



Universidad de Valladolid



**PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN
CIENCIAS DE LA SALUD**

TESIS DOCTORAL:

**UTILIDAD DE LOS MICROARNS Y ARNm DE
LA TELOMERASA PLASMÁTICOS EN EL
MANEJO DEL CARCINOMA EPIDERMÓIDE
DE CABEZA Y CUELLO AVANZADO**

Presentada por BLANCA PILAR GALINDO TORRES
para optar al grado de Doctor/a por la Universidad
de Valladolid

Dirigida por:

Dr. Carlos García Girón

Dr. Miguel Víctor Grijalba Uche

Dra. María Isabel Adiego Leza

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. García Girón, tutor y director, por su disponibilidad, accesibilidad y su buena disposición para formar parte de este proyecto.

Al Dr. Grijalba, codirector y jefe de sección de Oncología. Gracias por confiar en mí cuando era una recién llegada al Servicio con ganas de aprender el mundo de la Oncología. Por estar cerca con los casos complejos, las dudas, y las consultas, así como por ayudarme a buscar la excelencia en el Doctorado, donde tu eres un gran experto y un ejemplo a seguir.

A la Dra. Adiego Leza, Isabel, también codirectora, quien me hizo creer que la Otorrinolaringología era la mejor especialidad que podía elegir, contagiándome su pasión por la misma durante el periodo de formación MIR para confirmar que la elección había merecido la pena. Me enseñaste que la Medicina es un constante aprendizaje y que nunca es tarde para cumplir nuevos propósitos. Tu entusiasmo, tu ilusión y tus palabras de ánimo constantes han hecho que disfrute del duro recorrido del Doctorado y me han servido de estímulo profesional y personal.

A la Universidad de Valladolid, por abrirme las puertas y brindarme la oportunidad de avanzar en mi carrera profesional.

A la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Burgos, por permitirme almacenar las muestras en sus instalaciones, facilitarme el acceso al laboratorio para el análisis de muestras y por ayudarme con los trámites burocráticos, que habitualmente hacen todos estos procesos un poco más cuesta arriba.

A Raquel y Patri, con las que tantas tardes investigadoras he pasado. Gracias a vosotras descubrí el mundillo de la investigación médica como complemento a la actividad asistencial. Porque de manera incondicional me habéis ayudado con vuestra experiencia y consejos, dedicándome el tiempo que no teníais ni para vosotras.

A Mar, supervisora de la F6. Has sido una pieza fundamental en este trabajo. Tu planificación excelente permitió realizar las extracciones a tiempo, de manera ordenada y coordinada, por lo que estoy eternamente agradecida.

A los Servicios de ORL del HUBU y del Servet. Por enseñarme, por motivarme, por facilitarme rotaciones, por creer en mí, y por haberme sufrido en algún momento de bajón. Porque cuando se trabaja en familia es todo un poco más fácil. Todos habéis puesto un granito de arena para que esta tesis doctoral sea posible. Gracias también a Arturo por colaborar con tu creatividad en el diseño de esta portada.

A mi “Policlínica” de Zaragoza. ¡Qué gusto poder seguir sintiéndoos tan cerca a pesar de estar lejos! Si mirásemos a nuestro yo de 18 años, no nos reconoceríamos... o sí, porque como nos gusta creer, ¡vamos mejorando nuestra versión de aquel entonces! Este es un logro más de todos los que como equipo de amigas vamos consiguiendo, y lo mejor y más importante es poder seguir compartiéndolos.

A Bea, gracias por estar siempre, en las buenas y en las malas. Por haberme exigido tanto, como compañera y rival en atletismo, y por ser parte de mi vida desde entonces. Ya ves que esa exigencia ahora tiene sus frutos, y por fin, puedo decir que soy “tu Doctora”.

A Cristina, Danilo, Laura, Maribel, y agregados. Gracias “compiamigos” por hacer que ir a trabajar sea divertido. Por conseguir que todos los miedos de una recién adjunta desaparezcan de golpe sabiendo que os tengo cerca, por hacerme partícipe de todos vuestros éxitos, personales y laborales, y por alegraros de los míos. Gracias por cuidarme y acompañarme en este camino.

A mi familia, especialmente a mis padres, Juanmi y Liva. Gracias por haberme ofrecido la educación que he deseado, por haber confiado en mí en cada decisión que he ido tomando, por inculcarme la cultura del esfuerzo y de la superación, por acompañarme en los buenos y malos momentos, y por apoyarme incondicionalmente en todos mis proyectos. Sé que nadie más que vosotros queríais que llegara el momento de ser oficialmente Doctora, y me siento tremendamente afortunada de que podáis compartir este logro conmigo. Y a mi sobrino Carlos, que ha sufrido mis ausencias durante este último empujón, con el deseo de que se sienta orgulloso de su tía.

A Kiko, compañero de fatigas doctorales, y de vida. Porque caminar de la mano junto a ti en este proyecto ha hecho que nos motivemos, nos apoyemos, nos conozcamos y seamos mejores. Porque este era uno de nuestros grandes objetivos por cumplir, y que por fin podemos decir que es realidad.

*A mi familia,
los que están y los que no están,
con amor y gratitud.*

*Es preciso sacudir enérgicamente el bosque de las neuronas cerebrales
adormecidas; es menester hacerlas vibrar con la emoción de lo nuevo e infundirles
nobles y elevadas inquietudes.*

Santiago Ramón y Cajal

ÍNDICE

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS	XI
LISTA DE FIGURAS	XV
LISTA DE TABLAS	XVI
PALABRAS CLAVE	XVII
RESUMEN.....	XIX
 1.INTRODUCCIÓN.....	 1
1.1. Concepto de carcinoma epidermoide.....	3
1.1.1. Definición, concepto y datos epidemiológicos.	3
1.1.2. Causas de carcinoma epidermoide.	4
1.1.3. Herramientas diagnósticas del carcinoma epidermoide.	6
1.1.4. Tratamiento del carcinoma epidermoide.....	7
1.1.5. Pronóstico y supervivencia en el carcinoma epidermoide.	8
1.2. Marcadores existentes validados en la actualidad para el control de la enfermedad en pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.	8
1.3. Definición y concepto de biopsia líquida.	11
1.4. Ácido ribonucleico.	12
1.4.1. Definición, concepto y tipos de ácido ribonucleico.....	12
1.4.2. Definición y concepto de microARN circulante.	15
1.4.3. Utilidad de los microARNs circulantes como biomarcadores en pacientes diagnosticados de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.	17
1.5. Telomerasa.....	21
1.5.1. Definición y concepto de telómeros y telomerasa.....	21
1.5.2. Utilidad de la telomerasa como marcador en pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.....	22
1.6. Justificación del trabajo.	23

2.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	25
3.METODOLOGÍA.....	29
3.1. Revisión de la bibliografía.	31
3.2. Diseño de los estudios.	31
3.3. Población del estudio.	31
3.4. Variables clínicas.....	32
3.5. Declaración de Ética.	32
3.6. Pruebas otorrinolaringológicas (ORL) y de imagen.....	32
3.7. Protocolo de extracción y recolección de muestras.	32
3.8. Protocolo de extracción del ácido ribonucleico y de la retrotranscripción inversa.....	33
3.9. Protocolo de amplificación de microARN.	33
3.10. Selección de microARNs.....	34
3.11. Protocolo de medición del ARNm de la hTERT.	34
3.12. Seguimiento de los pacientes.	34
3.13. Financiación.	35
3.14. Análisis estadístico.....	35
4.RESULTADOS	37
4.1. Características socio-demográficas de los pacientes.....	39
4.2. Características clínico-patológicas de los tumores.....	39
4.3. MicroARNs en el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello avanzado. ...	42
4.3.1. Valor diagnóstico: comparativa de pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello frente a controles al diagnóstico.	42
4.3.2. Valor pronóstico: utilidad de los microARNs en el seguimiento de pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.	44
4.3.3. Correlación de los microARNs con las pruebas disponibles para el diagnóstico del carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.	46

4.3.4. Utilidad para la predicción de recidivas en pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.....	49
4.3.5. Cambios en los niveles de expresión de los microARNs tras cirugía.	53
4.3.6. Funciones, según nuestros resultados, de los diferentes microARNs analizados en el estudio (<i>tabla 10</i>).	55
4.4. ARNm de la hTERT en el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello avanzado.....	56
4.4.1 ARNm de la hTERT en relación con las características sociodemográficas y clínico-patológicas de los pacientes.....	56
4.4.2 ARNm de la hTERT en la monitorización de pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.....	57
5.DISCUSIÓN.....	59
5.1. Utilidad de los microARNs en el diagnóstico, el seguimiento y la detección de recidivas en el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.....	61
5.2. Correlación de los microARNs con las pruebas disponibles para el seguimiento del carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.	74
5.3. Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello y ARNm de la hTERT.	76
5.4. Limitaciones del estudio.	79
6.CONCLUSIONES.....	81
7.BIBLIOGRAFÍA.....	85
8.ANEXOS	129
Anexo 1 – Clasificación T siguiendo la 8ª versión de la Clasificación TNM de la AJCC actualizada en 2017.....	131
Anexo 2 – Clasificación N siguiendo la 8ª versión de la Clasificación TNM de la AJCC actualizada en 2017.....	133
Anexo 3 –MiARNs incluidos en la revisión para diagnóstico, pronóstico y respuesta al tratamiento en pacientes con CECC.	135

Anexo 4. Protocolo de extracción de ARN mediante el kit miRNeasy Serum/Plasma (Qiagen N.V., Hilden, Alemania).....	138
Anexo 5. Protocolo de retrotranscripción inversa utilizando el kit de síntesis de ADNc Transcriptor High Fidelity (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA).....	140
Anexo 6. Comunicación póster (2021).	143
Anexo 7. Artículo 1 (2022).....	144
Anexo 8. Artículo 2 (2025).....	145

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

ADH	Alcohol deshidrogenasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AKT	Proteína quinasa B
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
AP-1	Proteína activadora 1
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
ARNt	ARN de transferencia
BamHI-A	Proteína viral lítica temprana del virus de Epstein-Barr, del inglés, BamHI-A rightward frame 1 (BARF1).
CCND1	Ciclina D1
CECC	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
CECO	Carcinoma epidermoide de cavidad oral
CEL	Carcinoma epidermoide de laringe
CEOF	Carcinoma epidermoide de orofaringe
CNF	Carcinoma nasofaríngeo
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CST1	Cistatina C
CYP450	Citrocromo P450

DCUN1D1	<i>Defective In Cullin Neddylation 1 Domain Containing 1</i>
DGCR8	Región crítica 8 de DiGeorge
DS	Desviación estándar
EBNA-1	Antígeno nuclear 1 del Virus de Epstein Barr
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
FE	Fallecidos por la enfermedad
hTERT	Telomerasa transcriptasa inversa humana
IGF1R	Receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1
IT	Inmunoterapia
K-Ras	Homólogo de oncogén viral del sarcoma de rata Kirsten, del inglés, Kirsten rat sarcoma viral oncogene
LMP1	Proteína Latente de Membrana 1
LMP2	Proteína Latente de Membrana 2
MAGE-A9	Antígeno 9 asociado a Melanoma
MAPK	Quinasas activadas por mitógenos
MEG3	Gen maternalmente expresado 3, del inglés, maternally expressed 3
MiARN	MicroARN

MTDH	Metadherina
MTMR3	Proteína relacionada con la miotubularina 3
mTOR	Diana mecanicista de la rapamicina
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NF-κB	Factor nuclear kappa B
ORL	Otorrinolaringológicos/as
PAK-1	Quinasa 1 activada por P21
PD-1	Proteína de Muerte programada-1
PD-L1	Ligando de Proteína de Muerte programada-1
PET-TAC	Tomografía de Emisión de Positrones
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
q-PCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa)
QT	Quimioterapia
QT_i	Quimioterapia de inducción
RISC	Complejo Silenciador Inductor de ARN
RM	Resonancia Magnética
RQ	Relative quantification (Cuantificación relativa)
RT	Radioterapia

RT-qPCR	Real Time Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real)
SATB1	Proteína 1 de unión a secuencias ricas en alaninas y treoninas
SMARCA5	Proteína ATPasa reguladora de la cromatina dependiente de actina asociada a matriz componente del complejo SWI/SNF, miembro 5
SOX-2	Gen relacionado con la región determinante del sexo del cromosoma Y, caja 2. o también llamado, del inglés, SRY-box2, de <i>Sex determining Region Y-box 2</i> .
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
TAC	Tomografía Axial Computarizada
TEM	Transición epitelio-mesenquimal
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TNM	Clasificación Tumor – Nódulos o Ganglios linfáticos – Metástasis
VAS	Vía Aérea Superior
VE	Vivos con enfermedad
VEB	Virus de Epstein Barr
VLE	Vivos libres de enfermedad
VPH	Virus del Papiloma Humano

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación gráfica de las distintas fases histológicas que ocurren en el epitelio normal hasta que progresivamente se transforma en un carcinoma.....	3
Figura 2. Ilustración donde se puede ver cómo los ácidos nucleicos circulantes provienen de una amplia gama de procesos celulares, y se encuentran tanto en sangre total, como en plasma.....	11
Figura 3. Esquema donde se representan los procesos de transcripción del ADN a ARN, y de traducción de ARN a proteínas.	12
Figura 4. Clasificación de los distintos tipos de ARN.	13
Figura 5. Representación de la biogénesis de los miARNs y la vía de regulación postranscripcional.....	16
Figura 6. Línea de tiempo cronológica de los descubrimientos clave en el campo de los miARNs y su relevancia para el cáncer.	18
Figura 7. Imagen donde se observa que, en condiciones normales, los telómeros se acortan con cada ciclo de división celular, mientras que, en células tumorales, el aumento de la actividad de la telomerasa favorece la proliferación celular.....	22
Figura 8. Representación gráfica de los niveles de expresión normalizados de los miARNs al diagnóstico.....	43
Figura 9. Representación gráfica de los niveles de expresión transformados de los pacientes que recidivaron durante el seguimiento.....	52
Figura 10. Valores de expresión transformados de los miARNs en los pacientes sometidos a cirugía.	54
Figura 11. Niveles de expresión del ARNm de la hTERT pre y postquirúrgicos en pacientes curados sometidos a cirugía como parte del tratamiento.	57
Figura 12. Esquema de la vía PTEN/PI3K/AKT.	63
Figura 13. Ilustración relativa a las diversas dianas del miR-195.	64
Figura 14. Representación de cómo la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR es activada en los pacientes con CECC positivo para VPH.....	67
Figura 15. Esquema de las vías de señalización activadas por miR-425.....	72

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características epidemiológicas de los sujetos incluidos en el estudio.	40
Tabla 2. Riesgo de desarrollar CECC en relación con los hábitos tóxicos.	40
Tabla 3. Características clínico-patológicas de los pacientes con CECC.	41
Tabla 4. Niveles de expresión medios $\pm$ desviación estándar (DS) de los miARNs en el grupo control y el grupo de pacientes con CECC.	42
Tabla 5. Valores promedio $\pm$ DS de los diversos niveles de expresión de miARNs transformados en estos dos grupos al diagnóstico y durante el seguimiento de un año.	45
Tabla 6. TNM, localización, grado histológico, y tratamiento global recibido por los 22 pacientes del estudio que realizaron seguimiento de 1 año.	46
Tabla 7. Correlación entre estudios ORL y de imagen con los miARNs diferencialmente expresados en los distintos puntos del seguimiento.	48
Tabla 8. Niveles de expresión transformados de los miARNs en los diferentes puntos del seguimiento.	50
Tabla 9. Pacientes con sospecha de recidiva durante el seguimiento.	51
Tabla 10. Resumen de las funciones de los miARNs incluidos en nuestro trabajo. .	55

PALABRAS CLAVE

Carcinoma epidermoide

Cáncer de cabeza y cuello

Biopsia líquida

MicroARN

ARNm de la hTERT

Plasma

Diagnóstico

Pronóstico

Monitorización

RESUMEN

Antecedentes: El pronóstico del carcinoma epidermoide de cabeza y cuello no ha cambiado en las últimas décadas. Los microARNs median la expresión génica y participan en la regulación de los procesos biológicos celulares, y su expresión aberrante es un acontecimiento importante en varias neoplasias. Asimismo, la elevación del ARN mensajero de la hTERT en la sangre periférica de pacientes con cáncer está relacionada con los parámetros clínico-patológicos y el pronóstico. Los objetivos de esta tesis son determinar si los niveles de determinados microARNs y del ARN mensajero de la hTERT plasmáticos podrían ser buenos biomarcadores para el diagnóstico y la monitorización del cáncer epidermoide de cabeza y cuello.

Métodos: Se realizó un estudio observacional, longitudinal, prospectivo, analítico, con diseño de casos y controles, en el que se compararon 37 pacientes con cáncer epidermoide de cabeza y cuello al diagnóstico con 30 pacientes sanos. Se obtuvieron muestras de sangre y se determinaron los niveles de expresión de 17 microARNs circulantes y del ARN mensajero de la hTERT en plasma mediante PCR-RT. El seguimiento del carcinoma epidermoide de cabeza y cuello se realizó durante un año con extracciones de sangre a los 7 días para los pacientes quirúrgicos, y a los 1, 2, 6 y 12 meses después de finalizar el tratamiento para todos los pacientes. Se extrajeron muestras adicionales en el caso de sospecha de recidiva.

Resultados: El 78,4% de los pacientes oncológicos y el 56,7% en el grupo de control eran hombres. Los fumadores y consumidores de alcohol presentaron una mayor susceptibilidad para desarrollar un cáncer epidermoide de cabeza y cuello, con un riesgo aumentado un 63,4% cuando se combinan ambos factores. La localización tumoral más frecuente fue la orofaringe (40,5%). Al diagnóstico, los pacientes oncológicos sobreexpresaron miR-21-5p y miR-122 ($p < 0,001$), mientras que miR-195-5p estaba regulado negativamente ($p = 0,002$). Igualmente, detectamos una sobreexpresión del ARN mensajero de la hTERT en el plasma de pacientes oncológicos en comparación con los controles ($p = 0,003$). Encontramos diferencias en los niveles de expresión de algunos microARNs entre pacientes vivos libres de enfermedad y aquellos con enfermedad persistente durante el año de seguimiento: el miR-122 se mostraba elevado en pacientes libres de enfermedad durante el primer

año, respecto a aquellos del grupo con enfermedad persistente ($p < 0,05$). A este miR-122 se le sumaban los miR-374-5p y miR-451a que, al mes de la finalización del tratamiento, también estaban significativamente elevados en pacientes sin enfermedad ($p < 0,02$). Al centrarnos exclusivamente en los pacientes que completaron el año de seguimiento con todos sus controles intermedios, encontramos 2 hallazgos destacables: miR-146 se mantenía estadísticamente significativo desde el diagnóstico hasta el control anual en los pacientes con enfermedad ($p < 0,04$), incluyendo todos los puntos intermedios y, los 6 meses, era el momento en que más microARNs diferencialmente expresados encontramos ya que, asociado a este miR-146, también detectamos diferencias en miR-3591-3p y miR-223 en el mismo grupo de pacientes. En la evaluación de los pacientes intervenidos, también hemos obtenido valores significativos en 6 microARNs: miR-21-5p ($p = 0,004$), miR-146 ($p = 0,021$), miR-223 ($p = 0,032$) y miR-375 ($p = 0,035$) disminuyeron, mientras que miR-26b ($p = 0,019$) y miR-3591-3p ($p = 0,013$) se elevaron tras la cirugía. Además, observamos una disminución global de los niveles de expresión de ARN mensajero de la hTERT en plasma en los 5 pacientes curados que se sometieron a cirugía, si bien al evaluar todos los pacientes que finalizaron el seguimiento y fueron intervenidos, las conclusiones no fueron significativas. Por último, observamos que el miR-206 era el que mejor correlación presentaba con las exploraciones otorrinolaringológicas y las pruebas de imagen tanto a los 6 como a los 12 meses de seguimiento.

Conclusión: Nuestros hallazgos sugieren que la evaluación de los niveles de expresión de ciertos microARNs y del ARN mensajero de la hTERT en plasma podrían proponerse como una herramienta complementaria para el diagnóstico de pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, y el cambio de sus valores tras la cirugía podría ayudar a identificar a los pacientes con mejor pronóstico. Además, la biopsia líquida podría ser valiosa para monitorizar la enfermedad, especialmente durante el primer año de seguimiento. Sin embargo, es preciso realizar más ensayos con muestras más grandes para aclarar el papel de los niveles de expresión de estos biomarcadores plasmáticos, con el objetivo de validar los datos y establecer un nivel de corte que pueda ser útil para el diagnóstico, el pronóstico y el seguimiento.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Concepto de carcinoma epidermoide.

1.1.1. Definición, concepto y datos epidemiológicos.

El cáncer de cabeza y cuello engloba a un grupo de neoplasias que se desarrollan a partir del epitelio de la cavidad oral, faringe y laringe, y representan los cánceres más frecuentes de este área [1].

La gran mayoría (más del 90%) son carcinomas de células escamosas, y se originan a partir de células epiteliales de la mucosa que recubren la vía aérea superior (VAS), denominándose carcinoma escamoso o epidermoide de cabeza y cuello (CECC). Histológicamente, la progresión a CECC invasivo sigue una serie ordenada de pasos que comienzan con la hiperplasia de células epiteliales, seguida de displasia (leve, moderada y grave), carcinoma in situ y, finalmente, carcinoma infiltrante [2] (*figura 1*). Sin embargo, es de destacar que la mayoría de los pacientes diagnosticados con CECC no tienen antecedentes de una lesión premaligna previa [1].

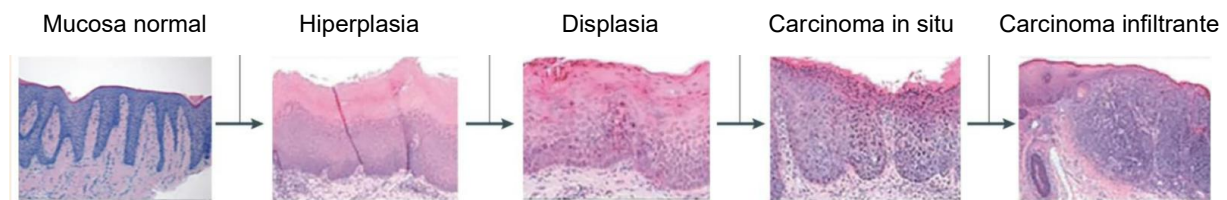


Figura 1. Representación gráfica de las distintas fases histológicas que ocurren en el epitelio normal hasta que progresivamente se transforma en un carcinoma, extraída del artículo “**Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization**” [2].

El CECC es el sexto tipo de cáncer más prevalente. Se prevé que la incidencia del CECC, que representa hasta el 5,1% de todas las neoplasias malignas en todo el mundo, aumente de 947.000 a 1.240.000 casos en 2035 debido a los cambios en las variables etiológicas, ambientales y sociodemográficas [3].

Las tasas de incidencia y mortalidad del CECC varían ampliamente según la región geográfica y las características demográficas. A nivel mundial, el CECC es más

común en hombres que en mujeres, con una proporción de aproximadamente 2:1 y, predominantemente, a partir de los 50 años [4]. Las tasas de incidencia son más altas en el sur y sudeste de Asia [5], seguida de Europa central y oriental, y América del Sur [4].

1.1.2. Causas de carcinoma epidermoide.

La incidencia del CECC puede estar relacionada con factores de riesgo ambientales y de estilo de vida [6], entre los que se incluye el tabaquismo, el consumo de alcohol, la masticación de nuez de areca o betel, la nutrición inadecuada, la mala higiene oral, el virus del papiloma humano (VPH), el virus de Epstein-Barr (VEB) y las infecciones por *Candida albicans* [1,7].

La posible relación entre el consumo de alcohol y el cáncer epidermoide de laringe (CEL) fue por primera vez descrito en la década de 1950 [8]. En 1977 existía la alta sospecha de que el consumo de cigarrillos y el alcohol eran los factores de riesgo principales para desarrollar cáncer de la vía aérea superior, tanto de cavidad oral, faringe como de laringe [9]. En 1987 la *International Agency for Research on Cancer* clasificó las bebidas alcohólicas como carcinogénicas y concluyó que el CEL se relacionaba con su consumo [10], lo que se ha reafirmado posteriormente en otros trabajos. En concreto, hay estudios que describen que uno de estos dos factores, tabaco o alcohol, estaría presente en hasta el 72% de los casos de CECC, y en un tercio de ellos, coincidirían ambos [11,12].

El alcohol o etanol se metaboliza en alcohol acetaldehído, que es un carcinógeno reconocido [10], por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) y, a su vez, este acetaldehído se cataliza mediante la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) en ácido acético. Esto ocurre en su mayor parte en el hígado, pero en parte también ocurre en la VAS [13,14]. Además, el alcohol también puede tener un efecto local, actuando como disolvente de las membranas celulares para favorecer la penetración de otros carcinógenos, como el tabaco, en la mucosa [15].

En el caso del tabaco, las aminas aromáticas y heterocíclicas presentes requieren una activación metabólica para interactuar con el DNA. Estos grupos son metabolizados por enzimas relacionadas con el citocromo P450 (CYP450) que,

además, puede presentar polimorfismos que condicionan que determinados precarcinógenos se conviertan en metabolitos altamente reactivos, incrementando la susceptibilidad de desarrollar un CECC en determinados pacientes [16]. La concentración y potencia de los carcinógenos del tabaco dependen del tipo de producto de tabaco y su método de consumo [17]. La nuez de betel todavía no es un factor de riesgo ampliamente establecido en nuestro país; sin embargo, alrededor del 10% de la población mundial mastica regularmente nueces de betel, lo que la convierte en la cuarta sustancia psicoactiva más consumida en el mundo [18], siendo Asia el continente donde el consumo está más extendido.

También existen factores relacionados con la sexualidad, como la infección por el VPH, que se considera un factor de riesgo importante para desarrollar el CECC [19], causando alrededor del 10-20% de los casos [20]. El CECC asociado al VPH se desarrolla típicamente a partir del epitelio reticulado que recubre las criptas de las amígdalas palatinas y la base de la lengua, que representan sitios inmunológicamente privilegiados para las infecciones por VPH [21]. Las amígdalas capturan los antígenos inhalados e ingeridos y los transportan a los espacios subepiteliales, y estos atraviesan el epitelio reticulado, que presenta una membrana basal porosa, lo que facilita la interacción estrecha entre las células epiteliales estacionarias y la población de células linfoides migratorias [22]. Así, las células epiteliales amigdalares transformadas pueden propagarse rápida y fácilmente a través de los vasos linfáticos eferentes hasta los ganglios linfáticos cervicales regionales. Estas metástasis a menudo presentan degeneración quística y pueden sufrir cambios rápidos de tamaño, atribuidos a que las células tumorales intentan simular la morfología de las criptas originarias dentro de los ganglios linfáticos [23]. Las proteínas oncogénicas del VPH de alto riesgo, E6 y E7, se expresan sistemáticamente en células tumorales [24] e interactúan directamente con otras proteínas reguladoras en las células [25]. Se encontró que los pacientes con carcinoma epidermoide de orofaringe (CEOF) eran positivos para el VPH hasta en el 84% de los casos y el 61,5% estaban asociados al serotipo 16 [26]. En este sentido, hay que destacar que ha habido un aumento en la incidencia de CEOF durante las últimas tres décadas, especialmente en pacientes más jóvenes [27,28].

Del mismo modo, otra de las infecciones víricas relacionada directamente con la carcinogénesis del CECC y, en concreto, con el carcinoma nasofaríngeo (CNF), es la infección por el virus de Epstein-Barr [29].

Por último, pero no por ello menos importante, la mala higiene oral y las deficiencias nutricionales han sido consideradas como factores del riesgo para el desarrollo del cáncer epidermoide de cavidad oral (CECO), especialmente cuando se combinan con el tabaquismo y el consumo de alcohol [30]. Asimismo, se ha sugerido que la colonización oral por *Candida albicans*, el patógeno fúngico más común en la cavidad oral, puede estar correlacionada con el desarrollo de cáncer de esta localización [31].

1.1.3. Herramientas diagnósticas del carcinoma epidermoide.

Hasta la fecha, la valoración inicial en pacientes con CECC consiste en la evaluación clínica, apoyada en visualización directa o la endoscopia flexible y/o pruebas de imagen como la Tomografía Axial Computarizada (TAC), la Resonancia Magnética (RM) o la Tomografía de Emisión de Positrones (PET-TAC). La biopsia de tejido y el estudio histológico anatómico-patológico sigue siendo el método gold standard de referencia para la confirmación del cáncer [32].

La *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) designó los estadios de los distintos tipos de cáncer de cabeza y cuello mediante la clasificación TNM (tumor, ganglio linfático y metástasis) para definir en su 8ª versión en 2017 [33], que se puede ver en los Anexos 1 y 2.

De manera similar, estas mismas herramientas se utilizan para determinar la respuesta al tratamiento, pero, con frecuencia, esta evaluación es compleja debido a los cambios inflamatorios o anatómicos postratamiento, lo que ocasiona que las recurrencias se descubran demasiado tarde y la enfermedad se encuentre en estadios más avanzados.

1.1.4. Tratamiento del carcinoma epidermoide.

Las opciones de tratamiento para el CECC varían según la ubicación y el estadio del tumor [34,35]. Alrededor del 40% de los pacientes tienen una enfermedad en estadios iniciales, que frecuentemente puede tratarse de manera eficaz con radioterapia o cirugía [35]. La mayoría de los pacientes con cáncer localmente avanzado reciben quimioterapia (QT) y radioterapia (RT) de manera concomitante [34–37], precedida o no de quimioterapia de inducción (QTi). Agentes quimioterápicos como el docetaxel, paclitaxel y cisplatino son comúnmente utilizados en los regímenes de tratamiento del CECC [38,39], aunque la introducción de la inmunoterapia (IT) ha ampliado la gama de terapias potenciales para personas que no eran elegibles para recibir medicamentos estándar [40].

Nuestros protocolos de tratamiento en el CECC avanzado se basan en las Directrices de la Guía de la *National Comprehensive Cancer Network (NCCN)* para los cánceres de cabeza y cuello versión 1.2018 [33]. Siguiendo estos protocolos, los pacientes reciben RT concomitante con la administración fraccionada de quimioterapéuticos como cisplatino (20 mg/m²) o carboplatino AUC2/m² los días 1 a 4, repetido cada 3 semanas. Estos protocolos suelen ir en ocasiones precedidos de QTi, que consiste en la administración de 3 ciclos (separados 3 semanas) de docetaxel 75 mg/m² el día 1, cisplatino 75 mg/m² o AUC5/m² de carboplatino (si es posible) el día 1, y 5-fluorouracilo 750 mg/m² los días 1-5.

La RT radical como tratamiento principal [33], en el tumor primario y ganglios linfáticos afectados debe alcanzar 66Gy a 70Gy, mientras que en sitios con sospecha de diseminación subclínica el objetivo debe ser 44-63Gy. Sin embargo, la RT posoperatoria [33] debe alcanzar 60-66 Gy si se encuentran características adversas, mientras que se necesitan 44-63 Gy en sitios donde se sospecha diseminación subclínica.

La cirugía es la primera opción cuando el tumor se localiza en la cavidad oral, o cuando afecta a la laringe con compromiso del cartílago tiroides [33] (seguida de RT adyuvante concomitante con QT en la mayoría de los pacientes con tumores localmente avanzados), y también es necesaria en caso de enfermedad resecable persistente o recurrente después del tratamiento sistémico [33].

La IT es la forma moderna de tratar el CECC y sigue siendo una alternativa en caso de recurrencias irsecables, progresión o enfermedad metastásica, combinada o no con QT. Los medicamentos disponibles en IT incluyen cetuximab y los inhibidores del punto de control inmunológico anti-proteína 1 de muerte programada (PD-1), como son el nivolumab y el pembrolizumab, que fueron aprobados en 2016 [41].

1.1.5. Pronóstico y supervivencia en el carcinoma epidermoide.

A pesar del desarrollo de tratamientos avanzados, el pronóstico de estos pacientes no ha cambiado durante décadas [42]. En el momento del diagnóstico, más de dos tercios de los pacientes presentan una enfermedad en estadio avanzado [43] y otro 10% de los pacientes tiene metástasis a distancia [44]. Las tasas de supervivencia general a 5 años de los pacientes con CECC son aproximadamente del 40% al 50% [45], y la mayoría de los pacientes con enfermedad recurrente o metastásica fallecen dentro del primer año tras el diagnóstico [46].

Numerosas variables, incluido el retraso en el diagnóstico, las recurrencias locales, las metástasis a distancia y los segundos tumores primarios, están relacionadas con la mala supervivencia general [47,48]. La mayoría de los pacientes con CECC carecen de un tratamiento dirigido a una diana específica para su tumor, por lo que encontrar nuevos biomarcadores será crucial para mejorar los resultados de la IT [49].

1.2. Marcadores existentes validados en la actualidad para el control de la enfermedad en pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.

Aunque se ha sugerido que muchos biomarcadores tienen un impacto significativo en el diagnóstico y el pronóstico del CECC, pocos de ellos han sido validados para su uso en la práctica clínica. De hecho, una proporción significativa de biomarcadores en desarrollo no se introducen en la práctica clínica porque carecen de especificidad y sensibilidad, o de características importantes como un bajo coste, un alto valor predictivo positivo, relevancia clínica o corto tiempo de respuesta [50].

Los marcadores actualmente validados en CECC son:

- p16 como biomarcador subrogado CECC asociado al VPH [51,52]
 - En comparación con el CECC no relacionado con el VPH, el CEOF asociado al VPH ha surgido como una entidad patológica distinta con diferentes características clínicas y un perfil molecular único, lo que enfatiza la necesidad de incorporar el estado del VPH de rutina. Es importante destacar que, dado el comportamiento clínico distintivo y el pronóstico favorable del CEOF positivo para VPH, recientemente se ha desarrollado un sistema de estadificación separado de los demás CECC [53,54]. Sin embargo, actualmente no existe ningún protocolo de desintensificación del tratamiento recomendado para estos cánceres y dos ensayos publicados en 2019 demostraron que la combinación de RT con cetuximab como anticuerpo monoclonal anti-factor de crecimiento epidérmico (EGFR), era menos eficaz que la combinación con cisplatino en el tratamiento del CECC, especialmente en pacientes con tumores positivos para el VPH [55,56].
- PD-1 y ligando de la proteína 1 de muerte programada (PD-L1) [51]
 - Los puntos de control inmunológico modulan la señalización e inhiben o mejoran la respuesta de las células T. El PD-L1 está regulado positivamente en condiciones inflamatorias y es expresado en tumores enriquecidos con células T [57]. Son varios los autores que describieron que, en el CECC, la sobreexpresión de PD-L1 conllevaba un peor pronóstico. En concreto, en el CECO, Lin et al. añadieron que la sobreexpresión de PD-L1 se correlacionaba con una mala supervivencia [58]. Müller et al., por su parte, demostraron que la alta expresión de PD-L1 se correlacionaba con un fenotipo de CECC altamente agresivo, independientemente de origen del tumor [59]. Sin embargo, Vassilakopoulou et al. encontraron que una alta expresión de PD-L1 se correlacionaba positivamente con el pronóstico de la enfermedad [60] y, Yang et al. describieron que el PD-L1 se correlacionaba con una mejor supervivencia libre de progresión, pero no con la supervivencia global en pacientes con CECC avanzado [61].
 - En los primeros estudios de IT, se demostró que la expresión de PD-L1 estaba asociada con la tasa de respuesta a tratamientos inhibidores de la

PD-1, como nivolumab y pembrolizumab y, por lo tanto, se estableció como el biomarcador predictivo más comúnmente utilizado [62,63]. Como consecuencia, la evaluación de la expresión de PD-L1 representa actualmente un biomarcador de referencia para ensayos clínicos, siendo actualmente el único biomarcador que ha mostrado correlación con la respuesta a la IT en CECC [51].

- ADN del VEB en plasma como biomarcador en el CNF [64]
 - o El papel del VEB como agente etiológico primario en la patogénesis del CNF está bien establecido [65]. Se ha identificado el ácido desoxirribonucleico (ADN) del VEB en lesiones precursoras y células tumorales. Las células del CNF expresan un subgrupo específico de proteínas latentes del VEB, incluida la proteína denominada antígeno nuclear 1 del VEB (EBNA-1) y dos proteínas integrales de membrana, las proteínas latentes de membrana 1 y 2 (LMP-1 y LMP-2), junto con el fragmento BamHI-A (Proteína viral lítica temprana). Los pacientes con CNF también demuestran respuestas inmunológicas específicas a diversos productos genéticos del VEB, particularmente anticuerpos de inmunoglobulina A dirigidos contra el antígeno de la cápside viral del VEB [65,66]. Esta asociación de CNF con la infección por VEB se ha aprovechado para desarrollar pruebas de diagnóstico no invasivas, algunas de las cuales se han explorado como biomarcadores clínicos. El ADN del VEB en plasma es actualmente el biomarcador predictivo más confiable y preciso para CNF y tiene utilidad en el diagnóstico, el pronóstico, la vigilancia y la evaluación de la respuesta al tratamiento. Por ejemplo, se encontró ADN del VEB antes del tratamiento en el 96% de los pacientes con CNF, y los niveles altos de ADN del VEB se asociaron con enfermedad avanzada, recaída de la enfermedad y peores resultados [67,68]. El ADN del VEB elevado después del tratamiento es un fuerte factor de pronóstico negativo en ensayos prospectivos de RT exclusiva, QT-RT concomitante o QTí seguida de RT [69–72].

