

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTADE DE MEDICINA E ODONTOLOXÍA

TRABALLO FIN DE GRAO DE ODONTOLOXÍA

Título do TFG: Mutaciones en MET en Cáncer de Cabeza y Cuello pre- y post- quimioterapia

AUTOR/A: Otero Gayoso, Noelia

TITOR/A: Suárez Cunqueiro, María Mercedes

COTITOR/A: Díaz Peña, Roberto

Departamentos: Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas. Grupo de Oncología Médica Traslacional (ONCOMET). Instituto de Investigación Sanitaria (IDIS) de Santiago de Compostela

Curso académico: 5º

Convocatoria: 1ª

AGRADECIMIENTOS

Quisiera mostrar mi agradecimiento a diferentes personas y entidades que me ayudaron durante la elaboración de este trabajo.

En primer lugar, al grupo de Oncología Médica Traslacional, dirigido por el doctor Rafael López López, y a la Unidad de Análisis de Biopsia Líquida, dirigida por Laura Muínelo Romay, del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela, por permitirme conocer la importancia de su trabajo en la lucha contra el cáncer.

También quiero dar las gracias a Patricia Mondelo Macía por compartir conmigo su tiempo y transmitirme sus conocimientos en la materia de una forma tan cercana y desinteresada.

Por último, quiero agradecer a mis tutores, la doctora María Mercedes Suárez Cunqueiro y Roberto Díaz Peña, por su paciencia, su constante interés y sus mensajes positivos, que para mí fueron tan valiosos desde el primer momento.

Por darme la oportunidad de acercarme a la investigación por medio de este trabajo que para mí resultó tan satisfactorio,

Muchas gracias

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO	1
1.2 BIOMARCADORES TUMORALES	3
1.3 ESTRUCTURA DE MET	3
1.4 ALTERACIÓN DE LA VÍA HGF / MET	5
1.5 BIOPSIA LÍQUIDA	6
1.5.1 ADN tumoral circulante (ADNtc)	7
1.5.2 Células tumorales circulantes (CTCs)	7
1.6 TRATAMIENTO ANTI-EGFR	8
2. JUSTIFICACIÓN y OBJETIVOS	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS	10
3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	10
3.2 MUESTRAS DE PACIENTES	10
3.3 AISLAMIENTO DE ADNtc	10
3.4 NÚMERO DE COPIAS DE MET EN ADNtc	11
3.5 EXPRESIÓN DE MET EN CTCs	12
3.5.1 CellSearch®	12
3.5.2 Parsortix	13
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	13
4. RESULTADOS	14
4.1 NÚMERO DE COPIAS DE MET EN ADNtc	14
4.2 EXPRESIÓN DE MET EN CTCs	15
5. DISCUSIÓN	18
6. CONCLUSIONES	21
7. BIBLIOGRAFÍA	22

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

El Cáncer de Cabeza y Cuello (CCC) representa un problema de salud global (1) por ser el sexto cáncer más prevalente en el mundo (2). En 2018, el número de nuevos casos superó los 887.000 y se registraron 453.307 fallecimientos. En España, la incidencia y mortalidad anuales fueron de 10.244 y 3.850 casos respectivamente, según la información de la plataforma GLOBOCAN (*International Agency for Research on Cancer*, Organización Mundial de la Salud) (3).

El CCC asienta en las siguientes zonas anatómicas del tracto aerodigestivo superior (4): la cavidad oral, la orofaringe, la nasofaringe, la hipofaringe, la laringe (5), los senos paranasales y las glándulas salivales (6,7). Desde el punto de vista histológico, el Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello (CCECC) es el tipo más frecuente, representando más del 90% de todos los CCC (1,4) y se localiza en las superficies mucosas de la cavidad oral, la orofaringe y la laringe (8). A pesar de los avances en investigación, la tasa de supervivencia a los 5 años del CCC se mantiene en el 50%. Esto es debido, en gran medida, a la aparición de resistencias a los nuevos tratamientos, que tiene como consecuencia el desarrollo de recurrencias y metástasis locorregionales (9,10).

Podemos destacar tres factores de riesgo principales para el CCC: el tabaco, el alcohol y la infección por el virus del papiloma humano (VPH) (1,2,6). Hace más de 20 años, alrededor del 90% de los pacientes con CCC eran fumadores (4), pero en las últimas décadas se ha producido una disminución en el número de casos de relacionados con el tabaco (2) y un aumento del CCC relacionado con el VPH (8). A pesar de esta reducción, el tabaco todavía está asociado al 70% de casos de CCC (6). Otros factores de riesgo menos conocidos para el CCC son la inmunosupresión (post- trasplante o debida a una infección por el virus de la inmunodeficiencia humana) (4), la falta de antioxidantes en la dieta, la radiación ultravioleta (UV) (11), antecedentes familiares de CCC, edad avanzada, lesiones potencialmente malignas como la leucoplasia o la eritroplasia y algunas condiciones sistémicas como el síndrome de Plummer-Vinson, la anemia de Fanconi o la disqueratosis congénita (6).

El VPH está relacionado con más del 25% de todos los CCC, siendo el VPH16 el factor etiológico responsable del 90% de tumores VPH-positivos (VPH+) (2,4,12,13). La principal localización de estos tumores es la orofaringe (11), que incluye la pared faríngea posterior, las amígdalas y la base de la lengua, siendo menos frecuente en otras zonas anatómicas (12,13). El CCC VPH+ afecta a individuos más jóvenes (8) y es más frecuente en caucásicos, a diferencia de los tumores VPH-negativos (VPH-) (12). El porcentaje de pacientes fumadores es menor en el grupo de pacientes con CCC VPH+ (4), pero el riesgo de desarrollar estos tumores aumenta de forma proporcional al número de personas con las que el individuo mantiene relaciones sexuales (14).

Varios estudios han demostrado que el CCC VPH+ tiene un mejor pronóstico que el CCC VPH-, mostrando una mayor tasa de supervivencia general (SG), una mayor supervivencia libre de progresión (SLP) y una mejor respuesta al tratamiento (6,8,9,12,14). Algunos autores relacionan estas diferencias relativas al pronóstico con la edad o el nivel socioeconómico de los pacientes (1,15), pero fundamentalmente se deben a las características moleculares que lo diferencian.

Con respecto a los perfiles moleculares del CCC, son varias las características que diferencian los tumores VPH+ y VPH-. Generalmente, el CCC VPH+ está mejor diferenciado y no queratinizado (6), y con frecuencia presenta sobreexpresión de PD-L1 y una mayor secreción de citocinas proinflamatorias (16). Además, expresa las oncoproteínas virales E6 y E7, que tienen la capacidad de inactivar las proteínas supresoras tumorales p53 y Rb e incrementar la expresión de las proteínas p16 (11). Estas oncoproteínas virales también incrementan la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico “*epidermal growth factor receptor*” (EGFR), desencadenando un aumento en la activación de la vía PI3K en el CCC VPH+ (9,13). Es importante destacar que la proteína p16 es actualmente un biomarcador para el CCC (13), que se asocia a un mejor pronóstico y una mejor respuesta terapéutica, independientemente del estadio tumoral, tipo de progresión, historial de tabaquismo o cirugía previa (11). Por otro lado, la presencia de niveles más altos de anticuerpos E6 en el momento del diagnóstico se ha relacionado con un mayor riesgo de recurrencia (9).

Tabla 1. Representación comparativa entre el CCC VPH+ y VPH-.

	VPH-Negativo	VPH-Positivo
Tendencia en la incidencia	Descendente	Ascendente
Género	2-3 veces más común en varones	4-5 veces más común en varones
Edad	>50 años	40-60 años
Mayor incidencia y peor pronóstico racial	Afroamericanos	Caucásicos
Historial de tabaquismo	>90%	50-65 %
Número de parejas sexuales	Irrelevante	Riesgo proporcionalmente mayor al aumentar el número de personas
Porcentaje de supervivencia a los 3 años	57%	82%
Tasa de recurrencia a los 5 años	50%	10-15%
Localización	Laringe, cavidad oral, otras localizaciones	Orofaringe (pared faríngea posterior, paladar blando, amígdalas y base de la lengua)
Hallazgos clínicos característicos	Variables	Ganglios cervicales agrandados, dolor orofaríngeo, disfagia, otalgia referida
Hallazgos moleculares característicos	Generalmente queratinizado Mal diferenciado Mutación de p53 frecuentes Frecuente sobreexpresión de p53 y Rb p16 ausente Menor grado de expresión de EGFR y alteración de la vía PI3K Sobreexpresión de PD-L1 infrecuente Baja secreción de citocinas proinflamatorias	A menudo no queratinizado Moderadamente diferenciado Mutaciones de p53 infrecuentes P53 y Rb bloqueados por las proteínas virales E6 y E7 Sobreexpresión de p16 Sobreexpresión de EGFR y frecuente alteración de la vía PI3K Sobreexpresión de PD-L1 Mayor secreción de citocinas proinflamatorias
Respuesta al tratamiento	Peor respuesta al tratamiento	Mejor respuesta al tratamiento

1.2 BIOMARCADORES TUMORALES

Un biomarcador es una molécula biológica que se puede encontrar en tejidos y en fluidos del organismo, como la sangre, y que puede representar una condición normal o una enfermedad. Se utiliza para determinar la respuesta del organismo a un tratamiento para una determinada patología (17).

Uno de los principales objetivos de la oncología de precisión es identificar las alteraciones moleculares y genéticas que están involucradas en los procesos de carcinogénesis en cada tipo de tumor (18). Aunque este estudio está centrado en la monitorización de las alteraciones de *MET*, se han descubierto otros genes que están involucrados en los diferentes procesos que favorecen el desarrollo del CCC. Marur y col. (8) clasificaron estos genes según su función de la siguiente forma: genes que participan en la supervivencia tumoral, genes involucrados en la proliferación tumoral, genes que modulan la diferenciación tumoral y genes supresores tumorales.

Dentro del primer grupo, se identificaron mutaciones en *EGFR* y *PIK3CA*, con la consiguiente alteración de las vías de señalización que estos regulan (8,19). Leblanc y col. (20) identificaron mutaciones *PIK3CA* en el 12% de los pacientes con CCC y estas mutaciones se correlacionaron con una peor SLP en pacientes tratados con Cetuximab.

En el segundo grupo, que incluye los genes involucrados en la proliferación tumoral, se han detectado mutaciones puntuales en *CDKN2A/CDKN2B* (21), *p16*, *Rb* y *RAS* (8). Aunque las mutaciones del gen *RAS* se han convertido en un biomarcador bien establecido para otros tipos tumorales como el cáncer colorrectal, son muy poco frecuentes en el CCC. No obstante, su identificación en el CCC se ha relacionado con una peor respuesta a la quimioterapia y la radioterapia (9,22).

NOTCH1 es el principal gen que ha presentado mutaciones en el CCC dentro de los implicados en la diferenciación tumoral (23). En la actualidad, existen ensayos clínicos activos en fases iniciales con fármacos inhibidores dirigidos a este gen (24).

