 (6.7%)	10 (28.6%)		7 (20.6%)	1 (10.0%)	6 (25.0%)	
Enfermedad estable	11 (22.0%)	6 (40.0%)	5 (14.3%)		7 (20.6%)	3 (30.0%)	4 (16.7%)	
Progresión	19 (38.0%)	8 (53.3%)	11 (31.4%)		12 (35.3%)	6 (60.0%)	6 (25.0%)	

Tabla 29. Respuesta según el PS en el momento de la recurrencia/disenminación en la serie ERBITAX

	Total	0	1	2	p	Total	0	1	2	p
	N=52	N=9	N=28	N=15		N=34	N=9	N=21	N=4	
Respuesta, n (%):					0.022					0.069
Respuesta	20 (38.5%)	7 (77.8%)	10 (35.7%)	3 (20.0%)		15 (44.1%)	7 (77.8%)	7 (33.3%)	1 (25.0%)	
No respuesta o no valorable	32 (61.5%)	2 (22.2%)	18 (64.3%)	12 (80.0%)		19 (55.9%)	2 (22.2%)	14 (66.7%)	3 (75.0%)	
Respuesta a tratamiento, n (%):					0.125					0.331
Respuesta completa	9 (18.0%)	4 (44.4%)	5 (17.9%)	0 (0.0%)		8 (23.5%)	4 (44.4%)	4 (19.0%)	0 (0.0%)	
Respuesta parcial	11 (22.0%)	3 (33.3%)	5 (17.9%)	3 (23.1%)		7 (20.6%)	3 (33.3%)	3 (14.3%)	1 (25.0%)	
Enfermedad estable	11 (22.0%)	1 (11.1%)	7 (25.0%)	3 (23.1%)		7 (20.6%)	1 (11.1%)	5 (23.8%)	1 (25.0%)	
Progresión	19 (38.0%)	1 (11.1%)	11 (39.3%)	7 (53.8%)		12 (35.3%)	1 (11.1%)	9 (42.9%)	2 (50.0%)	

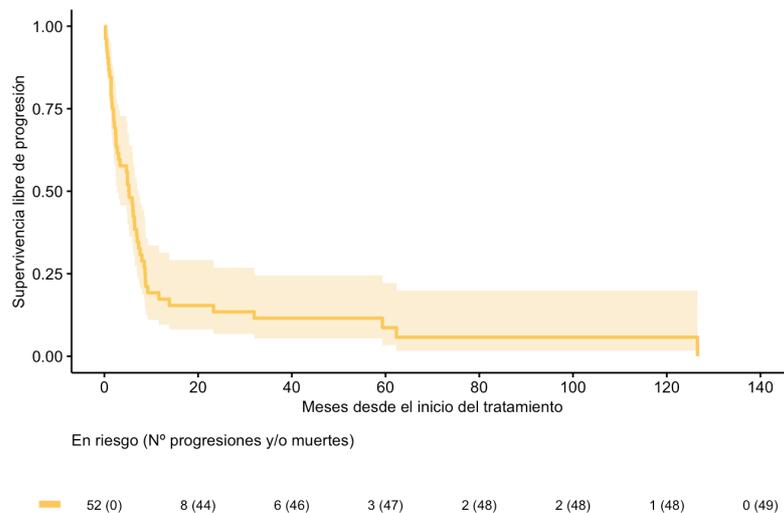
Tabla 30. Respuesta según el grado de rash acneiforme por cetuximab en la serie ERBITAX

	Total	0	1	2	3	p
	N=52	N=11	N=14	N=19	N=8	
Respuesta, n (%):						0.009
Respuesta	20 (38.5%)	0 (0.0%)	6 (42.9%)	11 (57.9%)	3 (37.5%)	
No respuesta o no valorable	32 (61.5%)	11 (100.0%)	8 (57.1%)	8 (42.1%)	5 (62.5%)	
Respuesta a tratamiento, n (%):						0.024
Respuesta completa	9 (18.0%)	0 (0.0%)	1 (7.1%)	6 (31.6%)	2 (25.0%)	
Respuesta parcial	11 (22.0%)	0 (0.0%)	5 (35.7%)	5 (26.3%)	1 (12.5%)	
Enfermedad estable	11 (22.0%)	1 (11.1%)	2 (14.3%)	5 (26.3%)	3 (37.5%)	
Progresión	19 (38.0%)	8 (88.9%)	6 (42.9%)	3 (15.8%)	2 (25.0%)	
	Total	0	1	2	3	p
	N=34	N=5	N=9	N=15	N=5	
Respuesta, n (%):						0.084
Respuesta	15 (44.1%)	0 (0.0%)	5 (55.6%)	9 (60.0%)	1 (20.0%)	
No respuesta o no valorable	19 (55.9%)	5 (100.0%)	4 (44.4%)	6 (40.0%)	4 (80.0%)	
Respuesta a tratamiento, n (%):						0.041
Respuesta completa	8 (23.5%)	0 (0.0%)	1 (11.1%)	6 (40.0%)	1 (20.0%)	
Respuesta parcial	7 (20.6%)	0 (0.0%)	4 (44.4%)	3 (20.0%)	0 (0.0%)	
Enfermedad estable	7 (20.6%)	0 (0.0%)	1 (11.1%)	4 (26.7%)	2 (40.0%)	
Progresión	12 (35.3%)	5 (100.0%)	3 (33.3%)	2 (13.3%)	2 (40.0%)	

4.2.3. SLP en la serie ERBITAX

La SLP fue de 5,26 meses (Figura 21). El 83 % de los pacientes progresó en los primeros 12 meses tras iniciar el tratamiento.

Figura 21. Supervivencia libre de progresión en la serie ERBITAX



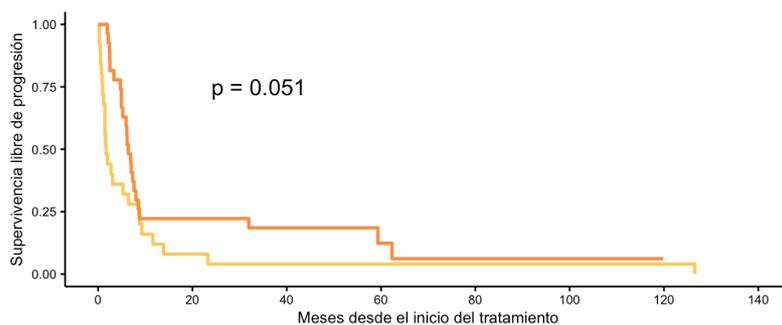
Mediana en meses (IC 95%)

5.26 (2.8-7.3)

Tiempo (meses)	Supervivencia (IC 95%)
12	17% (10-31)
24	13% (7-27)
36	12% (5-24)
60	9% (3-22)

Analizamos la SLP según los parámetros clínicos que habían mostrado significación estadística en relación con la respuesta. Sólo encontramos diferencias significativas con el grado de rash acneiforme, como mostramos en la figura 22.

Figura 22. Supervivencia libre de progresión según el grado de rash acneiforme por cetuximab en la serie ERBITAX



En riesgo (Nº progresiones y/o muertes)

—	25 (0)	2 (23)	1 (24)	1 (24)	1 (24)	1 (24)	1 (24)	0 (25)
—	27 (0)	6 (21)	5 (22)	2 (23)	1 (24)	1 (24)	0 (24)	0 (24)

Reacción acneiforme Mediana en meses (IC 95%)

0-1 1.7 (1.4-8.7)

2-4 6.4 (5.2-8.5)

Reacción acneiforme Tiempo (meses) Supervivencia (IC 95%)

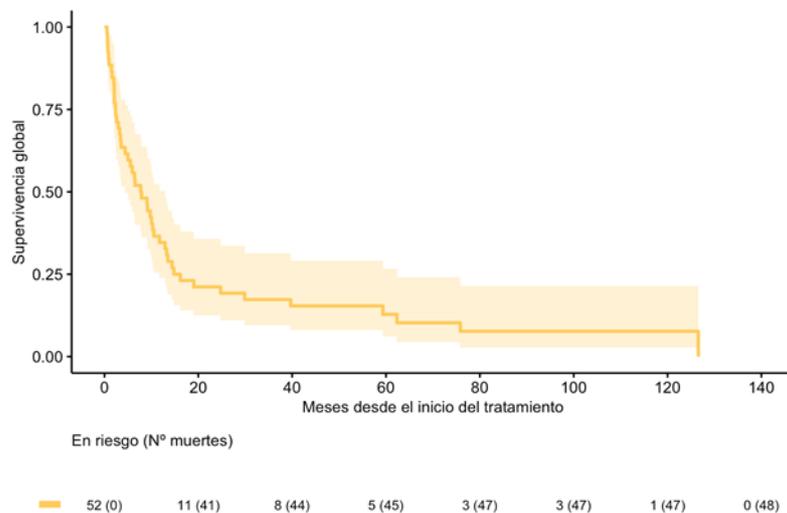
Reacción acneiforme	Tiempo (meses)	Supervivencia (IC 95%)
0-1	12	12% (4-35)
	24	4% (1-27)
	36	4% (1-27)
	60	4% (1-27)
2-4	12	22% (11-45)
	24	22% (11-45)
	36	19% (8-41)
	60	12% (4-38)

4.2.4. SG y supervivencia desde el diagnóstico en la serie ERBITAX

Consideramos como supervivencia global, la supervivencia calculada desde el inicio del tratamiento con paclitaxel y cetuximab hasta la fecha de muerte o del último control, así como también la supervivencia considerando la fecha del diagnóstico de la neoplasia de cabeza y cuello.

La mediana de SG fue de 7,8 meses. Un 65% de los pacientes fallecieron en el primer año desde el inicio del tratamiento, pero se observó la presencia de largos supervivientes (LS), con un 21% y un 13% de pacientes vivos a los 2 y 5 años de inicio del tratamiento, respectivamente (Figura 23).

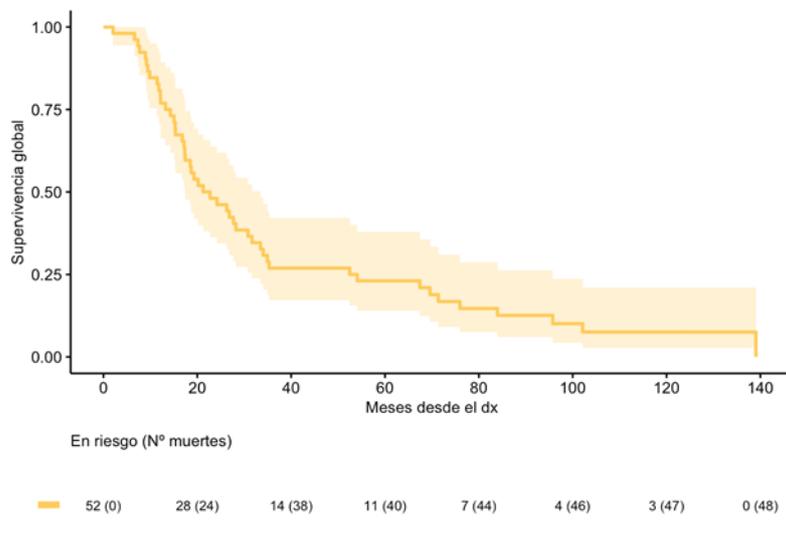
Figura 23. Supervivencia global en la serie ERBITAX



Mediana en meses (IC 95%)	
7.8 (4.4-12.9)	
Tiempo (meses)	Supervivencia (IC 95%)
12	35% (24-50)
24	21% (13-36)
36	17% (10-31)
60	13% (6-27)

La mediana de supervivencia desde el diagnóstico fue de 22 meses. (Figura 24).

Figura 24. Supervivencia desde el diagnóstico del cáncer de cabeza y cuello en la serie ERBITAX

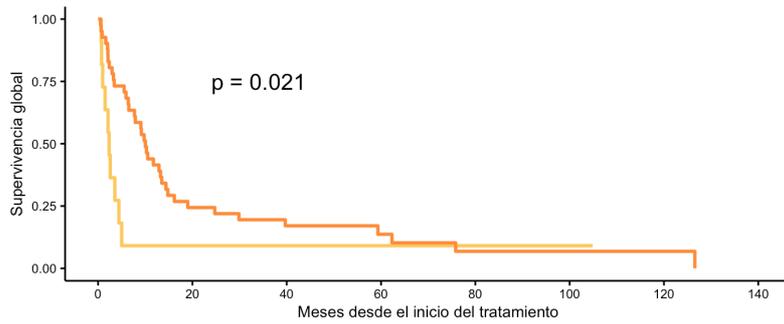


Mediana en meses (IC 95%)	
21.98 (17.3-33.4)	
Tiempo (meses)	Supervivencia (IC 95%)
12	81% (71-92)
24	48% (36-64)
36	27% (17-42)
60	23% (14-38)

4.2.4.1. SG según los parámetros clínicos

Analizamos la SG según los parámetros que habían mostrado asociación con la respuesta. Se mantuvieron las diferencias obtenidas en todos los parámetros menos en el *PS*, de tal manera que los pacientes con exposición previa a cetuximab y/o taxanos y ausencia de rash acneiforme, como toxicidad al tratamiento, tenían medianas de SG inferiores. (Figura 25, 26 y 27).

Figura 25. Supervivencia global según la exposición previa a cetuximab en la serie ERBITAX



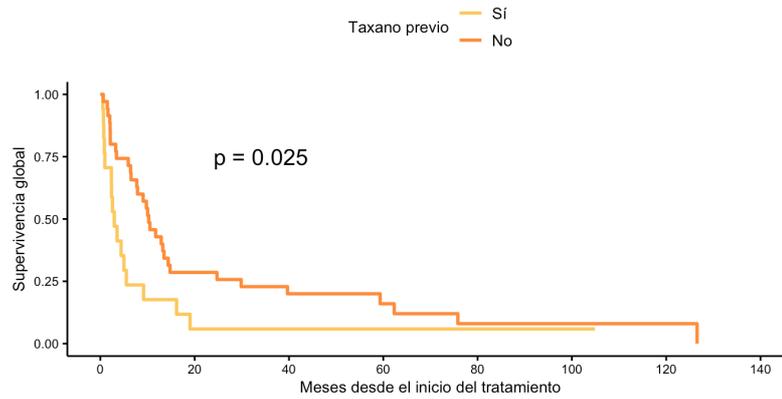
En riesgo (Nº muertes)

11 (0)	1 (10)	1 (10)	1 (10)	1 (10)	1 (10)	0 (10)	0 (10)
41 (0)	10 (31)	7 (34)	4 (35)	2 (37)	2 (37)	1 (37)	0 (38)

Cetuximab previo Mediana en meses (IC 95%)

Sí	2.3 (1.5-NA)
No	10 (7.7-14.4)

Figura 26. Supervivencia global según la exposición previa a taxanos en la serie ERBITAX



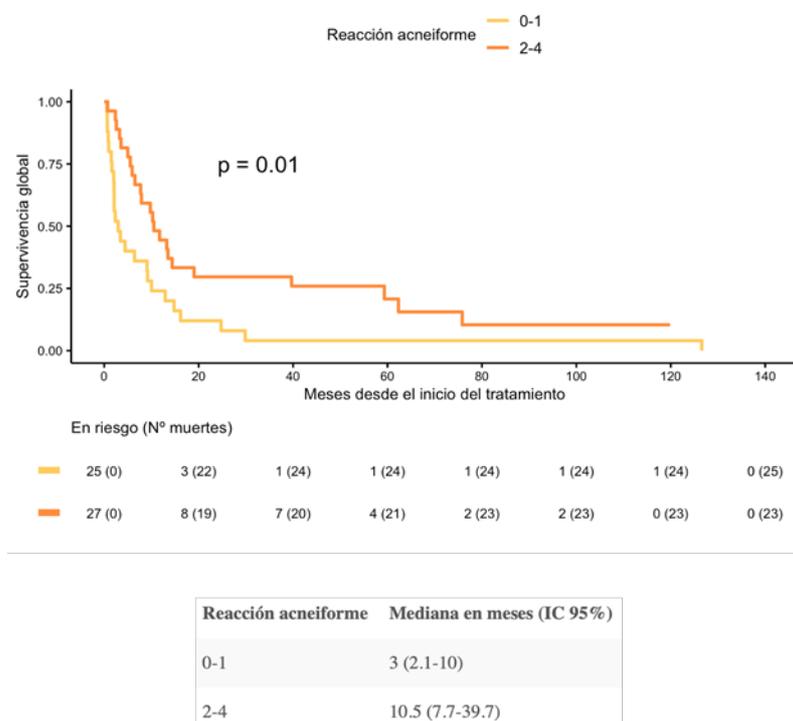
En riesgo (Nº muertes)

17 (0)	1 (16)	1 (16)	1 (16)	1 (16)	1 (16)	0 (16)	0 (16)
35 (0)	10 (25)	7 (28)	4 (29)	2 (31)	2 (31)	1 (31)	0 (32)

Taxano previo Mediana en meses (IC 95%)

Sí	3 (2.3-9.2)
No	10.3 (7.7-14.8)

Figura 27. Supervivencia global según el grado de rash acneiforme por cetuximab en la serie ERBITAX



4.2.5. Eficacia del tratamiento según los parámetros de activación de la vía STAT3 en la serie ERBITAX

4.2.5.1. Parámetros de activación de la vía STAT3

Se detectó la hipermetilación del promotor de PTPRT en un 41% de los tumores y la sobreexpresión de la proteína pSTAT3, definida como presencia de áreas 2 y/o 3+ por IHQ estaba presente en un 67% de los mismos.

4.2.5.2. Correlación entre los parámetros de activación de la vía STAT3

La hipermetilación del promotor de PTPRT se correlacionó con la expresión de pSTAT3 de forma significativa (Fisher; $p = 0.009$), pero no con los niveles de expresión de ARNm de STAT3 (Tabla 31.). Tampoco se encontró correlación entre la expresión de pSTAT3 y los niveles de expresión de ARNm de STAT3. No disponemos de datos de la expresión de la proteína STAT3 total.

Tabla 31. Correlación entre los parámetros de activación de la vía STAT3 en la serie ERBITAX

	Total	No metilado	Metilado	p
	N=33	N=19	N=14	
Niveles mRNA STAT3, n (%):				0.156
Bajos	14 (66.7%)	11 (78.6%)	3 (42.9%)	
Altos	7 (33.3%)	3 (21.4%)	4 (57.1%)	
Expresión pSTAT3 2 y/o 3, n (%):				0.009
Presente	22 (66.7%)	9 (47.4%)	13 (92.9%)	
Ausente	11 (33.3%)	10 (52.6%)	1 (7.1%)	

	Total	Bajos	Altos	p
	N=21	N=14	N=7	
Expresión pSTAT3 2 y/o 3, n (%):				1.000
Presente	11 (52.4%)	7 (50.0%)	4 (57.1%)	
Ausente	10 (47.6%)	7 (50.0%)	3 (42.9%)	

4.2.5.3. Correlación de los parámetros clínicos con la activación de la vía STAT3

Se valoró la relación entre los parámetros de activación de la vía STAT3 con los parámetros clínicos que previamente habíamos observado que tenían un impacto en la eficacia de ERBITAX, sin obtener resultados significativos (Tablas 44-46 del anexo 5.). Sólo destacaremos que todos los pacientes que tenían un *PS 0* tenían niveles bajos de ARNm de STAT3.

4.2.5.4. Distribución de frecuencia de la respuesta según los parámetros de activación de la vía STAT3

Si tenemos en cuenta las 3 variables que hemos definido para evaluar la activación de la vía STAT3 (ARNm de STAT3, pSTAT3 y metilación de PTPRT), todos los pacientes con tumores que mostraban esta activación presentaron peores respuestas a paclitaxel y cetuximab comparados con los que no la presentaron, aunque únicamente el estado de metilación de PTPRT consiguió resultados estadísticamente significativos (Tablas 32-34.). La mayoría de pacientes que experimentaron una RP o RC no presentaban metilación en el gen *PTPRT*.

Tabla 32. Distribución de frecuencia de la respuesta según la metilación de PTPRT en la serie ERBITAX

	Total	No metilado	Metilado	p
	<i>N=34</i>	<i>N=20</i>	<i>N=14</i>	
Respuesta, n (%):				0.060
Respuesta	15 (44.1%)	12 (60.0%)	3 (21.4%)	
No respuesta o no valorable	19 (55.9%)	8 (40.0%)	11 (78.6%)	
Respuesta a tratamiento, n (%):				0.046
Respuesta completa	8 (23.5%)	6 (30.0%)	2 (14.3%)	
Respuesta parcial	7 (20.6%)	6 (30.0%)	1 (7.1%)	
Enfermedad estable	7 (20.6%)	1 (5.0%)	6 (42.9%)	
Progresión	12 (35.3%)	7 (35.0%)	5 (35.7%)	

Tabla 33: Distribución de frecuencia de la respuesta según la sobreexpresión de pSTAT3 en la serie ERBITAX

	Total	Presente	Ausente	p
	<i>N=33</i>	<i>N=22</i>	<i>N=11</i>	
Respuesta, n (%):				0.459
Respuesta	14 (42.4%)	8 (36.4%)	6 (54.5%)	
No respuesta o no valorable	19 (57.6%)	14 (63.6%)	5 (45.5%)	
Respuesta a tratamiento, n (%):				0.844
Respuesta completa	7 (21.2%)	4 (18.2%)	3 (27.3%)	
Respuesta parcial	7 (21.2%)	4 (18.2%)	3 (27.3%)	
Enfermedad estable	7 (21.2%)	5 (22.7%)	2 (18.2%)	
Progresión	12 (36.4%)	9 (40.9%)	3 (27.3%)	

Tabla 34. Distribución de frecuencia de la respuesta según los niveles de expresión de ARNm de STAT3 en la serie ERBITAX

	Total	Bajos	Altos	p
	N=21	N=14	N=7	
Respuesta, n (%):				0.397
Respuesta	12 (57.1%)	9 (64.3%)	3 (42.9%)	
No respuesta o no valorable	9 (42.9%)	5 (35.7%)	4 (57.1%)	
Respuesta a tratamiento, n (%):				0.124
Respuesta completa	7 (33.3%)	4 (28.6%)	3 (42.9%)	
Respuesta parcial	5 (23.8%)	5 (35.7%)	0 (0.0%)	
Enfermedad estable	4 (19.0%)	1 (7.1%)	3 (42.9%)	
Progresión	5 (23.8%)	4 (28.6%)	1 (14.3%)	

4.2.5.5. SLP según los parámetros de activación de STAT3

En el caso de la SLP, los pacientes con tumores con activación de la vía STAT3 mediante metilación de PTPRT o sobreexpresión de pSTAT3 mostraron una peor mediana de SLP a paclitaxel y cetuximab, comparado con los que no la presentaron, pero sin mostrar diferencias estadísticamente significativas (4,9 vs 6,9 meses y 5,1 vs 6,9 meses, respectivamente). Este hecho no se observó con los niveles de expresión de ARNm de STAT3. (Figuras 38-40 del anexo 5)

4.2.5.6. SG según los parámetros de activación de STAT3

Asimismo, al analizar la SG según los parámetros de activación de STAT3, los pacientes con tumores con activación de esta vía mediante metilación de PTPRT y sobreexpresión de pSTAT3 presentaron peor SG con paclitaxel y cetuximab en comparación con los que no la presentaron, fenómeno que también observamos al analizar los niveles de expresión de ARNm de STAT3, aunque las diferencias fueron numéricas, y no estadísticamente significativas. (Tabla 35. y Figuras 41-43 del anexo 5)

Tabla 35. Supervivencia global según los parámetros de activación de la vía STAT3 en la serie ERBITAX

	Mediana en meses (IC 95%)	P
Metilación de PTPRT		0,46
Metilado	8,1 (3,5-NA)	
No metilado	9,8 (6,4-29,9)	
Sobreexpresión pSTAT3		1
Presente	8,1 (3,5-24,7)	
Ausente	9,1 (7,7-NA)	
Niveles ARNm STAT3		0,81
Altos	12,9 (9,8-NA)	
Bajos	14,1 (7,9-75,8)	

4.2.5.7. Supervivencia desde el diagnóstico según los parámetros de activación de STAT3

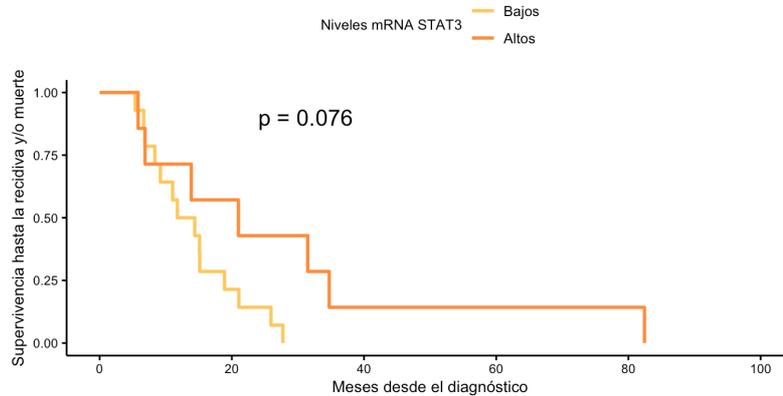
Como hemos comentado anteriormente, las muestras tumorales se obtuvieron antes de que los pacientes hubieran recibido RT y/o tratamiento sistémico. Por este motivo, decidimos evaluar la supervivencia desde el diagnóstico del cáncer en función de los parámetros de activación de STAT3, para evaluar su papel pronóstico y/o el impacto de tratamientos realizados antes de la recurrencia o diseminación.

Es importante destacar que la supervivencia desde el diagnóstico mostraba una tendencia a ser superior en los pacientes con sobreexpresión de pSTAT3 (32,1 vs 22,7 meses), y con niveles altos de expresión de ARNm de STAT3 (54,1 vs 27,5 meses), sin alcanzar la significación estadística. (Figuras 44-46 del anexo 5)

4.2.5.8. Tiempo a la recidiva según los parámetros de activación de la vía STAT3

Al analizar el tiempo transcurrido desde el diagnóstico a la recidiva, no encontramos diferencias significativas para ninguno de los tres parámetros evaluados, pero se observó una clara tendencia a un mayor tiempo a la recidiva en los pacientes con tumores con niveles altos de ARNm de STAT3 (Figura 28.).

Figura 28. Tiempo a la recidiva según los niveles de ARNm de STAT3 en la serie ERBITAX



En riesgo (Nº muertes)

Bajos	14 (0)	3 (11)	0 (14)	0 (14)	0 (14)	0 (14)
Altos	7 (0)	4 (3)	1 (6)	1 (6)	1 (6)	0 (7)

Niveles mRNA STAT3 Mediana en meses (IC 95%)

Bajos	13.1 (9.2-25.9)
Altos	21 (6.9-NA)

Niveles mRNA STAT3 Tiempo (meses) Supervivencia (IC 95%)

Bajos	12	50% (30-84)
	24	14% (4-52)
Altos	12	71% (45-100)
	24	43% (18-100)
	36	14% (2-88)
	60	14% (2-88)

4.2.6 Modelo de regresión logística

Según el modelo de regresión logística univariado, los factores clínicos que tenían un efecto significativo sobre la respuesta al tratamiento con ERBITAX fueron la exposición previa a taxanos (p 0,013) y el *PS* en el momento de la recidiva (p 0,028). En cuanto a los parámetros de activación de la vía STAT3, el estado de metilación del gen *PTPRT* mostró un efecto significativo sobre la respuesta al tratamiento (p 0,026). Este efecto se mantuvo en el análisis multivariado, con una tendencia prácticamente significativa. Los pacientes con el gen metilado se beneficiaron menos del tratamiento que los pacientes con el gen funcional ($OR=2,84$). (Tabla 36.)

Tabla 36. Efecto de diferentes parámetros clínicos y biomarcadores en la respuesta al tratamiento en la serie ERBITAX

variables		OR (Univariable)	OR (Model)
HPV	No		
	No procede	0.38 (0.09-1.27, p=0.141)	
	Sí	0.38 (0.04-3.10, p=0.368)	
Tipo de recidiva	Locorregional		
	A distancia	0.63 (0.21-1.83, p=0.403)	
	Ambas	0.76 (0.20-2.91, p=0.685)	
Cetuximab previo	No		
	Sí	275.64 (0.00-NA, p=0.990)	
Taxano previo	No		
	Sí	4.45 (1.50-16.63, p=0.013)	2.69 (0.84-10.19, p=0.115)
PS en el momento de la recidiva	0		
	1	3.31 (1.18-10.10, p=0.028)	2.97 (0.89-11.59, p=0.080)
	2	4.22 (0.89-23.60, p=0.081)	5.61 (0.88-44.28, p=0.070)
Reacción acneiforme	0-1		
	2-4	0.69 (0.29-1.64, p=0.409)	
Expresión pSTAT3 2 y/o 3	Presente		
	Ausente	0.63 (0.25-1.57, p=0.322)	
Metilación de PTPRT	No metilado		
	Metilado	2.84 (1.15-7.37, p=0.026)	2.82 (0.96-8.75, p=0.060)

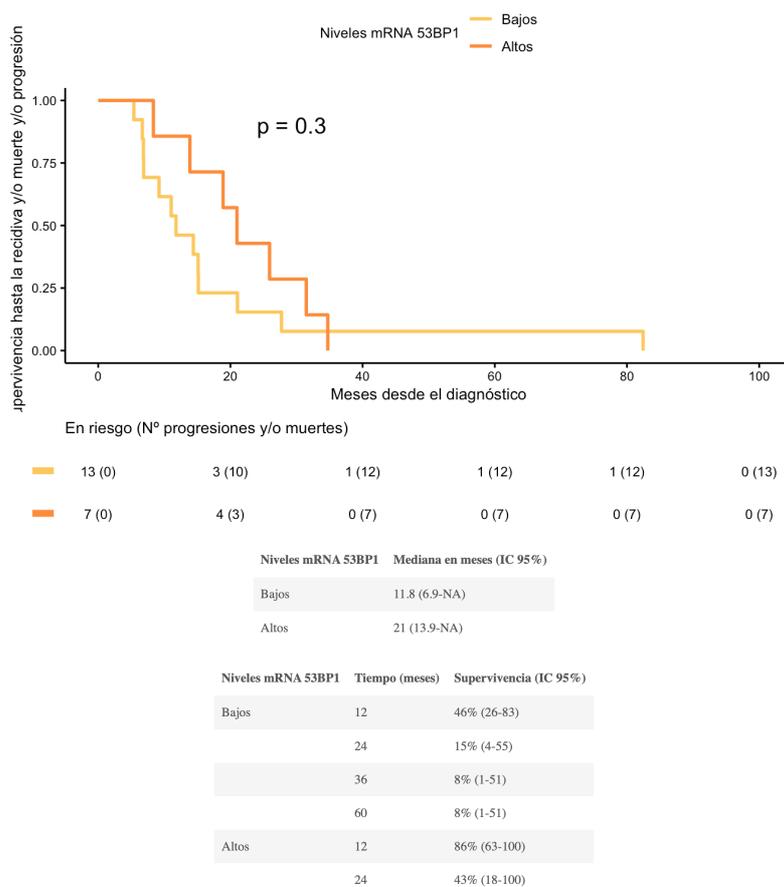
4.2.7 Eficacia del tratamiento según los niveles de expresión de los genes implicados en las vías de reparación del ADN en la serie ERBITAX

Debido a los resultados obtenidos en el trabajo con la serie de QRT, en el cual los niveles de expresión de ARNm de la proteína 53BP1 fueron los que más se asociaron con la respuesta a QRT, decidimos determinarlos en la serie de pacientes tratados con ERBITAX para valorar su papel predictivo de respuesta. Según los resultados obtenidos, decidiríamos si continuar y realizar el análisis de otros genes como *BRCA1* y *RAP80*, que habían mostrado peor correlación en la serie de QRT.

En el análisis de expresión de ARNm, no encontramos una asociación significativa entre 53BP1 y la eficacia del tratamiento ERBITAX en términos de respuesta, SLP ni SG (Tabla 47 y Figuras 47 y 48 del anexo 5).

Por último, al tratarse *53BP1* de un gen reparador del daño del ADN, y pensando en su posible papel pronóstico y en la eficacia de tratamientos adyuvantes administrados previamente, evaluamos su papel en el tiempo a la recidiva de la enfermedad. Los pacientes con tumores con niveles altos de ARNm de 53BP1 presentaron un tiempo a la recidiva muy superior a los que alcanzaron los pacientes con tumores con niveles bajos. Sólo se pudo realizar esta determinación en 20 muestras, por lo que estas diferencias no son estadísticamente significativas. (Figura 29).