1.3. Definición y concepto de biopsia líquida.

La biopsia líquida se define como el análisis de material tumoral, células o ácidos nucleicos, obtenidos mediante métodos mínimamente o no invasivos. El término fue acuñado por Klaus Pantel y Catherine Alix-Panabières para estudiar células tumorales circulantes en muestras de sangre periférica [73], pero generalmente representa el análisis de diferentes biomarcadores de cáncer en material derivado de tumores aislado típicamente del torrente sanguíneo u otros biofluidos como orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, derrame pleural o bilis [74]. La liberación de material tumoral al torrente sanguíneo se produce desde etapas muy tempranas del proceso cancerígeno [75]. La sangre llega a la mayoría de las localizaciones tumorales, por lo que las biopsias líquidas basadas en sangre podrían reflejar mejor la heterogeneidad del tumor que las biopsias tisulares de tumores pequeños [76], pudiéndose encontrar tanto libres como en células tumorales circulantes y exosomas [77] (*figura 2*).

Para que un biomarcador sea idóneo, debe ser altamente específico y sensible con un alto valor predictivo, que pueda detectarse de manera rápida, fácilmente accesible, precisa y económica, y debe estar ausente o mínimamente presente en individuos sanos y libres de tumores [78]. Este podría ser el caso de los microARNs (miARNs), que tienen una serie de características intrínsecas que los convierten en una clase ideal de biomarcadores sanguíneos para la detección del cáncer.

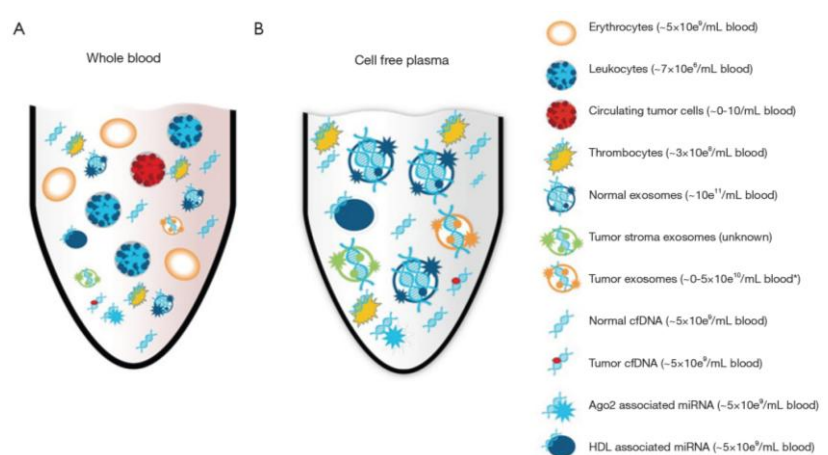


Figura 2. Ilustración donde se puede ver cómo los ácidos nucleicos circulantes provienen de una amplia gama de procesos celulares, y se encuentran tanto en sangre total (A), como en plasma (B), obtenida del artículo titulado *“Liquid biopsy for cancer screening, patient stratification and monitoring”* [79].

1.4. Ácido ribonucleico.

1.4.1. Definición, concepto y tipos de ácido ribonucleico.

El ácido ribonucleico (ARN) es una molécula que está presente en la mayoría de los organismos vivos y en los virus. El ARN se forma a partir del ADN en el proceso llamado transcripción. Está formado por nucleótidos, que son azúcares ribosa unidos a bases nitrogenadas y grupos fosfato. Las bases nitrogenadas incluyen adenina, guanina, uracilo y citosina. El ARN existe principalmente en forma monocatenaria, y puede tener una variedad de longitudes y estructuras [80].

Existen dos tipos principales de ARN que participan en la síntesis de proteínas en el proceso llamado traducción: el ARN codificante o mensajero (ARNm) y el ARN no codificante, que incluye el ARN relacionado con la traducción (ARN de transferencia - ARNt- y ARN ribosómico -ARNr-), así como los ARNs no codificantes cortos, y los ARNs no codificantes largos [80,81] (*figuras 3 y 4*).

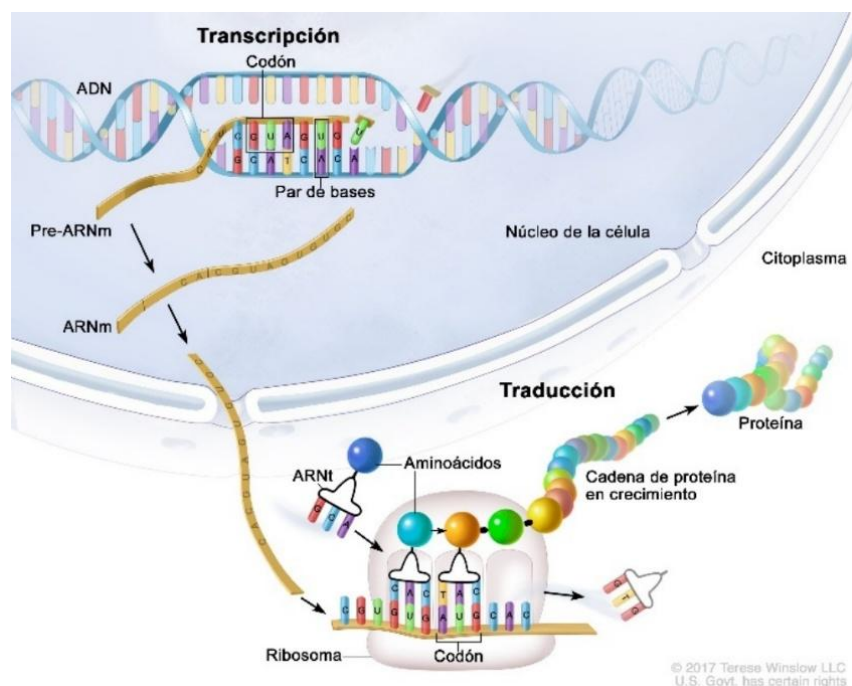


Figura 3. Esquema donde se representan los procesos de transcripción del ADN a ARN, y de traducción de ARN a proteínas, tomada de “*El sitio web del Instituto Nacional del Cáncer*” [82].

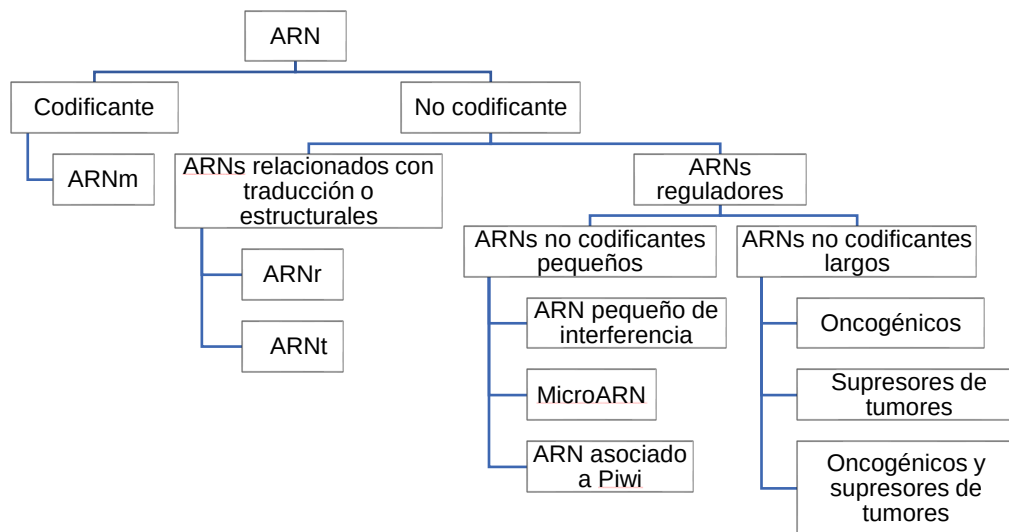


Figura 4. Clasificación de los distintos tipos de ARN [81,83].

- ARNm o codificante

- El ARNm se transcribe a partir del ADN y contiene el modelo genético para producir proteínas. En eucariotas, una transcripción de ARN recién transcrita se considera un pre-ARNm y necesita madurar para formar el ARNm. Un pre-ARNm contiene regiones codificantes y no codificantes conocidas como exones e intrones, respectivamente. Durante el procesamiento previo al ARNm, los intrones se eliminan y los exones se unen, en un proceso llamado empalme de ARN. Se agrega una tapa 5' conocida como 7-metilguanosina al extremo 5' de la transcripción de ARN y el extremo 3' se poliadenila. La poliadenilación se refiere al proceso en el que se agrega a la transcripción una cola poli(A), que es una secuencia de nucleótidos de adenina. La tapa 5' protege el ARNm de la degradación y la cola poli(A) 3' contribuye a la estabilidad del ARNm y le ayuda en el transporte. Los investigadores también están estudiando el ARNm como tratamiento contra el cáncer debido a su capacidad para modificar las células [84].

- ARN no codificante

- o ARN relacionado con la traducción o estructurales

- ARNt

Los ARNt son moléculas de ARN que traducen el ARNm en proteínas. Tienen una estructura de hoja de trébol que consta de un sitio aceptor en 3', un fosfato terminal en 5', un brazo D, un brazo T y un brazo anticodón. La función principal de un ARNt es transportar aminoácidos en su sitio aceptor 3' (brazo anticodón) a un complejo de ribosomas con la ayuda de la aminoacil-ARNt sintetasa. El tipo de aminoácido transportado depende del codón del ARNm, que es una secuencia de tres nucleótidos. Los ARNt también regulan la apoptosis al actuar como eliminadores del citocromo C [85].

- ARNr

El ARNr forma ribosomas, que son esenciales en la síntesis de proteínas. Un ribosoma contiene una subunidad ribosómica grande y otra pequeña. En eucariotas, las subunidades 40S y 60S forman un ribosoma 80S. Los ribosomas contienen un sitio de salida, un sitio peptidilo y un aceptor para unir aminoacil-ARNt y unir aminoácidos para crear polipéptidos.

- o ARNs reguladores

- ARNs no codificantes largos

Son un grupo heterogéneo de ARNs, de más de 200 nucleótidos de largo. Recientemente se ha demostrado que participan en muchos procesos biológicos, y la mayoría de ellos no tienen capacidad de codificación de proteínas [86]. Su número es significativamente mayor que el de los genes que codifican proteínas, y están involucrados en enfermedades o etapas de desarrollo, incluidos los cánceres en seres humanos [87,88]. Regulan muchas funciones biológicas, como la impresión de loci genómicos, la regulación de la conformación de los cromosomas, etc. [89]. Se pueden detectar tanto en el núcleo como el citoplasma, y sus diferentes ubicaciones suponen diversas funciones involucradas en la regulación de los genes, por ejemplo, modificación de la cromatina, interacción con factores transcripcionales,

procesamiento de ARNm, metabolismo celular, proliferación, apoptosis, actuando como “esponja molecular” y creando complejos de ribonucleoproteínas [86,90–93].

- ARNs no codificantes pequeños

Estos pequeños ARNs, muchos de los cuales cumplen funciones regulatorias y están involucrados en procesos de silenciamiento o apagado de genes [94], tienen menos 200 nucleótidos de largo. En concreto, los miARNs representan los ARNs no codificantes pequeños mejor estudiados y se cree que regulan el 60% del genoma humano [95,96]. Estas moléculas tienen entre 18 y 25 nucleótidos de largo, se unen predominantemente a 3'-UTR del ARNm para mediar el silenciamiento génico postranscripcional [97], pero pueden unirse a 5'-UTR para inducir la expresión génica en algunos casos [98] o pueden unirse simultáneamente a 3'-UTR y 5'-UTR [99]. Además, los miARNs también pueden activar la expresión génica mediante la represión de la descomposición del ARN [100].

1.4.2. Definición y concepto de microARN circulante.

Los miARNs participan en la regulación postranscripcional de la expresión génica mediante el emparejamiento de bases con el ARNm [101]. Los miARNs parecen generarse a partir de secuencias genómicas intergénicas o regiones intrónicas de los genes codificadores de proteínas [102].

Teniendo en cuenta que un miARN puede regular potencialmente, directa o indirectamente, cientos de objetivos, estas biomoléculas podrían modular la progresión y el tratamiento del tumor [103]. El papel de los miARN en el cáncer se sospechó por primera vez en 1993 cuando se observó en *C. elegans* y *Drosophila* que los miARNs controlaban aspectos de la proliferación celular y la apoptosis [104].

Los miARNs se pueden generar mediante las vías de biogénesis de miARN canónicas o no canónicas [105] (*figura 5*):

- Para la biogénesis canónica, los miARNs se transcriben como transcripciones precursoras largas de loci genómicos intergénicos, intrónicos o policistrónicos

mediante la ARN polimerasa II [106]. El ciclo de vida de los miARNs consta de múltiples fases, incluida la transcripción, la exportación nuclear, el recorte (trimming) y el corte en cubitos (dicing). El miARN primario (pri-miARN) forma una estructura en horquilla distintiva que es reconocida y procesada por el complejo de la enzima ARNasa III-DROSHA y la región crítica 8 de DiGeorge (DGCR8) para generar miARNs precursores (pre-miARNs) en el núcleo de las células, que luego se transportan al citoplasma a través del poro nuclear Exportina-5. El pre-miARN se somete a la actividad ribonucleasa de DICER para producir miARN maduro con una cadena pasajera y otra cadena guía. La cadena pasajera se degrada, mientras que la cadena guía se une a un complejo formado por DICER y la proteína Argonaute-2, llamado Complejo Silenciador Inductor de ARN (RISC) para realizar su función de bloquear o degradar el ARNm objetivo [107,108].

- El término "vías no canónicas" se refiere a la colección de varias rutas de ensamblaje de miARN únicas de combinación de proteínas que se han ido descubriendo e investigando [109–112]. En la vía no canónica, el miARN se transcribe directamente como ARN en horquilla o mediante empalme de intrones que pueden replegarse en horquillas, formando entonces una estructura adecuada para la escisión por el DICER, continuando por la misma ruta que la vía canónica [108].

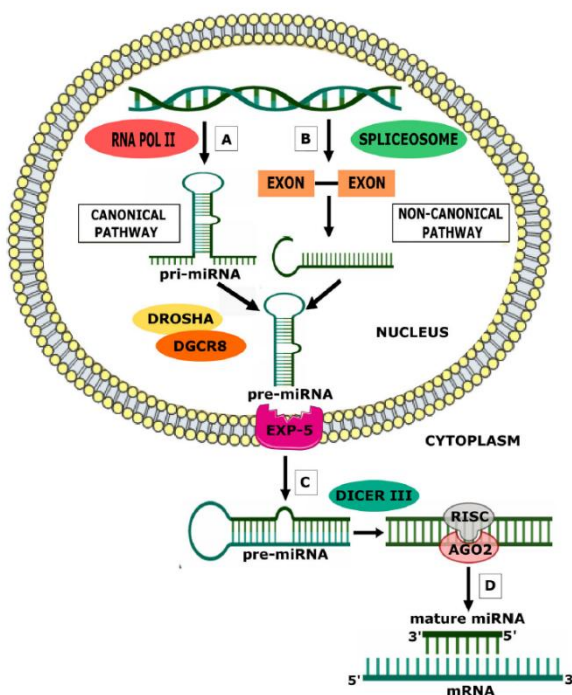


Figura 5. Representación de la biogénesis de los miARNs y la vía de regulación postranscripcional, extraída del artículo "*MicroRNAs deregulation in head and neck squamous cell carcinoma*" [105].

1.4.3. Utilidad de los microARNs circulantes como biomarcadores en pacientes diagnosticados de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.

Los miARNs tienen una serie de características intrínsecas que los convierten en una clase ideal de biomarcadores sanguíneos para la detección del cáncer. Por un lado, son muy específicos: los perfiles de expresión de los miARNs parecen ser específicos de cada tejido y se ha demostrado que difieren entre los tipos de cáncer según el diagnóstico y el estadio del tumor [113]. Por otro lado, la expresión de estos miARNs es notablemente estable y, por lo tanto, puede medirse no solo en fluidos biológicos, sino también de forma rutinaria en material fijado con formalina y parafina [114]. Además, los miARNs son resistentes a la ebullición, los cambios de pH y la fragmentación por sustancias químicas o enzimas [115]. Concretamente, se ha descrito que los miARNs plasmáticos podrían permanecer estables durante ocho ciclos de congelación y descongelación y a temperatura ambiente durante 24 horas [116] debido a su pequeño tamaño y relativa resistencia a las nucleasas [113]. De hecho, algunos investigadores detectaron que el ARN libre circulante mostraba, en diferentes tumores, una mayor sensibilidad y especificidad tisular en comparación con los biomarcadores convencionales [117].

Para investigar la correlación y la importancia de los biomarcadores de fluidos corporales en pacientes con CECC, resulta esencial una validación de diferentes miARNs [118]. En la *figura 6* se pueden observar los descubrimientos más relevantes en el campo de los miARNs y su importancia en el cáncer, que culminaría con la concesión del Premio Nobel de Medicina o Fisiología del año 2024 a Victor Ambros y Gary Ruvkun por el descubrimiento de los miARNs en los años 80 [104,119].

Como se ha adelantado previamente, los miARNs controlan los procesos primarios que conducen a la formación del CECC, incluida la diferenciación, proliferación, apoptosis y metabolismo tumoral. También desempeñan un papel en la regulación postranscripcional de la expresión génica [101,120].

En relación con los mecanismos de oncogenicidad en el CECC, existe una gran cantidad de estudios que revelan la importancia de los miARNs en varios procesos biológicos [121–123]. Los miARNs pueden funcionar como miARNs promotores de tumores (onco-miARNs) o como miARNs supresores de tumores, cuya sobreexpresión o subexpresión conduce respectivamente al crecimiento tumoral

INTRODUCCIÓN

[124]; además, también hay algunos miARNs que exhiben ambas funciones, y son considerados duales [122]. Esta creciente cantidad de evidencia que establece la conexión entre la regulación negativa, positiva, desactivación u otra desregulación de los miARNs en varios tipos de cáncer nos hace plantear la hipótesis de que los miARNs también desempeñarán un papel esencial en el tratamiento de las neoplasias en un futuro no muy lejano [125]. Por tanto, el conocimiento de estos cambios moleculares podría ayudar a interpretar los mecanismos de progresión del cáncer y a la identificación de dianas específicas para el desarrollo de estrategias terapéuticas.

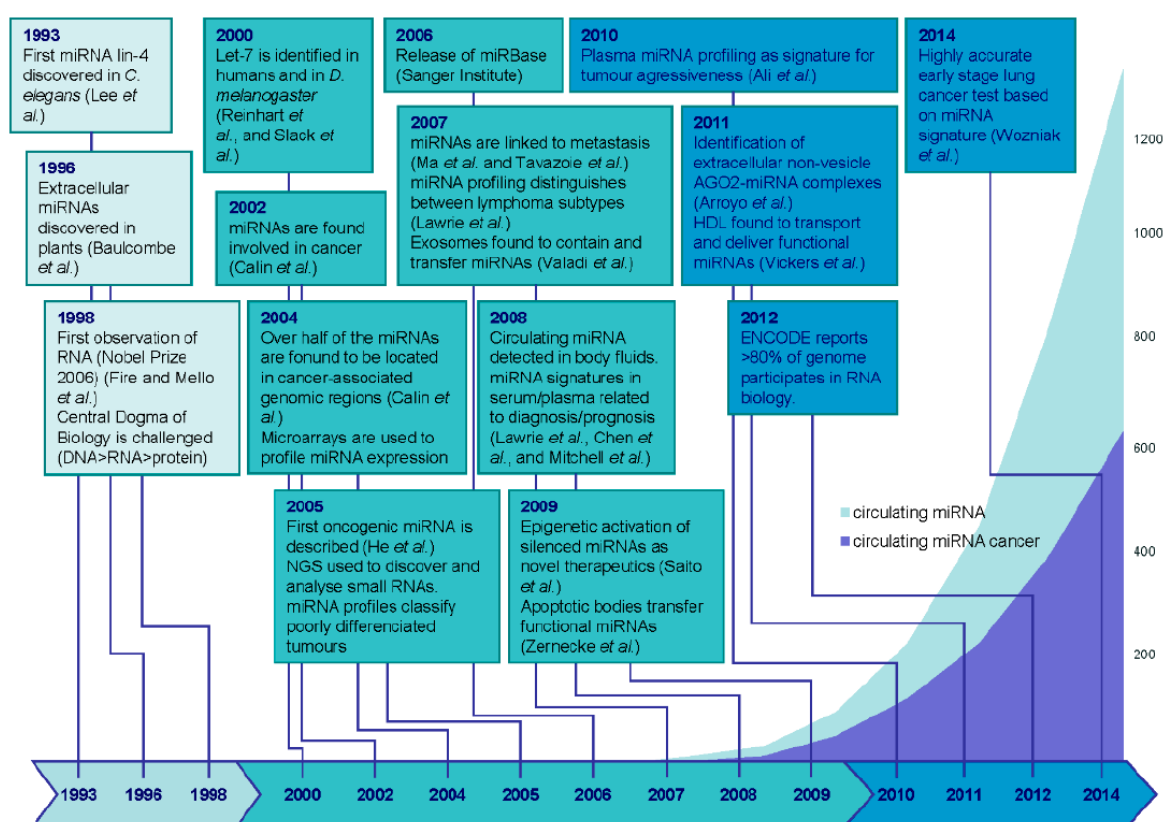


Figura 6. Línea de tiempo cronológica de los descubrimientos clave en el campo de los miARNs y su relevancia para el cáncer, perteneciente al artículo “**New Concepts in Cancer Biomarkers: Circulating miRNAs in Liquid Biopsies**” [126].

La expresión anormal de miARN ha sido descrita muchas veces en el diagnóstico y pronóstico del CECC desde que Avissar *et al.* identificaron dieciocho miARNs significativamente alterados entre muestras de tejido primario fresco congelado de

pacientes con CECC y donantes sanos, pero solo 4 de estos miARNs fueron validados [127].

Desde el punto de vista del diagnóstico, existen numerosos esfuerzos en curso para respaldar el uso de los miARNs como biomarcadores altamente discriminativos en el diagnóstico de CECC, pero se cree que debido a la excesiva posibilidad de falsos positivos y negativos, la prueba de un solo biomarcador no es factible [128]. Además, los miARNs pueden predecir la ubicación del tumor. Barker et al. observaron distintos perfiles de expresión en la base de la lengua, las amígdalas y nasofaringe, lo que sugiere que estos perfiles de miARNs sean también específicos de tejido en el CECC [129]. Sin embargo, el estudio de Hui et al. no mostró diferencias en los perfiles globales de miARNs entre los cánceres de células escamosas originados en laringe, orofaringe o hipofaringe [130].

Desde que se estudió por primera vez el papel de los miARNs, se han hecho muchos intentos de correlacionar también sus niveles de expresión con la enfermedad a distancia y la supervivencia general y libre de enfermedad. Ren et al. y Wang et al. demostraron que una alteración de la expresión de determinados miARNs se relacionaba con una histología más avanzada, menos diferenciada y la presencia de adenopatías patológicas en CEL y CEO [131,132]. Sin embargo, otros autores concluyeron que la expresión en muestras de plasma no era significativamente diferente entre pacientes con CEO con ganglios negativos y con ganglios positivos [133]. A pesar de muchos esfuerzos, Prasad et al. destacaron que ningún biomarcador tenía mejor valor pronóstico que el análisis histopatológico, lo que sugiere que existe una necesidad imperativa de optimizar su validación frente a pruebas clínico-patológicas ya existentes y aceptadas [134]. Recientemente, Popov et al. demostraron que la desregulación de ciertos miARNs en muestras de CEL exhibía una fuerte asociación con la supervivencia libre de recurrencia [135]. Aún más, Wang et al descubrieron que 18 miARNs asociados con genes del metabolismo de los ácidos grasos estaban relacionados con el pronóstico de los pacientes con CECC y las curvas ROC demostraron que sus puntuaciones de riesgo pueden predecir con precisión el pronóstico de los pacientes con CECC a 1, 3 y 5 años [136].

Los principales estudios relacionados con la expresión de miARNs y CECC incluidos en esta revisión, publicados en el primer artículo de la tesis doctoral, se resumen en el anexo 3. Como se puede apreciar, en CECC, las familias de miR-21,

INTRODUCCIÓN

miR-31, miR-99a y miR-142 generalmente estaban sobreexpresadas, mientras que las familias de miR-125, miR-145 y miR-199 estaban principalmente infraexpresadas. Sin embargo, se pueden encontrar algunas controversias con las familias miR-15, miR-30, miR-155, miR-375, que se ha descrito que funcionan ocasionalmente como miARNs duales.

Finalmente, en relación con la respuesta al tratamiento, Lapa et al. revelaron que la biopsia líquida y particularmente los miARNs podrían usarse como biomarcadores para brindar información más detallada que ayudará a seleccionar la mejor opción de tratamiento y monitorizar la respuesta del tumor [137]. Algunos estudios demostraron que los miARNs estaban elevados en el plasma de pacientes con CECO y sus niveles se redujeron notablemente después de la cirugía de resección, lo que respalda que estos marcadores estaban asociados con el tumor [138].

Curiosamente, un metaanálisis reveló importantes grupos de firmas de miARNs asociados con la respuesta al tratamiento con Cetuximab y la supervivencia libre de progresión en pacientes con CECC [139]. El estudio de Summerer et al. de 2013 analizó los cambios en miARNs plasmáticos en pacientes con CECC tratados con RT y QT, e identificaron 6 miARNs (miR-425-5p, miR-21-5p, miR-106b-5p, miR-590-5p, miR-574-3p y miR-885-3p) que mostraron cambios significativos después de 2 días de tratamiento, sugiriendo su potencial como biomarcadores de respuesta terapéutica [140]. Posteriormente, en 2015, el mismo grupo validó estos hallazgos en una cohorte independiente, encontrando que los niveles elevados de ciertos miARNs antes y después del tratamiento se asociaban con un peor pronóstico, lo que respalda la utilidad de los miARNs plasmáticos como herramientas mínimamente invasivas para la monitorización y el pronóstico en pacientes con CECC [141]. En un esfuerzo por minimizar la morbilidad y mortalidad relacionadas con el tratamiento, se cree que los biomarcadores sanguíneos precisos podrían evitar que tratamientos ineficaces empeoren el pronóstico de los pacientes con CECC o reduzcan las tasas de supervivencia, ya que el tratamiento también se asocia con efectos secundarios y puede reducir su calidad de vida [142–144].

Las conclusiones relacionadas con la expresión de miARNs podrían ser engañosas porque medir estos niveles de expresión hoy en día sigue siendo un desafío debido a que los umbrales de corte no están claramente definidos y los resultados de los estudios preliminares dependen del laboratorio que realiza el

análisis. Además, estos valores están determinados por las muestras analizadas (plasma, suero y tejido tumoral), ya que los niveles de expresión de los miARNs son muy variables según el tipo de célula [145]. Estas son algunas de las razones por las que, a pesar de los esfuerzos de varios autores que informaron el valor diagnóstico de los miARNs circulantes y su papel potencial como factores pronósticos en pacientes que padecen CECC [145], todavía faltan datos sobre el papel pronóstico de los mismos. Sin embargo, aunque el estudio de los miARNs circulantes como biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico en tumores de órganos sólidos aún está en fases preliminares [146], se considera posible que la combinación de biopsias líquidas con endoscopia de rutina y técnicas de imagen debería mejorar la vigilancia y el pronóstico del CECC [147].

1.5. Telomerasa

1.5.1. Definición y concepto de telómeros y telomerasa.

La telomerasa es un complejo de ribonucleoproteína que contiene un molde interno de ARN telomérico (TERC) y una proteína catalítica con actividad de transcriptasa inversa específica de los telómeros humanos (hTERT), que añade la terminación “TTAGGG” al final del cromosoma, creando la estructura final del mismo, llamada telómero, manteniendo así su integridad durante la replicación del ADN [148,149]. La activación de la telomerasa evita que los telómeros se acorten, lo que puede conducir a la inmortalización celular, la evitación de la apoptosis y la promoción de la tumorigénesis [148,150].

La expresión de la actividad telomerasa y la longitud de los telómeros se considera uno de los aspectos más relevantes en el diagnóstico precoz de los carcinomas [151]. Las células somáticas normales no expresan telomerasa; sin embargo, se encuentra una alta actividad de telomerasa en la mayoría de las neoplasias malignas [152,153]. Esta activación está estrechamente asociada con un resultado clínico deficiente en el cáncer localmente avanzado [151], y esta actividad está fuertemente correlacionada con la expresión de hTERT, que desempeña un papel clave en la proliferación celular ilimitada [154] (*figura 7*).

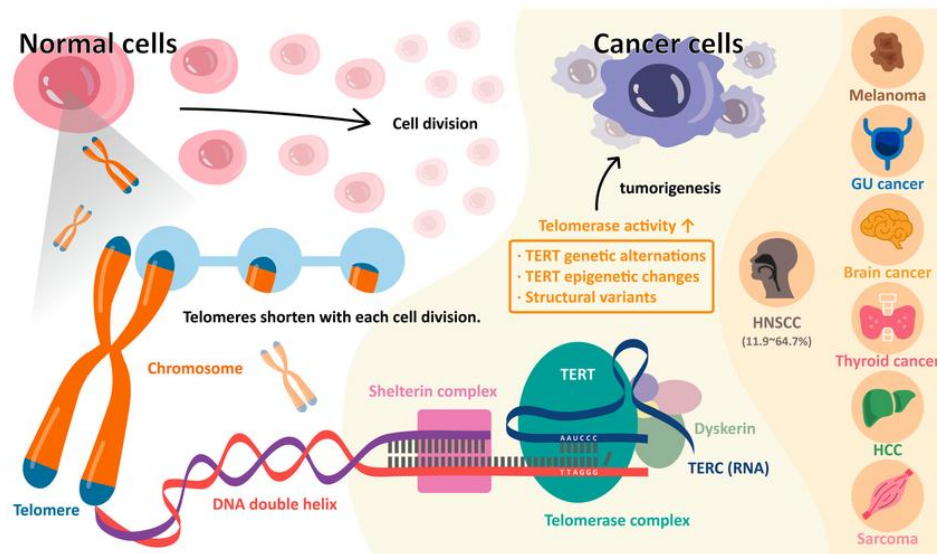


Figura 7. Imagen donde se observa que, en condiciones normales, los telómeros se acortan con cada ciclo de división celular, mientras que, en células tumorales, el aumento de la actividad de la telomerasa favorece la proliferación celular, tomada del artículo “*Deciphering the Functions of Telomerase Reverse Transcriptase in Head and Neck Cancer*” [149].

El descubrimiento de los telómeros y la telomerasa fue protagonista en el 2009, ya que hizo que el Instituto Karolinska de Estocolmo concediera el Premio Nobel de Medicina de ese año a sus investigadores Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider [155,156] y Jack W. Szostak [157], por las implicaciones de los mismos tanto en el proceso del envejecimiento como del cáncer.

1.5.2. Utilidad de la telomerasa como marcador en pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.

La expresión/actividad de la telomerasa y la disfunción de los telómeros se han investigado ampliamente en el cáncer [158–160], y la mayoría de los estudios indican que son eventos tempranos cruciales en la tumorigénesis, a menudo detectables en la etapa previa al desarrollo tumoral [161–166].

En los últimos años, numerosos estudios han detectado este ARNm de la hTERT en la sangre periférica de pacientes con diferentes tumores como el cáncer de

próstata, pulmón y gástrico, y han demostrado que la elevación del ARNm de la hTERT en sangre periférica está estrechamente relacionada con parámetros clínico-patológicos, eficacia del tratamiento y otros biomarcadores tumorales de pacientes con cáncer [167].

Específicamente, en la VAS, se ha encontrado una baja expresión y actividad de telomerasa en el epitelio normal, mientras que se ha detectado una alta expresión en el 75-100% de los pacientes con CECC [154,168–174].

Además, varios autores han demostrado la implicación de la longitud telomérica tanto en el diagnóstico, donde ha sido relacionada con el riesgo de progresión del cáncer [175–178], como en el pronóstico [179].

Se han descrito diferentes vías de señalización que interactúan con la hTERT, como WNT/ β -catenina y factor nuclear kappa B (NF- κ B), amplifica su influencia en la progresión tumoral, creando una compleja red de efectos prooncogénicos [180].

1.6. Justificación del trabajo.

La biopsia de tejido y el estudio histológico anatómo-patológico sigue siendo el método gold standard de referencia para la confirmación y el diagnóstico definitivo del cáncer, incluyendo el CECC, pero la heterogeneidad de las neoplasias sigue siendo uno de los mayores problemas tanto en el diagnóstico como en el tratamiento [32]; una sola biopsia de tejido por sí sola no podría ser representativa de esta diversidad. La detección de micrometástasis locorregionales también podría ser difícil y la biopsia incisional y los hallazgos inmunohistoquímicos inespecíficos durante el análisis anatomopatológico pueden conducir a un tratamiento ineficaz [181–183].

Una opción menos invasiva para ayudar en el diagnóstico o en la monitorización del cáncer es la biopsia líquida, que podría permitir, además, predecir la respuesta al tratamiento y la enfermedad residual mínima [184].

La ausencia de biomarcadores validados en el CECC fiables para predecir o confirmar el diagnóstico, personalizar los tratamientos dirigidos o monitorizar la respuesta a los mismos, hace que sea necesario buscar y estudiar moléculas alternativas, como podrían ser los miARNs o el ARNm de la hTERT plasmáticos obtenidos mediante biopsia líquida.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A medida que crece nuestra comprensión de las vías moleculares detrás de la patología CECC, es posible mejorar la supervivencia y la calidad de vida del paciente facilitando el diagnóstico temprano y el seguimiento posterior al tratamiento.

Hipótesis: los niveles de expresión de los miARNs y el ARNm de la hTERT plasmáticos son biomarcadores de utilidad en el diagnóstico del CECC avanzado y sirven para evaluar la respuesta de un paciente al tratamiento e identificar recurrencias tempranas de la enfermedad CECC avanzado.

Con la intención de estudiar esta hipótesis, nos hemos fijado varios **objetivos**:

- Analizar las características epidemiológicas y clínicas de los pacientes del grupo control y del grupo de pacientes con CECC avanzado.
- Analizar la expresión de un subconjunto de los miARNs y el ARNm de la hTERT plasmáticos, en pacientes del grupo control y pacientes con CECC avanzado al diagnóstico antes de comenzar el tratamiento.
- Comparar los niveles de expresión de los miARNs y el ARNm de la hTERT plasmáticos de los pacientes diagnosticados de CECC avanzado y pacientes del grupo control (utilidad para el diagnóstico).
- Analizar los niveles de expresión de los miARNs y del ARNm de la hTERT plasmáticos e intentar correlacionarlos con las características clínico-patológicas de los pacientes con CECC avanzado.
- Comparar los niveles de expresión de los miARNs y el ARNm de la hTERT plasmáticos antes y después del tratamiento, en distintos momentos del seguimiento, en los pacientes diagnosticados de CECC avanzado (utilidad para el pronóstico).
- Determinar si algún miARN, o el ARNm de la hTERT, se correlaciona en plasma positiva o negativamente con la supervivencia de los pacientes con CECC avanzado (utilidad para la monitorización).
- Evaluar la desregulación de esos miARNs y la expresión del ARNm de la hTERT plasmáticos y correlacionar los resultados con la exploración clínica y las pruebas de imágenes en pacientes con CECC avanzado.

3. METODOLOGÍA

3. METODOLOGÍA

3.1. Revisión de la bibliografía.

Previo al reclutamiento de pacientes, se revisaron todos los artículos publicados en inglés o español que abordaran el análisis de miARNs y el ARNm de la hTERT circulantes o plasmáticos en CECC hasta octubre de 2022 y los hallazgos más significativos en diagnóstico y pronóstico. Se excluyeron de esta búsqueda otros estudios de biomoléculas en otros fluidos como saliva, así como sobre ARNs no codificantes largos o exosomales. Para la redacción del documento de tesis doctoral, se han incluido los estudios actualizados hasta abril de 2025.

Los términos clave utilizados para la búsqueda fueron "microRNA", "hTERT mRNA", "hTERC", "telomerase" y "human telomerase reverse transcriptase", combinados con "head and neck squamous cell cancer", "oral/oropharyngeal/hypopharyngeal/laryngeal cancer" y "blood or plasma".

3.2. Diseño de los estudios.

Se realizó un estudio observacional, longitudinal, prospectivo, analítico, con un diseño de casos-contróles, en el que se compararon pacientes enfermos al diagnóstico con controles sanos, y a los que se les realizó un seguimiento durante un año desde que finalizaron el tratamiento.

3.3. Población del estudio.

Entre enero de 2019 y enero de 2022 se reunieron 30 controles sanos y 37 pacientes con CECC recién diagnosticados (estadios III y IV) de cavidad oral, orofaringe, hipofaringe y laringe. Los sujetos del grupo control no tenían antecedentes oncológicos, y para sus muestras de sangre, se eligieron pacientes que fueron ingresados en el hospital para procedimientos quirúrgicos variados. En el caso de los pacientes con CECC, se excluyeron los pacientes con otros antecedentes de cáncer

de cualquier tipo, los casos de trastornos de inmunodeficiencia reconocidos, como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, y los pacientes con CECC en estadio I o II.