TP53 es un gen inductor de la muerte celular e inhibidor del crecimiento cuando se activa en el proceso de carcinogénesis y es el más representativo dentro de este grupo de genes. Además, está mutado aproximadamente en la mitad de los casos en CCECC y la identificación de estas mutaciones (más frecuente en los tumores VPH-) se correlaciona con una disminución de la SG y con un peor pronóstico (9,25).

1.3 ESTRUCTURA DE MET

MET es un receptor de membrana conocido como receptor del factor de crecimiento hepatocitario “*hepatocyte growth factor*” (HGF) que pertenece a la familia de receptores tirosina quinasa (RTK) (7). Está codificado por el protooncogén *MET*, localizado en el cromosoma 7 (26), y puede encontrarse en la membrana de células epiteliales de múltiples órganos como el hígado, el riñón, el pulmón, la próstata, la médula ósea, el páncreas y la piel (27).

Después de ser sintetizado como una proteína precursora de cadena sencilla, el protooncogén *MET* sufre un proceso proteolítico (glucosilación y escisión) que da lugar a la formación de un heterodímero maduro con dos subunidades principales: dominio o cadena α y dominio o cadena β (Figura 1). La cadena α permanece completamente extracelular, pero la

cadena β se divide en tres regiones: un primer dominio extracelular de unión a ligando (HGF), un dominio transmembrana y un segmento intracelular o citoplasmático, que se subdivide a su vez en una secuencia de yuxtamembrana (ubicada inmediatamente a continuación de la membrana celular), un dominio intermedio con actividad tirosina-quinasa y una región con secuencias carboxilo terminales, también llamada sitio de unión o sitio de acoplamiento multifuncional (26,28-31).

El ligando endógeno natural de MET es el HGF, también conocido como factor de dispersión (32) y es secretado por células mesenquimales (células madre y células progenitoras) (29,33). Este ligando puede unirse a la parte extracelular del receptor en dos zonas: el dominio SEMA y el dominio IPT (31).

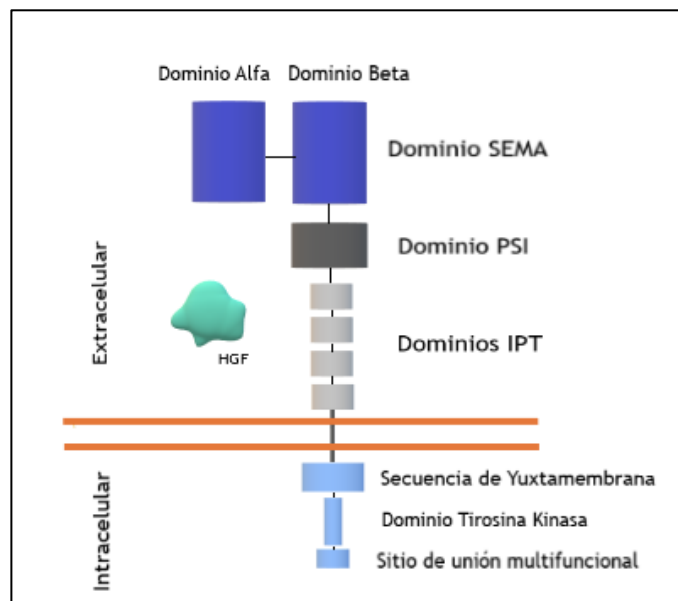


Figura 1. Estructura del receptor MET. La parte extracelular del receptor podemos dividirla en las siguientes regiones: el dominio SEMA (que incluye la cadena α y parte de la cadena β), el dominio PSI (dominio de integridad de semaforina de plexina) y el dominio IPT (factores de transcripción de pliegue de plexina de tipo inmunoglobulina) que conecta con el segmento transmembrana. A nivel citoplasmático, distinguimos un dominio catalítico de tirosina quinasa flanqueado por las secuencias de yuxtamembrana y carboxi-terminal.

En condiciones fisiológicas, el receptor MET se activa mediante la unión de su ligando, desencadenando la activación de la vía de señalización que se describe a continuación. Esta unión produce una dimerización y fosforilación de dos residuos de tirosina ubicados en la secuencia de yuxtamembrana (Y1234 e Y1235), seguidos de autofosforilación de Y1349 e Y1356 en el sitio de acoplamiento multifuncional (26,27,30). Esta reacción pone en marcha la activación en cadena de una serie de proteínas: proteínas quinasas activadas por mitógeno "*Mitogen-Activated Protein kinases*" (MAPK), fosfatidilinositol 3-quinasa "*Phosphatidylinositol 3-kinase*" (PI3K / AKT), quinasas de adhesión focal "*Focal Adhesion Kinases*" (FAK) y transductor de señal y activador de transcripción 3 "*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*" (STAT3) entre otras (26). Este proceso tiene lugar tanto durante la fase de desarrollo como durante la fase adulta en células no tumorales y juega un papel importante en la embriogénesis, la regeneración de tejidos y la cicatrización de heridas (33).

1.4 ALTERACIÓN DE LA VÍA HGF / MET

La vía de señalización de MET puede activarse en condiciones no fisiológicas en células tumorales, desencadenando un aumento en la supervivencia y proliferación de estas células, inhibición de la apoptosis, migración, angiogénesis, invasión de otros tejidos y finalmente metástasis (32). Son múltiples los mecanismos que pueden producir una activación aberrante del receptor y pueden ser ligando-dependientes o ligando-independientes (lo que conocemos como activación constitutiva de MET). Dentro de estos mecanismos encontramos la sobreexpresión de HGF/MET, la amplificación o ganancia en el número de copias del gen *MET*, la presencia de mutaciones somáticas o heredadas en los dominios quinasa y no quinasa, y la secreción aberrante de HGF (26,29,34) (Figura 2).

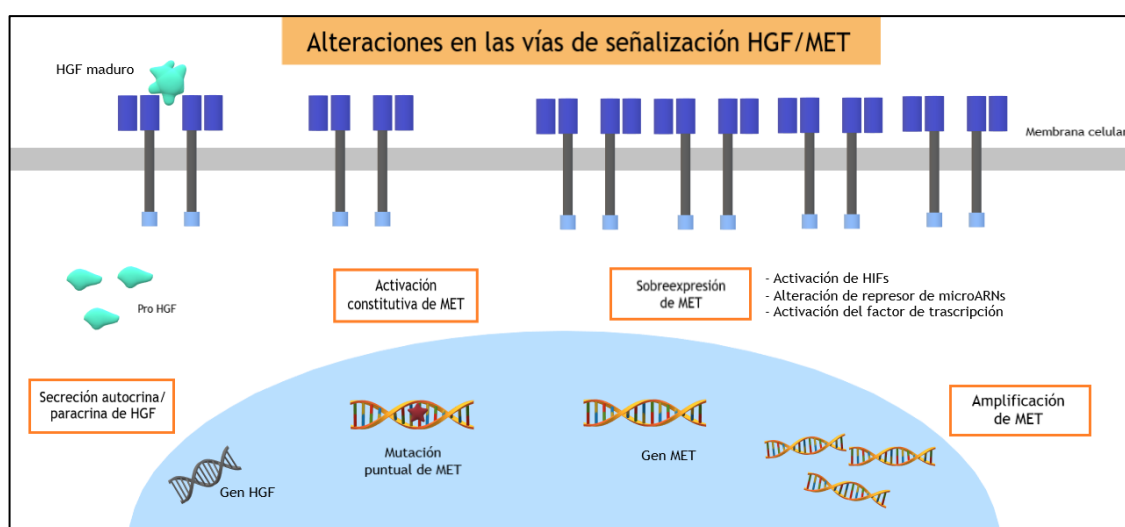


Figura 2. Principales mecanismos de alteración de la vía de señalización de MET/HGF en el CCC. Dentro de estos mecanismos se incluyen la secreción aberrante autocrina y paracrina de HGF, la presencia de mutaciones puntuales en *MET*, la sobreexpresión de MET y la amplificación o el incremento en el número de copias del gen *MET*. La sobreexpresión de MET puede deberse a una activación de factores inducibles por hipoxia “*hypoxia inducible factors*” (HIFs), una desregulación del repressor de microARN o una activación de factores de transcripción.

La sobreexpresión de MET se ha detectado en el 90% de los CCE (7). Constituye una de las alteraciones más frecuentes y puede producirse a nivel de proteínas o de ARN mensajero (ARNm) (26). Esta alteración se ha identificado como un marcador de pronóstico negativo en varios tipos de cáncer, incluyendo el carcinoma renal de células claras, el cáncer de pulmón, de ovario, de mama, gástrico y también en el CCC (33). Concretamente en este último grupo se ha relacionado con edad avanzada, una SG y una SLP más cortas, un estado ganglionar positivo, estadios tumorales más avanzados, mayor tasa de recurrencias y lesiones de mayor tamaño (26).

La amplificación del protooncogén *MET* puede identificarse como alteración única o coexistir con la sobreexpresión de MET (7). Se ha detectado en muchos tumores primarios y metastásicos, incluidos el cáncer de mama, gástrico, renal y esofágico entre otros (27). Esta alteración se analiza en muestras de tejido mediante hibridación fluorescente in situ “*fluorescence in situ hybridization*” (FISH) y se ha asociado con una SG más corta,

independientemente del estadio tumoral (26). A pesar de ser una alteración menos frecuente que la sobreexpresión en el CCE, también constituye un indicador de peor pronóstico (7).

Las mutaciones puntuales de *MET* producen una activación constitutiva del receptor y se han detectado en tumores de pulmón, riñón, mama, ovario, gástricos y de cabeza y cuello (32). En el cáncer de pulmón, se han identificado una serie de mutaciones que se engloban bajo la denominación de “omisión del exón 14” y que confieren resistencia a tratamientos con inhibidores de MET (26). En la actualidad, se están desarrollando agentes terapéuticos capaces de bloquear esta alteración específica (35,36). En el CCC, se detectaron mutaciones a nivel del dominio intracelular de tirosina quinasa (con mayor frecuencia en las regiones Y1235D e Y1230C) (31), en el dominio SEMA (37) y en la secuencia de yuxtamembrana (38). La identificación de estas mutaciones en el Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE) se ha relacionado con un mayor riesgo de metástasis a distancia, progresión de la enfermedad, recurrencia local y peor respuesta al tratamiento con agentes inhibidores de MET (39).

El HGF se expresa con frecuencia con MET, produciendo una activación aberrante del receptor. Aunque la activación de la vía HGF/MET constituye un factor pronóstico para el CPCNP o el cáncer colorrectal con una peor SLP y SG, los resultados no son tan evidentes para el CCC (26). La sobreexpresión de HGF y/o MET en el CCECC se ha identificado como un posible factor desencadenante de la transición epitelio-mesenquimal (TEM), lo que le confiere al tumor un comportamiento más agresivo y resistente al tratamiento (7). Además, la liberación de factores pro-angiogénicos desencadenada por el HGF se ha relacionado con un aumento de tamaño del tumor primario, una mayor tasa de recurrencia y capacidad metastásica y una SLP más corta (7).