Figura 29. Tiempo a la recidiva según los niveles de ARNm de 53BP1 en la serie ERBITAX



4.2.8. Características y resultados de la población con tumores de orofaringe relacionados con el VPH en la serie ERBITAX

Pese a que no era un objetivo del estudio y no estaba dimensionado para ello, quisimos analizar específicamente los tumores localizados en la orofaringe, y más concretamente, aquellos relacionados con el VPH. En concreto, de los 13 tumores localizados en la orofaringe, disponíamos de muestra tumoral en 8 y sólo 2 presentaron positividad para p16 mediante IHQ (15% del total).

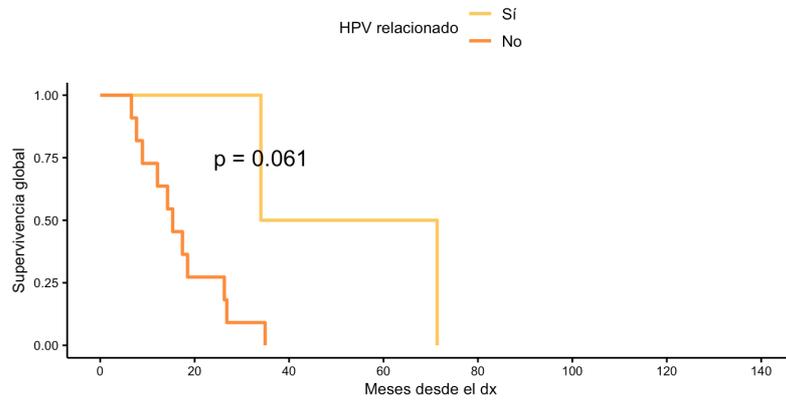
La supervivencia desde el diagnóstico y el tiempo a la recidiva de los pacientes con tumores relacionados con el VPH fue muy superior a la de los no relacionados, pero no se encontraron diferencias significativas por el reducido número de pacientes.

Los pacientes con tumores de orofaringe relacionados con el VPH presentaron un 50% de respuesta al tratamiento (un paciente respondió y otro progresó). No hallamos una correlación significativa entre la respuesta y la asociación con el virus. La SG desde el inicio del tratamiento también fue muy superior, sin diferencias significativas por las razones ya descritas.

Los dos tumores relacionados con el VPH tenían *PTPRT* metilado y sobreexpresión de pSTAT3.

A continuación, exponemos la supervivencia desde al diagnóstico en los COFs según la relación con el VPH (Figura 30). El resto de resultados están detallados en el anexo 5 (Figuras 49 y 50).

Figura 30. Supervivencia desde el diagnóstico en los carcinomas de orofaringe según el estado del VPH serie ERBITAX



En riesgo (Nº muertes)

— Sí	2 (0)	2 (0)	1 (1)	1 (1)	0 (2)	0 (2)	0 (2)	0 (2)
— No	11 (0)	3 (8)	0 (11)	0 (11)	0 (11)	0 (11)	0 (11)	0 (11)

HPV relacionado Mediana en meses (IC 95%)

Sí 52.7 (34-NA)

No 15.3 (12.1-NA)

HPV relacionado Tiempo (meses) Supervivencia (IC 95%)

Sí 12 100% (100-100)

24 100% (100-100)

36 50% (13-100)

60 50% (13-100)

No 12 73% (51-100)

24 27% (10-72)

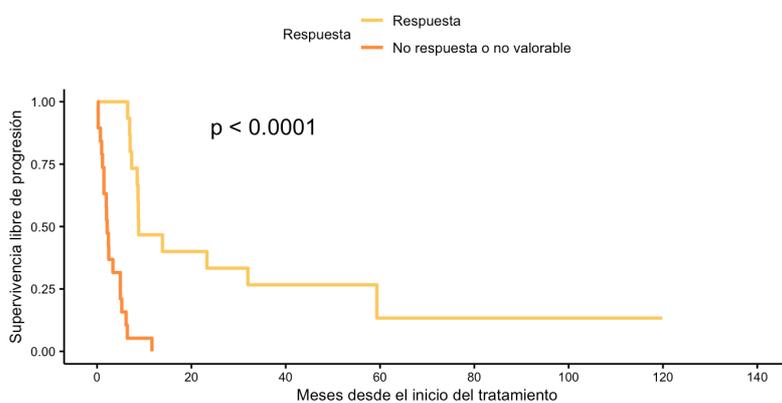
4.2.9. Correlación entre las diferentes medidas de eficacia en la serie ERBITAX

También quisimos confirmar la relación entre los diferentes parámetros que valoraban la eficacia de la combinación de paclitaxel y cetuximab con el propósito de confirmar que los resultados no eran una consecuencia del azar.

La respuesta al tratamiento se correlacionó significativamente con la SLP y la SG (Figuras 31 y 32).

Destaca que el 75% de los pacientes que responden están vivos al año de iniciar el tratamiento, en comparación con el 16% de los que no lo hacen. El 50% y el 22% de los pacientes respondedores está vivos a los 2 y 5 años, respectivamente.

Figura 31. Supervivencia libre de progresión según la presencia o ausencia de respuesta en la serie ERBITAX



En riesgo (N° progresiones y/o muertes)

15 (0)	6 (9)	4 (11)	1 (12)	1 (12)	1 (12)	0 (12)	0 (12)
19 (0)	0 (19)	0 (19)	0 (19)	0 (19)	0 (19)	0 (19)	0 (19)

Respuesta **Mediana en meses (IC 95%)**

Respuesta 8.8 (8.5-NA)

No respuesta o no valorable 2.1 (1.4-5.2)

Respuesta **Tiempo (meses)** **Supervivencia (IC 95%)**

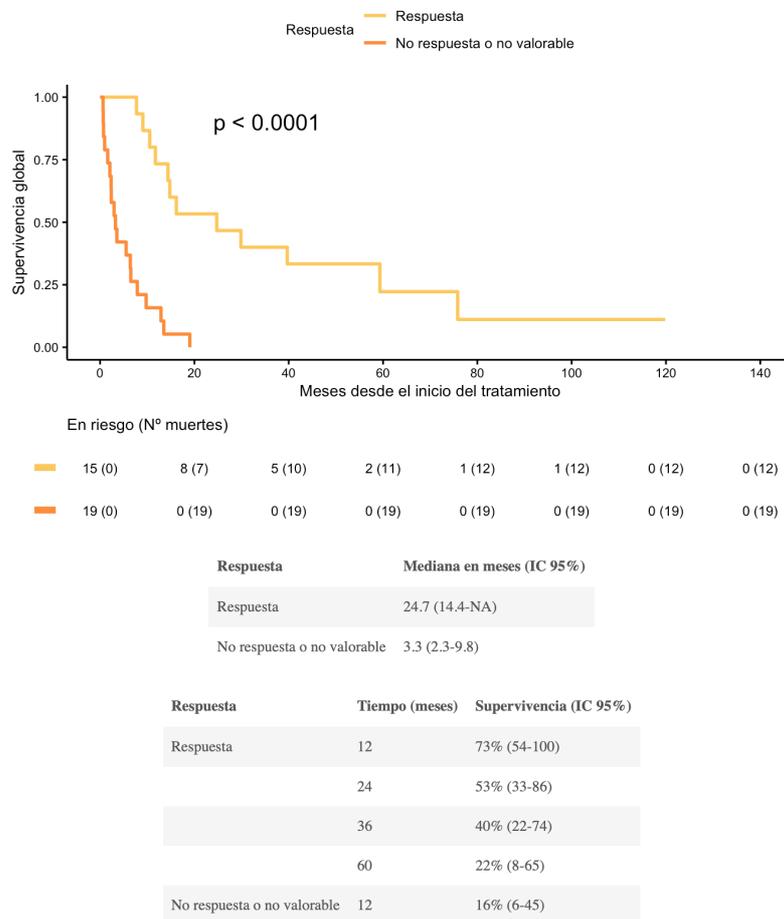
Respuesta 12 47% (27-80)

24 33% (16-68)

36 27% (12-62)

60 13% (3-67)

Figura 32. Supervivencia global según la presencia o ausencia de respuesta en la serie ERBITAX



4.2.10. Resumen de resultados de la serie ERBITAX

Si recordamos el objetivo que nos habíamos planteado de correlacionar la activación de la vía STAT3 con la eficacia de paclitaxel y cetuximab, observamos que:

- la activación de la vía de STAT3 evaluada mediante la metilación de *PTPRT* y la sobreexpresión de pSTAT3 fue muy frecuente en el CECC.

- existía una franca correlación entre la metilación de *PTPRT* y la sobreexpresión de pSTAT3, que no se reprodujo con los niveles de expresión de ARNm de STAT3. La

metilación de *PTPRT* fue el único parámetro que tuvo un impacto en la eficacia en el análisis multivariado.

- la metilación de *PTPRT* fue el único parámetro de activación de la vía STAT3 que tuvo una relación significativa con una peor respuesta. La sobreexpresión de pSTAT3 también se relacionó con resistencia al tratamiento, pero sin significación estadística.

- los pacientes con tumores con activación de la vía STAT3 alcanzaron SLP y SG inferiores a los que no los tenían, sin significación estadística.

- el tiempo a la recidiva de la neoplasia de cabeza y cuello en los pacientes con tumores con niveles altos de ARNm de STAT3 y 53BP1 fue superior a aquellos con tumores con niveles bajos.

Otros resultados del análisis fueron:

- la eficacia de ERBITAX fue peor en los pacientes con exposición previa a cetuximab y/o taxanos, peor *PS* y ausencia de reacción acneiforme relacionada con cetuximab.

- los COF relacionados con el VPH tuvieron un mejor pronóstico.

- todos los resultados que evaluaban la eficacia (TR, SLP y SG) se correlacionaron entre ellos.

6. DISCUSIÓN

5.1. Análisis de las características de los pacientes y de los factores clínicos o epidemiológicos en relación a su potencial valor pronóstico y predictivo de respuesta en ambas series de pacientes con CECC.

En esta tesis hemos analizado 2 series de pacientes con CECC. La primera de ellas consta de 72 pacientes con CECC-LA tratados con carboplatino y RT entre 1994 y 2010, denominada serie de QRT, y la segunda de 52 pacientes con tumores recurrentes y/o metastásicos tratados con paclitaxel y cetuximab entre 2008 y 2017 (serie ERBITAX).

5.1.1. Análisis de las características de la cohorte de pacientes con CECC LA tratados con platino y RT (serie de QRT).

Una serie española nos sirve para entender las características clínicas de la nuestra. Seijas-Tamayo y colaboradores (col.) describieron una cohorte de pacientes diagnosticados de carcinoma escamoso de cavidad oral, orofaringe, hipofaringe y laringe en 19 centros españoles entre 2012 y 2014 (355). La mayoría eran varones, con una mediana de edad de 59 años, una carga importante de hábitos tóxicos, principalmente el tabaco, y la mayoría diagnosticados en estadios localmente avanzados, sobre todo los localizados en la orofaringe. Los 72 pacientes con CECC-LA de nuestra serie de QRT tenían una mediana de edad de 59 años, el 93% eran varones y habían estado expuestos al tabaco y el alcohol, y casi la mitad de ellos estaban localizados en la orofaringe, por lo que son un reflejo de la realidad epidemiológica de este tipo de tumor en nuestro entorno.

En este punto es importante destacar dos aspectos.

En primer lugar, cuando se analizaron los datos, la correlación entre la escala ECOG/PS y el índice de Karnofsky era la siguiente: PS 0 - IK 100-90; PS 1- IK 80-70; PS 2- IK 60- 50; PS 3 IK 40-30; PS 4 IK 20-10; PS 5 IK 0 (356). Los datos publicados en el artículo en 2016 están descritos de acuerdo a esta correlación, donde el PS de los pacientes era 0,1 y 2 en un 36%, 62,5% y 1% respectivamente. Posteriormente ha cambiado esa equivalencia entre ambas escalas, (<https://oncologypro.esmo.org/Oncology-in-Practice/Practice-Tools/Performance-Scales>)(ver anexo 1). Si tenemos en cuenta esta segunda correlación, los porcentajes serían 3%, 66% y 31%, es decir, casi

un tercio de los pacientes tenían un PS 2 al diagnóstico, hecho que confiere un especial mal pronóstico a nuestra serie.

Por otro lado, es importante destacar el estadiaje de los tumores de los pacientes analizados, un 10% estadio III, un 50% estadio IVa y un 40% estadio IVb. Esta estrategia se utilizó como preservación de órgano sólo en un 7% de los pacientes. La enfermedad se consideró irresecable o inoperable por un mismo comité multidisciplinar en un 93% de los casos.

David J. Adelstein afirmó que *“en cáncer de cabeza y cuello, la definición de irresecabilidad está, como la belleza, en el ojo del observador. Es subjetiva y a menudo basada en la capacidad quirúrgica individual o institucional”*.

Es importante destacar que estos pacientes deben ser valorados desde el diagnóstico por un equipo multidisciplinar. Esta estrategia ha demostrado un beneficio en la supervivencia de los mismos (357,358). El Comité de Tumores de Cabeza y Cuello fue fundado en nuestro centro en 1997, por lo que, en la gran mayoría de los pacientes analizados, la decisión terapéutica inicial fue tomada por, al menos, un cirujano de cabeza y cuello, un oncólogo radioterápico y un oncólogo médico, hecho que validaría la definición tomada de resecabilidad/operabilidad.

La evolución de las técnicas reconstructivas (microcirugía) (359,360), la cirugía robótica transoral (361) y otros avances quirúrgicos en estos veinticinco años han hecho posible que aumente el porcentaje de resecabilidad de estos tumores. Probablemente si volviéramos a evaluar a estos pacientes en el equipo multidisciplinar a día de hoy, consideraríamos resecables a un porcentaje de los que, en el momento en que fueron diagnosticados, se consideraron irresecables. También los avances en nutrición nos han permitido mejorar el estado del paciente de forma bastante rápida y permitir que pacientes considerados como inoperables por una desnutrición severa, puedan pasar a ser candidatos a cirugía gracias a diferentes técnicas (gastrostomías, inmunonutrición, etc) (361).

Otra causa de que el porcentaje de pacientes con tumores resecables fuera bajo pudo ser que, durante gran parte de ese período de tiempo, la estrategia de preservación de órgano más frecuentemente utilizada en nuestro entorno era la quimioterapia de inducción, como hemos descrito en la introducción. Los pacientes que tenían buen PS y ausencia de contraindicación a cisplatino, probablemente recibieron

esta estrategia cuando se planteaba conservar la funcionalidad.

A pesar de todo lo expuesto, un alto porcentaje de pacientes evaluados fueron diagnosticados con enfermedades muy voluminosas, conglomerados ganglionares de más de 6 cm (N3 en el sistema de estadiaje TNM en ediciones previas a la 8ª), tumores primarios con afectación prevertebral (T4), afectación de estructuras vasculares, etc., características que pudieron condicionar los resultados clínicos obtenidos en nuestra serie de QRT.

La educación social y los circuitos de derivación a unidades de diagnóstico de tumores de cabeza y cuello han supuesto que, a pesar de que esta neoplasia se siga diagnosticando mayoritariamente en estadios localmente avanzados, hoy día no nos encontremos situaciones tan extremas como en el periodo de la cohorte seleccionada.

Por último, aunque no se recogió exhaustivamente esta información, el perfil de pacientes incluidos presentaba un índice de comorbilidades asociado muy alto, como se ha descrito ampliamente en la literatura (362). Existen claras evidencias de que un 21% tiene comorbilidades moderadas o severas debido a otras enfermedades asociadas al tabaco y el alcohol y a un alto porcentaje de pacientes con edad avanzada. Este hecho, se ha asociado con un peor pronóstico y con una incapacidad de realización del tratamiento óptimo. También, el contexto socioeconómico y desnutrición presente en nuestra serie, puede tener implicaciones en el tratamiento y la SG.

Después de todo lo expuesto anteriormente y la evidencia científica desarrollada en la introducción, podemos entender que el esquema de tratamiento de elección en este escenario fuera el carboplatino AUC 2 semanal concomitante con la RT, mayoritariamente convencional, y en casos seleccionados, hiperfraccionada.

Ya se ha explicado previamente que la QRT con cisplatino 100 mg/m² día 1, 22 y 43 es el estándar de tratamiento en este escenario, en pacientes con un buen estado general y ausencia de comorbilidades importantes.

Debido al perfil de toxicidad asociado al fármaco y a la edad, enfermedades asociadas y el *PS* de los pacientes con CECC-LA, el cisplatino está contraindicado en muchas ocasiones. La toxicidad aguda asociada es muy importante, con más de un 80% de toxicidad severa que condiciona que sólo dos tercios de los pacientes puedan completar los 3 ciclos de tratamiento (363). Además de esto, hay que destacar la toxicidad tardía

de este esquema, que se asocia a una mortalidad no despreciable (364).

El carboplatino es un importante radiosensibilizador, con una toxicidad renal y gastrointestinal mucho menor al cisplatino (365). Estudios clínicos fase II mostraron tasas de RC a este fármaco similares al cisplatino (366, 367)

A pesar de que el cisplatino es el fármaco con mayor evidencia científica en este contexto, y de que parece superior en algunos metanálisis, queda clara la eficacia del carboplatino, siendo un fármaco recomendado, especialmente en pacientes con dudas de que puedan tolerar el cisplatino (368-370), como los representados en este trabajo.

La eficacia del tratamiento obtenida en nuestra serie de QRT fue muy inferior a la reportada con esquemas similares, independientemente del platino utilizado (cisplatino o carboplatino), donde las tasas de supervivencia a los 3 años eran del 51-80% y a los 5 años del 25-55% (52).

Estas diferencias son atribuidas a las características de mal pronóstico de nuestros pacientes en relación al estadiaje, el alto porcentaje de irreseabilidad/inoperabilidad, y el *PS* e importante carga de hábitos tóxicos de los mismos. Estos factores no se relacionaron significativamente con la SG en nuestro análisis, probablemente por el reducido número de pacientes en los subgrupos de características de bajo riesgo.

Por otra parte, encontramos una asociación entre una mayor SG y aquellos pacientes que desarrollaron un segundo tumor primario, lo que puede indicar que, si todos los pacientes consiguieran curarse del tumor de cabeza y cuello, una gran parte de ellos sufrirían esta condición, probablemente en relación con la importante exposición al tabaco y el alcohol y la cancerización de toda la mucosa del aparato aéreo-digestivo secundaria.

Para comprender nuestros resultados de eficacia, también hay que destacar la causa de muerte de los pacientes. Sólo el 56% de ellos murieron a causa de la neoplasia. Un 8% murieron por toxicidad aguda, un 17,5 % por un segundo tumor y un 19% por otras causas, en ocasiones relacionadas con sus comorbilidades y en otras no aclaradas, quizás relacionadas con toxicidad tardía, como ha ocurrido en otros estudios de QRT (9).

Para analizar la mortalidad asociada a toxicidad, debemos remitirnos a una de las frases con las que iniciamos la tesis, es decir, que es un error juzgar el pasado con los ojos del presente.

Los pacientes tratados en nuestra serie de QRT eran frágiles, con importantes comorbilidades, y recibieron la QRT sin la disponibilidad de una unidad de soporte nutricional. El tratamiento de soporte médico era diferente al actual, en el que existe una mayor multidisciplinariedad (implicación de nutricionistas, psicooncólogos, enfermería especializada, gestores de casos, unidades de deshabitación, etc). El tratamiento antiemético, analgésico, el soporte nutricional y los cuidados de enfermería se han ido optimizando posteriormente a lo largo de los años.

También se debe destacar que en el año 2010, se puso en marcha en nuestro centro la radioterapia de intensidad modulada (IMRT), técnica que ha supuesto una clara disminución de la toxicidad al tratamiento, por lo que los pacientes de nuestra serie no pudieron beneficiarse de esta técnica.

En definitiva, las características de la serie de pacientes de QRT concuerdan con las de la época y entorno en que fueron diagnosticados, y los resultados de eficacia se justifican por las características de los mismos. Los resultados nos permiten reflexionar sobre la necesidad de seguir avanzando hacia un modelo multidisciplinar, donde el paciente esté en el centro de la atención médica.

5.1.2. Análisis de las características de la cohorte de pacientes con CECC R/M tratados con paclitaxel y cetuximab (serie ERBITAX)

Un régimen alternativo y mejor tolerado para los pacientes con CECC R/M no candidatos a recibir platino, es el paclitaxel en combinación con cetuximab semanal. Hitt y col. reclutaron a 46 pacientes que tenían pocas opciones de beneficiarse de la QT basada en platino en un ensayo clínico de fase II que combinaba estos fármacos. La TR global fue del 54% (IC del 95%: 39% - 69%) (tasa de RC: 22%, tasa de control de la enfermedad: 80%). La mediana de SLP y SG fue de 4,2 meses (IC del 95%: 2,9 a 5,5 meses) y 8,1 meses (IC del 95%: 6,6 a 9,6 meses), respectivamente. El desarrollo de rash acneiforme se asoció con la respuesta del tumor.

Los pacientes que no habían recibido previamente QT como parte de un tratamiento multimodal de enfermedad localmente avanzada, tuvieron una respuesta tumoral significativamente mejor que aquellos que habían recibido QT previa (65).

Además, las guías de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) incluyen esta opción para los pacientes no tratados previamente con QT en el tratamiento de la enfermedad recurrente y metastásica. Si el paciente no puede ser tratado con platino (enfermedad concomitante, tratamiento previo, etc.) o los pacientes tienen un *PS* 2, se debe considerar esta combinación, denominada ERBITAX (371).

Los resultados obtenidos en nuestra serie ERBITAX son bastante similares a los descritos en el estudio de Hitt y col., a pesar de tratarse de una población no seleccionada. La mediana de edad fue de 64 años, algo más elevada, el porcentaje de mujeres fue algo superior y el *PS* del paciente fue mejor. Las localizaciones más frecuentes fueron la laringe y la orofaringe, con un mayor porcentaje de la primera en nuestro caso. La carga de enfermedad locorregional también fue parecida, e incluso algo superior, con un 88% de pacientes con enfermedad locorregional frente al 79% reportado en el estudio fase II.

En cuanto a los tratamientos recibidos previamente, tanto en el estudio fase II como en nuestra serie, el porcentaje de pacientes que habían recibido RT anteriormente fue muy alto (83 vs 88%), y la exposición previa a taxanos fue significativamente superior en nuestros pacientes (32,7 vs 12,5%). En el estudio de Hitt y col. no se permitió la inclusión de pacientes que hubieran recibido cetuximab previamente, y en cambio en nuestra serie casi el 21% de lo habían recibido.

Los resultados de eficacia obtenidos en la serie ERBITAX fueron una TR algo peor a la del estudio de Hitt y col, una SLP algo superior y una SG similar. La diferencia entre la SLP y la SG es muy discreta, hecho que puede justificarse porque más del 60% de los pacientes no recibieron ningún tratamiento posterior a ERBITAX en nuestra serie. No disponemos de este dato en el estudio fase II de Hitt y col.

La toxicidad cutánea severa fue algo superior en el estudio pivotal de Hitt y col. (24 vs 15%). En este estudio, la toxicidad grado 2-4 se asoció con una mayor TR, pero no con la SG. En cambio, en nuestra serie ERBITAX, los pacientes que desarrollaron un rash acneiforme grado 2-4 alcanzaron una SG significativamente superior a aquellos

con grado 0-1. 2 de los 4 pacientes que recibieron esta terapia y desarrollaron toxicidad grado 3 alcanzaron SG muy prolongadas.

La correlación entre el grado de la toxicidad cutánea inducida por cetuximab en combinación con RT y la eficacia del tratamiento está bastante descrita en la literatura. Sin embargo, pocos estudios publicados se han centrado en la correlación entre esta toxicidad cutánea inducida por cetuximab y la eficacia del tratamiento en CECC R/M. Aún así, varios estudios sugieren que podría ser un prometedor factor predictor de la eficacia a regímenes que contengan cetuximab en este escenario (372). No existen características clínicas que nos ayuden a detectar qué pacientes van a presentar esta toxicidad, pero se han postulado algunos mecanismos, como determinados genotipos del receptor EGFR, o niveles de proteína en plasma de EGF o HGF (373, 374).

En cuanto a la influencia de los tratamientos previos en la evolución de la enfermedad, en el estudio de Hitt y col., los pacientes que no habían recibido QT previa obtuvieron mejores TR a ERBITAX, pero no un beneficio en la SG. En nuestra serie, la exposición previa a taxanos o cetuximab se asocia con peores TR y SG de forma significativa, reflejo del desarrollo de resistencias adquiridas, lo que podría aplicarse en un cambio de estrategia terapéutica para mejorar el pronóstico en estos pacientes.

Otro punto muy interesante a destacar, es la presencia de LS (375). Un 14% de los pacientes tratados con el esquema EXTREME alcanzaron una supervivencia mayor de 2 años (64), y el 2,7% de los pacientes mantuvieron esta respuesta hasta los 5 años (24). Aunque estos datos no se han reportado con el esquema de ERBITAX, un 22% de los pacientes alcanzaron una RC. El grupo de Oncología Médica del Institut Català d'Oncologia de Hospitalet publicó en 2016 una serie de 7 casos con RC o RP mantenida durante más de 2 años al tratamiento combinado de QT y cetuximab, entre los cuales había 3 pacientes tratados con ERBITAX (376). La biología de los tumores de estos LS está siendo objeto de estudio, pero no se han reportado resultados hasta el momento.

En nuestra serie, un 21% de los pacientes estaban vivos a los 2 años de iniciar el tratamiento, y un 13% a los 5 años, lo que confirma la presencia de esta población con una enfermedad recurrente /metastásica que consiguen la curación en ausencia de un tratamiento local.

5. 1.3. Relación del CECC con la infección por el VPH

Como se ha comentado previamente, el carcinoma escamoso relacionado con el VPH es una entidad diferente al carcinoma escamoso relacionado con el tabaco y el alcohol en términos epidemiológicos, moleculares y clínicos, y también presentan un mejor pronóstico. Por este motivo, nos pareció interesante estudiar esta relación en las dos series, la serie de QRT y la serie ERBITAX, de forma retrospectiva, ya que no se había realizado esta determinación, ahora rutinaria, en el momento en que se trataron los pacientes.

En la serie de QRT, realizamos la determinación de la proteína p16 por IHQ y el ADN del VPH por CISH en todos los tumores, independientemente de la localización (no sólo orofaringe).

En cuanto a la relación con el VPH, sólo 4 de los 72 pacientes (6,35%) de la serie de QRT tuvo sobreexpresión de p16: dos pacientes con tumor localizado en orofaringe, uno en el seno maxilar y uno en la cavidad oral. La determinación por CISH mostró amplificación del virus en uno de los casos, siendo los otros 3 indeterminados, debido a las dificultades técnicas descritas previamente.

En la serie ERBITAX, sólo realizamos la determinación de p16 por IHQ en los COFs. No se confirmó la presencia de ADN del virus, pese a que es la práctica asistencial rutinaria en nuestro centro desde hace 3 años ya que, aunque hubiéramos obtenido datos discordantes entre las dos técnicas, no habrían cambiado los resultados obtenidos y, además, la muestra de la que disponíamos era muy escasa en muchas ocasiones. En este caso, el 15 % de los carcinomas de orofaringe (2 de 13) resultaron relacionados con el VPH.

Sabemos que la prevalencia del COF atribuible al VPH es muy variable según el área geográfica, pero globalmente, en la actualidad, supone un 30-35%. El carcinoma escamoso no orofaríngeo relacionado con el HPV es muy raro (<6%). Como se ha comentado en la introducción, en Cataluña el porcentaje de COF relacionado con el VPH ha pasado de alrededor del 8% en el periodo 1991-1997 a casi el 20% en el periodo 2007-2014 (10,11).

La serie de QRT comprende prácticamente estos dos períodos, pero analiza otras localizaciones, y la serie ERBITAX coincide con el segundo, y tiene resultados bastantes similares.

En cuanto a los tumores no localizados en orofaringe, se han reportado incidencias muy bajas (7,4% en la cavidad oral, 7,9% en nasofaringe, 3,9% en hipofaringe y 5,7% en laringe) (28) y su implicación pronóstica no está tan clara como en la orofaringe. En nuestro caso, observamos un caso positivo en una cavidad oral, más concretamente en el triángulo retromolar. La revisión del caso tras este hallazgo concluyó que el origen tumoral podía ser la amígdala. El otro caso fue en un paciente con un tumor localizado en el seno maxilar. Existen evidencias de que los carcinomas escamosos sin nasales son positivos en un porcentaje elevado, casi del 30% e incluso que puede tener una implicación pronóstica favorable (377).

En cuanto a las técnicas realizadas, recientemente se ha comunicado un análisis internacional de 13 cohortes de pacientes con carcinoma de orofaringe con información sobre el estado de la proteína p16, el ADN del VPH, datos demográficos de hábitos tóxicos y características clínicas, que ha demostrado que los pacientes con tumores con doble positividad para p16 y ADN de VPH presentan un mejor pronóstico en términos de SLP y SG respecto a los otros subgrupos, por lo que debemos utilizar las dos técnicas en nuestra práctica clínica habitual. El uso únicamente de la determinación de p16 estaría clasificando incorrectamente como tumores VPH relacionados, a un 11% del global, e incluso en un porcentaje mayor, en regiones con bajo porcentaje de causalidad por el VPH, como es nuestro caso (378).

Todos los datos obtenidos sobre la asociación con el VPH en el análisis de ambas series aportan una información epidemiológica importante, pero en ningún caso tienen una implicación en los resultados de eficacia obtenidos, debido al bajo porcentaje de pacientes positivos.

5.2. De la investigación clínica a la traslacional. “Lost in translation”.

Nuestras dos series tienen en común un importante porcentaje de pérdida de casos analizados a nivel molecular, a causa de la ausencia de muestra tumoral o limitación por la cantidad o calidad de la misma. En la serie de QRT pudimos analizar

32 de 72 pacientes (44%) y en la segunda 34 de 52 (65%). Este hecho es una de las limitaciones más importantes de esta tesis, ya que ha podido influir de forma significativa en la robustez de los resultados, por lo que nuestros datos deben considerarse únicamente como generadores de hipótesis para futuros estudios más amplios.

La pérdida de casos por falta de muestra es un problema habitual en los estudios de investigación traslacional. En primer lugar, la comunidad científica no ha sido siempre suficientemente meticulosa y consciente de la importancia de complementar todo estudio clínico con una valoración de biomarcadores, y, se han requerido años, para generar correctas estructuras y legislación para la preservación de las muestras biológicas y su uso con fines científicos respetando los derechos de los pacientes. En situaciones en las que se intentan validar biomarcadores como predictores de eficacia a tratamientos oncológicos, la situación idónea sería la de disponer de una muestra antes de iniciar el tratamiento y otra a la progresión del mismo.

Si bien la biopsia de tejido es la técnica de diagnóstico estándar, ésta limita la cantidad de muestra disponible para estudios moleculares, entre otros condicionamientos como la baja sensibilidad y precisión y la incapacidad para poder representar la heterogeneidad intratumoral. Además, los altos costes a nivel hospitalario asociados y, en muchas ocasiones, los riesgos de estos procedimientos invasivos para el paciente, hacen muy difícil la obtención de muestras de tejido seriadas a lo largo de la evolución de la enfermedad para un seguimiento longitudinal. En este sentido, la irrupción de la biopsia líquida en el escenario del tratamiento oncológico, supone una opción prometedora que contribuirá, sin duda, a un tratamiento más individualizado.

Pese a que los tumores de cabeza y cuello son más accesibles para la obtención de muestra que otros tipos de cáncer (tumores cerebrales, neoplasias de páncreas o pulmón, entre otros), y que éstas suelen ser muy ricas en células tumorales, la necesidad del inicio rápido de un tratamiento provoca que se utilicen técnicas rápidas y sencillas para el diagnóstico, como la punción-aspiración con aguja fina (PAAF), con la obtención de poco material biológico.

Además, la rápida progresión tumoral y deterioro del paciente implica que no siempre podamos obtener muestra a la progresión de la enfermedad, para un seguimiento longitudinal.

Por otro lado, como se ha mencionado, la biopsia tumoral nunca será representativa de la totalidad del tumor, ya que es recogida de una zona puntual del mismo, no representando su heterogeneidad espacial ni longitudinal, teniendo en cuenta que el tumor sufre cambios a lo largo del tiempo, ya sea por su evolución o por la presión de los tratamientos administrados.