3.4. Variables clínicas.

En el estudio se recogieron varios factores como edad, sexo, consumo de tabaco y alcohol, detección de inmunohistoquímica p16 como biomarcador subrogado del estado del VPH, ubicación del tumor, estadio (determinado por las directrices de la *NCCN* para los cánceres de cabeza y cuello versión 1.2018) y grado histológico. Además, se incluyó el tipo de tratamiento recibido por el paciente, y en el caso de las recidivas se concretó el tipo de QT e IT recibido y las dosis de RT.

3.5. Declaración de Ética.

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del área de Burgos y Soria (Referencia CEIC 2041) y todos los participantes firmaron un consentimiento informado.

3.6. Pruebas otorrinolaringológicas (ORL) y de imagen.

La evaluación del cáncer en el momento del diagnóstico, así como durante el seguimiento tras completar el tratamiento seleccionado y en el momento de la sospecha de la recurrencia se realizó mediante la exploración de la cavidad oral y orofaríngea, endoscopia, TAC y/o PET-TAC.

3.7. Protocolo de extracción y recolección de muestras.

A cada paciente, en los distintos momentos del estudio, se le extrajeron 2 muestras de 6 mL de sangre que se recogieron en tubos de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), y se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Dentro de las primeras 4 horas después de la recolección, se procesaron las muestras de sangre. El plasma se separó mediante doble centrifugación: 1600 x g

durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de 6000 x g durante otros 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras resultantes se almacenaron en alícuotas de un ml a -80 °C hasta que se realizó el aislamiento del ARN.

3.8. Protocolo de extracción del ácido ribonucleico y de la retrotranscripción inversa.

Utilizando el kit miRNeasy Serum/Plasma (Qiagen N.V., Hilden, Alemania) y las instrucciones del fabricante (ver Anexo 4), se extrajo el ARN total de las muestras de plasma. Con un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE), se determinó la concentración de ARN total. Se utilizó el kit de síntesis de ADNc Transcriptor High Fidelity (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA) para transcribir de forma inversa 10 ng de ARN total de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ver Anexo 5). Nuevamente se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE), en este caso para medir la concentración de ADNc.

3.9. Protocolo de amplificación de microARN.

Exiqon determinó los niveles de expresión de miARNs maduros con ayuda de un sistema de PCR rápido en tiempo real 7900HT (Applied Biosystems, California, EE. UU.) y el kit de PCR miScript SYBR Green (Qiagen, Hilden, Alemania). Los niveles de expresión se calibraron contra el control interno RNU6B de Qiagen en Hilden, Alemania. La técnica $2^{-\Delta\Delta C_t}$ se utilizó para analizar la cuantificación relativa de miARNs en el plasma tanto de muestras tumorales como de muestras de control. Para determinar el ddCt de muestras de plasma CECC, se utilizó un ddCt promedio del grupo de control no oncológico. Los valores de expresión relativa inferiores a 0,5 se consideraron regulados negativamente y los valores superiores a 2 se clasificaron como sobreexpresados.

3.10. Selección de microARNs.

Utilizando las bases de datos del Programa de Secuenciación del Genoma Doméstico del Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano, Cochrane, UpToDate y PubMed, se realizó una revisión de la literatura. El panel final de miARNs detectados se derivó de los estudios con el factor de impacto más alto y los miARNs coincidentes, con la siguiente lista final: miR-21-5p, miR-26b, miR-28-3p, miR-99a, miR-122, miR-143-3p, miR-146, miR-195-5p, miR-206, miR-223, miR-374b-5p, miR-375, miR-425-5p, miR-451a, miR-512-5p, miR-574-3p y miR-3591-3p.

3.11. Protocolo de medición del ARNm de la hTERT.

El proceso de extracción, transcripción inversa, amplificación y determinación de los niveles de expresión del ARN es el descrito previamente. Se utilizó la técnica $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para analizar la cuantificación relativa (RQ) del ARNm de la hTERT en el plasma tanto de muestras tumorales como de muestras de control. Para determinar el ddCt de muestras de plasma de los pacientes con CECC, se utilizó un ddCt promedio del grupo de control no oncológico.

3.12. Seguimiento de los pacientes.

Todos los pacientes oncológicos incluidos en el estudio tenían al diagnóstico una prueba de imagen (bien TAC o bien PET-TAC), con una biopsia histológica positiva para carcinoma epidermoide. Una vez confirmado el diagnóstico y antes de iniciar el tratamiento, se les realizó una extracción de 2 muestras de sangre de 6mL.

A los sujetos que servían como controles únicamente se les realizó una extracción.

A todos los pacientes oncológicos se les realizó un seguimiento durante 12 meses tras haber finalizado el tratamiento, excepto aquellos que fallecieron antes de finalizar este periodo. El control mediante exploración ORL y pruebas de imagen de los pacientes oncológicos se realizó a los 2, 6 y 12 meses tras haber finalizado el tratamiento. En este periodo, se extrajeron muestras sanguíneas al mes, así como a los 2, 6 y 12 meses después de finalizar el tratamiento. Se obtuvieron muestras

adicionales en caso de que se sospechara una recurrencia, y a los 7 días post-intervención en los pacientes que fueron sometidos a cirugía radical.

3.13. Financiación.

El trabajo ha sido financiado por la Fundación de Burgos por la Investigación en la Salud, gracias a sus becas de los años 2018, 2019 y 2020.

3.14. Análisis estadístico.

Para realizar el análisis estadístico se utilizó el software SPSS 26.0.

Las variables analizadas fueron las descritas previamente.

Se utilizaron valores de “Fold Change” para normalizar los datos de expresión de los miARNs.

Se emplearon pruebas paramétricas debido a la distribución normal de los datos.

Se realizó una regresión logística multivariable para calcular los factores protectores y de riesgo para el desarrollo de CECC.

Se realizaron correlaciones bivariadas mediante la prueba de Fisher entre variables cualitativas y niveles de expresión de los miARNs y del ARNm de la hTERT.

Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Características socio-demográficas de los pacientes.

El estudio incluyó 67 pacientes, de los cuales, 30 formaron parte del grupo control y 37 del grupo de pacientes con CECC. El grupo control estaba compuesto por 17 hombres (56,7%) y 13 mujeres (43,3%), con una edad media de 62,3 años, mientras que el grupo CECC lo conformaron 29 hombres (78,4%) y 8 mujeres (21,6%), de 50,8 años de edad media.

Respecto a los hábitos tóxicos, encontramos que sólo 4 (10,8%) de los pacientes con CECC no habían fumado nunca y 6 (16,2%) no habían bebido nunca, mientras que, en el grupo control, los no fumadores eran 16 (53,3%) y los no bebedores 26 (86,7%). De los 37 pacientes con CECC, 12 (32,4%) eran fumadores y bebedores simultáneamente (*Tabla 1*).

Al comparar estos hábitos, observamos que el grupo con CECC tenía mayor porcentaje de fumadores -70,3% y 20% respectivamente- (Chi cuadrado, $p=0,03$) y bebedores activos -73% frente a 13,4%- (Chi cuadrado, $p=0,022$) que el grupo control. El consumo simultáneo de alcohol y tabaco tenía un riesgo aumentado de 63,4% de desarrollar CECC (Análisis multivariante, $R^2=0,634$) (*Tabla 2*).

4.2. Características clínico-patológicas de los tumores.

La orofaringe fue la localización tumoral más frecuente, con 15 pacientes (40,5%). Aproximadamente un tercio de los pacientes, 14 (37,8%), presentaban un carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado y la mayoría, 31 de ellos (83,8%) tenían una inmunohistoquímica para p16 negativa. En cuanto al nivel de estadiaje, 18 (48,6%) de los pacientes tenían un estadio IVb, y prácticamente todos, 35 (94,6%) eran M0. A nivel loco-regional, T4b y N2c fueron los estadios más frecuentes con 14 (37,8%) y 9 (24,3%) pacientes respectivamente (*tabla 3*).

RESULTADOS

VARIABLES	PACIENTES CECC		GRUPO CONTROL		P-VALOR
	N	%	N	%	
SEXO					
HOMBRE	29	78,4%	17	56,7%	
MUJER	8	21,6%	13	43,3%	
EDAD (AÑOS)					
MEDIA $\pm$ DE	62,3 $\pm$ 8,3 (SD)		50,8 $\pm$ 15,0 (SD)		
CONSUMO DE TABACO					0,03
>20 CIGARROS AL DÍA	21	56,8%	2	6,7%	
<20 CIGARROS AL DÍA	4	10,8%	4	13,3%	
PIPA	1	2,7%	0	0%	
EXFUMADOR	7	18,9%	8	26,7%	
NO FUMADOR	4	10,8%	16	53,3%	
CONSUMO DE ALCOHOL					0,022
SEVERO	12	32,4%	0	0%	
MODERADO	14	37,8%	2	6,7%	
LEVE	1	2,7%	2	6,7%	
EXBEBEDOR	4	10,8%	0	0%	
NO BEBEDOR	6	16,2%	26	86,7%	

Tabla 1. Características epidemiológicas de los sujetos incluidos en el estudio.

DESARROLLO CECC	ODDS	LÍMITE INFERIOR	LÍMITE SUPERIOR	P-VALOR
	RATIO	IC 95%	IC 95%	
Consumo tabaco	2,190	1,166	4,114	0,015
Consumo alcohol	3,261	1,966	5,408	0,000
Tabaco + Alcohol	2,675	1,555	4,604	0,000

Tabla 2. Riesgo de desarrollar CECC en relación con los hábitos tóxicos.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS					
	N	%		N	%
LOCALIZACIÓN TUMORAL			T		
CAVIDAD ORAL	5	13,5%	T1	1	2,7%
OROFARINGE	15	40,5%	T2	3	8,1%
HIPOFARINGE	6	16,2%	T3	8	21,6%
SUPRAGLOTIS	8	21,6%	T4A	11	29,7%
GLOTIS	3	8,1%	T4B	14	37,8%
ESTADO VPH (P16)			N		
POSITIVO	6	16,2%	N0	9	24,3%
NEGATIVO	31	83,8%	N1	6	16,2%
GRADO HISTOLÓGICO			N2B	7	19 %
POBREMENTE DIFERENCIADO	10	27,1%	N2C	9	24,3%
MODERADAMENTE DIFERENCIADO	14	37,8%	N3B	6	16,2%
BIEN DIFERENCIADO	9	24,3%	M		
NO ESPECIFICADO	4	10,8%	M0	35	94,6%
ESTADIO			M1	2	5,4%
III	8	21,6%			
IVA	9	24,3%			
IVB	18	48,6%			
IVC	2	5,4%			

Tabla 3. Características clínico-patológicas de los pacientes con CECC.

La inmunohistoquímica de p16 fue positiva en 6 (16,2%) de los pacientes con CECC y, en todos los casos, el tumor estaba localizado en la orofaringe. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre la expresión de p16 y la localización del tumor (Chi cuadrado, $p=0,081$), probablemente como consecuencia del pequeño tamaño de la muestra.

RESULTADOS

4.3. MicroARNs en el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello avanzado.

4.3.1. Valor diagnóstico: comparativa de pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello frente a controles al diagnóstico.

El estudio evaluó los niveles de expresión relativos de los miARNs seleccionados en el plasma de 30 controles y 37 pacientes con CECC que no habían recibido tratamiento previo (*tabla 4 y figura 8*), y encontramos que, en pacientes con CECC, los miR-21-5p y miR-122 estaban sobreexpresados (t-Student, $p < 0,001$) y miR-195-5p tenía los niveles de expresión reducidos (t-Student, $p = 0,002$), en comparación con el grupo control.

MiARN	Controles	CECC	p-valor
MiR-21-5p	0,029 ± 0,002	0,302 ± 0,007	0,000
MiR-26b	0,299 ± 0,009	0,335 ± 0,005	0,378
MiR-28-3p	0,312 ± 0,001	0,321 ± 0,002	0,685
MiR-99a	0,100 ± 0,002	0,922 ± 0,001	0,683
MiR-122	0,003 ± 0,001	0,203 ± 0,002	0,000
MiR-143-3p	0,920 ± 0,002	0,813 ± 0,001	0,367
MiR-146	0,021 ± 0,005	0,022 ± 0,000	0,979
MiR-195-5p	0,399 ± 0,001	0,141 ± 0,001	0,002
MiR-206	0,939 ± 0,002	0,735 ± 0,009	0,083
MiR-223	0,225 ± 0,003	0,223 ± 0,000	0,540
MiR-374b-5p	0,231 ± 0,003	0,220 ± 0,002	0,988
MiR-375	0,222 ± 0,005	0,202 ± 0,002	0,997
MiR-425-5p	0,332 ± 0,002	0,512 ± 0,009	0,187
MiR-451a	0,052 ± 0,010	0,022 ± 0,003	0,339
MiR-512-5p	0,132 ± 0,000	0,192 ± 0,005	0,730
MiR-574-3p	0,232 ± 0,002	0,230 ± 0,003	0,920
MiR-3591-3p	0,533 ± 0,003	0,523 ± 0,002	0,914

Tabla 4. Niveles de expresión medios ± desviación estándar (DS) de los miARNs en el grupo control y el grupo de pacientes con CECC.

Con el objetivo de analizar si los hábitos tóxicos podían determinar la expresión de los miARNs seleccionados, se examinaron las posibles diferencias entre los niveles de expresión de estos miARNs y las conductas de fumar o consumir alcohol en pacientes con CECC. Los fumadores sobreexpresaron miR-574-3p (Kruskal-wallis, $p=0,015$) independientemente de si eran pacientes sanos o con tumores. Los pacientes en estadios IV sobreexpresaron miR-374b-5p (Kruskal-wallis, $p=0.005$) en comparación con los del estadio III. No encontramos una correlación significativa entre la expresión de miARNs y el consumo de alcohol, ni con la localización del tumor o el grado histológico.

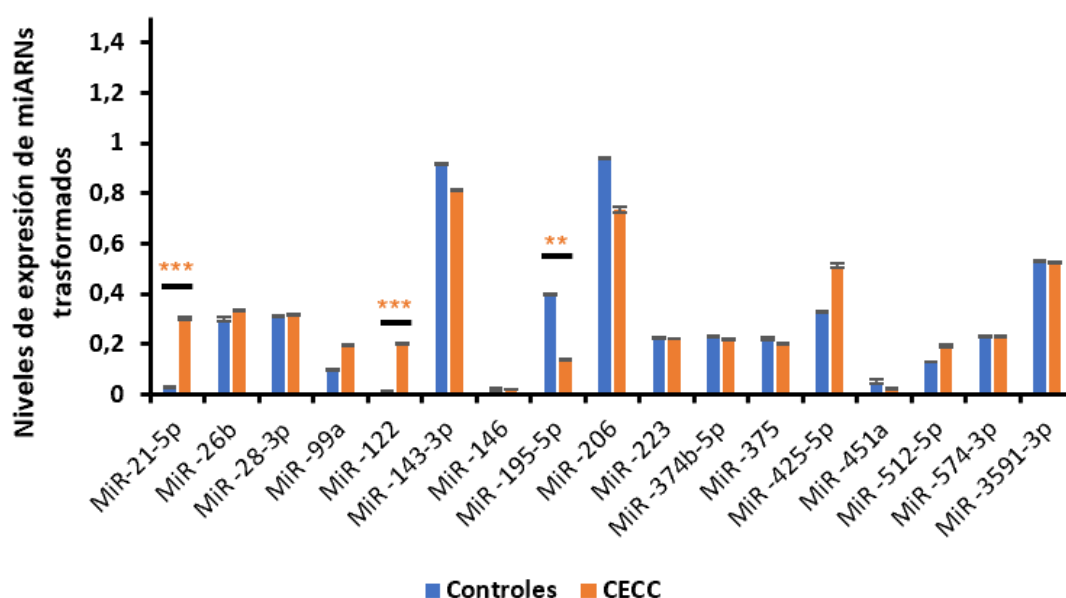


Figura 8. Representación gráfica de los niveles de expresión normalizados de los miARNs al diagnóstico, donde vemos que miR-21-5p, y miR-122 estaban sobreexpresados en pacientes con CECC con una alta significancia, y miR-195-5p infraexpresado de manera muy significativa.

RESULTADOS

4.3.2. Valor pronóstico: utilidad de los microARNs en el seguimiento de pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.

En esta segunda parte, se estudiaron los datos de los 37 pacientes con CECC, con el objetivo de analizar los niveles de expresión de miARNs de los pacientes después de completar sus terapias individuales.

Al final del periodo de seguimiento (12 meses), 18 pacientes se mantuvieron vivos libres de enfermedad (VLE), 6 vivían con enfermedad (VE), y 11 fallecieron con enfermedad (FE), 6 debido a la misma y 5 por otra causa. Se descartaron 2 pacientes de los 37, uno por desarrollar un hepatocarcinoma durante el seguimiento, y otro por no realizar seguimiento alguno. Así, agrupamos a los 35 pacientes incluidos en 2 grupos: VLE (18) y VE/FE (17). Los miR-122 y miR-195-5p se sobreexpresaron significativamente en pacientes VLE frente a pacientes con enfermedad (VE/FE) en cada momento clave (al diagnóstico, y 1 mes, 2 meses, 6 meses y un año postratamiento). Además, también detectamos diferencias significativas en los miR-374-5p (Anova, $p=0,011$), miR-425-5p (Anova, $p=0,011$) y miR-451a (Anova, $p=0,001$) un mes después de finalizar el tratamiento entre estos 2 grupos (*tabla 5*).

Al examinar las diferencias en los niveles de expresión de los miARNs en diversas ubicaciones tumorales en estos 2 grupos de pacientes (VLE frente a VE/FE), en el momento del diagnóstico, se observaron diferencias significativas: el miR-206 se elevó (Anova, $p=0,012$) en el grupo de glotis-cavidad oral de pacientes con enfermedad en comparación con aquellos VLE, y miR-375 también se incrementó (Anova, $p=0,020$) en el grupo de pacientes con cáncer de cavidad oral con enfermedad frente a pacientes VLE.

RESULTADOS

	Diagnóstico			1 mes			2 meses			6 meses			12 meses		
	VLE	VE/FE	p-valor	VLE	VE/FE	p-valor	VLE	VE/FE	p-valor	VLE	VE/FE	p-valor	VLE	VE/FE	p-valor
MiR-21-5p	0,101±0,001	0,130±0,001	0,601	0,071±0,01	0,123±0,003	0,118	0,132±0,004	0,157±0,004	0,807	0,063±0,002	0,079±0,001	0,721	0,128±0,002	0,137±0,002	0,807
MiR-26b	0,130±0,003	0,155±0,003	0,493	0,110±0,007	0,100±0,005	0,912	0,393±0,003	0,214±0,001	0,162	0,226±0,006	0,405±0,002	0,162	0,292±0,002	0,212±0,001	0,162
MiR-28-3p	0,101±0,001	0,344±0,001	0,593	0,188±0,006	0,127±0,003	0,874	0,319±0,008	0,154±0,001	0,064	0,564±0,004	0,496±0,005	0,064	0,219±0,008	0,132±0,001	0,064
MiR-99a	0,311±0,001	0,515±0,001	0,531	0,511±0,051	0,381±0,005	0,256	0,339±0,003	0,143±0,004	0,058	0,582±0,003	0,469±0,001	0,058	0,229±0,002	0,123±0,002	0,058
MiR-122	0,531±0,004	0,110±0,004	0,03	0,327±0,007	0,107±0,003	0,049	0,551±0,331	0,140±0,331	0,008	0,742±0,004	0,258±0,001	0,006	0,551±0,221	0,120±0,331	0,002
MiR-143-3p	0,113±0,001	0,115±0,003	0,718	0,515±0,011	0,133±0,001	0,093	0,310±0,191	0,257±0,005	0,894	0,556±0,005	0,508±0,006	0,894	0,210±0,191	0,237±0,003	0,894
MiR-146	0,111±0,004	0,353±0,001	0,751	0,081±0,001	0,107±0,001	0,897	0,328±0,310	0,202±0,191	0,141	0,572±0,005	0,484±0,006	0,014	0,288±0,210	0,187±0,191	0,014
MiR-195-5p	0,531±0,001	0,151±0,001	0,014	0,500±0,005	0,171±0,003	0,015	0,333±0,001	0,103±0,001	0,017	0,577±0,001	0,277±0,004	0,02	0,522±0,001	0,203±0,001	0,039
MiR-206	0,113±0,001	0,444±0,001	0,141	0,300±0,007	0,232±0,007	0,685	0,382±0,002	0,279±0,005	0,351	0,618±0,001	0,417±0,002	0,351	0,288±0,008	0,279±0,003	0,351
MiR-223	0,531±0,001	0,504±0,003	0,918	0,071±0,007	0,151±0,005	0,115	0,333±0,002	0,211±0,005	0,438	0,577±0,006	0,477±0,005	0,438	0,222±0,008	0,211±0,003	0,438
MiR-374b-5p	0,013±0,001	0,501±0,004	0,853	0,505±0,010	0,118±0,003	0,011	0,312±0,002	0,191±0,001	0,754	0,558±0,006	0,505±0,002	0,754	0,218±0,008	0,191±0,001	0,754
MiR-375	0,113±0,003	0,343±0,001	0,405	0,010±0,001	0,181±0,003	0,075	0,305±0,003	0,343±0,008	0,901	0,552±0,002	0,515±0,002	0,901	0,205±0,002	0,323±0,008	0,901
MiR-425-5p	0,301±0,001	0,430±0,004	0,119	0,351±0,008	0,102±0,001	0,011	0,353±0,005	0,185±0,351	0,101	0,594±0,002	0,452±0,002	0,101	0,252±0,005	0,183±0,331	0,101
MiR-451a	0,113±0,001	0,115±0,001	0,858	0,510±0,006	0,101±0,002	0,001	0,311±0,001	0,163±0,374	0,131	0,557±0,004	0,507±0,002	0,131	0,211±0,001	0,163±0,372	0,131
MiR-512-5p	0,313±0,001	0,131±0,003	0,571	0,121±0,001	0,103±0,008	0,902	0,312±0,005	0,207±0,313	0,347	0,558±0,003	0,505±0,002	0,347	0,218±0,005	0,207±0,313	0,347
MiR-574-3p	0,011±0,001	0,334±0,004	0,94	0,088±0,001	0,151±0,001	0,148	0,323±0,005	0,221±0,341	0,364	0,568±0,008	0,490±0,004	0,364	0,282±0,005	0,221±0,321	0,364
MiR-3591-3p	0,311±0,001	0,114±0,04	0,313	0,211±0,001	0,133±0,002	0,154	0,305±0,002	0,281±0,008	0,996	0,552±0,009	0,515±0,001	0,989	0,245±0,002	0,221±0,003	0,996

Tabla 5. Valores promedio $\pm$ DS de los diversos niveles de expresión de miARNs transformados en estos dos grupos al diagnóstico y durante el seguimiento de un año.

RESULTADOS

4.3.3. Correlación de los microARNs con las pruebas disponibles para el diagnóstico del carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.

En este 3^{er} apartado, se incluyeron únicamente 22 de los 37 pacientes oncológicos que, desde enero de 2019 hasta enero de 2022, fueron diagnosticados de CECC localmente avanzado (estadios III y IV) de cavidad oral, orofaringe, hipofaringe y laringe, y completaron un tiempo de seguimiento de 12 meses, sin desarrollar otros tumores primarios. Además, el otro requisito que debían para ser incluidos en este apartado es que durante el seguimiento tuvieran un control de ORL y por imagen a los 2, 6 y 12 meses (*tabla 6*).

Nº	DIAGNÓSTICO	HISTOLOGÍA	TRATAMIENTO
3	T4bN2cM0 – IVb ca. supraglótico	Pobrementemente diferenciado, p16-	QTi + QRT
4	T4aN0M0 – III ca. orofaríngeo	Moderadamente diferenciado, p16+	QTi + QRT
5	T4bN2cM0 – IVb ca. hipofaríngeo	Bien diferenciado, p16-	QTi + QRT + CIRUGÍA
6	T4aN0M0 – III ca. orofaríngeo	Pobrementemente diferenciado, p16+	QTi + QRT
7	T3N2cM0 – IVb ca. cavidad oral	Pobrementemente diferenciado, p16-	QTi + QRT +
8	T4aN0M0 – IVa ca. glótico	Bien diferenciado, p16-	CIRUGÍA + QRT + NIVOLUMAB
11	T4aN2bM0 – IVb ca. cavidad oral	Bien diferenciado, p16-	QTi + QRT
27	T4bN2cM0 – IVb ca. orofaríngeo	Pobrementemente diferenciado, p16+	QTi + QRT
32	T4aN1M0 - IVa ca. hipofaríngeo	Pobrementemente diferenciado, p16-	QTi + QRT
34	T3N0M0 – III ca. orofaríngeo	Bien diferenciado, p16-	QRT
35	T4aN3bM0 – III ca. orofaríngeo	Moderadamente diferenciado, p16+	QTi + QRT + 1ª línea NIVOLUMAB x3, 2ª línea TAXOL - CETUXIMAB
36	T4aN2bM0 - IVa ca. orofaríngeo	Pobrementemente diferenciado, p16-	QTi + QRT
41	T4bN3bM0 – IVb ca. supraglótico	Pobrementemente diferenciado, p16-	QTi + CIRUGÍA + RT
44	T4bN2cM0 – IVb ca. supraglótico	Moderadamente diferenciado, p16-	QTi + QRT
47	T4bN1M0 - IVa ca. orofaríngeo	Moderadamente diferenciado, p16+	QTi + QRT + NIVOLUMAB
55	T2N3bM0 – IVb ca. hipofaríngeo	Moderadamente diferenciado, p16-	QTi + QRT
58	T3N2cM0 - IVa ca. cavidad oral	Moderadamente diferenciado, p16-	QTi + CIRUGÍA + RT
60	T3N1M0 – III ca. supraglótico	Pobrementemente diferenciado, p16-	QTi + QRT
61	T4aN0M0 - IVa ca. supraglótico	Moderadamente diferenciado, p16-	CIRUGÍA + RT
62	T4bN2bM0 – IVb ca. orofaríngeo	Moderadamente diferenciado, p16-	QTi + QRT + CARBOPLATINO-5FU-PEMBROLIZUMAB
64	T3N0M0 – III ca. supraglótico	Bien diferenciado, p16-	QRT + CIRUGÍA
65	T1N3bM0 – IVb ca. orofaríngeo	Bien diferenciado, p16-	QTi+QRT

Tabla 6. TNM, localización, grado histológico, y tratamiento global recibido por los 22 pacientes del estudio que realizaron seguimiento de 1 año.

Además de las pruebas de control pertinentes tras haber finalizado el tratamiento, a todos los pacientes se les realizó una extracción de sangre para medir los niveles de expresión de los diferentes miRNAs al mes y a los 2, 6 y 12 meses. Con la finalidad de investigar si los cambios en los niveles de expresión de los miRNAs resultaban fiables al compararlos con las pruebas de rutina realizadas, realizamos una correlación bivariada con el test de Fisher, a los 2, 6 y 12 meses. Obtuvimos una asociación positiva con los miR-21-5p, miR-28-3p, miR-99a, miR-143-3p, miR-146, miR-206, miR-223, miR-425-5p, miR-512-5p y miR-3591-3p en diferentes momentos del seguimiento (*tabla 7*).

RESULTADOS

	2 MESES				6 MESES				12 MESES			
	ENDOSCOPIA		PRUEBA IMAGEN		ENDOSCOPIA		PRUEBA IMAGEN		ENDOSCOPIA		PRUEBA IMAGEN	
	COEF. PEARSON	p-valor	COEF. PEARSON	p-valor	COEF. PEARSON	p-valor	COEF. PEARSON	p-valor	COEF. PEARSON	p-valor	COEF. PEARSON	p-valor
MiR-21-5p	,627	0,009	,546	0,029	-0,015	0,954	0,275	0,387	,076	,780	,076	,780
MiR-26b	0,166	0,538	0,196	0,468	0,083	0,751	-0,064	0,844	-,364	,166	-,364	,166
MiR-28-3p	0,401	0,124	0,429	0,097	,569	0,017	0,431	0,162	-,061	,822	-,061	,822
MiR-99a	0,419	0,106	,673	0,004	0,419	0,094	,751	0,005	-,015	,956	-,015	,956
MiR-122	-0,085	0,754	0,010	0,971	-0,099	0,704	0,202	0,528	-,010	,969	-,010	,969
MiR-143-3p	0,299	0,260	0,473	0,064	0,336	0,187	,651	0,022	,013	,962	,013	,962
MiR-146	0,346	0,189	0,365	0,165	,661	0,004	0,465	0,128	,433	,094	,433	,094
MiR-195-5p	0,055	0,839	0,394	0,131	0,391	0,120	0,444	0,149	,098	,717	,098	,717
MiR-206	0,355	0,177	0,376	0,152	,564	0,018	,804	0,002	,514	,042	,514	,042
MiR-223	0,002	0,994	0,106	0,697	0,394	0,118	,663	0,019	,153	,572	,153	,572
MiR-374b-5p	0,273	0,306	0,025	0,926	0,336	0,187	-0,009	0,979	-,215	,423	-,215	,423
MiR-375	-0,158	0,559	-0,004	0,989	0,288	0,262	0,309	0,329	,221	,412	,221	,412
MiR-425-5p	0,242	0,366	0,284	0,287	,678	0,003	0,403	0,194	,642	,007	,642	,007
MiR-451a	-0,071	0,794	-0,022	0,935	0,226	0,382	-0,134	0,679	-,026	,924	-,026	,924
MiR-512-5p	,537	0,032	0,113	0,676	0,253	0,326	0,364	0,245	-,019	,945	-,019	,945
MiR-574-3p	0,082	0,763	0,349	0,185	0,352	0,165	0,267	0,401	-,041	,880	-,041	,880
MiR-3591-3p	-0,085	0,755	0,048	0,860	0,297	0,247	0,548	0,065	,521	,039	,521	,039

Tabla 7. Correlación entre estudios ORL y de imagen con los miARNs diferencialmente expresados en los distintos puntos del seguimiento.

4.3.4. Utilidad para la predicción de recidivas en pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.

Consideramos recidiva aquella reaparición del tumor en la misma localización donde se había diagnosticado el tumor primario después de un periodo indetectable, tanto por exploración ORL como por prueba de imagen.

Con el fin de estudiar la posible utilidad de los miARNs para el diagnóstico de recidivas, dividimos a estos 22 pacientes oncológicos incluidos en esta parte del estudio en 2 grupos, obteniendo 15 pacientes VLE y 5 pacientes VE y 2 pacientes FE, de los cuales uno falleció por su CECC y otro por causas ajenas al cáncer (sangrado postoperatorio complicado con shock séptico de origen respiratorio con fracaso multiorgánico), pero con enfermedad. Estudiando los niveles de expresión transformados de estos pacientes en los diferentes puntos del seguimiento, obtuvimos valores de expresión significativos de diferentes miARNs, comparando pacientes con enfermedad persistente frente a VLE (*tabla 8*). De estos resultados concluimos que miR-146 se mantuvo estadísticamente significativo desde el diagnóstico hasta el control anual (sobreexpresado en pacientes VE/FE). Los 6 meses es el momento en el que más miARNs presentaron diferencias significativas, ya que, asociados a este miR-146, encontramos una sobreexpresión significativa de tanto de miR-195-5p y miR-223, como una disminución de miR-3591-3p a los 2-6 meses y una elevación de miR-425-5p a los 6-12 meses de seguimiento. MiR-206 también estaba sobreexpresado significativamente al año de seguimiento.

De los 22 pacientes que se incluyeron en esta parte del estudio, 7 presentaron durante el seguimiento una sospecha de recurrencia (*tabla 9*): 4 de ellos fueron sometidos a cirugía y los 3 restantes tuvieron una confirmación basada en imágenes. De los 4 pacientes intervenidos, la recidiva fue histológicamente confirmada en 2 de ellos y en los otros 2 el estudio histopatológico fue negativo. El tiempo medio hasta la recidiva en estos 5 pacientes fue de $6,2 \pm 3,35$ meses.

RESULTADOS

	DIAGNÓSTICO			2 MESES			6 MESES			12 MESES		
	Media	SD	p-valor	Media	SD	p-valor	Media	SD	p-valor	Media	SD	p-valor
MiR-21-5p	2,049	0,963	,081	1,542	2,100	,294	0,900	0,611	,991	0,738	0,326	,778
MiR-26b	-0,017	1,237	,620	-0,866	1,155	,735	-0,643	1,193	,691	-1,326	0,867	,214
MiR-28-3p	0,002	0,550	,325	-0,568	0,774	,591	-0,356	0,757	,280	-1,258	0,817	,469
MiR-99a	0,056	1,164	,135	-0,263	1,414	,307	-0,536	1,238	,217	-0,822	1,935	,604
MiR-122	2,701	2,811	,162	0,446	0,415	,490	0,607	0,459	,707	0,669	0,435	,410
MiR-143-3p	0,487	1,015	,461	-0,043	1,094	,673	-0,211	1,144	,753	-0,090	0,876	,772
MiR-146	0,758	0,763	,033	0,518	0,971	,017	0,777	0,392	,005	0,848	1,330	,016
MiR-195-5p	1,729	3,295	,079	0,342	1,408	,170	1,050	0,717	,014	-0,250	1,759	,769
MiR-206	0,278	1,852	,166	-0,413	1,589	,466	-0,720	1,770	,560	1,402	0,854	,004
MiR-223	2,036	4,094	,099	-0,233	2,022	,834	1,770	1,833	,019	0,888	0,904	,170
MiR-374b-5p	-0,866	1,346	,444	-1,694	1,666	,806	-1,299	1,399	,425	-2,508	0,608	,156
MiR-375	0,725	1,885	,275	0,075	1,482	,377	-0,320	1,369	,739	-0,144	1,724	,757
MiR-425-5p	-0,278	0,611	,214	-0,830	0,802	,364	0,993	0,523	,000	0,749	1,348	,037
MiR-451a	0,870	3,656	,103	-1,001	1,238	,429	-0,889	0,979	,454	-2,003	1,414	,493
MiR-512-5p	0,231	3,004	,358	-1,520	1,361	,446	-1,191	1,494	,992	-1,243	1,887	,947
MiR-574-3p	0,158	1,219	,568	-0,153	1,466	,491	-0,267	1,460	,677	-0,323	2,337	,932
MiR-3591-3p	-0,171	0,951	,064	0,161	1,376	,008	-0,132	1,201	,010	0,640	1,930	,062

Tabla 8. Niveles de expresión transformados de los miARNs en los diferentes puntos del seguimiento.

RESULTADOS

N° de paciente	5	64	27	36	7	41	62
Sexo	Hombre	Mujer	Hombre	Hombre	Hombre	Hombre	Hombre
Diagnóstico	Carcinoma hipofaríngeo T4bN2cM0 (Estadio IVb)	Carcinoma supraglótico T3N0M0 (Estadio III)	Carcinoma orofaríngeo T4bN2cM0 (Estadio IVb)	Carcinoma orofaríngeo T4aN2bM0 (Estadio IVa)	Carcinoma de cavidad oral T3N2cM0 (Estadio IVb)	Carcinoma supraglótico T4bN3bM0 (Estadio IVb)	Carcinoma orofaríngeo T4bN2bM0 (Estadio IVb)
Histopatología	Bien diferenciado, p16 -.	Bien diferenciado, p16 -.	Pobremente diferenciado, p16 +.	Pobremente diferenciado, p16 +.	Pobremente diferenciado, p16 -.	Pobremente diferenciado, p16 -.	Moderadamente diferenciado, p16 -.
QT inducción	3 x TPF (docetaxel, carboplatino y 5FU)	NO	3 x TPF (docetaxel, carboplatino y 5FU)	3 x PF (carboplatino AUC4 y 5FU)	3 x TPF (docetaxel, cisplatino y 5FU).	3 x PF (cisplatino y 5FU).	3 x TPF (docetaxel, cisplatino y 5FU).
RT	Radical (70Gy)	Radical (66 Gy)	Radical (69.9 Gy en tumor y adenopatías, 59.4 Gy en regiones ganglionares no afectas)	Radical (74.2 Gy en tumor y 63Gy en adenopatías patológicas)	Radical (70 Gy)	Radical (adyuvante) - 65.72 Gy	Radical (70 Gy)
QT concomitante	Carboplatino semanal AUC2/m ²	Cisplatino semanal 50mg/m ² iv	Cisplatino semanal 50mg/m ² iv	Carboplatino semanal AUC2/m ²	Cisplatino semanal 50mg/m ² IV x3 semanas, continua con Carboplatino AUC2/m ²	Carboplatino semanal AUC2/m ²	Cisplatino semanal 50mg/m ² IV
Cirugía	SI, DE RESCATE	SI, DE RESCATE	SI, BIOPSIA INSICIONAL	SI, BIOPSIA INCISIONAL	NO	SI (TRAS QT i Y ANTES DE QRT)	NO
Fecha sospecha de recurrencia	5 meses	6 meses	7 meses	4 meses	6 meses	12 meses	10 meses
Recurrencia	CONFIRMACIÓN HISTOLÓGICA	CONFIRMACIÓN HISTOLÓGICA	DESCARTADA	DESCARTADA	CONFIRMACIÓN RADIOLÓGICA	CONFIRMACIÓN RADIOLÓGICA	CONFIRMACIÓN RADIOLÓGICA
Estado al final del seguimiento	VE	FE	VLE	VLE	VE	VE	VE

Tabla 9. Pacientes con sospecha de recidiva durante el seguimiento.

