



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Programa Oficial de Doctorado en Ciencias de la Salud

Título de la tesis:

**EXPRESIÓN DE SOX2 Y NANOG EN LESIONES ORALES
POTENCIALMENTE CANCERIZABLES Y EN EL CARCINOMA DE
CÉLULAS ESCAMOSAS DE LA CAVIDAD ORAL. SIGNIFICADO
CLÍNICO Y PRONÓSTICO.**

Nombre del autor

**PAULA DONATE PÉREZ DEL MOLINO
2020**



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Expresión de SOX2 y NANOG en lesiones orales potencialmente cancerizables y en el carcinoma de células escamosas de cavidad oral. Significado clínico y pronóstico.	Inglés: SOX2 and NANOG expression in potentially malignant disorders and in oral squamous cell carcinomas. Clinical and prognostic relevance.
2.- Autor	
Nombre: Paula Donate Pérez del Molino	DNI/Pasaporte/NIE: .
Programa de Doctorado: CIENCIAS DE LA SALUD	
Órgano responsable: CENTRO INTERNACIONAL DE POSTGRADO	

RESUMEN (en español)

La transformación maligna de los trastornos orales potencialmente cancerizables (TOPC) varía ampliamente, incluso en ausencia de características histológicas como la displasia epitelial. Existe una urgente necesidad por identificar nuevos biomarcadores capaces de predecir con mayor precisión el riesgo de progresión a carcinoma de estas lesiones. NANOG y SOX2 son reguladores clave de la pluripotencialidad y autorrenovación de las células troncales (*stem*) en tejidos embrionarios adultos. Ambos factores se encuentran frecuentemente sobreexpresados en múltiples cánceres, incluyendo el carcinoma oral de células escamosas (COCE), lo que sugiere un vínculo entre la malignidad y la pluripotencialidad. Recientemente, NANOG y SOX2 han sido implicados en la tumorigénesis laríngea. Sobre esta base, hemos investigado el papel de la expresión de las proteínas NANOG y SOX2 como biomarcadores de riesgo precoz en TOPC así como su impacto en el pronóstico y evolución de pacientes con COCE. Para ello, se evaluó la expresión de SOX2 y NANOG mediante inmunohistoquímica en 55 pacientes con displasia epitelial oral y en 125 pacientes con COCE. Estos resultados fueron posteriormente correlacionados con los datos clinicopatológicos y seguimiento de los pacientes. Se detectó expresión nuclear de NANOG en 2 displasias orales (3,6%) y expresión citoplasmática en 9 displasias (16,4%). La expresión de NANOG aumentaba significativamente con el grado de displasia. La expresión citoplasmática de NANOG y el grado histopatológico se asociaron significativamente con un mayor riesgo de desarrollar cáncer oral, si bien el grado de displasia fue el único predictor independiente en el análisis multivariante. La expresión citoplasmática de NANOG también se detectó en 39 (31%) de las muestras de COCE. La expresión positiva de NANOG se asoció significativamente con el consumo de tabaco y alcohol, y era más frecuente en tumores pN0 y estadios tempranos I y II. La expresión nuclear de SOX2 se detectó en 4 (7%) casos de displasia epitelial oral, usando un punto de corte del 10% de núcleos teñidos, y en 16 (29%) casos cuando cualquier núcleo positivo fue evaluado. El análisis univariante mostró que la expresión de SOX2 y el grado histopatológico se asociaban significativamente con un mayor riesgo de cáncer oral; y ambos resultaron también predictores independientes significativos en el análisis multivariante. La expresión nuclear de SOX2 se detectó en 49 (39%) de las muestras de COCE, siendo más frecuente en estadios tempranos y tumores N0, y se asoció con una mejor supervivencia. En conclusión, datos desvelan la relevancia clínica de NANOG y SOX2 en las etapas iniciales de la tumorigénesis oral, más que en la progresión de los COCE en estadios avanzados de la enfermedad. Además, nuestros hallazgos descubren un papel novedoso para NANOG y SOX2 como predictores tempranos del riesgo de cáncer oral en pacientes con



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

TOPC. Aún más importante, la expresión de SOX2 emerge como un robusto predictor independiente del riesgo de cáncer oral, que podría tener una posible aplicación clínica junto con la clasificación histopatológica para mejorar la evaluación del riesgo de cáncer.

RESUMEN (en Inglés)

Malignant transformation of the oral potentially malignant disorders (OPMD) varies widely, even in the absence of histological features such as epithelial dysplasia. There is an urgent need for novel biomarker-based systems to predict more accurately the risk of cancer progression. NANOG and SOX2 are two key regulators of pluripotency and self-renewal in embryonic and adult stem cells. Both are frequently overexpressed in multiple cancers, including oral squamous cell carcinoma (OSCC), thereby providing a link between malignancy and stemness. Recently, NANOG and SOX2 have both been implicated in laryngeal tumorigenesis. On this basis, we investigated the role of NANOG and SOX2 protein expression as early cancer risk biomarkers in OPMD, and the impact on prognosis and disease outcomes in OSCC patients. For this purpose, NANOG and SOX2 expression was evaluated by immunohistochemistry in 55 patients with oral epithelial dysplasia, and 125 OSCC patients. Later, correlations with clinical and follow-up data were assessed. Nuclear NANOG expression was detected in 2 (3.6%) and cytoplasmic NANOG expression in 9 (16.4%) oral dysplasias. NANOG expression increased with the grade of dysplasia. Cytoplasmic NANOG expression and the histopathological grading were significantly correlated with oral cancer risk, although dysplasia grading was the only significant independent predictor of oral cancer development in multivariate analyses. Cytoplasmic NANOG expression was also detected in 39 (31%) OSCC samples. Positive NANOG expression was significantly associated with tobacco and alcohol consumption and was more frequent in pN0 tumors and early I-II stages. Nuclear SOX2 expression was detected in four (7%) cases of oral epithelial dysplasia, using a cut-off of 10% stained nuclei, and in 16 (29%) cases when any positive nuclei was evaluated. Univariate analysis showed that SOX2 expression and histopathological grading were significantly associated with oral cancer risk; and both of them were found to be significant independent predictors in the multivariate analysis. Nuclear SOX2 expression was also found in 49 (39%) OSCC specimens, more frequently in early tumor stages and N0 cases, and was associated with a better survival. In conclusion, these data unveil the clinical relevance of NANOG and SOX2 in early stages of oral tumorigenesis rather than in advanced neoplastic disease and OSCC progression. Moreover, our findings uncover a novel role for NANOG and SOX2 as early predictors of oral cancer risk in patients with OPMD. More importantly, SOX2 expression emerges as an independent and robust predictor of oral cancer risk, which could be of potential clinical applicability jointly with histopathological grading to improve cancer risk assessment.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
EN CIENCIAS DE LA SALUD**



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Programa Oficial de Doctorado en Ciencias de la Salud

Título de la tesis:

**EXPRESIÓN DE SOX2 Y NANOG EN LESIONES ORALES
POTENCIALMENTE CANCERIZABLES Y EN EL CARCINOMA DE
CÉLULAS ESCAMOSAS DE LA CAVIDAD ORAL. SIGNIFICADO
CLÍNICO Y PRONÓSTICO.**

Nombre del autor

**PAULA DONATE PÉREZ DEL MOLINO
2020**

Directores

**Prof. Dr. D. Juan Carlos de Vicente Rodríguez
Dra. Dña. Juana María García Pedrero**

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero transmitir mi más profundo agradecimiento a los dos directores de mi tesis doctoral:

- Al Prof. Dr. D. Juan Carlos de Vicente Rodríguez, quien ha sido mi guía a lo largo de este proyecto y ha depositado en mí su confianza y conocimientos para poder realizar este trabajo. Gracias por brindarme con tu paciencia, tu tiempo, tu ayuda y tu apoyo a lo largo de mi pequeña vida laboral, y más allá por ser un referente y mentor a lo largo del resto de ella.
- A la Dra. Dña. Juana María García Pedrero, por ser una fuente de conocimientos, de carisma, de comprensión y de ayuda. Gracias por tu dedicación, tu amabilidad y tu paciencia.

En segundo lugar, quería agradecer su participación,

Al Prof. Dr. D. Juan Pablo Rodrigo Tapia, por el trabajo y conocimientos que aporta cada día a la comunidad científica.

A la Dra. Tania Rodríguez Santamarta, por ser una fuente de inspiración y trabajo, y por su contribución ilimitada en este proyecto.

A los Dres. Dña. Eva Allonca, Dña. Aitana Vallina, D. Francisco Hermida Prado y Dña. Rocío Granda Díaz, integrantes del IUOPA, por su contribución a la investigación y en particular a este documento.

A todos mis compañeros de Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del Hospital Universitario Central de Asturias.

A todos los residentes que me han acompañado durante estos cinco años, por ser una fuente de conocimientos, amistad y apoyo inconmensurables.

A mis padres, José y Teresa,
quienes caminan a mi lado desde
mi primer aliento. Por su amor y
apoyo incondicionales.

LISTADO DE ABREVIATURAS

○ ADH	Alcohol deshidrogenasa
○ ADN	Ácido desoxirribonucleico
○ ARN	Ácido ribonucleico
○ ARNm	ARN mensajero
○ ARN-Seq	Secuenciación masiva de ARN o transcriptoma completo
○ CCE	Carcinoma de células escamosas
○ CECC	Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello
○ CITs	Células iniciadoras de tumor
○ COCE	Carcinoma oral de células escamosas
○ COX	Ciclooxigenasa
○ CTTs	Células troncales tumorales
○ DE	Desviación estándar
○ DOE	Displasia oral epitelial
○ EGFR	Receptor de factor de crecimiento epidérmico
○ FHIT	Tríada de la histidina frágil
○ FU	Fluorouracilo
○ HR	<i>Hazard Ratio</i>
○ HUCA	Hospital Universitario Central de Asturias
○ IC	Intervalo de confianza
○ IDH	Índice de desarrollo humano
○ IHQ	Inmunohistoquímica
○ iPS	Células troncales (<i>stem</i>) pluripotenciales inducidas
○ LOH	Pérdida de heterocigosidad
○ NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
○ OMS	Organización Mundial de la Salud
○ OR	<i>Odds Ratio</i>
○ PDI	Profundidad de invasión
○ PDPN	Podoplanina
○ RM	Resonancia Magnética
○ Rb	Retinoblastoma

- SOX2>10% Tinción de SOX2 superior al 10% de núcleos positivos
- SOX2any Tinción de SOX2 en cualquier núcleo positivo
- TC Tomografía computerizada
- TCGA *The Cancer Genome Atlas*
- TEM Transición epitelio-mesenquimal
- TMAs Matrices tisulares *Tissue Microarrays*
- TOPC Trastornos orales potencialmente cancerizables
- VEGF Factor de crecimiento endotelial vascular
- VPH Virus del papiloma humano

LISTADO DE TABLAS

- **Tabla 1.** *Microorganismos y potencial papel carcinógeno. Adaptado de Kalavrezos y cols. (41).*
- **Tabla 2.** *Alteraciones citogenéticas en la progresión del CECC (76, 85, 104).*
- **Tabla 3.** *Factores considerados para la terapia adyuvante en el cáncer oral.*
- **Tabla 4.** *Criterios histopatológicos para las displasias orales. Adaptado de Barnes y cols. (156).*
- **Tabla 5.** *Factores de riesgo asociados a la malignización de las leucoplasias orales.*
- **Tabla 6.** *Biomarcadores proteicos identificados en los TOPC.*
- **Tabla 7.** *Biomarcadores glucoproteicos identificados en los TOPC.*
- **Tabla 8.** *Biomarcadores no proteicos identificados en los TOPC.*
- **Tabla 9.** *Características clinicopatológicas de los 55 pacientes con displasia oral.*
- **Tabla 10.** *Características clínicas y patológicas de la cohorte de 125 pacientes con COCE seleccionados para el estudio.*
- **Tabla 11.** *Asociaciones entre la expresión citoplasmática de NANOG y las características clinicopatológicas en pacientes con displasia oral.*
- **Tabla 12.** *Asociaciones entre la expresión nuclear de NANOG y las características clinicopatológicas en pacientes con displasia oral.*
- **Tabla 13.** *Asociaciones entre la expresión nuclear de SOX2^{> 10} (superior al 10%) y las características de los pacientes con displasia oral.*
- **Tabla 14.** *Asociaciones entre la expresión nuclear de SOX2^{any} (cualquier núcleo teñido) y las características de los pacientes con displasia oral.*
- **Tabla 15.** *Evolución de las lesiones premalignas en relación con el diagnóstico histopatológico y la expresión nuclear y citoplasmática de NANOG.*
- **Tabla 16.** *Análisis univariante de Cox para la supervivencia libre de cáncer de 55 pacientes con displasia oral clasificada según el grado de displasia y la expresión de NANOG.*
- **Tabla 17.** *Modelo multivariante de Cox para estimar el riesgo de cáncer oral en pacientes con displasia oral.*

- **Tabla 18.** Evolución de las lesiones premalignas en relación al diagnóstico histopatológico y la expresión de SOX2.
- **Tabla 19.** Análisis univariante de Cox para la supervivencia libre de cáncer en 55 pacientes con displasia oral categorizada según el grado de displasia y la expresión de SOX2.
- **Tabla 20.** Modelo multivariante de Cox para estimar el riesgo de cáncer oral.
- **Tabla 21.** Análisis univariante de Cox para la supervivencia libre de cáncer en 55 pacientes con displasia oral categorizada según la expresión individual y combinada de SOX2 >10% y NANOG.
- **Tabla 22.** Análisis univariante de Cox para la supervivencia libre de cáncer en 55 pacientes con displasia oral categorizada según la expresión de SOX2any y NANOG.
- **Tabla 23.** Asociaciones entre la expresión de NANOG y las variables clinicopatológicas en la cohorte de 125 pacientes con COCE.
- **Tabla 24.** Asociaciones entre la expresión de SOX2 y las variables clinicopatológicas en pacientes con COCE.
- **Tabla 25.** Análisis univariante de Cox para evaluar la asociación de variables clinicopatológicas y la supervivencia específica de la enfermedad en la cohorte de 125 pacientes con COCE.
- **Tabla 26.** Asociación entre la expresión de proteínas NANOG y PDPN en TOPC.

LISTADO DE FIGURAS

- **Figura 1.** *Presentación de los eventos genéticos y moleculares en la progresión de los CECC. Adaptado de Ferlay y cols. (77).*
- **Figura 2.** *Representación de la cancerización de campo. Tomada de Leemans y cols. (3).*
- **Figura 3.** *Modelo de carcinogénesis propuesto por Boudewijn y cols. (83).*
- **Figura 4.** *Criterios de irreseabilidad tumoral propuestos por la NCCN (109).*
- **Figura 5.** *Trastornos orales potencialmente cancerizables, clasificación de la OMS.*
- **Figura 6.** *Modelo jerárquico de CTTs en el cáncer oral. Adaptado de Baillie y cols. (177).*
- **Figura 7.** *Clasificación histopatológica de la cohorte de 55 displasias epiteliales orales.*
- **Figura 8.** *Análisis inmunohistoquímico de la expresión de NANOG en displasias epiteliales orales.*
- **Figura 9.** *Análisis inmunohistoquímico de la expresión de SOX2 en displasias epiteliales orales.*
- **Figura 10.** *Curvas de Kaplan-Meier para el análisis de la supervivencia libre de cáncer en la cohorte de 55 pacientes con displasia epitelial oral según la clasificación histológica.*
- **Figura 11.** *Curvas de Kaplan-Meier para el análisis de la supervivencia libre de cáncer en la cohorte de 55 pacientes con displasia epitelial oral según la puntuación en la expresión de NANOG.*
- **Figura 12.** *Curvas de Kaplan-Meier para el análisis de supervivencia libre de cáncer en la cohorte de 55 pacientes con displasia epitelial oral según la expresión nuclear de SOX2.*
- **Figura 13.** *Análisis inmunohistoquímico de la expresión de NANOG en pacientes con COCE.*
- **Figura 14.** *Curvas de Kaplan-Meier para el análisis de supervivencia específica de enfermedad en la cohorte de 125 pacientes con COCE, categorizada según la expresión de NANOG (positiva vs. negativa).*

- **Figura 15.** Análisis inmunohistoquímico de la expresión de SOX2 en pacientes con COCE.
- **Figura 16.** Curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia específica de enfermedad en la cohorte de 125 pacientes con COCE categorizada según la tinción nuclear de SOX2.
- **Figura 17.** Comparación de los niveles de expresión de ARNm de NANOG en tumores primarios (rojo) vs. tejido normal (azul) en la cohorte de 530 pacientes con CECC del TCGA usando los recursos online UALCAN.
- **Figura 18.** Comparación de los niveles de expresión de ARNm de OCT4 en los tumores primarios (rojo) vs. tejido normal (azul) en la cohorte de 530 pacientes con CECC del TCGA usando los recursos online UALCAN.
- **Figura 19.** Representaciones “Oncoprint” y “Heatmap” mostrando el porcentaje de casos con niveles elevados del ARNm de varios genes relacionados con pluripotencialidad y CTTs.
- **Figura 20.** Curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia global según la expresión de ARNm de NANOG.
- **Figura 21.** Representaciones “Oncoprint” y “Heatmap” mostrando el porcentaje de casos con niveles elevados del ARNm de SOX2, junto con las mutaciones y amplificación del número de copias del gen SOX2.
- **Figura 22.** Análisis de la expresión de ARNm de SOX2 en relación con la alteración del número de copias del gen SOX2.
- **Figura 23.** Curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia global según la expresión de ARNm de SOX2.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	11
LISTADO DE ABREVIATURAS	15
LISTADO DE TABLAS	17
LISTADO DE FIGURAS	19
TABLA DE CONTENIDO	23
1. Introducción	27
INTRODUCCIÓN	29
2. Marco teórico	33
MARCO TEÓRICO	35
¿QUÉ ES EL CÁNCER ORAL?	35
EPIDEMIOLOGÍA	35
ETIOLOGÍA	36
HISTOPATOLOGÍA	43
CARCINOGENÉISIS	45
Carcinogénesis epitelial.....	51
Oncogenes.....	52
Genes supresores tumorales.....	53
TRATAMIENTO	55
Cirugía	56
Terapia adyuvante	61
Radioterapia.....	62
Quimioterapia.....	63
Terapia biológica	64
PRONÓSTICO	65
TRASTORNOS ORALES POTENCIALMENTE CANCERIZABLES	67
MARCADORES MOLECULARES	71
CÉLULAS TRONCALES (STEM) TUMORALES	75
NANOG.....	77
SOX 2.....	78
3. Hipótesis y objetivos	81
HIPÓTESIS	83

OBJETIVOS.....	85
4. Pacientes y método.....	87
PACIENTES Y MÉTODO	89
Selección de pacientes:	89
i. Displasia epitelial oral.....	89
ii. Carcinoma oral de células escamosas.	90
Variables analizadas.....	91
i. Displasia epitelial oral.....	91
ii. Carcinoma oral de células escamosas.	91
Displasia epitelial oral: características de la muestra.....	93
COCE: Características de la muestra	95
Muestras histológicas y análisis posteriores	97
Elaboración de matrices de tejido (TMAs).....	97
Análisis de proteínas mediante inmunohistoquímica	98
Cuantificación de la tinción	99
NANOG	99
SOX2	100
Análisis estadístico	101
5. Resultados	103
RESULTADOS	105
Displasia epitelial oral	105
Expresión de biomarcadores en displasias epiteliales orales	105
Análisis de la expresión de NANOG	105
Asociaciones entre la expresión de NANOG y las variables clinicopatológicas	106
Análisis de la expresión de SOX2	108
Asociaciones entre la expresión de SOX2 y las variables clinicopatológicas	110
Asociación de la expresión de los biomarcadores con el riesgo de progresión a cáncer oral	112
Correlación entre el grado de displasia y el riesgo de cáncer oral	112
Correlación de la expresión de NANOG con el riesgo de cáncer oral.....	114
Correlación de la expresión de SOX2 con el riesgo de cáncer oral	118
Coexpresión de NANOG y SOX2 y el riesgo de progresión a cáncer oral	122
Carcinoma oral de células escamosas.....	124
Significado clínico de la expresión de los biomarcadores en la progresión del COCE y evolución de la enfermedad.....	124
Análisis de la expresión de NANOG	124
Análisis de la expresión de SOX2	128
Análisis <i>in silico</i> en pacientes con COCE de las cohortes del TCGA “ <i>The Cancer Genome Atlas</i> ”	133
Expresión de ARN mensajero de NANOG y OCT4	133

Análisis de la expresión de ARNm de SOX2 y las alteraciones en el número de copias génicas.	138
6. Discusión	143
DISCUSIÓN	145
Consideraciones sobre las características de las cohortes de pacientes estudiadas	147
Trastornos orales potencialmente cancerizables	147
Carcinoma oral de células escamosas	148
Consideraciones sobre los marcadores moleculares estudiados	151
Expresión de NANOG en los TOPC	151
Expresión de NANOG en los COCE. Significado clínico y pronóstico	155
Expresión de SOX2 en los TOPC	158
Expresión de SOX2 en los COCE. Significado clínico y pronóstico	161
COEXPRESIÓN DE NANOG Y SOX2	162
7. Conclusiones	165
CONCLUSIONES	167
8. Referencias bibliográficas	171
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	173
Anexo 1: Artículos publicados.	191

1. Introducción

INTRODUCCIÓN

El cáncer oral es el undécimo tumor más frecuente a nivel mundial (1), con una incidencia de más de 300.000 nuevos casos al año. La variante histológica más frecuente es la de células escamosas. En España, se diagnostican al año más de 4.500 casos, constituyendo un 1,1% de la mortalidad por cáncer en 2018 (2). La incidencia del carcinoma oral de células escamosas (COCE) sigue siendo mayor en los varones, aunque se está observando una tendencia al equilibrio entre ambos sexos debido al mayor consumo de tabaco y alcohol por parte de las mujeres.