La dificultad a la hora de encontrar terapias dirigidas que sean eficaces es un propósito exigente y difícil de alcanzar, debido a la existencia de interacciones cruzadas entre MET con otros receptores como HER2 (37), PI3K / AKT, RAS / MAPK, JAK / STAT, SRC, Wnt / β -catenina, EGFR y RON, que pueden producir la activación de MET sin su ligando (10). Además, muchos de estos receptores activan las mismas proteínas que MET en sus respectivas vías de señalización (26). Por lo tanto, uno de los desafíos en la actualidad reside en conocer el comportamiento molecular de cada tumor para poder formar subpoblaciones e identificar aquellas que podrían beneficiarse de las terapias dirigidas con inhibidores de MET (27).

1.5 BIOPSIA LÍQUIDA

La medicina de precisión está revolucionando el campo de la oncología, pasando de utilizarse tratamientos empíricos tradicionales a seleccionar tratamientos dirigidos, donde el objetivo es conocer el perfil molecular característico de cada tumor (25). La identificación de biomarcadores específicos ha surgido como una necesidad para poder combatir la variabilidad tumoral y las resistencias al tratamiento (26). La biopsia líquida surge como una técnica de diagnóstico mínimamente invasiva que puede proporcionar información sobre las características moleculares del tumor en el momento del diagnóstico, durante el tratamiento y en la progresión de la enfermedad (40). Este análisis molecular nos permite formar subgrupos tumorales para seleccionar una terapia dirigida de forma individualizada, hacer un seguimiento en el tiempo de la respuesta al tratamiento y detectar la aparición de resistencias o recidivas (18). Las principales ventajas de esta técnica frente a la biopsia convencional en tejido son la posibilidad de proporcionar una imagen dinámica del tumor a tiempo real y su carácter mínimamente invasivo. Esta herramienta adquiere una mayor importancia en aquellos casos en

los que no se puede realizar una biopsia de tejido debido a la localización del tumor, cuando necesitamos re-biopsiar una lesión y, especialmente, en las metástasis tumorales (21).

Aunque la biopsia de tejido todavía está considerada como el método de diagnóstico principal (*gold estándar*) para la confirmación y caracterización tumoral, su aplicación se ve limitada a la hora de representar el panorama mutacional completo de un tumor, ya que dos regiones de la misma lesión pueden presentar diferentes características (18).

Mediante técnicas de biopsia líquida se analizan fundamentalmente fragmentos de ADN tumoral circulante (ADNtc) y células tumorales circulantes (CTCs) (12,13,15,19). A diferencia de la biopsia convencional, en esta técnica se utilizan muestras de fluidos del organismo (41), como el plasma, el suero, los fluidos linfáticos y peritoneales y la saliva (42). Un estudio en el que analizaron el CCC mediante diferentes tipos de fluidos concluyó que se obtenían mejores resultados cuando se utilizaban muestras de sangre de pacientes con CCC en cualquier localización, excepto en la cavidad oral, donde la saliva resultó ser más precisa (41).

1.5.1 ADN tumoral circulante (ADNtc)

Las células necróticas o apoptóticas del organismo liberan constantemente fragmentos de ADN a la circulación. Estos fragmentos son moléculas de ADN libre circulante (ADNlc), y en aquellos pacientes que presentan alguna lesión maligna, un pequeño porcentaje de este material genético libre puede proceder de células tumorales (ADNtc) (42). En una revisión de Galot y col. (21) concluyeron que existe una relación proporcional entre el estadio tumoral y la concentración de ADNtc. Así lo demuestran también Nonaka y Wong (41), que además afirman que hasta un 47% de los pacientes con tumores en estadio I pueden presentar ADNtc detectable, lo que revela la importancia de la biopsia líquida para la detección temprana del cáncer. Sin embargo, la identificación de ADNtc puede ser un reto debido a su baja concentración en el torrente sanguíneo (43).

Además del valor pronóstico de la concentración de ADNtc en el torrente circulatorio, estas pequeñas moléculas de ADN pueden albergar alteraciones genéticas y/o genómicas (16) como son las mutaciones, variaciones en el número de copias “*copy number variations*” (CNVs) de un gen y cambios de metilación (42). Algunas de estas alteraciones representan marcadores de pronóstico negativo en algún tipo de cáncer, tal y como revelaron estudios recientes, que demostraron la relación entre la amplificación genética de *MET* detectada en ADNtc y la adquisición de resistencias a inhibidores de EGFR en cáncer de pulmón (44,45).

1.5.2 Células tumorales circulantes (CTCs)

Las CTCs son células tumorales intactas que se desprenden de un tumor primario o metastásico y entran en el torrente vascular (41) y pueden proporcionar información relevante para hacer un diagnóstico o un seguimiento del tumor. Estas células se encuentran en una proporción muy baja en la circulación (1 CTC por cada 10^6 - 10^7 leucocitos) (42), aunque esta proporción depende del tipo de tumor y del estadio en el que se encuentre.

El mecanismo mediante el cual las CTCs pueden acceder a la circulación todavía no está completamente estudiado, pero se sabe que atraviesan los vasos sanguíneos durante el crecimiento tumoral y la angiogénesis (gracias a su plasticidad celular y a la TEM, que les confiere un fenotipo puramente mesenquimal o mixto con adquisición de motilidad) (18).

Después de este proceso, se incorporan y permanecen en el torrente sanguíneo hasta que consiguen salir de la circulación por extravasación y se someten a una transformación mesenquimo-epitelial (46).

Las CTCs pueden permanecer como células circulantes individuales o crear microémbolos circulantes, conocidos como “agrupaciones” o “clusters”, que con frecuencia se encuentran unidos a células estromales y glóbulos blancos (18). Varios estudios han confirmado que los tumores en los que se detecta al menos 1 *cluster* presentan un mayor potencial metastásico gracias a la protección que le confieren los glóbulos blancos a estos grupos de CTCs en el torrente circulatorio (47).

Podemos diferenciar dos tipos de protocolos para el aislamiento de CTCs: procedimientos de selección positiva, que son marcador-dependientes y procedimientos de selección negativa, independientes de biomarcadores, que se basan en la eliminación progresiva de otros tipos de células para obtener una población de CTCs pura. Aunque las técnicas marcador-dependientes suelen ser de elección, pueden omitir algunas CTCs debido a la heterogeneidad tumoral (18) y a la TEM, que altera el fenotipo celular y produce una pérdida total o parcial de marcadores epiteliales (47).

1.6 TRATAMIENTO ANTI-EGFR

El EGFR se sobreexpresa en el 80-90% del CCECC y se correlaciona con peor pronóstico y resistencia a la radioterapia (9). La farmacología oncológica ha desarrollado múltiples terapias dirigidas a inhibir el EGFR, diferenciando dos tipos de agentes dentro de este grupo de fármacos: inhibidores de tirosina quinasa “*tyrosine kinase inhibitors*” (TKI) y anticuerpos monoclonales, dirigidos al dominio extracelular de EGFR. En el último grupo incluimos Cetuximab, que es el único agente terapéutico dirigido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos “*Food and Drug Administration*” (FDA) para el tratamiento del CCC (48). El mecanismo de acción de este anticuerpo monoclonal consiste en impedir o bloquear la unión del ligando al dominio extracelular del EGFR, inhibiendo la dimerización y la fosforilación del receptor y bloqueando la posterior activación de las vías de señalización (26). Otros agentes aceptados por la FDA para el tratamiento de CCECC incluyen metotrexato, 5-fluorouracilo, bleomicina, cisplatino, docetaxel y pembrolizumab y nivolumab, aprobados recientemente (7). El protocolo estándar para tratar el CCC de acuerdo con la FDA consiste en la combinación de Cetuximab con radioterapia para la enfermedad local avanzada o quimioterapia para la enfermedad metastásica.

Son múltiples los procesos que podrían estar relacionados con las resistencias a los inhibidores de EGFR. En el grupo de los anticuerpos monoclonales, los principales mecanismos de resistencia incluyen mutaciones en *EGFR* (como la mutación T790M en el cáncer de pulmón); sobreexpresión, traslocación y activación constitutiva de EGFR; activación aberrante de PI3K / AKT y KRAS; procesos de TEM; interacción cruzada con el receptor MET y sobreexpresión de MET/HGF entre otros (48). En la actualidad, se están investigando otros factores que podrían estar involucrados en la adquisición de estas resistencias, alterando la función del receptor de forma directa o indirecta, como la ciclooxygenasa 2 (COX 2) (49), la nicotina (50) o el estrés crónico (51), pero se necesitan más estudios en estos campos.

Con respecto al CCC, algunos de los mecanismos descritos en la resistencia a Cetuximab son la expresión de factores de crecimiento (52), el proceso TEM, la mutación y pérdida de función de TP53 y la alteración de otros RTK, como la activación aberrante de HER2 y HER3,

la sobreexpresión de MET / HGF (31,53), la amplificación de *MET*, la activación de PIK3CA (54) y la desregulación ALK durante la terapia (55). Además, Rothemberg y col. (7) hallaron una correlación entre un aumento en la expresión basal de MET y una peor respuesta al tratamiento con Cetuximab. Recientemente, se descubrieron nuevas mutaciones de *EGFR in vitro*, aparentemente capaces de desencadenar un estado activado del receptor de manera constitutiva y permanente, evitando así la unión entre Cetuximab y EGFR (56).

A pesar de haber obtenido resultados satisfactorios con el uso de inhibidores de EGFR en algún tipo de cáncer, la resistencia primaria que ofrecen muchos pacientes ante estos tratamientos es considerable. En algún caso, aunque no sean resistentes desde el inicio, desarrollan una resistencia secundaria o adquirida tras haber superado de forma satisfactoria varias líneas de tratamiento. *MET* constituye uno de los genes responsables de la aparición de dicha resistencia, de modo que existe una necesidad de implementar terapias inhibitorias de HGF/MET o incluso de utilizar una doble terapia que combine inhibidores de MET y EGFR (57,58) como una alternativa terapéutica en estos tumores resistentes. En la actualidad, se están desarrollando estudios activos con esta doble terapia y los resultados hasta la fecha han sido satisfactorios. Se han obtenido una reducción de la proliferación celular y la capacidad invasiva y una mejor cicatrización de las heridas en comparación con la utilización de un solo ITK, lo que demuestra que la acción sinérgica de ambos inhibidores podría ser beneficiosa para determinados grupos de pacientes con CCC (7).

2. JUSTIFICACIÓN y OBJETIVOS

El CCC es uno de los tumores más prevalentes en el mundo y, con frecuencia, se diagnostica en estadios avanzados de la enfermedad. En las últimas décadas, ni el pronóstico ni la tasa de supervivencia han experimentado una mejoría a pesar de los avances en investigación. Aunque los inhibidores de EGFR han mejorado ligeramente los resultados clínicos, todavía no se ha desarrollado una terapia dirigida efectiva para tratar este tipo de cáncer. Además, la resistencia del CCC a tratamientos con Cetuximab ha aumentado en los últimos años. *MET* es uno de los genes involucrados en la adquisición de dicha resistencia por medio de alteraciones como la amplificación genética o la sobreexpresión proteica.