En la serie de QRT, las dos causas más frecuentes de ausencia de tejido tumoral disponible para su análisis fueron las siguientes: en primer lugar, la obtención de muestra al diagnóstico mediante PAAF y, en segundo lugar, la calidad de las muestras después de ser preservadas. Hasta el 70% de los errores analíticos se deben a variaciones en la fase preanalítica. En el contexto de bioespecímenes, la fase preanalítica cubre todos los procesos entre la recolección de la muestra hasta que se retira del almacenamiento para su análisis (379). Uno de los factores de preservación con más impacto es el tiempo que transcurre entre la extracción y la fijación, así como a la técnica que se utiliza. La automatización de estas tareas ha mejorado la bioseguridad y calidad de las muestras, minimizando estas pérdidas. Desde hace unos años, existen estándares de procedimientos regulatorios en los biobancos (como la norma ISO 20387: 2018), que requieren una calificación y validación formales, para mejorar la preservación de las muestras biológicas.

Hay que recordar que la serie de QRT está constituida por pacientes tratados entre 1994 y 2010. La recolección y almacenamiento de las muestras no estaba sujeta a todas estas regulaciones actuales. Este hecho puede haber influido en la falta de calidad de las mismas y haber acentuado su deterioro, habitual con el paso de los años.

En la serie ERBITAX, analizamos específicamente las probables causas de ausencia de muestra tumoral. Determinamos la correlación entre la disponibilidad de muestra y el estadio al diagnóstico, la participación en un ensayo clínico, el diagnóstico en nuestra institución o en una externa, el tipo de enfermedad (recurrente locorregional presente o únicamente metastásica), el año en el que se inició el tratamiento y la realización de cirugía en algún momento de la evolución del paciente. No se obtuvieron asociaciones significativas entre estos parámetros y la pérdida de muestras, pero el 83% de los pacientes con muestra tumoral disponible fueron sometidos a cirugía, mientras que el porcentaje fue sólo del 54% en los que no la tenían.

5.3. Correlación de la eficacia de la QRT con platino con los niveles de expresión de genes implicados en las vías de reparación del ADN en la serie de QRT.

En la primera serie de la tesis, se analizó la TR al tratamiento y la SG en pacientes con CECC- LA tratados con QRT en relación con los niveles de expresión de ARNm de diferentes genes de reparación del ADN (*MDC1*, *BRCA 1*, *RAP80*, *53BP1* y *RNF8*). Observamos diferencias significativas en la tasa de RC, mayor en los pacientes con tumores con niveles de expresión de ARNm de 53BP1 bajos, así como una tendencia a una mayor SG. Es importante destacar la diferencia numérica de la mediana de SG entre los dos grupos de expresión (alta o baja), especialmente cuando se tiene en cuenta la causa de muerte por cáncer de cabeza y cuello.

El Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) realizó una caracterización integral multiplataforma de diferentes tipos de tumores. La cohorte de cabeza y cuello mostró un alto porcentaje de población p53 mutada, una proteína supresora de tumores (25), relacionando la presencia de mutación con un peor pronóstico. 53BP1 se une a esta proteína supresora de tumores y está implicada en la respuesta al daño del ADN. Por lo tanto, en esta tesis se planteó la hipótesis que 53BP1 podría ser un factor importante en los resultados de eficacia al tratamiento de estos pacientes.

En un ensayo clínico de fase II (144), los pacientes con CPCNP con niveles de expresión bajos de BRCA1 y RAP80 tuvieron una mediana de SG más prolongada al tratamiento con cisplatino/gemcitabina. Sin embargo, un ensayo de fase III (145), con un grupo experimental de acuerdo con los niveles de BRCA1 / RAP80, se cerró prematuramente debido a un efecto perjudicial para éste.

Bonanno y col. examinaron el posible papel predictivo de una serie de genes de reparación del ADN implicados en la vía de 53BP1 al realizar tratamiento con QT basada en platino en el CPNCP, e identificaron un nuevo modelo predictivo de dos genes basado en el impacto de 53BP1 en la función de BRCA1(99). Los pacientes con tumores que expresaban niveles bajos de BRCA1 y de 53BP1 obtuvieron una mayor mediana de SLP y SG que aquellos con BRCA1 bajo y 53BP1 alto, de forma estadísticamente significativa. En pacientes cuyos tumores expresaban niveles altos de BRCA1, la expresión de 53BP1 no afectó al resultado del tratamiento.

Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestra serie de QRT difieren de la experiencia descrita en CPNCP. En nuestra serie, los pacientes con tumores con niveles

bajos de 53BP1 y altos de BRCA1 o RAP80, tuvieron una tasa de RC significativamente mayor. Es posible que esto pueda explicarse por la implicación de la RT. Se requiere de la proteína 53BP1 para reparar las DSB de ADN inducidas por la irradiación durante la fase G1 del ciclo celular. El platino sensibiliza las células tumorales a la radiación ionizante mediante la inhibición de la vía de reparación NHEJ. Por tanto, el pronóstico de los pacientes con bajo nivel de expresión de 53BP1 es significativamente mejor.

La relación antagónica entre BRCA1 y 53BP1 ha sido ampliamente descrita. La letalidad embrionaria, la predisposición tumoral, y los defectos en la vía HR en células con alteraciones de BRCA1 se restauran con el agotamiento de 53BP1(380). En una serie de estudios publicados en 2010, se implicó 53BP1 y el gen supresor tumoral *BRCA1* en el control de la resección final del ADN durante el proceso de reparación (102). Se demostró que 53BP1 regulaba negativamente esta resección en la fase del ciclo celular G1. BRCA1 promovía la eliminación de 53BP1 en la fase S para permitir la resección y la reparación. En consecuencia, en las células que carecían de BRCA1, la resección no se producía en la fase S, dando lugar a una reparación por NHEJ inapropiada en las DSB del ADN asociadas al proceso de replicación, lo que conducía a reordenamientos cromosómicos graves (40) y carcinogénesis.

Adicionalmente, existe una competencia interactiva entre las vías de reparación HR y NHEJ (381, 382). La DNA-PK, compuesta por Ku70, Ku80 y la subunidad catalítica (DNA-PKcs), está involucrada en la reparación de DSB a través de la NHEJ. Los defectos de DNA-PKcs confieren sensibilidad a la radiación ionizante y aumentan la reparación por HR. El aumento de la HR es consistente con la derivación pasiva de las DSB de NHEJ a HR. En la serie de QRT, los niveles elevados de BRCA1 y RAP80, componentes de la vía HR, podrían indicar una mayor inhibición de NHEJ y, secundariamente, un mayor efecto de la RT y de la estimulación con platino, obteniendo estos pacientes mejores resultados.

5.4. Correlación de la eficacia de la combinación de paclitaxel y cetuximab con los niveles de expresión de genes implicados en las vías de reparación del ADN en la serie ERBITAX

El papel del gen *EGFR* en la promoción de la reparación de las DSB inducidas por radiación es importante, especialmente en el contexto de la RT para los tumores con amplificación y / o mutaciones en *EGFR*. El efecto exacto de EGFR sobre la reparación de las DSB parece depender del contexto y varía con el tipo de mutación y cáncer (41).

En los CECC, se ha demostrado una relación inversa entre los niveles de expresión de EGFR y la respuesta a la RT (158). Es importante señalar que no todos los tumores que sobrexpresan EGFR responden igualmente bien a la terapia anti-EGFR (383, 384).

Con esta premisa, se generó la hipótesis de que los pacientes con tumores con niveles de expresión de genes involucrados en la vía NHEJ más altos, se beneficiaban más del tratamiento con cetuximab que del platino. Debido a la gran implicación de 53BP1 en esta vía, observada en el análisis de la serie de QRT, se evaluó si los niveles de expresión elevados de ARNm de 53BP1 se correlacionaban con la TR y SG a cetuximab en la serie ERBITAX.

El análisis se pudo realizar en 20 de las 34 muestras disponibles y no se obtuvo una correlación de los niveles de ARNm de 53BP1 con la TR ni con la SG. Debido a la ausencia de resultados positivos y al escaso material histológico disponible, se decidió no realizar el análisis de los niveles de expresión de ARNm de más genes reparadores de ADN analizados en la serie de QRT.

El hecho de que no se haya observado ninguna correlación podría deberse, en primer lugar, al bajo número de muestras disponibles para el análisis en la serie ERBITAX, y, también, a que estos pacientes no recibieron RT, al contrario que los pacientes con CECC-LA de la serie de QRT. También, la QT utilizada en esta serie no fue platino, sino el paclitaxel, un agente antimicrotúbulos cuyo mecanismo de acción no se basa en la generación de daño en el ADN, y en el que la influencia de los mecanismos de reparación del ADN es menos importante, lo que ha podido influir en que no se haya observado una asociación estadísticamente significativa.

5.5. Correlación de la eficacia de paclitaxel y cetuximab con la activación de la vía de STAT3 en la serie ERBITAX

5.5.1. Cambios metodológicos durante el desarrollo del trabajo.

Antes del análisis definitivo de la serie ERBITAX, se realizó un estudio exploratorio (anexo 3) en 22 muestras tumorales de estos pacientes, donde se evaluaron los niveles de expresión de ARNm de *STAT3*, *SPHK1*, *EGFR*, *AXL* y *YAP1*, así como el estado mutacional y de metilación del gen *PTPRT* y el estado mutacional de *TP53*.

Además, se analizó por IHQ la expresión de la proteína pSTAT3. Esta última se cuantificó mediante un Histoscore (HS) calculado con la siguiente fórmula $\sum (1 \times \% \text{ células } 1+) + (2 \times \% \text{ células } 2+) + (3 \times \% \text{ células } 3+)$ (385).

Se detectó una franca asociación entre la metilación de *PTPRT*, el HS de pSTAT3 y la eficacia del tratamiento, de forma que la respuesta y la supervivencia global en los pacientes con tumores con *PTPRT* no metilado e HS < 95 era significativamente mejor que la de los pacientes con *PTPRT* metilado e HS de pSTAT3 > 95. No observamos relación con el resto de parámetros, motivo por el que decidimos focalizarnos en la vía de regulación de STAT3 mediante *PTPRT*.

Basándonos en esos datos preliminares, y con la hipótesis de que los pacientes con tumores con sobreexpresión de pSTAT3 (proteína activada) tenían peores respuestas a paclitaxel y cetuximab que los que no la tenían, y que el estado de metilación de *PTPRT* tenía un impacto directo en la regulación de la activación de esta proteína, se decidió ampliar la serie, para dar robustez y confirmar los hallazgos del análisis exploratorio.

La mutación de *PTPRT* finalmente no fue considerada, ya que sólo fue detectada en 3 pacientes y habría sido necesaria una muestra muy numerosa para poder establecer conclusiones sobre el impacto de esta alteración en la eficacia al tratamiento.

Como se ha explicado previamente, de 52 pacientes tratados con el esquema ERBITAX, finalmente pudimos disponer de muestra histológica de 34 de ellos, los 22 que analizamos en el estudio preliminar y 12 pacientes más para el posterior análisis de ampliación.

Por cuestiones logísticas, la valoración de pSTAT3 por IHQ entre las 22 muestras del análisis preliminar y las 12 muestras de ampliación fue diferente: dos patólogos diferentes y diferentes anticuerpos para la proteína fosforilada (anexo 4).

Detectamos que los niveles de expresión de pSTAT3 en las dos series eran muy distintos, debido a las diferentes intensidades de la señal de tinción entre ambos análisis. Esto conllevaba que el valor del HS variara de forma significativa. Por este motivo, se cambió el método a una cuantificación relativa para cada serie, y se consideró como sobreexpresión la presencia de áreas de tinción de 2 y/o 3+, y la ausencia de la misma si no se detectaban, como se ha considerado en otros trabajos reportados (386).

5.5.2. Activación de la vía STAT3 en CECC y correlación con parámetros clínicos en la serie ERBITAX

Se observó metilación de *PTPRT* y sobreexpresión de pSTAT3 en un 41% y 67% de las muestras, respectivamente. Esto concuerda con los datos de la literatura comentados previamente y apoya el potencial papel de esta vía en la carcinogénesis y desarrollo de esta neoplasia.

The Human Protein Atlas, un programa sueco iniciado en 2003 con el propósito de mapear todas las proteínas humanas en células, tejidos y órganos (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000168610-STAT3/cell>) y el TCGA, describieron que la sobreexpresión del ARNm y de la proteína STAT3 era muy frecuente en la mayoría de neoplasias, siendo los tumores de cabeza y cuello de los que tienen mayor sobreexpresión de ambos. (Figuras 51 y 52 en anexo 6).

Teniendo en cuenta la idea de la implicación de la activación de la vía STAT3 en la carcinogénesis, en nuestra serie ERBITAx, no se detectó ninguna relación entre ésta y las diferentes características clínicas de los tumores (localización, estadio, ...). Tampoco hubo correlación con las características clínicas de los pacientes (*PS*, presencia de toxicidad cutánea, ...). Estos resultados concuerdan con los que describieron Peyser y col. en el análisis de una serie de 206 casos de CECC (213).

Como las muestras tumorales se habían obtenido al diagnóstico, antes de que los pacientes hubieran recibido RT y/o tratamiento sistémico, se evaluó la supervivencia desde el diagnóstico del cáncer en función de los parámetros de activación de STAT3, para valorar su papel pronóstico, pero considerando el impacto de los tratamientos realizados antes de la recurrencia o diseminación.

No encontramos diferencias significativas en ninguno de los tres parámetros evaluados, pero los resultados mostraron que la supervivencia desde el diagnóstico de los pacientes con sobreexpresión de pSTAT3 y niveles de expresión de ARNm de STAT3 altos fue superior a la de los pacientes sin estas características, dándoles valor como potenciales factores de mejor pronóstico, independientemente del tratamiento adyuvante recibido.

Si evaluamos sólo el tiempo a la recidiva, sin tener en cuenta el periodo posterior de exposición a ERBITAX, esta diferencia numérica se mantiene sólo con los niveles de

expresión de ARNm de STAT3, siendo de 21 meses en los pacientes con tumores con niveles altos y 13 meses en aquellos con niveles bajos. Esto iría en contra de la idea de que la activación de STAT3 es perjudicial para la evolución del paciente.

En el análisis de The Human Protein Atlas, los niveles de expresión de ARNm de STAT3 no fueron factor pronóstico de SG. No obstante, al analizar la supervivencia a los 5 años tomando punto de corte aquel que mostraba mayores diferencias entre los dos grupos, ésta fue del 54% en aquellos pacientes con niveles ARNm altos y del 44% en aquellos con niveles bajos (p , 018). (Figura 53 en anexo 6). Se ha postulado que STAT3 puede actuar como oncogén o como supresor tumoral, en función del tumor o el contexto molecular (por ejemplo, la deficiencia de PTEN) (387). Esto se corroboraría en datos en cáncer de mama y ovario donde los niveles altos de ARNm STAT3 también eran un factor de buen pronóstico (388,389).

Un metanálisis publicado en el año 2016 evaluó el papel de la proteína STAT3 como factor pronóstico en tumores sólidos. La correlación entre STAT3 y los tumores más avanzados se asoció con su estado fosforilado (activado) (390), y no con los niveles de proteína total.

5.5.3. Correlación entre los diferentes componentes de la vía de STAT3: metilación de *PTPRT*, expresión de pSTAT3 y niveles de expresión de ARNm de STAT3.

Lo primero a destacar en este punto es la correlación significativa entre la metilación de *PTPRT* y la expresión de pSTAT3, hecho que no se reproducía cuando se tenían en cuenta los niveles de expresión de ARNm de STAT3.

Este hecho se puede explicar porque la correlación entre el ARNm y la proteína fosforilada depende de varios factores, tanto biológicos como técnicos. A nivel biológico, la regulación de la expresión génica se caracteriza por múltiples mecanismos alternativos en la transcripción, traducción, y degradación. En consecuencia, los ARNm más abundantes tienden a ser más cortos y se traducen de forma más eficiente, pudiendo existir diferentes isoformas de la proteína que pueden tener origen desde el mismo ARNm, no observando así correlación entre ambas valoraciones. En realidad, existen datos discordantes en la literatura acerca de esta correlación (213,391). Además, debemos tener en cuenta que el ARNm de STAT3 se traduce en la proteína STAT3 total, y sólo parte de ésta podría ser activada, o lo que es lo mismo, fosforilada

por diferentes mecanismos y en diferentes aminoácidos, dando lugar a diferentes formas de proteínas STAT3, por lo que pueden correlacionarse o no con los niveles de expresión del gen por ARNm. Evidentemente, se tiene que suponer que cuanto más ARNm de STAT3 se detecte, mayor cantidad de proteína estará disponible para ser fosforilada, pero esto dependerá de muchas otras vías. Para valorar esta correlación con más exactitud, deberíamos conocer la expresión de proteína fosforilada y no fosforilada (proteína total), pudiendo así establecer una correlación directa con los niveles de ARNm totales. (392).

De todas formas, tampoco podemos descartar que haya una correlación y que no se haya podido visualizar por el escaso número de pacientes, ya que sólo pudimos analizar los niveles de expresión de ARNm en 21 de las muestras.

5.5.4. Condicionamientos del uso de muestras basales

Una de las características de este estudio, es que todas las muestras disponibles se obtuvieron a nivel basal, es decir, se obtuvieron antes de que el paciente hubiera recibido ningún tratamiento.

Si tenemos en cuenta los tratamientos previos que recibieron los pacientes antes de paclitaxel y cetuximab, tan sólo 2 pacientes habían sido sometidos a cirugía previa como única modalidad terapéutica, 8 pacientes a RT, sola o en combinación con cirugía, y el resto habían estado expuestos a algún tipo de tratamiento sistémico.

La ausencia de disponibilidad de biopsia al inicio y a la progresión de ERBITAX es debida, en muchas ocasiones, a que se prioriza la seguridad y el inicio urgente del tratamiento a la disponibilidad de este material. Este hecho puede haber influido en los resultados, ya que desconocemos si la metilación de *PTPRT* o la expresión de pSTAT3 pueden haber cambiado tras la exposición a esos factores.

Se pueden inducir cambios en la metilación de *PTPRT* y otros genes mediante el tratamiento con inhibidores de la ADN metiltransferasa o de la histona deacetilasa. De hecho, estos fármacos se están utilizando como tratamiento de diferentes neoplasias, fundamentalmente hematológicas, pero no hay evidencia clara de que la exposición a QT o RT pueda hacer que este estado de metilación varíe (393). Tampoco existe una evidencia de cambios de los niveles expresión de pSTAT3 durante la QT o RT.

Además, diferentes trabajos han demostrado una homogeneidad epigenética entre el tumor primario y las metástasis (394, 395), por lo que podríamos pensar que la metilación de *PTPRT*, como causa de activación de la vía STAT3, no deba de variar significativamente de la muestra basal al desarrollo de la recurrencia o metástasis.

Por otro lado, el tratamiento realizado por estos pacientes antes de la recidiva es bastante homogéneo, por lo que, si existe un impacto de éste en la activación de la vía STAT3, podría ser similar en todos ellos. Un estudio en pacientes con CPNCP mostró que el perfil epigenético de los mismos indicaba qué pacientes tenían más probabilidades de beneficiarse de la IT con nivolumab o pembrolizumab (396). También se detectó que el estado de metilación de FOXP1 se asociaba con biomarcadores predictivos validados de beneficio clínico con el bloqueo de PD-1 como la expresión de PD-L1 y la carga mutacional. En este estudio, las muestras utilizadas eran basales, como en nuestro caso, y la mayoría de los pacientes estaban tratados con IT en segunda línea, tras una primera línea de QT.

Por estos motivos, asumimos que el estado de activación de la vía de STAT3 en la biopsia basal, previa a cualquier tratamiento del CECC, no varía significativamente antes de iniciar la combinación con ERBITAX, o, al menos, varía de forma homogénea, presentando el mismo efecto como factor confusor en el análisis.

Somos conscientes de esta limitación, pero, como se explicado con anterioridad, la obtención de muestras es una de las grandes limitaciones que tenemos en la investigación traslacional en estos tumores.

Se están elaborando nuevas líneas de investigación futuras en las que no se obviará este hecho y está planificado obtener muestra tumoral antes de iniciar el tratamiento y a la progresión, o tras unos meses de recibirlo, si no ha existido progresión, para valorar estos cambios de una forma más robusta.

5.5.5. Correlación entre la activación de la vía de STAT3 y la eficacia del tratamiento en la serie ERBITAX

Observamos una clara correlación de la metilación de *PTPRT* con la respuesta al tratamiento, con un 60 % de respuesta en los pacientes con tumores no metilados y sólo un 21% en los pacientes con tumores metilados. Aunque las diferencias eran marginalmente significativas ($p = 0,06$), teniendo en cuenta el reducido número de pacientes y la franca diferencia numérica, consideramos la correlación como si lo fuera.

En cuanto a la sobreexpresión de pSTAT3, también se observó que los pacientes que tenían tumores con áreas de intensidad 2 y/o 3+ presentaban peor respuesta al esquema ERBITAX que los pacientes con tumores sin expresión, pero sin observar diferencias estadísticamente significativas (36 vs 54%, p 0,534).

Aunque ya se ha comentado que los niveles de expresión de ARNm de STAT3 no se correlacionaban con los otros parámetros (metilación de *PTPRT* y niveles de proteína fosforilada), también se observó el mismo patrón de eficacia que en los anteriores, de forma que los pacientes con tumores con niveles altos de ARNm de STAT3 respondían menos a paclitaxel/cetuximab que los que tenían niveles bajos (43 vs 64%, p 0,094).

Ya se ha comentado previamente que los homodímeros de pSTAT3 se traslocan al núcleo y se unen a secuencias de las regiones promotoras de sus genes diana, conllevando su transcripción y posterior traducción en proteínas, que inducen la proliferación y supervivencia celular, por lo que nuestros resultados tienen una plausibilidad biológica.

Si agrupamos las dos variables de la vía STAT3 que se correlacionaban en nuestro análisis, los pacientes con tumores con metilación de *PTPRT* y sobreexpresión de pSTAT3 respondían mucho menos al tratamiento (23%) que los que tenían tumores con ausencia de metilación de *PTPRT* y de sobreexpresión pSTAT3 (60%), pero las diferencias obtenidas no alcanzaron la significación estadística, seguramente porque los subgrupos tienen muy pocos pacientes. La metilación del promotor de *PTPRT* provoca una inactivación del gen. Los PTPRs inducen la desfosforilación de STAT3 (inactivación), por lo que la metilación de *PTPRT* conllevará una mayor sobreexpresión de pSTAT3 y una mayor activación de la vía.

Los resultados obtenidos nos indican que la activación de la vía STAT3 mediante la metilación del promotor de uno de sus genes reguladores (*PTPRT*), podría ser un mecanismo de resistencia a paclitaxel y cetuximab. Esto nos plantea la hipótesis de que la inactivación de esta vía, mediante tratamientos específicos dirigidos, aumentaría el número de pacientes que podrían beneficiarse de este esquema de tratamiento tan activo y tan bien tolerado, teniendo en cuenta que un alto porcentaje de estos casos presentan activación de la vía.

Cuando se analizó la SG y la SLP en función de los parámetros previamente descritos, se observó una diferencia numérica en ambos parámetros de supervivencia a favor de los pacientes con tumores con *PTPRT* no metilado y ausencia de sobreexpresión de pSTAT3, pero no se alcanzó la significación estadística, probablemente por el reducido número de pacientes.

Existe una clara correlación entre la TR, la SG y la SLP. Esto apoya la validez de los resultados obtenidos y su ausencia de influencia por el azar o por otras variables como los tratamientos posteriores al esquema que estamos evaluando. Además, hemos de destacar la plausibilidad biológica, ya que los datos de eficacia a paclitaxel y cetuximab concuerdan con la influencia biológica descrita en la bibliografía de la vía STAT3.

También se quiso analizar el estado de la vía en los tumores de los pacientes LS, para intentar tener más información de la importancia de la vía en la eficacia al tratamiento. Los pacientes con supervivencia mayor a 5 años presentaban tumores con ausencia de hipermetilación del promotor *PTPRT* y sobreexpresión pSTAT3, es decir, que podríamos deducir que la activación de la vía de STAT3 se producía por otra causa distinta a la regulación por *PTPRT* en estos casos.

Después de analizar todos estos resultados, podemos concluir que la activación de la vía de STAT3 por ausencia de la regulación negativa de *PTPRT* a consecuencia de su metilación podría conferir resistencia a ERBITAX, dando lugar a una peor respuesta al tratamiento, asociada en esos casos a una peor SG.

5.5.6. Activación de la vía STAT3 y estado del VPH en la serie ERBITAX

Pese al interés de estudiar esta relación, desafortunadamente, sólo 2 pacientes de la serie presentaron un COF relacionado con VPH, por lo que no se pudieron extraer conclusiones con una base robusta.

Según se ha descrito en la literatura, no se han observado diferencias en la TR en función del estado de *PTPRT*, y la activación de la vía de STAT3 es superior en los COF no relacionados con el VPH (290, 204)

Curiosamente, los dos pacientes con tumores relacionados con el HPV tenían *PTPRT* metilado y sobreexpresión de pSTAT3. Esto puede deberse a que los dos tenían

una importante exposición al hábito tabáquico. Aunque en nuestra serie no hemos encontrado una relación significativa entre la activación de la vía STAT3 y el consumo de este carcinógeno, hay evidencias de que existe, incluso parece ser uno de los mecanismos más precoces de carcinogénesis, en estos tipos de tumor (213,394). Sólo un 11,8% de nuestros pacientes no habían estado expuestos a este tóxico, y este es el hecho por el que puede ser que no se haya reflejado en esta serie.

El pronóstico de estos dos pacientes fue radicalmente distinto. Aunque ya se ha comentado anteriormente que, en comparación con la población general, parece que el pronóstico de los tumores VPH es mejor, no podemos sacar ninguna conclusión en nuestra serie respecto al valor predictivo de la infección por VPH en relación al esquema de tratamiento con paclitaxel y cetuximab, en general, ni a la activación de la vía de STAT3, en particular.

5.6. Plausibilidad y correlación entre parámetros de eficacia en ambas series

Para finalizar la discusión, sería importante destacar dos aspectos que apoyan la fiabilidad de los resultados obtenidos.

En primer lugar, que existe una plausibilidad biológica en ambas series. Las correlaciones obtenidas tienen un razonamiento biológico claro que las justifica, y mostraron una tendencia con lo esperado. Sin embargo, el reducido tamaño muestral podría haber influido en que no se encontraran relaciones robustas con claro sentido biológico. Tampoco parece que las variables clínicas fueran un factor de confusión.

En segundo lugar, la correlación entre todos los parámetros de eficacia (TR, SLP y SG) en ambas poblaciones avala el interés de los resultados y disminuye la probabilidad de que se produjeran por el azar.

7. LIMITACIONES Y FORTALEZAS

Limitaciones

- Los dos estudios son retrospectivos.
- El porcentaje de pacientes en ambas poblaciones con muestra histológica disponible y evaluable fue menor al esperado (44 y 65% respectivamente). Esto hace que la potencia estadística de ambos análisis se haya visto reducida.
- Las características de población con alto riesgo y el uso de un tratamiento diferente al estándar en la serie de QRT, dificulta la comparación con las series publicadas en la literatura.
- Las muestras utilizadas en la serie ERBITAX son basales y no podemos descartar el efecto de los tratamientos recibidos previamente a la recidiva en los parámetros de activación de la vía STAT3.
- La evaluación de la IHQ de pSTAT3 se ha realizado por dos patólogos diferentes y con dos anticuerpos diferentes, por lo que se tuvo que cambiar la metodología de análisis planificada.
- No se ha determinado la proteína total (fosforilada más no fosforilada) de STAT3, por lo que la correlación con los niveles de expresión de ARNm de STAT3 no es valorable con suficiente robustez.

Fortalezas

- Se trata de dos poblaciones no seleccionadas, con datos extraídos de nuestra práctica clínica habitual, por lo que los resultados son totalmente extrapolables a poblaciones reales. A pesar de ello, los resultados clínicos de la serie ERBITAX coinciden con los reportados en el estudio clínico de fase 2 publicado de la combinación evaluada.
- No hay experiencia en la evaluación de factores biológicos predictivos de respuesta a la combinación de paclitaxel y cetuximab.
- La mediana de seguimiento de ambas series es larga, lo que permite tener resultados clínicos sólidos, así como detectar y valorar a los LS.
- En el momento en el que se realizó el tratamiento de las dos poblaciones analizadas en el presente del estudio, no existía la estructura ni legislación actual para la recogida de muestras para el estudio de biomarcadores, ni tampoco biobancos ni sistemas de calidad en el manejo de las muestras. Pese a esto, hemos logrado analizar a nivel molecular un gran número de las muestras tumorales de ambas series.
- Los resultados obtenidos en las dos series muestran plausibilidad biológica
- En la serie ERBITAX, los resultados de expresión de la proteína pSTAT3 en relación con los parámetros clínicos y moleculares, se reprodujeron tanto en el estudio preliminar como en las muestras analizadas posteriormente como ampliación, a pesar de que fueron evaluados por dos patólogos diferentes y con anticuerpos diferentes.
- A pesar de que no era uno de los objetivos principales de la tesis, se ha obtenido información epidemiológica muy importante sobre la incidencia del CECC relacionado con el VPH en nuestra población.

8. CONCLUSIONES

En referencia al objetivo principal de la tesis:

- En nuestro primer trabajo observamos que los niveles de expresión de ARNm de 53BP1 se correlacionan con la eficacia de la RT en combinación con carboplatino en el tratamiento del CECC-LA, y que los niveles de expresión de ARNm de BRCA1 y RAP80 parecen reforzar su valor predictivo. En nuestro segundo trabajo, la activación de la vía STAT3 medida por la sobreexpresión de pSTAT3 y mediada por la metilación del promotor de *PTPRT* parece ser predictora de resistencia a paclitaxel y cetuximab en CECC R/M.

En referencia a los objetivos secundarios:

- Los niveles bajos de ARNm de 53BP1 predicen un mayor porcentaje de RC a la QRT, destacando su utilidad como potencial biomarcador predictivo de beneficio en pacientes con CECC. Este hecho es más evidente cuando coexisten con niveles altos de ARNm de BRCA1 o RAP80.
- La hipermetilación del promotor de *PTPRT* se correlaciona significativamente con la expresión de pSTAT3 y, conlleva una menor TR a paclitaxel y cetuximab. No encontramos asociación de pSTAT3 con los niveles de expresión de ARNm de STAT3.
- No se identifican factores clínicos pronósticos ni predictivos de respuesta a la QRT en nuestra serie de pacientes con CECC-LA. Sin embargo, un *PS de 2*, la exposición previa a cetuximab y/o taxanos y la ausencia de rash acneiforme se correlacionan con una menor eficacia del esquema paclitaxel y cetuximab en los pacientes con CECC R/M.

9. LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS

Debido a los resultados obtenidos en ambos trabajos y a los biomarcadores de respuesta a diferentes tratamientos del cáncer de cabeza y cuello hallados, hemos decidido continuar nuestra investigación en este campo y diseñado un proyecto en el que se integran todos ellos para evaluar su papel como factores predictivos de respuesta a la IT.

Existe una necesidad de encontrar biomarcadores de respuesta a los inhibidores del punto de control inmunitario (ICI) en CECC. Hay evidencias de la relación entre el daño del ADN y la inestabilidad genómica, con la respuesta a la IT, así como de la implicación de la vía de STAT3 en la evasión del sistema inmune por parte del tumor. En este sentido, uno de los mecanismos de activación de STAT3 es el estado de metilación del gen *PTPRT*.

Nuestro objetivo principal es describir la inmunogenicidad en CECC, en base a su inmunofenotipo histopatológico, así como al papel de STAT3, *PTPRT* y un panel de genes relacionados con la reparación del ADN y, en consecuencia, encontrar los mejores pacientes candidatos a recibir IT.

Para abordar este objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Colección de una cohorte de CECC, caracterización histopatológica y generación de base de datos clínica:

1.1. Obtención prospectiva de tejido tumoral proveniente de cortes parafinados (FFPE) antes y en la progresión a la IT.

1.2. Extracción prospectiva de muestras de sangre antes, a lo largo del tratamiento (en diferentes puntos) y en la progresión a la IT.