La etiología de los COCE es muy variable, en la cual podemos incluir factores clásicos como el alcohol y el tabaco. Ambos son considerados los principales factores de riesgo del cáncer oral, y de forma frecuente estos coexisten en un mismo individuo obteniendo un efecto carcinogénico multiplicativo, originando cambios genéticos en la mucosa oral que van a persistir independientemente del cese de su consumo. Otros factores de riesgo son el virus del papiloma humano (VPH), bacterias, radiación, factores ocupacionales, infecciones fúngicas, dieta... Asimismo, existen condiciones genéticas que predisponen al desarrollo del cáncer oral, como son el xeroderma pigmentoso o el síndrome de Li-Fraumeni.

Tras la exposición mantenida a los agentes carcinógenos, se produce lo que Slaughter bautizó en 1953 como “cancerización de campo”. Con ello, se explica la presencia de una o varias regiones en la mucosa con células epiteliales que albergan alteraciones genéticas o epigenéticas asociadas al cáncer (3). Tras la persistencia de la exposición a carcinógenos dichas células sufren una serie de eventos genéticos adicionales que, además de un aumento de su capacidad proliferativa, les confiere capacidad invasiva, lo que conlleva la progresión a un carcinoma. Adicionalmente, en la mucosa oral y orofaríngea pueden hallarse trastornos orales potencialmente cancerizables (TOPC), los cuales son en ocasiones precursores del COCE.

Actualmente, existen técnicas de reconstrucción funcionales y estéticas que permiten realizar resecciones más amplias para la obtención de márgenes quirúrgicos libres. Además, existen tratamientos adyuvantes o neoadyuvantes como son la radioterapia, la quimioterapia y la inmunoterapia con fines complementarios, radicales o paliativos.

Existe un gran interés por identificar marcadores biológicos fiables del riesgo de progresión de los TOPC, dado que la histopatología ha demostrado un limitado poder predictivo, como nuestro grupo ha evidenciado para la podoplanina, la cortactina y la quinasa de adhesión focal (4,5). El reciente desarrollo de las tecnologías de secuenciación masiva ha impulsado numerosos estudios genómicos sobre el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CECC) que han contribuido enormemente a mejorar el conocimiento de las bases moleculares de la carcinogénesis, y con ello identificar nuevos candidatos como marcadores moleculares que podrían ser útiles no sólo para el diagnóstico precoz de tumores, sino también para predecir el comportamiento tumoral, la evolución y además podrían constituir nuevas moléculas diana con fines terapéuticos.

A pesar de los continuos avances en el tratamiento del cáncer oral y en el conocimiento molecular de los CECC, la supervivencia de pacientes con COCE no ha mejorado en los últimos años, persistiendo en torno al 50% la supervivencia global a los 5 años. Existe una imperiosa necesidad por identificar biomarcadores precoces que permitan una identificación temprana de estos tumores y de lesiones potencialmente malignizables asintomáticas, para con ello intentar mejorar el pronóstico de los COCE, ominoso en muchos casos.

De esa necesidad surge la motivación para realizar el presente estudio, en el cual se analiza la expresión de NANOG y SOX2 en trastornos orales potencialmente cancerizables y su importancia como biomarcadores de riesgo de progresión del cáncer oral, así como en etapas tardías de la progresión tumoral de los COCE y evolución de la enfermedad.

2. Marco teórico

MARCO TEÓRICO

¿QUÉ ES EL CÁNCER ORAL?

El cáncer oral se define como el conjunto de neoplasias malignas que se encuentran localizadas en la mucosa labial (superior e inferior), los dos tercios anteriores de la lengua, el suelo oral, la encía superior e inferior, la mucosa yugal, el trigono retromolar y el paladar duro (6).

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) constituye el 90% de todas las lesiones malignas de la cavidad oral (7,8). De los restantes subtipos, el más habitual es el carcinoma mucoepidermoide (54%), seguido del adenocarcinoma de bajo grado (17%) y finalmente el carcinoma adenoideo quístico (15%) (9,10).

EPIDEMIOLOGÍA

A nivel mundial, el cáncer oral supone el undécimo cáncer más frecuente (1), con una incidencia de 354.864 casos nuevos al año, siendo los países más afectados por esta patología Sri Lanka, Francia, Pakistan, India, Bangladesh y Hungría. Aproximadamente 2 de cada 100 cánceres diagnosticados son cánceres orales. En Europa, se diagnostican al año 65.726 casos nuevos (8). Anualmente 177.384 (1,9%) pacientes mueren por COCE (11). Desde 1999 hasta 2010, la incidencia del cáncer oral en Europa ha aumentado en un 26% en los varones y en un 30% en mujeres (12).

El índice de desarrollo humano (IDH) es un indicador sintético elaborado por el Programa de Naciones Unidas para el Desarrollo basado en la tenencia de una vida saludable, la adquisición de conocimiento y el disfrute de un nivel de vida digno (13). En las últimas estadísticas del cáncer global (GLOBOCAN, 2018)(11), en 2018 se observó una distribución del COCE en función del IDH, encontrando que este cáncer es más frecuente en países con un índice bajo-medio (8,7/100.000) en comparación con aquellos con un índice alto (3,9/100.000).

Concretamente en España, el cáncer de cavidad oral tuvo una prevalencia de 4.526 casos en 2018, encontrándose en la posición número 16 del total de tumores. Durante ese tiempo, el número de muertes ocasionadas por esta enfermedad fue de 1.211 personas, constituyendo un 1,1% de la mortalidad total asociada al cáncer (2). Desglosando los datos por sexo, este tipo de carcinoma es más frecuente en varones, afectando a 3.080 hombres frente a 1.284 mujeres en el año 2017. La incidencia continúa siendo menor en estas últimas, aunque se está observando una tendencia al equilibrio entre ambos sexos debido al mayor consumo de tabaco y alcohol por parte de las mujeres.

El cáncer oral es por tanto más frecuente en hombres, sobre todo a partir de la quinta década de la vida. Aproximadamente un 5% desarrollan otro tumor primario sincrónico en la cavidad oral o en el tracto aerodigestivo superior (laringe, esófago o pulmón) (14). Los tumores metacrónicos se dan entre el 10% y el 40% durante los primeros 10 años tras el tratamiento del tumor primario (15,16).

ETIOLOGÍA

En cuanto a la etiología del COCE, el riesgo del desarrollo del mismo surge de la combinación, entre otros, de aspectos genéticos, ambientales y hábitos vitales. Podemos encontrar multitud de factores idiosincrásicos, algunos de ellos intrínsecos como características hereditarias o genéticas, así como factores extrínsecos.

Dentro de los factores extrínsecos, los más destacables son:

- ✓ Tabaco: este elemento es considerado el principal factor de riesgo del COCE considerándose la causa del 33% de estos tumores (17). Su origen se encuentra en la planta *Nicotiana tabacum*, de la cual se obtiene el alcaloide volátil nicotina. Existen varias formas de consumo de tabaco (combustión, mascado, pasivo) y la variante más consumida es distinta en función de la localización geográfica. El riesgo de cáncer es directamente proporcional al número de cigarrillos diarios consumidos así como al tiempo de exposición (18). Los pacientes fumadores tienen 7-10 veces más riesgo de padecer cáncer oral frente a aquellos que nunca

han fumado (19,20). El consumo de tabaco en España ha ido disminuyendo con los años, aunque todavía el 22% de la población es fumadora diaria (8.631.651 personas) y un 25% es exfumadora, existiendo hoy en día mayor población masculina fumadora que femenina (21).

- ✓ Alcohol: también es considerado como un factor de riesgo de desarrollo de COCE (22), aunque la relación directa causa-efecto es difícil de establecer debido a la frecuente asociación entre alcohol con otras prácticas de riesgo como el consumo de tabaco. Se han propuesto varias hipótesis para justificar su papel como factor de riesgo del cáncer oral, entre las cuales podemos diferenciar (23):
 - Efecto local: induce un aumento de la permeabilidad debido a la atrofia epitelial (24–27) por el efecto disolvente del etanol, aumentando con ello la penetración de carcinógenos a través de la mucosa oral (26,28,29). Asimismo, se encuentra el acetaldehído, principal metabolito del etanol obtenido a través de la alcohol deshidrogenasa (ADH), el cual ha sido evidenciado como carcinógeno en modelos animales (30,31) y por ello posiblemente en humanos, puesto que interfiere en la síntesis y reparación del ADN, induce cambios en las cromátidas hermanas, produce mutaciones genéticas, inhibe la O6-metilguaniltransferasa (enzima encargado de reparar daños causados por agentes alquilantes) e induce neoantígenos que generan una respuesta inmune citotóxica (25,32–34).
 - Efecto sistémico:
 - A nivel hepático: por acúmulo de etanol y dificultad en la detoxificación de determinados compuestos (29,35,36), así como la activación de otros con potencial actividad carcinógena (36).
 - A nivel de glándulas salivales: induce una alteración morfológica y funcional de las mismas, conduciendo a un menor flujo salival y con ello mayor acumulación de carcinógenos sobre la superficie de la mucosa oral, incrementando su exposición y con ello el riesgo de cáncer oral (37,38).
 - En sus investigaciones, Homann y cols. observaron que el etanol parece incrementar la producción bacteriana de acetaldehído de una forma

dosis-dependiente, con un potencial carcinógeno a partir cantidades superiores a 40 gramos de etanol al día (32,39).

El alcohol y el tabaco son considerados los dos principales factores de riesgo independientes del cáncer oral, aunque de forma frecuente ambos coexisten en un mismo individuo y originan un efecto carcinogénico multiplicativo. Los sujetos fumadores y no bebedores tienen un riesgo de 5 a 7 veces superior de cáncer oral, mientras que en los pacientes fumadores y bebedores es hasta 15 veces mayor (19,23,40).

En cuanto a los microorganismos, cobran un papel especialmente importante en tumores originados en pacientes no fumadores ni bebedores (en torno al 20%), habitualmente con una edad inferior a 45 años. La Tabla 1 recoge un resumen de los diferentes tipos y sus potenciales efectos carcinogénicos.

Tabla 1. Microorganismos y potencial papel carcinógeno. Adaptado de Kalavrezos y cols. (41).

Microorganismo	Potencial mecanismo carcinógeno
Bacterias de la placa dental	Inducen la proliferación celular, inhiben la apoptosis, interfieren con la señalización celular, interacción mutagénica con la saliva
Bacterias de la enfermedad periodontal	Provocan reacciones inflamatorias y actúan sobre protooncogenes
<i>Streptococcus viridans</i>	Convierte etanol en acetaldehído
Candida	Convierte etanol en acetaldehído
Virus del Herpes Simple	Activa protooncogenes, inactiva p53
Virus del Papiloma Humano	Inmortalización de células epiteliales, interfiere con genes supresores de tumor

Podemos hablar de:

- ✓ Virus: varios tipos de virus han sido relacionados con el cáncer oral, como el Virus del Papiloma Humano (VPH) o el Virus del Epstein-Barr. En concreto, en la última década ha adquirido un papel muy importante el VPH debido a su elevada prevalencia en tumores de orofaringe, aunque con unas tasas variables según las series de pacientes y su distribución geográfica (4,4-90%) (42), y considerándose actualmente como un factor etiológico establecido para el carcinoma de orofaringe. Dentro de los tumores VPH positivos, predomina como característica la proteína p16 positiva codificada por el gen supresor tumoral *CDKN2A*. Existen dos oncoproteínas virales E6 y E7, que son fundamentales para el mecanismo de carcinogénesis y patogénia del VPH. Ambas se encuentran integradas genómicamente en las células epiteliales infectadas por este virus y están implicadas en un aumento anómalo de la proliferación celular y su diferenciación aberrante. La oncoproteína E6: (i) induce la degradación o inactivación del gen supresor tumoral p53, induciendo con ello un aumento en la proliferación celular con un consecuente acúmulo de daños en el ADN; (ii) media en la degradación del dominio celular PDZ, alterando la integridad cromosómica de la célula hospedadora y las vías de transducción de señales; y (iii) induce activación de la telomerasa, lo cual aumenta la capacidad replicativa y esperanza de vida celular. Por otro lado, la oncoproteína E7: (i) provoca la inactivación del gen supresor tumoral Rb, condicionando una sobreexpresión del factor de transcripción E2F y con ello un aumento de la proliferación celular; (ii) induce errores en la duplicación cromosómica aumentando la inestabilidad genómica; (iii) disminuye la expresión de genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I (MHC-I), contribuyendo así a la supervivencia de las células infectadas; y (iv) otras formas de alterar el ciclo celular a través de la interacción con el complejo de transcripción AP-1, inhibidores CDK, p21 y p27 (43).

La primera asociación entre el VPH y el COCE fue descrita en 1983 por Syrjänen y cols. Desde entonces, se han aportado numerosas evidencias de la infección por VPH, con una variable prevalencia, en la mucosa oral normal, los TOPC y en el COCE. En un metaanálisis realizado en 2001 que incluía 94 estudios con un total de 4580 casos, Miller y Johnston determinaron que la prevalencia

del VPH en la mucosa oral sana y en el COCE era del 10% y 46,5%, respectivamente (44). Asimismo, identificaron el VPH como factor de riesgo independiente para el COCE, con una probabilidad 2 ó 3 veces mayor en TOPC y hasta 4,7 veces mayor en COCE vs. mucosa oral normal. De forma más reciente, Syrjänen publicó en el año 2018 una revisión sistemática de la literatura sobre el VPH, el COCE y los TOPC desde 1966 hasta el 2010, cuyos resultados mostraron una prevalencia del VPH en el COCE del 33,7% vs. 12% en el grupo control, siendo el genotipo 16 el más prevalente. Asimismo, los Odds Ratio (OR) entre el COCE y el VPH y entre los TOPC y el VPH fueron de 3,98 y 4,1, respectivamente (45).

- ✓ Hongos: los hongos podrían estar involucrados en la leucoplasia oral y los cambios displásicos, principalmente a través de la conversión del etanol y la glucosa a acetaldehído y la producción de nitrosaminas por algunos géneros como la *Candida*. Se ha estimado que hasta el 40% de las candidiasis hiperplásicas crónicas podrían convertirse en carcinomas orales (41,46).
- ✓ Bacterias: las bacterias tienen la capacidad de penetrar e invadir el epitelio celular, induciendo inflamación que plausiblemente podría estar asociada con la progresión tumoral. Recientemente, Pushalkar y cols. publicaron un estudio sobre el microambiente oral en pacientes con COCE vs. pacientes sanos, con una predominancia de bacterias Gram-positivas en el primero (47). El papel de la microflora oral en la oxidación del etanol ha sido ampliamente estudiado por Homann y cols. (25,32,39,48,49), que han demostrado la producción de cantidades aumentadas de acetaldehído asociado al consumo de alcohol. El acetaldehído salival se encuentra aumentado en aquellos individuos con tendencia a la flora aeróbica (*Streptococcus salivarius*, *Streptococcus viridans* hemolítico var., *Corynebacterium* sp., *Stomatococcus* sp.). De tal modo que el etanol parece incrementar la producción bacteriana de acetaldehído de forma dosis dependiente, y a partir de cantidades superiores a 40 gramos de etanol al día (23,25). Asimismo, Homann y cols. (49) encontraron una asociación entre la escasa higiene oral de sujetos alcohólicos y el sobrecrecimiento bacteriano, repercutiendo así en una mayor concentración salival de acetaldehído y por ende mayor riesgo de cáncer.

Otros factores:

- ✓ Radiación: la exposición a la radiación ionizante, tanto la natural como la inducida por el hombre, aumenta el riesgo de varios tipos de cáncer, siendo mayor este riesgo cuando la exposición ocurre en etapas tempranas de la vida. Los pacientes sometidos a radioterapia de cabeza y cuello tienen riesgo de desarrollar un segundo tumor primario en la cavidad oral secundario a alteraciones degenerativas en el genoma celular, con un periodo de latencia variable que puede llegar a alcanzar los 40 años (50).
- ✓ Ocupacionales: es plausible pensar que la exposición a ciertas sustancias químicas en el ámbito laboral está asociada a un aumento del riesgo del cáncer oral. En una revisión sistemática publicada por Awan y cols. en 2018, se objetivó una asociación estadísticamente significativa entre un incremento del riesgo de COCE y la exposición al asbesto en ciertas actividades profesionales como la albañilería (cemento, azulejos) e industrias de automóvil (frenos, transmisiones). Asimismo, se encontró un aumento de riesgo de cáncer en profesionales del metal (níquel, cobalto, cromo, arsénico) y carbón, aunque es mayor para el cáncer de hipofaringe con una *Odds Ratio* de 2,31. Lo mismo ocurre para los trabajadores de la industria textil, como el cuero (debido a su tratamiento con cromo). Concretamente, no se ha encontrado una asociación estadística entre la exposición a formaldehído y el COCE, aunque sí con el cáncer de hipofaringe y nasofaringe (51).
- ✓ Traumatismo crónico: se ha relacionado el desarrollo del COCE con el traumatismo crónico oral, bien secundario al desgaste, restauraciones deficientes y patología dental con la aparición de cúspides filosas, o bien a prótesis mal ajustadas. Estudios experimentales en animales basados en la irritación mucosa crónica sugieren que el papel de dicha irritación contribuye a la carcinogénesis de forma multifactorial, aumentando la mitosis para reparar el daño tisular (lo cual puede aumentar el riesgo del daño del ADN por otros agentes, como por ejemplo el VPH), se produce la liberación de mediadores químicos y de estrés oxidativo, se alteran factores de transcripción y se induce la angiogénesis (52–55).

- ✓ Dietas y hábitos alimenticios: una baja ingesta de frutas y verduras está asociada con un aumento del riesgo del cáncer oral. Se ha sugerido que una dieta rica en grasas monoinsaturadas (carne roja, queso, cerdo, pasta) y pobre en micronutrientes (vitamina E, A, C, folato, selenio, cobre, níquel) están asociados fuertemente con un aumento del riesgo del cáncer oral (56). Se ha investigado la relación entre los niveles séricos del Zinc y el cáncer de cabeza y cuello, observando que el estado basal del primero se correlaciona con el tamaño y el estadio de los tumores malignos (57). Otros alimentos relacionados con el cáncer oral son aquellos que contienen nitrosaminas o hidrocarburos policíclicos.
- ✓ Farmacológicos: recientemente se ha observado que el tratamiento con algunos subtipos de medicación inmunosupresora y quimioterápica se ha asociado con el desarrollo de COCE. Se ha observado que el tratamiento a largo plazo con doxorubicina pegilada, un fármaco utilizado para el tratamiento del carcinoma papilar seroso recurrente de ovario, sarcoma de Kaposi secundario a inmunodeficiencia adquirida, tumor desmoide y carcinoma de mama metastásico, está asociado con el desarrollo de COCE (58–60) y con la aparición de leucoplasias orales como un factor de riesgo independiente a partir de dosis acumulativas superiores a 400 mg/m² (61). En pacientes inmunosuprimidos secundariamente a trasplante de órgano sólido, se ha observado un incremento en el riesgo de CECC, particularmente de labio (*Hazard Ratio* (HR) 4,02) seguido de lengua (HR 3,49). Este riesgo es especialmente mayor en pacientes tratados con anticuerpos monoclonales como tratamiento de inducción y en aquellos con ciclosporina y azatioprina como tratamiento de mantenimiento (62).

En cuanto a los factores intrínsecos, podríamos hablar de condiciones genéticas que están asociadas con un incremento en el riesgo de carcinoma de cabeza y cuello, y en concreto con el COCE. Entre ellos se encuentran el Xeroderma Pigmentoso, la Anemia de Fanconi, Ataxia-telangiectasia (Síndrome de Louis-Bar) o el Síndrome de Li-Fraumeni, entre otros.

También podemos encontrar factores que podrían disminuir el riesgo de desarrollo del cáncer oral, como son los vegetales sin almidón, algunas frutas y los

carotenos. De forma natural, aquellos alimentos que contienen antioxidantes son considerados factores protectores para el cáncer, sobre todo el retinol, los β -carotenos y la vitamina E. Existen estudios que abogan por el uso de β -carotenos para el tratamiento de leucoplasias orales con posibles efectos protectores e incluso remisiones (63). En un estudio publicado por Nagaeo y cols.(64) se ha observado que niveles séricos altos de β -caroteno y licopeno reducen el riesgo de leucoplasia en la población japonesa. La metformina (a través de la activación de la proteína quinasa dependiente de adenosín monofosfato cíclico (AMPK)), las estatinas (a través de la inhibición de la vía del mevalonato) y los medicamentos antiinflamatorios (inhibidores de ciclooxigenasa COX-2) podrían tener un efecto beneficioso sobre el cáncer, aunque con resultados no concluyentes hasta ahora.

HISTOPATOLOGÍA

La histología del COCE se caracteriza por la presencia de islotes y/o cordones de células epiteliales malignas, con mayor o menor diferenciación hacia la morfología escamosa. Estas células tumorales presentarán un citoplasma eosinófilo, con un gran núcleo y un incremento en la relación núcleo/citoplasma. De forma ocasional podemos observar perlas córneas, que son el resultado de la producción de queratina por parte del epitelio escamoso (65).