RESULTADOS

Con los 5 miARNs que se consideraron más representativos por haberse mostrado significativos tanto en la comparativa entre VLE y VE/FE, como en la correlación de exploración ORL y prueba de imagen, se realizaron las gráficas de los 5 pacientes que han recidivado durante el seguimiento, marcándose el momento de la recidiva (*figura 9*) dentro de la línea temporal del seguimiento (diagnóstico, 2, 6 y 12 meses). MiR-206 aumentó de manera progresiva en los 5 pacientes que presentaron recidiva. MiR-146 se elevó en el momento de la recidiva en 4 de los 5 casos. MiR-425-5p y miR-3591-3p aumentaron únicamente en 2 y 3 de los 5 pacientes en el momento de la recidiva, respectivamente. MiR-223 se mantuvo sin grandes cambios en el momento de la recidiva.

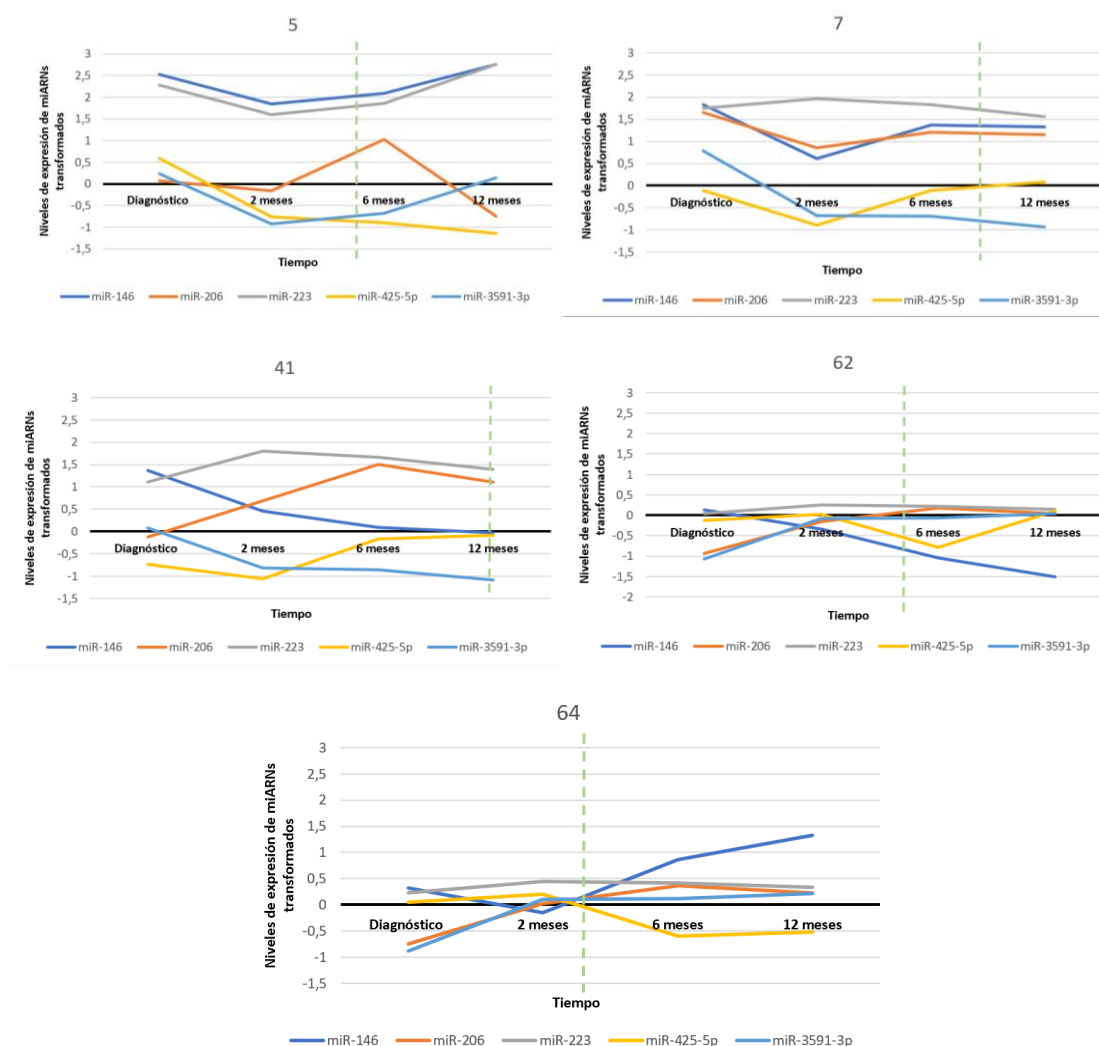


Figura 9. Representación gráfica de los niveles de expresión transformados de los pacientes que recidivaron durante el seguimiento. La línea verde discontinua muestra el momento de la recidiva dentro de la línea temporal del seguimiento anual.

4.3.5. Cambios en los niveles de expresión de los microARNs tras cirugía.

Teniendo en cuenta la totalidad de la muestra de 37 pacientes con CECC, se realizó un análisis descriptivo de los niveles de expresión de diversos miARNs en los 5 pacientes curados (VLE) que fueron sometidos a cirugía como parte de su tratamiento. Las mediciones se realizaron en el momento del diagnóstico y 7 días después del procedimiento. En estos pacientes curados se observó una disminución global en la media de los niveles expresión de miR-26b y miR-122. Por el contrario, se encontró un aumento en los niveles de miR-122 en pacientes con enfermedad, vivos o fallecidos.

Sin embargo, al centrarnos en la muestra de los 22 pacientes que realizaron el seguimiento completo, y al comparar los grupos de FE/VE frente a VLE, estos resultados difirieron. Son 6 los pacientes candidatos a cirugía como parte del tratamiento (pacientes nº 5, 8, 41, 58, 61 y 64). En 4 de ellos se combinó la cirugía con RT adyuvante $\pm$ QT concomitante, y en 2 de ellos la enfermedad obligó a realizar una cirugía de rescate. La variación de los niveles de expresión de los miARNs en estos 6 pacientes, una vez resecado el tumor, se representa en la *figura 10*. Realizando un test de t de Student de muestras pareadas, pre y post-cirugía, obtuvimos valores significativos en 6 miARNs: disminuyeron miR-21-5p (0,004), miR-146 ($p=0,021$), miR-223 ($p=0,032$) y miR-375 ($p=0,035$), mientras que aumentaron miR-26b (0,019) y miR-3591-3p ($p=0,013$). Si tenemos en cuenta el objetivo de la cirugía, entre el grupo de cirugía de rescate, solo un paciente falleció debido a la enfermedad (64) y 1 estaba vivo con enfermedad (5). Entre los otros 4 que se operaron, 3 eran pacientes vivos libres de enfermedad al final del año (8, 58, 61) y 1 terminó vivo con metástasis pulmonar (41).

RESULTADOS

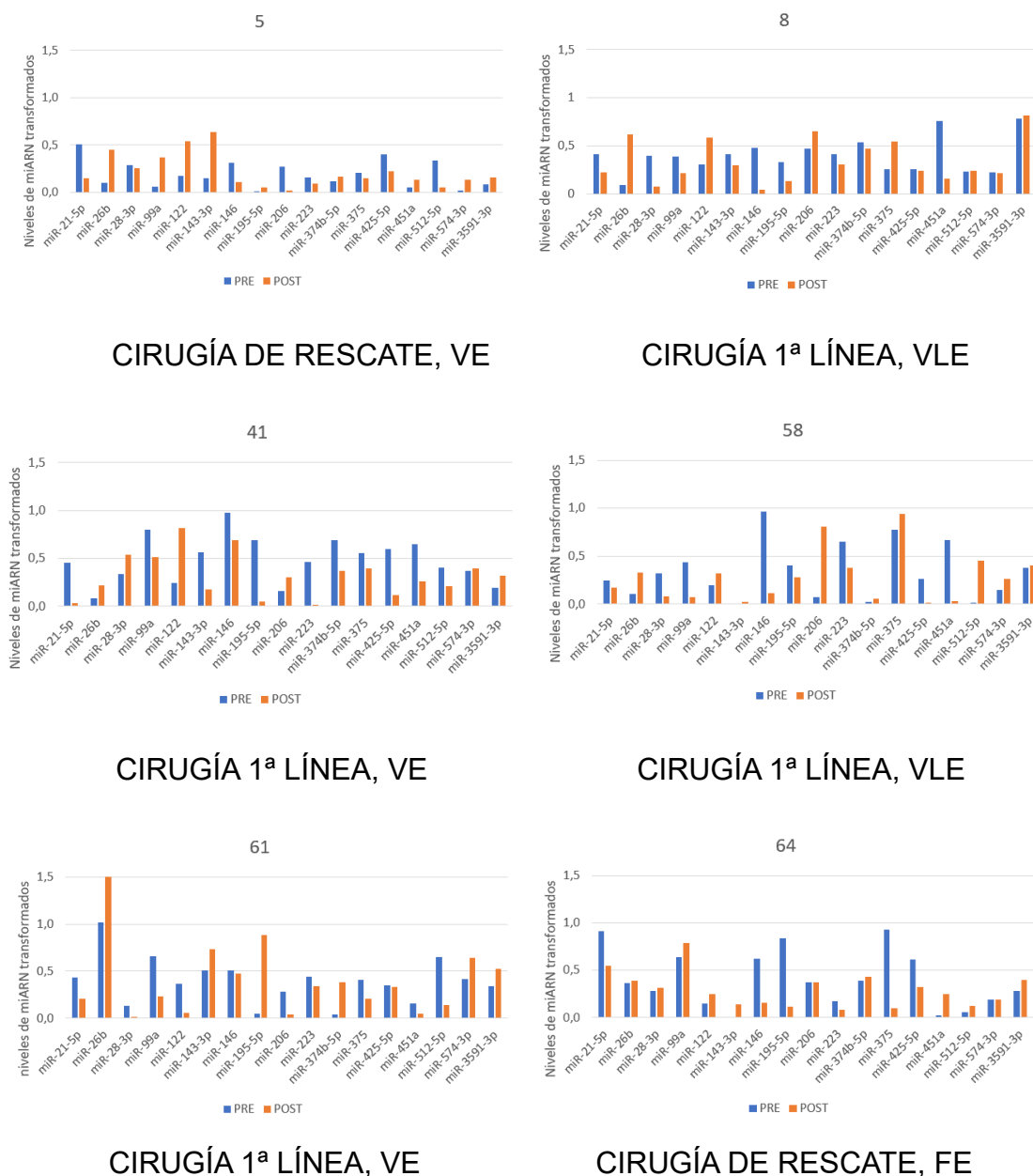


Figura 10. Valores de expresión transformados de los miARNs en los pacientes sometidos a cirugía, antes y después de la intervención, con cambios significativos en miR-21-5p, miR-26b, miR-146, miR-223, miR-375 y miR-3591-3p.

4.3.6. Funciones, según nuestros resultados, de los diferentes microARNs analizados en el estudio (*tabla 10*).

	Función	UTILIDAD
MiR-21-5p	Onco-miARN	Diagnóstico (sobreexpresado en CECC). Pronóstico (disminuye tras cirugía).
MiR-26b	Supresor tumoral	Pronóstico (sobreexpresado tras cirugía).
MiR-28-3p	Significado incierto	
MiR-99a	Significado incierto	
MiR-122	Significado incierto	Diagnóstico (sobreexpresado en CECC). Pronóstico (elevado en VLE frente VE/FE).
MiR-143-3p	Significado incierto	
MiR-146	Onco-miARN	Pronóstico (aumentado en VE/FE frente VLE en todo el seguimiento, disminuye tras cirugía). Detección recidivas (aumentado).
MiR-195-5p	Significado incierto	Diagnóstico (infraexpresado en CECC). Pronóstico (controvertido).
MiR-206	Onco-miARN	Pronóstico (sobreexpresado en pacientes con cáncer glótico-cavidad oral persistente en comparación con VLE, aumentado en VE/FE frente VLE a los 12 meses). Detección recidivas (aumentado).
MiR-223	Onco-miARN	Pronóstico (disminuye tras cirugía, aumentado a los 6 meses en VE/FE frente VLE).
MiR-374b-5p	Significado incierto	Diagnóstico (elevado estadio IV frente III) Pronóstico (elevado al mes en VLE frente VE/FE).
MiR-375	Onco-miARN	Pronóstico (sobreexpresado en cáncer de cavidad oral en pacientes VE/FE en comparación con VLE, disminuye tras cirugía).
MiR-425-5p	Significado incierto	Pronóstico (controvertido).
MiR-451a	Supresor tumoral	Pronóstico (elevado al mes en VLE frente VE/FE).
MiR-512-5p	Significado incierto	
MiR-574-3p	Significado incierto	
MiR-3591-3p	Supresor tumoral	Pronóstico (elevado tras cirugía, disminuye a los 2 y 6 meses en VE/FE frente a VLE).

Tabla 10. Resumen de las funciones de los miARNs incluidos en nuestro trabajo.

4.4. ARNm de la hTERT en el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello avanzado.

Para esta parte del estudio se incluyeron los 30 sanos y 37 pacientes con CECC. Al igual que realizamos con los miARNs, la medición de los niveles del ARNm de la hTERT fue realizada al diagnóstico en ambos grupos de pacientes. En el grupo de CECC se realizaron mediciones adicionales al mes, 2, 6 y 12 meses después de finalizar el tratamiento. En los pacientes sometidos a cirugía, se realizó una medición adicional 7 días después del procedimiento.

4.4.1 ARNm de la hTERT en relación con las características sociodemográficas y clínico-patológicas de los pacientes.

La expresión relativa del ARNm de la hTERT en el plasma de los 30 sujetos sanos y los 37 pacientes con CECC en el momento del diagnóstico mostró diferencias significativas; en particular, encontramos un aumento en los niveles basales de expresión del ARNm de la hTERT plasmática en pacientes con CECC (0,75) en comparación con los controles (0,5) (t Student, $p=0,003$). Tras desarrollar correlaciones bivariadas, la diferencia de los niveles de expresión del ARNm de la hTERT plasmática entre hombres y mujeres al diagnóstico no fue estadísticamente significativa.

Casi tres cuartas partes del total de pacientes con CECC eran consumidores activos de tabaco o bebedores de alcohol, y prácticamente un tercio de los pacientes compartían ambos hábitos. Los fumadores y bebedores de alcohol sobreexpresaron el ARNm de la hTERT (Kruskall-wallis, $p=0,019$ y $p=0,026$), independientemente de si eran pacientes oncológicos o controles sanos, tras realizar una prueba de correlación bivalente.

Para identificar posibles variaciones entre la estadificación TNM y los niveles de expresión del ARNm de la hTERT, también desarrollamos una prueba de correlación bivalente, y detectamos que los pacientes en estadio IV sobreexpresaban el ARNm de la hTERT en comparación con los pacientes pertenecientes al estadio III (t Student, $p=0,008$).

Teniendo en cuenta los 6 pacientes con CECC que tenían una prueba de inmunohistoquímica positiva para p16, todos ellos localizados en la orofaringe, no encontramos diferencias significativas relacionadas con la expresión del ARNm de la hTERT y p16 (Chi cuadrado, $p=0,872$) en la prueba de correlación bivalente, probablemente debido al pequeño tamaño de la muestra.

4.4.2 ARNm de la hTERT en la monitorización de pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.

En este apartado agrupamos nuevamente a los 35 pacientes que realizaron el seguimiento, según su estado al final del mismo: 18 VLE y 17 VE/FE. Los niveles de expresión del ARNm de la hTERT en plasma durante el seguimiento de un año no cambiaron significativamente en los diferentes momentos clave, pero mostraron una tendencia a la disminución, comparando VLE con VE/FE.

Asimismo, teniendo en cuenta la totalidad de la muestra de 37 pacientes con CECC, llevamos a cabo un análisis descriptivo de los niveles de expresión globales del ARNm de la hTERT en los 5 pacientes VLE que fueron sometidos a cirugía como parte de su tratamiento. Las mediciones se tomaron al momento del diagnóstico y 7 días después de la intervención, y se ha observado una importante disminución de los niveles de expresión del ARNm de la hTERT en estos pacientes (*figura 11*).

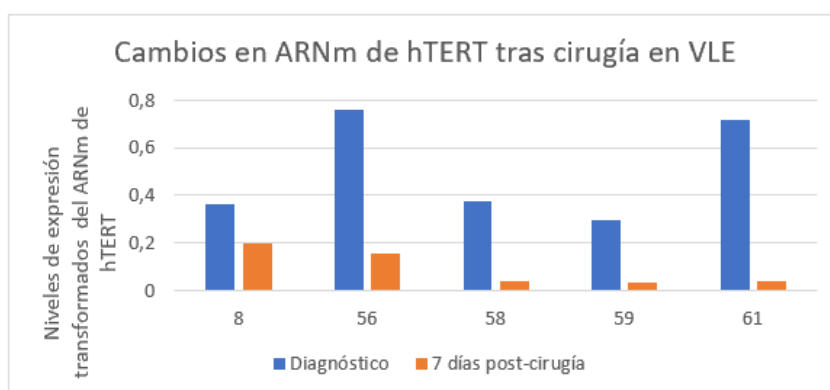


Figura 11. Niveles de expresión del ARNm de la hTERT pre y postquirúrgicos en pacientes curados sometidos a cirugía como parte del tratamiento.

RESULTADOS

Sin embargo, al centrarnos en la muestra de los 22 pacientes que completaron el seguimiento con todos sus controles intermedios, no obtuvimos resultados estadísticamente significativos en los niveles de expresión del ARNm de la hTERT al realizar el test de t-Student de muestras pareadas, estudiando únicamente a los 6 los pacientes candidatos a cirugía como parte del tratamiento (pacientes nº 5, 8, 41, 58, 61 y 64).

Por último, con el objetivo de investigar si los cambios en los niveles de expresión del ARNm de la hTERT resultaban fiables al compararlos con las pruebas ORL y de imagen que se realizan de rutina, realizamos una correlación bivariada con el test de Fisher, a los 2, 6 y 12 meses, y no obtuvimos resultados significativos en ninguno de los momentos del periodo de seguimiento entre los pacientes estudiados.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. Utilidad de los microARNs en el diagnóstico, el seguimiento y la detección de recidivas en el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.

Los biomarcadores diagnósticos desempeñan un papel crucial a la hora de detectar o confirmar la presencia de enfermedades [185]. En la aplicación clínica, requieren el cumplimiento de criterios estrictos, en particular, una alta sensibilidad y especificidad [186]. La utilización de miARNs como biomarcadores ofrece varias ventajas, incluyendo su manejabilidad, facilidad para testarlos y la significación clínica en el diagnóstico de enfermedades [187]. Como consecuencia, el perfil de miARNs ha atraído una considerable atención como herramienta valiosa para la clasificación de tumores, detección temprana, pronóstico de enfermedades e incluso la toma de decisiones terapéuticas.

Cabe destacar que los miARNs ya han sido aprobados en otras neoplasias como el cáncer colorrectal: PreveCol® es una prueba innovadora basada en un algoritmo que combina las características clínicas identificadas por Inteligencia Artificial con el análisis de los niveles de biomarcadores en plasma (incluidos los miARNs) para la detección temprana del cáncer colorrectal y del adenoma avanzado [188], destacando su aplicabilidad clínica.

Avissar et al. fueron pioneros en demostrar que la expresión de miARNs exhibía un fuerte potencial predictivo para el diagnóstico de CECC [127]. A pesar de que hay múltiples estudios que avalan su utilidad, la detección de miARNs individuales aún no es eficaz para un diagnóstico preciso debido a la falta de puntos de corte normalizados, paneles de detección estandarizados y validados y la posibilidad de resultados falsos positivos y falsos negativos. Por tanto, la combinación de múltiples miARNs podría mejorar significativamente la precisión diagnóstica en CECC [189]. Algunas firmas de miARNs alcanzan una sensibilidad del 89,3% y una especificidad del 98,9% en muestras de suero [190]. En este sentido, en nuestro estudio hemos identificado una desregulación significativa en plasma de los miR-21-5p, miR-122 y miR-195-5p en pacientes diagnosticados de CECC en estadio avanzado frente al grupo control.

DISCUSIÓN

Esto concuerda con lo descrito con diversos autores que vamos a mencionar, ya que el miR-21 fue el primer onco-miARN en describirse en CECC y ha sido el más estudiado en esta región [191,192]. Se destaca entre los pocos miARNs que, sistemáticamente, están regulados positivamente en tejidos, plasma, exosomas derivados del suero y sangre total del CECC en comparación con controles sanos [193,194]. Recientemente, la revisión sistemática de Banta et al. destaca que el miR-21-5p estuvo regulado positivamente de manera constante en múltiples estudios independientes [195], y concluye que los niveles elevados de miR-21-5p estaban asociados con etapas avanzadas de la enfermedad, metástasis en los ganglios linfáticos y tasas de supervivencia reducidas, lo que lo convierte en un valioso marcador pronóstico además de diagnóstico [195,196]. El nivel de expresión de miR-21 aumenta principalmente para promover la progresión tumoral, y es un regulador de varias vías oncogénicas como la del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3), la vía WNT y el eje PTEN/PI3K/AKT, el objetivo más conocido. El miR-21 induce su señalización a través de la regulación negativa de la fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN), aumentando la actividad de fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)/proteínas quinasas B (AKT), y promoviendo así la proliferación celular y la progresión del tumor [197,198] (*figura 12*). Además, miR-21 estimula la transición epitelio-mesénquima (TEM) y las metaloproteinasas de matriz, lo que favorece las metástasis a distancia [199].

Recientemente, Jaksic Karisik et al. señalaron la influencia del miR-21 en las células madre para la progresión tumoral en el cáncer de cavidad oral [200]. Nuestros hallazgos se alinean con estos estudios, ya que observamos niveles elevados de expresión de miR-21-5p en el plasma de pacientes con CECC, sugiriendo su actividad como onco-miARN.

MiR-122 presenta una función dual, ya que tiene el potencial de actuar como oncogén o supresor tumoral [201–203]. El mecanismo subyacente a la progresión del CECC relacionado con el miR-122 no se ha investigado ni definido a fondo, pero en el caso concreto del CNF, Liu et al. demostraron que los niveles de expresión de miR-122-5p se redujeron considerablemente en las líneas celulares del CNF y que miR-122-5p tiene como diana la proteína 1 de unión a secuencias ricas en alanina y treonina (SATB1), inhibiendo así una amplia gama de funciones celulares, como la formación de colonias, la invasión celular, la

proliferación celular y la migración celular [204]. Tian et al. coinciden en que la sobreexpresión de miR-122 disminuía la tasa de invasión y migración, actuando en ambos casos como un miARN supresor tumoral [205]. Estos hallazgos no son exclusivos del CECC, ya que la función dual también ha sido descrita en otros tipos de cáncer, como el de vesícula biliar [206], mama [207] o renal [208]. En nuestro caso, encontramos niveles elevados de miR-122 al diagnóstico en pacientes con CECC frente a pacientes sanos, sugiriendo una actividad oncogénica. En cambio, también estaba elevado en pacientes que finalizaron VLE frente a VE/FE en todos los puntos del seguimiento, lo que haría pensar que su sobreexpresión es beneficiosa, actuando así, como un supresor tumoral.

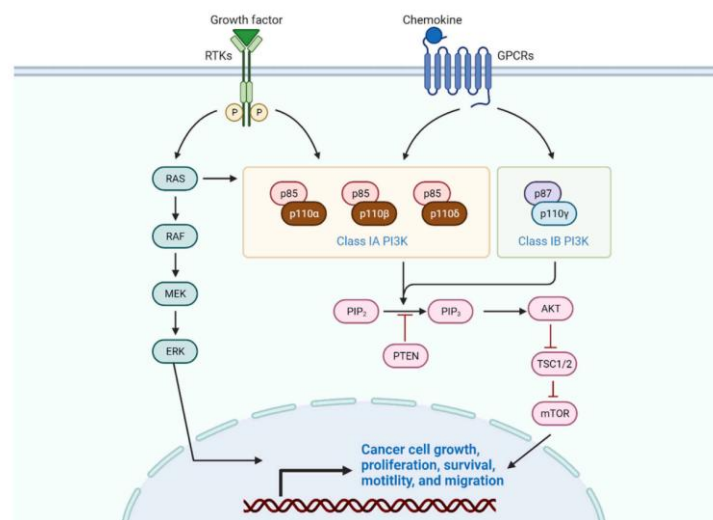


Figura 12. Esquema de la vía PTEN/PI3K/AKT, que tiene como objetivo final la activación de la AKT, lo que regula en última instancia el crecimiento, el metabolismo y la supervivencia celular. PTEN es un factor crucial que desfosforila PIP3 y, en consecuencia, inhibe la activación de AKT. Pertenece al artículo “*MicroRNA-21's role in PTEN suppression and PI3K/AKT activation: Implications for cancer biology*” [198].

Para finalizar la cuestión de los miARNs diferencialmente expresados en el diagnóstico de pacientes con CECC, debemos hablar del miR-195-5p. Numerosos autores encontraron que miR-195-5p estaba notablemente regulado a la baja en CECC [209–212] y su sobreexpresión favorecía la capacidad para inhibir el desarrollo de fenotipos malignos en células de CECO [213],

DISCUSIÓN

considerándose, por tanto, un miARN supresor de tumores. Nuestros hallazgos corroboran esta tendencia, con una disminución de la expresión de miR-195-5p en los pacientes con CECC al diagnóstico, si bien los datos pronósticos en nuestro caso no han sido concluyentes. Los mecanismos por los cuales miR-195 media su acción son extremadamente complicados y están involucrados en varias vías de señalización, como Rb-E2F, PI3K/AKT, NF- κ B, quinasas activadas por mitógenos (MAPK), WNT/ β -catenina e Hippo/YAP [214] (*figura 13*). Además, en la revisión de Komitova et al., se hace referencia a la asociación molecular del miR-195 con p53 y su vía molecular [197], descrito por Selvi et al. en 2015 [215]. También se ha publicado que miR-195 causa la inhibición de la expresión de los genes de la Ciclina D1 (CCND1) y BCL-2 en el CECC [197,209,212], del gen *Defective In Cullin Neddylation 1 Domain Containing 1* (DCUN1D1) en el CEL [216], y de la proteína TRIM14 en el CECO [210].

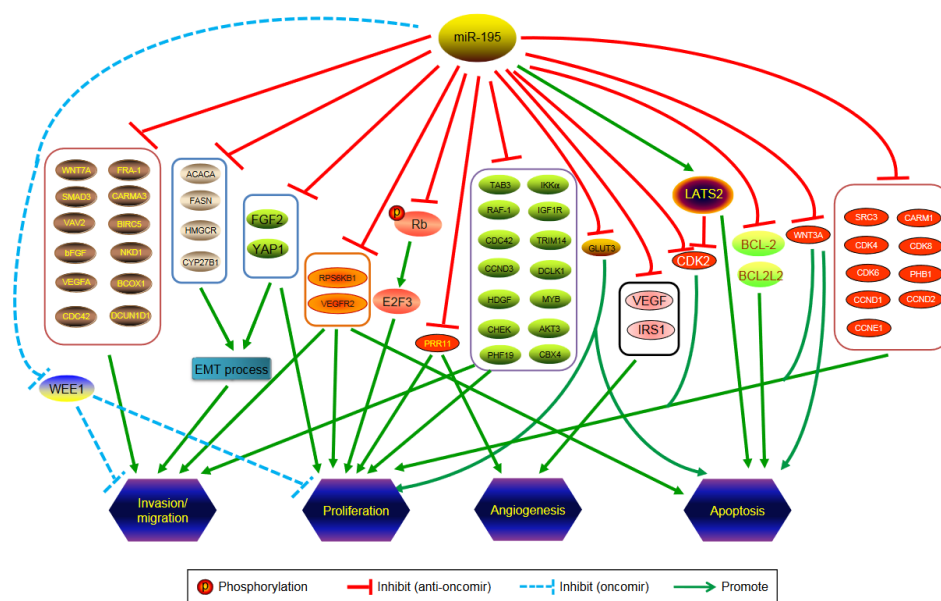


Figura 13. Ilustración relativa a las diversas dianas del miR-195, con sus múltiples funciones en el proceso del desarrollo tumoral: TEM, invasión/migración, proliferación, angiogénesis y apoptosis, extraído del artículo “*MicroRNA-195: a review of its role in cancers*” [214].

Escasos estudios han tenido como objetivo examinar la desregulación de los miARNs en CECC secundaria a hábitos poco saludables, como masticar nuez de betel [217] o tabaco, fumar [218] y consumir alcohol [219]. Sin embargo, Zhang et al. sí que consiguieron establecer una correlación entre los patrones de

expresión de los miARNs y el tabaquismo en CECC [220]. Vageli et al. también observaron niveles notablemente más altos de miR-21 en el suero de pacientes con CECO y antecedentes de tabaquismo en comparación con los que nunca fumaron y los controles sanos con antecedentes de tabaquismo [221]. Además, varios estudios concluyeron que fumar tabaco regulaba positivamente miR-294 y regulaba negativamente miR-26a, miR-122a [222] y miR-375 [218]. Como hallazgo en nuestra investigación, identificamos diferencias estadísticamente significativas con respecto a los fumadores y la sobreexpresión de miR-574-3p en el plasma de pacientes con CECC, lo que contrasta con los datos obtenidos por Shi et al. en los que el miR-574-3p se encuentra infraexpresado [223]. Aunque las dianas moleculares de miR-574-3p en el CECC todavía no están claras, se ha descrito que la vía de señalización de WNT desempeña un papel importante en la progresión, la metástasis y la invasión en el cáncer epidermoide esofágico [224], observándose también en este tipo de pacientes oncológicos una sobreexpresión de EGFR asociada a comportamientos biológicos agresivos [225]. En cuanto al consumo de alcohol, Avissar et al. identificaron que el miR-375 estaba sobreexpresado en pacientes que ingerían alcohol, observándose una mayor expresión en el cáncer faríngeo y CEL en comparación con los CECO [219]. Sin embargo, en nuestro estudio no hemos logrado identificar una asociación significativa entre el consumo de alcohol y una expresión alterada de miARNs, probablemente como consecuencia a un tamaño muestral pequeño.

Además de los hábitos nocivos relacionados con el estilo de vida, se conoce ampliamente que la infección por VPH, en particular los serotipos 16 y 18, representa un factor de riesgo para desarrollar el CECC [20]. Las principales proteínas oncogénicas del VPH, E6 y E7, desempeñan funciones críticas en la modulación de los procesos celulares [226]. E6 se dirige a la proteína supresora de tumores p53 y la degrada, mientras que E7 interactúa con la proteína supresora de tumores Rb y la inactiva [227]. Tal y como lo sugerían Sritippho et al. en su publicación [228], en nuestro caso, la inmunohistoquímica de p16 fue la técnica que utilizamos como biomarcador subrogado del estado del VPH, ya que no existía la posibilidad de realizar de rutina la PCR del VPH.

Varios investigadores demostraron que el estado del VPH también puede influir en los patrones de expresión de los miARNs en el CECC. Lajer et al,

DISCUSIÓN

abordaron el estado del VPH y la desregulación de diferentes miARNs en dos tipos de tumores positivos para el VPH: el cervical y el CECC [229,230]. En concreto, Nunvar et al. reportaron una infraexpresión de miR-451a en los cánceres de vulva VPH positivos [231]. Este miR-451 participa en la regulación de diversos procesos fisiológicos y patológicos humanos. No solo afecta directamente a las funciones biológicas de las células tumorales, sino también indirectamente a su invasión y metástasis, favoreciendo asimismo la resistencia a fármacos [232]. En el caso de CECC, Liu et al. descubrieron que miR-451 presentaba una expresión significativamente negativa en líneas celulares del CNF y tejidos. Aquellos pacientes con una baja expresión de miR-451 presentaron tanto una menor supervivencia general como una menor supervivencia libre de enfermedad que los pacientes con alta expresión, lo que podría indicar que miR-451 es un miARN supresor tumoral [233]. Esto coincide con lo previamente descrito en 2010 por Hui et al., quienes identificaron este miR-451 como el único miRNA significativamente sobreexpresado en pacientes con CECC localmente avanzado sin recaída, indicando el buen pronóstico que implicaría su sobreexpresión [130]. En nuestro estudio, este miR-451a también se mostró significativamente elevado al mes de finalizar el tratamiento en pacientes que finalizaron el periodo VLE frente a aquellos con enfermedad persistente, lo que concordaría con estos hallazgos. Desafortunadamente, aunque en 4 de los 6 pacientes con CEOF VPH positivo los valores de miR-451a estaban infraexpresados respecto a los demás pacientes con CECC como ocurría en el trabajo de Nunvar et al. con los cánceres de vulva VPH positivos [231], probablemente debido al pequeño tamaño muestral de este subgrupo, esta asociación no pudo ser confirmada estadísticamente.

Sin embargo, aunque la desregulación sí que está descrita, esta cascada reguladora VPH-miARN no está bien caracterizada. Wald et al. publicaron uno de los primeros estudios que describen el efecto de la sobreexpresión de E6 y su impacto en los niveles de varios miARNs, como miR-363, miR-181a, miR-218 y miR-29a [234]. Sais et al. también identificaron una vía reguladora específica que involucra a E6, miR-496 y E2F2 [235]. Además, las oncoproteínas E6 y E7 del VPH pueden activar la vía PI3K/AKT con la consecuente activación factores de transcripción como la proteína activadora 1 (AP-1) y el NF- κ B, aumentando así la transcripción, expresión y tumorigénesis de miR-21, lo que contribuye a

una mayor proliferación y supervivencia celular [198,236–240] (*figura 14*). Por otra parte, el VPH promueve indirectamente la regulación positiva de miR-21 al inhibir los supresores de tumores como el PDCD4 (proteína de muerte celular programada 4), lo que conduce a una mayor proliferación celular, una reducción de la apoptosis y la progresión del cáncer [241]. El VPH también puede alterar la expresión y actividad de proteínas implicadas en la biogénesis de miARNs, como Dicer y Drosha [242].

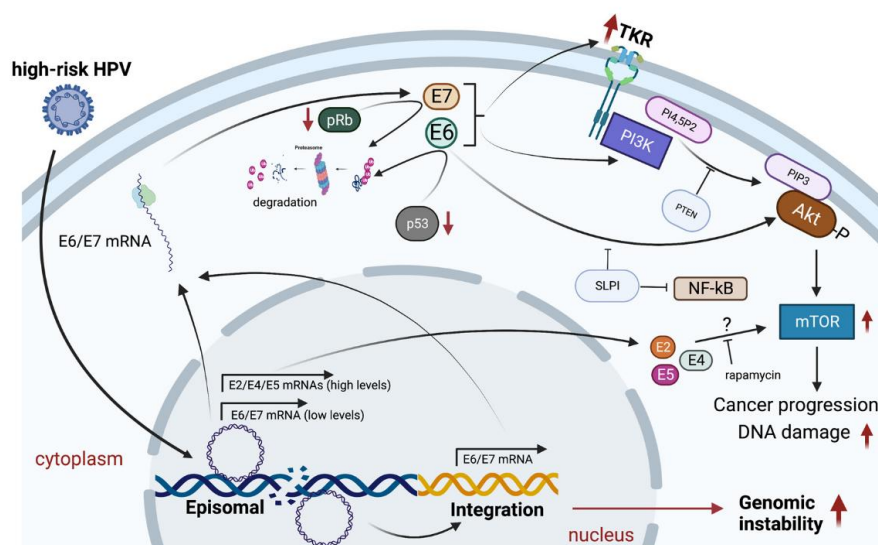


Figura 14. Representación de cómo la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR es activada en los pacientes con CECC positivo para VPH, tomada del artículo *“PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in HPV-Driven Head and Neck Carcinogenesis: Therapeutic Implications”* [236].

A pesar de los avances en el tratamiento del CECO, como la QT, la RT y las terapias dirigidas, la tasa de supervivencia general a 5 años para los pacientes con CECO sigue siendo notablemente baja (<50%) [243]. En términos de seguimiento de los pacientes oncológicos una vez finalizado el tratamiento, los miARNs podrían servir como una herramienta valiosa en el seguimiento y evaluación del pronóstico de los pacientes con CECC.

En nuestro estudio, hemos visto que, además del miR-451a descrito previamente, los miR-122 y miR-374b-5p también mostraron diferencias significativas en pacientes VLE en comparación con aquellos con CECC

DISCUSIÓN

persistente, durante el año entero de seguimiento postratamiento y 1 mes después tras la finalización del mismo, respectivamente, por lo que podrían ser de utilidad para detectar pacientes con buen pronóstico. Summerer et al. en su trabajo también identificaron los miR-195-5p y miR-374b-5p como marcadores pronósticos prometedores para monitorizar la respuesta a la RT/QT en muestras de plasma de pacientes con CECC antes y después de la terapia [141]. Sin embargo, existen hallazgos contradictorios con respecto a miR-195-5p, tanto en nuestro estudio, como en la bibliografía revisada. Huang et al. informaron que la regulación negativa de miR-195 se asoció con un peor pronóstico, y su alta expresión indicó una mejor supervivencia general [244]. Mientras, Lubov et al. revelaron que expresiones significativamente elevadas de miR-195 se asociaban con un mal pronóstico en CECC [245].