2. Análisis de los niveles de expresión y activación de STAT3 en las muestras de tejido tumoral descritas en el objetivo 1.1 y sus correspondientes muestras al diagnóstico, obtenidas retrospectivamente. Pretendemos identificar su efecto en la respuesta a la IT así como su asociación con el tratamiento previo con QT.

3. Estudio de mutaciones y del estado de metilación del gen *PTPRT* en tejido tumoral y muestras de sangre, para su asociación basal con el estado de STAT3, así como monitorizar su relación con la aparición de resistencia a lo largo del tratamiento con IT.
4. Estudio de mutaciones en genes relacionados con la reparación del ADN en muestras tumorales antes y en la progresión a la IT para determinar su efecto y así definir una firma mutacional de respuesta/resistencia a la IT.
5. Generación de modelos *ex vivo* a partir de biopsias tumorales frescas, obtenidas prospectivamente, para estudiar el inmunofenotipo y evaluar las sinergias entre los inhibidores de STAT3 y la IT de acuerdo con las alteraciones moleculares previamente determinadas
6. Descripción de biomarcadores de inmunofenotipo del CECC y publicación de las recomendaciones para la selección de pacientes para recibir tratamiento con ICIs.

Para ello, utilizaremos la siguiente metodología:

1. Colección de una cohorte de CECC, caracterización histopatológica y generación de base de datos clínica.

Se incluirán 15 pacientes con CECC tratados tanto con ICI en monoterapia como en combinación con QT (platino/ 5-fluorouracilo), de acuerdo con la nueva práctica clínica en CECC R/M. Por una parte, se recogerán prospectivamente, durante 2 años, con un seguimiento mínimo de 1.5 años, muestras de tumor antes del inicio y en la progresión a la IT. Además, muestras de sangre de estos mismos pacientes serán extraídas en distintos puntos del tratamiento: antes del inicio de la IT durante el tratamiento (1, 3, 6, y 18 meses) y a la progresión (en caso de no progresar, se considerará la de 18 meses como última muestra). Es importante destacar que las muestras pareadas en el momento del diagnóstico se recogerán retrospectivamente. Paralelamente, se documentará información histopatológica y clínica, así como datos de eficacia del tratamiento (respuesta objetiva, beneficio clínico, tiempo de tratamiento, SLP y SG). Las muestras biológicas provendrán del excedente del diagnóstico y todos

los pacientes serán informados y firmarán su consentimiento. La caracterización histopatológica de inmunofenotipo se realizará mediante el análisis de la expresión de PD-L1: *tumor proportion score*, *TPS*, o porcentaje de células tumorales con sobreexpresión de PD-L1; y *combined proportion score*, *CPS*, o *ratio* entre número de células (tumorales, linfocitos y macrófagos) PD-L1 positivas y el número de células tumorales totales multiplicado por 100, así como linfocitos infiltrantes en tumor (TILs), como los linfocitos CD8+ y CD4+, que será evaluados por técnicas de IHQ. La intensidad del marcaje de los TILs se evaluará y se clasificará en cuatro categorías (mínima, leve, moderada e intensa) en secciones representativas de cortes parafinados de CECC.

2. Análisis de los niveles de expresión y activación de STAT3 en muestras de tejido tumoral antes y en la progresión a la IT.

Por una parte, se analizarán los niveles transcripcionales de STAT3 mediante la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). Brevemente, el tejido tumoral proveniente de FFPE será digerido usando proteinasa K y mediante unos kits comerciales se aislará el ARN siguiendo el protocolo del fabricante. A continuación, el ARN será retrotranscrito a ADNc a través de una reacción de retrotranscripción, mediante hexámeros aleatorios y la enzima retrotranscriptasa MMLV (Thermofisher), entre otros reactivos que favorecen la reacción. Una vez obtenido el ADNc, se usarán ensayos de expresión TaqMan (Thermofisher) dirigidos contra una región específica de STAT3 para el análisis mediante la técnica qRT-PCR (ABI Prism 7900; Thermofisher), calculando los niveles de expresión relativos de STAT3 respecto a un gen control (beta-actina) en cada una de las muestras tumorales.

Asimismo, la expresión proteica de STAT3 será analizada mediante anticuerpos específicos contra la forma total de la proteína, así como contra su forma fosforilada pSTAT3 (activada) por técnicas de IHQ.

3. Análisis mutacional y de metilación y del gen *PTPRT* en ADN tumoral circulante (ADNtc) en sangre y en ADN aislado de tejido tumoral a lo largo del tratamiento con inmunoterapia.

Para abordar este objetivo, se recogerán muestras de sangre en tubos de EDTA

de 10 ml y, después de la centrifugación, se aislará la fase de plasma para proceder a extraer el ADN tumoral circulante (ADNtc). Para el tejido tumoral parafinado se realizará una digestión previa con proteinasa K. En ambos casos, la extracción de ADN se realizará mediante kits comerciales, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En ambos tipos de muestras, la metilación de *PTPRT* se analizará por pirosecuenciación. Brevemente, el ADN se someterá a una reacción de conversión de bisulfito y se amplificará utilizando cebadores específicos de regiones CpGs del gen *PTPRT* para el posterior análisis por pirosecuenciación.

Además, el estado mutacional del gen *PTPRT* se determinará por secuenciación directa por tecnología Sanger. Brevemente, la secuenciación se realizará mediante amplificación por amplicones de tamaño de 150 bp que cubrirán las zonas “hotspots” de *PTPRT*. Una vez analizadas las muestras, se procederá al análisis bioinformático de los resultados obtenidos, usando un software específico (Ingenuity program).

4. Identificación de alteraciones mutacionales de genes relacionados con la reparación del ADN en muestras tumorales antes y a la progresión del tratamiento con inmunoterapia para definir una firma mutacional de respuesta/resistencia a la terapia.

El ADN extraído del tejido también se procesará para su uso en el estudio de un panel comercial (OncoPrint, ThermoFisher) de mutaciones en genes de reparación del ADN, que se analizará utilizando la plataforma de última generación Ion Torrent (ThermoFisher). El análisis de datos se realizará con el apoyo de la plataforma HGBC, unidad de bioinformática del IGTP.

5. Generación de modelos *ex vivo* a partir de biopsias tumorales obtenidas prospectivamente para estudiar el inmunofenotipo y evaluar las sinergias entre el tratamiento con inhibidores de STAT3 e IT de acuerdo con las alteraciones moleculares previamente determinadas.

Después de la resección del tumor, una parte del tejido se enviará al Servicio de Anatomía Patológica para ser evaluada y derivada al Biobanco del IGTP, para ser codificada y finalmente enviada al laboratorio B-ARGO para su procesamiento. Allí, se generarán los explantes de tumores (PDOTS; patient-derived organotypic tumor spheroids) siguiendo el protocolo descrito por Jenkins RW, et al. (PMID: 29101162), y utilizando la tecnología descrita por Aref AR, et al. (PMID: 30183789). Brevemente, el tejido tumoral se disgrega en una placa de cultivo con un medio con alto contenido de

glucosa y colagenasa tipo IV. Una vez disgregado parcialmente, se aíslan los PDOTS con un diámetro aproximado de 40µm. A continuación, una parte de ellos se incluye en una matriz extracelular (colágeno, hidrogel o matrigel) y se inyecta en una cámara microfluídica 3D (chip de cultivo 3D DAX1 de AIM Biotech). Después de la incubación, estas cámaras nos van a permitir realizar experimentos de test de drogas con inhibidores de STAT3, agentes anti-PD-1 y combinaciones de ellos durante 3-6 días. El efecto de dichos tratamientos a nivel de viabilidad y muerte celular será evaluado, mediante la tinción con naranja de acridina y yoduro de propidio y visualizado por inmunofluorescencia, y por otra mediante el análisis de perfiles de citoquinas secretadas al medio.

Otra parte de los PDOTS se criopreservan y el resto se usará para estudiar el inmunofenotipo mediante citometría de flujo utilizando un citómetro LSRFortessa SORP (BD Bioscience). Para ello, se analizará la proporción de las diferentes poblaciones de células inmunes infiltradas en el tumor: tinción con anticuerpos para detectar células B (CD19 +), células T (CD4 +, CD8 +) y células del linaje mieloide (granulocitos CD15 +, monocitos CD14 + y células dendríticas). Además, también se analizarán los marcadores de agotamiento de células T (PD-1, CTLA-4, TIM3, PD-L1 y PD-L2).

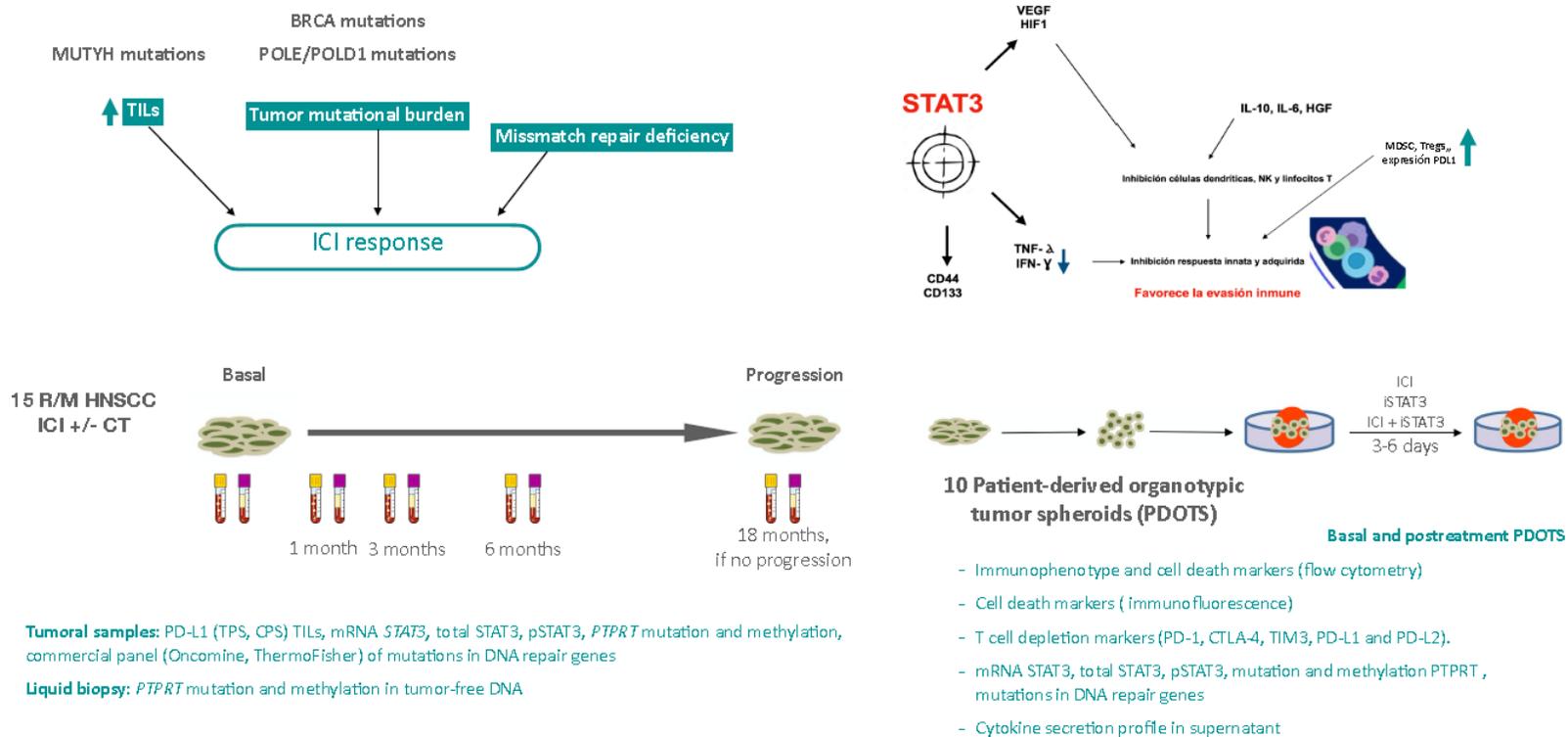
Además, en las muestras de origen de los PDOTS, se evaluará el estado de activación de STAT3, el estado de metilación y mutacional de PTPRT, así como el estado mutacional de los genes reparadores del ADN, seleccionados en el objetivo 4. Esta caracterización va a permitir definir perfiles moleculares y asociarlos a la respuesta de los PDTOS a los diferentes tratamientos (inhibidores de STAT3 e IT). Se esperan generar hasta 10 modelos *ex vivo* de CECC.

6. Descripción del inmunofenotipo del CECC y publicación de las recomendaciones para la selección de pacientes para recibir tratamiento con ICIs. Los resultados de este estudio no condicionarán el tratamiento de los pacientes participantes. Su aplicabilidad en futuros estudios prospectivos se evaluaría de acuerdo con los resultados obtenidos.

A continuación, resumimos el proyecto en la figura siguiente (Figura 33).

Figura 33. Proyecto de investigación futuro

Future project: Role of DNA repair and STAT3 pathways in resistance to immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma



11. BIBLIOGRAFÍA

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov; 68(6):394-424.
2. Sociedad de Oncología Médica. Cifras de Cáncer en España 2018. *Seom* 2018; 24. https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Las_Cifras_del_cancer_en_Espana2018.pdf .
3. Pfister DG, Spencer S, Brizel DM, Burtness B, Busse PM, Caudell JJ, et al. Head and Neck Cancers, Version 1.2015. *J Natl Compr Canc Netw.* 2015 Jul; 13(7):847-55; quiz 856
4. Chow LQM. Head and Neck Cancer. *N Engl J Med.* 2020 Jan 2; 382(1):60-72.
5. Vineis P, Alavanja M, Buffler P, Fontham E, Franceschi S, Gao YT, et al. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Jan 21; 96(2):99-106.
6. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. 2004;83.
7. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Alcohol Consumption and Ethyl Carbamate. 2010;96.
8. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: A systemic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(2):467–75.
9. Castellsagué X, Alemany L, Quer M, Halec G, Quirós B, Tous S, et al. HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *J Natl Cancer Inst.* 2016;108(6):1–12
10. Martel M, Alemany L, Taberna M, Mena M, Tous S, Bagué S, et al. The role of HPV on the risk of second primary neoplasia in patients with oropharyngeal carcinoma. *Oral Oncol.* 2017;64:37–43.
11. Taberna M, Mena M, Pavón MA, Alemany L, Gillison ML, Mesía R. Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer. *Ann Oncol.* 2017;28(10):2386–98.
12. Gillison ML, Alemany L, Snijders PJF, Chaturvedi A, Steinberg BM, Schwartz S, et al. Human papillomavirus and diseases of the upper airway: Head and neck cancer and respiratory papillomatosis. *Vaccine.* 2012 Nov 20; 30 Suppl 5: F34-54.

13. Mehanna H, Robinson M, Hartley A, Kong A, Foran B, Fulton-Lieuw T, et al. Radiotherapy plus cisplatin or cetuximab in low-risk human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (De-ESCALaTE HPV): an open-label randomised controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2019;393(10166):51–60.
14. Gillison ML, Trotti AM, Harris J, Eisbruch A, Harari PM, Adelstein DJ, et al. Radiotherapy plus cetuximab or cisplatin in human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (NRG Oncology RTOG 1016): a randomised, multicentre, non-inferiority trial. *Lancet*. 2019 Jan 5; 393(10166):40-50.
15. Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2001 Dec 27; 345(26):1890-900.
16. Brockstein B, Haraf DJ, Rademaker AW, Kies MS, Stenson KM, Rosen F, et al. Patterns of failure, prognostic factors and survival in locoregionally advanced head and neck cancer treated with concomitant chemoradiotherapy: A 9-year, 337-patient, multi-institutional experience. *Ann Oncol*. 2004 Aug; 15(8):1179-86
17. Argiris A, Harrington KJ, Tahara M, Schulten J, Chomette P, Castro AF, et al. Evidence-based treatment options in recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Front Oncol*. 2017 May 9; 7:72.
18. Lefebvre JL. Current clinical outcomes demand new treatment options for SCCHN. *Ann Oncol*. 2005; 16 Suppl 6:vi7-vi12
19. Budach V, Stuschke M, Budach W, Baumann M, Geismar D, Grabenbauer G, et al. Hyperfractionated accelerated chemoradiation with concurrent fluorouracil-mitomycin is more effective than dose-escalated hyperfractionated accelerated radiation therapy alone in locally advanced head and neck cancer: Final results of the Radiotherapy cooperative clinical trials group of the German Cancer Society 95-06 Prospective Randomized Trial. *J Clin Oncol*. 2005 Feb 20;23(6):1125-35.
20. Kuhnt T, Schreiber A, Pirnasch A, Hautmann MG, Hass P, Sieker FP, et al. Hyperfractionated accelerated radiation therapy plus cetuximab plus cisplatin chemotherapy in locally advanced inoperable squamous cell carcinoma of the head and

neck: Final 5-year results of a phase II study. *Strahlenther Onkol.* 2017 Sep; 193 (9):733-741

21. Okami K. Clinical features and treatment strategy for HPV-related oropharyngeal cancer. *Int J Clin Oncol.* 2016 Oct; 21(5):827-835.

22. Klein JD, Grandis JR..The molecular pathogenesis of head and neck cancer. *Cancer Biol Ther* 2010 Jan; 9 (1):1-7.

23. Park BJ, Chiosea SI, Grandis JR. Molecular changes in the multistage pathogenesis of head and neck cancer. *Cancer Biomark.* 2010; 9 (1-6):325-39.

24. Rampias T, Sasaki C, Psyrri A. Molecular mechanisms of HPV induced carcinogenesis in head and neck. *Oral Oncol.* 2014 May; 50 (5):356-63.

25. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature.* 2015 Jan 29; 517 (7536):576-82.

26. Zhao R, Choi BY, Lee MH, Bode AM, Dong Z. Implications of Genetic and Epigenetic Alterations of CDKN2A (p16(INK4a)) in Cancer.*EBioMedicine.* 2016 Jun; 8: 30-39

27. Castilho RM, Squarize CH, Almeida LO. Epigenetic Modifications and Head and Neck Cancer: Implications for Tumor Progression and Resistance to Therapy. *Int J Mol Sci.* 2017 Jul 12; 18 (7):1506.

28. Lubov J, Maschietto M, Ibrahim I, Mlynarek A, Hier M, Kowalski LP, et al. Meta-analysis of microRNAs expression in head and neck cancer: uncovering association with outcome and mechanisms. *Oncotarget.* 2017 Jul 13; 8 (33):55511-55524.

29. Nowicka Z, Stawiski K, Tomasik B, Fendler W. Extracellular miRNAs as Biomarkers of Head and Neck Cancer Progression and Metastasis. *Int J Mol Sci.* 2019 Sep 27; 20(19):4799.

30. Arantes LM, Laus AC, Melendez ME, de Carvalho AC, Sorroche BP, De Marchi PR,

et al. MiR-21 as prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma patients undergoing an organ preservation protocol. *Oncotarget*. 2017 Feb 7; 8(6):9911-9921.

31. Alsaahafi E, Begg K, Amelio I, Raulf N, Lucarelli P, Sauter T, et al. Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges. *Cell Death Dis*. 2019 Jul 15; 10 (8):540.

32. Bredell MG, Ernst J, El-Kochairi I, Dahlem Y, Ikenberg K, Schumann DM. Current relevance of hypoxia in head and neck cancer. *Oncotarget*. 2016 Aug 2;7(31): 50781-50804.

33. Orlandi E, Iacovelli NA, Tombolini V, Rancati T, Polimeni A, De Cecco L, et al. Potential role of microbiome in oncogenesis, outcome prediction and therapeutic targeting for head and neck cancer. *Oral Oncol*. 2019 Dec; 99:104453

34. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013 Jul 25; 39(1):1-10.

35. Peltanova B, Raudenska M, Masarik M. Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. *Mol Cancer* 2019 Mar 30; 18(1):63.

36. Baskar R, Dai J, Wenlong N, Yeo R, Yeoh KW. Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Front Mol Biosci*. 2014 Nov 17; 1:24.

37. Hutchinson MND, Mierzwa M, D'Silva NJ. Radiation resistance in head and neck squamous cell carcinoma: dire need for an appropriate sensitizer. *Oncogene*. 2020 Apr; 39 (18):3638-3649.

38. Heeran AB, Berrigan HP, O'Sullivan J. The Radiation-Induced Bystander Effect (RIBE) and its Connections with the Hallmarks of Cancer. *Radiat Res*. 2019 Dec; 192 (6):668-679.

39. McLaughlin M, Patin EC, Pedersen M, Wilkins A, Dillon MT, Melcher AA, Harrington KJ. Inflammatory microenvironment remodelling by tumour cells after radiotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2020 Apr; 20(4):203-217.
40. Johnstone TC, Park GY, Lippard SJ. Understanding and improving platinum anticancer drugs-phenanthriplatin. *Anticancer Res*. 2014 Jan; 34 (1):471-6.
41. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*. 2012 Apr 12; 31 (15):1869-83.
42. Rowinsky EK. The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. *Annu Rev Med*. 1997; 48:353-74.
43. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*. 2003 May; 3 (5):330-8.
44. Takimoto CH. New Antifolates: Pharmacology and Clinical Applications. *Oncologist*. 1996;1(1 & 2):68-81.
45. Mehra R, Cohen RB, Burtness BA. The role of cetuximab for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2008;6(10):742–50.
46. García-Foncillas J, Sunakawa Y, Aderka D, Wainberg Z, Ronga P, Witzler P, et al. Distinguishing Features of Cetuximab and Panitumumab in Colorectal Cancer and Other Solid Tumors. *Front Oncol*. 2019 Sep 20; 9: 849.
47. Melero I, Berman DM, Aznar MA, Korman AJ, Pérez Gracia JL, Haanen J. Evolving synergistic combinations of targeted immunotherapies to combat cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015 Aug; 15 (8):457-72.
48. Adelstein DJ, Li Y, Adams GL, Wagner H, Kish JA, Ensley JF, et al. An intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer.

J Clin Oncol. 2003; 21(1):92–8.

49. Taneja C, Allen H, Koness RJ, Radie-Keane K, Wanebo HJ. Changing patterns of failure of head and neck cancer. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2002 Mar; 128 (3):324-7.

50. Kramer S, Gelber RD, Snow JB, Marcial VA, Lowry LD, Davis LW, et al Combined radiation therapy and surgery in the management of advanced head and neck cancer: final report of study 73-03 of the Radiation Therapy Oncology Group. Head Neck Surg. 1987 Sep-Oct; 10 (1):19-30

51. Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designé L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. Lancet. 2000 Mar 18; 355 (9208):949-55.

52. Guan J, Li Q, Zhang Y, Xiao N, Chen M, Zhang Y, et al. A meta-analysis comparing cisplatin-based to carboplatin-based chemotherapy in moderate to advanced squamous cell carcinoma of head and neck (SCCHN). Oncotarget. 2016 Feb 9; 7 (6):7110-9.

53. Dutta S, Ghorai S, Choudhury KB, Majumder A. Radical treatment of locally advanced head and neck cancer with concurrent chemo radiation-cisplatin versus carboplatin: A randomized comparative phase III trial. Clin Cancer Investig J 2013; 2:122-127

54. Rockwell S, Dobrucki IT, Kim EY, Marrison ST, Vu VT. Hypoxia and radiation therapy: past history, ongoing research, and future promise. Curr Mol Med. 2009 May; 9 (4):442-58

55. Ow TJ, Pitts CE, Kabarriti R, Garg MK. Effective Biomarkers and Radiation Treatment in Head and Neck Cancer. Arch Pathol Lab Med. 2015 Nov; 139 (11):1379-88.

56. Dittmann K, Mayer C, Czemplin S, Huber SM, Rodemann HP. New roles for nuclear EGFR in regulating the stability and translation of mRNAs associated with VEGF

signaling. PLoS One. 2017 Dec 18; 12(12): e0189087.

57. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med. 2006 Feb 9; 354(6):567-78.

58. Bernier J, Dommenege C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefèbvre JL, Greiner RH, et al. European Organization for Research and Treatment of Cancer Trial 22931. Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. N Engl J Med. 2004 May 6; 350(19):1945-52.

59. Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, et al; Radiation Therapy Oncology Group 9501/Intergroup. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med. 2004 May 6; 350 (19):1937-44.

60. Bernier J, Cooper JS, Pajak TF, van Glabbeke M, Bourhis J, Forastiere A, et al. Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501). Head Neck. 2005 Oct; 27(10):843-50.

61. Posner MR, Hershock DM, Blajman CR, Mickiewicz E, Winkquist E, Gorbounova V, et al. TAX 324 Study Group. Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer. N Engl J Med. 2007 Oct 25; 357(17):1705-15

62. Vermorken JB, Remenar E, van Herpen C, Gorlia T, Mesia R, Degardin M, et al. EORTC 24971/TAX 323 Study Group. Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer. N Engl J Med. 2007 Oct 25; 357(17):1695-704.

63. Cohen EE, Lingen MW, Vokes EE. The expanding role of systemic therapy in head and neck cancer. J Clin Oncol. 2004 May 1; 22(9):1743-52.

64. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S, et al. Platinum based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. N Engl J Med. 2008 Sep 11; 359 (11):1116-27.

65. Hitt R, Irigoyen A, Cortes-Funes H, Grau JJ, García-Sáenz JA, Cruz-Hernandez JJ; Spanish Head and Neck Cancer Cooperative Group (TTCC). Phase II study of the combination of cetuximab and weekly paclitaxel in the first-line treatment of patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of head and neck. *Ann Oncol*. 2012 Apr; 23 (4):1016-22.
66. Burtneß B, Harrington KJ, Greil R, Soulières D, Tahara M, de Castro G Jr, et al. KEYNOTE-048 Investigators. Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 2019 Nov 23; 394(10212):1915-1928.
67. Grau JJ, Caballero M, Verger E, Monzó M, Blanch JL. Weekly paclitaxel for platin-resistant stage IV head and neck cancer patients. *Acta Otolaryngol*. 2009 Nov; 129(11):1294-9
68. Guardiola E, Peyrade F, Chaigneau L, Cupissol D, Tchiknavorian X, Bompas E, et al. Results of a randomised phase II study comparing docetaxel with methotrexate in patients with recurrent head and neck cancer. *Eur J Cancer*. 2004 Sep; 40(14):2071-6.
69. Ferris RL, Blumenschein G Jr, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med*. 2016 Nov 10; 375 (19):1856-1867.
70. Ferris RL, Blumenschein G Jr, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, Nivolumab vs investigator's choice in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: 2-year long-term survival update of CheckMate 141 with analyses by tumor PD-L1 expression. *Oral Oncol*. 2018 Jun; 81:45-51
71. Sturgis EM, Zheng R, Li L, Castillo EJ, Eicher SA, Chen M, et al. XPD/ERCC2 polymorphisms and risk of head and neck cancer: a case-control analysis. *Carcinogenesis*. 2000 Dec; 21(12):2219-23
72. Sak A, Grehl S, Engelhard M, Wierlemann A, Kaelberlah HP, Erichsen P, et al. Long-term in vivo effects of cisplatin on gamma-H2AX foci signaling in peripheral lymphocytes

of tumor patients after irradiation. *Clin Cancer Res.* 2009 Apr 15; 15(8):2927-34.

73. Rusin P, Walczak A, Zwierzchlejska A, Olszewski J, Morawiec-Bajda A, Kaczmarczyk D, et al. DNA damage and repair of head and neck cancer cells after radio and chemotherapy. *Z Naturforsch C J Biosci.* 2009 Jul-Aug; 64(7-8):601-10

74. Blommaert FA, Floot BG, van Dijk-Knijnenburg HC, Berends F, Baan RA, Schornagel JH, et al. The formation and repair of cisplatin-DNA adducts in wild-type and cisplatin-resistant L1210 cells: comparison of immunocytochemical determination with detection in isolated DNA. *Chem Biol Interact.* 1998 Jan 30; 108(3):209-25.

75. Cha HJ, Yim H. The accumulation of DNA repair defects is the molecular origin of carcinogenesis. *Tumour Biol.* 2013 Dec; 34(6):3293-302.

76. Huang SM, Harari PM. Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res.* 2000 Jun; 6(6):2166-74.

77. Jackson SP, Bartek J The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature.* 2009 Oct 22; 461(7267):1071-8.

78. Lukas J, Lukas C, Bartek J. More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nat Cell Biol.* 2011 Oct 3; 13(10):1161-9.

79. Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell.* 2010 Oct 22; 40(2):179-204.

80. O'Connor MJ. Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Mol Cell.* 2015 Nov 19; 60(4):547-60.

81. Kim YJ, Wilson DM 3rd. Overview of base excision repair biochemistry. *Curr Mol Pharmacol.* 2012 Jan; 5(1):3-13

82. Hsieh P, Yamane K. DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech Ageing Dev.* 2008 Jul-Aug; 129(7-8):391-407.
83. Kottemann MC, Smogorzewska A. Fanconi anaemia and the repair of Watson and Crick DNA crosslinks. *Nature.* 2013 Jan 17; 493(7432):356-63.
84. Kutler DI, Singh B, Satagopan J, Batish SD, Berwick M, Giampietro PF, et al. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood* 2003 Feb 15; 101(4):1249-56.
85. Lowy DR, Gillison ML. A new link between Fanconi anemia and human papillomavirus-associated malignancies. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Nov 19; 95(22):1648-50.
86. Hartlerode AJ, Scully R. Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *Biochem J.* 2009 Sep 25; 423(2):157-68
87. Scully R, Panday A, Elango R, Willis NA. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 Nov; 20(11):698-714.
88. Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem.* 2010; 79:181-211.
89. Jones NR, Spratt TE, Berg AS, Muscat JE, Lazarus P, Gallagher CJ. Association studies of excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) haplotypes with lung and head and neck cancer risk in a Caucasian population. *Cancer Epidemiol.* 2011 Apr; 35(2):175-81.
90. San Filippo J, Sung P, Klein H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem.* 2008; 77:229-57.
91. Chapman JR, Taylor MR, Boulton SJ. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell.* 2012 Aug 24; 47(4):497-510.
92. Stark JM, Jasin M. Extensive loss of heterozygosity is suppressed during homologous repair of chromosomal breaks. *Mol Cell Biol.* 2003 Jan; 23(2):733-43.

93. Li X, Heyer WD. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res.* 2008 Jan; 18(1):99-113.
94. Lavin MF. ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks. *Oncogene.* 2007 Dec 10; 26 (56):7749-58.
95. Podhorecka M, Skladanowski A, Bozko P. H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *J Nucleic Acids.* 2010 Aug 3; 2010:920161.
96. Wang B, Matsuoka S, Ballif BA, Zhang D, Smogorzewska A, Gygi SP, et al. Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. *Science.* 2007 May 25; 316(5828):1194-8.
97. Dever SM, White ER, Hartman MC, Valerie K. BRCA1-directed, enhanced and aberrant homologous recombination: mechanism and potential treatment strategies. *Cell Cycle.* 2012 Feb 15; 11(4):687-94.
98. Wang B. BRCA1 tumor suppressor network: focusing on its tail. *Cell Biosci.* 2012 Feb 27; 2(1):6
99. Bonanno L, Costa C, Majem M, Sanchez JJ, Gimenez-Capitan A, Rodriguez I, et al. The predictive value of 53BP1 and BRCA1 mRNA expression in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with first-line platinum-based chemotherapy. *Oncotarget.* 2013 Oct; 4(10):1572-81.
100. Cirauqui B, Margelí M, Quiroga V, Quer A, Karachaliou N, Chaib I, et al. DNA repair pathways to regulate response to chemoradiotherapy in patients with locally advanced head and neck cancer. *Tumour Biol.* 2016 Oct; 37(10):13435-13443.
101. Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, Lieber MR. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017 Aug; 18(8):495-506.
102. Bothmer A, Robbiani DF, Di Virgilio M, Bunting SF, Klein IA, Feldhahn N, et al. Regulation of DNA end joining, resection, and immunoglobulin class switch recombination by 53BP1. *Mol Cell.* 2011 May 6; 42(3):319-29.
103. Mirman Z, de Lange T. 53BP1: a DSB escort. *Genes Dev.* 2020 Jan 1; 34(1-2):7-23.