Dentro de la histopatología tumoral, deben analizarse asimismo otros datos, como (66):

- ✓ Grado de diferenciación tumoral. En función del grado de similitud entre las células tumorales con las células epiteliales primitivas, basada en la clasificación de Broders de 1926 (67) y modificada posteriormente por otros autores, podemos hablar de tumores (68):
 - Bien diferenciados. Similares al tejido original en más de un 75%, estos tumores producen grandes cantidades de queratina, y aún existe maduración celular desde el estrato basal.

- Moderadamente diferenciados. Similares entre un 50 y 75%, siempre con menos de un 50% de células indiferenciadas. Aún podemos encontrar queratina, pero en menor cantidad, y observamos más pleomorfismo nuclear y celular.
- Pobremente diferenciados. Con más del 75% de células indiferenciadas que tienen una producción de queratina ausente o casi nula y con una alteración severa de su morfología epitelial y celular, siendo apenas reconocible el epitelio original. Tiene intensa actividad mitótica y pleomorfismo nuclear y celular.
- ✓ Además del grado de diferenciación tumoral, se han ido introduciendo otros parámetros, como son el grado de pleomorfismo nuclear, el tipo de patrón de invasión y el grado de infiltrado leucocitario.
- ✓ La invasión perineural refleja una afinidad tumoral por el tejido nervioso, asociada con un peor pronóstico (69).
- ✓ La invasión perivascular, descrita como la presencia de células tumorales dentro de un revestimiento endotelial definido, ya sea un vaso sanguíneo o linfático, cuya presencia también está asociada a un peor pronóstico (69).
- ✓ La Profundidad de Invasión Tumoral (PDI): mide el espesor tumoral desde la membrana basal hasta la zona tumoral más profunda. Se ha añadido recientemente al nuevo sistema de clasificación TNM asociado con un mayor riesgo de metástasis ganglionar y una menor supervivencia (70).

Existe una variante epitelial del COCE conocida como carcinoma verrugoso de Ackerman. Este tumor se caracteriza microscópicamente por estar compuesto por una engrosada capa de células tumorales epiteliales bien diferenciadas y una amplia base tumoral con papilas bulbosas que se invaginan hacia el estroma y mantienen característicamente una membrana basal intacta, aunque podemos encontrar inflamación crónica linfocítica y de células plasmáticas a nivel del tejido conjuntivo. Las células tumorales muestran poca actividad mitótica, pleomorfismo e hiper cromatismo. Algunas variantes pueden incluir atipias celulares, con rasgos displásicos más intensos, e incluso zonas de carcinoma *in situ*. Otras variantes existentes son el carcinoma de células fusiformes, el carcinoma adenoescamoso y el carcinoma escamoso basaloides.

CARCINOGENESIS

El proceso a través del cual una célula sana se transforma en tumoral se conoce como carcinogénesis. El cáncer es el resultado de un complejo proceso multietapa que resulta en una proliferación celular incontrolada formando un tumor y la posterior adquisición de la capacidad de invadir y colonizar otros tejidos y estructuras locales, regionales y a distancia, contribuyendo todo ello al desarrollo de metástasis. Todo este proceso viene definido esencialmente por una serie de cambios, que podríamos a su vez clasificar en: (i) alteraciones genéticas en la propia secuencia del ADN, las cuales incluyen inserciones, deleciones, amplificaciones y mutaciones genéticas y (ii) cambios epigenéticos que afectan a la expresión de los genes, como el silenciamiento causado por hipermetilación de las islas CpG de los promotores de varios genes como *CDKN2A* (codifica p16^{INK4a}) o *MLH1* (71).

La exposición continuada a carcinógenos provoca alteraciones genéticas (mutaciones somáticas) en las células epiteliales. Por otro lado, las propias características genéticas del individuo pueden hacerle más vulnerable para el desarrollo del cáncer (mutaciones germinales). Se han definido una serie de propiedades celulares o biológicas que se adquieren y caracterizan a los tumores malignos, descritas como sellos distintivos (“*hallmarks*”) del cáncer por Hanahan y Weinberg en el año 2000 (72), y posteriormente modificadas y ampliadas por los mismos autores en el año 2011 (73), siendo finalmente las siguientes:

- ✓ Independencia en las señales de crecimiento. Una de las características fundamentales de las células tumorales es su capacidad ilimitada de crecimiento gracias a la mutación de genes involucrados en las vías de señalización que mantienen activa la proliferación celular, como son MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos), el oncogén RAS o la vía PI3K-Akt-mTOR.
- ✓ Invasividad y metástasis. Las células tumorales adquieren capacidad para invadir tejidos y estructuras adyacentes y posteriormente diseminarse a lo largo del organismo, proceso conocido como metástasis. En este proceso cobran importancia las proteínas de la familia de las Cadherinas, en concreto la E-

Cadherina, cuya menor expresión favorece la pérdida de adhesión intercelular y con la matriz extracelular.

- ✓ Insensibilidad a estímulos que inhiben el crecimiento. Esto permite mantener una alta tasa de proliferación celular. Dos genes clave asociados a esta peculiaridad serían los supresores tumorales RB1 y p53. El gen *RB1* es un gen supresor tumoral cuya mutación en la proteína Rb está asociada al tumor conocido como Retinoblastoma. Por otro lado, el gen *TP53* es otro supresor tumoral con un papel fundamental en la regulación del ciclo celular, y cuya mutación se encuentra por ejemplo en el Síndrome de Li-Fraumeni. Mutaciones de p53 se detectan de forma frecuente en los CECC y COCE.
- ✓ Potencial ilimitado para la replicación. La mayor parte de las células tienen un número limitado de divisiones, proceso conocido como límite de Hayflick (74). Las células tumorales inducen la expresión y actividad de una proteína conocida como telomerasa, la cual permite una capacidad replicativa ilimitada y la inmortalidad celular.
- ✓ Incremento de la angiogénesis: Las células tumorales se dividen de forma constante precisando alta demanda de nutrientes y oxígeno. Debido a la rápida velocidad de replicación, se produce una hipoxia celular. Para suplir dicha necesidad, se induce la formación de nuevos vasos sanguíneos mediante la liberación de factores proangiogénicos como VEGF, FGF, e interleucinas (o la pérdida de reguladores negativos) por parte del propio tumor o las células del microambiente que lo rodea.
- ✓ Reprogramación del metabolismo energético. La hipoxia celular junto con ciertas mutaciones conducen al conocido como efecto Warburg, hipótesis según la cual las células tumorales utilizan la glicólisis anaerobia como fuente de energía, independientemente de la existencia de niveles adecuados de oxígeno (73,75).
- ✓ Evasión del sistema inmune. Debido a que las células tumorales son células del propio organismo, existe una cierta inmunotolerancia a las mismas. A esto hay que añadir que gracias a las mutaciones que van acumulando, se produce un recambio antigénico constante y la producción de ciertas proteínas inmunomoduladoras e inmunosupresoras (74). Gracias a estas propiedades, entre otras, las células tumorales son capaces de evadir la respuesta inmune.

- ✓ Evasión de la apoptosis. Se altera la homeostasis celular y disminuye la apoptosis, como proceso fisiológico fundamental para evitar la transmisión de material genético alterado. Su evasión fomenta el acúmulo de daños y mutaciones en el ADN celular. Mutaciones de la familia de la proteína Bcl-2 han sido ampliamente estudiadas en diferentes tipos de cáncer y se han asociado con este fenómeno.

Aunque algunos casos de cáncer son el resultado de una predisposición genética causada por alteraciones genéticas germinales que aumentan el riesgo de un individuo a desarrollarlo, el cáncer es en general una enfermedad genética de las células somáticas. Los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (CECC) se encuentran a menudo asociados a una gran variedad de alteraciones histopatológicas de la mucosa epitelial. En 1996, Califano y cols. (76) realizaron un estudio para establecer una correlación entre alteraciones fenotípicas, es decir clínicas, y su progresión en función de las alteraciones genotípicas. En este modelo de progresión se establece una asociación entre los cambios genéticos que van aconteciendo en las diferentes etapas desde la mucosa normal para el subsecuente desarrollo de un carcinoma invasivo (Figura 1).

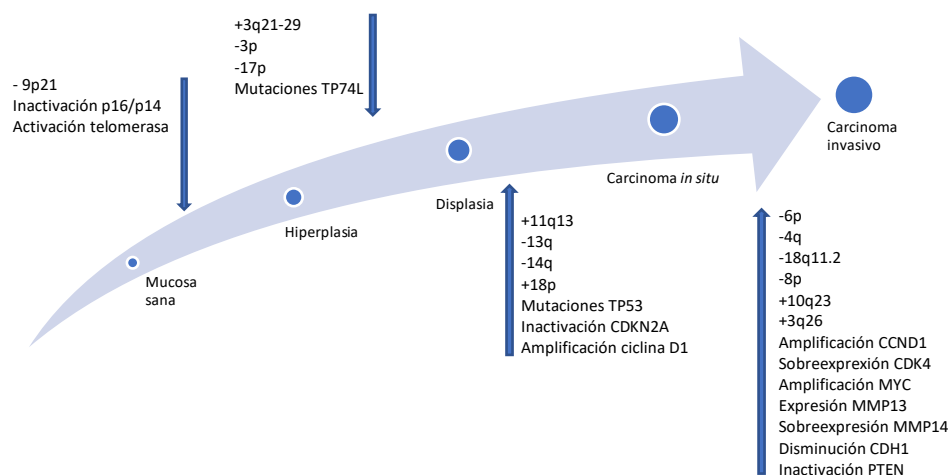


Figura 1. Presentación de los eventos genéticos y moleculares en la progresión de los CECC. Adaptado de Ferlay y cols. (77).

Es la acumulación de eventos genéticos y no el orden de los mismos lo que determina la progresión de una lesión. De forma genérica, cuanto mayor es el intervalo de tiempo existente entre los eventos genéticos, más concuerda con el orden indicado.

Asimismo, Califano (76) realizó un estudio sobre las bases genéticas de la “cancerización de campo” mediante análisis genético para detectar alteraciones en las células de la mucosa que rodean tumores y que, a su vez, albergan las mismas alteraciones genéticas. Observó con una frecuencia creciente la pérdida de genes supresores de tumor a medida que aumentaba la etapa histológica.

La “cancerización de campo” fue propuesta previamente por Slaughter y cols. en 1953 (78). Según este modelo, dentro de una misma región anatómica, que incluye mucosa sana próxima a lesiones premalignas, podemos encontrar áreas con diferente histopatología pero con eventos genéticos tempranos comunes a los carcinomas, a los que posteriormente se asocia una pérdida genética adicional obteniendo un fenotipo celular cada vez más similar al tumoral. Este concepto es muy importante para el pronóstico de los CECC, puesto que en esta región se han obtenido tasas de recidiva de hasta un 30% (14,15). El término “cancerización de campo” se ha utilizado para describir la mayor prevalencia en la aparición de tumores sincrónicos o metacrónicos en regiones precancerosas debido a una exposición prolongada a carcinógenos. Basándose en hallazgos moleculares recientes, la “cancerización de campo” se define como la presencia de una o varias regiones en la mucosa con células epiteliales que tienen alteraciones genéticas o epigenéticas asociadas al cáncer (3), sin capacidad invasiva ni metastásica. Estos hallazgos incluyen la identificación de las mutaciones de *TP53* y la pérdida de heterocigosidad (LOH) en los *loci* cromosómicos 3p, 9p y 17p, regiones implicadas en la regulación del ciclo celular, como los eventos moleculares más precoces en el desarrollo del cáncer (79). Esto proporciona a la célula una mayor capacidad proliferativa, creando un campo precanceroso con una ventaja, y sumando un *continuum* de mutaciones genéticas. La capacidad invasiva del cáncer es adquirida en eventos oncológicos más tardíos situados en los *loci* 8p, 13q y 18q, además de otros asociados con la transición epitelio-mesénquima relacionados con la disminución de la expresión de moléculas de adhesión como las E-cadherinas.

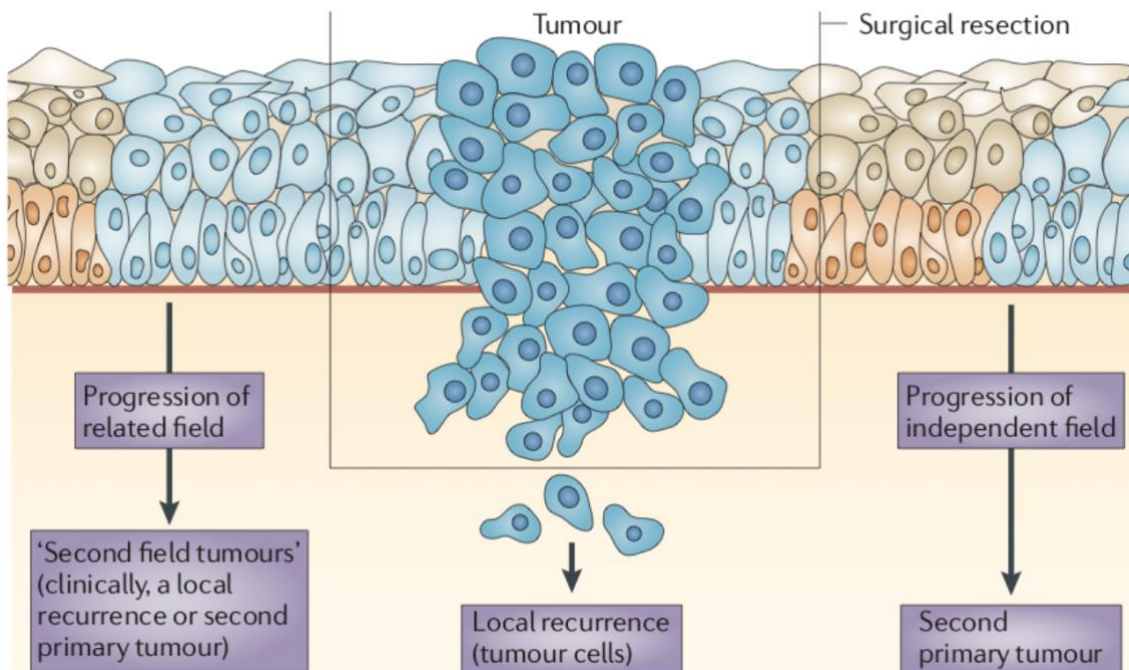


Figura 2. Representación de la cancerización de campo. Tomada de Leemans y cols. (3).

Con el concepto de cancerización de campo podemos hablar de dos tipos de recidiva basándonos en un campo precursor de origen monoclonal, el cual puede o no incluir alteraciones displásicas (80). Este campo puede ser fuente de recidivas locales (menos de 2 cm de distancia o en menos de 3 años tras la intervención del tumor primario) y/o de segundos tumores primarios, para lo cual se precisan más alteraciones genéticas que las ya existentes en un campo precanceroso (Figura 2).

La “cancerización lateral” se incluyó posteriormente para mostrar que la diseminación lateral de los tumores se debe a una transformación progresiva de las células adyacentes al tumor, en lugar de la propagación y destrucción de las células epiteliales sanas adyacentes por las células tumorales preexistentes (81). En un estudio retrospectivo publicado por Tabor y cols. en 2004, se estimó que hasta un 62,5% de los segundos tumores primarios de CECC se producen en campos clonales genéticamente similares que quedan tras la resección (82).

En las últimas décadas se han realizado numerosos estudios para el análisis histopatológico y genómico del epitelio próximo al tejido tumoral y a los márgenes quirúrgicos, utilizando diferentes marcadores y técnicas como las LOH, la inestabilidad

cromosómica, alteraciones de microsatélites, mutaciones en el gen *TP53*, detectados mediante inmunohistoquímica e hibridación *in situ*. Mediante estas técnicas, se ha demostrado la existencia de un grupo o “parche” de menos de 200 células con inmunotinción positiva para p53, y cuyo tipo de mutación difiere de la existente en el tumor (Figura 3). Ese parche celular consistiría en un clon celular originario de una célula troncal que adquiere una mutación en *TP53*, la cual le otorga una ventaja proliferativa frente al resto celular, y es transferida a sus células sucesoras. De esta forma, las siguientes generaciones celulares con capacidades proliferativas superiores se convierten en un clon en expansión, desplazando lateralmente el tejido epitelial sano, y adquiriendo nuevos eventos genéticos, creando a su vez subclones dentro de un mismo campo, hasta que uno de éstos adquiere las alteraciones genómicas necesarias como para evolucionar a un clon invasivo. La posibilidad de que ocurra el último evento transformador en un paciente será proporcional a la cantidad de células troncales (*stem*) afectadas y la acumulación de sucesivos cambios (“*hits*”) oncogénicos. En este modelo de carcinogénesis se hace hincapié en dos pasos críticos: (a) la creación de un parche monoclonal de células con crecimiento incontrolado; (b) un eventual momento transformador, creando un clon invasivo y metastásico (79).

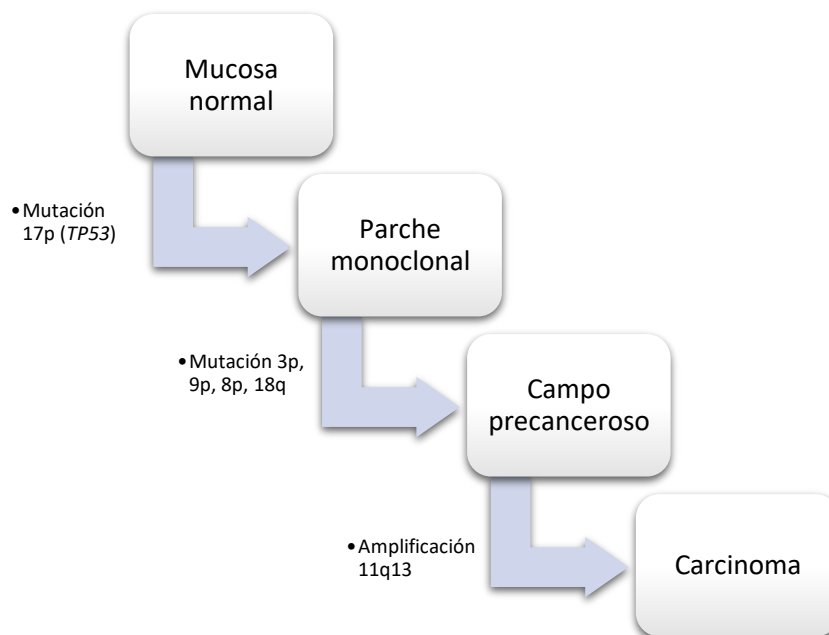


Figura 3. Modelo de carcinogénesis propuesto por Boudewijn y cols. (83).

Carcinogénesis epitelial

La carcinogénesis se puede resumir como el conjunto de procesos a través de los cuales se desarrolla una neoplasia maligna. Esta génesis es el resultado de numerosas alteraciones moleculares que afectan a diferentes genes, entre las cuales destacan genes implicados en la prevención del desarrollo tumoral (genes supresores tumorales) y genes cuya alteración favorece la aparición tumoral (oncogenes). La carcinogénesis se divide en tres fases principales, y en cada una de ellas van a sucederse distintas alteraciones genéticas que favorecerán el desarrollo tumoral.

- ✓ Fase de iniciación o activación: esta fase comienza con las alteraciones a nivel del ADN celular de forma secundaria a la exposición a carcinógenos, creando un clon celular con superioridad proliferativa. Una célula germinal del estrato suprabasal adquiere una mutación, que se irá transmitiendo a su vez las sucesivas células hijas en las diferentes rondas de división celular. No podremos observar cambios en la mucosa oral, puesto que únicamente se trata de alteraciones genéticas, sin expresión fenotípica.
- ✓ Fase de promoción tumoral: en ella se produce una expansión clonal selectiva de las células anteriormente mencionadas. El clon celular se verá expuesto a carcinógenos, tanto endógenos como exógenos, que promoverán la aparición de nuevas mutaciones y a su vez afectarán propiedades celulares. En esta fase, pueden observarse cambios fenotípicos en la mucosa oral, observando lesiones precancerosas como por ejemplo la leucoplasia oral.
- ✓ Fase de progresión tumoral: el clon celular va adquiriendo más alteraciones genéticas que le confieren características y capacidades superiores, apareciendo subclones a su vez con nuevas propiedades hasta que finalmente alguno de ellos adquiere las propias de una célula tumoral. En esta fase, además de los cambios fenotípicos, las células tumorales adquirirían la capacidad de penetrar y extenderse más allá de la membrana basal y de diseminarse a tejidos adyacentes y a distancia.

Se necesitan invariablemente innumerables fenómenos mutagénicos que van acumulándose en una célula germinal con un fenotipo normal para que evolucione a

una totalmente cancerosa. Como si de una evolución darwiniana se tratase, de forma sucesiva las células van adquiriendo mutaciones que les confieren características proliferativas ventajosas y superiores en comparación con las células adyacentes. Se estima que son necesarios entre 5 y 10 eventos genéticos acumulados en una célula para que su fenotipo evolucione de normal a maligno (84). Como se indicó previamente, existen alteraciones genéticas precoces importantes para la iniciación y promoción tumoral, como son las que afectan al gen *TP53* y las LOH en los *loci* 3p, 9p21 y 17p13 (Figura 1). Asimismo, otros eventos oncológicos más tardíos se dan en los *loci* 8p, 13q y 18q, además de aquellos relacionados con la pérdida de expresión de E-cadherina, importantes para la invasividad y diseminación tumoral.