El objetivo principal de este estudio es monitorizar la amplificación y la sobreexpresión de MET en muestras de pacientes con CCC durante el tratamiento con Cetuximab mediante técnicas de biopsia líquida.

Como objetivos secundarios, cabe mencionar los siguientes:

- Analizar cómo influye la expresión de MET y el número de CTCs en la supervivencia de pacientes con CCC tratados con inhibidores de EGFR.
- Justificar, mediante la detección de estas alteraciones de MET con técnicas de biopsia líquida, la necesidad de que se lleven a cabo ensayos clínicos con fármacos inhibidores de MET en pacientes con CCC que incluyan esta metodología de análisis.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Este es un estudio prospectivo en el que se analizaron muestras de 14 pacientes con CCC para detectar amplificación o sobreexpresión de MET en un período de tiempo durante el cual los pacientes recibieron tratamiento con inhibidores de EGFR. Los pacientes fueron reclutados en el Servicio de Oncología Médica del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica de Galicia (Ref. No. 2017/538) y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los participantes involucrados en el momento del reclutamiento. Los datos obtenidos con el análisis de las muestras de pacientes se compararon con muestras de un grupo de controles formado por 50 individuos sanos que participaron voluntariamente en el estudio. Esta comparación entre los datos obtenidos tras el análisis de pacientes y controles sanos nos permitió definir los valores que podían ser considerados normales y establecer un límite, a partir del cual se consideraba que existía una alteración en MET.

3.2 MUESTRAS DE PACIENTES

Tras la fase de reclutamiento, se obtuvo una primera muestra de todos los pacientes. En los casos en los que fue posible, se obtuvieron nuevas muestras a los 3 y 6 meses, tiempo durante el cual los pacientes recibieron tratamiento con Cetuximab. Una última muestra se obtuvo para algunos pacientes en el momento de la progresión de la enfermedad. De esta forma, se pretendía analizar la evolución del tumor con el tratamiento y detectar posibles cambios asociados a MET, tanto en las CNVs a través de ADNtc como en la sobreexpresión proteica mediante un análisis de las CTCs.

En la tabla 2 se incluyen las características clínicas y patológicas de los pacientes de este estudio. Los 14 pacientes tenían más de 50 años, el 71% eran varones y el 85%, fumadores. Todos ellos presentaban un tumor en estadio IV con una lesión maligna primaria localizada en la zona de cabeza y cuello y, al menos, una segunda lesión metastásica en otra localización. Desde el punto de vista histológico, todos los tumores primarios eran CCE excepto uno, que se trataba de un carcinoma mucoepidermoide (CME). Por último, el 21% de los pacientes habían sido tratados previamente con Cetuximab (dos pacientes habían recibido 1 línea de tratamiento y un paciente había recibido 3 líneas de tratamiento) antes de iniciar la recogida de muestras basales para este estudio.

3.3 AISLAMIENTO DE ADNtc

Se recogieron 10 mL de sangre periférica de pacientes y controles mediante venopunción directa y las muestras se almacenaron en tubos de recolección de sangre Streck Cell-Free DNA (Streck, La Vista, NE, EEUU). El plasma se separó en las primeras 96 horas tras la obtención de las muestras mediante dos ciclos de centrifugación de 10 minutos cada uno a temperatura ambiente (1600 g y 6000 g). Después de este procedimiento, las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta el momento de su análisis.

Después de sacar las muestras de la cámara fría y dejarlas durante un tiempo a temperatura ambiente, se separaron 3 mL de plasma para obtener el ADNlc y el ADNtc usando el Kit de ácido nucleico circulante QIAmp (Quiagen, Hilden, Alemania) y manipulando dichas muestras dentro de una campana UV para evitar su contaminación. Una vez separado el ADN, se calculó su concentración en esos 3 mL de plasma utilizando el kit de ensayo Qubit 1X dsDNA Hs (Bio-Rad, CA, EEUU), que realiza una lectura de la concentración de ADNtc mediante un fluorómetro. Ambos kits se usaron de acuerdo con las instrucciones de sus fabricantes.

Tabla 2. Características clínico-patológicas de los pacientes.

Paciente	Edad	Género	Tipo de tumor	Localización del tumor primario	Estadio tumoral	Número de localizaciones con metástasis	Tratamiento previo con Cetuximab	Líneas de tratamiento recibidas al inicio del estudio
P1	62	M	CCE	Trígono retromolar	IV	2	No	-
P2	60	M	CCE	Supraglotis	IV	2	Si	1
P3	55	M	CCE	Hipofaringe	IV	2	No	-
P4	65	M	CCE	Seno piriforme	IV	4	Si	3
P5	79	F	CCE	Amígdala lingual	IV	1	No	-
P6	69	M	CCE	Hipofaringe	IV	2	Si	1
P7	70	M	CCE	Lengua	IV	3	No	-
P8	67	M	CCE	Trígono retromolar	IV	3	No	-
P9	57	F	CCE	Paladar	IV	1	No	-
P10	65	F	CCE	Mucosa yugal	IV	1	No	-
P11	54	F	CME	Mucosa yugal	IV	2	No	-
P12	55	M	CCE	Laringe	IV	2	No	-
P13	71	M	CCE	Laringe	IV	1	No	-
P14	65	M	CCE	Paladar	IV	2	No	-

Género masculino (M), género femenino (F), carcinoma de células escamosas (CCE), carcinoma mucoepidermoide (CME).

3.4 NÚMERO DE COPIAS DE MET EN ADNtc

La PCR digital, llamada *digital droplet PCR* (ddPCR) es una técnica útil para identificar alteraciones genéticas, como mutaciones puntuales o CNVs de un gen, que puedan estar asociadas a una determinada patología. Esta técnica utiliza una enzima (ADN polimerasa) y cebadores específicos (secuencias de nucleótidos que se acoplan por complementariedad de bases al comienzo de las cadenas que queremos amplificar) para obtener múltiples copias de un fragmento de ADN.

El primer paso para llevar a cabo este proceso de amplificación por ddPCR fue la preparación de las muestras. Cada una de ellas tenía un volumen total de 20 μ L y estaban compuestas por una mezcla de 10 μ L ddPCR Supermix para sondas (Bio-Rad, CA, EEUU), 1 μ L de PrimePCR para *MET* combinado con el fluoróforo FAM (dHsaCP2500321, Bio-Rad, CA, EEUU), 1 μ L de PrimePCR para el gen de referencia (*Ago-1*) combinado con el fluoróforo HEX (dHsaCPE2500349, Bio-Rad, CA, EEUU) y 8 μ L de ADN libre circulante extraído

previamente y agua libre de nucleasas, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A partir de estas muestras, se generaron las gotas utilizando el sistema PCR digital de gotas QX200 AutoDG (Bio-Rad, CA, EEUU) con aceite especial y placas de 96 compartimentos. Cada compartimento contenía un pequeño fragmento de ADN que podía presentar alguna mutación (39). A continuación, se llevó a cabo el proceso de amplificación o clonación y las gotas generadas se sometieron a los siguientes ciclos para obtener fragmentos de ADN amplificados: 1 primer ciclo de 95 °C durante 10 minutos para desnaturalizar las cadenas de ADN, seguido de 40 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 60 segundos para activar la polimerasa y el proceso terminó con 10 minutos a 98° de incubación. Una vez que el ADN había sido amplificado, las placas se analizaron con el lector de gotas QX200 (Bio-Rad, CA, EEUU) y el software QuantaSoft Pro (Bio-Rad, CA, EEUU) para poder calcular las CNVs de *MET* e identificar las muestras de pacientes que presentaban amplificación de *MET*, comparando las CNVs de este gen con el gen de referencia (*Ago-1*).

3.5 EXPRESIÓN DE *MET* EN CTCs

Las CTCs se identificaron y enumeraron mediante dos procedimientos para validar los resultados de ambas técnicas: la plataforma CellSearch® y el sistema Parsortix. En ambos casos, se utilizaron 7.5 mL de sangre periférica recolectada mediante venopunción y las muestras se almacenaron en tubos CellSave (Menarini, Silicon Biosystems, Bolonia, Italia) para su posterior análisis.

3.5.1 CellSearch®

El sistema CellSearch® se basa en una técnica de selección positiva de CTCs y es el único procedimiento aprobado por la FDA para la detección y enumeración de estas células (18,45). En este estudio, se utilizó el kit CellSearch® Circulating Tumor Cell (Menarini, Silicon Biosystems, Bolonia, Italia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Una vez que las muestras de sangre habían sido centrifugadas, los componentes celulares se separaron del plasma para proceder con la selección celular inmunomagnética. Para separar las CTCs de las demás células sanguíneas, se utilizaron ferrofluidos compuestos de nanopartículas con un núcleo magnético y recubiertas por anticuerpos dirigidos a la molécula de adhesión de células epiteliales (anti-EpCAM). También se utilizaron anticuerpos específicos para poder identificar las células de interés mediante una tinción de inmunofluorescencia: anticuerpos monoclonales para las citoqueratinas 8,18 y 19 (anti-CK) conjugados con el fluorocromo ficoeritrina, anticuerpos específicos para identificar el marcador leucocitario CD45 (anti-CD45) combinados con aloficoeritrina, DAPI, un agente que identifica los núcleos celulares y un anticuerpo selectivo para *MET* (anti-*MET*) conjugado con fluoresceína (D-4, sc-514148, Santa Cruz, CA, EEUU). Se identificaron como CTCs aquellas células que presentaron los siguientes resultados: EpCAM +, CK +, CD45- y DAPI +.

Tras este proceso de detección y enumeración de CTCs, se analizó el grado de expresión de *MET* para cada una de las células, asignándoles una puntuación para clasificarlas de acuerdo con una escala 0-3, siendo la puntuación 0 (P0) expresión de *MET* negativa, puntuación 1 (P1) expresión débil, puntuación 2 (P2) expresión moderada y puntuación 3 (P3) eexpresión fuerte de *MET*. Esta escala había sido definida antes de iniciar el análisis de las muestras mediante estudios realizados con líneas celulares que presentaban distintos grados de expresión de *MET*.

3.5.2 Parsortix

Parsortix es un método de detección y enriquecimiento de CTCs que, a diferencia del sistema CellSearch®, no depende de los antígenos que expresan las células en superficie. Su criterio de detección se basa en el mayor tamaño y la menor capacidad de deformación que presentan las CTCs con respecto a la mayoría de células sanguíneas.