104. Mirza-Aghazadeh-Attari M, Mohammadzadeh A, Yousefi B, Mihanfar A, Karimian A, Majidinia M. 53BP1: A key player of DNA damage response with critical functions in cancer. *DNA Repair (Amst)*. 2019 Jan; 73: 110-119.
105. Noon AT, Goodarzi AA. 53BP1-mediated DNA double strand break repair: insert bad pun here. *DNA Repair (Amst)*. 2011 Oct 10; 10(10):1071-6.
106. Isono M, Niimi A, Oike T, Hagiwara Y, Sato H, Sekine R, et al. BRCA1 Directs the Repair Pathway to Homologous Recombination by Promoting 53BP1 Dephosphorylation. *Cell Rep*. 2017 Jan 10; 18(2):520-532.
107. Saha J, Davis AJ. Unsolved mystery: the role of BRCA1 in DNA end-joining. *J Radiat Res*. 2016 Aug; 57 Suppl 1(Suppl 1):i18-i24.
108. Pei H, Zhang L, Luo K, Qin Y, Chesi M, Fei F, et al. MMSET regulates histone H4K20 methylation and 53BP1 accumulation at DNA damage sites. *Nature*. 2011 Feb 3; 470(7332):124-8.
109. Hudlebusch HR, Santoni-Rugiu E, Simon R, Ralfkiær E, Rossing HH, Johansen JV, et al. The histone methyltransferase and putative oncoprotein MMSET is overexpressed in a large variety of human tumors. *Clin Cancer Res*. 2011 May 1; 17(9):2919-33.
110. Daley JM, Sung P. 53BP1, BRCA1, and the choice between recombination and end joining at DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol*. 2014 Apr; 34(8):1380-8..
111. Petruseva IO, Evdokimov AN, Lavrik OI. Molecular mechanism of global genome nucleotide excision repair. *Acta Naturae*. 2014 Jan; 6(1):23-34.
112. Lans H, Hoeijmakers JHJ, Vermeulen W, Marteijn JA. The DNA damage response to transcription stress. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019 Dec; 20(12):766-784.
113. Enzlin JH, Schärer OD. The active site of the DNA repair endonuclease XPF-ERCC1 forms a highly conserved nuclease motif. *EMBO J*. 2002 Apr 15; 21(8):2045-53.

114. Bessho T, Sancar A, Thompson LH, Thelen MP. Reconstitution of human excision nuclease with recombinant XPF-ERCC1 complex. *J Biol Chem.* 1997 Feb 7; 272(6):3833-7.
115. Faridounnia M, Folkers GE, Boelens R. Function and Interactions of ERCC1-XPF in DNA Damage Response. *Molecules.* 2018 Dec 5; 23(12):3205.
116. Vaezi A, Feldman CH, Niedernhofer LJ. ERCC1 and XRCC1 as biomarkers for lung and head and neck cancer. *Pharmgenomics Pers Med.* 2011; 4: 47-63.
117. Bauman JE, Austin MC, Schmidt R, Kurland BF, Vaezi A, Hayes DN, et al. ERCC1 is a prognostic biomarker in locally advanced head and neck cancer: results from a randomised, phase II trial *Br J Cancer.* 2013 Oct 15; 109(8):2096-105.
118. Hayes M, Lan C, Yan J, Xie Y, Gray T, Amirkhan RH, Dowell JE. ERCC1 expression and outcomes in head and neck cancer treated with concurrent cisplatin and radiation. *Anticancer Res.* 2011 Dec; 31(12):4135-9. PMID: 22199271.
119. Yu H, Liu Z, Huang YJ, Yin M, Wang LE, Wei Q. Association between single nucleotide polymorphisms in ERCC4 and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *PLoS One.* 2012; 7(7): e41853.
120. Dylawerska A, Barczak W, Wegner A, Golusinski W, Suchorska WM. Association of DNA repair genes polymorphisms and mutations with increased risk of head and neck cancer: a review. *Med Oncol.* 2017 Nov 15; 34(12):197.
121. Torgovnick A, Schumacher B. DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. *Front Genet.* 2015 Apr 23; 6:157.
122. Bi J, Huang A, Liu T, Zhang T, Ma H. Expression of DNA damage checkpoint 53BP1 is correlated with prognosis, cell proliferation and apoptosis in colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015 Jun 1; 8(6):6070-82.
123. Squatrito M, Vanoli F, Schultz N, Jasin M, Holland EC. 53BP1 is a haploinsufficient

tumor suppressor and protects cells from radiation response in glioma. *Cancer Res.* 2012 Oct 15; 72(20):5250-60.

124. Schochter F, Werner K, Köstler C, Faul A, Tzschaschel M, Alberter B, et al. 53BP1 Accumulation in Circulating Tumor Cells Identifies Chemotherapy-Responsive Metastatic Breast Cancer Patients. *Cancers (Basel)*. 2020 Apr 9; 12(4):930.

125. Taron M, Rosell R, Felip E, Mendez P, Souglakos J, Ronco MS, et al. BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer. *Hum Mol Genet.* 2004 Oct 15; 13(20):2443-9.

126. Litton JK, Rugo HS, Ettl J, Hurvitz SA, Gonçalves A, Lee KH, et al. Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med.* 2018 Aug 23; 379(8):753-763.

127. Robson ME, Tung N, Conte P, Im SA, Senkus E, Xu B, et al. OlympiAD final overall survival and tolerability results: Olaparib versus chemotherapy treatment of physician's choice in patients with a germline BRCA mutation and HER2-negative metastatic breast cancer. *Ann Oncol.* 2019 Apr 1; 30(4):558-566.

128. Litton JK, Hurvitz SA, Mina LA, Rugo HS, Lee KH, Gonçalves A, et al. Talazoparib versus chemotherapy in patients with germline BRCA1/2-mutated HER2-negative advanced breast cancer: final overall survival results from the EMBRACA trial. *Ann Oncol.* 2020 Nov;31 (11):1526-1535.

129. Toulany M. Targeting DNA Double-Strand Break Repair Pathways to Improve Radiotherapy Response. *Genes (Basel)*. 2019 Jan 4; 10(1):25.

130. Borrego-Soto G, Ortiz-López R, Rojas-Martínez A. Ionizing radiation-induced DNA injury and damage detection in patients with breast cancer. *Genet Mol Biol.* 2015 Dec; 38(4):420-32.

131. Han W, Yu KN. Chapter 6: Response of cells to ionizing radiation. En Tjong S.C. Bentham Books.. *Adv Biomed Sci Eng.* 2009;204–62.

132. Nickson CM, Moori P, Carter RJ, Rubbi CP, Parsons JL. Misregulation of DNA damage repair pathways in HPV-positive head and neck squamous cell carcinoma contributes to cellular radiosensitivity. *Oncotarget* 2017 May 2; 8(18):29963-29975
133. Barnett GC, Coles CE, Elliott RM, Baynes C, Luccarini C, Conroy D, et al. Independent validation of genes and polymorphisms reported to be associated with radiation toxicity: a prospective analysis study. *Lancet Oncol.* 2012 Jan; 13(1):65-77.
134. Eustace A, Mani N, Span PN, Irlam JJ, Taylor J, Betts GN, et al. A 26-gene hypoxia signature predicts benefit from hypoxia-modifying therapy in laryngeal cancer but not bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2013 Sep 1; 19(17):4879-88.
135. Speers C, Zhao S, Liu M, Bartelink H, Pierce LJ, Feng FY. Development and Validation of a Novel Radiosensitivity Signature in Human Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2015 Aug 15; 21(16):3667-77
136. Boeckman HJ, Trego KS, Turchi JJ. Cisplatin sensitizes cancer cells to ionizing radiation via inhibition of nonhomologous end joining. *Mol Cancer Res.* 2005 May; 3(5):277-85.
137. Cobo M, Isla D, Massuti B, Montes A, Sanchez JM, Provencio M, et al. Customizing cisplatin based on quantitative excision repair cross-complementing 1 mRNA expression: a phase III trial in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2007 Jul 1; 25(19):2747-54
138. Bepler G, Williams C, Schell MJ, Chen W, Zheng Z, Simon G, et al. Randomized international phase III trial of ERCC1 and RRM1 expression-based chemotherapy versus gemcitabine/carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2013 Jul 1; 31(19):2404-12
139. Quinn JE, James CR, Stewart GE, Mulligan JM, White P, Chang GK et al. BRCA1 mRNA expression levels predict for overall survival in ovarian cancer after chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2007 Dec 15; 13(24):7413-20.
140. Quinn JE, Kennedy RD, Mullan PB, Gilmore PM, Carty M, Johnston PG, et al.

BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 2003 Oct 1; 63(19):6221-8.

141. Rottenberg S, Nygren AO, Pajic M, van Leeuwen FW, van der Heijden I, van de Wetering K, et al. Selective induction of chemotherapy resistance of mammary tumors in a conditional mouse model for hereditary breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jul 17; 104(29):12117-22.

142. Boukovinas I, Papadaki C, Mendez P, Taron M, Mavroudis D, Koutsopoulos A, et al Tumor BRCA1, RRM1 and RRM2 mRNA expression levels and clinical response to first-line gemcitabine plus docetaxel in non-small-cell lung cancer patients. *PLoS One.* 2008; 3(11): e3695.

143. Wei J, Costa C, Ding Y, Zou Z, Yu L, Sanchez JJ, et al. mRNA expression of BRCA1, PIAS1, and PIAS4 and survival after second-line docetaxel in advanced gastric cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2011 Oct 19; 103(20):1552-6.

144. Rosell R, Perez-Roca L, Sanchez JJ, Cobo M, Moran T, Chaib I, et al. Customized treatment in non-small-cell lung cancer based on EGFR mutations and BRCA1 mRNA expression. *PLoS One.* 2009; 4(5):e5133.

145. Moran T, Wei J, Cobo M, Qian X, Domine M, Zou Z et al. Two biomarker-directed randomized trials in European and Chinese patients with nonsmall-cell lung cancer: the BRCA1-RAP80 Expression Customization (BREC) studies. *Ann Oncol.* 2014 Nov; 25(11):2147-2155.

146. Mukherjee B, Choy H, Nirodi C, Burma S. Targeting nonhomologous end-joining through epidermal growth factor receptor inhibition: rationale and strategies for radiosensitization. *Semin Radiat Oncol.* 2010 Oct; 20(4):250-7.

147. Saker J, Kriegs M, Zenker M, Heldt JM, Eke I, Pietzsch HJ, et al. Inactivation of HNSCC cells by 90Y-labeled cetuximab strictly depends on the number of induced DNA double-strand breaks. *J Nucl Med.* 2013 Mar; 54(3):416-23.

148. Bandyopadhyay D, Mandal M, Adam L, Mendelsohn J, Kumar R. Physical

interaction between epidermal growth factor receptor and DNA-dependent protein kinase in mammalian cells. *J Biol Chem*. 1998 Jan 16; 273(3):1568-73.

149. Zhao B, Wang L, Qiu H, Zhang M, Sun L, Peng P, et al. Mechanisms of resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017 Jan 17; 8(3):3980-4000.

150. Li L, Wang H, Yang ES, Arteaga CL, Xia F. Erlotinib attenuates homologous recombinational repair of chromosomal breaks in human breast cancer cells. *Cancer Res*. 2008 Nov 15; 68(22):9141-6.

151. Lee HJ, Lan L, Peng G, Chang WC, Hsu MC, Wang YN, et al. Tyrosine 370 phosphorylation of ATM positively regulates DNA damage response. *Cell Res*. 2015 Feb; 25(2):225-36.

152. Zhang J, Willers H, Feng Z, Ghosh JC, Kim S, Weaver DT, et al. Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol*. 2004 Jan; 24(2):708-18.

153. Wang SC, Nakajima Y, Yu YL, Xia W, Chen CT, Yang CC, et al. Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability. *Nat Cell Biol*. 2006 Dec; 8(12):1359-68.

154. Chou RH, Wang YN, Hsieh YH, Li LY, Xia W, Chang WC, et al. EGFR modulates DNA synthesis and repair through Tyr phosphorylation of histone H4. *Dev Cell*. 2014 Jul 28; 30(2):224-37.

155. Song H, Li CW, Labaff AM, Lim SO, Li LY, Kan SF, et al. Acetylation of EGF receptor contributes to tumor cell resistance to histone deacetylase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Jan 7; 404(1):68-73.

156. Kalyankrishna S, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Jun 10; 24(17):2666-72.

157. Byeon HK, Ku M, Yang J. Beyond EGFR inhibition: multilateral combat strategies

to stop the progression of head and neck cancer. *Exp Mol Med.* 2019 Jan 16; 51(1):1-14.

158. Rubin Grandis J, Melhem MF, Gooding WE, Day R, Holst VA, Wagener MM, et al. Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst.* 1998 Jun 3; 90(11):824-32.

159. Ang KK, Berkey BA, Tu X, Zhang HZ, Katz R, Hammond EH et al. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res.* 2002 Dec 15; 62(24):7350-6.

160. Yamaoka T, Ohba M, Ohmori T. Molecular-Targeted Therapies for Epidermal Growth Factor Receptor and Its Resistance Mechanisms. *Int J Mol Sci.* 2017 Nov 15; 18(11):2420.

161. Brand TM, Iida M, Wheeler DL. Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Biol Ther.* 2011 May 1; 11(9):777-92.

162. Cohen EE, Davis DW, Karrison TG, Seiwert TY, Wong SJ, Nattam S et al. Erlotinib and bevacizumab in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck: a phase I/II study. *Lancet Oncol.* 2009 Mar; 10(3):247-57.

163. Specenier P, Vermorken J. Afatinib in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Expert Opin Pharmacother.* 2016 Jun; 17(9):1295-301.

164. Cohen EEW, Licitra LF, Burtneß B, Fayette J, Gauler T, Clement PM et al. Biomarkers predict enhanced clinical outcomes with afatinib versus methotrexate in patients with second-line recurrent and/or metastatic head and neck cancer. *Ann Oncol.* 2017 Oct 1; 28(10):2526-2532.

165. Kontić M, Milovanović J, Čolović Z, Poljak NK, Šundov Ž, Sučić A, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2015 Feb; 272(2):401-5.

166. Zanotti L, Paderno A, Piazza C, Pagan E, Bignotti E, Romani C et al. Epidermal growth factor receptor detection in serum and saliva as a diagnostic and prognostic tool in oral cancer. *Laryngoscope*. 2017 Nov; 127(11): E408-E414.
167. Kang H, Kiess A, Chung CH. Emerging biomarkers in head and neck cancer in the era of genomics. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015 Jan; 12(1):11-26.
168. Martin D, Abba MC, Molinolo AA, Vitale-Cross L, Wang Z, Zaida M, et al. The head and neck cancer cell oncogenome: a platform for the development of precision molecular therapies. *Oncotarget*. 2014 Oct 15; 5(19):8906-23.
169. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr, Di Maria MV, Veve R, Bremmes RM, et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol*. 2003 Oct 15; 21(20):3798-807.
170. Feldman R, Gatalica Z, Knezetic J, Reddy S, Nathan CA, Javadi N, et al. Molecular profiling of head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2016 Apr; 38 Suppl 1(Suppl 1):E1625-38.
171. Bossi P, Resteghini C, Paielli N, Licitra L, Pilotti S, Perrone F. Prognostic and predictive value of EGFR in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2016 Nov 8; 7(45):74362-74379.
172. Osher E, Macaulay VM. Therapeutic Targeting of the IGF Axis. *Cells*. 2019 Aug 14; 8(8):895.
173. Simpson A, Petnga W, Macaulay VM, Weyer-Czernilofsky U, Bogenrieder T. Insulin-Like Growth Factor (IGF) Pathway Targeting in Cancer: Role of the IGF Axis and Opportunities for Future Combination Studies. *Target Oncol*. 2017 Oct; 12(5):571-597
174. Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jul; 4(7):505-18.

175. Jin M, Buck E, Mulvihill MJ. Modulation of insulin-like growth factor-1 receptor and its signaling network for the treatment of cancer: current status and future perspectives. *Oncol Rev.* 2013 Apr 22; 7(1): e3.
176. van de Luijngaarden AC, Versleijen-Jonkers YM, Roeffen MH, Schreuder HW, Flucke UE, van der Graaf WT. Prognostic and therapeutic relevance of the IGF pathway in Ewing's sarcoma patients. *Target Oncol.* 2013 Dec; 8(4):253-60.
179. Sell C, Dumenil G, Deveaud C, Miura M, Coppola D, DeAngelis T, et al. Effect of a null mutation of the insulin-like growth factor I receptor gene on growth and transformation of mouse embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 1994 Jun; 14(6):3604-12.
178. Riedemann J, Macaulay VM. IGF1R signalling and its inhibition. *Endocr Relat Cancer.* 2006 Dec; 13 Suppl 1: S33-43.
179. Werner H, Roberts CT Jr. The IGF1 receptor gene: a molecular target for disrupted transcription factors. *Genes Chromosomes Cancer.* 2003 Feb; 36(2):113-20.
180. Chitnis MM, Yuen JS, Protheroe AS, Pollak M, Macaulay VM. The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway. *Clin Cancer Res.* 2008 Oct 15; 14(20):6364-70.
181. Barnes CJ, Ohshiro K, Rayala SK, El-Naggar AK, Kumar R. Insulin-like growth factor receptor as a therapeutic target in head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 2007 Jul 15; 13(14):4291-9.
182. Riesterer O, Yang Q, Raju U, Torres M, Molkenhine D, Patel N, et al. Combination of anti-IGF-1R antibody A12 and ionizing radiation in upper respiratory tract cancers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011 Mar 15; 79(4):1179-87.
183. Hurbin A, Wislez M, Busser B, Antoine M, Tenaud C, Rabbe N, et al. Insulin-like growth factor-1 receptor inhibition overcomes gefitinib resistance in mucinous lung adenocarcinoma. *J Pathol.* 2011 Sep; 225(1):83-95.
184. Boeckx C, Baay M, Wouters A, Specenier P, Vermorken JB, Peeters M, et al.

Antiepidermal growth factor receptor therapy in head and neck squamous cell carcinoma: focus on potential molecular mechanisms of drug resistance. *Oncologist*. 2013; 18(7):850-64.

185. Tandon R, Kapoor S, Vali S, Senthil V, Nithya D, Venkataramanan R, et al. Dual epidermal growth factor receptor (EGFR)/insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) inhibitor: a novel approach for overcoming resistance in anticancer treatment. *Eur J Pharmacol*. 2011 Sep 30; 667(1-3):56-65.

186. Schmitz S, Kaminsky-Forrett MC, Henry S, Zanetta S, Geoffrois L, Bompas E, et al. Phase II study of figitumumab in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: clinical activity and molecular response (GORTEC 2008-02). *Ann Oncol*. 2012 Aug; 23(8):2153-2161.

187. Ferrarotto R, William WN Jr, Tseng JE, Marur S, Shin DM, Murphy B, et al. Randomized phase II trial of cixutumumab alone or with cetuximab for refractory recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2018 Jul; 82: 83-90.

188. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jul; 2(7):489-501.

189. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 2002 May 31; 296(5573):1655-7.

190. Jiang N, Dai Q, Su X, Fu J, Feng X, Peng J. Role of PI3K/AKT pathway in cancer: the framework of malignant behavior. *Mol Biol Rep*. 2020 Jun; 47(6):4587-4629.

191. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*. 2008 Sep 18; 27(41):5497-510

192. Qiu W, Schönleben F, Li X, Ho DJ, Close LG, Manolidis S, et al. PIK3CA mutations in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2006 Mar 1; 12(5):1441-6.

193. Rebucci M, Peixoto P, Dewitte A, Wattez N, De Nuncques MA, Rezvoy N, et al. Mechanisms underlying resistance to cetuximab in the HNSCC cell line: role of AKT inhibition in bypassing this resistance. *Int J Oncol.* 2011 Jan; 38(1):189-200.
194. Yamatodani T, Ekblad L, Kjellén E, Johnsson A, Mineta H, Wennerberg J. Epidermal growth factor receptor status and persistent activation of Akt and p44/42 MAPK pathways correlate with the effect of cetuximab in head and neck and colon cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009 Mar; 135(3):395-402.
195. Mriouah J, Boura C, Pinel S, Chretien AS, Fifre A, Merlin JL, et al. Cellular response to cetuximab in PTEN-silenced head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Int J Oncol.* 2010 Dec; 37(6):1555-63.
196. Geiger JL, Bauman JE, Gibson MK, Gooding WE, Varadarajan P, Kotsakis A, et al. Phase II trial of everolimus in patients with previously treated recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2016 Dec; 38(12):1759-1764.
197. Grünwald V, Keilholz U, Boehm A, Guntinas-Lichius O, Hennemann B, Schmoll HJ, et al. TEMHEAD: a single-arm multicentre phase II study of temsirolimus in platinum and cetuximab refractory recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) of the German SCCHN Group (AIO). *Ann Oncol.* 2015 Mar; 26(3):561-7
198. Massarelli E, Lin H, Ginsberg LE, Tran HT, Lee JJ, Canales JR, et al. Phase II trial of everolimus and erlotinib in patients with platinum-resistant recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oncol.* 2015 Jul; 26(7):1476-80.
199. Bauman JE, Arias-Pulido H, Lee SJ, Fekrazad MH, Ozawa H, Fertig E, et al. A phase II study of temsirolimus and erlotinib in patients with recurrent and/or metastatic, platinum-refractory head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2013 May; 49(5):461-7.
200. Jimeno A, Shirai K, Choi M, Laskin J, Kochenderfer M, Spira A, et al. A randomized, phase II trial of cetuximab with or without PX-866, an irreversible oral phosphatidylinositol

3-kinase inhibitor, in patients with relapsed or metastatic head and neck squamous cell cancer. *Ann Oncol.* 2015 Mar; 26(3):556-61.

201. Jimeno A, Bauman JE, Weissman C, Adkins D, Schnadig I, Bearegard P, et al. A randomized, phase 2 trial of docetaxel with or without PX-866, an irreversible oral phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, in patients with relapsed or metastatic head and neck squamous cell cancer. *Oral Oncol.* 2015 Apr; 51(4):383-8.

202. Soulières D, Faivre S, Mesía R, Remenár É, Li SH, Karpenko A, et al. Buparlisib and paclitaxel in patients with platinum-pretreated recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (BERIL-1): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2017 Mar; 18(3):323-335.

203. Soulières D, Licitra L, Mesía R, Remenár É, Li SH, Karpenko A, et al. Molecular Alterations and Buparlisib Efficacy in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: Biomarker Analysis from BERIL-1. *Clin Cancer Res.* 2018 Jun 1; 24(11):2505-2516.

204. Geiger JL, Grandis JR, Bauman JE. The STAT3 pathway as a therapeutic target in head and neck cancer: Barriers and innovations. *Oral Oncol.* 2016 May; 56:84-92.

205. Becker S, Groner B, Müller CW. Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA. *Nature.* 1998 Jul 9; 394(6689):145-51.

206. Chen X, Vinkemeier U, Zhao Y, Jeruzalmi D, Darnell JE Jr, Kuriyan J. Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell.* 1998 May 29; 93(5):827-39.

207. Shuai K. Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene.* 2000 May 15; 19(21):2638-44

208. Huynh J, Chand A, Gough D, Ernst M. Therapeutically exploiting STAT3 activity in cancer - using tissue repair as a road map. *Nat Rev Cancer.* 2019 Feb; 19(2):82-96.

209. Levy DE, Darnell JE Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Sep; 3(9):651-62
210. Song JI, Grandis JR. STAT signaling in head and neck cancer. *Oncogene.* 2000 May 15; 19(21):2489-95.
211. Siveen KS, Sikka S, Surana R, Dai X, Zhang J, Kumar AP, et al Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: role of synthetic and natural inhibitors. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Apr; 1845(2):136-54.
212. Lavecchia A, Di Giovanni C, Novellino E. STAT-3 inhibitors: state of the art and new horizons for cancer treatment. *Curr Med Chem.* 2011; 18(16):2359-75
213. Peyser ND, Wang L, Zeng Y, Acquafondata M, Freilino M, Li H et al. STAT3 as a Chemoprevention Target in Carcinogen-Induced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Prev Res (Phila).* 2016 Aug; 9(8):657-63.
214. Frank DA. STAT3 as a central mediator of neoplastic cellular transformation. *Cancer Lett.* 2007 Jun 28; 251(2):199-210
215. Lin TS, Mahajan S, Frank DA. STAT signaling in the pathogenesis and treatment of leukemias. *Oncogene.* 2000 May 15; 19(21):2496-504
216. Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, et al. Stat3 as an oncogene. *Cell.* 1999 Aug 6; 98(3):295-303.
217. Lee HJ, Zhuang G, Cao Y, Du P, Kim HJ, Settleman J. Drug resistance via feedback activation of Stat3 in oncogene-addicted cancer cells. *Cancer Cell.* 2014 Aug 11; 26(2):207-21.
218. Shukla S, Mahata S, Shishodia G, Pandey A, Tyagi A, Vishnoi K, et al. Functional regulatory role of STAT3 in HPV16-mediated cervical carcinogenesis. *PLoS One.* 2013 Jul 18; 8(7): e67849.

219. Bose P, Brockton NT, Dort JC. Head and neck cancer: from anatomy to biology. *Int J Cancer*. 2013 Nov; 133(9):2013-23.

220. Grandis JR, Tweardy DJ. 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 Aug 1; 53(15):3579-84.

221. Masuda M, Suzui M, Yasumatu R, Nakashima T, Kuratomi Y, Azuma K, et al. Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription 3 correlates with cyclin D1 overexpression and may provide a novel prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2002 Jun 15; 62(12):3351-5.

222. Kijima T, Niwa H, Steinman RA, Drenning SD, Gooding WE, Wentzel AL, et al. STAT3 activation abrogates growth factor dependence and contributes to head and neck squamous cell carcinoma tumor growth in vivo. *Cell Growth Differ*. 2002 Aug; 13(8):355-62.

223. Leong PL, Andrews GA, Johnson DE, Dyer KF, Xi S, Mai JC, et al. Targeted inhibition of Stat3 with a decoy oligonucleotide abrogates head and neck cancer cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 1; 100(7):4138-43.

224. Gao LF, Wen LJ, Yu H, Zhang L, Meng Y, Shao YT, et al. Knockdown of Stat3 expression using RNAi inhibits growth of laryngeal tumors in vivo. *Acta Pharmacol Sin*. 2006 Mar; 27(3):347-52.

225. Shah NG, Trivedi TI, Tankshali RA, Goswami JA, Jetly DH, Kobawala TP, et al. Stat3 expression in oral squamous cell carcinoma: association with clinicopathological parameters and survival. *Int J Biol Markers*. 2006 Jul-Sep; 21(3):175-83

226. 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*. 2011 Aug 26; 333(6046):1157-60.

227. Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, Bettegowda C, Chang K, Li RJ, et al.

Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science*. 2011 Aug 26; 333(6046):1154-7.

228. Sriuranpong V, Park JI, Amornphimoltham P, Patel V, Nelkin BD, Gutkind JS. Epidermal growth factor receptor-independent constitutive activation of STAT3 in head and neck squamous cell carcinoma is mediated by the autocrine/paracrine stimulation of the interleukin 6/gp130 cytokine system. *Cancer Res*. 2003 Jun 1; 63(11):2948-56.

229. Squarize CH, Castilho RM, Sriuranpong V, Pinto DS Jr, Gutkind JS. Molecular cross-talk between the NFkappaB and STAT3 signaling pathways in head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia*. 2006 Sep; 8(9):733-46.

230. Lee TL, Yeh J, Van Waes C, Chen Z. Epigenetic modification of SOCS-1 differentially regulates STAT3 activation in response to interleukin-6 receptor and epidermal growth factor receptor signaling through JAK and/or MEK in head and neck squamous cell carcinomas. *Mol Cancer Ther*. 2006 Jan; 5(1):8-19.

231. Johnson DE, O'Keefe RA, Grandis JR. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018 Apr; 15(4):234-248.

232. Xi S, Zhang Q, Dyer KF, Lerner EC, Smithgall TE, Gooding WE, et al. Src kinases mediate STAT growth pathways in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Biol Chem*. 2003 Aug 22; 278(34):31574-83.

233. Nagpal JK, Mishra R, Das BR. Activation of Stat-3 as one of the early events in tobacco chewing-mediated oral carcinogenesis. *Cancer*. 2002 May 1; 94(9):2393-400.

234. Arredondo J, Chernyavsky AI, Jolkovsky DL, Pinkerton KE, Grando SA. Receptor-mediated tobacco toxicity: cooperation of the Ras/Raf-1/MEK1/ERK and JAK-2/STAT-3 pathways downstream of alpha7 nicotinic receptor in oral keratinocytes. *FASEB J*. 2006 Oct; 20(12):2093-101

235. Yu H, Jove R. The STATs of cancer-new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer*. 2004 Feb; 4(2):97-105.

236. Decker T, Kovarik P. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene*. 2000 May 15; 19(21):2628-37.
237. Masuda M, Hirakawa N, Nakashima T, Kuratomi Y, Komiyama S. Cyclin D1 overexpression in primary hypopharyngeal carcinomas. *Cancer*. 1996 Aug 1; 78(3):390-5.
238. Dhingra V, Verma J, Misra V, Srivastav S, Hasan F. Evaluation of Cyclin D1 expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Diagn Res*. 2017 Feb; 11(2):EC01-EC04.
239. Akervall J, Bockmühl U, Petersen I, Yang K, Carey TE, Kurnit DM. The gene ratios c-MYC: cyclin-dependent kinase (CDK) N2A and CCND1:CDKN2A correlate with poor prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res*. 2003 May; 9(5):1750-5.
240. Pelengaris S, Khan M, Evan G. c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer*. 2002 Oct; 2(10):764-76.
241. Al Zaid Siddiquee K, Turkson J. STAT3 as a target for inducing apoptosis in solid and hematological tumors. *Cell Res*. 2008 Feb; 18(2):254-67
242. Masuda M, Wakasaki T, Suzui M, Toh S, Joe AK, Weinstein IB. Stat3 orchestrates tumor development and progression: the Achilles' heel of head and neck cancers? *Curr Cancer Drug Targets*. 2010 Feb; 10(1):117-26.
243. Masuda M, Ruan HY, Ito A, Nakashima T, Toh S, Wakasaki T, et al. Signal transducers and activators of transcription 3 up-regulates vascular endothelial growth factor production and tumor angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2007 Sep; 43(8):785-90.
244. Gao P, Niu N, Wei T, Tozawa H, Chen X, Zhang C. et al. The roles of signal transducer and activator of transcription factor 3 in tumor angiogenesis. *Oncotarget*. 2017 Aug 4; 8(40):69139-69161.

245. Wojcik EJ, Sharifpoor S, Miller NA, Wright TG, Watering R, Tremblay EA, et al. A novel activating function of c-Src and Stat3 on HGF transcription in mammary carcinoma cells. *Oncogene*. 2006 May 4; 25(19):2773-84.
246. Lee H, Jeong AJ, Ye SK. Highlighted STAT3 as a potential drug target for cancer therapy. *BMB Rep*. 2019 Jul; 52(7):415-423.
247. Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*. 2007 Jan; 7(1):41-51.
248. Herrmann A, Kortylewski M, Kujawski M, Zhang C, Reckamp K, Armstrong B, et al. Targeting Stat3 in the myeloid compartment drastically improves the in vivo antitumor functions of adoptively transferred T cells. *Cancer Res*. 2010 Oct 1; 70(19):7455-64.
249. Kujawski M, Zhang C, Herrmann A, Reckamp K, Scuto A, Jensen M, et al. Targeting STAT3 in adoptively transferred T cells promotes their in vivo expansion and antitumor effects. *Cancer Res*. 2010 Dec 1; 70(23):9599-610.
250. Siegel AM, Heimall J, Freeman AF, Hsu AP, Brittain E, Brenchley JM, et al. A critical role for STAT3 transcription factor signaling in the development and maintenance of human T cell memory. *Immunity*. 2011 Nov 23; 35(5):806-18.
251. Iwata-Kajihara T, Sumimoto H, Kawamura N, Ueda R, Takahashi T, Mizuguchi H, et al. Enhanced cancer immunotherapy using STAT3-depleted dendritic cells with high Th1-inducing ability and resistance to cancer cell-derived inhibitory factors. *J Immunol*. 2011 Jul 1; 187(1):27-36.
252. Gotthardt D, Putz EM, Straka E, Kudweis P, Biaggio M, Poli V, et al. Loss of STAT3 in murine NK cells enhances NK cell-dependent tumor surveillance. *Blood*. 2014 Oct 9; 124(15):2370-9.
253. Hossain DM, Dos Santos C, Zhang Q, Kozłowska A, Liu H, Gao C, et al. Leukemia cell-targeted STAT3 silencing and TLR9 triggering generate systemic antitumor immunity. *Blood*. 2014 Jan 2; 123(1):15-25.