Existen numerosas alteraciones citogenéticas subyacentes al desarrollo de CECC. Las más frecuentes en estos tumores son la ganancia de 3q, 8q, 9q, 20q, 7p, 11q13 y 5p, y la pérdida de 3p, 9p, 21q, 5q, 13q, 18q, 17p y 8p. Los cariotipos a menudo proporcionan una explicación del mecanismo por el cual surgieron las alteraciones genéticas moleculares. Por ejemplo, las ganancias y pérdidas coordinadas que involucran brazos enteros de los cromosomas 3, 5, 7, 8 y 9 a menudo resultan en la formación de isocromosomas. Además, aparentes desequilibrios alélicos pueden no representar LOH, sino la ganancia o amplificación del gen (85).

Oncogenes

Los protooncogenes son genes de acción dominante que suelen participar en procesos de crecimiento y proliferación celular. Cuando un alelo sufre una mutación, se transforma en un oncogén, cuyos productos proteicos alterarán la regulación del ciclo celular. Oncogenes importantes en los CECC son *CCND1*, *EGFR* y *MYC*.

- ✓ Amplificación de 3q26-27: es una de las alteraciones genéticas más frecuentes en los CECC. Se observa con mayor frecuencia en tumores positivos para el VPH (86) y se ha relacionado con peor pronóstico (87). Entre otros, se ha asociado con un aumento en el número de copias del gen *PIK3CA* y una sobreexpresión en su producción proteica p110 (subunidad catalítica de la fosfatidil-inositol 3 quinasa, PI3K), que se ha relacionado con fenómenos de transformación celular.

- ✓ Amplificación 7p: asociada con un incremento en el número de copias del gen *EGFR* en aproximadamente un tercio de las líneas celulares mediante el análisis citogenético clásico. Rubin Grandis y cols. (88) mostraron que un incremento en la expresión de *EGFR* induce la activación persistente de *STAT3* y con ello un crecimiento tumoral por un mecanismo antiapoptótico.
- ✓ Amplificación 8q: considerada clave en los eventos genéticos iniciales de la progresión tumoral en los CECC. Se ha asociado con una consecuente amplificación y sobreexpresión de genes como *MYC* (89) o *FAK* (4) con un papel importante en los COCE.
- ✓ Amplificación de 11q13: contiene el locus del gen *CCND1* que codifica la Ciclina D1, el cual se encuentra amplificado hasta en la mitad de los CECC y juega un papel importante en el cáncer oral. La Ciclina D1 es una proteína clave para la regulación del ciclo celular; se une a otras quinasas dependientes de ciclina (*CDK4* o *CDK6*) y fosforila e inactiva la proteína supresora tumoral del retinoblastoma (*pRB*). La sobreexpresión de *CCND1* reduce los requerimientos celulares de factores de crecimiento o mitógenos, acelera el paso celular de G1 a S, propagando daños en el ADN y aumentando el crecimiento celular.

Además, también contiene otros genes con un aumento de su expresión asociado a la amplificación, como *CTTN*, que codifica la Cortactina, un importante regulador del citoesqueleto y la invasión celular, *TPCN2*, *ORAOV1* (*TAOS1*), *FADD*, *FGF19*.

Se han publicado numerosos estudios sobre la relación entre la sobreexpresión de la proteína Ciclina D1 y los CECC, encontrando que niveles altos de la misma se relacionan con menor tiempo de recidiva (90), mayor estadio tumoral, afectación linfática, disminución de la supervivencia y peor pronóstico (91–93). Además, se ha informado que la sobreexpresión de Ciclina D1 parece alterar la sensibilidad tumoral a la radiación ionizante (94).

Genes supresores tumorales

Los genes supresores tumorales son “guardianes” de la proliferación celular, con una acción recesiva. Pueden inhibir el crecimiento o promover la muerte celular. Cuando los

dos alelos sufren una mutación, se inactivan o se pierden, se altera el control del crecimiento y muerte celular. Podemos clasificar los genes supresores tumorales en dos tipos: los *gatekeepers*, que controlan la proliferación celular y son reguladores negativos de la misma como *TP53*, *RB1*, *DDC*, *APC* y *CDKN2A*; y los *caretakers*, los cuales mantienen la estabilidad e integridad del genoma mediante la reparación del ADN, como *ATM*, *MSH 2* y *MLH1* (85).

- ✓ Pérdida 3p: se ha observado esta pérdida en lesiones orales displásicas, pudiendo constituir una alteración genética temprana en el desarrollo de los COCE (95). El locus 3p14.2 contiene el gen *FHIT* (tríada de la histidina frágil), un gen supresor tumoral cuya pérdida podría asociarse con el desarrollo y/o progresión del CECC.
- ✓ Pérdida 8p: contiene al menos 3 regiones asociadas con la progresión de los COCE (96).
- ✓ Pérdida 9p: la alteración en 9p21 es la más frecuentemente observada en los CECC, alcanzando hasta el 72% en la serie de Riet y cols. (97) (Tabla 2). Incluye mutaciones y/o metilación en el gen *CDKN2A*, que codifica la proteína p16/INK4A, la cual se considera una de las más precoces del desarrollo del cáncer oral. Asimismo incluye otras alteraciones en genes inhibidores de quinasas dependientes de ciclina, como p15/CDKN2B, p18/CDKN2C y p19/CDKN2D (98). Estos genes son cruciales para el control (*check point*) de la fase G1 del ciclo celular, cuya inactivación facilitarían el incremento de la proliferación celular acumulando daños en el ADN.
- ✓ Pérdida 17p13: contiene el gen *TP53*, que codifica la proteína p53, la cual funciona como un importante regulador transcripcional y controlador de la calidad del ADN al final de la fase G1 del ciclo celular. Si se detectan daños en el ADN, aumentan los niveles de p53, frenando así la replicación celular y conduciendo a la célula a apoptosis. Es un gen ampliamente relacionado con la carcinogénesis de los CECC, y está asociado concretamente con alteraciones precoces displásicas en la mucosa oral (99) y la cancerización de campo (83), pudiendo encontrar una mutación en este gen en el 50% de los CECC (100).
- ✓ Pérdida 18q: se alteran numerosos genes supresores tumorales identificados en el brazo largo del cromosoma 18, como son *DDC*, *DPC4*, *MADR2*, y varios

miembros de la familia de las Serpinas *PI5*, *SCCA1*, *SCCA2*, *PAI2* y *PI13*. Este último se expresa en la mucosa oral normal, mientras que disminuye en los COCE (101,102). La pérdida de 18q se asocia con peor pronóstico en CECC (103).

Tabla 2. Alteraciones citogenéticas en la progresión del CECC (76,85,104).

Descripción histopatológica	Cambio citogenético	Frecuencia (%)	Posible gen
Lesión precursora o hiperplasia benigna Displasia	Pérdida 9p21	73	<i>CDKN2A</i>
	Pérdida 3p	67	<i>FHIT</i> ; más de 2 otros loci de genes supresores tumorales
	Pérdida 17p13	55	<i>TP53</i>
Carcinoma <i>in situ</i>	Amplificación 11q13	61	<i>CCND1</i> , <i>CTTN</i>
	Pérdida 13q21	52	Nuevo gen supresor
	Pérdida 14q24	44	No informado
Carcinoma invasivo	Pérdida 6p	38	Gen supresor no identificado
	Pérdida 8p23	40	Gen supresor no identificado
	Pérdida 4q26-q28	47	No informado

TRATAMIENTO

La cirugía es el tratamiento de elección para el COCE (105,106). Mediante la resección tumoral se consigue obtener una estadificación tumoral más certera, incluyendo información histopatológica tumoral y márgenes quirúrgicos. Además, existen otras modalidades de tratamiento, como son la radioterapia y la quimioterapia, cuyo uso dependerá del estadio tumoral y de la existencia de otros factores de mal pronóstico.

En resumen, la elección de una, otra o varias modalidades combinadas entre sí depende de varios factores, principalmente el estadio tumoral y su localización. Existe una última modalidad de tratamiento, más reciente, que es la inmunoterapia. Ésta se basa en la utilización de fármacos biológicos, como los anticuerpos monoclonales, que van dirigidos frente a dianas moleculares del tumor y/o su microambiente.

Cirugía

Aproximadamente el 50% de los COCE se diagnostican en estadios I o II (107,108). La cirugía será el tratamiento de elección en caso de estadios precoces y en general es la modalidad preferida para el manejo de estos tumores acorde con las guías del 2017 de la *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) (106). Ellis y cols. (105) publicaron recientemente una revisión de más de 20.000 cánceres orales precoces (estadios I o II) en los cuales la cirugía fue el tratamiento de elección en aproximadamente el 95% de los pacientes, mostrando además un beneficio en la supervivencia general a favor de la cirugía y un aumento de la mortalidad en casos de tratamiento primario con radioterapia, aunque no discute el uso de terapias alternativas como la braquiterapia en caso de lesiones superficiales en las que la cirugía podría conllevar mayor morbilidad funcional o estética.

La cirugía será el tratamiento de elección en tumores que cumplan criterios de resecabilidad (Figura 4) propuestos por la NCCN (109). Dicha resección quirúrgica del tumor debe incluir todo el tumor macroscópicamente visible así como un margen quirúrgico que incluya, presumiblemente, toda la extensión microscópica del mismo. El mínimo estándar aceptado es de 5 mm, puesto que reduce el riesgo de recidiva local incluso sin radioterapia adyuvante en un 21% (110), aunque otros autores han sugerido que márgenes más pequeños de hasta 2,2 mm son aceptables (111).



Figura 4. Criterios de irresecabilidad tumoral propuestos por la NCCN (109).

Se han publicado varios ensayos clínicos aleatorizados comparando el tratamiento del cáncer oral localmente avanzado, pero operable, mediante cirugía o radioterapia (112,113). Ambos ensayos tuvieron que suspenderse precozmente, debido a que el análisis de los primeros pacientes mostró que la supervivencia era mayor con la cirugía que con la radioterapia (58% vs. 12%, respectivamente).

Las técnicas quirúrgicas reconstructivas actuales permiten no sólo la transferencia microquirúrgica de tejidos para una mejor reconstrucción tanto funcional como estética, sino que gracias a la evolución tecnológica y a su aplicabilidad en la cirugía es posible realizar reconstrucciones mediante modelos estereolitográficos y prótesis personalizadas para cada paciente. Y aún más, mediante los sistemas de navegación es posible realizar una resección quirúrgica con una previa planificación en un modelo tridimensional obtenido mediante una tomografía computerizada; e

intraoperatoriamente, podrá comprobarse que los límites de la resección son los calculados previamente.

La cirugía local frecuentemente se acompaña de tratamiento cervical regional, considerando la disección célula-ganglionar cervical como uno de los tratamientos quirúrgicos primarios junto con la resección que ha de realizarse en función del tamaño tumoral y de la localización, principalmente. La realización de dicho tratamiento dependerá del estadio clínico cervical, siendo imperioso en caso de que existan adenopatías clínicamente evidentes de forma preoperatoria o bien que sean halladas en pruebas complementarias como una tomografía computerizada.

La disección célula-ganglionar cervical estandarizada fue descrita en 1906 por Crile, quien creó la técnica de *disección cervical clásica en bloque*, inspirado en los conceptos oncológicos de la época, la cual consistía en la extirpación de los niveles ganglionares cervicales I a V junto con estructuras nobles como la vena yugular interna, el nervio espinal, el plexo sensitivo cervical y el músculo esternocleidomastoideo. Esta técnica se mantuvo hasta que a mediados del siglo XX comienza a perder adeptos en casos de cuellos clínicamente negativos, sobre todo por la morbimortalidad que conlleva. En 1962, Osvaldo Suárez introdujo por primera vez la disección cervical funcional, la cual surge no como variante de la cirugía radical, sino sobre la base anatómica de que la disección a través de los espacios fasciales del cuello permite extirpar los ganglios cervicales respetando las estructuras nobles. Posteriormente en 1980, Jesús Medina establece una nueva clasificación de las disecciones cervicales en función de la preservación o no de las estructuras nobles. Actualmente, el sistema de clasificación más utilizado, basado a su vez en la clasificación de Spiro (114), divide los tipos de disecciones en:

- ✓ Disección cervical radical modificada tipo I (DCRM-I): incluye los niveles ganglionares I a V, la vena yugular interna y el músculo esternocleidomastoideo, pero conserva selectivamente el nervio espinal.
- ✓ Disección cervical radical modificada tipo II (DCRM-II): incluye los niveles ganglionares I a V y la vena yugular interna, pero conserva selectivamente el nervio espinal y el músculo esternocleidomastoideo.
- ✓ Disección cervical radical modificada tipo III (DCRM-III) o disección cervical funcional, en la cual se conservan las tres estructuras nobles precitadas.

- ✓ Disección cervical selectiva:
 - Supraomohioidea: incluye los niveles cervicales I a III.
 - Supraomohioidea ampliada: incluye los niveles cervicales I a IV.
 - Anterolateral: incluye los niveles cervicales II a IV.
 - Posterolateral: incluye los niveles cervicales II a V además de los ganglios suboccipitales (tanto superficiales como profundos) y los retroauriculares.
- ✓ Disección cervical radical ampliada: se incluye bajo esta acepción, además de una de las disecciones descritas, la extirpación de cualquier estructura vascular, muscular, neural o ganglionar que no se incluye en el resto de las técnicas regladas (pares craneales, arteria carótida, músculos cervicales, ganglios para o retrofaríngeos...).

Siguiendo las recomendaciones estandarizadas de la NCCN, la disección cervical ha de hacerse siempre que se hallen adenopatías en la exploración clínica o en los estudios complementarios preoperatorios, pudiendo ser homolateral o bilateral a la lesión en función de la localización del tumor.

Para aquellos tumores con cuellos clínicamente negativos o sin hallazgos ganglionares patológicos en los estudios de imagen, la disección cervical será necesaria en casos de tumores T3 o T4a.

Finalmente, para tumores en estadios iniciales (T1 o T2) con cuellos clínica y radiológicamente negativos, existen varias alternativas, pudiendo escoger entre tres tipos de tratamientos, a saber:

- ✓ “Wait and Watch” (WW): en esta opción no se haría tratamiento cervical del paciente, únicamente el tratamiento consistiría en la resección tumoral y posterior seguimiento ambulatorio. Existen varios estudios comparativos entre las opciones WW o disección cervical electiva. D’Cruz y cols.(115) publicaron en 2015 un ensayo clínico randomizado en el que se proporcionó evidencia científica mostrando un beneficio en la supervivencia media del 12,5% y una mejora del 23,6% en la supervivencia libre de enfermedad (SSE) a favor de la disección cervical electiva. Los informes de la *American Cancer Society* indican que más del 40% de los pacientes con COCE se presentan con diseminación regional de la enfermedad en el momento del diagnóstico inicial (116). Entre un

15% y un 20% de pacientes con cáncer sin afectación metastásica cervical clínica tendrá metástasis ocultas. Otra consideración es que los pacientes con riesgo de tener micrometástasis no progresan hacia una metástasis clínica o radiológicamente evidente de una forma consistente y predecible. Según datos aportados por Shah y cols.(116), hasta un 68% de los pacientes estadificados clínicamente como cN0 fueron reclasificados como N1 tras la disección cervical que tuvo que realizarse ulteriormente, un 24% como N2 y un 8% como N3. En cuanto a los hallazgos patológicos, hasta en un 70% de los pacientes clasificados inicialmente como cN0 se observaron metástasis cervicales (N2 y N3) en disecciones cervicales posteriores, incluso con un seguimiento estrecho.

- ✓ Disección cervical electiva: numerosas publicaciones y metaanálisis abogan de forma general por la realización de una disección cervical electiva en lugar de mantener una actitud observadora (115,117). Se ha demostrado que el tratamiento electivo de los ganglios regionales mejora la supervivencia libre de enfermedad (116).
- ✓ Biopsia del ganglio centinela: esta técnica es una alternativa a la disección cervical electiva para la identificación de metástasis ocultas en pacientes con tumores de cavidad oral T1 o T2. En caso de presencia de metástasis en el ganglio, será precisa una disección cervical posterior. Se debe ser cauteloso a la hora de ofrecer este tratamiento, sobre todo en ciertas localizaciones como el suelo oral, en el cual se ha encontrado que la precisión de este tratamiento es menor que en otros lugares como la lengua o el labio. Actualmente se considera que esta técnica tiene alta precisión diagnóstica en cirujanos experimentados y podría ser una alternativa a la cirugía electiva de cuello (118).

De forma más específica, existen varias publicaciones sobre la posibilidad de afectación de los niveles cervicales en función de la localización tumoral. De tal modo, Byers y cols. (119) recomiendan extender la resección al nivel IV en caso de tumores linguales con un riesgo de metástasis ocultas del 15,8%. Recientemente, de Vicente y cols. (120) encontraron un 0% de metástasis ocultas en el nivel IIb en pacientes con cuellos clínicamente negativos, recomendando su realización en caso de hallazgo intraoperatorio de afectación del nivel IIa y en caso de afectación multiestacionaria. De

forma general, este nivel se encuentra más frecuentemente afecto en caso de tumores linguales o de triángulo retromolar.

Terapia adyuvante

Los cánceres orales con estadios avanzados son biológicamente agresivos y la terapia adyuvante a menudo está indicada para mejorar los resultados. Existen varias modalidades de tratamiento complementario del cáncer oral en función del estadio tumoral y de la existencia de factores de mal pronóstico (Tabla 3).

Tabla 3. Factores considerados para la terapia adyuvante en el cáncer oral.

Factores definitivos para radioterapia adyuvante	Factores definitivos para quimio-radioterapia adyuvante	Otros factores que podrían indicar necesidad de radioterapia
<ul style="list-style-type: none"> • pT3/T4. • N2/3. • Márgenes próximos <5 mm. 	<ul style="list-style-type: none"> • Extensión ganglionar extracapsular. • Márgenes positivos (<1 mm). 	<ul style="list-style-type: none"> • Invasión perineural. • Embolismo linfovascular • Grado tumoral. • Solo un ganglio positivo. • Peor patrón de invasión.

En caso de tumores no resecables quirúrgicamente, constituirán el tratamiento principal del paciente. La finalidad de estos tratamientos diferirá en función de varias características, tanto idiosincrásicas del paciente como del propio tumor. Podemos encontrar una finalidad complementaria para lograr un mayor control locoregional de la enfermedad, disminuir las secuelas de la misma, una finalidad terapéutica en caso de tumores no resecables quirúrgicamente para lograr una disminución del volumen tumoral y con ello conseguir márgenes quirúrgicos accesibles, y en otras ocasiones únicamente cumplirán un papel paliativo que tiene como finalidad conseguir una mejoría sintomática.

Radioterapia

Es el tratamiento complementario a la cirugía más estandarizado. Las técnicas de irradiación han evolucionado notoriamente en los últimos años, convirtiendo el tratamiento de los tumores de cabeza y cuello en uno de los más complejos de la actualidad debido a las altas dosis requeridas y a la cantidad y variedad de órganos que circundan a estos tumores.

Las principales indicaciones de tratamiento con radioterapia son como:

- ✓ Tratamiento radical: indicada sobre todo para pacientes con tumores locorregionalmente avanzados de orofaringe incluidos dentro del protocolo de preservación de órganos, con buenas respuestas en ocasiones.
- ✓ Tratamiento adyuvante: pacientes con enfermedad localmente avanzada, pero resecable (pT3/4, N2/3, márgenes próximos), se beneficiarán de la combinación de tratamiento quirúrgico y radioterápico. Además, los parámetros más desfavorables para tener una recidiva locorregional tras la resección quirúrgica son la extensión extracapsular y los márgenes positivos. Para pacientes con estadio ganglionar bajo (N1) y en caso de no tener características histológicas adversas, la indicación de la radioterapia adyuvante queda a criterio del cirujano y del equipo multidisciplinar. En general, los estudios publicados demuestran una mejora estadísticamente significativa en los resultados del COCE con estadios pT2N1 tratados con radioterapia adyuvante. La radioterapia adyuvante se asocia de forma independiente con un beneficio significativo de la supervivencia para los pacientes con COCE T2N1 (121). Si bien la evidencia sugiere que existe alguna ventaja de supervivencia para los cánceres T1N1, ésta aún no está demostrada.
- ✓ Tratamiento paliativo: indicado en pacientes no candidatos a cirugía por cuestiones de comorbilidad, tumores no candidatos a tratamiento quirúrgico y recidivas no resecables. Este tratamiento puede mejorar la sintomatología tumoral (dolor, sangrado, disfagia, ulceración cutánea tumoral) e incluso llega a conseguir disminución del volumen tumoral.

La efectividad de la radioterapia es dosis dependiente, utilizando dosis de entre 50 y 70 Gy, en función de la indicación terapéutica, dividida en 1,8-2 Gy/día, cinco veces a la semana. Hoy en día, la forma más utilizada es la Radioterapia de Intensidad Modulada o IMRT, la cual utiliza varios campos con una intensidad modulada especificada gracias a una matriz de subhaces de distinta fluencia. Gracias a ello, se obtiene una mejor conformación de la dosis, llegando más dosis a la zona del lecho tumoral y menos a los tejidos sanos circundantes.

Quimioterapia

En el COCE, la quimioterapia puede indicarse como tratamiento de inducción como estrategia para conseguir una disminución del volumen tumoral, de forma concomitante o no junto con la radioterapia, seguida o no por cirugía, en caso de tumores localmente avanzados, o bien como tratamiento paliativo en casos de resección completa no factible con el objetivo de mejorar la supervivencia gracias a la reducción de la masa tumoral y a un aumento en la calidad de vida (122). Se han realizado estudios sobre el papel de la quimioterapia en el CECC localmente avanzado, tanto resecable como no resecable, en los que se objetivó que el uso de la quimioterapia junto con la radioterapia reducía la tasa de mortalidad en un 22%, pero aumentaba la toxicidad aguda (RR 2,17; IC 95% (1,84-2,56; $p = 0,001$) (123,124).