Además, Summerer et al. evaluaron los miARN en plasma sanguíneo en una cohorte de validación de 11 pacientes con CECC tratados con RT y descubrieron que los niveles plasmáticos altos de miR-374b-5p antes del tratamiento se asociaban con una supervivencia general o libre de progresión más corta, mientras que los niveles plasmáticos altos de miR-195-5p después del tratamiento se relacionaron con un peor pronóstico [141]. Estos hallazgos fueron corroborados por Patil y Warnakulasuriya et al., quienes desarrollaron una revisión sistemática que encontró que la regulación positiva de miR-374b-5p se asociaba con una supervivencia muy pobre en CECC [246]. Estos resultados coinciden parcialmente con los nuestros en cuanto a que los pacientes con estadio IV presentaban valores de miR-374b-5p más altos que los del estadio III, pero difieren de los obtenidos una vez finalizado el tratamiento. Debido a la elevación de miR-374-5p tras el tratamiento en pacientes VLE al mes de la finalización del tratamiento, podríamos concluir que su sobreexpresión presentaba a priori un mejor pronóstico. Por este motivo, plantearíamos este miARN como un supresor tumoral, lo cual ya había sido descrito por otros autores en otras neoplasias, como el cáncer de pulmón no microcítico [247]. El conocer la causa de esta función dual es difícil, ya que los estudios sobre la función de miR-374 en el cáncer han sido relativamente escasos fuera del aparato digestivo. Solo en el osteosarcoma humano y el carcinoma epidermoide cutáneo se han publicado informes detallados sobre la activación de miR-374, su papel en diversas vías de señalización y sus dianas posteriores. El resto de

la investigación se ha centrado principalmente en analizar la dependencia de la expresión de miR-374 y diferentes características clínico-patológicas, y no concretamente en el CECC [248].

De manera similar, algunos investigadores han evaluado los niveles de expresión plasmática de estos miARNs como respuesta a la cirugía de pacientes con CECC y observaron una disminución significativa en los niveles plasmáticos en muestras postoperatorias [249]. Esta información la corroboramos en nuestro estudio al analizar los datos de los 6 pacientes que realizaron el seguimiento íntegro y fueron intervenidos quirúrgicamente, puesto que hemos encontrado cambios significativos en los niveles de expresión de varios miARNs pre y post-cirugía, entre los que se incluyen el descenso de miR-21-5p, miR-146, miR-223 y miR-375, así como el aumento de miR-26b y miR-3591-3p. Esto concuerda con los hallazgos de Hsu et al., quienes publicaron la modificación de los niveles plasmáticos en pacientes con CECC con pronóstico favorable, y niveles persistentemente alterados en pacientes que murieron dentro de un año después de la cirugía [193]. El hecho de que en nuestros pacientes estos 6 miARNs varíen significativamente de la misma forma independientemente de la situación de enfermedad, podría justificarse por la disminución del volumen tumoral.

El miR-26b desempeña un papel importante en la carcinogénesis y la progresión tumoral, actuando como gen supresor tumoral en múltiples cánceres [250–252]. El miR-26b está estrechamente relacionado con la apoptosis y la metástasis de las células tumorales y diversos estudios han mostrado una expresión disminuida en el CECO con dianas dependientes de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), gen maternalmente expresado 3 (MEG3) y quinasa 1 activada por P21 (PAK-1) [253–255]. Estos datos se confirman con nuestros hallazgos, puesto que aumentan los niveles de expresión tras la cirugía.

El miR-223 también desempeña un papel en la progresión del cáncer y la inflamación, actuando de forma dual, tanto como promotor como supresor tumoral. Por un lado, el miR-223 mostró una asociación significativa entre altos niveles de expresión y una baja supervivencia general en pacientes con CECC [256], pero por otro lado, Ruiman et al., demostraron que la inhibición de miR-223-3p promovió la TEM y la movilidad celular en el CECO [257], lo que concuerda con estudios previos [258]. Nuestros pacientes presentaron una

DISCUSIÓN

disminución de los niveles tras la cirugía, por lo que los datos concuerdan más con una actividad oncogénica.

En el caso de miR-375, se ha visto que su sobreexpresión inhibe el crecimiento e induce la detención del ciclo celular en la fase G0/G1 [259], considerándose un supresor tumoral. Los niveles reducidos de miR-375 se asocian con un comportamiento tumoral agresivo y una evolución clínica desfavorable [260–262]. En cambio, nuestras conclusiones son opuestas en este sentido, ya que los pacientes con CECO del grupo VE/FE presentaban unos mayores niveles de expresión que los VLE, y también los pacientes intervenidos presentaban una disminución de los niveles plasmáticos. Esto no resulta excepcional, ya que la actividad dual de miR-375 ya ha sido descrita previamente en otros tumores, como el prostático, sugiriendo que su sobreexpresión puede contribuir a la carcinogénesis y progresión tumoral [263].

Este miR-375 actúa sobre numerosas vías de señalización. En un alto porcentaje de casos, miR-375 tenía vínculos reguladores con la cascada PTEN/PI3K en el CECO [264], pero también actúa sobre la cistatina C (CST1) en el CEL promoviendo la apoptosis [265]. Igualmente, se ha demostrado que el miR-375 reduce la invasividad tumoral al regular proteínas como la vimentina y la L-plastina, cruciales para la migración celular [266] y que, en el CECC, el miR-375 actúa sinérgicamente con el miR-205 para regular la invasión y la migración a través de la vía de la TEM mediada por AKT [267]. Además, se ha informado que el miR-375 se dirige directamente a la metadherina (MTDH) en el CECC, donde su regulación negativa contribuye a la actividad oncogénica [268]. Asimismo, el miR-375 modula la señalización de PD-1/PD-L1, lo que sugiere su potencial como modulador de la respuesta inmunitaria del CECC [269].

Desde el punto de vista pronóstico, además de los miR-122, miR-374b-5p y miR-451a que habíamos detectado elevados significativamente en los pacientes VLE al estudiar nuestra muestra de pacientes oncológicos completa, también encontramos que, al centrarnos en los 22 pacientes con seguimiento íntegro, había una expresión diferencial al alza de miR-146, miR-223, miR-206 y a la baja de miR-3591-3p en pacientes con enfermedad persistente respecto a los VLE.

Los niveles de expresión del miR-146 circulante ya habían sido considerados de utilidad en otros tipos de cáncer, como el cáncer diferenciado de tiroides, asociándose con peores resultados de la enfermedad, y con un valor pronóstico

en el tratamiento y seguimiento [270]. Los investigadores indican que niveles bajos de miR-146a se asocian con una mayor agresividad en el CECO [271], siendo, por tanto, un miARN supresor de tumores. Además, experimentos in vivo demostraron que la restauración de miR-146a suprimió el crecimiento tumoral, lo que indica su potencial como diana terapéutica. También se ha reportado de que miR-146a puede regular las vías implicadas en la progresión e invasividad tumoral a través de su interacción con Sox2 (gen relacionado con la región determinante del sexo del cromosoma Y, caja 2) [271]. En nuestro estudio, sin embargo, al comparar sus valores pre-post cirugía, observamos que disminuía tras la intervención, lo que iría más a favor de una actividad oncogénica que de la actividad supresora tumoral previamente descrita. A pesar de esta discordancia, también hay otros trabajos en los que se ha observado que este miR-146a tiene un papel oncogénico en ciertos contextos, lo que sugiere que su función podría depender del tipo específico de cáncer y del entorno celular, como ocurre, por ejemplo, en el CECO [272].

En concreto, en nuestra investigación, este miR-146 es el que nos brinda una mayor utilidad para el seguimiento de los pacientes oncológicos en los diferentes puntos del seguimiento. El hecho de que miR-146 se mantenga en nuestros pacientes diferencialmente sobreexpresado desde el diagnóstico hasta el control anual en los pacientes con enfermedad, podría hacernos pensar en él como un buen biomarcador pronóstico y para la detección de recidivas.

Igualmente, el hallazgo de otros miARNs también significativamente expresados a los 6 meses, como miR-223 y miR-3591-3p, nos haría plantear su utilidad para su confirmación, además del resto de las pruebas diagnósticas que ya se realizan de rutina. Esta virtud de los miARNs había sido descrita por Towle et al., ya que identificaron una firma de miARNs circulantes en suero capaz de detectar el CECO recurrente un promedio de 15 meses antes de la presentación clínica [273]. En el caso del CECC, la detección precoz de recidivas resultaría determinante para mejorar la supervivencia, ya que la mayoría de los pacientes con CECC fallece dentro del primer año tras el diagnóstico, en gran parte debido a recurrencias y metástasis [243].

Langevin et al. estudiaron las líneas celulares del CECO y descubrieron que 8 miRNAs, entre los que se encontraba miR-3591-3p, causaban fluctuaciones

DISCUSIÓN

de expresión en comparación con las cepas de control [274]. Aunque los mecanismos de acción y las dianas de este miR-3591 a nivel de cabeza y cuello todavía no han sido descritos, en nuestro trabajo sí que hemos detectado un aumento diferencial en los niveles de expresión en las muestras post-cirugía.

Los niveles de expresión de miR-425 se mostraron elevados en biopsia tisular en el CECO [275] y CEL [276], siendo así considerado un onco-miARN, con la función de promocionar la proliferación, invasión y migración de células tumorales [275]. Investigaciones recientes han demostrado que el miR-425 controla las vías de señalización de MAPK, WNT, PI3K/AKT y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) [277] (*figura 15*); sin embargo, el valor pronóstico del miR-425-5p con los hallazgos de nuestro estudio tiene un significado incierto.

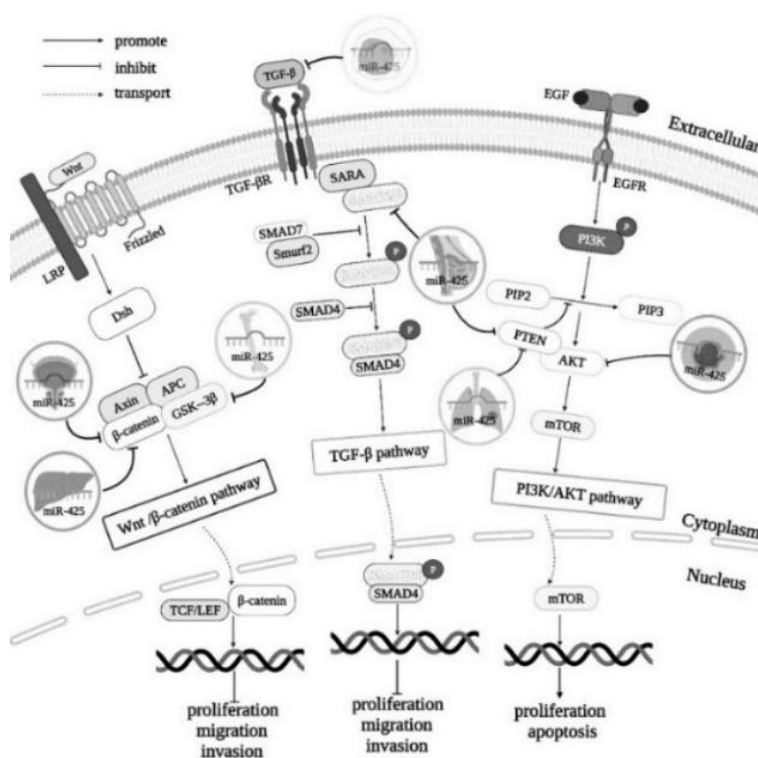


Figura 15. Esquema de las vías de señalización activadas por miR-425 obtenida del artículo “*Diverse Functions of MiR-425 in Human Cancer*” [277].

El cruce de datos de los pacientes con peor pronóstico y de las correlaciones positivas, nos permitió elegir unos miARNs en los que profundizar en el estudio de los pacientes con recidiva, en los que observamos lo siguiente:

- MiR-146 está elevado en el momento de la recidiva en 4 de los 5 casos, lo que iría a favor de que fuera un onco-miARN, como también había descrito previamente Gómez-Pérez et al. [270], y nosotros en los pacientes que finalizaron el periodo VE/FE frente a los VLE.
- MiR-206 se aumenta de manera progresiva en los 5 pacientes que presentaron recidiva, lo que también orientaría que pudiera considerarse un onco-miARN, tal y como sospechábamos por su elevación en los pacientes con carcinoma glótico y de cavidad oral persistente respecto a pacientes VLE. Los estudios revisados describen más bien que es la regulación negativa de miR-206 la que contribuye a la proliferación e invasión del CEL mediante la regulación de la expresión de VEGF [278,279]. Sin embargo, el valor pronóstico de este miR-206 no está claro, ya que Du et al. describieron que, en el cáncer de esófago, una alta expresión de miR-206 se asociaba con un pronóstico desfavorable de la enfermedad, actuando sobre las vías de señalización del TGF- β , de WNT, las MAPK o de la diana mecanicista de la rapamicina (mTOR) [280].
- MiR-223 ha tenido una respuesta variable sin grandes cambios en el momento de la detección de la recidiva. Sin embargo, el hecho de que encontráramos que el miR-223 aumentaba con el seguimiento en pacientes VE/FE frente a VLE, concordaría con la asociación significativa entre altos niveles de expresión y una baja supervivencia general en pacientes con CECC reportada por Falco et al. [256].
- MiR-425-5p tiene una tendencia a aumentar únicamente en 2 de los 5 pacientes en el momento de la recidiva. Los valores de miR-425-5p aumentados coinciden con las publicaciones previas, donde se muestra como un onco-miARN [275,276]. En cambio, en nuestro caso, no podemos sacar conclusiones, ya que las diferencias entre VLE y VE/FE resultan confusas y también disminuye en 3 de los 5 pacientes en el momento de la recidiva.
- MiR-3591-3p aumenta en 3 y disminuye en 2 de los 5 pacientes recidivados, lo que no permite obtener conclusiones respecto a su función. Como habíamos reportado previamente, en nuestro caso el hecho de que aumente tras la cirugía y que se mantenga significativamente disminuido en

pacientes VLE frente a VE/FE a los 2 y 6 meses del seguimiento, sugiere que pueda ser un supresor tumoral, si bien en el momento de las recidivas no obtenemos resultados significativos.

5.2. Correlación de los microARNs con las pruebas disponibles para el seguimiento del carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.

Con el objetivo de comprender mejor si la biopsia líquida es una herramienta complementaria fiable en el CECC, se intentaron correlacionar los niveles de expresión de los miARNs obtenidos en la extracción sanguínea con los exámenes ORL y las pruebas de imagen realizadas de manera habitual en los distintos puntos del seguimiento, obteniendo una asociación positiva con miR-21-5p, miR-28-3p, miR-99a, miR-143-3p, miR-146, miR-206, miR-223, miR-425-5p, miR-512-5p y miR-3591-3p.

En el caso de miR-28-3p, el estudio de Lv et al. ya encontró que los niveles de expresión de miR-28-3p disminuyeron significativamente en los tejidos del CNF en comparación con los tejidos normales adyacentes, concluyendo su importancia en la promoción de la migración e invasividad celular, acelerando el proceso de TEM [281].

Asimismo, la desregulación de los miembros de la familia miR-99 ya había sido reportada consistentemente en el CECC por varios autores [130,229]. Los resultados de Chen et al., junto con observaciones previas en otras neoplasias [282], sugieren que los miembros de la familia miR-99 son importantes supresores tumorales que regulan la proliferación, la apoptosis y la migración [283]. Varios estudios funcionales sugieren que los miembros de la familia miR-99 regulan las vías de señalización de AKT/mTOR al actuar sobre el receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1R), mTOR y la proteína reguladora asociada a mTOR [283–285]. Un estudio de Mueller et al. también sugiere que los miembros de la familia miR-99 regulan la respuesta al daño del ADN a través de su gen diana, la proteína ATPasa reguladora de la cromatina dependiente de actina asociada a matriz componente del complejo SWI/SNF, miembro 5 (SMARCA5) [286]. Asimismo, también ha sido descrita la regulación

postranscripcional de miR-99a en la proteína relacionada con la miotubularina 3 (MTMR3) [287].

En el CEL, Zhang y Cao confirmaron que la baja expresión de miR-143-3p se asociaba con un pronóstico desfavorable y que la sobreexpresión de miR-143-3p inhibía el crecimiento tumoral in vivo, suprimía la migración e invasión celular mediante la inhibición de la cascada de TEM. Además, verificaron que el oncogén K-Ras (Homólogo de oncogén viral del sarcoma de rata Kirsten) es una diana de miR-143-3p en células de CEL, y que los efectos supresores de miR-143-3p en estas células fueron anulados por la sobreexpresión de K-Ras. También revelaron que miR-143-3p podía inhibir el crecimiento celular y la metástasis al actuar sobre la vía de señalización K-Ras/Raf/proteína quinasa activada por mitógeno (MEK)/quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) [288]. Por otro lado, el antígeno 9 asociado a Melanoma (MAGE-A9) también fue descrito como un objetivo de miR-143-3p, contribuyendo así la regulación negativa de miR-143-3p a la progresión del CEL al regular positivamente MAGE-A9 [289].

A partir del análisis conjunto de las tablas 7 y 8, identificamos los miARNs que presentaron una correlación positiva con las pruebas de rutina y los que fueron significativos en el mismo momento del seguimiento al comparar VE/FE con VLE. De aquí concluimos que miR-146 a los 6 meses, miR-206 a los 12 meses, miR-223 a los 6 meses y miR-425-5p a los 6-12 meses, eran los que coincidían. Todos presentaban valores elevados en estos periodos y, además, en el caso del miR-146, la detección de esta sobreexpresión era también a los 2 meses, es decir, previa a la detección por las pruebas ORL y de imagen. Esto nos permite pensar que, el estudio mediante biopsia líquida de la alteración de los niveles de expresión del miR-146 plasmático, podría incluso anticiparse a la aparición clínica de la enfermedad no detectable por estas pruebas.

En nuestro trabajo, sin embargo, no hemos logrado sacar conclusiones relacionadas con miR-28-3p, miR-99a ni miR-143-3p que nos orienten a que sean onco-miARNs o miARNs supresores de tumores, únicamente podemos afirmar que hemos encontrado estas correlaciones positivas con las pruebas ORL y de imagen realizadas, con un significado incierto.

5.3. Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello y ARNm de la hTERT.

El mantenimiento de los telómeros mediante la reactivación de la telomerasa es una característica casi universal de las células tumorales [290–292]. La gran mayoría de los cánceres superan la senescencia replicativa mediante la regulación positiva de la expresión de la hTERT y la actividad de la telomerasa [290], presente en el 80-90% de las neoplasias malignas [151,293,294]. Hay varias formas de regular positivamente la actividad de la telomerasa y activar el gen hTERT, normalmente silenciado. Estos mecanismos de activación de la hTERT incluyen reordenamientos cromosómicos, mutaciones somáticas del promotor de TERT, modificaciones epigenéticas, activadores o represores transcripcionales, polimorfismo del gen TERT y empalmes alternativos [295–298].

La detección de la actividad de la telomerasa en la sangre periférica puede desempeñar un papel importante en el diagnóstico temprano de los pacientes con CECC [299], con posibles implicaciones para la práctica clínica y las estrategias de tratamiento [300]. Numerosos estudios han analizado también la capacidad de la telomerasa para predecir el pronóstico de la enfermedad, y la mayoría ha descrito una correlación entre la sobreexpresión y un comportamiento tumoral agresivo y una evolución desfavorable en los pacientes [172], una alta tasa de metástasis regionales y a distancia [164,301], recurrencias [294] o mayor probabilidad de desarrollar segundos tumores [164].

Más recientemente, otros autores han publicado la presencia de niveles plasmáticos incrementados del ARNm de la hTERT en pacientes con CECC. En el estudio de Ganesh et al., todos los pacientes mostraron niveles elevados de telomerasa en plasma al inicio del estudio en comparación con los controles [302], hallazgos similares a los de Fu et al. [299] y Hong et al. [303], que también encontraron que el contenido del ARNm de la hTERT periférico en el CNF y de la actividad de la telomerasa, en pacientes con CECC respectivamente eran mayores, en comparación con sujetos sanos. Pudimos corroborar estos hallazgos en nuestro estudio, donde hubo un aumento significativo en los niveles basales de expresión del ARNm de la hTERT plasmático en pacientes con CECC en comparación con los controles.

En cuanto a su correlación con hallazgos histopatológicos, cabe destacar que son varios los autores que demostraron que la presencia y cantidad relativa del ARNm de la hTERT aumentaba progresivamente con el grado de anomalías del epitelio laríngeo [304] y otros CECC [305]. El grupo de Luzar et al. también describió que la reactivación de la telomerasa es un evento temprano en la carcinogénesis laríngea, detectable también en los cambios epiteliales de los estadios premalignos laríngeos [306].

Sin embargo, esta correlación con las características clínico-patológicas es controvertida, debido a las opiniones de diversos autores. Se ha encontrado correlación entre niveles más altos del ARNm de la hTERT circulante y características clínico-patológicas más graves y resultados de enfermedades en el cáncer colorrectal, de próstata y gástrico [307–309], particularmente en el carcinoma de células escamosas poco diferenciado [164,168,305], estadio tumoral avanzado [164], metástasis ganglionares [164,168] o su extensión extraganglionar [301]. En el caso del CNF, Fu et al. observaron que el ARNm de la hTERT periférico tenía una correlación significativa con el estadio clínico, el estadio T y el estadio N de los pacientes [299]. En el CECO, Rai A. et al., mostraron una correlación significativa entre los niveles de telomerasa y la edad del paciente y grados histopatológicos de malignidad [310]. Por el contrario, encontramos estudios como los desarrollados por Lee et al., Rai A. et al., Boscolo-Rizzo et al., quienes no pudieron encontrar una asociación entre los niveles plasmáticos del ARNm de la hTERT y variables de resultado como sexo, hábitos adversos, tamaño o sitio de la lesión, afectación de los ganglios linfáticos o estadio general del paciente [310–312]. Ganesh et al. tampoco encontraron correlación entre los niveles de telomerasa y el estadio T, el estadio N y el consumo de tabaco. [302]. En nuestra investigación, respecto a estas características epidemiológicas, solo encontramos correlación significativa del aumento del ARNm de la hTERT en consumidores de tabaco y alcohol, independientemente de si son pacientes sanos o con cáncer, y en pacientes en estadio IV frente al III. No obtuvimos diferencias significativas relacionadas con el sexo, la edad, la detección inmunohistoquímica de p16, la localización del tumor o el grado histológico.

DISCUSIÓN

Diversas investigaciones han demostrado que los CECC asociados al VPH expresan niveles más altos de TERT [164,313]. La oncoproteína E6 del VPH potencia la actividad de la telomerasa mediante diversos mecanismos reguladores, lo que contribuye a la inmortalización celular y al desarrollo y progresión del cáncer [314]. Además del mantenimiento de los telómeros, la hTERT influye en las vías de señalización, el metabolismo celular y el microambiente inmunitario tumoral [315], contribuyendo a la progresión tumoral, la metástasis y un pronóstico desfavorable [164,311]. Asimismo, se ha demostrado que el serotipo 16 del VPH desinhibe el promotor TERT y reactiva la expresión del gen TERT en las células epiteliales, contribuyendo así igualmente a la inmortalización celular [316,317], importante en el CEOF, donde las amígdalas son el subsitio con la tasa más alta de VPH positivo [318,319]. Sin embargo, en nuestro estudio no encontramos diferencias significativas relacionadas con los niveles de expresión del ARNm de la hTERT y la expresión de p16, probablemente debido al pequeño tamaño de la muestra.

Además de la utilidad diagnóstica del ARNm de la hTERT, también sus niveles de expresión han sido estudiados como factor pronóstico de respuesta a tratamiento. El aumento de la expresión de TERT y de la actividad de la telomerasa contribuyen a una menor respuesta al tratamiento y, en última instancia, una supervivencia global deficiente [1]. Cabe destacar que la actividad de la telomerasa se ha convertido en un predictor independiente de una supervivencia reducida en pacientes con CECC, incluso considerando otros factores clínicos y patológicos [311]. Los resultados sobre la reducción de los niveles del ARNm de la hTERT después de la QT-RT son consistentes en diferentes cánceres [307,320–323], pero en el CECC todavía existe cierta controversia. Fu et al. mostraron en estadios avanzados de pacientes con CNF que, después de los diferentes tratamientos con RT o QT-RT, los niveles plasmáticos del ARNm de la hTERT disminuían significativamente [299]. Pero, a diferencia de este grupo, Ganesh et al. concluyeron que no hubo cambios significativos en los niveles de telomerasa después del día 5 de radioterapia en comparación con el valor inicial, y que el aumento en el nivel de telomerasa a los 3 meses que tenían sus pacientes en comparación con el valor inicial no se correlacionaba con la respuesta del tratamiento [302], lo que es más acorde a lo que nuestros pacientes les ocurre, ya que no encontramos diferencias

significativas en el ARNm de la hTERT en los distintos momentos clave de seguimiento tras el tratamiento, entre los pacientes que respondieron y los pacientes que persistieron con la enfermedad.

A pesar de que la reactivación de la telomerasa en el CECC se ha observado en muchos trabajos, su relevancia clínica y pronóstica en estos estudios es variada [301,324–326], y hay autores que no encontraron asociación entre la actividad de la telomerasa en sangre periférica antes y después de la cirugía o en relación a las tasas de supervivencia libre de enfermedad [312]. Sin embargo, Li et al. sugirieron que el tratamiento quirúrgico del CEL tiene una influencia directa sobre los niveles plasmáticos del ARNm de la hTERT, disminuyendo significativamente 2 días después de la cirugía [174]. Además, en el estudio de García-Olmo et al. en el que se incluyeron pacientes con CEL y cáncer de hipofaringe, la detección temprana y tardía del ARNm de la hTERT plasmático en el postoperatorio, fue más frecuente en pacientes que presentaron recurrencias y/o metástasis y, la detección del ARNm de la hTERT en plasma después de la operación se relacionaba con una disminución de la supervivencia global [327]. En nuestro grupo de pacientes, a pesar de no mostrar diferencias concluyentes debido a la pequeña cantidad de pacientes en los que se realizó cirugía, percibimos que los 5 pacientes VLE que fueron intervenidos quirúrgicamente como parte de su tratamiento tuvieron una disminución de los niveles de expresión del ARNm de la hTERT, lo que hace sospechar que se podrían lograr conclusiones significativas en caso de un tamaño de muestra mayor.

5.4. Limitaciones del estudio.

El número de pacientes ha sido menor del esperado, aunque sí que se ha cumplido el número necesario previsto inicialmente. El hecho de que muchos pacientes sean fumadores y bebedores condiciona la presencia de otros antecedentes oncológicos o la existencia de tumores sincrónicos al diagnóstico, motivos que han impedido la inclusión de algunos de ellos en el estudio.

DISCUSIÓN

Asimismo, la muestra de pacientes es bastante heterogénea en cuanto a localizaciones tumorales, lo que hace que sea difícil sacar conclusiones significativas relacionadas con los diferentes subgrupos de pacientes.

La situación de emergencia sanitaria por la COVID-19 impidió realizar un correcto seguimiento clínico-radiológico de los pacientes y la adecuación de sus citas para realizar las extracciones previstas, problema que hemos solventado parcialmente adaptando la asistencia al hospital con citas no diferibles de nuestra u otras especialidades. A esto se le suma que algunos pacientes presentaban un mal estado general por culpa de la enfermedad o los tratamientos, y la mala adherencia de algunos pacientes a acudir a las citas.

No todos los pacientes en las extracciones programadas cuentan con prueba de imagen o con exploración ORL, por lo que en algún paciente no ha sido posible hacer la correlación clínica-exploratoria-analítica y para este apartado del estudio nos hemos visto obligados a reducir el número de pacientes incluidos.

El retraso en el envío de muestras y obtención de los análisis de las mismas por la empresa externa debido a la pandemia por COVID-19 condicionó la demora en la redacción de los artículos previstos, lo que, asociado a que el número de pacientes fue menor del esperado inicialmente y que se incluyeron pacientes para aumentar el tamaño muestral hasta noviembre 2021, obligó a retrasar las extracciones anuales de los últimos pacientes incluidos en el estudio hasta febrero de 2023. Por este motivo, se solicitó una prórroga y la defensa de la tesis se ha demorado hasta este año 2025.

A pesar de que la biopsia líquida podría mejorar la eficacia diagnóstica de las otras herramientas existentes, evaluar la respuesta terapéutica o predecir la recurrencia tumoral permitiendo una intervención más temprana, todavía el potencial de los miARNs y del ARNm de la hTERT como biomarcadores universales de CECC está influenciado por la variabilidad de la técnica y las funciones multifacéticas de los miARNs en la regulación de la expresión génica. Por este motivo, a día de hoy, todavía se precisan más estudios con mayor tamaño muestral y a largo plazo para investigar y validar más a fondo estos biomarcadores.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. El grupo con CECC tiene mayor porcentaje de fumadores y bebedores activos que el grupo control. Los pacientes fumadores y bebedores tienen un riesgo mayor de desarrollar CECC.
2. Al diagnóstico, miR-21-5p y miR-122 plasmáticos están sobreexpresados de manera significativa en pacientes con CECC frente a individuos sanos, mientras que miR-195-5p está regulado negativamente en plasma.
3. Los niveles de expresión basales del ARNm de la hTERT plasmático en pacientes con CECC están aumentados en comparación con los controles.
4. Los fumadores y bebedores de alcohol sobreexpresan ARNm de la hTERT plasmática, independientemente de si son pacientes oncológicos o controles.
5. El CECC presenta un desafío importante con un pronóstico generalmente sombrío. En nuestro grupo de 35 pacientes con CECC, sólo 18 terminan el seguimiento vivos y sin enfermedad, mientras que 17 presentan una enfermedad persistente, falleciendo 11 de ellos.
6. Desde el punto de vista pronóstico, en plasma, el miR-122 se encuentra elevado en pacientes VLE, y miR-146 elevado en pacientes VE/FE, durante todo el año de seguimiento postratamiento. A estos se les suman, en la muestra global, también en plasma, los miR-374-5p y miR-451a que, al mes de la finalización del tratamiento, se muestran significativamente elevados en pacientes VLE. En el estudio de los 22 pacientes con seguimiento y revisiones completas, miR-3591-3p está infraexpresado a los 2 y 6 meses, mientras que miR-223 y miR-206 están sobreexpresados a los 6 y 12 meses respectivamente.
7. Los niveles de expresión del ARNm de la hTERT en plasma, a diferencia de los de diferentes miARNs, no cambiaron significativamente en los diferentes momentos clave después del tratamiento, por lo que no podemos recomendar la prueba del ARNm de la hTERT en sangre como marcador de respuesta por sí solo en CECC.
8. Aunque encontramos varias correlaciones positivas de diferentes miARNs con las exploraciones otorrinolaringológicas y las pruebas de imagen en

CONCLUSIONES

distintos puntos del seguimiento, es difícil sacar conclusiones de cuál sería el miARN más apropiado. El miR-206 es el que mejor correlación presenta con ambas tanto a los 6 como a los 12 meses de seguimiento.

9. La expresión del ARNm de la hTERT plasmático no se correlaciona de manera significativa con las exploraciones otorrinolaringológicas y las pruebas de imagen en ninguno de los momentos del periodo de seguimiento.
10. En plasma, el miR-146 podría considerarse un buen marcador para identificar recidivas tempranas, ya que presenta diferencias estadísticamente significativas desde el diagnóstico hasta el año de seguimiento, incluyendo todos los puntos intermedios. Los 6 meses es el momento en el que más miARNs plasmáticos presentan diferencias significativas, ya que, asociados a este miR-146, encontramos una expresión significativa de tanto de miR-223, como de miR-3591-3p. Estos últimos podrían elegirse para confirmar la recidiva sospechada de manera temprana por miR-146.
11. Los valores de 6 miARNs plasmáticos han mostrado diferencias significativas pre- y postoperatorias al estudiar las muestras de los 6 pacientes sometidos a cirugía que realizaron un seguimiento de 1 año: disminuyen miR-21-5p, miR-146, miR-223 y miR-375, mientras que aumentan miR-26b y miR-3591-3p.
12. Los niveles de expresión del ARNm de la hTERT disminuyeron en plasma en los 5 pacientes VLE que se sometieron a cirugía. Sin embargo, si estudiamos únicamente a los 6 pacientes sometidos a cirugía que finalizaron el periodo de seguimiento de 12 meses, no obtuvimos resultados estadísticamente significativos.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Johnson DE, Burtneß B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2020;6: 92. doi:10.1038/s41572-020-00224-3
2. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res*. 1996;56: 2488–2492.
3. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA A Cancer J Clinicians*. 2024;74: 229–263. doi:10.3322/caac.21834
4. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71: 209–249. doi:10.3322/caac.21660
5. Cheong SC, Vatanasapt P, Yi-Hsin Y, Zain RB, Kerr AR, Johnson NW. Oral cancer in South East Asia: Current status and future directions. *Translational Research in Oral Oncology*. 2017;2: 2057178X1770292. doi:10.1177/2057178X17702921
6. Shield KD, Ferlay J, Jemal A, Sankaranarayanan R, Chaturvedi AK, Bray F, et al. The global incidence of lip, oral cavity, and pharyngeal cancers by subsite in 2012: Lip, Oral Cavity, and Pharyngeal Cancers. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2017;67: 51–64. doi:10.3322/caac.21384
7. Canning M, Guo G, Yu M, Myint C, Groves MW, Byrd JK, et al. Heterogeneity of the Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Immune Landscape and Its Impact on Immunotherapy. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7: 52. doi:10.3389/fcell.2019.00052

BIBLIOGRAFÍA

8. Wynder EL, Bross IJ, Day E. A study of environmental factors in cancer of the larynx. *Cancer*. 1956;9: 86–110. doi:10.1002/1097-0142(195601/02)9:1<86::aid-cnrcr2820090108>3.0.co;2-6
9. Tobacco smoking. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum. 1986;38: 35–394.
10. Alcohol drinking. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 1988;44: 1–378.
11. Hashibe M, Brennan P, Chuang S, Boccia S, Castellsague X, Chen C, et al. Interaction between Tobacco and Alcohol Use and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18: 541–550. doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-0347
12. Whiteman DC, Wilson LF. The fractions of cancer attributable to modifiable factors: A global review. *Cancer Epidemiology*. 2016;44: 203–221. doi:10.1016/j.canep.2016.06.013
13. Hashibe M, Boffetta P, Zaridze D, Shangina O, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, et al. Evidence for an important role of alcohol- and aldehyde-metabolizing genes in cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15: 696–703. doi:10.1158/1055-9965.EPI-05-0710
14. Hashibe M, McKay JD, Curado MP, Oliveira JC, Koifman S, Koifman R, et al. Multiple ADH genes are associated with upper aerodigestive cancers. *Nat Genet*. 2008;40: 707–709. doi:10.1038/ng.151
15. Seitz HK, Stickel F, Homann N. Pathogenetic mechanisms of upper aerodigestive tract cancer in alcoholics. *Intl Journal of Cancer*. 2004;108: 483–487. doi:10.1002/ijc.11600
16. Canova C, Richiardi L, Merletti F, Pentenero M, Gervasio C, Tanturri G, et al. Alcohol, tobacco and genetic susceptibility in relation to cancers of the upper aerodigestive tract in northern Italy. *Tumori*. 2010;96: 1–10. doi:10.1177/030089161009600101

17. Goodchild M, Nargis N, Tursan d'Espaignet E. Global economic cost of smoking-attributable diseases. *Tob Control*. 2018;27: 58–64. doi:10.1136/tobaccocontrol-2016-053305
18. Athukorala IA, Tilakaratne WM, Jayasinghe RD. Areca Nut Chewing: Initiation, Addiction, and Harmful Effects Emphasizing the Barriers and Importance of Cessation. Becona E, editor. *Journal of Addiction*. 2021;2021: 1–9. doi:10.1155/2021/9967097
19. Li H, Torabi SJ, Yarbrough WG, Mehra S, Osborn HA, Judson B. Association of Human Papillomavirus Status at Head and Neck Carcinoma Subsites With Overall Survival. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2018;144: 519. doi:10.1001/jamaoto.2018.0395
20. Saulle R, Semyonov L, Mannocci A, Careri A, Saburri F, Ottolenghi L, et al. Human papillomavirus and cancerous diseases of the head and neck: a systematic review and meta-analysis. *Oral Dis*. 2015;21: 417–431. doi:10.1111/odi.12269
21. Lyford-Pike S, Peng S, Young GD, Taube JM, Westra WH, Akpeng B, et al. Evidence for a Role of the PD-1:PD-L1 Pathway in Immune Resistance of HPV-Associated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Research*. 2013;73: 1733–1741. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2384
22. Miniggio HD. Biological significance of palatine tonsillar epithelium: microstructure and disease. *S Afr Dent J*. 2016;71: 496–9.
23. Ferris RL, Westra W. Oropharyngeal Carcinoma with a Special Focus on HPV-Related Squamous Cell Carcinoma. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2023;18: 515–535. doi:10.1146/annurev-pathmechdis-031521-041424
24. Mason D, Munger K, Tran N. The dynamic interactome of microRNAs and the human papillomavirus in head and neck cancers. *Current Opinion in Virology*. 2021;51: 87–95. doi:10.1016/j.coviro.2021.09.013