254. Kortylewski M, Yu H. Role of Stat3 in suppressing anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol.* 2008 Apr; 20(2):228-33.
255. Lee H, Pal SK, Reckamp K, Figlin RA, Yu H. STAT3: a target to enhance antitumor immune response. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2011; 344:41-59
256. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer.* 2005 Apr; 5(4):263-74.
257. Cheng F, Wang HW, Cuenca A, Huang M, Ghansah T, Brayer J, et al. A critical role for Stat3 signaling in immune tolerance. *Immunity.* 2003 Sep; 19(3):425-36.
258. Nefedova Y, Huang M, Kusmartsev S, Bhattacharya R, Cheng P, Salup R, et al. Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. *J Immunol.* 2004 Jan 1; 172(1):464-74.
259. Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L, Shain K, Zhang S, et al. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med.* 2004 Jan; 10(1):48-54.
260. Jewett A, Head C, Cacalano NA. Emerging mechanisms of immunosuppression in oral cancers. *J Dent Res.* 2006 Dec; 85 (12):1061-73.
261. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2002 Jun; 2(6):442-54.
262. Christofori G. New signals from the invasive front. *Nature.* 2006 May 25; 441(7092):444-50.
263. Yamashita S, Miyagi C, Fukada T, Kagara N, Che YS, Hirano T. Zinc transporter LIV1 controls epithelial-mesenchymal transition in zebrafish gastrula organizer. *Nature.* 2004 May 20; 429(6989):298-302.
264. Lo HW, Hsu SC, Xia W, Cao X, Shih JY, Wei Y, et al. Epidermal growth factor

receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression. *Cancer Res.* 2007 Oct 1; 67(19):9066-76.

265. Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2005 Sep; 5(9):744-9.

266. Galoczova M, Coates P, Vojtesek B. STAT3, stem cells, cancer stem cells and p63. *Cell Mol Biol Lett.* 2018 Mar 22; 23:12.

267. Wu M, Song D, Li H, Yang Y, Ma X, Deng S, et al. Negative regulators of STAT3 signaling pathway in cancers. *Cancer Manag Res.* 2019 May 29; 11: 4957-4969.

268. Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, et al Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science.* 1997 Dec 5; 278(5344):1803-5

269. Rabellino A, Andreani C, Scaglioni PP. The Role of PIAS SUMO E3-Ligases in Cancer. *Cancer Res.* 2017 Apr 1; 77(7):1542-1547.

270. Brantley EC, Nabors LB, Gillespie GY, Choi YH, Palmer CA, Harrison K et al. Loss of protein inhibitors of activated STAT-3 expression in glioblastoma multiforme tumors: implications for STAT-3 activation and gene expression. *Clin Cancer Res.* 2008 Aug 1; 14(15):4694-704.

271. Dabir S, Kluge A, Kresak A, Yang M, Fu P, Groner B, et al. PIAS3 expression in malignant mesothelioma is associated with increased STAT3 activation and poor patient survival. *Clin Cancer Res.* 2014 Oct 1; 20(19):5124-32.

272. Kluge A, Dabir S, Vlassenbroeck I, Eisenberg R, Dowlati A. Protein inhibitor of activated STAT3 expression in lung cancer. *Mol Oncol.* 2011 Jun; 5(3):256-64.

273. Saydmohammed M, Joseph D, Syed V. Curcumin suppresses constitutive activation of STAT-3 by up-regulating protein inhibitor of activated STAT-3 (PIAS-3) in

ovarian and endometrial cancer cells. *J Cell Biochem.* 2010 May 15; 110(2):447-56.

274. Ogata Y, Osaki T, Naka T, Iwahori K, Furukawa M, Nagatomo I et al. Overexpression of PIAS3 suppresses cell growth and restores the drug sensitivity of human lung cancer cells in association with PI3-K/Akt inactivation. *Neoplasia.* 2006 Oct; 8(10):817-25.

275. Lee JH, Kim C, Sethi G, Ahn KS. Brassinin inhibits STAT3 signaling pathway through modulation of PIAS-3 and SOCS-3 expression and sensitizes human lung cancer xenograft in nude mice to paclitaxel. *Oncotarget.* 2015 Mar 20; 6(8):6386-405.

276. Wible BA, Wang L, Kuryshev YA, Basu A, Haldar S, Brown AM. Increased K⁺ efflux and apoptosis induced by the potassium channel modulatory protein KChAP/PIAS3beta in prostate cancer cells. *J Biol Chem.* 2002 May 17; 277(20):17852-62.

277. Driscoll JJ, Pelluru D, Lefkimiatis K, Fulciniti M, Prabhala RH, Greipp PR, et al. The sumoylation pathway is dysregulated in multiple myeloma and is associated with adverse patient outcome. *Blood.* 2010 Apr 8; 115(14):2827-34

278. Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature.* 1997 Jun 26; 387(6636):917-21.

279. Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, et al. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature.* 1997 Jun 26; 387(6636):921-4.

280. Jiang M, Zhang WW, Liu P, Yu W, Liu T, Yu J. Dysregulation of SOCS-Mediated Negative Feedback of Cytokine Signaling in Carcinogenesis and Its Significance in Cancer Treatment. *Front Immunol.* 2017 Feb 8; 8:70.

281. Sasi W, Sharma AK, Mokbel K. The role of suppressors of cytokine signalling in human neoplasms. *Mol Biol Int.* 2014; 2014:630797.

282. Weber A, Hengge UR, Bardenheuer W, Tischoff I, Sommerer F, Markwarth A, et al.

SOCS-3 is frequently methylated in head and neck squamous cell carcinoma and its precursor lesions and causes growth inhibition. *Oncogene*. 2005 Oct 6; 24(44):6699-708.

283. Chekhun VF. Inflammation and cancer. *Exp Oncol*. 2009 Dec; 31(4):190.

284. Liao NPD, Laktyushin A, Lucet IS, Murphy JM, Yao S, Whitlock E, et al. The molecular basis of JAK/STAT inhibition by SOCS1. *Nat Commun*. 2018 Apr 19; 9(1):1558.

285. Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Nov; 7(11):833-46.

286. Julien SG, Dubé N, Hardy S, Tremblay ML. Inside the human cancer tyrosine phosphatome. *Nat Rev Cancer*. 2011 Jan; 11(1):35-49.

287. Veeriah S, Brennan C, Meng S, Singh B, Fagin JA, Solit DB, et al. The tyrosine phosphatase PTPRD is a tumor suppressor that is frequently inactivated and mutated in glioblastoma and other human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jun 9; 106(23):9435-40.

288. Lui VW, Peyser ND, Ng PK, Hritz J, Zeng Y, Lu Y, et al. Frequent mutation of receptor protein tyrosine phosphatases provides a mechanism for STAT3 hyperactivation in head and neck cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jan 21; 111(3):1114-9.

289. Peyser ND, Freilino M, Wang L, Zeng Y, Li H, Johnson DE, et al. Frequent promoter hypermethylation of PTPRT increases STAT3 activation and sensitivity to STAT3 inhibition in head and neck cancer. *Oncogene*. 2016 Mar 3; 35(9):1163-9

290. Peyser ND, Du Y, Li H, Lui V, Xiao X, Chan TA et al. Loss-of-Function PTPRD Mutations Lead to Increased STAT3 Activation and Sensitivity to STAT3 Inhibition in Head and Neck Cancer. *PLoS One*. 2015 Aug 12; 10(8): e0135750.

291. Arany I, Chen SH, Megyesi JK, Adler-Storthz K, Chen Z, Rajaraman S, et al. Differentiation-dependent expression of signal transducers and activators of transcription (STATs) might modify responses to growth factors in the cancers of the head and neck. *Cancer Lett.* 2003 Sep 10; 199(1):83-9.
292. Xi S, Gooding WE, Grandis JR. In vivo antitumor efficacy of STAT3 blockade using a transcription factor decoy approach: implications for cancer therapy. *Oncogene.* 2005 Feb 3; 24(6):970-9
293. Masuda M, Toh S, Koike K, Kuratomi Y, Suzui M, Deguchi A. et al. The roles of JNK1 and Stat3 in the response of head and neck cancer cell lines to combined treatment with all-trans-retinoic acid and 5-fluorouracil. *Jpn J Cancer Res.* 2002 Mar; 93(3):329-39.
294. Nix P, Cawkwell L, Patmore H, Greenman J, Stafford N. Bcl-2 expression predicts radiotherapy failure in laryngeal cancer. *Br J Cancer.* 2005 Jun 20; 92(12):2185-9.
295. Spitzner M, Ebner R, Wolff HA, Ghadimi BM, Wienands J, Grade M. STAT3: A Novel Molecular Mediator of Resistance to Chemoradiotherapy. *Cancers (Basel).* 2014 Sep 29; 6(4):1986-2011.
296. Soleymani Abyaneh H, Gupta N, Radziwon-Balicka A, Jurasz P, Seubert J, Lai R, et al. STAT3 but Not HIF-1 α Is Important in Mediating Hypoxia-Induced Chemoresistance in MDA-MB-231, a Triple Negative Breast Cancer Cell Line. *Cancers (Basel).* 2017 Oct 14; 9(10):137.
297. Wang K, Zhu X, Zhang K, Yin Y, Chen Y, Zhang T. Interleukin-6 contributes to chemoresistance in MDA-MB-231 cells via targeting HIF-1 α . *J Biochem Mol Toxicol.* 2018 Mar; 32(3): e22039.
298. Qin JJ, Yan L, Zhang J, Zhang WD. STAT3 as a potential therapeutic target in triple negative breast cancer: a systematic review. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019 May 14; 38(1):195.
299. Li H, Qian Y, Wang X, Pi R, Zhao X, Wei X. Targeted activation of Stat3 in

combination with paclitaxel results in increased apoptosis in epithelial ovarian cancer cells and a reduced tumour burden. *Cell Prolif.* 2020 Jan; 53(1): e12719.

300. Walker SR, Chaudhury M, Nelson EA, Frank DA. Microtubule-targeted chemotherapeutic agents inhibit signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling. *Mol Pharmacol.* 2010 Nov; 78(5):903-8.

301. Wu X, Tang W, Marquez RT, Li K, Highfill CA, He F. et al. Overcoming chemo/radio-resistance of pancreatic cancer by inhibiting STAT3 signaling. *Oncotarget.* 2016 Mar 8; 7(10):11708-23.

302. Fan Z, Cui H, Yu H, Ji Q, Kang L, Han B, et al. MiR-125a promotes paclitaxel sensitivity in cervical cancer through altering STAT3 expression. *Oncogenesis.* 2016 Feb 15; 5(2): e197.

303. Lo HW, Cao X, Zhu H, Ali-Osman F. Constitutively activated STAT3 frequently coexpresses with epidermal growth factor receptor in high-grade gliomas and targeting STAT3 sensitizes them to Iressa and alkylators. *Clin Cancer Res.* 2008 Oct 1; 14(19):6042-54.

304. Feng FY, Lopez CA, Normolle DP, Varambally S, Li X, Chun PY, et al. Effect of epidermal growth factor receptor inhibitor class in the treatment of head and neck cancer with concurrent radiochemotherapy in vivo. *Clin Cancer Res.* 2007 Apr 15; 13(8):2512-8.

305. Bonner JA, Raisch KP, Trummell HQ, Robert F, Meredith RF, Spencer SA, et al. Enhanced apoptosis with combination C225/radiation treatment serves as the impetus for clinical investigation in head and neck cancers. *J Clin Oncol.* 2000 Nov 1; 18(21 Suppl):47S-53S. PMID: 11060327.

306. Mali SB. Review of STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription) in head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2015 Jun; 51(6):565-9.

307. Cohen EEW, Harrington KJ, Hong DS, Mesia R, Brana I, Perez Segura P, et al. A phase Ib/II study (SCORES) of durvalumab (D) plus danvatirsen (DAN; AZD9150) or

AZD5069 (CX2i) in advanced solid malignancies and recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma (RM-HNSCC): Updated results. *Ann Oncol* 2018 Oct;29(Supplement 8):viii372.

308. Zhu C, Wei Y, Wei X. AXL receptor tyrosine kinase as a promising anti-cancer approach: functions, molecular mechanisms and clinical applications. *Mol Cancer*. 2019 Nov 4; 18(1):153.

309. von Mässenhausen A, Brägelmann J, Billig H, Thewes B, Queisser A, Vogel W, et al. Implication of the Receptor Tyrosine Kinase AXL in Head and Neck Cancer Progression. *Int J Mol Sci*. 2016 Dec 22; 18(1):7.

310. Brand TM, Iida M, Stein AP, Corrigan KL, Braverman CM, Coan JP, et al. AXL Is a Logical Molecular Target in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2015 Jun 1; 21(11):2601-12.

311. Brand TM, Iida M, Stein AP, Corrigan KL, Braverman CM, Luthar N, et al. AXL mediates resistance to cetuximab therapy. *Cancer Res*. 2014 Sep 15; 74(18):5152-64.

312. Giles KM, Kalinowski FC, Candy PA, Epis MR, Zhang PM, Redfern AD, et al. Axl mediates acquired resistance of head and neck cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib. *Mol Cancer Ther*. 2013 Nov; 12(11):2541-58.

313. Chaib I, Cai X, Llige D, Santarpia M, Jantus-Lewintre E, Filipka M, et al. Osimertinib and dihydroartemisinin: a novel drug combination targeting head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Transl Med*. 2019 Nov; 7(22):651.

314. Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Feb; 9(2):139-50.

315. Furuya H, Shimizu Y, Kawamori T. Sphingolipids in cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2011 Dec; 30(3-4):567-76.

316. Shida D, Takabe K, Kapitonov D, Milstien S, Spiegel S. Targeting SphK1 as a new

strategy against cancer. *Curr Drug Targets*. 2008 Aug; 9(8):662-73.

317. Payne SG, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate: dual messenger functions. *FEBS Lett*. 2002 Oct 30; 531(1):54-7.

318. Bao M, Chen Z, Xu Y, Zhao Y, Zha R, Huang S, et al. Sphingosine kinase 1 promotes tumour cell migration and invasion via the S1P/EDG1 axis in hepatocellular carcinoma. *Liver Int*. 2012 Feb; 32(2):331-8.

319. Handy DE, Castro R, Loscalzo J. Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease. *Circulation*. 2011 May 17; 123(19):2145-56.

320. Nava VE, Cuvillier O, Edsall LC, Kimura K, Milstien S, et al. Sphingosine enhances apoptosis of radiation-resistant prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2000 Aug 15; 60(16):4468-74.

321. Sauer L, Nunes J, Salunkhe V, Skalska L, Kohama T, Cuvillier O, et al. Sphingosine kinase 1 inhibition sensitizes hormone-resistant prostate cancer to docetaxel. *Int J Cancer*. 2009 Dec 1; 125(11):2728-36

322. Guillermet-Guibert J, Davenne L, Pchejetski D, Saint-Laurent N, Brizuela L, Guilbeau-Frugier C, et al. Targeting the sphingolipid metabolism to defeat pancreatic cancer cell resistance to the chemotherapeutic gemcitabine drug. *Mol Cancer Ther*. 2009 Apr; 8(4):809-20.

323. Hobson JP, Rosenfeldt HM, Barak LS, Olivera A, Poulton S, Caron MG, et al. Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science*. 2001 Mar 2; 291(5509):1800-3.

324. Shirai K, Kaneshiro T, Wada M, Furuya H, Bielawski J, Hannun YA, et al. A role of sphingosine kinase 1 in head and neck carcinogenesis. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011 Mar; 4(3):454-62.

325. Sinha UK, Schorn VJ, Hochstim C, Chinn SB, Zhu S, Masood R. Increased radiation

sensitivity of head and neck squamous cell carcinoma with sphingosine kinase 1 inhibition. *Head Neck*. 2011 Feb; 33(2):178-88.

326. French KJ, Schrecengost RS, Lee BD, Zhuang Y, Smith SN, Eberly JL, et al. Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase. *Cancer Res*. 2003 Sep 15; 63(18):5962-9.

327. Pan J, Tao YF, Zhou Z, Cao BR, Wu SY, Zhang YL, et al. An novel role of sphingosine kinase-1 (SPHK1) in the invasion and metastasis of esophageal carcinoma. *J Transl Med*. 2011 Sep 22; 9:157.

328. Facchinetti MM, Gandini NA, Fermento ME, Sterin-Speziale NB, Ji Y, Patel V, Gutkind JS, et al. The expression of sphingosine kinase-1 in head and neck carcinoma. *Cells Tissues Organs*. 2010; 192(5):314-24.

329. Wheeler SE, Suzuki S, Thomas SM, Sen M, Leeman-Neill RJ, Chiosea SI, et al. Epidermal growth factor receptor variant III mediates head and neck cancer cell invasion via STAT3 activation. *Oncogene*. 2010 Sep 16; 29(37):5135-45.

330. Tamashiro PM, Furuya H, Shimizu Y, Kawamori T. Sphingosine kinase 1 mediates head & neck squamous cell carcinoma invasion through sphingosine 1-phosphate receptor 1. *Cancer Cell Int*. 2014 Aug 29; 14(1):76.

331. Schiefler C, Piontek G, Doescher J, Schuettler D, Mißbeck M, Rudelius M, et al. Inhibition of SphK1 reduces radiation-induced migration and enhances sensitivity to cetuximab treatment by affecting the EGFR / SphK1 crosstalk. *Oncotarget*. 2014 Oct 30; 5(20):9877-88.

332. Wu X, Wu Q, Zhou X, Huang J. SphK1 functions downstream of IGF-1 to modulate IGF-1-induced EMT, migration and paclitaxel resistance of A549 cells: A preliminary in vitro study. *J Cancer*. 2019 Jul 10; 10(18):4264-4269.

333. Segrelles C, Paramio JM, Lorz C. The transcriptional co-activator YAP: A new player in head and neck cancer. *Oral Oncol*. 2018 Nov; 86: 25-32.

334. Liu H, Du S, Lei T, Wang H, He X, Tong R, et al. Multifaceted regulation and functions of YAP/TAZ in tumors (Review). *Oncol Rep.* 2018 Jul; 40(1):16-28.
335. Moroishi T, Hansen CG, Guan KL. The emerging roles of YAP and TAZ in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2015 Feb; 15(2):73-79.
336. Zanconato F, Battilana G, Forcato M, Filippi L, Azzolin L, Manfrin A, et al. Transcriptional addiction in cancer cells is mediated by YAP/TAZ through BRD4. *Nat Med.* 2018 Oct; 24(10):1599-1610.
337. Santos-de-Frutos K, Segrelles C, Lorz C. Hippo Pathway and YAP Signaling Alterations in Squamous Cancer of the Head and Neck. *J Clin Med.* 2019 Dec 3; 8(12):2131.
338. Martin D, Degese MS, Vitale-Cross L, Iglesias-Bartolome R, Valera JLC, Wang Z, et al. Assembly and activation of the Hippo signalome by FAT1 tumor suppressor. *Nat Commun.* 2018 Jul 9; 9(1):2372.
339. Kim NG, Gumbiner BM. Adhesion to fibronectin regulates Hippo signaling via the FAK-Src-PI3K pathway. *J Cell Biol.* 2015 Aug 3; 210(3):503-15.
340. Ge L, Smail M, Meng W, Shyr Y, Ye F, Fan KH, et al. Yes-associated protein expression in head and neck squamous cell carcinoma nodal metastasis. *PLoS One.* 2011; 6(11): e27529
341. Eun YG, Lee D, Lee YC, Sohn BH, Kim EH, Yim SY, et al. Clinical significance of YAP1 activation in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2017 Nov 27; 8(67):111130-111143.
342. Yoshikawa K, Noguchi K, Nakano Y, Yamamura M, Takaoka K, Hashimoto-Tamaoki T, et al. The Hippo pathway transcriptional co-activator, YAP, confers resistance to cisplatin in human oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2015; 46(6):2364-70.

343. Jerhammar F, Johansson AC, Ceder R, Welander J, Jansson A, Grafström RC, et al. YAP1 is a potential biomarker for cetuximab resistance in head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2014 Sep; 50(9):832-9.
344. Hsu PC, You B, Yang YL, Zhang WQ, Wang YC, Xu Z, et al. YAP promotes erlotinib resistance in human non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget.* 2016 Aug 9; 7(32):51922-51933.
345. Dong X, Meng L, Liu P, Ji R, Su X, Xin Y, et al. YAP/TAZ: a promising target for squamous cell carcinoma treatment. *Cancer Manag Res.* 2019 Jul 8; 11:6245-6252.
346. Bykov VJN, Eriksson SE, Bianchi J, Wiman KG. Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2018 Feb;18(2):89-102.
347. Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, Forastiere A, Benoit N, Califano JA, et al. TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 2007 Dec 20; 357(25):2552-61.
348. Boyle JO, Hakim J, Koch W, van der Riet P, Hruban RH, Roa RA, et al The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res.* 1993 Oct 1; 53(19):4477-80.
349. Tjebbes GW, Leppers vd Straat FG, Tilanus MG, Hordijk GJ, Slootweg PJ. p53 tumor suppressor gene as a clonal marker in head and neck squamous cell carcinoma: p53 mutations in primary tumor and matched lymph node metastases. *Oral Oncol.* 1999 Jul; 35(4):384-9.
350. De Paula AM, Souza LR, Farias LC, Corrêa GT, Fraga CA, Eleutério NB, et al. Analysis of 724 cases of primary head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) with a focus on young patients and p53 immunolocalization. *Oral Oncol.* 2009 Sep; 45(9):777-82.
- 351 Pickering CR, Zhang J, Neskey DM, Zhao M, Jasser SA, Wang J, et al Squamous cell carcinoma of the oral tongue in young non-smokers is genomically similar to tumors in older smokers. *Clin Cancer Res.* 2014 Jul 15; 20(14):3842-8.

352. Perrone F, Bossi P, Cortelazzi B, Locati L, Quattrone P, Pierotti MA, et al. TP53 mutations and pathologic complete response to neoadjuvant cisplatin and fluorouracil chemotherapy in resected oral cavity squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2010 Feb 10; 28(5):761-6.
353. Lu HY, Lin RT, Zhou GX, Yu TM, Liu ZJ. Critical Role of p53 and K-ras in the Diagnosis of Early Colorectal Cancer: a One-center, Single-center Analysis. *Int J Med Sci*. 2017 Sep 13; 14(11):1154-1162.
354. Zhou G, Liu Z, Myers JN. TP53 Mutations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Their Impact on Disease Progression and Treatment Response. *J Cell Biochem*. 2016 Dec; 117(12):2682-2692.
355. Seijas-Tamayo R, Fernández-Mateos J, Adansa Klain JC, Mesía R, Pastor Borgoñón M, Pérez-Ruiz E, et al. Epidemiological characteristics of a Spanish cohort of patients diagnosed with squamous cell carcinoma of head and neck: distribution of risk factors by tumor location. *Clin Transl Oncol*. 2016 Nov; 18(11):1114-1122.
356. Oken MM, Creech RH, Davis TE. Toxicology and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. Vol. 5, *American Journal of Clinical Oncology: Cancer Clinical Trials*. 1982. p. 649–55.
357. Licitra L, Keilholz U, Tahara M, Lin JC, Chomette P, Ceruse P, et al. Evaluation of the benefit and use of multidisciplinary teams in the treatment of head and neck cancer *Oral Oncol*. 2016 Aug; 59: 73-79.
358. Friedland PL, Bozic B, Dewar J, Kuan R, Meyer C, Phillips M. Impact of multidisciplinary team management in head and neck cancer patients. *Br J Cancer*. 2011 Apr 12; 104(8):1246-8.
359. Carta F, Quartu D, Mariani C, Tatti M, Marrosu V, Gioia E, et al. Compartmental Surgery with Microvascular Free Flap Reconstruction in Patients With T1-T4 Squamous Cell Carcinoma of the Tongue: Analysis of Risk Factors, and Prognostic Value of the 8th Edition AJCC TNM Staging System. *Front Oncol*. 2020 Jul 14; 10:984.

360. Hernández-Vila C. Current prognosis and quality of life following surgical treatment for head and neck squamous cell carcinoma. *Plast Aesthetic Res.* 2016; 3(6):203.
361. Nguyen AT, Luu M, Mallen-St Clair J, Mita AC, Scher KS, Lu DJ, et al. Comparison of Survival After Transoral Robotic Surgery vs Nonrobotic Surgery in Patients with Early-Stage Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *JAMA Oncol.* 2020 Oct 1; 6(10):1555-1562.
362. Piccirillo JF, Vlahiotis A. Comorbidity in patients with cancer of the head and neck: prevalence and impact on treatment and prognosis. *Curr Oncol Rep.* 2006 Mar; 8(2):123 - 9.
363. Forastiere AA, Zhang Q, Weber RS, Maor MH, Goepfert H, Pajak TF, et al. Long-term results of RTOG 91-11: A comparison of three nonsurgical treatment strategies to preserve the larynx in patients with locally advanced larynx cancer. *J Clin Oncol.* 2013; 31(7):845–52.
364. Machtay M, Moughan J, Trotti A, Garden AS, Weber RS, Cooper JS, et al. Factors associated with severe late toxicity after concurrent chemoradiation for locally advanced head and neck cancer: an RTOG analysis. *J Clin Oncol.* 2008 Jul 20; 26(21):3582-9.
365. Duple EB, Richmond RC, O'Hara JA, Coughlin CT. Carboplatin as a potentiator of radiation therapy. *Cancer Treat Rev.* 1985 Sep; 12 Suppl A: 111-24
366. Jeremic B, Shibamoto Y, Milicic B, Nikolic N, Dagovic A, Aleksandrovic J, et al. Hyperfractionated radiation therapy with or without concurrent low-dose daily cisplatin in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a prospective randomized trial. *J Clin Oncol.* 2000 Apr; 18(7):1458-64.
367. Jeremic B, Milicic B, Dagovic A, Vaskovic Z, Tadic L. Radiation therapy with or without concurrent low-dose daily chemotherapy in locally advanced, nonmetastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol.* 2004 Sep 1; 22(17):3540-8.
368. Chitapanarux I, Lorvidhaya V, Kamnerdsupaphon P, Sumitsawan Y, Tharavichitkul

E, Sukthomya V, et al. Chemoradiation comparing cisplatin versus carboplatin in locally advanced nasopharyngeal cancer: randomised, non-inferiority, open trial. *Eur J Cancer*. 2007 Jun; 43(9):1399-406.

369. Wilkins AC, Rosenfelder N, Schick U, Gupta S, Thway K, Nutting CM, et al. Equivalence of cisplatin and carboplatin-based chemoradiation for locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a matched-pair analysis. *Oral Oncol*. 2013 Jun; 49(6):615-9.

370. Aguiar PN Jr, Tadokoro H, da Silva GF, Landgraf MM, Noia Barreto CM, Filardi BA, et al. Definitive chemoradiotherapy for squamous head and neck cancer: cisplatin versus carboplatin? A meta-analysis. *Future Oncol*. 2016 Dec; 12(23):2755-2764.

371. Iglesias Docampo LC, Arrazubi Arrula V, Baste Rotllan N, Carral Maseda A, Cirauqui Cirauqui B, Escobar Y. et al. SEOM clinical guidelines for the treatment of head and neck cancer (2017). *Clin Transl Oncol*. 2018 Jan; 20(1):75-83.

372. Uozumi S, Enokida T, Suzuki S, Nishizawa A, Kamata H, Okano T et al. Predictive Value of Cetuximab-Induced Skin Toxicity in Recurrent or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and NECK. *Front Oncol*. 2018 Dec 13; 8:616.

373. Hichert V, Scholl C, Steffens M, Paul T, Schumann C, Rüdiger S et al. Predictive blood plasma biomarkers for EGFR inhibitor-induced skin rash. *Oncotarget*. 2017 May 23; 8(21):35193-35204.

374. Klinghammer K, Knödler M, Schmittel A, Budach V, Keilholz U, Tinhofer I. Association of epidermal growth factor receptor polymorphism, skin toxicity, and outcome in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck receiving cetuximab-docetaxel treatment. *Clin Cancer Res*. 2010 Jan 1; 16(1):304-10.

375. Szturz P, Specenier P, Van Laer C, Van Den Weyngaert D, Corthouts B, Carp L et al. Long-term remission of locally recurrent oropharyngeal cancer after docetaxel-based chemotherapy plus cetuximab. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2016 Jun; 273(6):1629-36.

376. Linares J, Rullan A, Taberna M, Vazquez S, Mesia R. Emergence of long-term

surviving patients with the introduction of Cetuximab in recurrent/metastatic disease of squamous cell carcinoma of head and neck. *Oral Oncol.* 2016 Apr; 55: e4.

377. Oliver JR, Lieberman SM, Tam MM, Liu CZ, Li Z, Hu KS et al. Human papillomavirus and survival of patients with sinonasal squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2020 Apr 1; 126(7):1413-1423.

378. Mehanna H, Taberna Sanz M, Tous S, Brooks J, von Buchwald C, Mena M, et al. 911O Performance of dual p16 and HPV testing for determining prognosis in cancer of the oropharynx, the EPIC-OPC Study. *Ann Oncol [Internet].* 2020 Sep; 31: S658–9

379. Ellervik C, Vaught J. Preanalytical variables affecting the integrity of human biospecimens in biobanking. *Clin Chem.* 2015 Jul; 61(7):914-34.

380. Kass EM, Moynahan ME, Jasin M. Loss of 53BP1 is a gain for BRCA1 mutant cells. *Cancer Cell.* 2010 May 18; 17(5):423-5.

381. Allen C, Halbrook J, Nickoloff JA. Interactive competition between homologous recombination and non-homologous end joining. *Mol Cancer Res.* 2003 Oct; 1(12):913-20.

382. Panier S, Boulton SJ. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Jan; 15(1):7-18.

383. Nyati MK, Morgan MA, Feng FY, Lawrence TS. Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2006 Nov; 6(11):876-85.

384. Neboori HJ, Haffty BG, Wu H, Yang Q, Aly A, Goyal S, et al. Low p53 binding protein 1 (53BP1) expression is associated with increased local recurrence in breast cancer patients treated with breast-conserving surgery and radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012 Aug 1; 83(5): e677-83

385. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr, Di Maria MV, Veve R, Bremmes RM, et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation

between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol*. 2003 Oct 15; 21(20):3798-807.

386. Im JY, Kim BK, Lee KW, Chun SY, Kang MJ, Won M. DDIAS promotes STAT3 activation by preventing STAT3 recruitment to PTPRM in lung cancer cells. *Oncogenesis*. 2020 Jan 2; 9(1):1.

387. Ecker A, Simma O, Hoelbl A, Kenner L, Beug H, Moriggl R et al. The dark and the bright side of Stat3: proto-oncogene and tumor-suppressor. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009 Jan 1; 14: 2944-58.

388. Li S, Sheng B, Zhao M, Shen Q, Zhu H, Zhu X. The prognostic values of signal transducers activators of transcription family in ovarian cancer. *Biosci Rep*. 2017 Jul 16; 37(4): BSR20170650.

389. Aleskandarany MA, Agarwal D, Negm OH, Ball G, Elmouna A, Ashankyty I et al. The prognostic significance of STAT3 in invasive breast cancer: analysis of protein and mRNA expressions in large cohorts. *Breast Cancer Res Treat*. 2016 Feb; 156(1):9-20.

390. Wu P, Wu D, Zhao L, Huang L, Shen G, Huang J, et al. Prognostic role of STAT3 in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2016 Apr 12; 7(15):19863-83.

391. Lassmann S, Schuster I, Walch A, Göbel H, Jütting U, Makowiec F, et al. STAT3 mRNA and protein expression in colorectal cancer: effects on STAT3-inducible targets linked to cell survival and proliferation. *J Clin Pathol*. 2007 Feb; 60(2):173-9.

392. Yang J, Stark GR. Roles of unphosphorylated STATs in signaling. *Cell Res*. 2008 Apr; 18 (4):443-51.

393. Jones PA, Ohtani H, Chakravarthy A, De Carvalho DD. Epigenetic therapy in immune oncology. *Nat Rev Cancer*. 2019 Mar; 19(3):151-161.

394. Udali S, De Santis D, Ruzzenente A, Moruzzi S, Mazzi F, Beschin G, et al. DNA

Methylation and Hydroxymethylation in Primary Colon Cancer and Synchronous Hepatic Metastasis. *Front Genet.* 2018 Jan 9; 8:229.