La combinación más frecuentemente utilizada como agente quimioterápico es la de un fármaco con base en platinos y el 5-fluorouracilo (5-FU). Clásicamente, el tratamiento para los CECC localmente avanzados pero resecables era la cirugía seguida de quimio-radioterapia, con varios estudios que muestran beneficios a favor de este tratamiento adyuvante combinado. Dos estudios relevantes en este campo son el EORTC 22931 y el RTOG 95-01. Ambos son potentes estudios en los cuales se muestra un incremento en la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global en pacientes tratados con radioterapia y platinos de forma concomitante, aunque si bien es cierto implica una importante toxicidad aguda, siendo la mucositis la más frecuente, y otras crónicas, como la disfonía y disfagia (124).

Las indicaciones generales del uso de la quimioterapia como tratamiento concomitante a la radioterapia serían:

- ✓ Extensión extracapsular.
- ✓ Márgenes afectos.

Otros factores que podrían indicar la necesidad de un tratamiento quimioterápico complementario son pT3/4, N2/3, afectación de los niveles ganglionares IV o V, embolismo linfovascular e invasión perineural.

Un importante estudio es el metaanálisis MACH-NC publicado por Pignon y cols. (125) en 2009, en el cual se realiza un análisis de 93 ensayos clínicos con 17.346 pacientes. En él se evalúa el efecto sobre la supervivencia global de la quimioterapia como parte del tratamiento del CECC, observándose un beneficio significativo de la quimioterapia ($p < 0,0001$) en la supervivencia global (HR 0,88 [0,85–0,92]), con una mejora absoluta de ésta del 4,5% a los 5 años. Este beneficio fue mayor para la quimio-radioterapia concomitante (8% a los 5 años, HR = 0,81; $p < 0,0001$), mientras que no hubo evidencia clara de un beneficio para las quimioterapias de inducción y la adyuvante. Además, mostró un beneficio debido a su efecto sobre las muertes relacionadas con el CECC (HR 0,78; [0.73-0.84], $p < 0,0001$). Con respecto al tipo de fármacos combinados concomitantemente con la radioterapia, se obtuvo un beneficio similar independientemente del uso de cisplatino solo, el cisplatino o el carboplatino asociado con 5-FU u otra poliquimioterapia que incluya platino o 5-FU. No obstante, la mono-quimioterapia que no fuera con cisplatino dio resultados inferiores.

Terapia biológica

En los últimos años se han ido sumando nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento del CECC, sobre todo en el caso de CECC recurrentes y metastásicos. Entre ellos, se encuentran la familia de los taxanos (como el docetaxel) y el cetuximab. El cetuximab es un anticuerpo IgG1 monoclonal quimérico frente al receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR. El ensayo en fase III EXTREME publicado en 2008 puso de manifiesto que la adición de cetuximab al tratamiento basado en platino y 5-FU en pacientes con enfermedad metastásica conseguía mejorar las tasas de respuesta y la supervivencia global asociando muy poca toxicidad en comparación con el tratamiento de platino y 5-FU (126,127).

Fármacos más recientes son los inhibidores inmunológicos pembrolizumab y nivolumab, utilizados para el tratamiento de segunda línea tras una ausencia en la respuesta al tratamiento con platinos. El pembrolizumab es un anticuerpo monoclonal frente el receptor de muerte celular programada PD-1, impidiendo su acción con sus ligandos PD-L1 y PD-L2. PD-1 y su ligando PD-L1 se encuentran involucrados en la generación de tolerancia inmunológica por parte de los tumores sólidos, incluyendo el COCE. Estudios recientes indican que la expresión de este ligando PD-L1 en más del 10% de las células tumorales constituye un marcador independiente de mal pronóstico en pacientes con COCE (128).

Existen otras moléculas que se encuentran en estudio, como son:

- ✓ Inhibidores de la actividad tirosina-quinasa del receptor EGFR: gefitinib, erlotinib.
- ✓ Inhibidores de la angiogénesis: bevacizumab, motesanib, axitinib, vandetanib.

PRONÓSTICO

En general, los pacientes que padecen un COCE tienen mayor riesgo de padecer una segunda neoplasia, que puede ser sincrónica o metacrónica. Aproximadamente un 5% tendrán otro tumor primario sincrónico en la cavidad oral o en el tracto aerodigestivo superior (laringe, esófago o pulmón) (14). Los tumores metacrónicos se dan entre el 10% y el 40% durante los primeros 10 años tras el tratamiento del tumor primario (15,16). La presencia de márgenes positivos en la resección tumoral es un importante factor de riesgo de recidiva local.

El pronóstico de los pacientes con COCE varía en función del estadio tumoral y las características moleculares e histológicas del tumor, de las posibilidades terapéuticas y de la propia comorbilidad del paciente.

El estadio tumoral es un factor predictor de respuesta y supervivencia global del paciente. En general, pacientes con estadios iniciales tienen una supervivencia a los 5 años del 85%, la cual disminuye a la mitad en casos con afectación ganglionar positiva y a menos de un 10% en caso de enfermedad metastásica. En la enfermedad regional, la

afectación ganglionar constituye un factor pronóstico independiente de mal pronóstico y un factor predictivo de recidiva locorregional y metástasis a distancia, siendo la supervivencia inversamente proporcional al número y tamaño de ganglios afectados (121,129–131). Moore y cols. (132) concluyeron que el grosor tumoral es el predictor más consistente de metástasis ganglionar y supervivencia libre de enfermedad a los 3 años. La invasión perineural refleja la afinidad de un tumor por el tejido neurológico, y está asociado con un peor pronóstico en diferentes tipos de cáncer, incluyendo el COCE, con un importante impacto negativo en la supervivencia (133).

En cuanto a factores moleculares relacionados con el tumor, la presencia de mutaciones de *TP53* se ha asociado a una mayor resistencia al tratamiento con quimio y radioterapia (134,135). La expresión de VEGF se ha asociado con mayor tasa de recurrencias locorregionales y metástasis a distancia, con un incremento de la mortalidad en dos años de 1,88 veces (136,137). La sobreexpresión de EGFR también se ha asociado con un peor control locorregional y supervivencia global así como con la radio-resistencia (138,139).

El VPH es un importante factor pronóstico independiente para el cáncer de orofaringe. La supervivencia a los 5 años en este subconjunto es de aproximadamente 80-85% para los pacientes con infección de VPH (VPH positivos), frente al 30-35% para los pacientes VPH negativos (140). Además, el hábito tabáquico y la exposición al mismo parecen modificar la supervivencia y la recurrencia de los carcinomas orofaríngeos VPH positivos (141). Es importante destacar que aquellos tumores asociados al VPH son diferentes a nivel genómico que los asociados al tabaquismo (142), con predominio en las mutaciones de *PIK3CA*, pérdida de *TRAF3* y amplificación de *E2F1* (141,142). La amplificación de genes que mapean en 11q13 y su sobreexpresión es frecuente en los CECC VPH negativos relacionados con el tabaco, y en particular la expresión de *CTTN* y *ANO1* se ha asociado con un peor pronóstico, mientras estas alteraciones son altamente infrecuentes en los CECC VPH positivos (143). Por otro lado, los resultados sobre el papel pronóstico del VPH en el COCE, en el cual este virus es relativamente poco común (10-15%), han sido inconsistentes (140,144,145). Existe un subgrupo de cánceres de cavidad oral con resultados clínicos favorables que muestran alteraciones infrecuentes del número de copias junto con mutaciones activadoras de *HRAS* o *PIK3CA*, además de mutaciones inactivadoras de *CASP8*, *NOTCH1* y *TP53* (45,142).

Existen otras características asociadas al paciente como la edad, estado nutricional y otras posibles enfermedades que padezca.

El tiempo de demora entre el tratamiento quirúrgico y la terapia adyuvante también influye negativamente en la supervivencia global de los COCE ($p < 0,001$) (146).

TRASTORNOS ORALES POTENCIALMENTE CANCERIZABLES

Bajo el concepto de trastornos orales potencialmente cancerizables (TOPC) se incluyen un conjunto de condiciones orales con potencial capacidad de malignización. Antiguamente conocidas como “lesiones precancerosas” o “lesiones premalignas”, en una reunión de la OMS en 2005 se decidió eliminar esos términos e incluir estas lesiones bajo el concepto de TOPC (Figura 5). Estas lesiones pueden compartir características morfológicas, citológicas y moleculares con los COCE, pero por definición no han adquirido aún potencial invasivo.

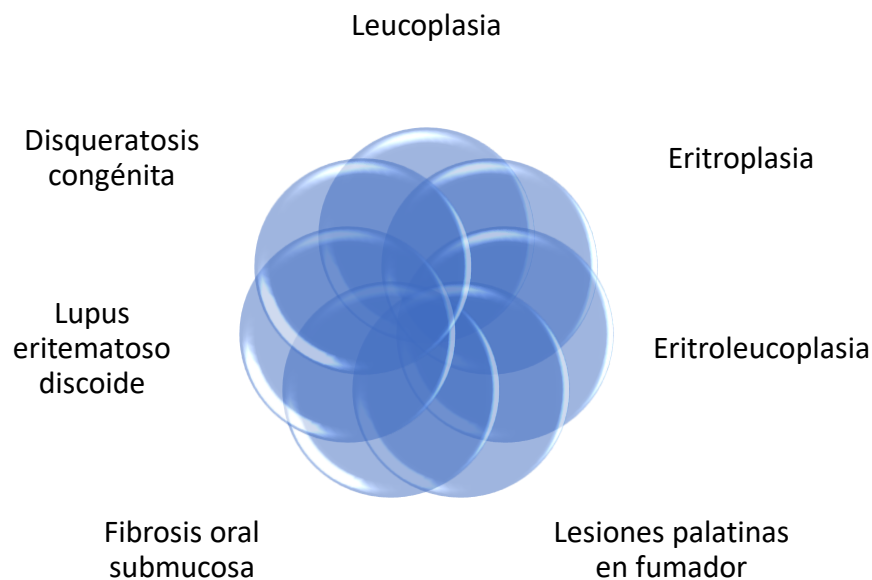


Figura 5. Trastornos orales potencialmente cancerizables, clasificación de la OMS.

La tasa de prevalencia mundial de los TOPC varía del 1% al 5% (147). Estas tasas van a diferir en función del país, la muestra poblacional a estudio (sexo, raza, edad) y los hábitos de vida. Los TOPC constituyen un diagnóstico clínico, para el cual posteriormente es imprescindible un diagnóstico histológico. Según éste, podremos hablar de hiperplasia, hiperqueratosis, displasia epitelial oral (DEO) o carcinoma de células escamosas. La DEO se caracteriza por contener alteraciones citológicas y estructurales que reflejan una pérdida en la maduración normal y en el patrón de estratificación del epitelio superficial (68,148).

Dentro de los TOPC, la lesión más frecuente es la leucoplasia, y se define como placa blanquecina con riesgo de malignización cuestionable habiendo excluido otras enfermedades o trastornos conocidos que no conllevan un mayor riesgo de cáncer (149). En general, las lesiones con un componente eritroplásico son más propensas a presentar malignidad.



La prevalencia mundial de las leucoplasias es aproximadamente del 2% (150), aunque se cree que puede estar levemente sobreestimada siendo más realista hablar de una prevalencia menor al 0,5% (151). Esta lesión es hasta 6 veces más frecuente en pacientes fumadores (40), y el alcohol constituye un factor de riesgo independiente (152). En cuanto al VPH, existen conflictos en los resultados sobre su posible implicación, aunque algunos autores encontraron asociación entre este virus y algunos TOPC como el liquen plano oral y la displasia epitelial (45).

La leucoplasia puede afectar cualquier sitio de la cavidad oral y orofaríngea. Clínicamente, se puede subdividir en una variante homogénea (plana, fina, de color blanco uniforme) y una no homogénea, como la leucoeritroplasia. La leucoplasia verrugosa es otro tipo de leucoplasia no homogénea, clínicamente indistinguible del aspecto clínico del carcinoma verrugoso. Dentro de la leucoplasia verrugosa, podemos hallar el subtipo proliferativo, el cual se caracteriza por mayor resistencia al tratamiento y altas tasas de transformación maligna (151,153). Es más prevalente en mujeres añosas y puede no haber antecedente de hábito tabáquico (151). En ocasiones, las leucoplasias pueden ulcerarse en su superficie, lo cual puede ser proporcionalmente un signo de malignidad o implicar la aparición de displasia severa (76,154).

En cuanto a su histología, las leucoplasias pueden incluir o no cambios displásicos. La evaluación de la lesión y la gravedad de la misma se basa en alteraciones

en el patrón arquitectónico acompañadas de atipia citológica (151). Las alteraciones epiteliales varían desde meras alteraciones fisiológicas hasta la malignidad. Estas alteraciones fisiológicas son principalmente debidas a un aumento del espesor de la capa de queratina (la cual puede ser ortoqueratósica o paraqueratósica) o bien a un aumento del estrato espinoso (conocido como acantosis), o bien a una atrofia epitelial. Para poder hablar de displasia, existen una serie de criterios histológicos (Tabla 4). Es importante destacar que en la evaluación histopatológica de la displasia puede existir variedad intralesional, interobservador e incluso intraobservador. En el año 2017, la OMS publicó un sistema de clasificación de tres niveles para la displasia epitelial oral, sobre la cual se ha sugerido que existen ciertas limitaciones al no incluir determinantes clínicos y marcadores moleculares que deberían completar el sistema de clasificación. Existen múltiples sistemas de clasificación histológica. La clasificación utilizada para el presente estudio de las DOEs es la clasificación de la OMS de 2017 (155), la cual subdivide estas displasias en displasia leve, moderada y severa. Asimismo, se utilizará el sistema binario de clasificación, el cual las subdivide en displasias de bajo y de alto grado. Este sistema binario surge como intento de llegar a un mejor consenso y disminuir la variabilidad intra e interobservador antes comentada.

Tabla 4. Criterios histopatológicos para las displasias orales. Adaptado de Barnes y cols. (156).

 Arquitectura	Estratificación epitelial irregular.	 Citología
	Pérdida de polaridad de las células basales.	
	Crestas interpapilares con forma de gota.	
	Aumento del número de figuras de mitosis.	
	Mitosis anormal en capas superficiales.	
	Queratinización prematura individual (disqueratosis).	
	Perlas córneas en las crestas interpapilares.	
	Variación anómala en el tamaño nuclear (anisoacariosis).	
	Variación anómala de la forma nuclear (pleomorfismo nuclear).	
	Variación anómala del tamaño nuclear (anisocitosis).	
	Variación anómala del tamaño celular (pleomorfismo celular).	
	Aumento del ratio núcleo-citoplasma.	
	Aumento del tamaño nuclear.	
	Figuras mitóticas atípicas.	
	Aumento del número y tamaño de los nucléolos.	
	Hipercromasía.	

La tasa promedio anual de transformación maligna de las leucoplasias es del 1% (151). En general, las leucoplasias no homogéneas tienen más riesgo de progresión que las homogéneas, siendo la leucoplasia verrugosa proliferativa la de mayor riesgo de progresión a malignidad seguida de la eritroplasia (151). La displasia epitelial se considera el indicador más importante de potencial maligno, aunque no puede establecerse una correlación individual directa entre el grado de displasia y el desarrollo de cáncer; de hecho, algunas lesiones no sólo se mantienen en el tiempo, sino que otras llegan a mostrar una regresión completa (157). Además, la transformación maligna puede darse en una región leucoplásica no displásica. Por ello, el diagnóstico histopatológico ha demostrado limitaciones como marcador pronóstico fiable de progresión a malignidad. Existen una serie de factores de riesgo asociados a malignización de una leucoplasia que se muestran a continuación (151):

Tabla 5. Factores de riesgo asociados a la malignización de las leucoplasias orales.

Sexo femenino
Duración larga de la leucoplasia
Leucoplasia en no fumadores (idiopática)
Localización lingual / suelo oral
Tamaño > 200 mm²
Tipo no homogéneo
Presencia de C. albicans
Presencia de displasia epitelial

Aún no existen marcadores moleculares únicos que permitan predecir de manera fiable y reproducible la malignización de una leucoplasia, aunque existen varias moléculas que han sido estudiadas con este fin, como la podoplanina, la expresión suprabasal de p53, presencia de genotipos de VPH de alto riesgo, inmunohistoquímica positiva para Ciclina D1, p27 y p63, la expresión de citoqueratina, Cortactina y la quinasa de adhesión focal (FAK) (4,5,151).

Por ello, es fundamental la búsqueda de marcadores fiables de riesgo progresión a cáncer oral que puedan complementar al diagnóstico histopatológico de los TOPC.

MARCADORES MOLECULARES

La biología molecular ofrece tecnologías de una elevada sensibilidad que permiten identificar una modificación genética en una etapa molecular temprana antes de poder evidenciar una alteración celular a través de un microscopio o de que ocurran cambios clínicos notables. Su robustez ha contribuido a implementar cada vez más las tecnologías moleculares en la clínica para mejorar el diagnóstico y conocimiento de las enfermedades. El concepto de la Patología Molecular es un área emergente y, en el contexto de esta tesis, un objetivo fundamental es identificar alteraciones moleculares presentes en los TOPC que permitan predecir el potencial maligno de estas lesiones orales y, en último término, mejorar el diagnóstico precoz y el tratamiento y/o prevención del COCE (158).

Los instrumentos de detección molecular se pueden clasificar en marcadores basados en ácidos nucleicos y en proteínas. Existen diferentes alteraciones que pueden ocurrir a nivel de los ácidos nucleicos debido a mutaciones genéticas, amplificaciones, polimorfismos o mecanismos epigenéticos que conducen a expresiones aberrantes de los genes. Por otro lado, las herramientas de detección temprana basadas en proteínas detectan los cambios postranscripcionales y postraduccionales que pueden tener lugar como resultado de la carcinogénesis (158–160). Las Tablas 6, 7 y 8 recogen diferentes ejemplos de biomarcadores proteicos, glucoproteicos y no proteicos identificados para predecir el potencial maligno de los TOPC, su respectiva especificidad y papel asociado en la carcinogénesis oral (adaptadas de Sarode y cols., 2019) (161).

Tabla 6. Biomarcadores proteicos identificados en los TOPC.

Nombre del marcador	Abreviatura	Fenotipo	Especificidad de TOPC	Papel en carcinogénesis
<i>Transportadores dependientes de ATP, subfamilia G2</i>	ABCG2	Sobreexpresión de proteína	Leucoplasia oral	Mantiene el fenotipo de células tumorales
<i>Aldehído deshidrogenasa 1</i>	ALDH 1	Expresión de proteína	Leucoplasia oral	Mantiene las propiedades de auto-renovación de las células tumorales
<i>B lymphoma Mo-MLV insertion region homolog</i>	BMI-1	Sobreexpresión de proteína	Leucoplasia oral	Auto-renovación de células tumorales
<i>E-cadherina</i>	-	Pérdida de expresión de proteína	Leucoplasia oral	Controla la motilidad celular, migración de células displásicas e invasión celular
<i>Factor de crecimiento fibroblástico-2 y receptor de factor de crecimiento fibroblástico-2</i>	FGF2 y FGFR2	Sobreexpresión de proteína	No especificado	Angiogénesis e invasión de células tumorales
<i>Human EAG-related gen</i>	HERG1	Sobreexpresión de proteína	Leucoplasia oral	Proliferación y diferenciación de células tumorales
<i>Proteína de mantenimiento de mini-cromosomas</i>	MCM	Sobreexpresión de proteína	Leucoplasia oral	Asociado con el ratio de la diferenciación celular tumoral
<i>Fosfolipasa C-γ1</i>	PLC1	Expresión de proteína	No especificado	Migración de células tumorales e invasión
<i>Survivina73</i>	-	Expresión de proteína	No especificado	Proliferación celular y angiogénesis

Tabla 7. Biomarcadores glucoproteicos identificados en los TOPC.

Nombre del marcador	Abreviatura	Fenotipo	Especificidad de TOPC	Papel en carcinogénesis
<i>CD133</i>	-	Expresión de proteína	Leucoplasia oral	Mantiene el fenotipo de célula tumoral
<i>Podoplanina</i>	PDPN	Sobreexpresión de proteína	Leucoplasia oral	Mantiene las propiedades de auto-renovación de las células tumorales
<i>Proteínas con el tripéptido RGD</i>	SIBLINGs	Sobreexpresión de proteína	No especificado	Promueve proliferación y metástasis de células tumorales
<i>Antígeno de carcinoma de células escamosas</i>	SCCA	Expresión de proteína	No especificado	Controla la motilidad celular, migración de células displásicas e invasión celular

Tabla 8. Biomarcadores no proteicos identificados en los TOPC.