Se utilizaron también muestras de 7.5 mL de sangre, que se cargaron en el dispositivo microfluídico Parsortix (Angle Inc, Guildford, Reino Unido). Las CTCs quedaron atrapadas en el casete de Parsortix por su mayor tamaño y menor deformabilidad. Posteriormente, estas CTCs se fijaron al casete utilizando paraformaldehído al 4% en PBS y, a continuación, se realizó una tinción de inmunofluorescencia siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron los siguientes anticuerpos conjugados con fluorocromos: anticuerpo pan-citoqueratina (pan-CK) conjugado con AF546 (C11, sc-80-18, Santa Cruz, CA, EEUU), anti-CD45 conjugado con AF647 (35-Z6, Sc-1178, Santa Cruz, CA, EEUU), DAPI para marcar fluorescentemente los núcleos celulares y anti-MET conjugado con fluoresceína (D-4, sc-514148, Santa Cruz, CA, EEUU) para valorar a continuación la sobreexpresión. Las CTCs fueron identificadas de acuerdo con los siguientes resultados: CK11 +, CD45- y DAPI +. El siguiente paso fue analizar el grado de expresión MET, clasificando las células según su puntuación en la misma escala 0-3.

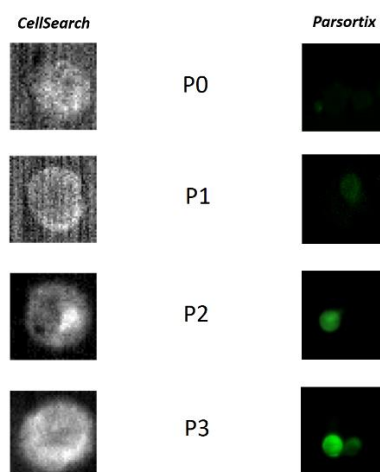


Figura 3. Tinción de inmunofluorescencia para MET con fluoresceína en CellSearch® y Parsortix y clasificación de las células según el grado de expresión de MET de acuerdo con la escala P0 (expresión negativa), P1 (expresión débil), P2 (expresión moderada) y P3 (expresión fuerte).

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con Microsoft Excel 2016 y la plataforma R Studio (versión 3.4.0). En primer lugar, se calculó la correlación de Pearson en Excel para evaluar si había una relación proporcional directa entre dos variables aleatorias cuantitativas: la concentración de ADNtc y las CNVs de *MET* en las cuatro etapas de este estudio. Esta misma correlación fue hallada a posteriori para el número de localizaciones con metástasis y las CNVs de *MET*. A continuación, para comprobar la capacidad de detección de CTCs, se realizó una prueba de comparación estadística entre los valores de CellSearch® y Parsortix. Con el objetivo

de comparar dos muestras pareadas con variables numéricas que no seguían una distribución normal según el test de Shapiro para CellSearch® y Parsortix ($p_1 = 0.000037$ y $p_2 = 0.131$ respectivamente), calculamos el valor de la Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon con la plataforma R Studio. Por último, para analizar la supervivencia esperada según la cuantificación de CTCs y el grado de expresión de MET, se utilizó el estimador no paramétrico de Kaplan-Meier.

4. RESULTADOS

4.1 NÚMERO DE COPIAS DE MET EN ADNtc

Tras cuantificar las CNVs de los pacientes en cada fase, estos datos se compararon con los obtenidos en el grupo de controles para establecer un valor que se pudiera considerar como límite entre la normalidad y la amplificación del gen. Según los resultados del grupo de controles, que oscilaban entre 1.9 y 2.66, se estableció un umbral de 2.8 como valor límite a partir del cual se consideraba que *MET* estaba amplificado. Solo un paciente presentó valores por encima de 2.8, aunque en 13 de las 14 muestras (92% de los pacientes) se detectaron CNVs de *MET* > 2 (Tabla 3).

Es importante destacar que se encontró una débil relación proporcional positiva entre la concentración de ADNtc y las CNVs de *MET* de acuerdo con la correlación de Pearson ($R = 0,44$), calculada con los datos basales (Figura 4). Concretamente, la muestra basal del paciente P12 y la muestra a los 6 meses del paciente P13 reflejan los valores más representativos de esta correlación (1.15 ng/ μ L y 3.23 CNVs de *MET* para P12 y 4.9 ng/ μ L y 3.63 CNVs de *MET* para P13). Se utilizó la misma prueba estadística para hallar una posible relación entre el número de sitios metastásicos y las CNVs de *MET*, pero el resultado en este caso no se consideró estadísticamente significativo ($R = 0.18$). Tampoco se encontró una relación estadísticamente significativa entre los valores de las CNVs y el número de líneas de tratamiento recibidas antes de iniciar el estudio, ya que sólo tres de los pacientes habían recibido tratamiento previamente, aunque ninguno de estos pacientes que había sido tratado previamente presentó CTCs detectables en la muestra basal. Los valores más altos de CNVs de *MET* se detectaron en muestras cuyo tumor primario se localizaba en la mucosa yugal y la laringe, pero se necesitaría una cohorte formada por un mayor número de pacientes para establecer una correlación estadística entre la localización del tumor primario y la amplificación *MET*.

Fue posible obtener una muestra en más de una fase del estudio del 50% de los pacientes ($n=7$) para analizar el ADNtc. Tres de estos pacientes (P11, P13 y P14) presentaban un aumento considerable en la concentración de ADNtc y en las CNVs de *MET* en la última muestra (a los 6 meses o en la progresión de la enfermedad). En el paciente P10 se detectó un ligero aumento de estos valores y en los 3 pacientes restantes, se observó una estabilidad o incluso una disminución de estos valores.

Tabla 3. Análisis de la concentración de ADNtc y de las CNVs de MET.

PACIENTE	BASAL		3 MESES		6 MESES		PROGRESIÓN	
	ADNtc ng/ul	CNVs de MET	ADNtc ng/ul	CNVs de MET	ADNtc ng/ul	CNVs de MET	ADNtc ng/ul	CNVs de MET
P1	0,62	2,26	0,285	2,65	0,08	1,98	0,175	2
P2	0,201	2,36	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P3	0,206	2,22	EXITUS	EXITUS	EXITUS	EXITUS	EXITUS	EXITUS
P4	0,642	2,5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P5	0,271	2,57	EXITUS	EXITUS	EXITUS	EXITUS	EXITUS	EXITUS
P6	0,535	2,22	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P7	0,057	2,51	EXITUS	EXITUS	EXITUS	EXITUS	EXITUS	EXITUS
P8	0,271	2,47	0,116	3,01	0,27	2,57	0,224	2,06
P9	0,509	2,42	0,31	2,03	0,403	2,2	2,1	2,14
P10	0,141	2,71	0,232	2,07	0,282	2,45	ND	ND
P11	0,215	2,65	0,566	2,14	0,504	2,12	0,861	2,57
P12	1,15	3,23	EXITUS	EXITUS	EXITUS	EXITUS	EXITUS	EXITUS
P13	0,233	1,5	ND	ND	4,9	3,63	ND	ND
P14	0,277	2,37	0,464	2,25	0,986	2,49	ND	ND

ADN tumoral circulante (ADNtc), variaciones en el número de copias (CNVs), no data (ND) y EXITUS indica que el paciente falleció antes de que se completara el estudio.

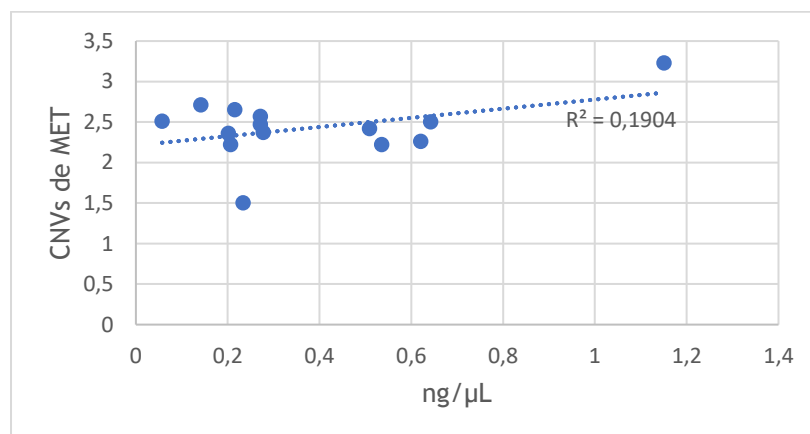


Figura 4. Correlación de Pearson entre la concentración de ADNtc y CNVs de MET basales ($R^2 = 0.1904$, $R = 0.4363$). Este resultado revela que existe una correlación positiva, aunque baja.

4.2 EXPRESIÓN DE MET EN CTCs

Las CTCs se analizaron en las cuatro fases (basal, 3 y 6 meses después del inicio del estudio y en la progresión de la enfermedad) utilizando la plataforma CellSearch® y el sistema Parsortix (Tabla 4). La Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon se calculó para comprobar si existían diferencias en cuanto a la capacidad de detección de CTCs entre ambos procedimientos. Los resultados indicaron que no había diferencias significativas [$p = 0.0584$, $CI = (-15.5 - 3)$], aunque el valor de esta prueba está muy próximo al nivel de significación ($p=0.05$). Esto puede ser debido al pequeño tamaño muestral disponible, de modo que no

podemos determinar con certeza que ambas pruebas sean igual de eficaces. De hecho, analizando los resultados visualmente vemos que Parsortix fue ligeramente más sensible, ya que pudimos identificar un total de 45 CTCs con CellSearch® y más de 200 con Parsortix. Concretamente, en la muestra del paciente P10 obtenida 3 meses después del inicio del estudio, existe una diferencia considerable entre CellSearch®, que pudo identificar 5 CTC, y Parsortix, que detectó más de 50 células individuales y 21 *clusters*. En total, se analizaron 27 muestras con CellSearch® y 20 muestras con Parsortix. El 41% de las muestras analizadas con CellSearch® (n=11) y el 80% de las que se analizaron con Parsortix (n=16) presentaba alguna CTC detectable.

Tabla 4. Detección de CTCs con CellSearch® y Parsortix y determinación del nivel de expresión de MET.

PACIENTE	BASAL		3 MESES		6 MESES		PROGRESIÓN	
	CellSearch®	Parsortix	CellSearch®	Parsortix	CellSearch®	Parsortix	CellSearch®	Parsortix
P1	3	3	ND	19	ND	9	ND	2
P2	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P3	0	19	EXITUS	EXITUS	EXITUS	EXITUS	EXITUS	EXITUS
P4	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P5	10	5	EXITUS	EXITUS	EXITUS	EXITUS	EXITUS	EXITUS
P6	ND	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P7	0	11	EXITUS	EXITUS	EXITUS	EXITUS	EXITUS	EXITUS
P8	0	5	0	ND	0	ND	2	3
P9	0	0	0	ND	0	ND	5	2
P10	2	6	5	104	2	ND	ND	ND
P11	1	0	7	0	0	ND	0	2
P12	0	6	EXITUS	EXITUS	EXITUS	EXITUS	EXITUS	EXITUS
P13	0	12	ND	ND	0	53	ND	ND
P14	2	ND	2	ND	ND	ND	ND	ND

ND “no data” indica que no se pudieron obtener esos datos y EXITUS indica que el paciente falleció antes de completarse el estudio.