BIBLIOGRAFÍA

25. Sannigrahi M, Singh V, Sharma R, Panda N, Khullar M. Role of autophagy in head and neck cancer and therapeutic resistance. *Oral Dis.* 2015;21: 283–291. doi:10.1111/odi.12254
26. Robayo DAG, Eira HAT, Jaimes FOG, Torres AM, Galindo AIC. Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: Human Papilloma Virus Coinfection with *Streptococcus anginosus*. *Braz Dent J.* 2019;30: 626–633. doi:10.1590/0103-6440201902805
27. Mehanna H, Beech T, Nicholson T, El-Hariry I, McConkey C, Paleri V, et al. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer--systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head Neck.* 2013;35: 747–755. doi:10.1002/hed.22015
28. Näsman A, Nordfors C, Holzhauser S, Vlastos A, Tertipis N, Hammar U, et al. Incidence of human papillomavirus positive tonsillar and base of tongue carcinoma: a stabilisation of an epidemic of viral induced carcinoma? *Eur J Cancer.* 2015;51: 55–61. doi:10.1016/j.ejca.2014.10.016
29. Hettmann A, Demcsák A, Decsi G, Bach Á, Pálkó D, Rovó L, et al. Infectious Agents Associated with Head and Neck Carcinomas. *Adv Exp Med Biol.* 2016;897: 63–80. doi:10.1007/5584_2015_5005
30. Chang JS, Lo H-I, Wong T-Y, Huang C-C, Lee W-T, Tsai S-T, et al. Investigating the association between oral hygiene and head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2013;49: 1010–1017. doi:10.1016/j.oraloncology.2013.07.004
31. Alnuaimi AD, Wiesenfeld D, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC, McCullough MJ. Oral *Candida* colonization in oral cancer patients and its relationship with traditional risk factors of oral cancer: a matched case-control study. *Oral Oncol.* 2015;51: 139–145. doi:10.1016/j.oraloncology.2014.11.008
32. Ramón y Cajal S, Sesé M, Capdevila C, Aasen T, De Mattos-Arruda L, Diaz-Cano SJ, et al. Clinical implications of intratumor heterogeneity: challenges

- and opportunities. *J Mol Med*. 2020;98: 161–177. doi:10.1007/s00109-020-01874-2
33. Classification TNM. American Joint Committee on Cancer: AJCC cancer staging manual. 8. New York: Springer; 2017. [Google Scholar].
 34. Tawk B, Debus J, Abdollahi A. Evolution of a Paradigm Switch in Diagnosis and Treatment of HPV-Driven Head and Neck Cancer—Striking the Balance Between Toxicity and Cure. *Front Pharmacol*. 2022;12: 753387. doi:10.3389/fphar.2021.753387
 35. Caudell JJ, Gillison ML, Maghami E, Spencer S, Pfister DG, Adkins D, et al. NCCN Guidelines® Insights: Head and Neck Cancers, Version 1.2022: Featured Updates to the NCCN Guidelines. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2022;20: 224–234. doi:10.6004/jnccn.2022.0016
 36. Ahmad P, Sana J, Slavik M, Gurin D, Radova L, Gablo NA, et al. MicroRNA-15b-5p Predicts Locoregional Relapse in Head and Neck Carcinoma Patients Treated With Intensity-modulated Radiotherapy. *Cancer Genomics Proteomics*. 2019;16: 139–146. doi:10.21873/cgp.20119
 37. Chang Y-C, Jan C-I, Peng C-Y, Lai Y-C, Hu F-W, Yu C-C. Activation of microRNA-494-targeting Bmi1 and ADAM10 by silibinin ablates cancer stemness and predicts favourable prognostic value in head and neck squamous cell carcinomas. *Oncotarget*. 2015;6: 24002–24016. doi:10.18632/oncotarget.4365
 38. Seiwert TY, Salama JK, Vokes EE. The chemoradiation paradigm in head and neck cancer. *Nat Clin Pract Oncol*. 2007;4: 156–171. doi:10.1038/ncponc0750
 39. Specenier P, Vermorken JB. Advances in the systemic treatment of head and neck cancers. *Current Opinion in Oncology*. 2010;22: 200–205. doi:10.1097/CCO.0b013e3283376e15

BIBLIOGRAFÍA

40. Cohen EEW, Bell RB, Bifulco CB, Burtneess B, Gillison ML, Harrington KJ, et al. The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC). *J immunotherapy cancer*. 2019;7: 184. doi:10.1186/s40425-019-0662-5
41. von der Grün J, Rödel F, Brandts C, Fokas E, Guckenberger M, Rödel C, et al. Targeted Therapies and Immune-Checkpoint Inhibition in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Where Do We Stand Today and Where to Go? *Cancers*. 2019;11: 472. doi:10.3390/cancers11040472
42. Amar A, Chedid HM, Rapoport A, Dedivitis RA, Cernea CR, Brandão LG, et al. Update of Assessment of Survival in Head and Neck Cancer after Regional Recurrence. *Journal of Oncology*. 2012;2012: 1–4. doi:10.1155/2012/154303
43. Belcher R, Hayes K, Fedewa S, Chen AY. Current treatment of head and neck squamous cell cancer: Outcomes in Head and Neck Cancer. *J Surg Oncol*. 2014;110: 551–574. doi:10.1002/jso.23724
44. Marur S, Forastiere AA. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*. 2016;91: 386–396. doi:10.1016/j.mayocp.2015.12.017
45. Lu L, Wu Y, Feng M, Xue X, Fan Y. A novel seven-miRNA prognostic model to predict overall survival in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Mol Med Report*. 2019. doi:10.3892/mmr.2019.10665
46. Xu Q, Zhang Q, Ishida Y, Hajjar S, Tang X, Shi H, et al. EGF induces epithelial-mesenchymal transition and cancer stem-like cell properties in human oral cancer cells via promoting Warburg effect. *Oncotarget*. 2017;8: 9557–9571. doi:10.18632/oncotarget.13771
47. Babu JM, Prathibha R, Jijith VS, Hariharan R, Pillai MR. A miR-centric view of head and neck cancers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2011;1816: 67–72. doi:10.1016/j.bbcan.2011.04.003

48. Dalmay T, Edwards DR. MicroRNAs and the hallmarks of cancer. *Oncogene*. 2006;25: 6170–6175. doi:10.1038/sj.onc.1209911
49. Cortez MA, Anfossi S, Ramapriyan R, Menon H, Atalar SC, Aliru M, et al. Role of miRNAs in immune responses and immunotherapy in cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2019;58: 244–253. doi:10.1002/gcc.22725
50. Kern SE. Why Your New Cancer Biomarker May Never Work: Recurrent Patterns and Remarkable Diversity in Biomarker Failures. *Cancer Research*. 2012;72: 6097–6101. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3232
51. Economopoulou P, De Bree R, Kotsantis I, Psyrri A. Diagnostic Tumor Markers in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) in the Clinical Setting. *Front Oncol*. 2019;9: 827. doi:10.3389/fonc.2019.00827
52. Eze N, Lo Y-C, Burtneess B. Biomarker driven treatment of head and neck squamous cell cancer. *Cancers Head Neck*. 2017;2: 6. doi:10.1186/s41199-017-0025-1
53. Lydiatt W, O'Sullivan B, Patel S. Major Changes in Head and Neck Staging for 2018. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*. 2018; 505–514. doi:10.1200/EDBK_199697
54. Huang SH, Chen Z-J, O'Sullivan B. A New Staging System for HPV-Related Oropharynx Cancer: Rationale, Derivation, Validation and Practical Applications. In: Vermorken JB, Budach V, Leemans CR, Machiels J-P, Nicolai P, O'Sullivan B, editors. *Critical Issues in Head and Neck Oncology*. Cham: Springer International Publishing; 2018. pp. 149–164. doi:10.1007/978-3-319-98854-2_11
55. 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. *The Lancet*. 2019;393: 51–60. doi:10.1016/S0140-6736(18)32752-1

BIBLIOGRAFÍA

56. 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. *The Lancet*. 2019;393: 40–50. doi:10.1016/S0140-6736(18)32779-X
57. Ritprajak P, Azuma M. Intrinsic and extrinsic control of expression of the immunoregulatory molecule PD-L1 in epithelial cells and squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*. 2015;51: 221–228. doi:10.1016/j.oraloncology.2014.11.014
58. Lin Y-M, Sung W-W, Hsieh M-J, Tsai S-C, Lai H-W, Yang S-M, et al. High PD-L1 Expression Correlates with Metastasis and Poor Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma. Suzuki H, editor. *PLoS ONE*. 2015;10: e0142656. doi:10.1371/journal.pone.0142656
59. Müller T, Braun M, Dietrich D, Aktakin S, Höft S, Kristiansen G, et al. PD-L1: a novel prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8: 52889–52900. doi:10.18632/oncotarget.17547
60. Vassilakopoulou M, Avgeris M, Velcheti V, Kotoula V, Rampias T, Chatzopoulos K, et al. Evaluation of PD-L1 Expression and Associated Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2016;22: 704–713. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-1543
61. Yang W, Wong MCM, Thomson PJ, Li K-Y, Su Y. The prognostic role of PD-L1 expression for survival in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncology*. 2018;86: 81–90. doi:10.1016/j.oraloncology.2018.09.016
62. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N Engl J Med*. 2012;366: 2443–2454. doi:10.1056/NEJMoa1200690

63. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQM, Hwu W-J, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *N Engl J Med.* 2012;366: 2455–2465. doi:10.1056/NEJMoa1200694
64. Shen S, Lin Y, Yuan X, Shen L, Chen J, Chen L, et al. Biomarker MicroRNAs for Diagnosis, Prognosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma: A Functional Survey and Comparison. *Sci Rep.* 2016;6: 38311. doi:10.1038/srep38311
65. Raghupathy R, Hui EP, Chan ATC. Epstein-Barr Virus as a Paradigm in Nasopharyngeal Cancer: From Lab to Clinic. *American Society of Clinical Oncology Educational Book.* 2014; 149–153. doi:10.14694/EdBook_AM.2014.34.149
66. Raab-Traub N. Novel mechanisms of EBV-induced oncogenesis. *Curr Opin Virol.* 2012;2: 453–458. doi:10.1016/j.coviro.2012.07.001
67. Lo YM, Chan LY, Lo KW, Leung SF, Zhang J, Chan AT, et al. Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 1999;59: 1188–1191.
68. Lo YM, Chan AT, Chan LY, Leung SF, Lam CW, Huang DP, et al. Molecular prognostication of nasopharyngeal carcinoma by quantitative analysis of circulating Epstein-Barr virus DNA. *Cancer Res.* 2000;60: 6878–6881.
69. Lin J-C, Wang W-Y, Chen KY, Wei Y-H, Liang W-M, Jan J-S, et al. Quantification of plasma Epstein-Barr virus DNA in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma. *N Engl J Med.* 2004;350: 2461–2470. doi:10.1056/NEJMoa032260
70. Chan ATC, Ma BBY, Lo YMD, Leung SF, Kwan WH, Hui EP, et al. Phase II study of neoadjuvant carboplatin and paclitaxel followed by radiotherapy and concurrent cisplatin in patients with locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma: therapeutic monitoring with plasma Epstein-

BIBLIOGRAFÍA

- Barr virus DNA. *J Clin Oncol.* 2004;22: 3053–3060. doi:10.1200/JCO.2004.05.178
71. Lee VH, Kwong DLW, Leung T-W, Choi C-W, Ng SC, Lam K-O, et al. Serial early post-IMRT undetectable plasma EBV DNA to predict outcomes in non-metastatic nasopharyngeal cancer. *JCO.* 2015;33: 6007–6007. doi:10.1200/jco.2015.33.15_suppl.6007
72. Lee N. NRG-HN001: Randomized Phase II and Phase III Studies of Individualized Treatment for Nasopharyngeal Carcinoma Based on Biomarker Epstein Barr Virus (EBV) Deoxyribonucleic Acid (DNA). <https://www.rtog.org/ClinicalTrials/ProtocolTable/StudyDetails.aspx?study=1305>. 2017.
73. Pantel K, Alix-Panabières C. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends in Molecular Medicine.* 2010;16: 398–406. doi:10.1016/j.molmed.2010.07.001
74. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14: 531–548. doi:10.1038/nrclinonc.2017.14
75. Racila E, Euhus D, Weiss AJ, Rao C, McConnell J, Terstappen LW, et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95: 4589–4594. doi:10.1073/pnas.95.8.4589
76. Kilgour E, Rothwell DG, Brady G, Dive C. Liquid Biopsy-Based Biomarkers of Treatment Response and Resistance. *Cancer Cell.* 2020;37: 485–495. doi:10.1016/j.ccell.2020.03.012
77. Huang Q, Yang J, Zheng J, Hsueh C, Guo Y, Zhou L. Characterization of selective exosomal microRNA expression profile derived from laryngeal squamous cell carcinoma detected by next generation sequencing. *Oncol Rep.* 2018. doi:10.3892/or.2018.6672
78. Zhao H, Shen J, Medico L, Wang D, Ambrosone CB, Liu S. A Pilot Study of Circulating miRNAs as Potential Biomarkers of Early Stage Breast Cancer.

- Creighton C, editor. PLoS ONE. 2010;5: e13735. doi:10.1371/journal.pone.0013735
79. Brock G, Castellanos E, Hu L, Coticchia C, Skog J. Liquid biopsy for cancer screening, patient stratification and monitoring. *Transl Cancer Res.* 2015;4: 280–290. doi:10.3978/j.issn.2218-676X.2015.06.05
 80. Wang D, Farhana A. Biochemistry, RNA Structure. [Updated 2023 Jul 29]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558999/>.
 81. Santosh B, Varshney A, Yadava PK. Non-coding RNAs: biological functions and applications. *Cell Biochemistry & Function.* 2015;33: 14–22. doi:10.1002/cbf.3079
 82. El sitio web del Instituto Nacional del Cáncer (<https://www.cancer.gov/espanol>).
 83. Dey S, Biswas B, Manoj Appadan A, Shah J, Pal JK, Basu S, et al. Non-Coding RNAs in Oral Cancer: Emerging Roles and Clinical Applications. *Cancers (Basel).* 2023;15: 3752. doi:10.3390/cancers15153752
 84. Van Lint S, Heirman C, Thielemans K, Breckpot K. mRNA: From a chemical blueprint for protein production to an off-the-shelf therapeutic. *Human Vaccines & Immunotherapeutics.* 2013;9: 265–274. doi:10.4161/hv.22661
 85. Raina M, Ibba M. tRNAs as regulators of biological processes. *Front Genet.* 2014;5. doi:10.3389/fgene.2014.00171
 86. Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet.* 2009;10: 155–159. doi:10.1038/nrg2521
 87. Zhang R, Xia LQ, Lu WW, Zhang J, Zhu J-S. LncRNAs and cancer. *Oncology Letters.* 2016;12: 1233–1239. doi:10.3892/ol.2016.4770
 88. Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, et al. Landscape of transcription in human cells. *Nature.* 2012;489: 101–108. doi:10.1038/nature11233

BIBLIOGRAFÍA

89. Quinn JJ, Chang HY. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat Rev Genet.* 2016;17: 47–62. doi:10.1038/nrg.2015.10
90. Prensner JR, Chinnaiyan AM. The emergence of lncRNAs in cancer biology. *Cancer Discov.* 2011;1: 391–407. doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0209
91. Schmitt AM, Chang HY. Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways. *Cancer Cell.* 2016;29: 452–463. doi:10.1016/j.ccell.2016.03.010
92. Jiang C, Li X, Zhao H, Liu H. Long non-coding RNAs: potential new biomarkers for predicting tumor invasion and metastasis. *Mol Cancer.* 2016;15: 62. doi:10.1186/s12943-016-0545-z
93. Khalil AM, Guttman M, Huarte M, Garber M, Raj A, Rivea Morales D, et al. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106: 11667–11672. doi:10.1073/pnas.0904715106
94. Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet.* 2009;10: 94–108. doi:10.1038/nrg2504
95. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research.* 2008;19: 92–105. doi:10.1101/gr.082701.108
96. Zhang F, Wang D. The Pattern of microRNA Binding Site Distribution. *Genes.* 2017;8: 296. doi:10.3390/genes8110296
97. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell.* 2005;120: 15–20. doi:10.1016/j.cell.2004.12.035
98. Gu W, Xu Y, Xie X, Wang T, Ko J-H, Zhou T. The role of RNA structure at 5' untranslated region in microRNA-mediated gene regulation. *RNA.* 2014;20: 1369–1375. doi:10.1261/rna.044792.114

99. Lee I, Ajay SS, Yook JI, Kim HS, Hong SH, Kim NH, et al. New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome Res.* 2009;19: 1175–1183. doi:10.1101/gr.089367.108
100. Bruno IG, Karam R, Huang L, Bhardwaj A, Lou CH, Shum EY, et al. Identification of a MicroRNA that Activates Gene Expression by Repressing Nonsense-Mediated RNA Decay. *Molecular Cell.* 2011;42: 500–510. doi:10.1016/j.molcel.2011.04.018
101. John K, Wu J, Lee B-W, Farah CS. MicroRNAs in Head and Neck Cancer. *International Journal of Dentistry.* 2013;2013: 1–12. doi:10.1155/2013/650218
102. Rodriguez A. Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units. *Genome Research.* 2004;14: 1902–1910. doi:10.1101/gr.2722704
103. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer.* 2006;6: 857–866. doi:10.1038/nrc1997
104. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75: 843–854. doi:10.1016/0092-8674(93)90529-Y
105. Carron J, Torricelli C, Silva JK, Queiroz GSR, Ortega MM, Lima CSP, et al. MicroRNAs deregulation in head and neck squamous cell carcinoma. *Head & Neck.* 2021;43: 645–667. doi:10.1002/hed.26533
106. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K-H, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004;23: 4051–4060. doi:10.1038/sj.emboj.7600385
107. Dar GM, Agarwal S, Kumar A, Nimisha, Apurva, Sharma AK, et al. A non-invasive miRNA-based approach in early diagnosis and therapeutics of oral cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 2022;180: 103850. doi:10.1016/j.critrevonc.2022.103850

BIBLIOGRAFÍA

108. Vahabi M, Blandino G, Di Agostino S. MicroRNAs in head and neck squamous cell carcinoma: a possible challenge as biomarkers, determinants for the choice of therapy and targets for personalized molecular therapies. *Transl Cancer Res TCR*. 2021;10: 3090–3110. doi:10.21037/tcr-20-2530
109. Ergin K, Çetinkaya R. Regulation of MicroRNAs. *Methods Mol Biol*. 2022;2257: 1–32. doi:10.1007/978-1-0716-1170-8_1
110. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*. 2007;448: 83–86. doi:10.1038/nature05983
111. Babiarz JE, Ruby JG, Wang Y, Bartel DP, Blelloch R. Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev*. 2008;22: 2773–2785. doi:10.1101/gad.1705308
112. Xie M, Li M, Vilborg A, Lee N, Shu M-D, Yartseva V, et al. Mammalian 5'-capped microRNA precursors that generate a single microRNA. *Cell*. 2013;155: 1568–1580. doi:10.1016/j.cell.2013.11.027
113. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005;435: 834–838. doi:10.1038/nature03702
114. Lawrie CH, Soneji S, Marafioti T, Cooper CDO, Palazzo S, Paterson JC, et al. MicroRNA expression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of diffuse large B cell lymphoma. *Int J Cancer*. 2007;121: 1156–1161. doi:10.1002/ijc.22800
115. Mo M-H, Chen L, Fu Y, Wang W, Fu SW. Cell-free Circulating miRNA Biomarkers in Cancer. *J Cancer*. 2012;3: 432–448. doi:10.7150/jca.4919
116. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105: 10513–10518. doi:10.1073/pnas.0804549105

117. Dasi F, Martinez-Rodes P, March JA, Santamaria J, Martinez-Javaloyas JM, Gil M, et al. Real-Time Quantification of Human Telomerase Reverse Transcriptase mRNA in the Plasma of Patients with Prostate Cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1075: 204–210. doi:10.1196/annals.1368.028
118. Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet*. 2012;13: 358–369. doi:10.1038/nrg3198
119. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993;75: 855–862. doi:10.1016/0092-8674(93)90530-4
120. Nagadia R, Pandit P, Coman WB, Cooper-White J, Punyadeera C. miRNAs in head and neck cancer revisited. *Cell Oncol (Dordr)*. 2013;36: 1–7. doi:10.1007/s13402-012-0122-4
121. Chen S, Zhang J, Sun L, Li X, Bai J, Zhang H, et al. miR-611 promotes the proliferation, migration and invasion of tongue squamous cell carcinoma cells by targeting *FOXN3*. *Oral Dis*. 2019;25: 1906–1918. doi:10.1111/odi.13177
122. Fitriana M, Hwang W-L, Chan P-Y, Hsueh T-Y, Liao T-T. Roles of microRNAs in Regulating Cancer Stemness in Head and Neck Cancers. *Cancers*. 2021;13: 1742. doi:10.3390/cancers13071742
123. Lages E. MicroRNAs: molecular features and role in cancer. *Front Biosci*. 2012;17: 2508. doi:10.2741/4068
124. Hammond SM. RNAi, microRNAs, and human disease. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2006;58: 63–68. doi:10.1007/s00280-006-0318-2
125. Petrović N, Stanojković TP, Nikitović M. MicroRNAs in prostate cancer following radiotherapy: Towards predicting response to radiation treatment. *CMC*. 2021;28. doi:10.2174/0929867328666210804085135

BIBLIOGRAFÍA

126. Larrea E, Sole C, Manterola L, Goicoechea I, Armesto M, Arestin M, et al. New Concepts in Cancer Biomarkers: Circulating miRNAs in Liquid Biopsies. *IJMS*. 2016;17: 627. doi:10.3390/ijms17050627
127. Avissar M, Christensen BC, Kelsey KT, Marsit CJ. MicroRNA Expression Ratio Is Predictive of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2009;15: 2850–2855. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-3131
128. Zahran F, Ghalwash D, Shaker O, Al-Johani K, Scully C. Salivary microRNAs in oral cancer. *Oral Dis*. 2015;21: 739–747. doi:10.1111/odi.12340
129. Barker EV, Cervigne NK, Reis PP, Goswami RS, Xu W, Weinreb I, et al. microRNA evaluation of unknown primary lesions in the head and neck. *Mol Cancer*. 2009;8: 127. doi:10.1186/1476-4598-8-127
130. Hui ABY, Lenarduzzi M, Krushel T, Waldron L, Pintilie M, Shi W, et al. Comprehensive MicroRNA Profiling for Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Clinical Cancer Research*. 2010;16: 1129–1139. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2166
131. Ren W, Qiang C, Gao L, Li S-M, Zhang L-M, Wang X-L, et al. Circulating microRNA-21 (MIR-21) and phosphatase and tensin homolog (PTEN) are promising novel biomarkers for detection of oral squamous cell carcinoma. *Biomarkers*. 2014;19: 590–596. doi:10.3109/1354750X.2014.955059
132. Wang J, Zhou Y, Lu J, Sun Y, Xiao H, Liu M, et al. Combined detection of serum exosomal miR-21 and HOTAIR as diagnostic and prognostic biomarkers for laryngeal squamous cell carcinoma. *Med Oncol*. 2014;31: 148. doi:10.1007/s12032-014-0148-8
133. Pedersen NJ, Jensen DH, Lelkaitis G, Kiss K, Charabi BW, Ullum H, et al. MicroRNA-based classifiers for diagnosis of oral cavity squamous cell carcinoma in tissue and plasma. *Oral Oncology*. 2018;83: 46–52. doi:10.1016/j.oraloncology.2018.05.020

134. Prasad G, Seers C, Reynolds E, McCullough MJ. A panel of microRNAs can be used to determine oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2017. doi:10.1111/jop.12592
135. Popov TM, Stancheva G, Kyurkchian SG, Petkova V, Panova S, Kaneva RP, et al. Global microRNA expression profile in laryngeal carcinoma unveils new prognostic biomarkers and novel insights into field cancerization. *Sci Rep*. 2022;12: 17051. doi:10.1038/s41598-022-20338-w
136. Wang X, Zhao Y, Strohmer DF, Yang W, Xia Z, Yu C. The prognostic value of MicroRNAs associated with fatty acid metabolism in head and neck squamous cell carcinoma. *Front Genet*. 2022;13: 983672. doi:10.3389/fgene.2022.983672
137. Lapa RML, Barros-Filho MC, Marchi FA, Domingues MAC, de Carvalho GB, Drigo SA, et al. Integrated miRNA and mRNA expression analysis uncovers drug targets in laryngeal squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncology*. 2019;93: 76–84. doi:10.1016/j.oraloncology.2019.04.018
138. Liu C-J, Kao S-Y, Tu H-F, Tsai M-M, Chang K-W, Lin S-C. Increase of microRNA miR-31 level in plasma could be a potential marker of oral cancer. *Oral Diseases*. 2010;16: 360–364. doi:10.1111/j.1601-0825.2009.01646.x
139. De Cecco L, Giannoccaro M, Marchesi E, Bossi P, Favales F, Locati L, et al. Integrative miRNA-Gene Expression Analysis Enables Refinement of Associated Biology and Prediction of Response to Cetuximab in Head and Neck Squamous Cell Cancer. *Genes*. 2017;8: 35. doi:10.3390/genes8010035
140. Summerer I, Niyazi M, Unger K, Pitea A, Zangen V, Hess J, et al. Changes in circulating microRNAs after radiochemotherapy in head and neck cancer patients. *Radiat Oncol*. 2013;8: 296. doi:10.1186/1748-717X-8-296
141. Summerer I, Unger K, Braselmann H, Schuettrumpf L, Maihoefer C, Baumeister P, et al. Circulating microRNAs as prognostic therapy

BIBLIOGRAFÍA

- biomarkers in head and neck cancer patients. *Br J Cancer*. 2015;113: 76–82. doi:10.1038/bjc.2015.111
142. Visacri MB, Ferrari GB, Dias P, Pimentel R, de Souza CM, Costa APL, et al. Quality of Life of Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck Receiving High-Dose Cisplatin Chemotherapy and Radiotherapy. *South Med J*. 2015;108: 343–349. doi:10.14423/SMJ.0000000000000298
143. Bar-Ad V, Palmer J, Yang H, Cognetti D, Curry J, Luginbuhl A, et al. Current Management of Locally Advanced Head and Neck Cancer: The Combination of Chemotherapy With Locoregional Treatments. *Seminars in Oncology*. 2014;41: 798–806. doi:10.1053/j.seminoncol.2014.09.018
144. Shaw P, Raymond G, Senthilnathan R, Kumarasamy C, Baxi S, Suresh D, et al. Clinical Theragnostic Relationship between Chemotherapeutic Resistance, and Sensitivity and miRNA Expressions in Head and Neck Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis Protocol. *Genes*. 2021;12: 2029. doi:10.3390/genes12122029
145. Kumarasamy, Madhav, Sabarimurugan, Krishnan, Baxi, Gupta, et al. Prognostic Value of miRNAs in Head and Neck Cancers: A Comprehensive Systematic and Meta-Analysis. *Cells*. 2019;8: 772. doi:10.3390/cells8080772
146. Tiberio P, Callari M, Angeloni V, Daidone MG, Appierto V. Challenges in Using Circulating miRNAs as Cancer Biomarkers. *BioMed Research International*. 2015;2015: 1–10. doi:10.1155/2015/731479
147. Jayaraj R, Polpaya K, Kunale M, Kodiveri Muthukaliannan G, Shetty S, Baxi S, et al. Clinical Investigation of Chemotherapeutic Resistance and miRNA Expressions in Head and Neck Cancers: A Thorough PRISMA Compliant Systematic Review and Comprehensive Meta-Analysis. *Genes*. 2022;13: 2325. doi:10.3390/genes13122325
148. Cohen SB, Graham ME, Lovrecz GO, Bache N, Robinson PJ, Reddel RR. Protein Composition of Catalytically Active Human Telomerase from

- Immortal Cells. *Science*. 2007;315: 1850–1853. doi:10.1126/science.1138596
149. Yeh T-J, Luo C-W, Du J-S, Huang C-T, Wang M-H, Chuang T-M, et al. Deciphering the Functions of Telomerase Reverse Transcriptase in Head and Neck Cancer. *Biomedicines*. 2023;11: 691. doi:10.3390/biomedicines11030691
 150. Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16: 203–222. doi:10.1038/nrd.2016.246
 151. Chen C-H, Chen R-J. Prevalence of Telomerase Activity in Human Cancer. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2011;110: 275–289. doi:10.1016/S0929-6646(11)60043-0
 152. Takahashi H, Hyakusoku H, Horii C, Takahashi M, Nishimura G, Taguchi T, et al. Telomerase-specific oncolytic adenovirus: antitumor effects on radiation-resistant head and neck squamous cell carcinoma cells. *Head Neck*. 2014;36: 411–418. doi:10.1002/hed.23309
 153. Ruttkay-Nedecky B, Jimenez Jimenez AM, Nejdl L, Chudobova D, Gumulec J, Masarik M, et al. Relevance of infection with human papillomavirus: the role of the p53 tumor suppressor protein and E6/E7 zinc finger proteins (Review). *Int J Oncol*. 2013;43: 1754–1762. doi:10.3892/ijo.2013.2105
 154. Takenaka S, Sato S. Telomerase as Biomarker for Oral Cancer. In: Preedy VR, Patel VB, editors. *Biomarkers in Cancer*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2015. pp. 753–770. doi:10.1007/978-94-007-7681-4_8
 155. Greider CW, Blackburn EH. A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*. 1989;337: 331–337. doi:10.1038/337331a0

BIBLIOGRAFÍA

156. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. *Cell*. 1985;43: 405–413. doi:10.1016/0092-8674(85)90170-9
157. Szostak JW, Blackburn EH. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell*. 1982;29: 245–255. doi:10.1016/0092-8674(82)90109-X
158. Low KC, Tergaonkar V. Telomerase: central regulator of all of the hallmarks of cancer. *Trends in Biochemical Sciences*. 2013;38: 426–434. doi:10.1016/j.tibs.2013.07.001
159. Zhang C, Chen X, Li L, Zhou Y, Wang C, Hou S. The Association between Telomere Length and Cancer Prognosis: Evidence from a Meta-Analysis. Saretzki G, editor. *PLoS ONE*. 2015;10: e0133174. doi:10.1371/journal.pone.0133174
160. Li Y, Tergaonkar V. Noncanonical Functions of Telomerase: Implications in Telomerase-Targeted Cancer Therapies. *Cancer Research*. 2014;74: 1639–1644. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-3568
161. Fernández-Marcelo T, Gómez A, Pascua I, De Juan C, Head J, Hernando F, et al. Telomere length and telomerase activity in non-small cell lung cancer prognosis: clinical usefulness of a specific telomere status. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015;34: 78. doi:10.1186/s13046-015-0195-9
162. Downey MG, Going JJ, Stuart RC, Keith WN. Expression of telomerase RNA in oesophageal and oral cancer. *J Oral Pathology Medicine*. 2001;30: 577–581. doi:10.1034/j.1600-0714.2001.301001.x
163. Bertorelle R, Briarava M, Rampazzo E, Biasini L, Agostini M, Maretto I, et al. Telomerase is an independent prognostic marker of overall survival in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2013;108: 278–284. doi:10.1038/bjc.2012.602
164. Boscolo-Rizzo P, Rampazzo E, Perissinotto E, Piano MA, Giunco S, Baboci L, et al. Telomere shortening in mucosa surrounding the tumor: Biosensor of field cancerization and prognostic marker of mucosal failure in head and

- neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*. 2015;51: 500–507. doi:10.1016/j.oraloncology.2015.02.100
165. Aida J, Izumo T, Shimomura N, Nakamura K, Ishikawa N, Matsuura M, et al. Telomere lengths in the oral epithelia with and without carcinoma. *European Journal of Cancer*. 2010;46: 430–438. doi:10.1016/j.ejca.2009.10.018
 166. Rampazzo E, Bertorelle R, Serra L, Terrin L, Candiotti C, Pucciarelli S, et al. Relationship between telomere shortening, genetic instability, and site of tumour origin in colorectal cancers. *Br J Cancer*. 2010;102: 1300–1305. doi:10.1038/sj.bjc.6605644
 167. Dasí F, Martínez-Rodes P, March JA, Santamaría J, Martínez-Javaloyas JM, Gil M, et al. Real-time quantification of human telomerase reverse transcriptase mRNA in the plasma of patients with prostate cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1075: 204–210. doi:10.1196/annals.1368.028
 168. Kunická Z, Mucha I, Fajkus J. Telomerase activity in head and neck cancer. *Anticancer Res*. 2008;28: 3125–3129.
 169. Chen M, Yang B, Zhang X. Effects of Telomerase Activity on Carcinogenesis and Survival in Laryngeal Carcinoma. *J Int Med Res*. 2008;36: 336–342. doi:10.1177/147323000803600217
 170. Yajima Y, Noma H, Furuya Y, Nomura T, Yamauchi T, Kasahara K, et al. Quantification of telomerase activity of regions unstained with iodine solution that surround oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*. 2004;40: 314–320. doi:10.1016/j.oraloncology.2003.08.017
 171. Fabricius E-M, Kruse-Boitschenko U, Khoury R, Wildner G-P, Raguse J-D, Klein M. Immunohistochemical determination of the appropriate anti-hTERT antibodies for in situ detection of telomerase activity in frozen sections of head and neck squamous cell carcinomas and tumor margin tissues. *Int J Oncol*. 2009;34: 1257–1279.