Nombre del marcador	Abreviatura	Fenotipo	Especificidad de TOPC	Papel en carcinogénesis
<i>MicroRNAs</i>	miRNAs	Expresión de microRNA	No especificado	Proliferación, diferenciación, migración y metástasis de células tumorales

De acuerdo con Chimenos y cols. (162), otra clasificación de los marcadores moleculares que podrían proporcionar información adicional al examen histopatológico para el riesgo de cáncer oral sería la siguiente:

✓ Marcadores de crecimiento tumoral:

- El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) pertenece a la familia de receptores de tirosina-quinasa ErbB. EGFR (ErbB-1) o el C-ErbB-2 son importantes en la diferenciación, el desarrollo y la emisión de la señal mitogénica en las células normales. Según Werkmeister y cols. (163), el EGFR se encuentra sobreexpresado en un 20,2% de los carcinomas orales. Asimismo, afirma que las aberraciones de ErbB-1 y ErbB-2 son marcas que indican que en la lesión puede producirse un proceso de carcinogénesis, independientemente de la existencia o no de displasia.
- Ciclinas: Una elevada expresión de Cdk2 es un factor crítico en la progresión del cáncer y puede ser utilizada como marcador predictivo del pronóstico (164). La proteína Ciclina D1 tiene un papel relevante en las fases más tardías del proceso de malignización, dentro del amplicón 11q13.
- P120: forma junto con las Cadherinas el complejo E-Cadherina-p120, y cuando se observa una pérdida de la expresión de este complejo se asocia con la progresión tumoral (165).
- Ki-67/MIB: Los niveles de Ki-67 tienen una estrecha relación con el grado histológico del COCE (166).
- AgNOR: Es el único marcador de este grupo que tiene una importante asociación con el pronóstico (165).
- Skp2: altos niveles de esta proteína están ligados a una disminución de p27, y ello se ha relacionado con un peor pronóstico (165).
- Telomerasa: Se puede utilizar como marcador en el diagnóstico de lesiones preneoplásicas o neoplásicas de la mucosa oral. La detección, sobre todo de la subunidad hTERT (actividad catalítica) puede ser útil como marcador de diagnóstico adicional, especialmente en la detección precoz del carcinoma de células escamosas (167,168).

- ✓ Marcadores de supresión tumoral y de respuesta antitumoral:
 - La desregulación de la proteína del retinoblastoma (pRb) da lugar a aberraciones de otras proteínas como la CD1 y CDK4, que participan en el desarrollo de cáncer oral.
 - Existe además una desregulación en los inhibidores de la ciclina dependiente de quinasa. Se ha hallado una asociación entre los niveles de expresión de p21 y el grado de diferenciación tumoral (169).
 - En cuanto a la mutación de *TP53*, a pesar de su elevada prevalencia en los COCE, no es posible concluir que se trate de un biomarcador predictor de riesgo, y es relativamente tardía en el proceso carcinogénico.
- ✓ Marcadores de angiogénesis: es una parte crucial para el crecimiento y metástasis de los tumores sólidos. La expresión de VEGF se ha asociado con mayor tasa de recurrencias locorregionales y metástasis a distancia, con un incremento de la mortalidad en dos años de 1,88 veces (136,137).
- ✓ Marcadores de invasión tumoral y de potencial metastatizante: existen múltiples moléculas dentro de este subgrupo, como las metaloproteasas de la matriz extracelular (MMPs) cuya expresión se encuentra alterada en el COCE y está asociada con el estadio tumoral (165). En cuanto a las integrinas, que pertenecen a una familia de receptores de la superficie celular, existen estudios que indican que el 41% de las leucoplasias expresan la integrina $\alpha v \beta 6$, la cual podría estar asociada a procesos de reparación epitelial, inflamación o transformación maligna (170). La expresión de esta integrina parece ser necesaria, pero no suficiente, para que se produzca dicha transformación (165).
- ✓ Marcadores celulares de superficie: existen varias moléculas de superficie cuya expresión se encuentra alterada, como por ejemplo el Antígeno CD57, el cual se encuentra en la membrana de células linfoides y cuya expresión se encuentra aumentada en leucoplasias orales con displasia moderada-severa (171). Las Cadherinas son proteínas de membrana que mantienen la adhesión intercelular y organizan y perpetúan la transducción de señales celulares que participan en la polaridad, crecimiento y migración celular. Von Zeidler y cols. (172) han demostrado una correlación entre la expresión de E-Cadherina y los grados de displasia epitelial, es decir, establecieron que una disminución en la expresión

de E-Cadherina se asocia con un mayor grado histopatológico de displasia ($p = 0,019$).

- ✓ Marcadores intracelulares: las citoqueratinas son proteínas cuyos cambios en su expresión no pueden considerarse como predictores del desarrollo de displasia, pero cuando un TOPC maligniza se asocia con la desaparición de estas proteínas. La expresión de CK19 se ha observado en fases iniciales de la carcinogénesis, y se ha descrito como marcador diagnóstico precoz de los TOPC (173).
- ✓ Marcadores de queratinización anómala: como las filagrinas, proteínas ricas en histidina, que podemos encontrar en las capas granular y córnea de un epitelio sano. En las leucoplasias orales las filagrinas aparecen en el estrato córneo y en los carcinomas orales forman perlas de queratina.
- ✓ Productos del ácido araquidónico: metabolitos de la lipooxigenasa, ácido hidroxieicosatetraenoico y el leucotrieno B₄ se encuentran aumentados en el COCE, aunque su papel en el potencial de malignización de los TOPC no ha sido estudiado en profundidad (162,174).
- ✓ Enzimas: la glutatión S-transferasa (GST), isoenzima implicada en la protección celular frente a carcinógenos y citotóxicos, tiene un subtipo π , el cual se encuentra sobreexpresado en lesiones orales premalignas y en la carcinogénesis oral experimental (162,171).

CÉLULAS TRONCALES (STEM) TUMORALES

En experimentos de fusión celular, se han determinado algunos factores en células embrionarias que inducen la reprogramación de núcleos somáticos. Se han identificado cuatro factores de transcripción que inducen la reprogramación de fibroblastos a un estado pluripotente. Takahashi y Yamanaka (175) establecieron que a partir de un cultivo de fibroblastos embrionarios murinos que expresan el gen *Fbx15*, por introducción retroviral de los factores de transcripción Oct4, SOX2, c-Myc y Klf4, pueden obtenerse células pluripotenciales inducidas (iPS). Este proceso de desdiferenciación se denomina reprogramación. No obstante, las iPS que expresaban

este gen *Fbx15* eran significativamente distintas de las células embrionarias en cuanto a la capacidad de expresión de sus genes y los patrones de metilación del ADN. Poco después, Maherali y cols. (2007) encontraron que las células iPS que expresan NANOG son fenotípica y molecularmente diferentes a las que expresan *Fbx15* (176).

Un concepto emergente sobre la carcinogénesis propone un modelo jerárquico de los tumores y la existencia de células troncales tumorales (CTTs), las cuales lideran esta organización jerárquica formando estructuras complejas con poblaciones heterogéneas de células dentro de un tumor (Figura 6). Se definen como una pequeña subpoblación de células que muestran características propias de una célula troncal (*stem cell*), tales como división asimétrica y autorrenovación, lo que resulta en la generación de poblaciones celulares tumorales heterogéneas. Las CTTs se caracterizan por ser altamente tumorigénicas, con una gran capacidad para iniciar y generar tumores (como células iniciadoras de tumor). Se considera que juegan un importante papel en varios procesos biológicos claves tanto para el inicio como la progresión tumoral, como la proliferación, la invasión, el desarrollo de metástasis y recurrencias tumorales y la resistencia a tratamiento; además, las CTTs muestran una mayor capacidad para estas características en comparación con el resto de células tumorales (177). En los COCE se han identificado subpoblaciones de CTTs y definido diferentes marcadores de CTTs, como son OCT4, SOX2, NANOG, ALDH1, STAT3 fosforilado, CD44, CD24, CD133 y Musashi-1. Algunas subpoblaciones de CTTs expresan componentes del sistema renina-angiotensina, lo cual indica que este podría ser una nueva diana terapéutica para el tratamiento de COCE (177). Otra peculiaridad de las CTTs es que se encuentran predominantemente en fase G0 inactiva del ciclo celular, haciéndolas particularmente resistentes a la quimio-radioterapia.

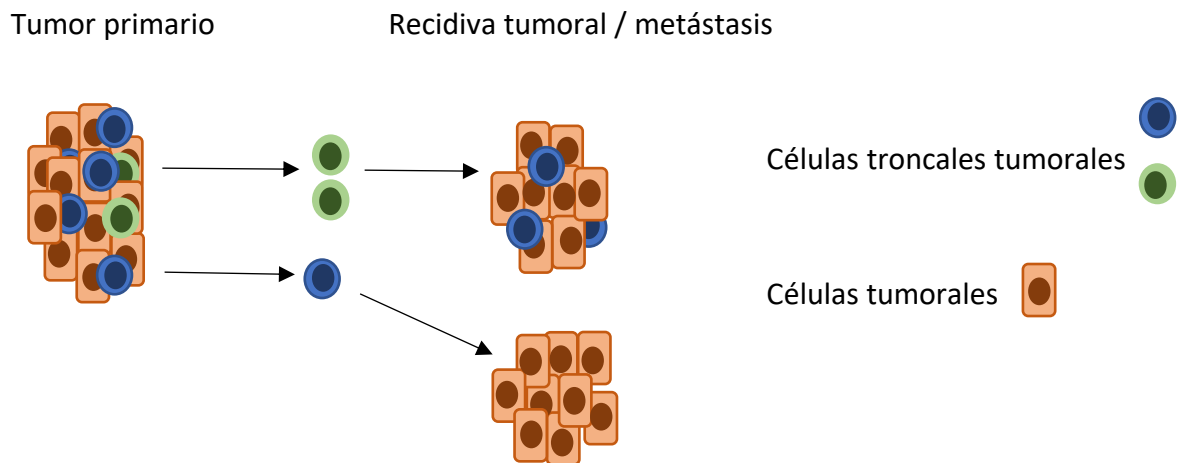


Figura 6. Modelo jerárquico de CTTs en el cáncer oral. Adaptado de Baillie y cols. (177).

NANOG

NANOG es un factor de transcripción esencial para el desarrollo embrionario, y necesario para el mantenimiento de la pluripotencialidad celular porque inhibe la diferenciación en el endodermo primordial (178). En líneas celulares murinas, se ha demostrado que NANOG está involucrado en el bloqueo funcional de la diferenciación y, por lo tanto, en el mantenimiento de la pluripotencialidad de las células embrionarias (179,180). Es considerado como un factor de transcripción *homeobox*, el cual inicia un efecto cascada a través del cual varias señales extrínsecas (como LIF, BMP, Wnt) mantienen la autorrenovación y pluripotencialidad de las células embrionarias. Niveles elevados de NANOG pueden mantener la autorrenovación de las células embrionarias de ratón independientemente de LIF y permitir el crecimiento de células embrionarias humanas sin células nutricias. Otros factores como Oct4, FoxD3 y p53 están implicados en la regulación de la expresión de NANOG. NANOG controla conjuntamente con otros factores de pluripotencialidad, como Oct4 y SOX2, la expresión y función de un conjunto de genes que regulan la pluripotencialidad de las células embrionarias (176).

NANOG se encuentra altamente expresado tanto en el tejido tumoral como en el peritumoral en comparación con el tejido normal (181). Se ha demostrado que NANOG está activo en diferentes tipos de cáncer y desempeña un papel en la transformación tumoral, tumorigenicidad y metástasis dentro del COCE (182). La

sobreexpresión de NANOG también se ha correlacionado con un peor estado de diferenciación y quimiorresistencia (183). En los COCE, se ha encontrado que una mayor expresión de NANOG está asociada con un mal pronóstico (184); además, se ha observado que se expresa en tres posibles subpoblaciones distintas de CTTs, tanto dentro de los nidos tumorales como en el estroma peritumoral (185).

En líneas celulares derivadas de COCE y en CCE de orofaringe, NANOG se sobreexpresa en la subpoblación de CTTs en comparación con el resto de las células tumorales. En 2017, Rodrigo y cols. (186) realizaron un estudio pionero analizando la expresión de NANOG en lesiones precancerosas laríngeas y su relación con el riesgo de cáncer de laringe. La expresión de NANOG fue detectada en el 60% de las displasias laríngeas y era un potente predictor del riesgo de cáncer de laringe ($p = 0,003$), superior a la clasificación histológica, concluyendo un nuevo papel para NANOG como biomarcador para la evaluación del riesgo de cáncer laríngeo en pacientes con lesiones precancerosas.

SOX 2

El gen *SOX2* está localizado en 3q26, una región frecuentemente amplificada en los CECC. *SOX2* es un factor de transcripción de la familia HMG-box relacionado con la región *SRY* (región determinante de sexo Y). Está implicado en múltiples vías de transducción de señales y se ha demostrado que posee un papel fundamental tanto en el desarrollo normal como en procesos patológicos, como regulador de la proliferación celular, la migración, la invasión y metástasis, la tumorigénesis, evasión de la apoptosis y la quimiorresistencia (187,188). La sobreexpresión de *SOX2* se ha utilizado en combinación con otros marcadores, como *ALDH1*, *CD44*, *OCT4* y *NANOG*, para identificar subpoblaciones de CTTs en los CECC, incluido el COCE (177,180,187).

En las líneas celulares de los CCE orofaríngeos, *SOX2* se sobreexpresa en las subpoblaciones de CTTs cuando se compara con el resto de células adyacentes (189). El papel de *SOX2* como oncogen, iniciador y promotor de tumores y su participación en la progresión tumoral se ha demostrado ampliamente. En concreto, en un estudio realizado en CCE de laringe, faringe y nasosinuales, *SOX2* se encontró más expresado

significativamente en los carcinomas de hipofaringe y laringe. Sin embargo, la expresión de SOX2 no se asoció de forma significativa con el estadio de la enfermedad, la clasificación T o N, la metástasis de los ganglios linfáticos, la recurrencia o el resultado clínico en ninguna de las sublocalizaciones. La ausencia de asociación con el resultado clínico puede sugerir un papel para SOX2 en el inicio del tumor, pero no en la progresión tumoral en CECC (190). Asimismo, se ha estudiado el papel de SOX2 en las primeras etapas de la tumorigénesis y su posible contribución a la transformación maligna en lesiones precancerosas de laringe, confirmando que la expresión de SOX2 se detecta de forma temprana y participa en las etapas iniciales de la tumorigénesis y, aún más importante, ha demostrado ser un predictor independiente para el riesgo de cáncer de laringe (191).

En el COCE, la expresión de SOX2 es significativamente mayor en el tejido tumoral en comparación con el tejido normal y se correlaciona débilmente con OCT4 (181). Existen resultados variables sobre el significado de la expresión de SOX2 en los COCE. Por un lado, se ha correlacionado con un tamaño tumoral pequeño, un estadio tumoral temprano y una mejor supervivencia libre de enfermedad (168). Por otro, otro estudio indica que la tinción con SOX2 con un patrón de tinción difuso se asocia significativamente con metástasis en los ganglios linfáticos (192). En ensayos funcionales, se ha demostrado que la sobreexpresión de SOX2 aumenta la invasividad, el crecimiento independiente al anclaje y la tumorigenicidad en modelos de xenotrasplante de líneas celulares derivadas de COCE. Por el contrario, silenciar SOX2 aumenta la expresión de genes antiapoptóticos, mejora la respuesta a fármacos y aumenta la sensibilidad de las células al tratamiento con cisplatino combinado con radioterapia (188).

3. Hipótesis y objetivos

HIPÓTESIS

Los COCE se desarrollan a partir de una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas que darán lugar posteriormente a cambios histológicos visibles microscópicamente que, a su vez, tiempo después se traducirán en trastornos clínicos macroscópicos. El mayor conocimiento de los cambios genéticos y moleculares que acompañan las diferentes etapas de la carcinogénesis permite entender mejor la patogenia de esta enfermedad. El pronóstico del COCE sigue siendo pobre a pesar de los avances que se han producido en las últimas décadas, puesto que hasta el 50% de los pacientes aún mueren en los primeros 5 años (181). Una estrategia fundamental en ciernes dirigida a mejorar el diagnóstico y manejo clínico de los pacientes con COCE es la búsqueda de marcadores moleculares que permitan un diagnóstico precoz de los COCE así como la identificación de lesiones con alto riesgo de malignización para una mejor estratificación y tratamiento de los pacientes. Los TOPC, principalmente la leucoplasia, pueden sufrir una transformación maligna, la cual es muy variable y puede darse incluso en ausencia de lesiones displásicas. Por ello, es importante la investigación de marcadores moleculares específicos y fiables de riesgo de progresión a cáncer oral que puedan complementar al diagnóstico histológico de displasia, que continúa siendo la herramienta de rutina clínica.

La hipótesis que defiende el presente estudio se basa en la búsqueda de nuevos biomarcadores que permitan una evaluación precoz del riesgo de malignización de los TOPC, así como el estudio de su posible impacto en el pronóstico y progresión de los COCE. Se han seleccionado como candidatos a estudio NANOG y SOX2, dos importantes reguladores de la pluripotencialidad y autorrenovación en células embrionarias y adultas, cuya expresión está frecuentemente alterada en múltiples cánceres, incluyendo los COCE. Ambos factores proporcionan un importante vínculo entre tumorigenicidad y pluripotencialidad, que impulsa el interés de su estudio en las etapas iniciales del desarrollo de los COCE y en el riesgo de malignización de los TOPC. Se centrará en el análisis mediante inmunohistoquímica por ser una técnica asequible y de fácil incorporación a la rutina hospitalaria.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo se centra en investigar el papel de NANOG y SOX2 tanto en las etapas iniciales de carcinogénesis oral y en la progresión a malignidad de los TOPC como en las etapas posteriores de la progresión tumoral de los COCE y su posible impacto en el pronóstico y resultado de la enfermedad.

Con esta finalidad, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de NANOG y SOX2 en amplias series de pacientes con TOPC (displasias epiteliales orales) y pacientes con COCE.
2. Investigar la relación entre la expresión de NANOG y SOX2 en pacientes con TOPC, el diagnóstico histopatológico de displasia y el riesgo de malignización de estas lesiones.
3. Establecer correlaciones entre la expresión proteica de NANOG y SOX2 y las variables clinicopatológicas de los pacientes con COCE.
4. Determinar el posible impacto de la expresión proteica de NANOG y SOX2 en el pronóstico y evolución de los pacientes con COCE.

4. Pacientes y método

PACIENTES Y MÉTODO

Selección de pacientes:

Se seleccionaron de forma retrospectiva dos cohortes de pacientes con:

- i. Diagnóstico de displasia epitelial oral.
- ii. Diagnóstico histológico de COCE.

i. Displasia epitelial oral.

Se recogieron muestras de tejido parafinado de pacientes con diagnóstico de displasia epitelial oral en el Hospital Universitario Central de Asturias entre los años 2000 y 2005. Para su inclusión en el estudio, los pacientes debían cumplir los siguientes criterios:

1. Diagnóstico histopatológico de displasia epitelial oral.
2. Leucoplasia oral.
3. Ausencia de historia previa de cáncer de cabeza y cuello.
4. Biopsia escisional completa de la lesión.
5. Seguimiento mínimo del o de la paciente durante 5 años o hasta progresión a malignidad.

Cincuenta y cinco pacientes que cumplían dichos criterios fueron incluidos finalmente en el estudio. Se realizó un seguimiento de los mismos de la siguiente forma:

- ✓ Cada dos meses, durante los primeros 6 meses tras completar el tratamiento.
- ✓ Cada tres meses, hasta el segundo año.
- ✓ Cada 6 meses, a partir del segundo año hasta la finalización del estudio.

ii. Carcinoma oral de células escamosas.

Se seleccionó una cohorte independiente de pacientes del Hospital Universitario Central de Asturias entre los años 1996 y 2007 que cumplieran los siguientes criterios:

1. Diagnóstico histológico de COCE.
2. Tratamiento quirúrgico con intención curativa.

Un total de 125 pacientes fueron incluidos finalmente en el estudio.

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) y por el CEIC Regional del Principado de Asturias (fecha de aprobación 5 de mayo de 2016; número de aprobación: 70/16) para el proyecto PI16/00280. Además, se obtuvo un consentimiento informado de todos los pacientes para el presente estudio.

Las muestras de tejido parafinado y los datos de los donantes incluidos en este estudio fueron proporcionados por el Biobanco del Principado de Asturias (PT17/0015/0023), integrado en la Red Nacional de Biobancos de España.

Todas las muestras y datos fueron procesados siguiendo los procedimientos operativos estándar con la aprobación del Comité Científico y de Ética del HUCA.

Variables analizadas

Para todos los pacientes se recogieron de la historia clínica los siguientes datos:

- ✓ Demográficos:
 - Sexo.
 - Edad en el momento del diagnóstico.
- ✓ Factores de riesgo:
 - Consumo de tabaco.
 - Consumo de alcohol.

i. Displasia epitelial oral

Las displasias orales fueron clasificadas de dos formas, según:

- ✓ La clasificación histológica de la OMS 2017 (155):
 - Displasia leve.
 - Displasia moderada.
 - Displasia severa.
- ✓ Clasificación histológica binaria de la OMS (155):
 - Displasia de bajo grado.
 - Displasia de alto grado.

ii. Carcinoma oral de células escamosas.

Además de las variables demográficas y los factores de riesgo, se recogieron los siguientes datos histopatológicos:

- ✓ Estadio tumoral, de acuerdo con la clasificación de la NCCN 2018 (193).
- ✓ Grado histopatológico de diferenciación:
 - G1: Bien diferenciado.
 - G2: Moderadamente diferenciado.
 - G3: Pobrementemente diferenciado.
- ✓ Localización tumoral:
 - Lengua.

- Suelo oral.
 - Otras localizaciones.
- ✓ Recurrencia tumoral.
- ✓ Segundo tumor primario.
- ✓ Estado clínico al final del periodo de seguimiento:
 - Paciente vivo sin recurrencia tumoral.
 - Paciente fallecido por el cáncer oral o con una recidiva no tratable.
 - Pacientes perdidos durante el seguimiento o fallecidos por otra causa (censurados).

Displasia epitelial oral: características de la muestra.