Además, se determinó el grado de expresión de MET, asignándole a cada CTC detectada una puntuación según la escala P0-P3. A continuación, se agruparon las CTCs en dos intervalos: P0-P1 para las células que no expresaban MET o con un nivel bajo de expresión y P2-P3 para células con un nivel medio-alto de expresión de MET. Tras estudiar el grado de expresión de MET de cada célula de forma individual, pudimos clasificar un total de 12 CTCs con CellSearch® y 20 CTCs con Parsortix en el intervalo P2-P3. Las muestras basales, que presentaban un mayor número de datos disponibles, nos permitieron representar las diferencias en cuanto a la capacidad de detección de CellSearch® y Parsortix (Figura 5). Analizando según esta clasificación las CTCs detectadas con CellSearch® y Parsortix, vimos que el 55% de las muestras analizadas con CellSearch® (n=6) y el 44% de las muestras analizadas con Parsortix (n=7) en las que se detectaron CTCs presentaba alguna célula en el intervalo P2-P3.

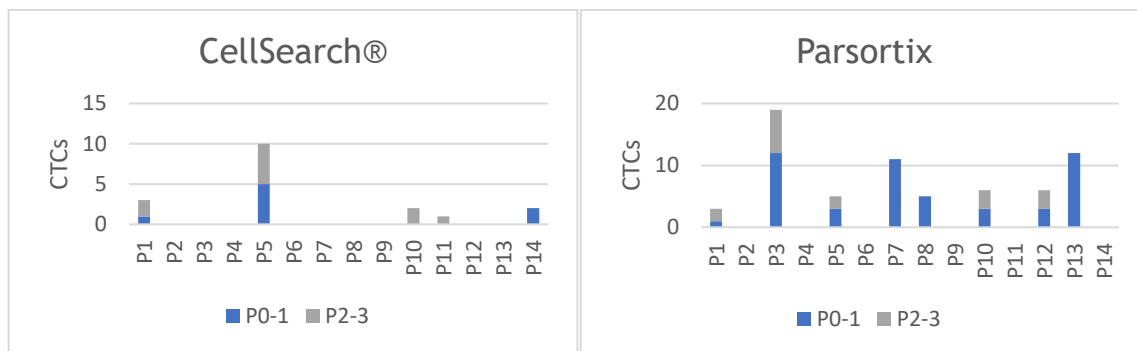


Figura 5. Número de CTCs basales identificadas con CellSearch® (izquierda) y Parsortix (derecha). Las células se clasificaron según la puntuación de acuerdo con el grado de expresión de MET. En azul se representan las CTCs que no expresan MET o con una expresión débil (puntuación 0-1) y en gris, las CTCs con una expresión moderada-fuerte de MET (puntuación 2-3).

También se analizó la repercusión del número de CTCs y el grado de expresión de MET en la SG de los pacientes utilizando el estimador no paramétrico de Kaplan-Meier. Tanto para CellSearch® como Parsortix, los datos revelan que la cuantificación de 2 o más CTCs parece estar relacionado con una peor SG. Además, la detección de 2 o más CTCs en Parsortix con una expresión moderada-fuerte de MET (P2-P3) parece estar relacionada con una supervivencia más baja, en comparación con la detección de menos de 2 CTCs con el mismo grado de expresión. Se necesitaría una cohorte formada por un mayor número de pacientes para verificar esta tendencia observada en la gráfica de supervivencia correspondiente a los pacientes de este estudio (Figura 6).

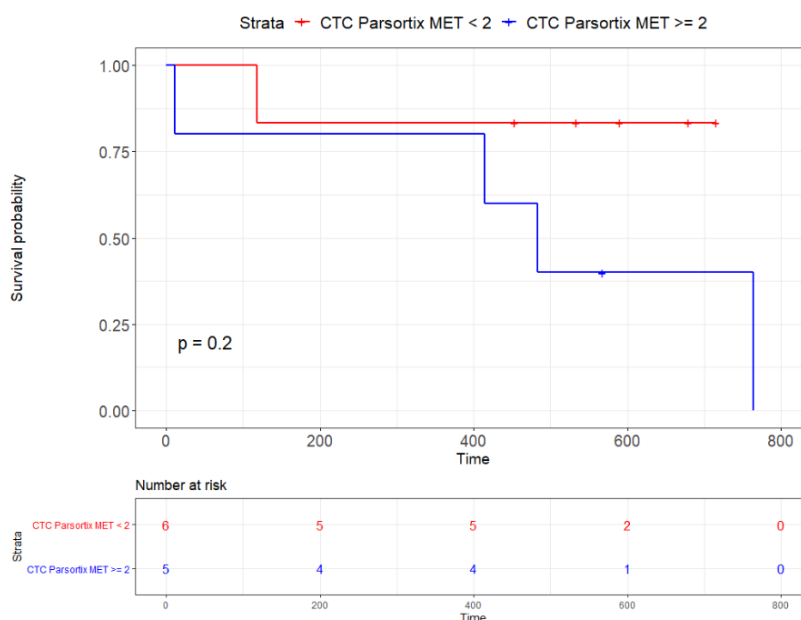


Figura 6. Valor pronóstico de la cuantificación de CTCs con Parsortix y la expresión de MET para predecir la SG en pacientes con CCC tratados con inhibidores de EGFR. En rojo se representa la supervivencia esperada cuando se detectaron < 2 CTCs con sobreexpresión moderada-fuerte de MET (P2-P3) y en azul, la supervivencia esperada cuando se detectaron \geq 2 CTCs con sobreexpresión de MET P2-P3.

5. DISCUSIÓN

El pronóstico del CCC apenas ha experimentado una mejoría en las últimas décadas y la tasa de supervivencia a los 5 años sigue siendo inferior al 50%. Podemos destacar dos factores responsables de esta baja supervivencia, que son el diagnóstico en estadios avanzados del CCC y el desarrollo de resistencias al tratamiento. Con el objetivo de controlar estas resistencias, muchos equipos de investigación luchan por mejorar el conocimiento del panorama molecular del CCC e identificar biomarcadores específicos para desarrollar terapias dirigidas eficaces (26,31). Entre los genes implicados en los procesos de carcinogénesis del CCC, *MET* aparece con frecuencia amplificado y/o sobreexpresado, y estas alteraciones se han relacionado con la presencia de resistencias primarias (fundamentalmente debidas a una amplificación genética) y resistencias adquiridas (más relacionadas con la sobreexpresión proteica) a tratamientos con inhibidores de EGFR (27).

Este estudio prospectivo fue diseñado con el objetivo de hacer un seguimiento a un grupo de 14 pacientes con CCC mientras recibían tratamiento con el inhibidor de EGFR, Cetuximab, para controlar la evolución del tumor desde un punto de vista molecular y comparar estos resultados con la progresión de cada paciente. La biopsia líquida fue el procedimiento de elección para analizar la amplificación genética de *MET* en ADNtc y la sobreexpresión proteica en CTCs por ser una técnica mínimamente invasiva que permite hacer una monitorización a tiempo real de la evolución de la enfermedad. Debido a la simplicidad y versatilidad que ofrece, se ha convertido en una herramienta muy importante en la obtención de perfiles moleculares tumorales, la selección terapéutica, la monitorización de la respuesta individual al tratamiento y la detección de lesiones residuales o recidivas (46).

Para cuantificar las CNVs de *MET* en ADNtc y detectar amplificaciones genéticas, se utilizó la ddPCR por ser un procedimiento sencillo, relativamente económico y suficientemente preciso. El 7% de los pacientes que participaron en este estudio presentó amplificación de *MET* de acuerdo con el umbral establecido (CNVs de *MET* > 2.8), aunque en el 92% de los pacientes se detectaron valores elevados de las CNVs de *MET* en la muestra basal. Además, los 4 pacientes que fallecieron antes de alcanzar la segunda fase del estudio presentaron CNVs basales > 2.5. Fue posible obtener una muestra en más de una fase en el 50% de los pacientes reclutados (n=7), lo que nos permitió hacer un seguimiento en el tiempo. El 57% de estos pacientes presentó un repunte en la concentración de ADNtc y en el valor de CNVs de *MET* en la última muestra disponible (a los 6 meses o en la progresión de la enfermedad) con respecto a la muestra de la fase anterior. En el 43% restante de pacientes, los datos no sufrieron variaciones o incluso experimentaron una disminución, tanto en la concentración de ADNtc como en CNVs de *MET*.

Varios autores han identificado la amplificación de *MET* como un factor relacionado con la adquisición de resistencias al tratamiento con Osimertinib (inhibidor de EGFR) en el cáncer de pulmón (59,60), pero también se ha asociado con la aparición de resistencias al tratamiento con Cetuximab en el CCC (61,62,63). Debido a este incremento en el desarrollo de resistencias a inhibidores EGFR, surge la propuesta de combinar fármacos dirigidos a EGFR y *MET* para bloquear de forma simultánea ambos receptores en el CCC (57,58). Aunque se está investigando la administración dual de ambos agentes terapéuticos en diferentes tipos de cáncer, es necesario que se lleven a cabo más ensayos clínicos para conocer los beneficios que podría aportar esta terapia en pacientes con CCC resistente. La determinación del estado de *MET* en el momento del diagnóstico podría ser de gran utilidad a la hora de seleccionar el tratamiento. Además, la monitorización de los pacientes durante la terapia permitiría identificar la aparición

de resistencias/recidivas. En este contexto, cobra una gran relevancia la biopsia líquida, que en el futuro podría implementarse como un procedimiento clínico rutinario para seleccionar el agente terapéutico adecuado y comprobar su eficacia en pacientes con CCC. Este planteamiento justifica el diseño de este estudio, cuyos resultados demuestran la utilidad de la biopsia líquida en la determinación del valor de las CNVs de *MET*, tanto en el momento del diagnóstico como en las distintas fases del tratamiento y en la progresión de la enfermedad, para detectar posibles resistencias primarias o secundarias a los inhibidores de EGFR en el CCC.

Los datos obtenidos tras analizar las CNVs de *MET* se compararon con el grado de expresión de MET en CTCs. La detección de este tipo de células en muestras de sangre todavía representa un desafío tecnológico, ya que el número de CTCs en la circulación es muy bajo (64). En el presente estudio se utilizaron dos técnicas para identificar las CTCs: CellSearch® y Parsortix. La plataforma CellSearch® es el único procedimiento aprobado por la FDA para detectar y enumerar CTCs y su sistema de detección emplea diferentes anticuerpos dirigidos a antígenos de superficie celular combinados con fluorocromos. A pesar de ser uno de los sistemas más utilizados en la actualidad, presenta dos inconvenientes principales: no existe un marcador que se pueda utilizar independientemente del tipo y el estadio tumoral (61) y no es capaz de detectar aquellas CTCs que han perdido los marcadores epiteliales debido al proceso de TEM. Con el objetivo de minimizar el número de falsos negativos que se pueden obtener mediante este procedimiento de selección positiva, se han desarrollado sistemas basados en otros criterios de detección e independientes de los marcadores celulares. El sistema Parsortix detecta las CTCs basándose en su mayor tamaño y menor capacidad de deformación con respecto a otras células sanguíneas (47). Este procedimiento ofrece algunas ventajas frente a los sistemas de detección marcador-dependientes. En primer lugar, es un procedimiento capaz de identificar CTCs independientemente de que estas hayan sufrido un cambio fenotípico debido a la TEM. Además, es posible recuperar las células que quedaron retenidas en el casete para someterlas a estudios moleculares. El tamaño de las CTCs oscila normalmente entre 15 y 40 μm y es ligeramente superior que el tamaño de los leucocitos (10 μm) (65), pero en algún caso se han detectado CTCs de menor tamaño cuyo diámetro se solapa con el de los leucocitos. En estos casos, el sistema Parsortix pierde capacidad de detección y omite algunas CTCs, filtrándolas con el resto de células sanguíneas (18,47).