BIBLIOGRAFÍA

172. Boscolo-Rizzo P, Da Mosto MC, Rampazzo E, Giunco S, Del Mistro A, Menegaldo A, et al. Telomeres and telomerase in head and neck squamous cell carcinoma: from pathogenesis to clinical implications. *Cancer Metastasis Rev.* 2016;35: 457–474. doi:10.1007/s10555-016-9633-1
173. Caraway NP, Khanna A, Dawlett M, Guo M, Guo N, Lin E, et al. Gain of the 3q26 region in cervicovaginal liquid-based pap preparations is associated with squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinoma. *Gynecologic Oncology.* 2008;110: 37–42. doi:10.1016/j.ygyno.2008.01.040
174. Li Y-R, Wu J-M, Wang L, Huang X, Shi J, Hu L-H. Human telomerase reverse transcriptase expression and its clinical significance in laryngeal squamous cell carcinoma. *Acta Oto-Laryngologica.* 2005;125: 409–414. doi:10.1080/00016480410024451
175. Huang Y-K, Fan X-G, Qiu F, Wang Z-M. Combined Detection of mRNA Expression of Alpha-Fetoprotein in Peripheral Blood and Telomerase Activity of Monocytes in Hepatocellular Carcinoma Patients. *HGE.* 2012 [cited 1 Sep 2024]. doi:10.5754/hge12359
176. Lu L, Zhang C, Zhu G, Irwin M, Risch H, Menato G, et al. Telomerase expression and telomere length in breast cancer and their associations with adjuvant treatment and disease outcome. *Breast Cancer Res.* 2011;13: R56. doi:10.1186/bcr2893
177. Lan Q, Cawthon R, Gao Y, Hu W, Hosgood HD, Barone-Adesi F, et al. Longer Telomere Length in Peripheral White Blood Cells Is Associated with Risk of Lung Cancer and the rs2736100 (CLPTM1L-TERT) Polymorphism in a Prospective Cohort Study among Women in China. Gorlova OY, editor. *PLoS ONE.* 2013;8: e59230. doi:10.1371/journal.pone.0059230
178. Qin Q, Sun J, Yin J, Liu L, Chen J, Zhang Y, et al. Telomere Length in Peripheral Blood Leukocytes Is Associated with Risk of Colorectal Cancer in Chinese Population. De Re V, editor. *PLoS ONE.* 2014;9: e88135. doi:10.1371/journal.pone.0088135

179. Barczak W, Rozwadowska N, Romaniuk A, Lipińska N, Lisiak N, Grodecka-Gazdecka S, et al. Telomere length assessment in leukocytes presents potential diagnostic value in patients with breast cancer. *Oncology Letters*. 2016;11: 2305–2309. doi:10.3892/ol.2016.4188
180. Allen CT, Ricker JL, Chen Z, Van Waes C. Role of activated nuclear factor- κ B in the pathogenesis and therapy of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head & Neck*. 2007;29: 959–971. doi:10.1002/hed.20615
181. Allott EH, Geradts J, Sun X, Cohen SM, Zirpoli GR, Khoury T, et al. Intratumoral heterogeneity as a source of discordance in breast cancer biomarker classification. *Breast Cancer Res*. 2016;18: 68. doi:10.1186/s13058-016-0725-1
182. Mali SB, Dahivelkar S. Liquid biopsy = Individualized cancer management: Diagnosis, monitoring treatment and checking recurrence and metastasis. *Oral Oncology*. 2021;123: 105588. doi:10.1016/j.oraloncology.2021.105588
183. Mroz EA, Rocco JW. MATH, a novel measure of intratumor genetic heterogeneity, is high in poor-outcome classes of head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*. 2013;49: 211–215. doi:10.1016/j.oraloncology.2012.09.007
184. Alix-Panabières C, Pantel K. Real-time liquid biopsy: circulating tumor cells versus circulating tumor DNA. *Ann Transl Med*. 2013;1: 18. doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2013.06.02
185. Califf RM. Biomarker definitions and their applications. *Exp Biol Med* (Maywood). 2018;243: 213–221. doi:10.1177/1535370217750088
186. Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, Bugnar OL, Boboc A, Cretoiu D, et al. miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. *Cells*. 2020;9: 276. doi:10.3390/cells9020276

BIBLIOGRAFÍA

187. Lussier YA, Stadler WM, Chen JL. Advantages of genomic complexity: bioinformatics opportunities in microRNA cancer signatures: Figure 1. *J Am Med Inform Assoc*. 2012;19: 156–160. doi:10.1136/amiajnl-2011-000419
188. Planelles L, Guler I, Jiménez-Martínez M, Babiker R, Castillo L, Monsalve C, et al. PREVECOL, a predictive model for early detection of colorectal cancer and precancerous lesions in liquid biopsy. *JCO*. 2024;42: 3629–3629. doi:10.1200/JCO.2024.42.16_suppl.3629
189. Luo K, Zhao Y, Liu H, Mo J. Identification of Critical miRNAs as Novel Diagnostic Markers for Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. Li S, editor. *Disease Markers*. 2022;2022: 1–7. doi:10.1155/2022/6858411
190. Liu C, Yu Z, Huang S, Zhao Q, Sun Z, Fletcher C, et al. Combined identification of three miRNAs in serum as effective diagnostic biomarkers for HNSCC. *EBioMedicine*. 2019;50: 135–143. doi:10.1016/j.ebiom.2019.11.016
191. Chang SS, Jiang WW, Smith I, Poeta LM, Begum S, Glazer C, et al. MicroRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2008;123: 2791–2797. doi:10.1002/ijc.23831
192. Sheng S, Su W, Mao D, Li C, Hu X, Deng W, et al. MicroRNA-21 induces cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma. El-Ashram S, editor. *PLoS ONE*. 2022;17: e0267017. doi:10.1371/journal.pone.0267017
193. Hsu C-M, Lin P-M, Wang Y-M, Chen Z-J, Lin S-F, Yang M-Y. Circulating miRNA is a novel marker for head and neck squamous cell carcinoma. *Tumor Biol*. 2012;33: 1933–1942. doi:10.1007/s13277-012-0454-8
194. Irimie-Aghiorghiesei, Pop-Bica, Pinteá, Braicu, Cojocneanu, Zimța, et al. Prognostic Value of MiR-21: An Updated Meta-Analysis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC). *JCM*. 2019;8: 2041. doi:10.3390/jcm8122041

195. Banta A, Bratosin F, Golu I, Toma A-O, Domuta EM. A Systematic Review of Circulating miRNAs Validated by Multiple Independent Studies in Laryngeal Cancer. *Diagnostics*. 2025;15: 394. doi:10.3390/diagnostics15030394
196. Prasad M, Hamsa D, Fareed M, Karobari MI. An update on the molecular mechanisms underlying the progression of miR-21 in oral cancer. *World J Surg Onc*. 2025;23: 73. doi:10.1186/s12957-025-03732-2
197. Komitova KS, Dimitrov LD, Stancheva GS, Kyurkchiyan SG, Petkova V, Dimitrov SI, et al. A Critical Review on microRNAs as Prognostic Biomarkers in Laryngeal Carcinoma. *IJMS*. 2024;25: 13468. doi:10.3390/ijms252413468
198. Chawra HS, Agarwal M, Mishra A, Chandel SS, Singh RP, Dubey G, et al. MicroRNA-21's role in PTEN suppression and PI3K/AKT activation: Implications for cancer biology. *Pathology - Research and Practice*. 2024;254: 155091. doi:10.1016/j.prp.2024.155091
199. Hashemi M, Mirdamadi MSA, Talebi Y, Khaniabad N, Banaei G, Daneii P, et al. Pre-clinical and clinical importance of miR-21 in human cancers: Tumorigenesis, therapy response, delivery approaches and targeting agents. *Pharmacological Research*. 2023;187: 106568. doi:10.1016/j.phrs.2022.106568
200. Jaksic Karisik M, Lazarevic M, Mitic D, Milosevic Markovic M, Riberti N, Jelovac D, et al. MicroRNA-21 as a Regulator of Cancer Stem Cell Properties in Oral Cancer. *Cells*. 2025;14: 91. doi:10.3390/cells14020091
201. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Sig Transduct Target Ther*. 2016;1: 15004. doi:10.1038/sigtrans.2015.4
202. Shah V, Shah J. Recent trends in targeting miRNAs for cancer therapy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2020;72: 1732–1749. doi:10.1111/jphp.13351

BIBLIOGRAFÍA

203. Faramin Lashkarian M, Hashemipour N, Niaraki N, Soghala S, Moradi A, Sarhangi S, et al. MicroRNA-122 in human cancers: from mechanistic to clinical perspectives. *Cancer Cell Int.* 2023;23: 29. doi:10.1186/s12935-023-02868-z
204. Liu Y-H, Liu J-L, Wang Z, Zhu X-H, Chen X-B, Wang M-Q. MiR-122-5p suppresses cell proliferation, migration and invasion by targeting SATB1 in nasopharyngeal carcinoma. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences.* 2019;23: 622–629. doi:10.26355/eurev_201901_16876
205. Tian Y, Zhong L, Gao S, Yu Y, Sun D, Liu X, et al. LncRNA LINC00974 Downregulates miR-122 to Upregulate RhoA in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals.* 2021;36: 18–22. doi:10.1089/cbr.2019.2907
206. Guo L, Yin M, Wang Y. CREB1, a direct target of miR-122, promotes cell proliferation and invasion in bladder cancer. *Oncol Lett.* 2018 [cited 1 May 2025]. doi:10.3892/ol.2018.9118
207. Perez-Añorve IX, Gonzalez-De La Rosa CH, Soto-Reyes E, Beltran-Anaya FO, Del Moral-Hernandez O, Salgado-Albarran M, et al. New insights into radioresistance in breast cancer identify a dual function of miR-122 as a tumor suppressor and oncomiR. *Molecular Oncology.* 2019;13: 1249–1267. doi:10.1002/1878-0261.12483
208. Fan Y, Ma X, Li H, Gao Y, Huang Q, Zhang Y, et al. miR-122 promotes metastasis of clear-cell renal cell carcinoma by downregulating Dicer. *Intl Journal of Cancer.* 2018;142: 547–560. doi:10.1002/ijc.31050
209. Jia L, Wei S, Gong K, Gan Y, Yu G. Prognostic Implications of MicroRNA miR-195 Expression in Human Tongue Squamous Cell Carcinoma. Kim AL, editor. *PLoS ONE.* 2013;8: e56634. doi:10.1371/journal.pone.0056634
210. Wang T, Ren Y, Liu R, Ma J, Shi Y, Zhang L, et al. miR-195-5p Suppresses the Proliferation, Migration, and Invasion of Oral Squamous Cell Carcinoma

- by Targeting TRIM14. *BioMed Research International*. 2017;2017: 1–13. doi:10.1155/2017/7378148
211. Li Z, Wang H, Wang Z, Cai H. MiR-195 inhibits the proliferation of human cervical cancer cells by directly targeting cyclin D1. *Tumor Biol*. 2016;37: 6457–6463. doi:10.1007/s13277-015-4540-6
 212. Shuang Y, Li C, Zhou X, Huang Y-W, Zhang L. Expression of miR-195 in laryngeal squamous cell carcinoma and its effect on proliferation and apoptosis of Hep-2. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21: 3232–3238.
 213. Wang J, Song R, Wang C, Zhang S, Zhang Y, Zhu Y, et al. miR-195 Inhibits Proliferation and Enhances Apoptosis of OSCC Cells via Targeting TLR4. Jain DK, editor. *Journal of Healthcare Engineering*. 2022;2022: 1–6. doi:10.1155/2022/2270777
 214. Yu W, Liang X, Li X, Zhang Y, Sun Z, Liu Y, et al. MicroRNA-195: a review of its role in cancers. *OTT*. 2018;Volume 11: 7109–7123. doi:10.2147/OTT.S183600
 215. Selvi RB, Swaminathan A, Chatterjee S, Shanmugam MK, Li F, Ramakrishnan GB, et al. Inhibition of p300 lysine acetyltransferase activity by luteolin reduces tumor growth in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) xenograft mouse model. *Oncotarget*. 2015;6: 43806–43818. doi:10.18632/oncotarget.6245
 216. Shuang Y, Li C, Zhou X, Huang Y, Zhang L. MicroRNA-195 inhibits growth and invasion of laryngeal carcinoma cells by directly targeting DCUN1D1. *Oncology Reports*. 2017;38: 2155–2165. doi:10.3892/or.2017.5875
 217. Tsai Y-S, Lin C-S, Chiang S-L, Lee C-H, Lee K-W, Ko Y-C. Areca Nut Induces miR-23a and Inhibits Repair of DNA Double-Strand Breaks by Targeting FANCG. *Toxicological Sciences*. 2011;123: 480–490. doi:10.1093/toxsci/kfr182
 218. Bhat MY, Advani J, Rajagopalan P, Patel K, Nanjappa V, Solanki HS, et al. Cigarette smoke and chewing tobacco alter expression of different sets of

BIBLIOGRAFÍA

- miRNAs in oral keratinocytes. *Sci Rep*. 2018;8: 7040. doi:10.1038/s41598-018-25498-2
219. Avissar M, McClean MD, Kelsey KT, Marsit CJ. MicroRNA expression in head and neck cancer associates with alcohol consumption and survival. *Carcinogenesis*. 2009;30: 2059–2063. doi:10.1093/carcin/bgp277
220. Zhang T, Zhu X, Sun Q, Qin X, Zhang Z, Feng Y, et al. Identification and Confirmation of the miR-30 Family as a Potential Central Player in Tobacco-Related Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Front Oncol*. 2021;11: 616372. doi:10.3389/fonc.2021.616372
221. Vageli DP, Doukas PG, Shah R, Boyi T, Liu C, Judson BL. A Novel Saliva and Serum miRNA Panel as a Potential Useful Index for Oral Cancer and the Association of miR-21 with Smoking History: a Pilot Study. *Cancer Prevention Research*. 2023;16: 653–659. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-23-0219
222. Nagadia R, Pandit P, Coman WB, Cooper-White J, Punyadeera C. miRNAs in head and neck cancer revisited. *Cell Oncol (Dordr)*. 2013;36: 1–7. doi:10.1007/s13402-012-0122-4
223. Shi B, Gao H, Zhang T, Cui Q. Analysis of plasma microRNA expression profiles revealed different cancer susceptibility in healthy young adult smokers and middle-aged smokers. *Oncotarget*. 2016;7: 21676–21685. doi:10.18632/oncotarget.7866
224. Deng F, Zhou K, Cui W, Liu D, Ma Y. Clinicopathological significance of wnt/ β -catenin signaling pathway in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8: 3045–3053.
225. Lin G, Sun X-J, Han Q-B, Wang Z, Xu Y-P, Gu J-L, et al. Epidermal growth factor receptor protein overexpression and gene amplification are associated with aggressive biological behaviors of esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology Letters*. 2015;10: 901–906. doi:10.3892/ol.2015.3277

226. Dust K, Carpenter M, Chen JC, Grant C, McCorrister S, Westmacott GR, et al. Human Papillomavirus 16 E6 and E7 Oncoproteins Alter the Abundance of Proteins Associated with DNA Damage Response, Immune Signaling and Epidermal Differentiation. *Viruses*. 2022;14: 1764. doi:10.3390/v14081764
227. Ghittoni R. The role of human papillomaviruses in carcinogenesis. *ecancer*. 2015;9. doi:10.3332/ecancer.2015.526
228. Sritippopho T, Pongsiriwet S, Lertprasertsuke N, Buddhachat K, Sastraruji T, Iamaroon A. p16 - a Possible Surrogate Marker for High-Risk Human Papillomaviruses in Oral Cancer? *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17: 4049–4057.
229. Lajer CB, Nielsen FC, Friis-Hansen L, Norrild B, Borup R, Garnæs E, et al. Different miRNA signatures of oral and pharyngeal squamous cell carcinomas: a prospective translational study. *Br J Cancer*. 2011;104: 830–840. doi:10.1038/bjc.2011.29
230. Lajer CB, Garnæs E, Friis-Hansen L, Norrild B, Therkildsen MH, Glud M, et al. The role of miRNAs in human papilloma virus (HPV)-associated cancers: bridging between HPV-related head and neck cancer and cervical cancer. *Br J Cancer*. 2012;106: 1526–1534. doi:10.1038/bjc.2012.109
231. Nunvar J, Pagacova L, Vojtechova Z, Azevedo NTD de, Smahelova J, Salakova M, et al. Lack of Conserved miRNA Deregulation in HPV-Induced Squamous Cell Carcinomas. *Biomolecules*. 2021;11: 764. doi:10.3390/biom11050764
232. Bai H, Wu S. miR-451: A Novel Biomarker and Potential Therapeutic Target for Cancer. *OTT*. 2019;Volume 12: 11069–11082. doi:10.2147/OTT.S230963
233. Liu N, Jiang N, Guo R, Jiang W, He Q-M, Xu Y-F, et al. MiR-451 inhibits cell growth and invasion by targeting MIF and is associated with survival in

BIBLIOGRAFÍA

- nasopharyngeal carcinoma. *Mol Cancer*. 2013;12: 123. doi:10.1186/1476-4598-12-123
234. Wald AI, Hoskins EE, Wells SI, Ferris RL, Khan SA. Alteration of microRNA profiles in squamous cell carcinoma of the head and neck cell lines by human papillomavirus. *Head Neck*. 2011;33: 504–512. doi:10.1002/hed.21475
235. Sais D, Zhang X, Marques TM, Rose B, Khoury S, Hill M, et al. Human papillomavirus 16 E6 modulates the expression of miR-496 in oropharyngeal cancer. *Virology*. 2018;521: 149–157. doi:10.1016/j.virol.2018.05.022
236. Aguayo F, Perez-Dominguez F, Osorio JC, Oliva C, Calaf GM. PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in HPV-Driven Head and Neck Carcinogenesis: Therapeutic Implications. *Biology*. 2023;12: 672. doi:10.3390/biology12050672
237. Basukala O, Banks L. The Not-So-Good, the Bad and the Ugly: HPV E5, E6 and E7 Oncoproteins in the Orchestration of Carcinogenesis. *Viruses*. 2021;13: 1892. doi:10.3390/v13101892
238. Fujita S, Ito T, Mizutani T, Minoguchi S, Yamamichi N, Sakurai K, et al. miR-21 Gene Expression Triggered by AP-1 Is Sustained through a Double-Negative Feedback Mechanism. *Journal of Molecular Biology*. 2008;378: 492–504. doi:10.1016/j.jmb.2008.03.015
239. Kordic M, Martinovic D, Puizina E, Bozic J, Zubcic Z, Dediol E. Impact of Human Papillomavirus on microRNA-21 Expression in Oral and Oropharyngeal Cancer—A Systematic Review. *IJMS*. 2024;25: 8038. doi:10.3390/ijms25158038
240. Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, Woodworth CD. Papillomavirus Type 16 Oncogenes Downregulate Expression of Interferon-Responsive Genes and Upregulate Proliferation-Associated and NF- κ B-Responsive Genes in Cervical Keratinocytes. *J Virol*. 2001;75: 4283–4296. doi:10.1128/JVI.75.9.4283-4296.2001

241. Peralta-Zaragoza O, Deas J, Meneses-Acosta A, De La O-Gómez F, Fernández-Tilapa G, Gómez-Cerón C, et al. Relevance of miR-21 in regulation of tumor suppressor gene PTEN in human cervical cancer cells. *BMC Cancer*. 2016;16: 215. doi:10.1186/s12885-016-2231-3
242. Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, Hata A. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature*. 2008;454: 56–61. doi:10.1038/nature07086
243. Li Z, Liu J, Li L, Shao S, Wu J, Bian L, et al. Epithelial mesenchymal transition induced by the CXCL9/CXCR3 axis through AKT activation promotes invasion and metastasis in tongue squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2017 [cited 14 Feb 2022]. doi:10.3892/or.2017.6169
244. Huang Y, Gu M, Tang Y, Sun Z, Luo J, Li Z. Systematic review and meta-analysis of prognostic microRNA biomarkers for survival outcome in laryngeal squamous cell cancer. *Cancer Cell Int*. 2021;21: 316. doi:10.1186/s12935-021-02021-8
245. 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;8: 55511–55524. doi:10.18632/oncotarget.19224
246. Patil S, Warnakulasuriya S. Blood-based circulating microRNAs as potential biomarkers for predicting the prognosis of head and neck cancer—a systematic review. *Clin Oral Invest*. 2020;24: 3833–3841. doi:10.1007/s00784-020-03608-7
247. Li J, Zhang X, Tang J, Gong C. MicroRNA-374b-5p Functions as a Tumor Suppressor in Non-Small Cell Lung Cancer by Targeting FOXP1 and Predicts Prognosis of Cancer Patients. *OTT*. 2020;Volume 13: 4229–4237. doi:10.2147/OTT.S243221
248. Bian H, Zhou Y, Zhou D, Zhang Y, Shang D, Qi J. The latest progress on miR-374 and its functional implications in physiological and pathological

BIBLIOGRAFÍA

- processes. *J Cellular Molecular Medi.* 2019;23: 3063–3076. doi:10.1111/jcmm.14219
249. Shi J, Bao X, Liu Z, Zhang Z, Chen W, Xu Q. Serum miR-626 and miR-5100 are Promising Prognosis Predictors for Oral Squamous Cell Carcinoma. *Theranostics.* 2019;9: 920–931. doi:10.7150/thno.30339
250. Liu X-X, Li X-J, Zhang B, Liang Y-J, Zhou C-X, Cao D-X, et al. MicroRNA-26b is underexpressed in human breast cancer and induces cell apoptosis by targeting SLC7A11. *FEBS Letters.* 2011;585: 1363–1367. doi:10.1016/j.febslet.2011.04.018
251. Wu N, Zhao X, Liu M, Liu H, Yao W, Zhang Y, et al. Role of MicroRNA-26b in Glioma Development and Its Mediated Regulation on EphA2. Maas S, editor. *PLoS ONE.* 2011;6: e16264. doi:10.1371/journal.pone.0016264
252. Zhang C, Tong J, Huang G. Nicotinamide Phosphoribosyl Transferase (Nampt) Is a Target of MicroRNA-26b in Colorectal Cancer Cells. El-Rifai W, editor. *PLoS ONE.* 2013;8: e69963. doi:10.1371/journal.pone.0069963
253. Cao J, Guo T, Dong Q, Zhang J, Li Y. miR-26b is downregulated in human tongue squamous cell carcinoma and regulates cell proliferation and metastasis through a COX-2-dependent mechanism. *Oncology Reports.* 2015;33: 974–980. doi:10.3892/or.2014.3648
254. Jia L, Wei S, Gan Y, Guo Y, Gong K, Mitchelson K, et al. Expression, regulation and roles of miR-26a and MEG3 in tongue squamous cell carcinoma. *Intl Journal of Cancer.* 2014;135: 2282–2293. doi:10.1002/ijc.28667
255. Wei Z, Chang K, Fan C, Zhang Y. MiR-26a/miR-26b represses tongue squamous cell carcinoma progression by targeting PAK1. *Cancer Cell Int.* 2020;20: 82. doi:10.1186/s12935-020-1166-6
256. Falco M, Tammaro C, Cossu AM, Takeuchi T, Tufano R, Ceccarelli M, et al. Identification and bioinformatic characterization of a serum miRNA

- signature for early detection of laryngeal squamous cell carcinoma. *J Transl Med.* 2024;22: 647. doi:10.1186/s12967-024-05385-3
257. Ruiman Z, Zhong C, Yihuang C, Huilian Z, Shunjie M, Yunan Z, et al. The simultaneous miR-155-5p overexpression and miR-223-3p inhibition can activate pEMT in oral squamous cell carcinoma. *J Appl Oral Sci.* 2024;32: e20240215. doi:10.1590/1678-7757-2024-0215
 258. Sun C, Liu X-H, Sun Y-R. MiR-223-3p inhibits proliferation and metastasis of oral squamous cell carcinoma by targeting SHOX2. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences.* 2019;23: 6927–6934. doi:10.26355/eurev_201908_18732
 259. Zhang B, Li Y, Hou D, Shi Q, Yang S, Li Q. MicroRNA-375 Inhibits Growth and Enhances Radiosensitivity in Oral Squamous Cell Carcinoma by Targeting Insulin Like Growth Factor 1 Receptor. *Cell Physiol Biochem.* 2017;42: 2105–2117. doi:10.1159/000479913
 260. Kozłowska-Masłoń J, Guglas K, Kolenda T, Lamperska K, Makalowska I. miRNA in head and neck squamous cell carcinomas: promising but still distant future of personalized oncology. *Rep Pract Oncol Radiother.* 2023; VM/OJS/J/96666. doi:10.5603/rpor.96666
 261. Shen Y, Ji M, Huang Q, Hsueh C-Y, Du H, Zhang M, et al. Nicotine downregulates miR-375–3p via neurotrophic tyrosine receptor kinase 2 to enhance the malignant behaviors of laryngopharyngeal squamous epithelial cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2024;274: 116215. doi:10.1016/j.ecoenv.2024.116215
 262. Dioguardi M, Musella G, Bizzoca ME, Sovereto D, Guerra C, Laterza P, et al. The Prognostic Role of miR-375 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review, Meta-Analysis, and Trial Sequential Analysis. *IJMS.* 2025;26: 2183. doi:10.3390/ijms26052183

BIBLIOGRAFÍA

263. Costa-Pinheiro P, Ramalho-Carvalho J, Vieira FQ, Torres-Ferreira J, Oliveira J, Gonçalves CS, et al. MicroRNA-375 plays a dual role in prostate carcinogenesis. *Clin Epigenet*. 2015;7. doi:10.1186/s13148-015-0076-2
264. Saika M, Nakashiro K, Tokuzen N, Shirai H, Uchida D. Possible Role of miR-375-3p in Cervical Lymph Node Metastasis of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Cancers*. 2024;16: 1492. doi:10.3390/cancers16081492
265. Dai F, Xie Z, Yang Q, Zhong Z, Zhong C, Qiu Y. MicroRNA-375 inhibits laryngeal squamous cell carcinoma progression via targeting CST1. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*. 2022;88: S108–S116. doi:10.1016/j.bjorl.2022.06.005
266. Jimenez L, Lim J, Burd B, Harris TM, Ow TJ, Kawachi N, et al. miR-375 Regulates Invasion-Related Proteins Vimentin and L-Plastin. *The American Journal of Pathology*. 2017;187: 1523–1536. doi:10.1016/j.ajpath.2017.02.019
267. Wang B, Lv K, Chen W, Zhao J, Luo J, Wu J, et al. miR-375 and miR-205 Regulate the Invasion and Migration of Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Synergistically via AKT-Mediated EMT. *BioMed Research International*. 2016;2016: 1–11. doi:10.1155/2016/9652789
268. Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, Mutallip M, Sakurai D, Fujimura L, et al. Tumor suppressive microRNA-375 regulates oncogene AEG-1/MTDH in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *J Hum Genet*. 2011;56: 595–601. doi:10.1038/jhg.2011.66
269. Wu Q, Zhao Y, Sun Y, Yan X, Wang P. miR-375 inhibits IFN- γ -induced programmed death 1 ligand $\frac{1}{2}$ 1 surface expression in head and neck squamous cell carcinoma cells by blocking JAK2/STAT1 signaling. *Oncol Rep*. 2018 [cited 22 Apr 2023]. doi:10.3892/or.2018.6177
270. Gómez-Pérez AM, Cornejo Pareja IM, García Alemán J, Coín Aragüez L, Sebastián Ochoa A, Alcaide Torres J, et al. New molecular biomarkers in differentiated thyroid carcinoma: Impact of miR-146, miR-221 and miR-222

- levels in the evolution of the disease. *Clinical Endocrinology*. 2019;91: 187–194. doi:10.1111/cen.13972
271. Shi Z, Johnson JJ, Jiang R, Liu Y, Stack MS. Decrease of miR-146a is associated with the aggressiveness of human oral squamous cell carcinoma. *Archives of Oral Biology*. 2015;60: 1416–1427. doi:10.1016/j.archoralbio.2015.06.007
 272. Ghuwalewala S, Ghatak D, Das S, Roy S, Das P, Butti R, et al. MiRNA-146a/AKT/ β -Catenin Activation Regulates Cancer Stem Cell Phenotype in Oral Squamous Cell Carcinoma by Targeting CD24. *Front Oncol*. 2021;11. doi:10.3389/fonc.2021.651692
 273. Towle R, Dickman CTD, MacLellan SA, Chen J, Prisman E, Guillaud M, et al. Identification of a serum-based microRNA signature that detects recurrent oral squamous cell carcinoma before it is clinically evident. *Br J Cancer*. 2023;129: 1810–1817. doi:10.1038/s41416-023-02405-9
 274. Langevin S, Kuhnell D, Parry T, Biesiada J, Huang S, Wise-Draper T, et al. Comprehensive microRNA-sequencing of exosomes derived from head and neck carcinoma cells *in vitro* reveals common secretion profiles and potential utility as salivary biomarkers. *Oncotarget*. 2017;8: 82459–82474. doi:10.18632/oncotarget.19614
 275. Fu Y, Liu Y, Nasiroula A, Wang Q, Cao X. Long non-coding RNA HCG22 inhibits the proliferation, invasion and migration of oral squamous cell carcinoma cells by downregulating miR-425-5p expression. *Exp Ther Med*. 2022;23: 246. doi:10.3892/etm.2022.11171
 276. Yuan Z, Xiu C, Liu D, Zhou G, Yang H, Pei R, et al. Long noncoding RNA LINC-PINT regulates laryngeal carcinoma cell stemness and chemoresistance through miR-425-5p/PTCH1/SHH axis. *Journal Cellular Physiology*. 2019;234: 23111–23122. doi:10.1002/jcp.28874
 277. Wang Z, Xie W, Guan H. Diverse Functions of MiR-425 in Human Cancer. *DNA and Cell Biology*. 2023;42: 113–129. doi:10.1089/dna.2022.0557

BIBLIOGRAFÍA

278. Zhang T, Liu M, Wang C, Lin C, Sun Y, Jin D. Down-regulation of MiR-206 promotes proliferation and invasion of laryngeal cancer by regulating VEGF expression. *Anticancer Res.* 2011;31: 3859–3863.
279. Mineta H, Miura K, Ogino T, Takebayashi S, Misawa K, Ueda Y, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in head and neck squamous cell carcinomas. *Br J Cancer.* 2000;83: 775–781. doi:10.1054/bjoc.2000.1357
280. Du G, Zhou J, Cheng L, Ma X, Gui Y, Tan B. High Expression of miR-206 Predicts Adverse Outcomes: A Potential Therapeutic Target for Esophageal Cancer. *CCHTS.* 2020;22: 599–611. doi:10.2174/1386207322666191018145825
281. Lv Y, Yang H, Ma X, Wu G. Strand-specific miR-28-3p and miR-28-5p have differential effects on nasopharyngeal cancer cells proliferation, apoptosis, migration and invasion. *Cancer Cell Int.* 2019;19: 187. doi:10.1186/s12935-019-0915-x
282. Sun D, Lee YS, Malhotra A, Kim HK, Matecic M, Evans C, et al. miR-99 Family of MicroRNAs Suppresses the Expression of Prostate-Specific Antigen and Prostate Cancer Cell Proliferation. *Cancer Research.* 2011;71: 1313–1324. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1031
283. Chen Z, Jin Y, Yu D, Wang A, Mahjabeen I, Wang C, et al. Down-regulation of the microRNA-99 family members in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncology.* 2012;48: 686–691. doi:10.1016/j.oraloncology.2012.02.020
284. Nagaraja AK, Creighton CJ, Yu Z, Zhu H, Gunaratne PH, Reid JG, et al. A Link between mir-100 and FRAP1/mTOR in Clear Cell Ovarian Cancer. *Molecular Endocrinology.* 2010;24: 447–463. doi:10.1210/me.2009-0295
285. Wang Q. Downregulation of microRNA 99a in oral squamous cell carcinomas contributes to the growth and survival of oral cancer cells. *Mol Med Report.* 2012 [cited 22 Feb 2022]. doi:10.3892/mmr.2012.971

286. Mueller AC, Sun D, Dutta A. The miR-99 family regulates the DNA damage response through its target SNF2H. *Oncogene*. 2013;32: 1164–1172. doi:10.1038/onc.2012.131
287. Kuo Y-Z, Tai Y-H, Lo H-I, Chen Y-L, Cheng H-C, Fang W-Y, et al. MiR-99a exerts anti-metastasis through inhibiting myotubularin-related protein 3 expression in oral cancer. *Oral Dis*. 2014;20: e65–e75. doi:10.1111/odi.12133
288. Zhang F, Cao H. MicroRNA-143-3p suppresses cell growth and invasion in laryngeal squamous cell carcinoma via targeting the k-Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway. *Int J Oncol*. 2018 [cited 18 Feb 2022]. doi:10.3892/ijo.2018.4655
289. Han L, Tang M, Xu X, Jiang B, Wei Y, Qian H, et al. MiR-143-3p suppresses cell proliferation, migration, and invasion by targeting Melanoma-Associated Antigen A9 in laryngeal squamous cell carcinoma. *J of Cellular Biochemistry*. 2019;120: 1245–1257. doi:10.1002/jcb.27084
290. Guterres AN, Villanueva J. Targeting telomerase for cancer therapy. *Oncogene*. 2020;39: 5811–5824. doi:10.1038/s41388-020-01405-w
291. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011;144: 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
292. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*. 2022;12: 31–46. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059
293. Barczak W, Suchorska WM, Sobecka A, Bednarowicz K, Machczynski P, Golusinski P, et al. hTERT C250T promoter mutation and telomere length as a molecular markers of cancer progression in patients with head and neck cancer. *Molecular Medicine Reports*. 2017;16: 441–446. doi:10.3892/mmr.2017.6590
294. Arantes LMRB, Cruvinel-Carlioni A, De Carvalho AC, Sorroche BP, Carvalho AL, Scapulatempo-Neto C, et al. TERT Promoter Mutation C228T

BIBLIOGRAFÍA

- Increases Risk for Tumor Recurrence and Death in Head and Neck Cancer Patients. *Front Oncol.* 2020;10: 1275. doi:10.3389/fonc.2020.01275
295. Dratwa M, Wysoczańska B, Łacina P, Kubik T, Bogunia-Kubik K. TERT—Regulation and Roles in Cancer Formation. *Front Immunol.* 2020;11: 589929. doi:10.3389/fimmu.2020.589929
296. Shay JW. Are Short Telomeres Predictive of Advanced Cancer? *Cancer Discovery.* 2013;3: 1096–1098. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0506
297. Leão R, Apolónio JD, Lee D, Figueiredo A, Tabori U, Castelo-Branco P. Mechanisms of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) regulation: clinical impacts in cancer. *J Biomed Sci.* 2018;25: 22. doi:10.1186/s12929-018-0422-8
298. Barthel FP, Wei W, Tang M, Martinez-Ledesma E, Hu X, Amin SB, et al. Systematic analysis of telomere length and somatic alterations in 31 cancer types. *Nat Genet.* 2017;49: 349–357. doi:10.1038/ng.3781
299. Fu X, Shen C, Wang H, Chen F, Li G, Wen Z. Joint quantitative measurement of hTERT mRNA in both peripheral blood and circulating tumor cells of patients with nasopharyngeal carcinoma and its clinical significance. *BMC Cancer.* 2017;17: 479. doi:10.1186/s12885-017-3471-6
300. McCaul JA, Gordon KE, Clark LJ, Parkinson EK. Telomerase inhibition and the future management of head-and-neck cancer. *The Lancet Oncology.* 2002;3: 280–288. doi:10.1016/S1470-2045(02)00729-5
301. Liao C-T, Tung-Chieh Chang J, Wang H-M, Chen I-H, Lin C-Y, Chen T-M, et al. Telomerase as an independent prognostic factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2004;26: 504–512. doi:10.1002/hed.20007
302. Ganesh MS, Narayanan GS, Kumar R. Change of telomerase activity in peripheral blood of patients with head and neck squamous cell carcinoma pre and post curative treatment. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy.* 2020;25: 28–34. doi:10.1016/j.rpor.2019.10.011

303. Hong D-Y, Lee B-J, Lee J-C, Choi J-S, Wang S-G, Ro J-H. Expression of VEGF, HGF, IL-6, IL-8, MMP-9, Telomerase in Peripheral Blood of Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2009;2: 186. doi:10.3342/ceo.2009.2.4.186
304. Luzar B, Poljak M, Marin IJ, Gale N. Telomerase Reactivation Is an Early Event in Laryngeal Carcinogenesis. *Mod Pathol*. 2003;16: 841–848. doi:10.1097/01.MP.0000086488.36623.27
305. Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz LA, et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110: 6021–6026. doi:10.1073/pnas.1303607110
306. Luzar B, Poljak M, Gale N. Telomerase catalytic subunit in laryngeal carcinogenesis—an immunohistochemical study. *Mod Pathol*. 2005;18: 406–411. doi:10.1038/modpathol.3800275
307. Terrin L, Rampazzo E, Pucciarelli S, Agostini M, Bertorelle R, Esposito G, et al. Relationship Between Tumor and Plasma Levels of hTERT mRNA in Patients with Colorectal Cancer: Implications for Monitoring of Neoplastic Disease. *Clinical Cancer Research*. 2008;14: 7444–7451. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0478
308. March-Villalba JA, Martínez-Jabaloyas JM, Herrero MJ, Santamaria J, Aliño SF, Dasí F. Cell-Free Circulating Plasma hTERT mRNA Is a Useful Marker for Prostate Cancer Diagnosis and Is Associated with Poor Prognosis Tumor Characteristics. Medeiros R, editor. *PLoS ONE*. 2012;7: e43470. doi:10.1371/journal.pone.0043470
309. Kang Y, Zhang J, Sun P, Shang J. Circulating cell-free human telomerase reverse transcriptase mRNA in plasma and its potential diagnostic and prognostic value for gastric cancer. *Int J Clin Oncol*. 2013;18: 478–486. doi:10.1007/s10147-012-0405-9

BIBLIOGRAFÍA

310. Rai A, Naikmasur VG, Sattur A. Quantification of telomerase activity in normal oral mucosal tissue and oral squamous cell carcinoma. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*. 2016;37: 183–188. doi:10.4103/0971-5851.190350
311. Boscolo-Rizzo P, Rampazzo E, Polesel J, Giunco S, Menegaldo A, Mantovani M, et al. Predictive and prognostic significance of telomerase levels/telomere length in tissues and peripheral blood in head and neck squamous cell carcinoma. *Sci Rep*. 2019;9: 17572. doi:10.1038/s41598-019-54028-x
312. Lee YS, Tae K, Lee SH, Cho SH, Jeong JH, Min HJ, et al. Change of telomerase activity in peripheral whole blood of head and neck squamous cell carcinoma patients before and after surgery: a pilot study. *Clin Transl Oncol*. 2011;13: 747–752. doi:10.1007/s12094-011-0727-5
313. Xian S, Dosset M, Castro A, Carter H, Zanetti M. Transcriptional analysis links B cells and TERT expression to favorable prognosis in head and neck cancer. Metallo C, editor. *PNAS Nexus*. 2023;2: pgad046. doi:10.1093/pnasnexus/pgad046
314. Wallace NA, Galloway DA. Novel Functions of the Human Papillomavirus E6 Oncoproteins. *Annu Rev Virol*. 2015;2: 403–423. doi:10.1146/annurev-virology-100114-055021
315. Martínez P, Blasco MA. Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nat Rev Cancer*. 2011;11: 161–176. doi:10.1038/nrc3025
316. Gewin L, Myers H, Kiyono T, Galloway DA. Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev*. 2004;18: 2269–2282. doi:10.1101/gad.1214704
317. Katzenellenbogen RA, Vliet-Gregg P, Xu M, Galloway DA. NFX1-123 Increases hTERT Expression and Telomerase Activity Posttranscriptionally

- in Human Papillomavirus Type 16 E6 Keratinocytes. *J Virol*. 2009;83: 6446–6456. doi:10.1128/JVI.02556-08
318. Taberna M, Mena M, Pavón MA, Alemany L, Gillison ML, Mesía R. Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer. *Annals of Oncology*. 2017;28: 2386–2398. doi:10.1093/annonc/mdx304
 319. Luginbuhl A, Sanders M, Spiro JD. Prevalence, Morphology, and Prognosis of Human Papillomavirus in Tonsillar Cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2009;118: 742–749. doi:10.1177/000348940911801010
 320. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*. 2011;11: 426–437. doi:10.1038/nrc3066
 321. El-Mazny A, Sayed M, Sharaf S. Human telomerase reverse transcriptase messenger RNA (TERT mRNA) as a tumour marker for early detection of hepatocellular carcinoma. *Arab Journal of Gastroenterology*. 2014;15: 68–71. doi:10.1016/j.ajg.2014.04.001
 322. Perhavec A, Cerkovnik P, Novakovic S, Zgajnar J. The hTERT mRNA in plasma samples of early breast cancer patients, non-cancer patients and healthy individuals. *Neoplasma*. 2008;55: 549–554.
 323. Pelosi G, Schianchi E, Dell’Orto P, Veronesi G, Spaggiari L, Pasini F, et al. Detecting cell-free circulating hTERT mRNA in the plasma may identify a subset of nonsmall cell lung cancer patients. *Virchows Arch*. 2006;448: 7–15. doi:10.1007/s00428-005-0087-z
 324. Koscielny S, Eggeling FV, Dahse R, Fiedler W. The influence of reactivation of the telomerase in tumour tissue on the prognosis of squamous cell carcinomas in the head and neck. *J Oral Pathology Medicine*. 2004;33: 538–542. doi:10.1111/j.1600-0714.2004.00232.x
 325. Fajkus J, Koppová K, Kunická Z. Dual-color real-time telomeric repeat amplification protocol. *Biotechniques*. 2003;35: 912–914.