Un total de cincuenta y cinco pacientes con diagnóstico de displasia epitelial oral fueron incluidos en el estudio. 26 pacientes (47%) eran hombres y 29 eran mujeres (53%), con edades comprendidas entre los 39 y 83 años y una edad media de 62,61 años (Desviación Estándar (DE) = 12,56).

En cuanto a posibles factores de riesgo asociados, en concreto el consumo de tabaco y alcohol, esta información sólo se encontró disponible para 31 pacientes, siendo diez de ellos (32%) fumadores y cuatro (13%) bebedores habituales de alcohol.

Con respecto a la histología de las lesiones orales, 42 pacientes (76%) se clasificaron como lesiones displásicas de bajo grado, y 13 (24%) como lesiones de alto grado, de acuerdo con la clasificación binaria de la OMS actual (155). En la Figura 7 se muestra la clasificación en tres grados de las lesiones, con 42 pacientes con displasia leve, 6 moderada y 7 severa.

Las características clínicas y patológicas de los 55 pacientes con displasia oral se muestran en la Tabla 9.

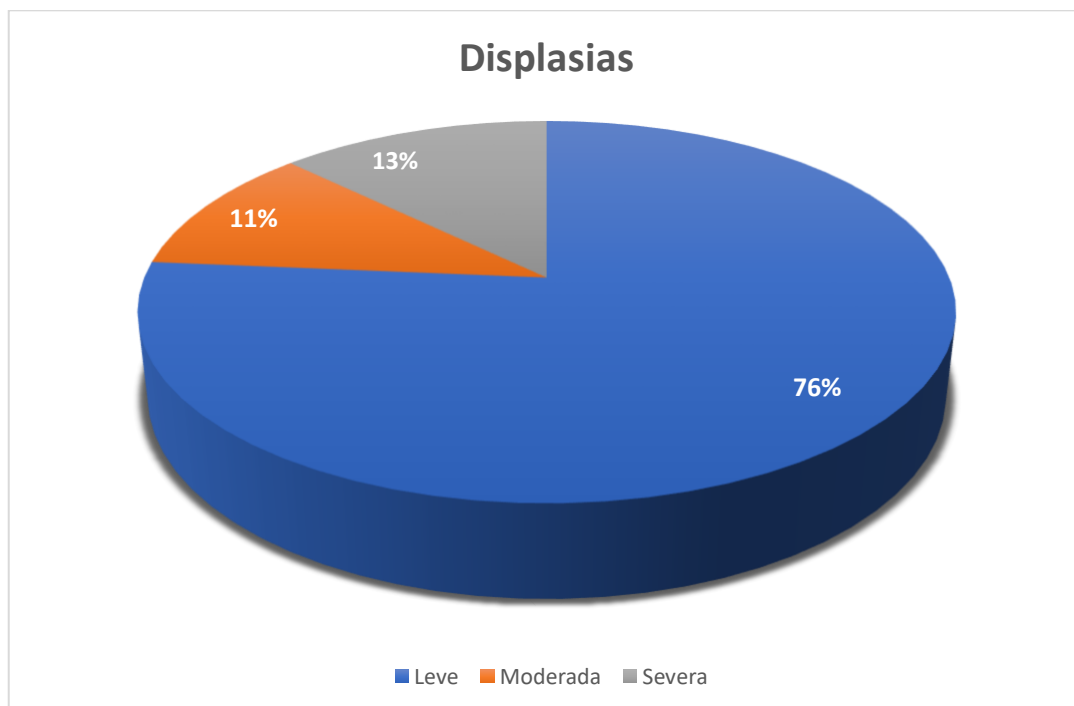


Figura 7. Clasificación histopatológica de la cohorte de 55 displasias epiteliales orales.

Tabla 9. Características clínicopatológicas de los 55 pacientes con displasia oral.

Variable	Número (%)
Edad (años)(media \pm SD; mediana, rango)	62,61 \pm 12,56; 60; 39-83
Sexo	
• Hombre	26 (47)
• Mujer	29 (53)
Tabaco	
• Fumador	10 (18)
• No fumador	21 (38)
• Desconocido	24 (44)
Consumo de alcohol	
• Bebedor	4 (7)
• No bebedor	27 (49)
• Desconocido	24 (44)
Localización	
• Lengua	20 (36)
• Suelo oral	2 (4)
• Encía	14 (25)
• Región bucal	13 (24)
• Paladar	2 (4)
• Otras localizaciones en la cavidad oral	4 (7)
Estado clínico al final del seguimiento	
• Progresión a carcinoma	12 (22)
• Persistencia como displasia epitelial	43 (78)

COCE: Características de la muestra

Un total de 125 pacientes con COCE fueron incluidos en esta cohorte. De ellos, 82 eran hombres (66%) y 43 mujeres (34%), con unas edades comprendidas entre los 28 y 91 años, y una mediana de edad de 57 años.

En cuanto a factores de riesgo asociados, como el consumo de tabaco y alcohol, 84 pacientes (67%) eran fumadores y 69 (55%) eran bebedores de alcohol habituales.

Con respecto a las características del tumor, la mayoría de los COCE eran bien diferenciados (64%), más del 50% se encontraban en estadios clínicos avanzados (III o IV), la localización más común fue la lengua, en un 41% de los casos, seguida del suelo de la boca (30%), y el 43% de los pacientes tenían tumores de entre 2 y 4 cm.

En cuanto al estado ganglionar regional, se observó presencia de metástasis ganglionares cervicales en 49 casos (39%), y recurrencias locales en 54 casos (43%).

Ningún paciente tenía enfermedad metastásica en el momento del diagnóstico. Se administró radioterapia adyuvante en 75 pacientes (60%), y quimioterapia adyuvante en 14 pacientes (11,2 %).

El tiempo medio de seguimiento de los pacientes fue de 71,82 meses (DE: 57,55), dentro de un rango de 1 a 230 meses, siendo la mediana de 61 meses. Durante dicho seguimiento fallecieron 53 pacientes. Las tasas de supervivencia específica de enfermedad a los 5 y 10 años fueron del 60% y 44%, respectivamente. El tiempo medio de supervivencia fue de 132,74 meses (IC 95%: 113,25 a 152,22 meses), siendo la mediana 141 meses (IC 95%: 102,40 a 179,59 meses).

Las características clínicas y patológicas de los 125 pacientes con COCE seleccionados para el estudio se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Características clínicas y patológicas de la cohorte de 125 pacientes con COCE seleccionados para estudio.

Variable	Número (%)
Edad (años)(media ± DE; mediana; rango)	58.69 ± 14.34; 57; 28-91
Sexo	
• Hombre	82 (66)
• Mujer	43 (34)
Tabaco	
• Fumador	84 (67)
• No fumador	41 (33)
Consumo de alcohol	
• Bebedor	69 (55)
• No bebedor	56 (45)
Localización del carcinoma oral de células escamosas	
• Lengua	51 (41)
• Suelo oral	37 (30)
• Otras localizaciones de la cavidad oral	37 (30)
pT	
• pT1	27 (22)
• pT2	54 (43)
• pT3	16 (13)
• pT4	28 (22)
pN	
• pN0	76 (61)
• pN1	25 (20)
• pN2	24 (19)
Estadio clínico	
• Estadio I	20 (16)
• Estadio II	32 (26)
• Estadio III	26 (20)
• Estadio IV	47 (38)
G	
• G1	80 (64)
• G2	41 (33)
• G3	4 (3)
Segundo carcinoma primario	
• No	106 (85)
• Sí	19 (15)
Recidiva tumoral	
• No	71 (57)
• Sí	54 (43)
Estado clínico al final del seguimiento	
• Vivo sin tumor	53 (42)
• Muerto por cáncer oral	53 (42)
• Censurado	19 (16)

Muestras histológicas y análisis posteriores

Para la cohorte de displasias orales, se obtuvieron muestras de tejido representativas de los bloques tisulares archivados embebidos en parafina obtenidos del archivo anatomopatológico del HUCA.

El diagnóstico histológico fue confirmado posteriormente por un patólogo especialista, categorizando las displasias en leves, moderadas o severas basándose en el actual sistema de clasificación de la OMS (155). Como grupo control se utilizó la mucosa alveolar obtenida en intervenciones de extirpación de terceros molares no erupcionados. Todos los pacientes dieron su consentimiento para la escisión de este tejido normal.

Para la cohorte de carcinomas orales de células escamosas, se obtuvieron muestras representativas a partir de bloques de tejido embebido en parafina. Estas muestras fueron proporcionadas por el Biobanco del Principado de Asturias. Tras la obtención de las muestras, se llevó a cabo una confirmación histológica posterior por un patólogo experimentado.

Elaboración de matrices de tejido (TMAs)

De cada bloque de tejido de parafina se seleccionaron tres áreas morfológicas representativas de tumor (tres cilindros de 1 mm de diámetro), que fueron transferidos posteriormente a un bloque receptor maestro para construir los TMAs. Los cortes originales de hematoxilina y eosina fueron revisados por un patólogo experimentado, quien identificó las áreas tumorales de interés y confirmó el diagnóstico histológico. En cada TMA también se incluyeron tres áreas (cilindros de 1 mm de diámetro) de epitelio normal como control interno. Para verificar el diagnóstico histopatológico y la adecuación del muestreo del tejido, una sección de cada TMA fue teñida con hematoxilina y eosina y posteriormente examinada por microscopía óptica.

Análisis de proteínas mediante inmunohistoquímica

Los TMAs se cortaron en secciones seriadas de 3 μm , que fueron adheridas posteriormente en portas Dako Flex IHC (DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Estas secciones se desparafinaron con xileno estándar y posteriormente se hidrataron con concentraciones graduales decrecientes de alcohol.

El desenmascaramiento antigénico se llevó a cabo utilizando Envision Flex Target Retrieval Solution a pH alto (Dako).

El protocolo de tinción específico utilizado para cada marcador fue el siguiente:

- ✓ **NANOG:** La tinción se realizó a temperatura ambiente en una estación de trabajo de tinción automática (Dako Autostainer Plus, Dako) con el anticuerpo monoclonal de conejo (Cell Signaling technology, Inc.) Anti-NANOG (D73G4) XP®, en una dilución 1:200.
- ✓ **SOX2:** La tinción se realizó a temperatura ambiente en una estación de trabajo de tinción automática (Dako Autostainer Plus, Dako) con el anticuerpo policlonal de conejo Anti-SOX2 (AB5603, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) en una dilución 1:1000.

Se utilizó como sistema de visualización el Dako EnVision Flex + Visualization System (Dako Autostainer, DakoCytomation, Glostrup, Denmark), usando como sustrato cromógeno la diaminobencidina, la cual otorga al complejo una tinción de color marrón. Se incluyeron controles negativos omitiendo el anticuerpo primario.

Finalmente, el último paso de la preparación fue la contratinción con hematoxilina.

Cuantificación de la tinción

Los resultados de la tinción inmunohistoquímica fueron evaluados de forma independiente por dos observadores experimentados, ambos desconocedores de los datos clínicos, con una concordancia inter-observador superior al 95%.

NANOG

Dado que las subpoblaciones de células troncales tumorales (CTTs) pueden representar un porcentaje muy pequeño de células, incluso del 1%, y como tal ser biológicamente relevante, se consideró expresión positiva de NANOG aquellos casos con tinción positiva en al menos el 1% de las células positivas.

La inmunotinción citoplasmática de NANOG en las muestras de displasia oral se cuantificó aplicando un sistema de puntuación semicuantitativo basado en la intensidad de la tinción, distinguiendo tres categorías (186):

- Negativa: ausencia de tinción (puntuación 0).
- Débil a moderada: algo de tinción citoplasmática en áreas displásicas (puntuación 1).
- Fuerte: expresión proteica fuerte, con tinción citoplasmática intensa y homogénea en áreas displásicas (puntuación 2).

Además, en algunos casos se observó tinción nuclear de NANOG, que también se cuantificó como expresión positiva o negativa en función de la presencia o ausencia de tinción nuclear de NANOG en áreas displásicas.

De forma análoga, la inmunotinción citoplasmática de NANOG en las muestras de COCE también se cuantificó aplicando el mismo sistema de puntuación semicuantitativo basado en la intensidad de la tinción dividido en las tres categorías, a saber negativo (puntuación 0), débil (puntuación 1) y fuerte (puntuación 2), de acuerdo con lo establecido previamente (194). Asimismo, teniendo en cuenta que cualquier tinción de NANOG podría ser relevante, incluso bajos niveles, este criterio se utilizó para

establecer como punto de corte de la expresión citoplasmática de NANOG como positiva (puntuaciones 1 y 2) vs. expresión negativa (puntuación 0).

Como grupo control positivo se utilizó el seminoma humano, el cual muestra una fuerte tinción nuclear para NANOG.

SOX2

La tinción de SOX2 se evaluó como el porcentaje de células con tinción nuclear positiva en el epitelio displásico o en el tejido tumoral, y se clasificó como tinción negativa o positiva aplicando dos puntos de corte diferentes:

- SOX2>10%: porcentajes superiores al 10% de núcleos teñidos (valor de la mediana) se consideraron expresión positiva vs. expresión negativa (valores inferiores a la mediana).
- SOX2any: la tinción de SOX2 en áreas displásicas también se valoró considerando como expresión positiva cualquier núcleo teñido vs. expresión negativa ningún núcleo teñido. Este punto de corte se escogió teniendo en cuenta que las subpoblaciones de CTTs se encuentran usualmente limitadas a un reducido número de células.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante el software SPSS versión 18 /IBM Co., Armonk, NY, USA).

Los contrastes entre variables categóricas (las variables clinicopatológicas y la expresión de NANOG y SOX2) se llevaron a cabo mediante el análisis bivariante de Chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher.

La supervivencia específica de enfermedad (SEE) se determinó como aquella desde que se finalizó el tratamiento hasta la muerte por el tumor. Para el análisis de tiempo hasta el evento, las curvas de supervivencia se estimaron mediante el método de Kaplan-Meier y las diferencias entre los diversos tiempos de supervivencia se analizaron utilizando el test de log-rank. El modelo de riesgos proporcionales de Cox se utilizó para los análisis uni y multivariante. Se calcularon los *Hazard Ratios* (HR) con intervalos de confianza del 95% (IC) para las variables clinicopatológicas. Todos los test fueron bilaterales (*two sided*), y los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

5. Resultados

RESULTADOS

Displasia epitelial oral

Expresión de biomarcadores en displasias epiteliales orales

Análisis de la expresión de NANOG

Se realizó una evaluación mediante inmunohistoquímica de la expresión de la proteína NANOG en una muestra de 55 displasias orales. Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes:

- ✓ La expresión nuclear de NANOG fue detectada en un total de 2 (3,6%) casos.
- ✓ La expresión citoplasmática de NANOG fue positiva en 9 displasias orales (16,4%):
 - Cinco (9,1%) lesiones mostraron tinción fuerte (puntuación 2).
 - Cuatro (7,2%) lesiones mostraron tinción débil a moderada (puntuación 1).

La Figura 8 muestra imágenes representativas de la expresión nuclear/citoplasmática de NANOG en displasias orales, comparado con la expresión negativa en tejido epitelial sano adyacente (Figuras 8 A-C). Como control positivo se utilizó una muestra de seminoma humano, en la que se detectó una fuerte tinción nuclear para NANOG (Figura 8 D).

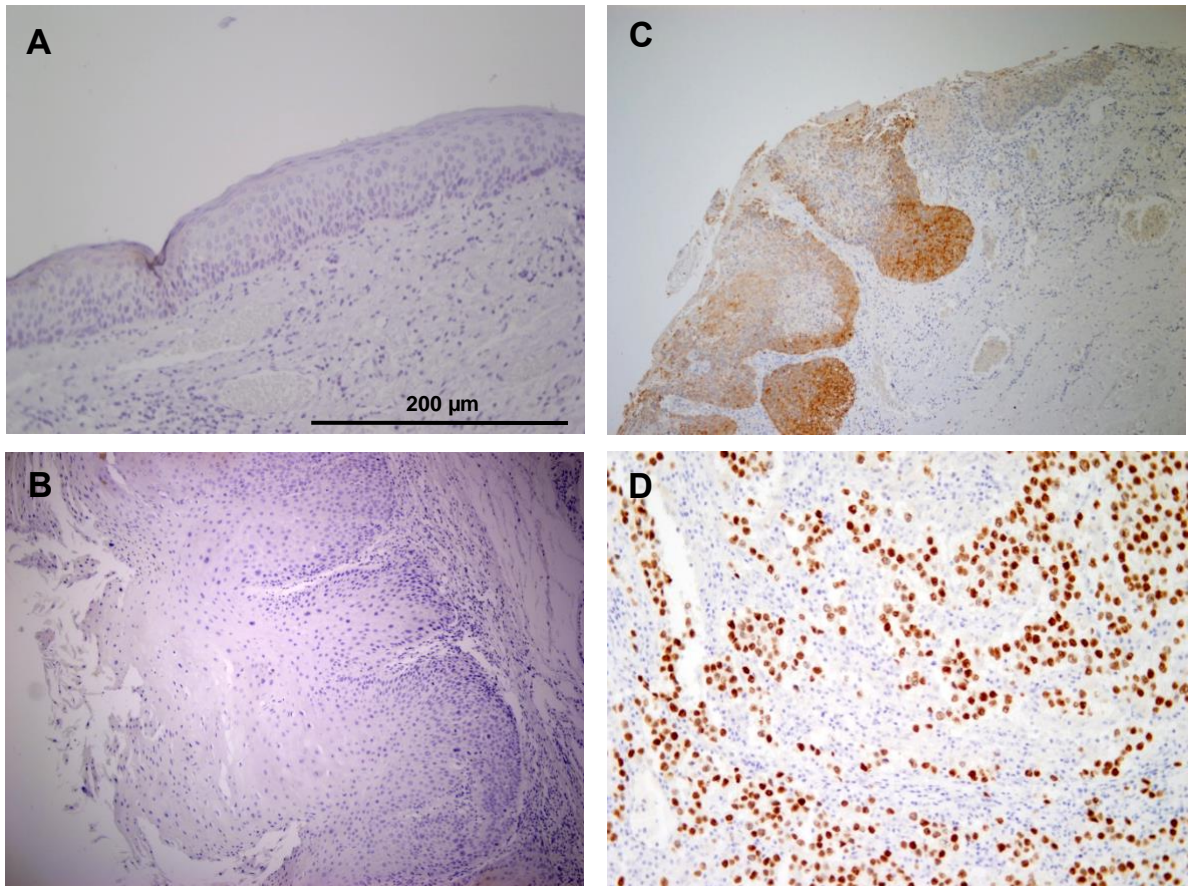


Figura 8. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de NANOG en displasias epiteliales orales. El tejido epitelial adyacente normal mostraba tinción negativa (A). Imágenes representativas de displasias orales con tinción negativa (B), y positiva (nuclear y citoplasmática) para NANOG (C). Seminoma humano (control positivo) con fuerte tinción nuclear de NANOG (D).

Asociaciones entre la expresión de NANOG y las variables clinicopatológicas

Se analizaron las correlaciones entre la expresión de NANOG y diferentes variables clinicopatológicas (Tabla 11). La expresión citoplasmática de NANOG no se asoció de forma estadísticamente significativa con la edad del paciente ($p = 0,69$), el sexo ni el hábito tabáquico. Se encontró una asociación significativa entre la expresión citoplasmática de NANOG y el hábito alcohólico ($p = 0,02$), aunque estos datos sólo incluyen 31 pacientes del total de la muestra.

La expresión citoplasmática de NANOG también se asoció de forma estadísticamente significativa con la clasificación histopatológica. 4 (10%) de las 42

lesiones con bajo grado de displasia, y 5 (38%) de las 13 lesiones con alto grado de displasia mostraron expresión citoplasmática de la proteína NANOG (Test exacto de Fisher, $p = 0,02$) (Tabla 11).

Tabla 11. Asociaciones entre la expresión citoplasmática de NANOG y las características clinicopatológicas en pacientes con displasia oral.

Característica	Puntuación de la tinción citoplasmática de NANOG			p^*
	0	1	2	
Edad (años), Media (SD)	63 (12)	57 (18)	65 (14)	0,69
Sexo, número (%)				
• Mujer	26 (90)	1 (3)	2 (7)	0,42
• Hombre	20 (77)	3 (11)	3 (11)	
Fumador, número (%)				
• Sí	7 (70)	1 (10)	2 (20)	1,00
• No	16 (76)	2 (10)	3 (14)	
Consumidor de alcohol, número (%)				
• Sí	1 (25)	2 (50)	1 (25)	0,02
• No	22 (81)	1 (4)	4 (15)	
Grado de displasia				
• Bajo	38 (90)	1 (3)	3 (7)	0,02
• Alto	8 (62)	3 (23)	2 (5)	

* Test exacto de Fisher. Los datos sobre el consumo de tabaco y alcohol sólo estaban disponibles para 31 pacientes.

En cuanto a la expresión nuclear de NANOG, hubo una tendencia a la asociación con un mayor grado de displasia (test exacto de Fisher $p = 0,05$) (Tabla 12). No se hallaron asociaciones de la expresión nuclear de NANOG con la edad de los pacientes, el hábito tabáquico ni el consumo de alcohol.

Tabla 12. Asociaciones entre la expresión nuclear de NANOG y las características clinicopatológicas en pacientes con displasia oral.

Característica	Expresión nuclear de NANOG		p †
	Negativa	Positiva	
Edad (años), Media (SD)	62 (13)	69 (13)	0,46
Sexo, número (%)			
• Mujer	28 (97)	1 (3)	
• Hombre	25 (96)	1 (4)	
Fumador, número (%)			
• Sí	10 (100)	0 (0)	1,00
• No	19 (90)	2 (10)	
Consumidor de alcohol, número (%)			
• Sí	4 (100)	0 (0)	1,00
• No	25 (93)	2 (7)	
Grado de displasia			
• Bajo	42 (100)	0 (0)	0,05
• Alto	11 (85)	2 (15)	

†Test de Fisher. Los datos sobre el consumo de tabaco y alcohol sólo estaban disponibles para 31 pacientes.