En este estudio en pacientes con CCC, los resultados en cuanto a la capacidad de detección de CTCs fueron mejores con el sistema Parsortix, lo que indica que existe una gran variabilidad en cuanto a la expresión de marcadores epiteliales en superficie en el CCC. Por este motivo, en este tipo de tumor parece ser más eficaz un sistema de detección antígeno-independiente. La sensibilidad de Parsortix a la hora de identificar CTCs puede comprobarse en las cuatro fases de este estudio y resulta especialmente evidente en una de las muestras analizadas a los tres meses, en la que la relación entre el número de células detectadas con Parsortix y CellSearch® sigue una proporción 20:1. Parsortix detectó un número de *clusters* considerable en esta muestra que no fue capaz de identificar CellSearch®. Parece razonable que un sistema tamaño-dependiente resulte más eficaz a la hora de detectar estas agrupaciones de células que un sistema marcador-dependiente, ya que los glóbulos blancos con frecuencia rodean estas agrupaciones de CTCs y pueden dificultar la identificación por medio de antígenos. Sin embargo, los datos obtenidos tras la enumeración de CTCs mediante ambos sistemas demuestran que la variabilidad que existe en cuanto a la detección de estas células depende en gran medida del tipo de dispositivo que se utilice. Por lo tanto, se necesitan todavía más estudios y con una cohorte formada por un mayor número de pacientes para corroborar los resultados aquí obtenidos.

En cuanto a la relación entre el conteo de CTCs y el pronóstico de la enfermedad, existen estudios recientes que ponen de manifiesto que la detección de CTCs constituye un marcador de peor pronóstico en relación con una menor supervivencia en cáncer de mama (66), gástrico (67), colorrectal (68) y también en el CCC (69). Además, la sobreexpresión de MET también se ha relacionado con un empeoramiento del pronóstico, por ser uno de los mecanismos frecuentes de adquisición de resistencias al tratamiento. Concretamente, en el CCC, algunos estudios (53,60) y un metaanálisis de Sturtz y col. (33) confirman el valor pronóstico negativo de la sobreexpresión de MET en el CCC.

Todos los pacientes que fallecieron antes de completar el estudio presentaban alguna CTC en la muestra basal detectada con Parsortix. Además, todos los pacientes que pudimos reevaluar en la fase de la progresión de la enfermedad presentaron alguna CTC detectada con este mismo sistema. Estos datos ponen de manifiesto la importancia de cuantificar las CTCs para identificar enfermedad residual o recidivas en el seguimiento de estos pacientes. Pudimos identificar alguna CTC en el 60% de las muestras analizadas en las cuatro fases del estudio. Además, el 89% de las muestras en las que se aislaron CTCs mediante alguno de los dos sistemas utilizados presentaba algún grado de expresión de MET. Dentro de este grupo, en el 58% de estas muestras se detectó una sobreexpresión moderada-fuerte de MET (P2-P3).

Debido al pequeño tamaño muestral con el que trabajamos en este estudio piloto, no fue posible correlacionar el número de CTCs o el grado de expresión de MET con aspectos clínico-patológicos como la localización de la lesión primaria, el número de sitios metastásicos o la cantidad de líneas de tratamiento recibidas previamente. Sin embargo, los datos del análisis molecular pudieron relacionarse con una modificación en la tendencia del pronóstico de la enfermedad. La detección de 2 o más CTCs se ha relacionado en este estudio con una menor SG para los dos sistemas de detección empleados, siendo más evidente esta tendencia para Parsortix. Además, analizando en conjunto la cuantificación de CTCs y la expresión de MET en Parsortix, los datos indican que la detección de 2 o más CTCs con una expresión moderada-fuerte (P2-P3) de MET se asocia con una menor supervivencia en comparación con la detección de menos de 2 CTCs con el mismo nivel de sobreexpresión de MET.

Es importante tener en cuenta algunas de las limitaciones que presenta este estudio. La primera de las limitaciones es el reducido tamaño de la muestra objeto de estudio. Si bien es cierto que trabajamos con 14 pacientes en total y no pudimos obtener las muestras requeridas en las cuatro fases del estudio para todos ellos, se analizaron un total de 77 muestras durante todo el seguimiento de los pacientes. Además, al tratarse de un estudio prospectivo, la recopilación de los datos de CTCs y ADNtc se llevó a cabo con pocos días de diferencia tras la obtención de las muestras y todas ellas se analizaron con los mismos criterios, garantizando la repetibilidad y la reproducibilidad del procedimiento y evitando así el sesgo que puede producirse cuando se manejan datos de manera retrospectiva. Una segunda limitación de nuestro estudio es la discrepancia que se halló entre los resultados de los dos sistemas empleados para cuantificar CTCs y analizar la expresión de MET. Siendo CellSearch® y Parsortix dos tecnologías diseñadas para ser utilizadas de forma independiente, su aplicación complementaria podría ser favorable para validar los resultados y obtener unos valores más fiables, ya que cada procedimiento presenta criterios de detección diferentes. La heterogeneidad molecular, fenotípica y morfológica que existe entre las CTCs, incluso dentro del mismo tipo de tumor, puede explicar estas diferencias. Por una parte, aunque en un primer momento las CTCs expresen marcadores epiteliales, debido a la TEM pierden sus características epiteliales y pueden adquirir un fenotipo puramente mesenquimal o epitelio-mesenquimal, lo que limita la capacidad de detección mediante procedimientos antígeno-dependientes. Por otra parte, los

sistemas de detección tamaño-dependientes como Parsortix pierden sensibilidad cuando las CTCs que se encuentran en el torrente circulatorio son de pequeño tamaño ya que confunden estas células con leucocitos y no las detectan.

6. CONCLUSIONES

Tras analizar toda la información obtenida en este estudio prospectivo, podemos llegar a las siguientes conclusiones:

1. La detección de amplificación y/o sobreexpresión de MET, mediante técnicas de biopsia líquida, podría convertirse en una oportunidad para complementar el diagnóstico molecular del CCC, así como evaluar la evolución y respuesta al tratamiento con anti-EGFR.
2. La cuantificación de un mayor número de CTCs y la detección de sobreexpresión moderada-fuerte de MET parecen estar relacionadas con una menor supervivencia de los pacientes con CCC.
3. La identificación de alteraciones de MET, tales como la amplificación y la sobreexpresión, en el momento del diagnóstico o durante el tratamiento podría estar relacionada con la presencia de resistencias al tratamiento con anti-EGFR y justifica la necesidad de que se lleven a cabo ensayos clínicos con fármacos inhibidores de MET en pacientes con CCC que incluyan la biopsia líquida como técnica de análisis.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Mifsud M, Eskander A, Irish J, Gullane P, Gilbert R, Brown D, et al. Evolving trends in head and neck cancer epidemiology: Ontario, Canada 1993-2010. *Head Neck*. 2017;39(9):1770-1778.
2. Kawakita D, Matsuo K. Alcohol and head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2017;36(3):425-434.
3. Globocan. Disponible online: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> (citado 15 mar 2020).
4. Rettig EM, D'Souza G. Epidemiology of Head and Neck Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2015;24(3):379-396.
5. Prusinkiewicz MA, Gameiro SF, Ghasemi F, Dodge MJ, Zeng PYF, Maekebay H, et al. Survival-associated metabolic genes in human papillomavirus-positive Head and Neck Cancers. *Cancers (Basel)*. 2020;12(1):1-17.
6. Vigneswaran N, Williams MD. Epidemiologic trends in Head and Neck Cancer and aids in diagnosis. *Oral Maxillofac Surg Clin N Am*. 2014;26(2):123-141.
7. Rothenberg NJ, Stabile LP. Hepatocyte growth factor/c-Met signaling in Head and Neck Cancer and implications for treatment. *Cancers (Basel)*. 2017;9(4):1-21.
8. Marur S, Forastiere AA. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc*. 2016;91(3):386-396.
9. Mena E, Thippsandra S, Yanamadala A, Redy S, Pattanayak P, Subramaniam RM. Molecular imaging and precision medicine in Head and Neck Cancer. *PET Clin*. 2017;12(1):7-25.
10. Sivakumar M, Jayakumar M, Seedeve P, Sivasankar P, Ravikumar M, Surendar S, et al. Meta-analysis of functional expression and mutational analysis of c-Met in various cancers. *Curr Probl Cancer*. 2019;22:1-20.
11. Perks A, Agop D, Barreira E, Fricain JC, Monteiro L, Diniz M, et al. Oral cancer prevention. 2^a ed. Birmingham: Clin Photogr & Design; 2019.
12. Young D, Xiao CC, Murphy B, Moore M, Fakhry C, Day TA. Increase in Head and Neck Cancer in younger patients due to human papillomavirus (HPV). *Oral Oncol*. 2015;51(8):727-730.
13. Kang H, Kiess A, Chung CH. Emerging biomarkers in head and neck cancer in the era of genomics. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12(1):11-26.
14. Gooi Z, Chan JYK, Fakhry C. The epidemiology of the human papillomavirus related to oropharyngeal head and neck cancer. *Laryngoscope*. 2016;126(4):894-900.
15. Agarwal P, Agrawal RR, Jones EA, Devaiah AK. Social determinants of health and oral cavity cancer treatment and survival: A competing risk analysis. *Laryngoscope*. 2019;0(0):1-6.
16. Gavrielatou N, Doulmas S, Economopoulou P, Foukas PG, Psyrris A. Biomarkers for immunotherapy response in Head and Neck Cancer. *Cancer Treat Rev*. 2020;84:1-8.
17. Instituto Nacional de Cancer. Disponible online: <https://www.cancer.gov/espanol> (citado 3 feb 2020).
18. Payne K, Brooks J, Spruce R, Batis N, Taylor G, Nankivell P, et al. Circulating tumour cell biomarkers in Head and Neck Cancer: current progress and future prospects. *Cancers (Basel)*. 2019;11(8):1-13.