BIBLIOGRAFÍA

326. Fajkus J. Detection of telomerase activity by the TRAP assay and its variants and alternatives. *Clinica Chimica Acta*. 2006;371: 25–31. doi:10.1016/j.cca.2006.02.039
327. García-Olmo DC, Contreras JD, Picazo MG, López-Torres J, García-Olmo D. Potential clinical significance of perioperative levels of mRNA in plasma from patients with cancer of the larynx or hypopharynx: Liquid biopsy in laryngeal cancer. *Head Neck*. 2017;39: 647–655. doi:10.1002/hed.24638

8. ANEXOS

8. ANEXOS

Anexo 1 – Clasificación T siguiendo la 8ª versión de la Clasificación TNM de la AJCC actualizada en 2017.

1a.

	CAVIDAD ORAL	OROFARINGE P16 +	OROFARINGE P16-
T0		Tumor primario no identificable.	
TX	Tumor primario no evaluable.		Tumor primario no evaluable.
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> .		Carcinoma <i>in situ</i> .
T1	Tumor que mide ≤2 cm con DOI: ≤5 mm.	T1 = tumor que mide ≤2 cm en su mayor dimensión.	T1 = tumor que mide ≤2 cm en su mayor dimensión.
T1a			
T1b			
T2	Tumor que mide ≤2 cm con DOI: >5 mm o tumor que mide entre >2 cm y ≤4 cm con DOI: ≤10 mm.	T2 = tumor que mide >2 cm, pero ≤4 cm en su mayor dimensión.	T2 = tumor que mide >2 cm, pero ≤4 cm en su mayor dimensión.
T3	Tumor >2 cm y ≤4 cm con DOI: >10 mm o tumor que mide >4 cm con DOI: ≤10 mm.	T3 = tumor que mide >4 cm en su mayor dimensión o se diseminó a la superficie lingual de la epiglotis.	T3 = tumor que mide >4 cm en su mayor dimensión o se diseminó a la superficie lingual de la epiglotis.
T4	Enfermedad local moderadamente avanzada o muy avanzada.	Enfermedad local moderadamente avanzada. Tumor con invasión de la laringe, el músculo extrínseco de la lengua, el músculo pterigoideo medio, el paladar duro, el maxilar inferior o de otras partes.	Enfermedad local moderadamente avanzada o muy avanzada.
T4a	Enfermedad local moderadamente avanzada. Tumor que mide >4 cm con DOI: >10 mm o tumor con invasión solo de estructuras adyacentes (por ejemplo, a través del hueso cortical de la mandíbula o el maxilar superior o compromete el seno maxilar o la piel de la cara).		Enfermedad local moderadamente avanzada. Tumor con invasión de la laringe, el músculo extrínseco de la lengua, el músculo pterigoideo medio, el paladar duro o el maxilar inferior.
T4b	Enfermedad local muy avanzada. Tumor con invasión del espacio masticatorio, las placas pterigoideas, la base del cráneo, o atrapamiento de la arteria carótida interna.		-T4b = enfermedad local muy avanzada. Tumor con invasión del músculo pterigoideo lateral, las placas pterigoideas, la nasofaringe lateral, la base del cráneo; o atrapamiento de la arteria carótida.

1b.

	HIPOFARINGE	SUPRAGLOTIS	GLOTIS
T0			
TX	Tumor primario no evaluable.	Tumor primario no evaluable.	Tumor primario no evaluable.
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> .	Carcinoma <i>in situ</i> .	Carcinoma <i>in situ</i> .
T1	Tumor que se limita a un subsitio de la hipofaringe o mide ≤ 2 cm en su mayor dimensión.	Tumor limitado a un subsitio de la supraglotis, con movilidad normal de las cuerdas vocales.	Tumor limitado a una o ambas cuerdas vocales (a veces con compromiso de la comisura anterior o posterior) con movilidad normal.
T1a			T1a: Tumor limitado a una cuerda vocal.
T1b			T1b: Tumor con compromiso de ambas cuerdas vocales.
T2	Tumor con invasión de más de un subsitio de la hipofaringe o de un sitio adyacente, o mide > 2 cm pero ≤ 4 cm en su mayor dimensión sin fijación de la hemilaringe.	Tumor con invasión de la mucosa en más de un subsitio adyacente de la supraglotis o la glotis, o invasión de una región fuera de la supraglotis (por ejemplo, la mucosa de la base de la lengua, la valécula, la pared media del seno piriforme) sin fijación de la laringe.	Tumor con diseminación a la supraglotis o la subglotis, o con deterioro de la movilidad de las cuerdas vocales.
T3	Tumor que mide > 4 cm en su mayor dimensión, con fijación de la hemilaringe o diseminación a la mucosa del esófago.	Tumor limitado a la laringe, con fijación de una cuerda vocal o invasión de cualquiera de los siguientes sitios: área poscricoidea, espacio preepiglótico, espacio paraglótico o corteza interna del cartílago tiroideos.	Tumor limitado a la laringe, con fijación de una cuerda vocal o invasión del espacio paraglótico o de la corteza interna del cartílago tiroideos.
T4	Enfermedad local moderadamente avanzada o muy avanzada.	Enfermedad moderadamente avanzada o muy avanzada.	Enfermedad moderadamente avanzada o muy avanzada.
T4a	Enfermedad local moderadamente avanzada. Tumor con invasión del cartílago tiroideos o cricoides, el hueso hioides, la glándula tiroidea, el músculo esofágico o el tejido blando del compartimiento central.	Enfermedad local moderadamente avanzada. Tumor con invasión de la corteza externa del cartílago tiroideos o invasión de tejidos fuera de la laringe (por ejemplo, la tráquea, los tejidos blandos del cuello como el músculo extrínseco profundo de la lengua, los músculos infrahioides, la tiroideos o el esófago).	Enfermedad local moderadamente avanzada. Tumor con invasión de la corteza externa del cartílago tiroideos o invasión de tejidos fuera de la laringe (por ejemplo, la tráquea, el cartílago cricoides, los tejidos blandos del cuello como el músculo extrínseco profundo de la lengua, los músculos infrahioides, la tiroideos o el esófago).
T4b	Enfermedad local muy avanzada. Tumor con invasión de la fascia prevertebral, atrapamiento de la arteria carótida o compromiso de las estructuras mediastínicas.	Enfermedad local muy avanzada. Tumor con invasión del espacio prevertebral, atrapamiento de la arteria carótida o invasión de estructuras mediastínicas.	Enfermedad local muy avanzada. Tumor con invasión del espacio prevertebral, atrapamiento de la arteria carótida o invasión de estructuras mediastínicas.

Anexo 2 – Clasificación N siguiendo la 8ª versión de la Clasificación TNM de la AJCC actualizada en 2017.

2a.

	CAVIDAD ORAL PATOLÓGICO	OROFARINGE P16 + CLÍNICO	OROFARINGE P16- CLÍNICO	HIPOFARINGE CLÍNICO	HIPOFARINGE PATOLÓGICO
NX	Ganglios linfáticos regionales no evaluables.	Ganglios linfáticos regionales no evaluables.	Ganglios linfáticos regionales no evaluables.	Ganglios linfáticos regionales no evaluables.	Ganglios linfáticos regionales no evaluables.
N0	Sin metástasis en ganglios linfáticos regionales.	Sin metástasis en ganglios linfáticos regionales.	Sin metástasis en ganglios linfáticos regionales.	Sin metástasis en ganglios linfáticos regionales.	Sin metástasis en ganglios linfáticos regionales.
N1	Metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral, que mide ≤3 cm en su mayor dimensión y ENE-.	Uno o más ganglios linfáticos ipsilaterales, ninguno mide >6 cm.	Metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral, que mide ≤3 cm en su mayor dimensión y ENE-.	Metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral que mide ≤3 cm en su mayor dimensión y ENE-.	Metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral que mide ≤3 cm en su mayor dimensión y ENE-.
N2	Metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral que mide ≤3 cm en su mayor dimensión y ENE+; o mide >3 cm pero ≤6 cm en su mayor dimensión y ENE-; o metástasis en múltiples ganglios linfáticos ipsilaterales, ninguno mide >6 cm en su mayor dimensión y ENE-; o metástasis en uno o más ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales ninguno mide >6 cm en su mayor dimensión, y ENE-.	Ganglios linfáticos contralaterales o bilaterales, ninguno mide >6 cm.	Metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral que mide >3 cm pero ≤6 cm en su mayor dimensión y ENE-; o metástasis en múltiples ganglios linfáticos ipsilaterales, ninguno mide >6 cm en su mayor dimensión y ENE-; o metástasis en ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales, ninguno mide >6 cm en su mayor dimensión y ENE-.	Metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral que mide >3 cm pero ≤6 cm en su mayor dimensión y ENE-; o metástasis en múltiples ganglios linfáticos ipsilaterales, ninguno mide >6 cm en su mayor dimensión y ENE-; o metástasis en ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales, ninguno mide >6 cm en su mayor dimensión y ENE-.	Metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral que mide ≤3 cm en su mayor dimensión y ENE+; o mide >3 cm pero ≤6 cm en su mayor dimensión y ENE-; o metástasis en múltiples ganglios linfáticos ipsilaterales, ninguno mide >6 cm en su mayor dimensión y ENE-; o metástasis en uno o más ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales ninguno mide >6 cm en su mayor dimensión, y ENE-.
N2a	Metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral que mide ≤3 cm en su mayor dimensión y ENE+; o metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral que mide >3 cm pero ≤6 cm en su mayor dimensión y ENE-.		Metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral que mide >3 cm, pero ≤6 cm en su mayor dimensión y ENE-.	Metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral que mide >3 cm pero ≤6 cm en su mayor dimensión y ENE-.	Metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral que mide ≤3 cm en su mayor dimensión y ENE+; o metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral que mide >3 cm pero ≤6 cm en su mayor dimensión y ENE-.
N2b	Metástasis en múltiples ganglios linfáticos ipsilaterales, ninguno mide >6 cm en su mayor dimensión y ENE-.		Metástasis en múltiples ganglios linfáticos ipsilaterales, ninguno mide >6 cm en su mayor dimensión y ENE-.	Metástasis en múltiples ganglios linfáticos ipsilaterales, ninguno mide >6 cm en su mayor dimensión y ENE-.	Metástasis en múltiples ganglios linfáticos ipsilaterales, ninguno mide >6 cm en su mayor dimensión y ENE-.
N2c	Metástasis en ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales, ninguno mide >6 cm en su mayor dimensión y ENE-.		Metástasis en ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales, ninguno mide >6 cm en su mayor dimensión y ENE-.	Metástasis en ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales, ninguno mide >6 cm en su mayor dimensión y ENE-.	Metástasis en ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales, ninguno mide >6 cm en su mayor dimensión y ENE-.
N3	Metástasis en un ganglio linfático que mide >6 cm en su mayor dimensión y ENE-; o metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral que mide >3 cm en su mayor dimensión y ENE+; o metástasis en múltiples ganglios linfáticos ipsilaterales, contralaterales o bilaterales y cualquiera con ENE+; o metástasis en un solo ganglio linfático contralateral de cualquier tamaño y ENE+.	Uno o más ganglios linfáticos que miden >6 cm.	Metástasis en un ganglio linfático que mide >6 cm en su mayor dimensión y ENE-; o metástasis en uno o más ganglios linfáticos y ENE+ manifiesta desde el punto de vista clínico.	Metástasis en un ganglio linfático que mide >6 cm en su mayor dimensión y ENE-; o metástasis en uno o más ganglios linfáticos y ENE+ manifiesta desde el punto de vista clínico.	Metástasis en un ganglio linfático que mide >6 cm en su mayor dimensión y ENE-; o metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral que mide >3 cm en su mayor dimensión y ENE+; o metástasis en múltiples ganglios linfáticos ipsilaterales, contralaterales o bilaterales, cualquiera con ENE+; o metástasis en un solo ganglio linfático contralateral de cualquier tamaño y ENE+.
N3a	Metástasis en un ganglio linfático que mide >6 cm en su mayor dimensión y ENE-.		Metástasis en un ganglio linfático que mide >6 cm en su mayor dimensión y ENE-.	Metástasis en un ganglio linfático que mide >6 cm en su mayor dimensión y ENE-.	Metástasis en un ganglio linfático que mide >6 cm en su mayor dimensión y ENE-.
N3b	Metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral que mide >3 cm en su mayor dimensión y ENE+; o metástasis en múltiples ganglios linfáticos ipsilaterales, contralaterales o bilaterales y cualquiera con ENE+; o metástasis en un solo ganglio linfático contralateral de cualquier tamaño y ENE+.		Metástasis en uno o más ganglios linfáticos con ENE+ manifiesta desde el punto clínico.	Metástasis en uno o más ganglios linfáticos con ENE+ manifiesta desde el punto de vista clínico.	Metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral que mide >3 cm en su mayor dimensión y ENE+; o metástasis en múltiples ganglios linfáticos ipsilaterales, contralaterales o bilaterales, cualquiera con ENE+; o metástasis en un solo ganglio linfático contralateral de cualquier tamaño y ENE+.

ANEXOS

2b.

[illegible]

Anexo 3 –MiARNs incluidos en la revisión para diagnóstico, pronóstico y respuesta al tratamiento en pacientes con CECC.

Autor, año	Tipo cáncer	microARN	Sobre/infrarregulado	Pacientes incluidos	Tipo muestra	Objetivo estudio
Lu, 2019 (5)	CECC	miR-548k, miR-3619, miR-137, miR-3170	SOBRE	525 CECC	Tejido	Pronóstico
		miR-654, miR-99a, miR-499a	INFRA	44 Tejido adyacente normal		
Schneider, 2018 (26)	CEO	miR-31-3p, miR-424-5p, miR-196b-5p, miR-877-5p, miR-7-5p, miR-135b-5p, miR-31-5p, miR-142-3p, miR-187-3p, miR-19a-3p, miR-708-3p, miR-223-3p, miR-32-5p, miR-18a-5p, miR-301a-3p, miR-21-5p, miR-455-5p, miR-92b-3p, miR-21-3p, miR-142-5p, miR-944, miR-20a-5p	SOBRE	5 CEO	Tejido	Identificar microARNs en muestras tisulares de CEO comparándolos con un tejido adyacente sano y verificar la presencia de los mismos microARNs en suero
		miR-204-5p, miR-375, miR-4497, miR-1291, miR-4492, miR-3196, miR-6087, miR-4508, miR-4485-3p, miR-3195, miR-3687, miR-3648, miR-6510-3p, miR-4516, miR-7704, miR-3656, miR-4532, miR-4488, miR-99a-3p, miR-125b-5p, miR-139-5p, miR-3651, miR-125b-2-3p, miR-99a-5p	INFRA		Serum	
Martinez, 2015 (27)	CECC	miR-205-5p, miR-145-5p, miR-27b-5p, miR-103a-3p, miR-107, miR-320a, miR-320b, miR-486-5p, miR-100-5p, miR-32-5p, miR-215-5p, miR-148a-5p, miR-99a-5p	SOBRE	7 CECC	Serum	Caracterización de ARN pequeños circulantes.
		miR-191-5p, miR-26a-5p, miR-181a-5p, miR-150-5p, miR-93-5p, miR-30c-5p, miR-28-5p, miR-26b-5p, miR-30b-5p, miR-122-5p, miR-98-5p, miR-183-5p, miR-224-5p	INFRA	7 Controles		
Wang, 2016 (28)	CEL	miR-155	SOBRE	280 CEL	Tejido	Predecir características clínicas Diagnóstico
				560 Controles	Plasma	
Avissar, 2009 (30)	CECC	miR-21, miR-18a, miR-221	SOBRE	99 CECC	Tejido	Diagnóstico
		miR-375	INFRA	14 Controles		
Zahran, 2015 (33)	CEO	miR-21, miR-184	SOBRE	20 CEO	Saliva	Diagnóstico
		miR-145	INFRA	40 lesiones potencialmente malignas 20 Controles sanos		

ANEXOS

Autor, año	Tipo cáncer	microARN	Sobre/infrarregulado	Pacientes incluidos	Tipo muestra	Objetivo estudio
				20 Estomatitis aftosa recurrente		
Barker, 2009 (34)	Primario desconocido CECC	miR-155, miR-103, miR-191 Other microARNs related to subsite	SOBRE	12 CECC de origen desconocido	Tejido	Descubrir tumor primario
Hui, 2010 (35)	CECC	miR-21, miR-155, miR-142-3p miR-125b, miR-375	SOBRE INFRA	51 CECC	Tejido	Diagnóstico Respuesta a tratamiento
Avissar, 2009 (43)	CECC	miR-375, miR-21	SOBRE	169 CECC	Tejido	Expresión Factores de riesgo
Chen, 2019 (52)	CELi	miR-611	SOBRE	60 CELingual 60 Tejido normal adyacente	Tejido	Mecanismos oncogénicos
Lajer, 2012 (57)	CEOF Cáncer de cervix	miR-10, miR-15a, miR-20b, miR-16 miR-139-3p, miR-143, miR-145, miR-381, miR-574-3p	SOBRE INFRA	20 CEOF 10 Amígdalas sanas 16 Cáncer cervix 16 Controles cervix	Tejido	Comparar expression de microARN expression en VPH +/-
Vojtechova, 2016 (59)	CEOF	HPV + miR-141-3p, miR-15b-5p, miR-200a-3p, miR-302c-3p, miR-9-5p, miR-335-5p, miR-579-3p miR-126-5p HPV – miR-34c-3p miR-328-3p, miR-885-5p	SOBRE INFRA SOBRE INFRA	87 Pacientes 5 Controles	Tejido	Comparar perfiles VPH +/-
Ren, 2014 (62)	CEO	miR-21	SOBRE	58 CEO 32 Controles	Sangre	Diagnóstico
Wang, 2014 (63)	CEL	miR-21	SOBRE	52 CEL 49 Controles	Suero exosomas	Diagnóstico Pronóstico
Pedersen, 2018 (64)	CEO	TEJIDO miR-193b-5p, miR-193-3p, miR-370-3p, miR-1307-5p, miR-671-5p, miR-769-5p miR-204, miR-144-5p, miR-30a-5p	INFRA SOBRE	TEJIDO - 80 CEO - 8 mucosa oral sana	Tejido	Diagnóstico Respuesta a tratamiento

Autor, año	Tipo cáncer	microARN	Sobre/infrarregulado	Pacientes incluidos	Tipo muestra	Objetivo estudio
		PLASMA miR-30a-5p, miR-769-5p, miR-370-3p, miR-144-5p	INFRA	PLASMA - 55 CEO - 18 Controles	Plasma	
Prasad, 2017 (65)	CEO	miR-21	SOBRE	20 CEO 20 Controles	Tejido	Diagnóstico
		miR-24, miR-26b, miR-155	INFRA	10 Displasia leve 10 Displasia moderada/severa 10 Liqueen plano oral		
Popov, 2022 (66)	CEL	miR-93-5p, miR-210-3p, miR-1260b, miR-130b-3p, miR-181b-5p, miR-21-3p, miR-31-3p, miR-31-5p, miR-4687-3p, miR-6786-5p	SOBRE	60 CEL	Tejido	Pronóstico
		miR-144-3p, miR-145-5p	INFRA			
Wang, 2022 (67)	CECC	miR-1229-3p, miR-1267, miR-1268b, miR-1286	SOBRE	NO especificado	Tejido	Pronóstico
		miR-135b-3p, miR-148a-3p, miR-148b-3p, miR-150-5p, miR-16-1-3p, miR-181c-5p	INFRA			
Lapa, 2019 (68)	CEL	miR-92a-3p	SOBRE	36 Pacientes	Tejido	Pronóstico
		miR-199b-5p, miR-29c-3p, miR-204-5p, miR-125b-5p	INFRA	5 Controles		
Liu, 2010 (69)	CEO	mi-31	SOBRE	PLASMA - 43 CEO - 21 Controles	Plasma Saliva	Diagnóstico Respuesta a cirugía
				SALIVA - 9 CEO - 8 Controles		
De Cecco, 2017 (70)	CECC	miR-760, miR-4259, miR-4733-5p, miR-371-5p, miR-2392	SOBRE	40	Tejido	Respuesta a tratamiento con Cetuximab
		miR-21, miR-199b-5p, miR-199a-3p, miR-34a, miR-16, miR-140-5p, miR-15b, miR-28-5p, miR-152, miR-15a, miR-199a-5p, miR-29a, miR-126, miR-214, miR-130b, miR-140-3p, miR-10b	INFRA			
Summerer, 2015 (71)	CECC	miR-142-3p, miR-186-5p, miR-195-5p, miR-374b-5p, miR-574-3p	SOBRE	18	Plasma	Pronóstico

Anexo 4. Protocolo de extracción de ARN mediante el kit miRNeasy Serum/Plasma (Qiagen N.V., Hilden, Alemania).

Quick-Start Protocol

April 2022

miRNeasy Serum/Plasma Kit

The miRNeasy Serum/Plasma Kit (cat. no. 217184) is shipped at ambient temperature. Store the RNeasy® MinElute® spin columns immediately at 2–8°C. QIAzol® Lysis Reagent can be stored at room temperature (15–25°C) or at 2–8°C. Store the remaining components dry at room temperature. All kit components are stable for at least 9 months under these conditions if not otherwise stated on label.

Further information

- *miRNeasy Serum/Plasma Handbook*: www.qiagen.com/HB-1002
- Safety Data Sheets: www.qiagen.com/safety
- Technical assistance: support.qiagen.com

Notes before starting

- This protocol is for purifying total RNA, including small RNAs, from small volumes (up to 200 µl) of serum, plasma, or other body fluids.
 - If necessary, redissolve any precipitate in Buffer RWT by warming.
 - Except for phase separation (step 6), all steps should be performed at room temperature (15–25°C). Work quickly.
 - Add ethanol (96–100%) to Buffer RWT and Buffer RPE concentrates before use (see bottle label for volume).
 - Before starting with step 1 for the first time, read the recommendations for preparing serum or plasma in the *miRNeasy Serum/Plasma Handbook*.
1. Prepare serum or plasma, or thaw frozen samples.
 2. Add 5 volumes QIAzol Lysis Reagent to the sample (e.g., for 200 µl sample, add 1 ml QIAzol Lysis Reagent). Mix by vortexing or pipetting up and down.
 3. Incubate the homogenate at room temperature (15–25°C) for 5 min.

— Sample to Insight —

4. Add chloroform of an equal volume to the starting sample and cap tube securely (e.g., for 200 μ l sample, add 200 μ l chloroform). Shake vigorously for 15 s.
5. Incubate at room temperature for 2–3 min.
6. Centrifuge for 15 min at 12,000 $\times g$ at 4°C.
7. Transfer the upper aqueous phase to a new collection tube (not supplied). Avoid transferring any interphase. Add 1.5 volumes of 100% ethanol (e.g., for 600 μ l aqueous phase, add 900 μ l ethanol). Mix thoroughly by pipetting.
8. Pipet up to 700 μ l sample, including any precipitate, into an RNeasy MinElute spin column in a 2 ml collection tube. Close the lid and centrifuge at $\geq 8000 \times g$ for 15 s at room temperature. Discard the flow-through.
9. Repeat step 8 using the remainder of the sample.
10. Add 700 μ l Buffer RWT to the RNeasy MinElute spin column. Close the lid, and centrifuge for 15 s at $\geq 8000 \times g$. Discard the flow-through.
11. Pipet 500 μ l Buffer RPE onto the RNeasy MinElute spin column. Close the lid, and centrifuge for 15 s at $\geq 8000 \times g$. Discard the flow-through.
12. Add 500 μ l of 80% ethanol to the RNeasy MinElute spin column. Close the lid, and centrifuge for 2 min at $\geq 8000 \times g$. Discard the flow-through and the collection tube.
13. Place the RNeasy MinElute spin column in a new 2 ml collection tube (supplied). Open the lid of the spin column and centrifuge at full speed for 5 min to dry the membrane. Discard the flow-through and the collection tube.
14. Place the RNeasy MinElute spin column in a new 1.5 ml collection tube (supplied). Add 14 μ l RNase-free water directly to the center of the spin column membrane. Close the lid gently, and centrifuge for 1 min at full speed to elute the RNA.



Scan QR code for handbook.

For up-to-date licensing information and product-specific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual. Trademarks: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAzol®, MinElute®, RNeasy® (QIAGEN Group). Registered names, trademarks, etc. used in this document, even when not specifically marked as such, are not to be considered unprotected by law.

1127637 04/2022 HB-0982-003 © 2022 QIAGEN, all rights reserved.

Anexo 5. Protocolo de retrotranscripción inversa utilizando el kit de síntesis de ADNc Transcriptor High Fidelity (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA).

2. How to Use this Product

2.2. Protocols

Standard Procedure for Qualitative RT-PCR

The following conditions describe a first-strand cDNA synthesis for a two-step RT-PCR. Fig. 1a shows a flow-diagram of the standard procedure for cDNA synthesis with anchored-oligo (dT)₁₈ primer or random hexamer primer for qualitative RT-PCR.

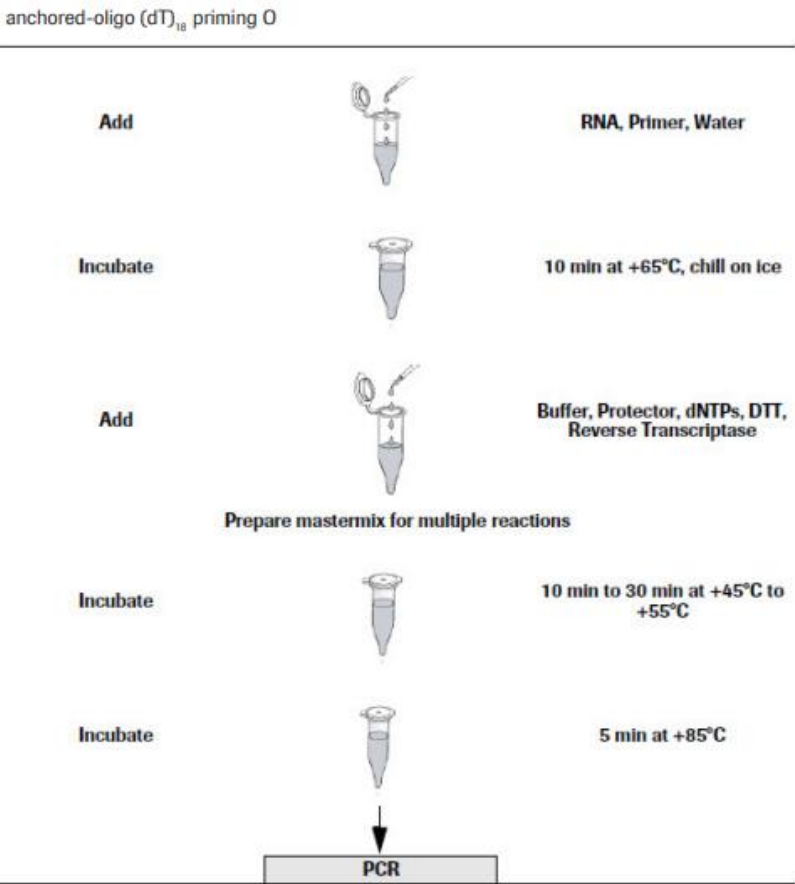


Fig. 1a: Overview of cDNA synthesis procedures in single and multiple reactions

2. How to Use this Product

Reverse transcription using either anchored-oligo (dT)₁₈ priming OR random hexamer priming.

i In the major cases, cDNA is generated with only one sort of primers.

- 1 Thaw the components listed below and place them on ice.
- 2 Briefly centrifuge all reagents before setting up the reactions.
- 3 Set up the reaction components in a nuclease free microcentrifuge tube placed on ice

Reagent	Volume	Final conc.
total RNA	variable	1 ng up to 4 µg ¹⁾
Primer -choose either		
Anchored-oligo(dT)18 Primer, 50 pmol/ml (vial 5)	1 µl	2,5 µM
OR Random Hexamer Primer, 600 pmol/ml (vial 6)	2 µl	60 µM
Water, PCR Grade (vial 8)	variable	
Total	11,4 µl	

1) When working with low concentrated RNA samples (< 10 µg/ml), add 10 µg/ml MS2 RNA* to stabilize the template RNA.

- 4 Mix the reagents and centrifuge briefly to collect the sample at the bottom of the tube.
 - 5 Denature the template-primer mixture by heating the tube for 10 minutes at +65°C in a block cycler with a heated lid (to minimize evaporation). This step ensures denaturation of RNA secondary structures.
 - 6 Immediately cool the tube on ice.
 - 7 To the tube containing the template-primer mix, add the remaining components of the RT mix in the order listed below.
- i* There is also the possibility to prepare master mix for multiple reactions.

Reagent	Volume	Final conc.
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5x conc. (vial 2)	4 µl	1x 8 mM MgCl ₂
Protector RNase Inhibitor, 40 U/ml (vial 3)	0,5 µl	20 U
Deoxynucleotide Mix, 10 mM each (vial 4)	2 µl	1 mM each
DTT (vial 7)	1 µl	5 mM
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase (vial 1)	1,1 µl	22 U
Total	20 µl	

- 9 Mix the reagents in the tube carefully and centrifuge briefly to collect the sample at the bottom of the tube.
- 10 Place the tube in a block cycler with heated lid (to minimize evaporation)

2. How to Use this Product

- 11 Incubate the reaction for 10 to 30 minutes at +45°C to +55°C. Depending on the RNA target chosen, optimal reaction temperature and time may vary. Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase can be used for temperatures between +45°C and +55°C, also for GC-rich targets. The recommended incubation time is 30 minutes. For many reactions however 10 minutes are sufficient.

 ***Preheat the block cycler to the temperature of the RT reaction***

- 12 Inactivate Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase by heating to +85°C for 5 minutes. Stop the reaction by placing the tube on ice.

At this point the reaction tube may be stored at +2 to +8°C for 1 to 2 hours or at -15 to -25°C for longer periods. The cDNA can be used for amplification without further purification or manipulation such as RNase H-treatment. For PCR use 1 to 5 µl of the reaction product in 20 µl or 50 µl final reaction volume.

Anexo 6. Comunicación póster (2021).

Estudio preliminar sobre la utilidad del microRNA en el diagnóstico del carcinoma epidermoide de cabeza y cuello en estadios avanzados

Galindo Torres BP, García Girón C, Adiego Leza MI, Álvarez Blanco I, Navazo Eguía AI, Grijalba Uche MV.

Complejo Asistencial
Universitario de Burgos

Fundación
Burgos por la Investigación de la Salud

Introducción

El carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (CECC) es el 7º más frecuente en el mundo. Los microRNA (miRNA) son una clase de moléculas cortas de RNA endógenas no codificantes que participan en la regulación postranscripcional de la expresión génica del mRNA (Fig. 1). Este trabajo plantea la complementación del diagnóstico del CECC introduciendo la biopsia líquida.

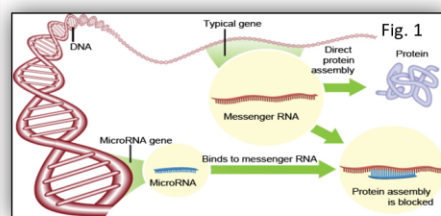


Fig. 1. Representación esquemática del material genético, y la unión del miRNA al mRNA.

Materiales y métodos

Se incluyeron 10 pacientes diagnosticados de CECC y 10 sanos, se extrajo una muestra de sangre periférica y se obtuvo el plasma. Mediante el kit comercial de Qiagen RNA easy se extrajo el RNA libre y posteriormente este se retrotranscribió con el kit comercial transcriptor High fidelity cDNA de Roche, obteniéndose así la cadena complementaria (cDNA) necesaria para la amplificación del material. La concentración y calidad del RNA y cDNA se determinaron con ayuda de un Nanodrop y se analizó el nivel de expresión de miR-21-5p, miR-26b, miR-28-3p, miR-99a, miR-122, miR-143-3p, miR-146, miR-195-5p, miR-206, miR-223, miR-374b-5p, miR-375, miR-425-5p, miR-451a, miR-512-5p, miR-574-3p, miR-3591-3p mediante PCR cuantitativa.

Resultados

El perfil de miRNA presentado por los pacientes oncológicos difirió del grupo control. Los miRNA-21-5p, -122, -375 presentaron una expresión entre 2,5 y 5 veces mayor que en el grupo control. Sin embargo, la expresión de los miRNA-206 y -195-5p disminuyó respecto a este a grupo (Fig. 2).

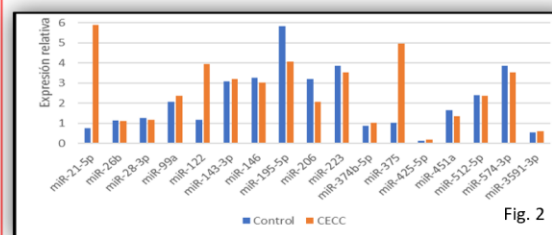


Fig. 2. Representación gráfica de la expresión relativa de los miRNAs estudiados

Discusión

Los miRNAs regulan los procesos fisiopatológicos fundamentales para el desarrollo del CECC, tales como la diferenciación, la proliferación, la apoptosis y el metabolismo tumoral. Publicaciones recientes han demostrado que la expresión aberrante de miRNAs es un potencial biomarcador como herramienta diagnóstica. Aún está por determinar si reemplazará a la biopsia tradicional en el futuro, pero, en cualquier caso, la posibilidad de realizar la biopsia líquida supone un cambio en el paradigma de la enfermedad tumoral.

Conclusiones

Las diferencias encontradas en los perfiles de miRNA entre controles y pacientes podrían ser una herramienta útil en el diagnóstico del CECC avanzado.

Referencias

- Jatana KR, Balasubramanian P, Lang JC, Yang L, Jatana CA, White E, et al. Significance of circulating tumor cells in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck: initial results. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2010;136:1274-9.
- Pantel K, Alix-Panabières C. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. Trends Mol Med. septiembre de 2010;16(9):398-406.
- John K, Wu J, Lee B-W, Farah CS. MicroRNAs in Head and Neck Cancer. Int J Dent. 2013;2013:1-12.
- Nagadia R, Pandit P, Coman WB, Cooper-White J, Punyadeera C. miRNAs in head and neck cancer revisited. Cell Oncol Dordr. febrero de 2013;36(1):1-7.
- Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. Cell Res. octubre de 2008;18(10):997-1006.

Datos de contacto

bgalindot@saludcastillayleon.es

947281800 – EXT 36175

CP-0164

Anexo 7. Artículo 1 (2022).

Galindo Torres BP, García Girón C, Alcaraz Ortega R, Saiz López P, Adiego Leza MI, Grijalba Uche MV. Knowledge and expectations about miRNAs as biomarkers in head and neck squamous cell cancers. Am J Otolaryngol. 2023 Mar-Apr;44(2):103771.

DOI: 10.1016/j.amjoto.2022.103771.

PMID: 36603378.

Anexo 8. Artículo 2 (2025).

Galindo Torres BP, Alcaraz Ortega R, Saiz López P, Adiego Leza MI, Moradillo Renuncio MDM, García Girón C, Grijalba Uche MV. New evidence for miRNA testing in head and neck squamous cell cancer patients. Clin Transl Oncol. 2025 Feb 6.

DOI: 10.1007/s12094-025-03854-9.

PMID: 39913046.

DISPONIBLE EN: <https://rdcu.be/d8VXS>

Correction: New evidence for miRNA testing in head and neck squamous cell cancer patients.

Galindo Torres BP, Alcaraz Ortega R, Saiz López P, Adiego Leza MI, Moradillo Renuncio MDM, García Girón C, Grijalba Uche MV.

Clin Transl Oncol. 2025 Feb 6.

DOI: 10.1007/s12094-025-03854-9

- In table 3, “CONTROL” column, the miR-451a expression level should be corrected from **0,522** +- 0,010 to **0,052** +- 0,010 (the deletion of a number “0” passed accidentally unnoticed). Figure 1 should also be corrected.
- In the subsection “MiRNA and Sociodemographic and clinicopathological features”, at the end of the third paragraph, instead of “and found that patients in stages III or IV overexpressed 374b-5p (p = 0.005) comparing with the rest of stages” should be “and found that patients in stages IV overexpressed 374b-5p (p = 0.005) comparing with stage III”.

The authors regret the errors.