395. Martínez-Cardús A, Moran S, Musulen E, Moutinho C, Manzano JL, Martínez-Balibrea E, et al. Epigenetic Homogeneity Within Colorectal Tumors Predicts Shorter Relapse-Free and Overall Survival Times for Patients With Locoregional Cancer. *Gastroenterology.* 2016 Nov; 151(5):961-972.

396. Duruisseaux M, Martínez-Cardús A, Calleja-Cervantes ME, Moran S, Castro de Moura M, Davalos V, et al. Epigenetic prediction of response to anti-PD-1 treatment in non-small-cell lung cancer: a multicentre, retrospective analysis. *Lancet Respir Med.* 2018 Oct; 6(10):771-781.

ANEXO 1. Equivalencias entre las escalas que evalúan el PS

Escalas antiguas (356)

Tabla 37. Escalas antiguas de evaluación del *performance status*

Grado	ECOG	Karnofsky
0	Completamente activo, capaz de llevar a cabo las actividades que realizaba previamente a la enfermedad sin limitaciones	100. Actividad normal, asintomático
		90. Actividad normal, síntomas mínimos
1	Limitación para las actividades intensas, pero ambulatorio y capaz de llevar a cabo trabajos ligeras o sedentarias	80. Realiza actividad normal con esfuerzo, síntomas mínimos
		70. Independiente para las actividades de la vida diaria, pero incapaz de trabajar
2	Ambulatorio, independiente para las actividades de la vida diaria, pero incapaz de trabajar. Más del 50% de las horas de vigilia fuera de la cama	60. Independiente para las actividades de la vida diaria, pero requiere ayuda ocasional
		50. Requiere ayuda frecuentemente y, a menudo, cuidados médicos
3	Parcialmente dependiente para las actividades de la vida diaria, más del 50% de las horas de vigilia en sofá-cama	40. Dependiente para las actividades de la vida diaria
		30. Requiere hospitalización aunque no muerte inminente
4	Totalmente dependiente para las actividades de la vida diaria o totalmente encamado	20. Muy enfermo, hospitalizado, requiere tratamiento sintomático y cuidados
		10. Situación de últimos días
5	Muerto	0. Muerto

Escalas actuales

Tabla 38. Escalas actuales de evaluación del *performance status*

Índice Karnofsky (IK)	Grado IK	Grado ECOG	Estado ECOG
Normal, asintomático	100	0	Completamente activo, capaz de llevar a cabo las actividades que realizaba previamente a la enfermedad sin limitaciones
Actividad normal, síntomas mínimos	90	1	Completamente activo, capaz de llevar a cabo las actividades que realizaba previamente a la enfermedad sin limitaciones
Realiza actividad normal con esfuerzo, síntomas mínimos	80	1	Completamente activo, capaz de llevar a cabo las actividades que realizaba previamente a la enfermedad sin limitaciones
Independiente para las actividades de la vida diaria, pero incapaz de trabajar	70	2	Ambulatorio, independiente para las actividades de la vida diaria, pero incapaz de trabajar. Más del 50% de las horas de vigilia fuera de la cama
Independiente para las actividades de la vida diaria, pero requiere ayuda ocasional	60	2	Ambulatorio, independiente para las actividades de la vida diaria, pero incapaz de trabajar. Más del 50% de las horas de vigilia fuera de la cama
Requiere ayuda frecuentemente y, a menudo, cuidados médicos	50	3	Parcialmente dependiente para las actividades de la vida diaria, más del 50% de las horas de vigilia en sofá-cama
Dependiente para las actividades de la vida diaria	40	3	Parcialmente dependiente para las actividades de la vida diaria, más del 50% de las horas de vigilia en sofá-cama
Requiere hospitalización aunque no muerte inminente	30	4	Totalmente dependiente para las actividades de la vida diaria o totalmente encamado
Muy enfermo, hospitalizado, requiere tratamiento sintomático y cuidados	20	4	Totalmente dependiente para las actividades de la vida diaria o totalmente encamado
Situación de últimos días	10	4	Totalmente dependiente para las actividades de la vida diaria o totalmente encamado
Muerto	0	5	Muerto

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7165009>

<https://oncologypro.esmo.org/Oncology-in-Practice/Practice-Tools/Performance-Scales>

ANEXO 2. Criterios RECIST (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*)

Los criterios RECIST son el método estándar para monitorizar la respuesta al tratamiento mediante las medidas unidimensionales de los tumores, obtenidas mediante técnicas de imagen reproducible como son la tomografía computerizada, la resonancia magnética y la tomografía por emisión de positrones. Fueron desarrollados y publicados por Therasse et al (2000), los RECIS 1.0 y revisados por Eisenhauer et al en 2009, los RECIST 1.1.

Las lesiones pueden considerarse dianas o medibles (LM) o no diana o medibles (LNM).

Según el cambio del sumatorio de los diámetros de las LM se considera:

- Respuesta completa (RC): desaparición de todas las lesiones medibles (adenopatías de <10 mm)
- Respuesta parcial (RP): disminución de, al menos, un 30% de la suma de los diámetros de las lesiones diana
- Enfermedad estable (EE): no se cumplen los criterios de RC, RP ni PE
- Progresión de enfermedad (PE): aumento de, al menos, un 20% de la suma de los diámetros de las lesiones diana

En la última versión, esta valoración de respuesta puede variar en función del comportamiento de las LNM y/o de la aparición de nuevas lesiones.

Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. J Natl Cancer Inst. 2000 Feb 2; 92(3):205-16.

Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). Eur J Cancer. 2009 Jan; 45(2):228-47.

Tabla 39. Valoración de respuesta en función del comportamiento de las lesiones no medibles y/o la aparición de nuevas lesiones en RECIST 1.1

LM	LNM	Nueva lesión	Respuesta
RC	RC	No	RC
RC	No RC/NoPE	No	RP
RP	No PE	No	RP
EE	No PE	No	EE
PE	cualquiera	Si/no	PE
cualquiera	PE	Sí/no	PE
cualquiera	cualquiera	Sí	PE

Tabla 40. Comparación entre los criterios RECIST 1.0 y 1.1

Criterios	RECIST 1.0	RECIST 1.1
Definición de LM	Tamaño mínimo 10 mm en TC helicoidal o 20 mm en convencional	Tamaño mínimo 10 mm en TC
Método de medida	Diámetro mayor	Diámetro mayor
Adenopatías	No especificado	Eje corto LM > 15 mm LNM 10-15 mm No patológicas < 10 mm
Número de LM	No aplicable	Máximo 5 lesiones en total Máximo 2 lesiones por órgano
Nuevas lesiones	No aplicable	Proporciona criterios de actuación cuando aparece una lesión nueva
Pruebas de imagen	TC, RM, Radiografía de tórax	TC, RM, PET

ANEXO 3. Resultados del análisis exploratorio de la serie ERBITAX

Exponemos el análisis preliminar que se realizó en 22 muestras tumorales de pacientes con CECC R/M tratados en nuestro centro con paclitaxel y cetuximab con el objetivo de explorar la relación de la eficacia de la combinación con los niveles de expresión de ARNm de diferentes genes implicados en las vías de las MAPK y otras vías alternativas, además de la mutación de *TP53*.

Ante los resultados de este análisis, seleccionamos la vía de STAT3 (metilación de *PPRPT*, expresión de pSTAT3 y niveles de ARNm de STAT3) como objeto de nuestro estudio en la serie ERBITAX ampliada.

En la Tabla 41. exponemos la TR en función de los niveles de expresión de ARNm de los genes explorados y de la presencia de la mutación de *TP53*. Observamos que no hay diferencias significativas en relación con ninguno de ellos.

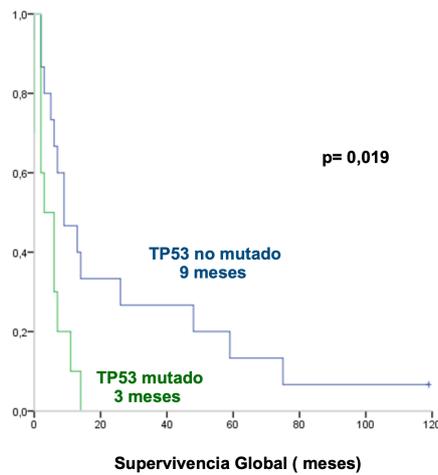
Tabla 41. Respuesta según la expresión de ARNm y mutación de diferentes genes en el análisis exploratorio de la serie ERBITAX

TASA DE RESPUESTA (TR)			
Niveles de expresión de ARNm	Bajos	Altos	P
	(%)	(%)	
AXL	57,14	75	0,855
EGFR	60	66,67	1
SPHK1	44,4	80	0,259
YAP	44,4	80	0,259
Mutación	No	Sí	
TP53	57	71	0,874

Tampoco encontramos diferencias significativas en la SG según los niveles de ARNm de AXL, EGFR, SPHK1 ni YAP1.

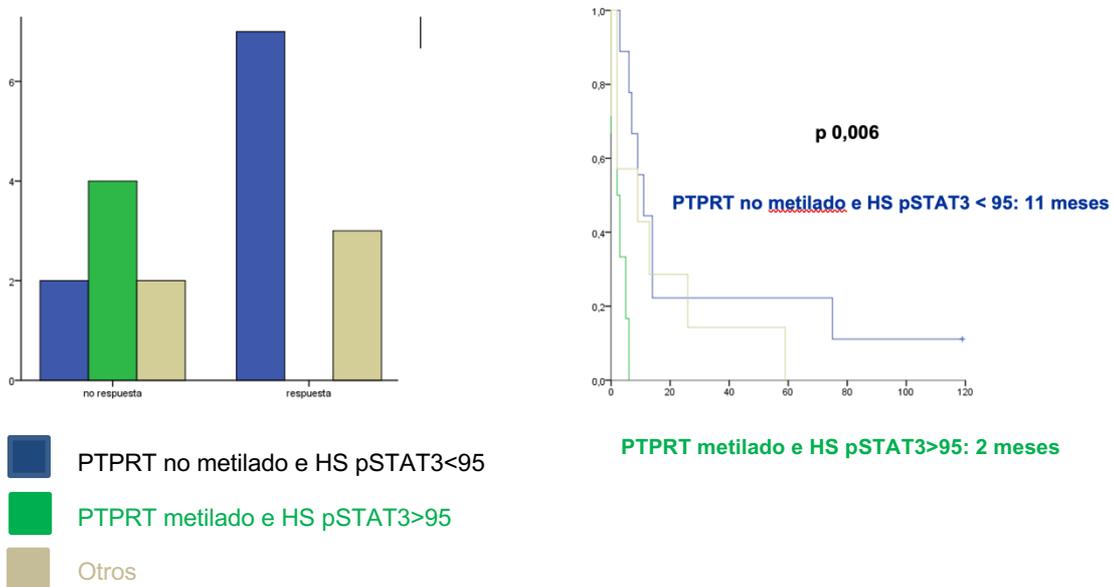
Observamos diferencias en la SG según la presencia de la mutación de *TP53*, un factor pronóstico conocido, de tal manera, que los pacientes con tumores con mutación de TP53 alcanzaron SG significativamente inferiores a los que no la tenían (3 vs 9 meses, p 0,019) (Figura 34).

Figura 34. SG en función la mutación de TP53 en el análisis exploratorio



A continuación, exponemos los resultados preliminares obtenidos al combinar la metilación de *PTPRT* y la expresión de pSTAT3 medida mediante el Histoscore (HS) comentado con anterioridad. Los pacientes cuyos tumores tenían metilación de *PTPRT* y sobreexpresión de pSTAT3 no obtuvieron ninguna respuesta, frente al 77,78 % de los que no tenían ni metilación de *PTPRT* ni sobreexpresión de pSTAT3 ($p= 0,033$) y una SG muy inferior al resto (Figura 35).

Figura 35: Respuesta y supervivencia global según la metilación de PTPRT y la sobreexpresión de pSTAT3 por HS en el análisis exploratorio



ANEXO 4. Análisis de la correlación entre la metilación de *PTPRT* y la sobreexpresión de pSTAT3 según los diferentes patólogos

Hemos descrito en el apartado de material y métodos que, por cuestiones logísticas, la determinación de pSTAT3 se llevó a cabo en dos fases en el tiempo, con dos anticuerpos diferentes y valorada por dos patólogos distintos.

A continuación, detallamos los dos análisis y la correlación de los resultados obtenidos con la metilación de *PTPRT* (Tablas 42 y 43 y Figuras 36 y 37)

² **Tabla 42. Correlación entre la metilación de *PTPRT* y la sobreexpresión de STAT3 en la serie ERBITAX según el análisis del patólogo A**

		pSTAT3 2 y/o 3		Total
		NO	SI	
PTPRT	Metilado	5	7	12
	No metilado	0	10	10
Total		5	17	22

Fisher 0,03

Figura 36. Correlación entre la metilación de *PTPRT* y la sobreexpresión de STAT3 en la serie ERBITAX según el análisis del patólogo A

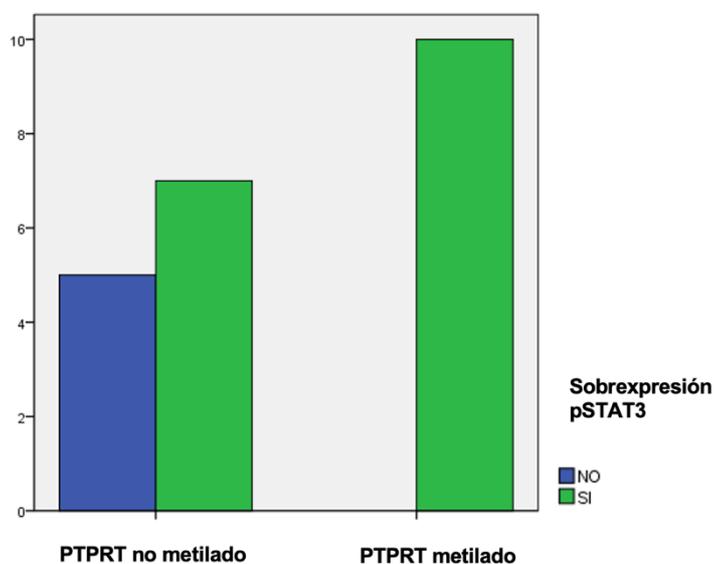
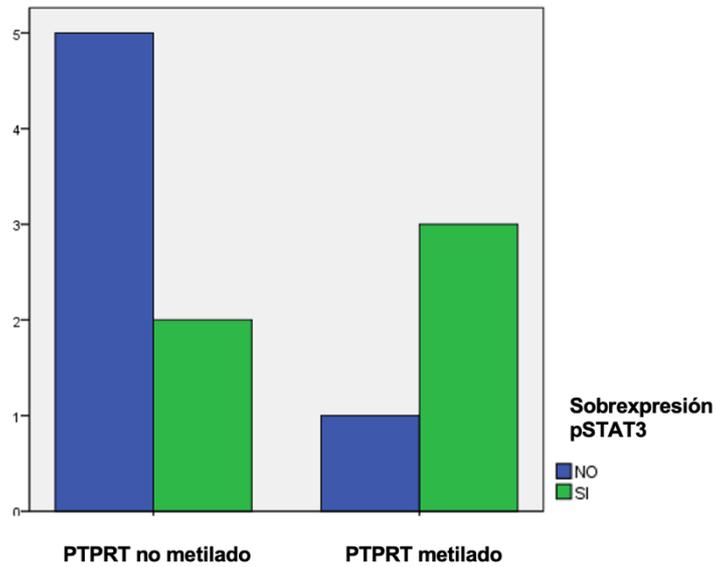


Tabla 43. Correlación entre la metilación de PTPRT y la sobreexpresión de STAT3 en la serie ERBITAX según el análisis del patólogo B

		pSTAT3 2 y/o 3		
		NO	SI	Total
PTPRT	Metilado	5	2	7
	No metilado	1	3	4
Total		6	5	11

Fisher 0,197

Figura 37. Correlación entre la metilación de PTPRT y la sobreexpresión de STAT3 en la serie ERBITAX según el análisis del patólogo B



ANEXO 5. Anexo de resultados

Correlación de los parámetros clínicos con activación de la vía STAT3

Tabla 44. Distribución de la metilación de *PTPRT* según los parámetros clínicos en la serie ERBITAX

	Total	No metilado	Metilado	p
	N=34	N=20	N=14	
Cetuximab previo, n (%):				0.627
Sí	5 (14.7%)	2 (10.0%)	3 (21.4%)	
No	29 (85.3%)	18 (90.0%)	11 (78.6%)	
Taxano previo, n (%):				0.252
Sí	10 (29.4%)	4 (20.0%)	6 (42.9%)	
No	24 (70.6%)	16 (80.0%)	8 (57.1%)	
PS en el momento de la recidiva, n (%):				0.155
0	9 (26.5%)	6 (30.0%)	3 (21.4%)	
1	21 (61.8%)	10 (50.0%)	11 (78.6%)	
2	4 (11.8%)	4 (20.0%)	0 (0.0%)	
PS en el momento de la recidiva, n (%):				0.126
0-1	30 (88.2%)	16 (80.0%)	14 (100.0%)	
2	4 (11.8%)	4 (20.0%)	0 (0.0%)	
PS en el momento de la recidiva, n (%):				0.704
0	9 (26.5%)	6 (30.0%)	3 (21.4%)	
1-2	25 (73.5%)	14 (70.0%)	11 (78.6%)	
Reacción acneiforme, n (%):				0.529
0	5 (14.7%)	2 (10.0%)	3 (21.4%)	
1	9 (26.5%)	7 (35.0%)	2 (14.3%)	
2	15 (44.1%)	8 (40.0%)	7 (50.0%)	
3	5 (14.7%)	3 (15.0%)	2 (14.3%)	

Tabla 45. Distribución de la sobreexpresión de pSTAT3 según los parámetros clínicos en la serie ERBITAX

	Total	Presente	Ausente	p
	N=33	N=22	N=11	
Cetuximab previo, n (%):				0.143
Sí	5 (15.2%)	5 (22.7%)	0 (0.0%)	
No	28 (84.8%)	17 (77.3%)	11 (100.0%)	
Taxano previo, n (%):				0.430
Sí	10 (30.3%)	8 (36.4%)	2 (18.2%)	
No	23 (69.7%)	14 (63.6%)	9 (81.8%)	
PS en el momento de la recidiva, n (%):				0.316
0	8 (24.2%)	4 (18.2%)	4 (36.4%)	
1	21 (63.6%)	16 (72.7%)	5 (45.5%)	
2	4 (12.1%)	2 (9.1%)	2 (18.2%)	
PS en el momento de la recidiva, n (%):				0.586
0-1	29 (87.9%)	20 (90.9%)	9 (81.8%)	
2	4 (12.1%)	2 (9.1%)	2 (18.2%)	
PS en el momento de la recidiva, n (%):				0.391
0	8 (24.2%)	4 (18.2%)	4 (36.4%)	
1-2	25 (75.8%)	18 (81.8%)	7 (63.6%)	
Reacción acneiforme, n (%):				0.702
0	5 (15.2%)	4 (18.2%)	1 (9.1%)	
1	9 (27.3%)	7 (31.8%)	2 (18.2%)	
2	14 (42.4%)	8 (36.4%)	6 (54.5%)	
3	5 (15.2%)	3 (13.6%)	2 (18.2%)	

Tabla 46. Distribución de los niveles de expresión de ARNm de STAT3 según los parámetros clínicos en la serie ERBITAX

	Total	Bajos	Altos	p
	<i>N=21</i>	<i>N=14</i>	<i>N=7</i>	
Cetuximab previo, n (%):				1.000
Sí	1 (4.8%)	1 (7.1%)	0 (0.0%)	
No	20 (95.2%)	13 (92.9%)	7 (100.0%)	
Taxano previo, n (%):				1.000
Sí	4 (19.0%)	3 (21.4%)	1 (14.3%)	
No	17 (81.0%)	11 (78.6%)	6 (85.7%)	
PS en el momento de la recidiva, n (%):				0.023
0	6 (28.6%)	6 (42.9%)	0 (0.0%)	
1	12 (57.1%)	5 (35.7%)	7 (100.0%)	
2	3 (14.3%)	3 (21.4%)	0 (0.0%)	
PS en el momento de la recidiva, n (%):				0.521
0-1	18 (85.7%)	11 (78.6%)	7 (100.0%)	
2	3 (14.3%)	3 (21.4%)	0 (0.0%)	
PS en el momento de la recidiva, n (%):				0.061
0	6 (28.6%)	6 (42.9%)	0 (0.0%)	
1-2	15 (71.4%)	8 (57.1%)	7 (100.0%)	
Reacción acneiforme, n (%):				0.491
0	1 (4.8%)	0 (0.0%)	1 (14.3%)	
1	6 (28.6%)	5 (35.7%)	1 (14.3%)	
2	10 (47.6%)	6 (42.9%)	4 (57.1%)	
3	4 (19.0%)	3 (21.4%)	1 (14.3%)	

SLP según los parámetros de activación de la vía STAT3

Figura 38. Supervivencia libre de progresión según la metilación de *PTPRT* en la serie ERBITAX

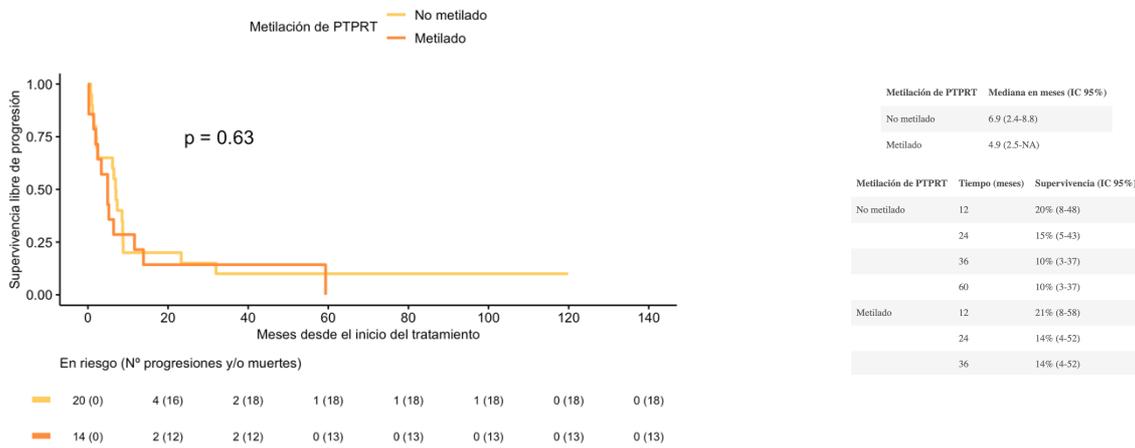


Figura 39. Supervivencia libre de progresión según la sobreexpresión de pSTAT3 en la serie ERBITAX

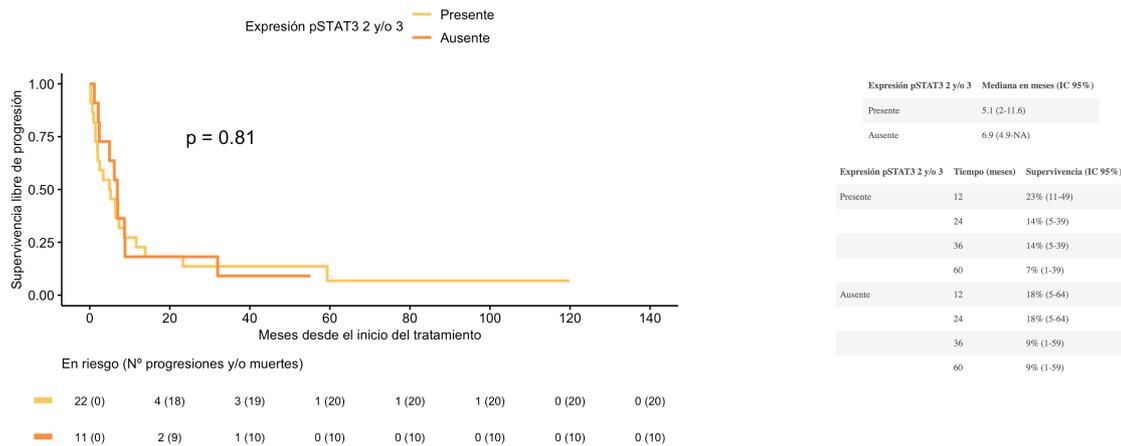
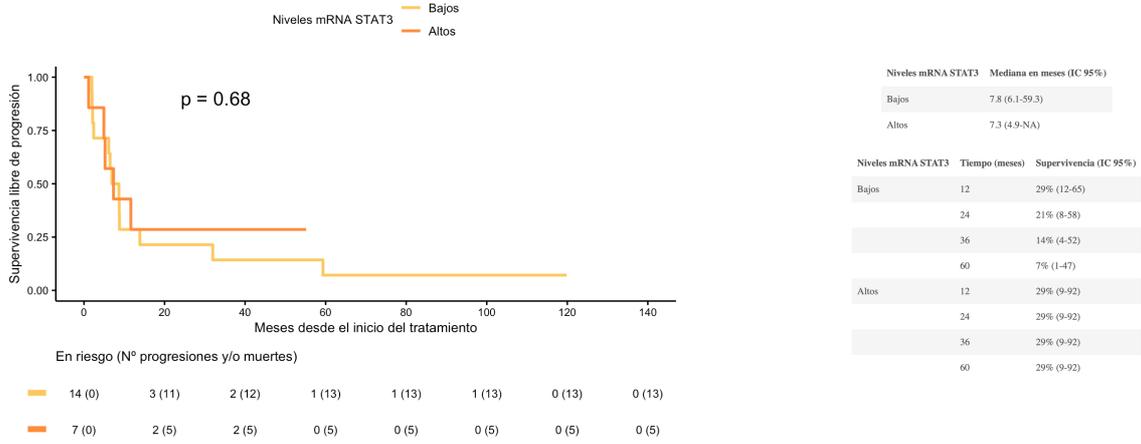


Figura 40. Supervivencia libre de progresión según los niveles de ARNm de STAT3 en la serie ERBITAX



SG según los parámetros de activación de la vía STAT3

Figura 41. Supervivencia global según la metilación de *PTPRT* en la serie ERBITAX

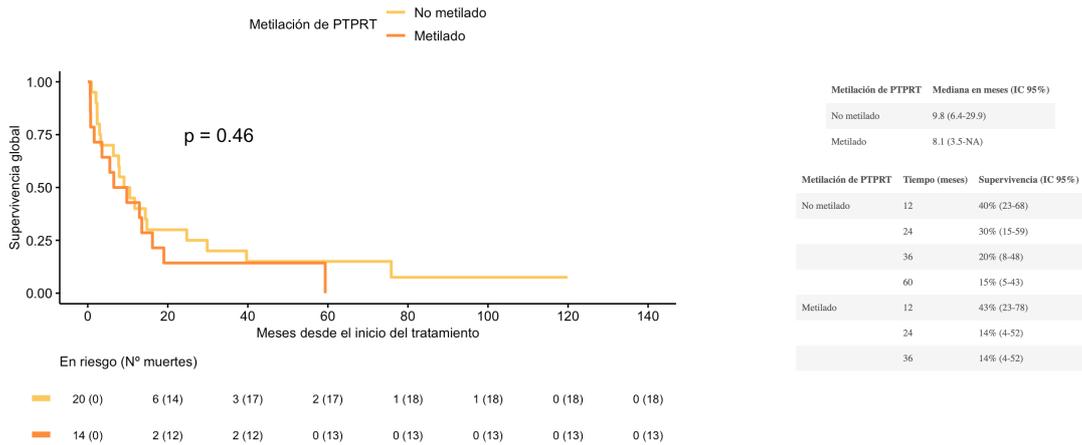


Figura 42. Supervivencia global según la sobreexpresión de pSTAT3 en la serie ERBITAX

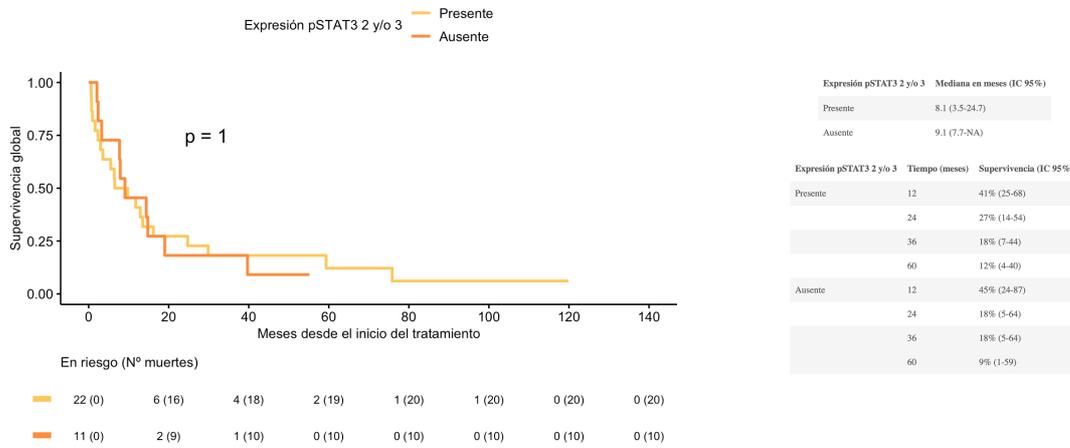
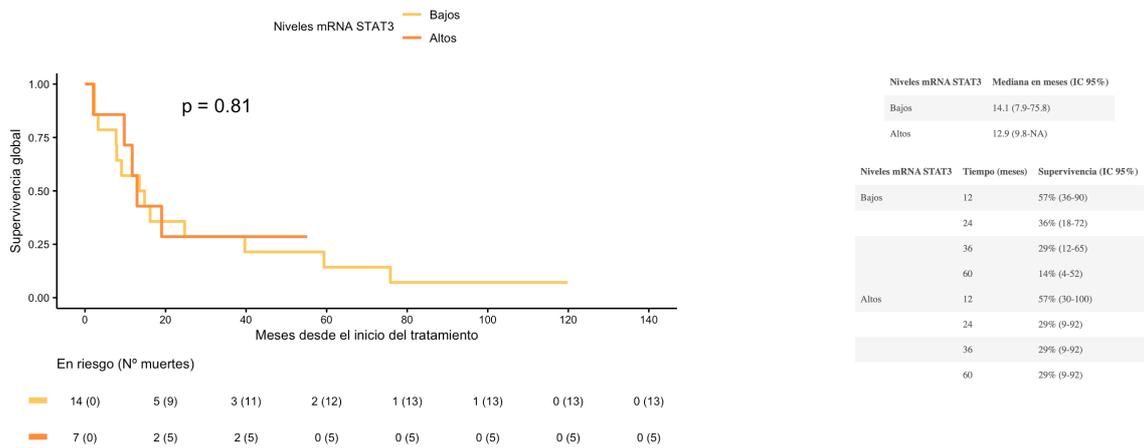


Figura 43. Supervivencia global según los niveles de ARNm de STAT3 en la serie ERBITAX



Supervivencia desde el diagnóstico según los parámetros de activación STAT3

Figura 44 Supervivencia desde el diagnóstico según la metilación de PTPRT en la serie ERBITAX

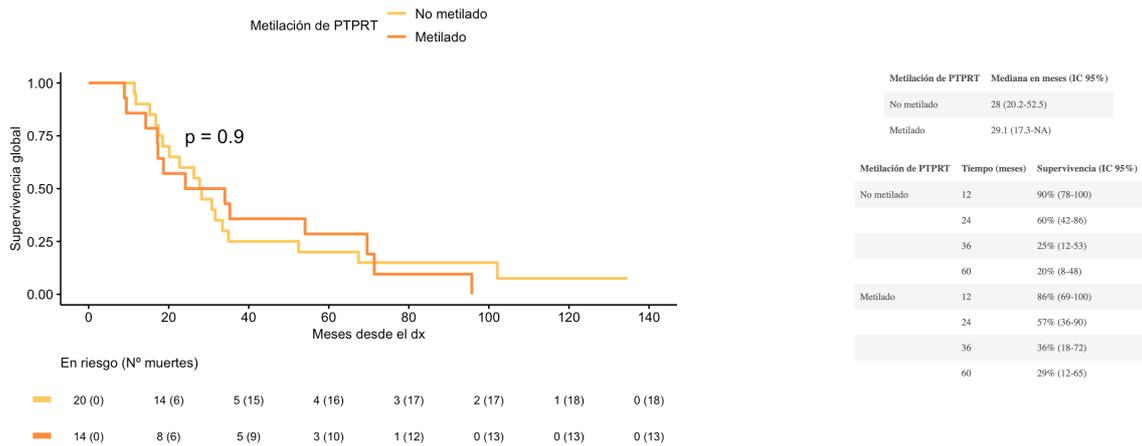


Figura 45. Supervivencia desde el diagnóstico según la sobreexpresión de pSTAT en la serie ERBITAX