19. Madsen RR, Vanhaesebroeck B, Semple RK. Cancer-associated PIK3CA mutations in overgrowth disorders. *Trends Mol Med.* 2018;24(10):856–870.
20. Leblanc O, Vacher S, Lecerf C, Jeannot E, Klijanienko J, Berger F, et al. Biomarkers of cetuximab resistance in patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Biol Med.* 2020;17(1):208-217.
21. Galot R, Machiels J-PH. Current applications and challenges of circulating tumor DNA (ctDNA) in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck (SCCHN). *Cancer Treat Rev.* 2020;85:1-31.
22. Alfieri S, Carezzo A, Platini F, Serafini MS, Perrone F, Galbiati D, et al. Tumor biomarkers for the prediction of distant metastasis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers.* 2020;12(4):1-20.
23. Pall AH, Jakobsen KK, Grønhoj C, Pall AH, Jakobsen KK, Æ CG, et al. Circulating tumour DNA alterations as biomarkers for Head and Neck Cancer : a systematic review. *Acta Oncol.* 2020;0(0):1–6.
24. ClinicalTrials. Disponible online: <https://clinicaltrials.gov/> (citado 20 abr 2020).
25. Van Ginkel JH, Huibers MMH, van Es RJJ, de Bree R, Willems SM. Droplet digital PCR for detection and quantification of circulating tumor DNA in plasma of Head and Neck Cancer patients. *BMC Cancer.* 2017;17(1):1–8.
26. Moosavi F, Giovannetti E, Saso L, Firuzi O. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences HGF / MET pathway aberrations as diagnostic , prognostic and predictive biomarkers in human cancers. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2019;56(8):533-566.
27. Novoplansky O, Fury M, Prasad M, Yegodayev K, Zorea J, Cohen L, et al. MET activation confers resistance to cetuximab and prevents HER2 and HER3 upregulation in Head and Neck Cancer. *Int J Cancer.* 2019;145(3):748–762.
28. Matsumoto K, Umitsu M, De Silva DM, Roy A, Bottaro DP. Hepatocyte growth factor / MET in cancer progression and biomarker discovery. *Cancer Sci.* 2017;108(3):296-307.
29. Organ SL, Tsao MS. An overview of the c-MET signaling pathway. *Ther Adv Med Oncol.* 2011;3(1):507-517.
30. Zhang Z, Yang S, Wang Q. Impact of MET alterations on targeted therapy with EGFR-tyrosine kinase inhibitors for EGFR-mutant lung cancer. *Biomark Res.* 2019;7:1–7.
31. Szturz P, Raymond E, Abitbol C, Albert S, de Gramont A, Faivre S. Understanding c-MET signalling in Squamous Cell Carcinoma of the Head & Neck. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017;111:39–51.
32. Lacroix L, Post SF, Valent A, Melkane AE, Vielh P, Egile C, et al. MET genetic abnormalities unreliable for patient selection for therapeutic intervention in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One.* 2014;9(1):1-8.
33. Szturz P, Budíková M, Vermorken JB, Horová I, Raymond E, de Gramont A, et al. Prognostic value of c-MET in Head and Neck Cancer : A systematic review and meta-analysis of aggregate data. *Oral Oncol.* 2017;74:68–76.
34. Danilkovitch-Miagkova A, Zbar B. Dysregulation of Met receptor tyrosine kinase activity in invasive tumors F. *J Clin Invest.* 2002;109(7):863–867.
35. Van Der Steen N, Zwaenepoel K, Mazzaschi G, Luirink RA, Geerke DP, de Beeck KO, et al. The role of c-Met as a biomarker and player in innate and acquired resistance in Non-small-cell lung cancer : Two New Mutations Warrant Further Studies. *Molecules.* 2019;24(24):1-15.

36. Digumarthy SR, Mendoza DP, Zhang EW, Lennerz JK, Heist RS. Clinicopathologic and Imaging Features of Non-Small-Cell Lung Cancer with MET Exon 14 Skipping Mutations. *Cancers (Basel)*. 2019;11(12):1–11.
37. Kong LR, Salleh NUBM, Ong RW, Tan TZ, Syn NL, Goh RM, et al. A common MET polymorphism harnesses HER2 signaling to drive aggressive squamous cell carcinoma. *Nat Commun*. 2020;11(1):1-14.
38. Chu LP, Franck D, Parachoniak CA, Gregg JP, Moore MG, Farwell DG, et al. MET genomic alterations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC): rapid response to Crizotinib in a patient with HNSCC with a novel MET R1004G mutation. *Oncologist*. 2019;24(10):1305–1308.
39. De Herdt MJ, Koljenovi S, van Der Steen B, Willems SN, Noorlag R, Nieboer D, et al. MET ectodomain shedding is associated with poor disease-free survival of patients diagnosed with Oral Squamous Cell Carcinoma. *Mod Pathol*. 2019;0(0):1-18.
40. Remon J, García-Campelo R, de Álava E, Vera R, Rodríguez-Peralto JL, Rodríguez-Lescure Á, et al. Liquid biopsy in oncology: a consensus statement of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin Transl Oncol*. 2020;22:961-962.
41. Nonaka T, Wong DTW. Liquid Biopsy in Head and Neck Cancer: promises and challenges. *J Dent Res*. 2018;97(6):701–708.
42. Mathai RA, Vidya RVS, Reddy BS, Thomas L, Udupa K, Kolesar J, et al. Potential utility of liquid biopsy as a diagnostic and prognostic tool for the assessment of solid tumors: implications in the precision oncology. *J Clin Med*. 2019;8(3):373.
43. Valpione S, Campana L. Detection of circulating tumor DNA (ctDNA) by digital droplet polymerase chain reaction (dd-PCR) in liquid biopsies. *Methods Enzymol*. 2019; 629: 1-15
44. Wang Q, Yang S, Wang K, Sun S. MET inhibitors for targeted therapy of EGFR TKI-resistant lung cancer. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):1-11.
45. Shi P, Oh Y, Zhang G, Yao W, Yue P, Li Y, et al. Met gene amplification and protein hyperactivation is a mechanism of resistance to both first and third generation EGFR inhibitors in lung cancer treatment. *Cancer Lett*. 2016;380(2):494-504.
46. Lousada-Fernandez F, Rapado-Gonzalez O, Lopez-Cedrun JL, Lopez-Lopez R, Muinelo-Romay L, Suarez-Cunqueiro MM. Liquid biopsy in oral cancer. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6):1–15.
47. Kulasinghe A, Hughes BGM, Kenny L, Punyadeera C. An update: circulating tumor cells in head and neck cancer. *Expert Rev Mol Diagn*. 2019;19(12):1109–1115.
48. Byeon HK, Ku M, Yang J. Beyond EGFR inhibition: multilateral combat strategies to stop the progression of head and neck cancer. *Exp Mol Med*. 2019;51(1):1-14.
49. Deng QF, Fang QY, Ji XX, Zhou SW. Cyclooxygenase-2 mediates gefitinib resistance in Non-Small Cell Lung Cancer through the EGFR/PI3K/AKT axis. *J Cancer*. 2020;11(12):3667–3674.
50. Shimizu R, Ibaragi S, Eguchi T, Kuwajima D, Kodama S, Nishioka T, et al. Nicotine promotes lymph node metastasis and cetuximab resistance in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Int J Oncol*. 2019;54(1):283–294.
51. Nilsson MB, Sun H, Diao L, Tong P, Liu D, Li L, et al. Stress hormones promote EGFR inhibitor resistance in NSCLC: Implications for combinations with beta blockers. *Sci Transl Med*. 2017;9(415):1-22.

52. Tepper SR, Zuo Z, Khattri A, Heß J, Seiwert TY. Growth factor expression mediates resistance to EGFR inhibitors in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Oral Oncol.* 2016;56:62–70.
53. Boeckx C, Baay M, Wouters A, Specenier P, Vermorken JB, Peeters M, et al. Anti-epidermal growth factor receptor therapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: focus on potential molecular mechanisms of drug resistance. *Oncologist.* 2013;18(7):850–864.
54. Brauswetter D, Dános K, Gurbi B, Félegyházi ÉF, Birtalan E, Meggyesshazi N, et al. Copy number gain of PIK3CA and MET is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Virchows Arch.* 2016;468(5):579–587.
55. Ouyang X, Barling A, Lesch A, Tyner JW, Choonoo G, Zheng C, et al. Induction of anaplastic lymphoma kinase (ALK) as a novel mechanism of EGFR inhibitor resistance in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma patient-derived models. *Cancer Biol Ther.* 2018;19(10):921–933.
56. Nair S, Trummell HQ, Rajbhandari R, Thudi NK, Nozell SE, Warram JM, et al. Novel EGFR ectodomain mutations associated with ligand-independent activation and cetuximab resistance in Head and Neck Cancer. *PLoS One.* 2020;15(2):1–14.
57. Hartmann S, Bhola NE, Grandis JR. HGF/Met Signaling in Head and Neck Cancer: impact on the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res.* 2016;22(16):4005–4013.
58. Seiwert TY, Jagadeeswaran R, Faoro L, Janamachi V, Nallasura V, el Dinali M, et al. The MET receptor tyrosine kinase is a potential novel therapeutic target for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res.* 2009;69(7):3021–3031.
59. Mehlman C, Cadranel J, Rousseau-Bussac G, Lacave R, Pujals A, Girard N, et al. Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A multicentric retrospective French study. *Lung Cancer.* 2019;137:149–156.
60. Schoenfeld AJ, Chan JM, Kubota D, Sato H, Rizvi H, Daneshbod Y, et al. Tumor analyses reveal squamous transformation and off-target alterations as early resistance mechanisms to first-line Osimertinib in EGFR-mutant Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2020;26:2654–2663.
61. Mondelo-Macía P, Rodríguez-López C, Valiña L, Aguin S, León-Mateos L, García-González J, et al. Detection of MET alterations using cell free DNA and circulating tumor cells from cancer patients. *Cells.* 2020;9(2):1–18.
62. Du Z, Lovly CM. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Mol Cancer.* 2018;17(1):1–13.
63. Miekus K. The Met tyrosine kinase receptor as a therapeutic target and a potential cancer stem cell factor responsible for therapy resistance(review). *Oncol Rep.* 2017;37(2):647–656.
64. Costa C, Dávila-Ibáñez AB. Methodology for the isolation and analysis of CTCs. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1220:45–59.
65. Myung JH, Hong S. Microfluidic devices to enrich and isolate circulating tumor cells. *Lab chip.* 2015;15(24):4500–4511.
66. Costa C, Muínelo-Romay L, Cebey-López V, Pereira-Veiga T, Martínez-Pena I, Abreu M, et al. Analysis of a real-world cohort of metastatic breast cancer patients shows circulating tumor cell. *Cancers (Basel).* 2020;12(5):1–18.
67. Thanh Huong P, Gurshaney S, Thanh Binh N, Gia A, Hoang H, Thanh Nguyen X. Emerging role of circulating tumor cells in Gastric Cancer. *Cancers (Basel).* 2020;12(3):1–22.
68. Pan X, Zhang X. Utility of circulating tumor cells and DNA in the management of advanced

colorectal cancer. *Futur Oncol.* 2020;0(0):1-12.

69. Khan M, Khaznadar SS, Routila J, Ventelä S, Schmid E, Gebhart B, et al. Hepatocyte growth factor receptor overexpression predicts reduced survival but its targeting is not effective in unselected HNSCC patients. *Head Neck.* 2020;42(4):625-635.

70. Boschert V, Klenk N, Abt A, Janaki Raman S, Fischer M, Brands RC, et al. The influence of Met receptor level on HGF-induced glycolytic reprogramming in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2020;21(2):1-17.