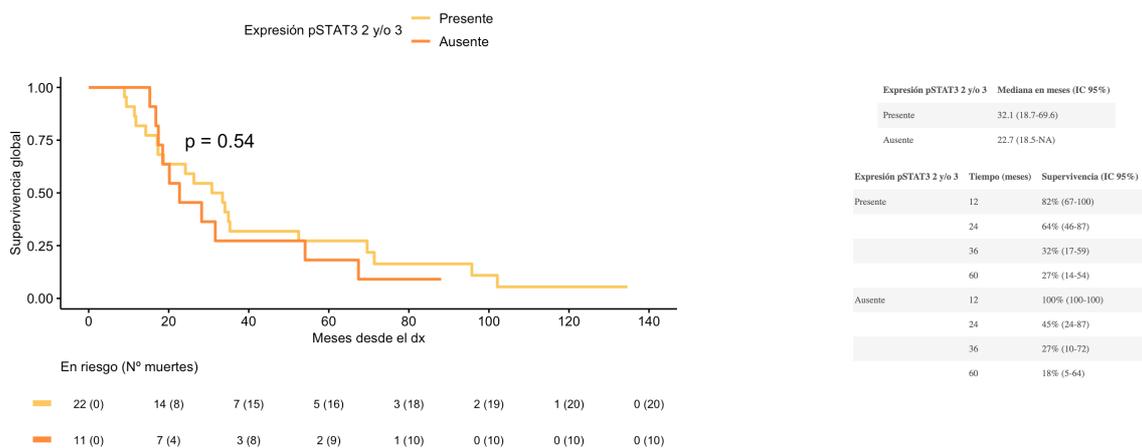
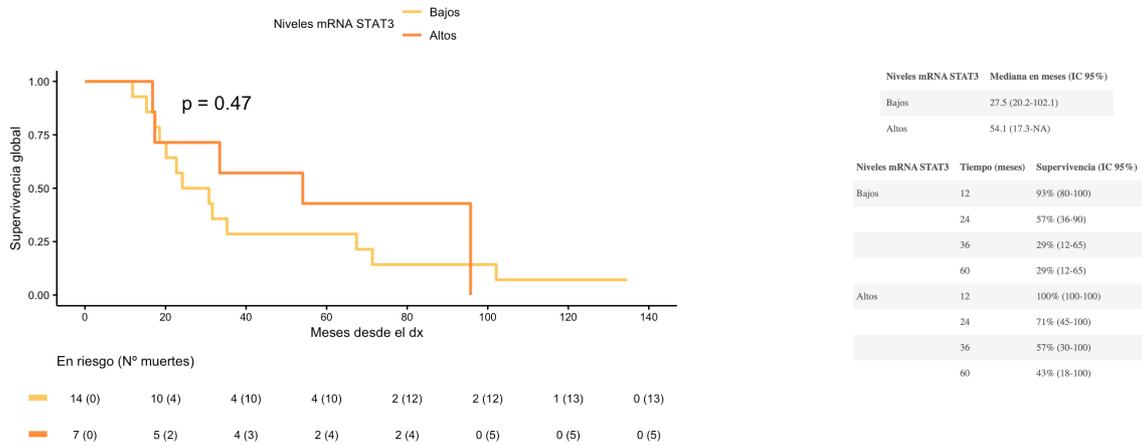


Figura 46. Supervivencia desde el diagnóstico según los niveles de ARNm de STAT3 en la serie ERBITAX

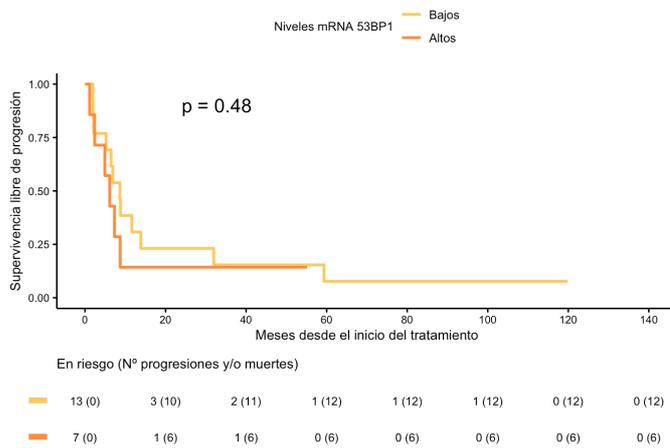


Papel de los niveles de ARNm de 53BP1 en la eficacia de ERBITAX

Tabla 47. Respuesta según los niveles de expresión de ARNm de 53BP1 en la serie ERBITAX

	Total	Respuesta	No respuesta o no valorable	p
	<i>N=21</i>	<i>N=12</i>	<i>N=9</i>	
53BP1, Mediana [RIQ]	3.2 [2.1;5.3]	3.2 [1.9;5.5]	3.6 [2.7;4.9]	0.569

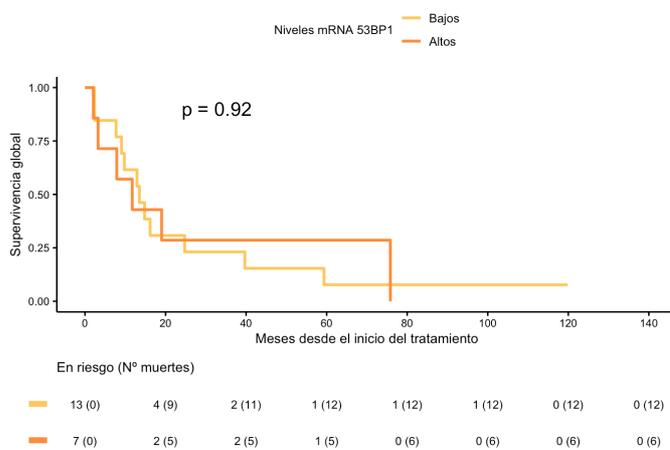
Figura 47. Supervivencia libre de progresión según los niveles de ARNm de 53BP1 en la serie ERBITAX



Niveles mRNA 53BP1	Mediana en meses (IC 95%)
Bajos	8.7 (5.2-NA)
Altos	6.1 (2.4-NA)

Niveles mRNA 53BP1	Tiempo (meses)	Supervivencia (IC 95%)
Bajos	12	31% (14-70)
	24	23% (9-62)
	36	15% (4-55)
Altos	12	8% (1-51)
	24	14% (2-88)
	36	14% (2-88)

Figura 48. Supervivencia global según los niveles de ARNm de 53BP1 en la serie ERBITAX



Niveles mRNA 53BP1	Mediana en meses (IC 95%)
Bajos	13.5 (9.1-NA)
Altos	11.7 (3.3-NA)

Niveles mRNA 53BP1	Tiempo (meses)	Supervivencia (IC 95%)
Bajos	12	62% (40-95)
	24	31% (14-70)
	36	23% (9-62)
	60	8% (1-51)
Altos	12	43% (18-100)
	24	29% (9-92)
	36	29% (9-92)
	60	29% (9-92)

Papel del VPH en la eficacia de ERBITAX

Figura 49. Supervivencia libre de progresión en el carcinoma de orofaringe según la relación con el HPV en la serie ERBITAX

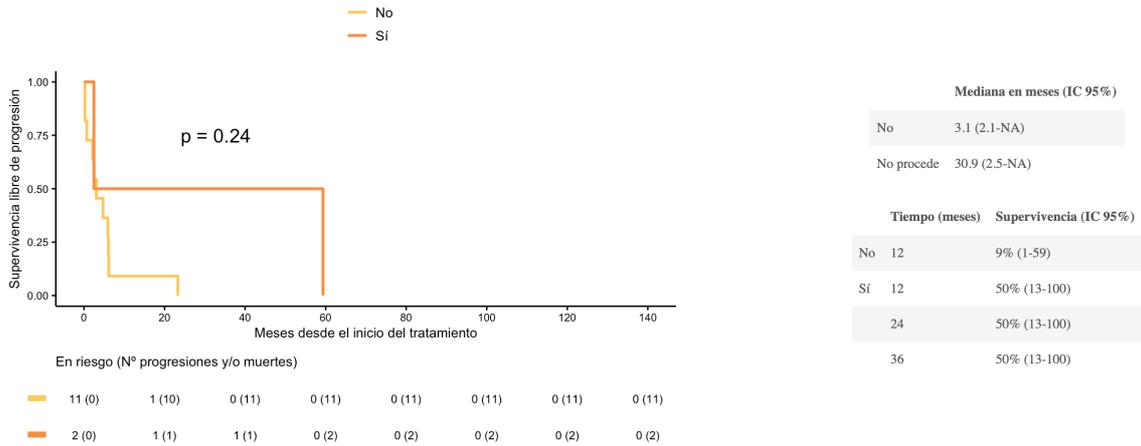
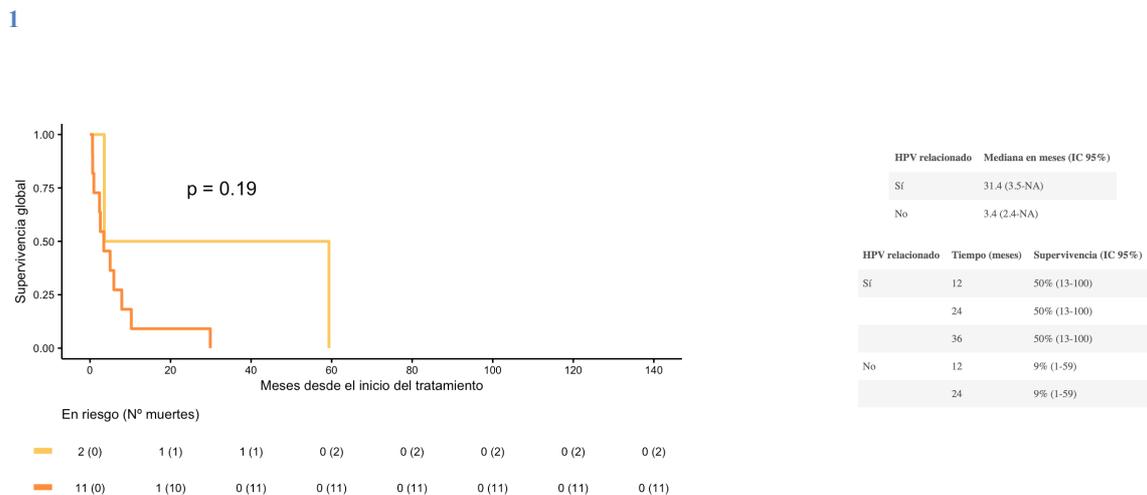


Figura 50. Supervivencia global en el carcinoma de orofaringe según la relación con el HPV en la serie ERBITAX



ANEXO 6. The Human Protein Atlas

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000168610-STAT3/cell>

Figura 51. Niveles de ARNm de STAT3 según el tipo de tumor en *The Human Protein Atlas*

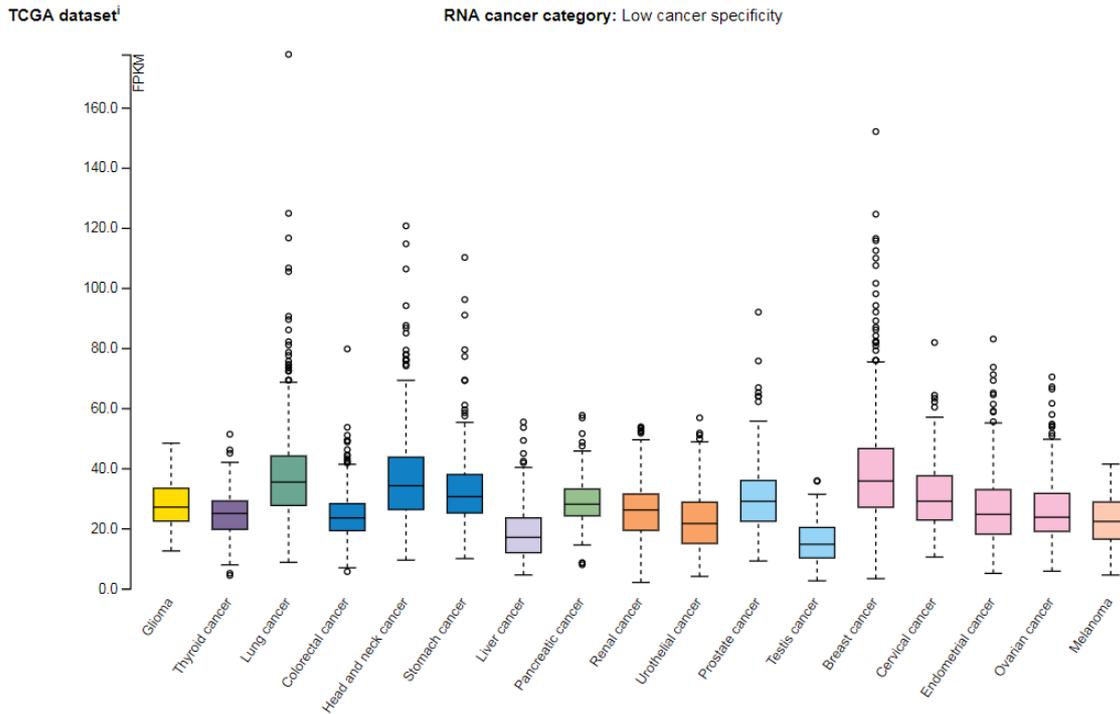


Figura 52. Niveles de expresión de proteína STAT3 según tipo de tumor en *The Human Protein Atlas*

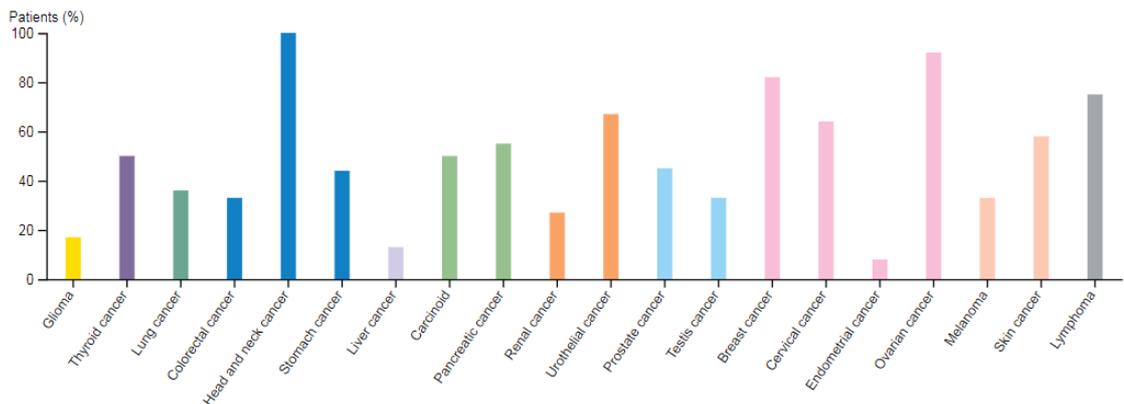
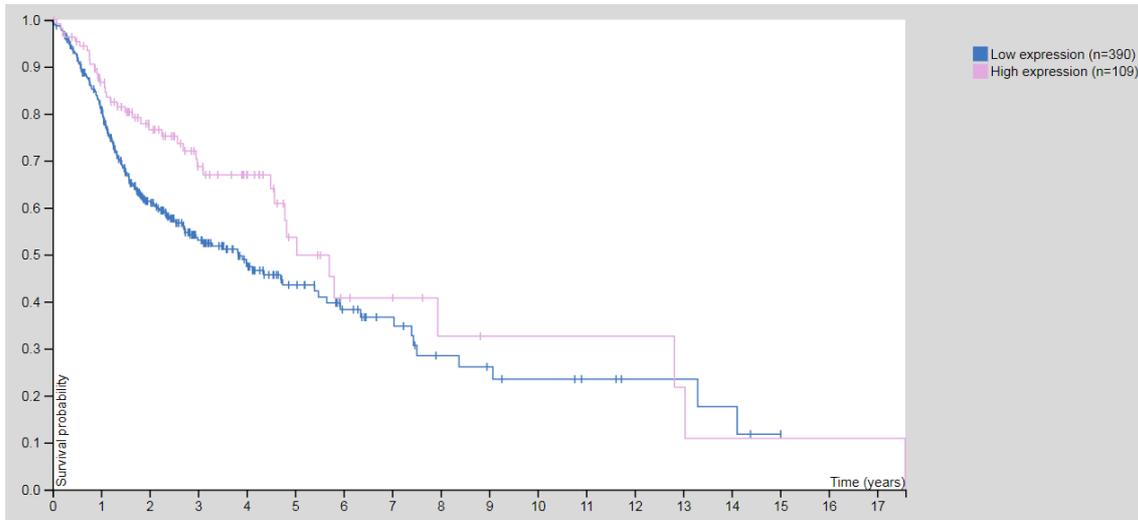


Figura 53. SG según los niveles de ARNm STAT3 en The Human Protein Atlas



ANEXO 7. Publicaciones y comunicaciones en el contexto de la tesis

1. Cirauqui B, Margelí M, Quiroga V, Quer A, Karachaliou N, Chaib I et al. DNA repair pathways to regulate response to chemoradiotherapy in patients with locally advanced head and neck cancer. *Tumour Biol.* 2016 Oct; 37(10):13435-13443.

doi: 10.1007/s13277-016-5149-0. Epub 2016 Jul 27. PMID: 27465548.

Impact Factor: 3,650 (Q2)

doi: 10.1007/s13277-016-5149-0. Epub 2016 Jul 27. PMID: 27465548.

doi: 10.1007/s13277-016-5149-0. Epub 2016 Jul 27. PMID: 27465548.

doi: 10.1007/s13277-016-5149-0. Epub 2016 Jul 27. PMID: 27465548.

doi: 10.1007/s13277-016-5149-0. Epub 2016 Jul 27. PMID: 27465548.

doi: 10.1007/s13277-016-5149-0. Epub 2016 Jul 27. PMID: 27465548.

doi: 10.1007/s13277-016-5149-0. Epub 2016 Jul 27. PMID: 27465548.

doi: 10.1007/s13277-016-5149-0. Epub 2016 Jul 27. PMID: 27465548.

doi: 10.1007/s13277-016-5149-0. Epub 2016 Jul 27. PMID: 27465548.

doi: 10.1007/s13277-016-5149-0. Epub 2016 Jul 27. PMID: 27465548.

2. B. Cirauqui Cirauqui, A. Bernat Peguera, A. Quer Pi-Sunyer, J.L. Ramírez Serrano, M. Domenech Viñolas, I. Teruel García, et al.

965P Role of STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) activation and its regulation by PTPRT (protein receptor tyrosine phosphatase type T) and response to paclitaxel and cetuximab in patients (P) with recurrent/metastatic (R/M) head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC),

Annals of Oncology, Volume 31, Supplement 4, 2020, Page S681,

ISSN 0923-7534

<https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.08.1080>.

(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923753420410762>)

965P **Role of STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) activation and its regulation by PTPRT (protein receptor tyrosine phosphatase type T) and response to paclitaxel and cetuximab in patients (P) with recurrent/metastatic (R/M) head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)**

B. Cirauqui Cirauqui¹, A. Bernat Peguera², A. Quer Pi-Sunyer³, J.L. Ramirez Serrano⁴, M. Domenech Viñolas⁵, I. Teruel Garcia⁵, V. Quiroga Garcia⁵, M. Margeli Vila⁵, I. Chaib⁶, L. Capdevila Riera⁷, A. Ferrando Diez⁵, A. Plaja Salarich⁵, L. Angelats Company⁵, S. España Fernandez⁵, G. Berenguer Peinado⁵, C. Lezcano Rubio⁹, C. Pollan Guisasaola⁹, A. Martinez Cardús⁹, R. Rosell Costa¹⁰, R. Mesia Nin⁵

¹Medical Oncology, Catalan Institut of Oncology (ICO) Badalona, Badalona Applied-Research Group in Oncology (B-ARGO), Germans Trias i Pujol Health Sciences Research Institute (IGTP), Badalona, Spain; ²Medical Oncology, Badalona Applied-Research Group in Oncology(B-ARGO), Germans Trias i Pujol Health Sciences Research Institute (IGTP), Badalona, Spain; ³Pathology, Germans Trias i Pujol Hospital, Badalona, Spain; ⁴Hematology, Molecular Biology Unit, Hematology Laboratory Catalan Institute of Oncology - Germans Trias i Pujol Hospital, Badalona, Spain; ⁵Medical Oncology, Catalan Institut of Oncology (ICO) Badalona, Badalona Applied-Research Group in Oncology (B-ARGO), Germans Trias i Pujol Health Sciences Research Institute (IGTP), Badalona, Spain; ⁶Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Germans Trias i Pujol Health Sciences Research Institute, Badalona, Spain; ⁷Medical Oncology, Sant Pau i Santa Tecla Hospital, Tarragona, Badalona Applied-Research Group in Oncology (B-ARGO), Germans Trias i Pujol Health Sciences Research Institute (IGTP), Tarragona, Spain; ⁸Pharmacy, Catalan Institut of Oncology (ICO) Badalona, Spain; ⁹Otolaryngology, Germans Trias i Pujol Hospital, Badalona, Spain; ¹⁰Medical Oncology, Germans Trias i Pujol Health Sciences Research Institute (IGTP), Autonomous University of Barcelona (UAB), Badalona, Spain

Background: Paclitaxel and cetuximab (ERBITAX) is widely used in platin-unfit R/M HNSCC. P. STAT3 signaling hyperactivation has been reported to promote development and progression of HNSCC. PTPRT protein acts as a negative regulator of STAT3. Loss of PTPRT function by mutation or promoter hypermethylation induces STAT3 phosphorylation and pathway activation. Paclitaxel decreases STAT3 phosphorylation and transcriptional activity in cell lines. Also, STAT3 is involved in epidermal growth factor receptor pathway, suggesting that may have a role in the response to cetuximab.

Methods: 34 P with R/M HNSCC treated with ERBITAX between 2008 and 2017 with available histological sample, clinical information and data on treatment efficacy were included in this retrospective study. STAT3 transcriptional levels were analyzed in 21 of 34 samples using TaqMan expression assays and quantitative real-time PCR technique. Cut-off point between high and low levels was the median value. Phosphorylated and therefore activated STAT3 form (pSTAT3) was analyzed by immunohistochemistry stratifying activation levels as 0, 1, 2 or 3+. PTPRT promoter hypermethylation was analyzed by methylation-specific PCR (MSP).

Results: 41% of tumors showed PTPRT promoter hypermethylation, significantly associated with a lower response rate (RR) (21 vs 60%, $p=0,026$). pSTAT3 overexpression (2 and/or 3+) was detected in 67% of tumors and was correlated with a non-statistically significant lower RR (36 vs 54%, $p=0,32$), similar to STAT3 mRNA transcriptional levels (43 vs 64%, $p=0,098$). PTPRT hypermethylation was correlated with pSTAT3 overexpression ($p=0,006$) but not with the expression levels. Overall survival of P whose tumors had PTPRT hypermethylated or pSTAT3 overexpressed was lower than those who did not have (6 vs 9 months), but this difference was not statistically significant.

Conclusions: Despite the limitations of this retrospective analysis with a small number of P, STAT3 pathway could be an interesting biomarker and therapeutic target that deserves further investigation in HNSCC.

Legal entity responsible for the study: The authors.

Funding: Has not received any funding.

Disclosure: B. Cirauqui Cirauqui: Advisory/Consultancy, Speaker Bureau/Expert testimony, Travel/Accommodation/Expenses: BMS; Advisory/Consultancy, Speaker Bureau/Expert testimony, Travel/Accommodation/Expenses: Roche; Advisory/Consultancy, Travel/Accommodation/Expenses: Merck; Speaker Bureau/Expert testimony, Travel/Accommodation/Expenses: Eisai; Travel/Accommodation/Expenses: Pierre-Fabre; Travel/Accommodation/Expenses: MSD. V. Quiroga Garcia: Speaker Bureau/Expert testimony, Travel/Accommodation/Expenses: Roche; Travel/Accommodation/Expenses: BMS; Travel/Accommodation/Expenses: Novartis; Travel/Accommodation/Expenses: Pfizer; Advisory/Consultancy: Kern. M. Margeli Vila: Advisory/Consultancy, Speaker Bureau/Expert testimony: Novartis; Advisory/Consultancy: Pfizer; Advisory/Consultancy: Roche; Advisory/Consultancy, Research grant/Funding (institution): Kern; Research grant/Funding (institution): Celgene. R. Mesia Nin: Advisory/Consultancy, Speaker Bureau/Expert testimony: BMS; Advisory/Consultancy, Speaker Bureau/Expert testimony: Merck; Advisory/Consultancy: MSD; Advisory/Consultancy: Roche; Advisory/Consultancy: Nanobiotics. All other authors have declared no conflicts of interest.

<https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.08.1080>

966P **Activation of the Wnt/PCP signaling pathway is an adverse prognostic predictor in patients with low grade glioma (LGG)**

L. Su, X.N. Li, C. Yan, Y.F. Yang

Medical Science and Research, Beijing Genetron Health Genetic Technology Co., Ltd., Beijing, China

Background: Previous studies have shown that Wnt/ planar cell polarity (PCP) pathway activation negatively correlates with survival in glioblastoma (GBM) patients. However, the role of the Wnt/PCP pathway in LGG development has not been elucidated. Although LGG patients have better prognosis compared to GBM patients, a small proportion of LGG patients show poor survival and no associated molecular/pathological factors have been found.

Methods: We integrated data of 510 LGG patients from The Cancer Genome Atlas (TCGA) and 375 LGG patients from the Chinese Glioma Genome Atlas (CGGA) database. All transcriptomic data were unified to remove batch effects and normalized as transcript per million base (TPM). Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of Wnt/PCP signaling pathway were evaluated by ssGSEA. Multivariate Cox model was used for survival analysis. Differential expression (DE) analysis was performed using edgeR, DE genes were identified based on if $FC > 2$ and q value < 0.05 . Feature selection was done using LASSO with λ equal to 0.082. Logistic regression was trained on TCGA dataset with CV, n folds was as large as the sample size. CGGA dataset was used as an independent validation set. Statistical differences between groups was evaluated using Wilcoxon signed-rank test.

Results: Top DE genes between Wnt/PCP high/low groups were enriched in blood-brain barrier (BBB) related pathways (q value < 0.05). We found DKK1, SFRP1 and SFRP2 in Wnt antagonist Dickkopf and sFRP gene families were significantly overexpressed in the Wnt low group ($P=0.05$). Survival analysis on the TCGA dataset showed that activity of the Wnt/PCP pathway significantly affected LGG patient survival. The survival difference remained significant ($P=0.01$) when evaluated by multivariate Cox model adjusting for known confounders, including IDH mutations, MGMT methylation status and cancer grade. LASSO identified 14 genes that mostly contribute to Wnt activation. Logistic regression model was trained on 358 TCGA samples using these selected genes, the model showed high accuracy in training set ($AUC=0.924$) as well as in an independent CGGA validation set ($AUC=0.93$). The median survival was 113 and 51 months for the Wnt low and high groups, respectively.

Conclusions: Our analysis indicated that activity of Wnt may be an independent adverse predictor of LGG patient survival. In addition, a set of key genes were selected and can be conveniently used in the clinical setting for prognosis of LGG patients.

Legal entity responsible for the study: Beijing Genetron Health Genetic Technology Co., Ltd.

Funding: Beijing Genetron Health Genetic Technology Co., Ltd.

Disclosure: L. Su, X.N. Li, C. Yan, Y.F. Yang: Full/Part-time employment: Beijing Genetron Health Genetic Technology Co., Ltd.

<https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.08.1081>

967P **Metastases harbored in the maxillofacial region: A retrospective review of patient and tumour characteristics**

S. Turgeman

Oral and Maxillofacial Surgery, Rambam Health Care Campus, Haifa, Israel

Background: Maxillofacial metastases from distal primary sites are rare, accounting for less than 1% of all newly diagnosed cancer in the head and neck region. Clinical manifestation is non-specific and lesions are often misdiagnosed as benign or inflammatory conditions. The purpose of this study was to thoroughly describe cases of maxillofacial metastases, evaluating both patient and tumor characteristics, and to explore associations with treatment delivered.

Methods: In this retrospective review, we collected data from the hospital registry of patients diagnosed with cancer in the maxillofacial region over a ten year period (from 2008 to 2018). Patients with a metastatic lesion that was supported radiologically and verified histologically were included in the study.

Results: Our initial cohort included 350 patients diagnosed with cancer in the maxillofacial region. Of these, 10 patients (7 men, 3 women) were shown to have metastatic lesions. Mean patient age was 60.7 and ranged between 48 to 73. Presenting symptoms included trismus and masseteric hypertrophy in 40% of cases. Primary malignancies most commonly originated in the lung, breast, and prostate, respectively, and the majority (80%) of tumors were adenocarcinomas. Non of these metastases were the presenting lesion of a systemic cancer. Tumors were more frequently located in the mandible than other maxillofacial sites (50%), and appeared in both bony and soft tissue regions. Radiological changes to the periosteum were most commonly observed. In 20% of cases, treatment was delayed due to misdiagnoses as acute infection or osteomyelitis.

Conclusions: Suggestive clinical presentation should alert a physician to a potential metastatic lesion in the head and neck region, and prompt a biopsy procedure.

ANEXO 8. Reflexión final de la autora

En el año 2004 inicié esta tesis con mucha ilusión. Decidí continuar con la línea de investigación del servicio, en ese momento liderada por el Dr. Rosell, y evaluar el papel de los genes reparadores del ADN en el tratamiento de los tumores de cabeza y cuello, con muchas expectativas de encontrar resultados interesantes. Era una oncóloga inexperta, pero tenía el motor de la frescura y la ilusión de aprender e investigar (aún recuerdo mis horas en el Archivo del hospital entre esas carpetas enormes y llenas de polvo). Diecisiete años más tarde, con muchos cambios en mi vida personal y profesional e incluso una pandemia, he conseguido depositar la tesis y me gustaría hacer una breve reflexión de cómo han sido, qué he aprendido y qué han supuesto para mí.

Lo primero que he de decir es que, al menos para un oncólogo médico, investigar no es fácil. En primer lugar, el día a día es muy intenso, horas extras por sobrecarga de trabajo, cansancio físico, empatía con los pacientes que te genera sentimientos de culpabilidad en muchas ocasiones, en definitiva, una gran carga asistencial que no deja tiempo ni fuerzas para hacer muchas cosas más. En segundo lugar, los recursos económicos y de infraestructura técnica y humana (biólogos, estadísticos, patólogos, etc.) no siempre están disponibles y, al final, dependes de favores y de la buena voluntad de los compañeros. En definitiva, embarcarse en la realización de una tesis supone un gran esfuerzo personal y restar horas al descanso personal, autocuidado, disfrute de la familia y de los amigos. He de decir que en algunos momentos he estado a punto de “tirar la toalla” y no le encontraba sentido a lo que estaba haciendo.

Pero, desde que era una niña, me enseñaron que hay que quedarse con lo bueno de las cosas y así lo he hecho. Me quedo con todo lo que he aprendido, de los tumores de cabeza y cuello, de su biología, de estadística y ¡hasta de Microsoft Word!. El haber evolucionado como oncóloga médica a lo largo de estos 17 años me ha ayudado apreciar conceptos que probablemente no hubiera entendido o dado la importancia que tienen un tiempo antes. He aprendido a valorar el trabajo en equipo en la investigación. Es la clave para avanzar y evolucionar, tanto a nivel de conocimientos como a nivel personal. Cuando las cosas no van como esperas, siempre encuentras unas palabras de aliento y una solución a los problemas. Y, por último, pero no menos importante, me quedo con los pacientes, con su total colaboración en todos los proyectos que se les ofrece, sus palabras y gestos que hacen que el peor de los días cambie radicalmente. Ese “doctora, estudie mucho para curarme” o “gracias por buscar todos los tratamientos para curarme” es el motor para seguir adelante.

Espero que esta tesis tenga una continuidad en el futuro y que me abra puertas a más proyectos, así como que pueda ayudar a mejorar el pronóstico y la calidad de vida de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello, muchas veces olvidados.