Análisis de la expresión de SOX2

Se realizó una evaluación mediante inmunohistoquímica de la expresión de la proteína SOX2 en una muestra de 55 displasias orales. Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes:

- ✓ La expresión nuclear de SOX2 se detectó en cuatro (7%) casos cuando se utilizó como punto de corte el 10% de núcleos teñidos (SOX2>10%), es decir, valores superiores a la mediana.
- ✓ La expresión se detectó en 16 (29%) casos cuando se consideró cualquier núcleo positivo (SOX2any).

El tejido epitelial adyacente normal mostró expresión negativa para SOX2 (Figura 9 A). En la Figura 9 B y C se muestran ejemplos de displasias epiteliales orales con tinción nuclear positiva y negativa para la expresión de SOX2.

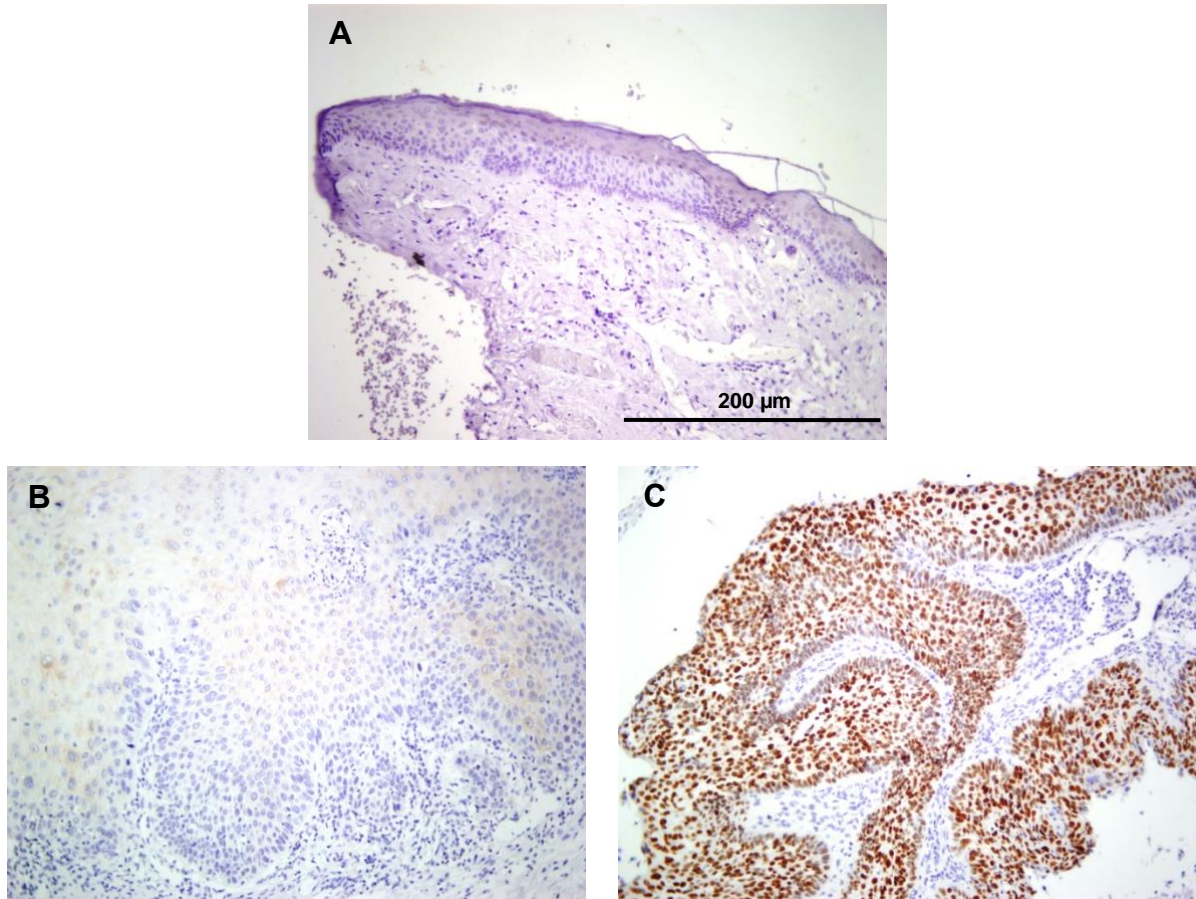


Figura 9. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de SOX2 en displasias epiteliales orales. El epitelio sano adyacente mostró tinción negativa (A). Imágenes representativas de displasia con tinción nuclear negativa (B) y tinción nuclear positiva (C) para SOX2.

Asociaciones entre la expresión de SOX2 y las variables clinicopatológicas

Cuando se consideró como expresión positiva SOX2>10, superior al 10% de núcleos teñidos, la tinción de SOX2 no se asoció de forma significativa con el sexo, el hábito tabáquico ni el consumo de alcohol (Tabla 13). Se observó que la expresión nuclear SOX2>10 aumentaba significativamente con el grado de displasia, tanto con la clasificación en tres grados de la OMS ($p = 0,001$) como con la clasificación binaria (bajo grado vs. alto grado; $p = 0,002$). Ningún caso de displasia leve mostraba expresión nuclear de SOX2, frente al 17% de las displasias moderadas y el 43% de las displasias graves, o el 31% de las displasias de alto grado según la clasificación binaria. En síntesis, cuatro (7%) de las 55 displasias epiteliales mostraron tinción positiva para SOX2 cuando se consideró como tinción positiva la tinción en más del 10% de los núcleos.

Tabla 13. Asociaciones entre la expresión nuclear de SOX2> 10 (superior al 10%) y las características de los pacientes con displasia oral.

Características	Tinción nuclear de SOX2		<i>p</i>
	Negativa	Positiva	
Edad (años), mediana (DS)	62,93 (12,69)	60,50 (13,20)	0,72
Sexo, número (%)			
• Femenino	27 (93)	2 (7)	1,00
• Masculino	24 (92)	2 (8)	
Fumador, número (%)			
• Sí	9 (90)	1 (10)	1,00
• No	18 (86)	3 (14)	
Consumo de alcohol, número (%)			
• Sí	3 (75)	1 (25)	0,44
• No	24 (89)	3 (11)	
Displasia epitelial			
• Leve	42 (100)	0 (0)	0,001
• Moderada	5 (83)	1 (17)	
• Grave	4 (57)	3 (43)	
Displasia epitelial			
• Bajo grado	42 (100)	0 (0)	0,002
• Alto grado	9 (69)	4 (31)	

Cuando se consideró como expresión positiva de SOX2 la tinción de cualquier núcleo (SOX2any), tampoco se encontraron asociaciones significativas con el sexo, el hábito tabáquico ni el consumo de alcohol (Tabla 14). De nuevo, se observó que la expresión nuclear de la proteína SOX2 aumentaba con el grado de displasia, tanto con la clasificación en tres grados de la OMS ($p = 0,055$) como con la clasificación binaria (bajo grado vs. alto grado), alcanzando diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,02$). En síntesis, 16 (29%) de las 55 displasias epiteliales mostraron expresión positiva para SOX2 cuando se consideró como tinción positiva cualquier núcleo teñido.

Tabla 14. Asociaciones entre la expresión nuclear de SOX2any (cualquier núcleo teñido) y las características de los pacientes con displasia oral.

Características	Tinción en cualquier núcleo SOX2any		<i>p</i>
	Negativa	Positiva	
Edad (años), mediana (DS)	61,00 (12,69)	65,55 (12,35)	0,34
Sexo, número (%)			
• Femenino	22 (76)	7 (24)	0,39
• Masculino	17 (65)	9 (35)	
Fumador, número (%)			
• Sí	6 (60)	4 (40)	0,71
• No	14 (67)	7 (33)	
Consumo de alcohol, número (%)			
• Sí	2 (50)	2 (50)	0,60
• No	18 (67)	9 (33)	
Displasia epitelial			
• Leve	33 (79)	9 (21)	0,055
• Moderada	3 (50)	3 (50)	
• Grave	3 (43)	4 (57)	
Displasia epitelial			
• Bajo grado	33 (79)	9 (21)	0,02
• Alto grado	6 (46)	7 (54)	

Asociación de la expresión de los biomarcadores con el riesgo de progresión a cáncer oral

Correlación entre el grado de displasia y el riesgo de cáncer oral

El periodo de seguimiento de los pacientes fue de 4 a 252 meses, con una media de 85,47 meses (media: 85,47, DS: 44,41; mediana 75). Durante este periodo de seguimiento, 12 (22%) de los 55 pacientes con displasia oral desarrollaron un carcinoma invasivo en el mismo sitio de la lesión premaligna previa.

El tiempo medio para el diagnóstico de cáncer en los casos con progresión fue de 184 meses (rango de 145 a 222 meses), siendo la mediana 192 meses (rango de 24 a 359 meses).

El grado histopatológico de displasia (tanto la clasificación en tres grados de la OMS como la binaria) se asoció significativamente con el riesgo de progresión a cáncer en esta cohorte ($p < 0,001$; Tabla 15). Un total de 12 pacientes progresaron a carcinoma oral, de los cuales 10 tenían una displasia de alto grado.

Los análisis de Kaplan-Meier y de Cox mostraron que el grado histológico de displasia obtuvo una asociación significativa con el riesgo de progresión a cáncer (test de log Rank, $p < 0,001$; Figura 10 A, B) (Tabla 16). De tal forma, aquellos pacientes con displasia de alto grado tuvieron una menor supervivencia media sin cáncer que los pacientes con displasias de bajo grado (log-rank, $p < 0,001$).

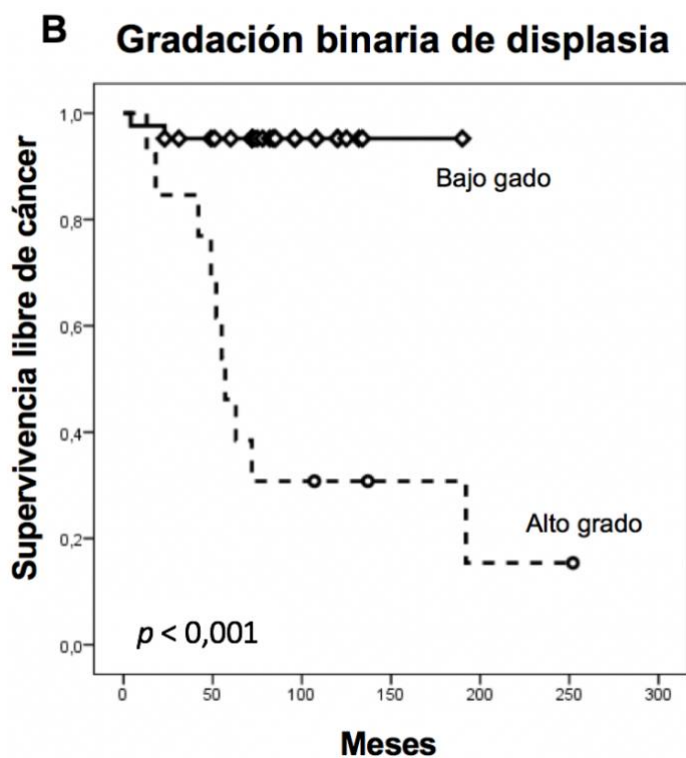
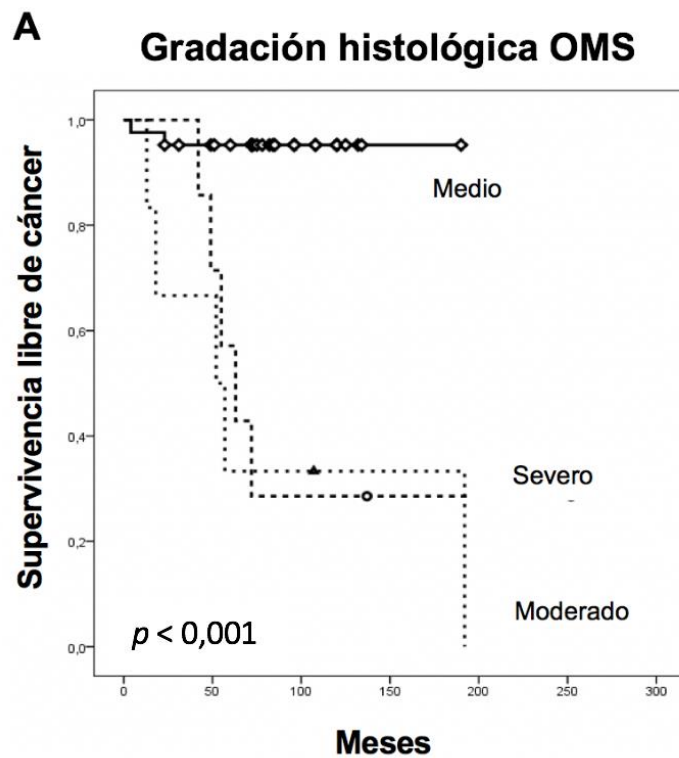


Figura 10. Curvas de Kaplan-Meier para el análisis de la supervivencia libre de cáncer en la cohorte de 55 pacientes con displasia epitelial oral según: **A)** la clasificación de la OMS; **B)** clasificación binaria (bajo grado vs. alto grado). Los valores de p fueron estimados con el test de log-rank.

Correlación de la expresión de NANOG con el riesgo de cáncer oral

La expresión positiva para NANOG en las displasias orales, tanto la expresión citoplasmática como nuclear, se asoció de forma consistente y significativa con un mayor riesgo de progresión a cáncer oral ($p = 0,02$ y $p = 0,04$, respectivamente) (Tabla 15). De tal forma, dos de los cuatro pacientes (50%) y tres de los cinco pacientes (60%) con expresión moderada o intensa de NANOG citoplasmático y el 100% de pacientes con expresión positiva para NANOG nuclear progresaron a carcinoma oral.

Tabla 15. Evolución de las lesiones premalignas en relación con el diagnóstico histopatológico y la expresión nuclear y citoplasmática de NANOG.

Característica	Número de casos (%)	Progresión a carcinoma (%)	p
Grado de displasia			
• Bajo	42 (76)	2 (5)	< 0,001 [†]
• Alto	13 (24)	10 (77)	
NANOG citoplasmático			
• Puntuación 0	46 (84)	7 (15)	0,02*
• Puntuación 1	4 (7)	2 (50)	
• Puntuación 2	5 (9)	3 (60)	
Tinción nuclear de NANOG			
• Negativa	53 (96)	10 (19)	0,04 [†]
• Positiva	2 (4)	2 (100)	

*Test de Chi cuadrado y [†]de Fisher

Los análisis de Kaplan-Meier y de Cox también mostraron de forma consistente que los pacientes con expresión positiva de NANOG citoplasmático y NANOG nuclear mostraron significativamente mayor riesgo de cáncer oral ($p = 0,002$ y $p = 0,001$, respectivamente) (Tabla 16). La expresión citoplasmática intensa de NANOG

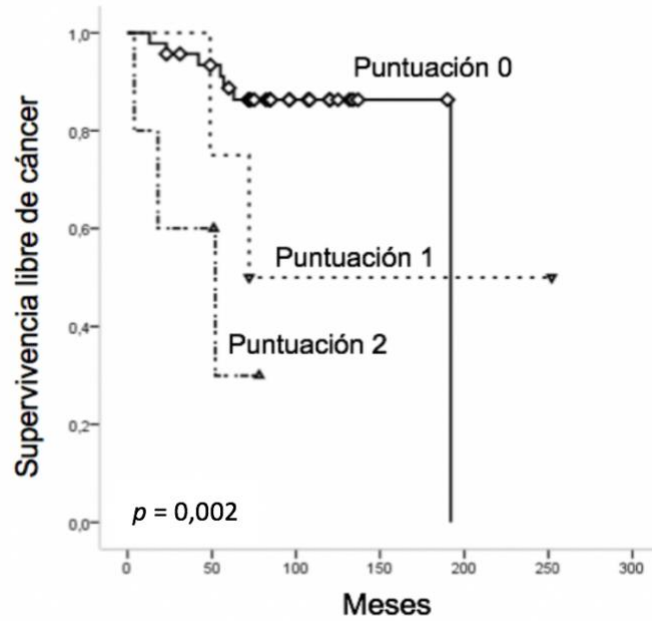
(puntuación 2) se asoció de forma estadísticamente significativa con una menor supervivencia sin cáncer (log-rank, $p = 0,002$; Figura 11 A). De forma análoga, pacientes con displasias con expresión nuclear de NANOG mostraron significativamente una mayor progresión a carcinoma que aquellos pacientes con expresión negativa (log-rank, $p = 0,001$; Figura 11 B).

Tabla 16. Análisis univariante de Cox para la supervivencia libre de cáncer de 55 pacientes con displasia oral clasificada según el grado de displasia y la expresión de NANOG.

Característica	Nº casos	Pacientes censurados (%)	Supervivencia media sin cáncer (IC 95%)	p	Hazard Ratio	IC 95%
Grado de displasia						
• Bajo	42	40 (95)	181,59 (170,21-192,98)	<0,001	Referencia	
• Alto	13	3 (23)	100,69 (54,14-147,24)		19,08	4,09-80,01
NANOG citoplasmático						
• Puntuación 0	46	39 (85)	171,57 (155,07-188,07)	0,002	Referencia	
• Puntuación 1	4	2 (50)	156,25 (62,07-250,43)		2,30	0,41-12,86
• Puntuación 2	5	2 (40)	43,40 (17,52-69,27)		8,13	2,02-32,64
NANOG nuclear						
• Negativo	53	43 (81)	189,58 (150,36-228,81)	0,001	Referencia	
• Positivo	2	0 (0)	45,00 (0,00-97,92)		8,13	1,78-38,79

Intervalo de confianza 95% (IC 95%).

A NANOG citoplasmático en TOPC



B NANOG nuclear en TOPC

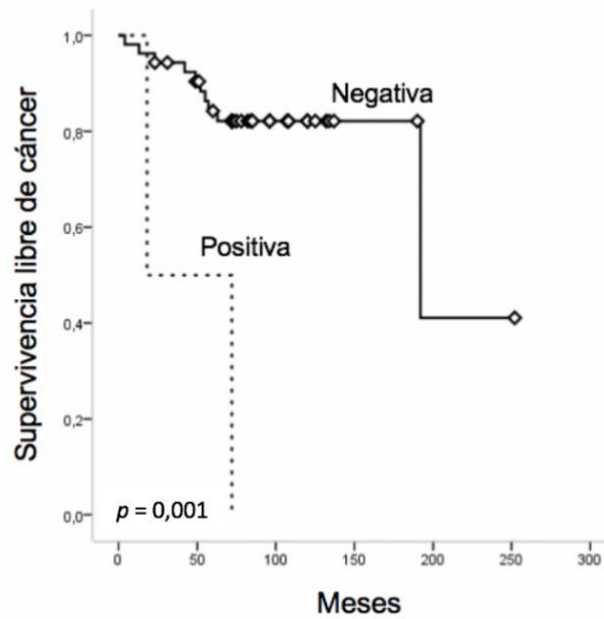


Figura 11. Curvas de Kaplan-Meier para el análisis de supervivencia libre de cáncer en la cohorte de 55 pacientes con displasia epitelial oral, categorizado según: **A)** la expresión de citoplasmática de NANOG (puntuación de tinción 0, 1 y 2); **B)** la expresión de nuclear de NANOG (positivo vs. negativo). Los valores de p fueron estimados con el test de log-rank.

Cuando se analizaron de forma simultánea la expresión citoplasmática y nuclear de NANOG y el grado histológico usando un análisis multivariante de Cox, el grado de displasia fue el único predictor independiente con significación estadística para el desarrollo de cáncer oral (HR =17,88, IC 95% 3,59 a 89,04; $p < 0,001$) (Tabla 17).

Es importante destacar que aquellos pacientes con fuerte expresión citoplasmática de NANOG (puntuación 2) experimentaron una mayor progresión a COCE que aquellos con tinción tenue o negativa (puntuaciones 0 y 1), con diferencias próximas a la significación estadística (HR = 4,45, IC 95% 0,88 a 22,42; $p = 0,07$).

Tabla 17. Modelo multivariante de Cox para estimar el riesgo de cáncer oral en pacientes con displasia oral.

Variable	<i>p</i>	Hazard Ratio	Intervalo de Confianza 95%
Histología (alto grado vs. bajo grado)	<0,001	17,88	3,59-89,04
NANOG citoplasmático	0,082		
• Puntuación 0	Referencia	Referencia	
• Puntuación 1	0,54	0,55	0,08-3,63
• Puntuación 2	0,07	4,45	0,88-22,42
Expresión de NANOG nuclear (positivo vs. negativo)	0,48	2,014	0,28-14,25

Correlación de la expresión de SOX2 con el riesgo de cáncer oral

Considerando la expresión positiva de SOX2 como la tinción en más del 10% de los núcleos (SOX2 > 10%), tres (75%) de los cuatro pacientes cuyas displasias eran positivas para SOX2 progresaron a carcinoma oral (test de Fisher, $p = 0,02$; Tabla 18). Cuando se consideró como tinción positiva la tinción de cualquier núcleo (SOXany), siete (44%) de los 16 pacientes con displasias positivas para SOX2 malignizaron a carcinoma oral (test de Fisher, $p = 0,01$; Tabla 18).

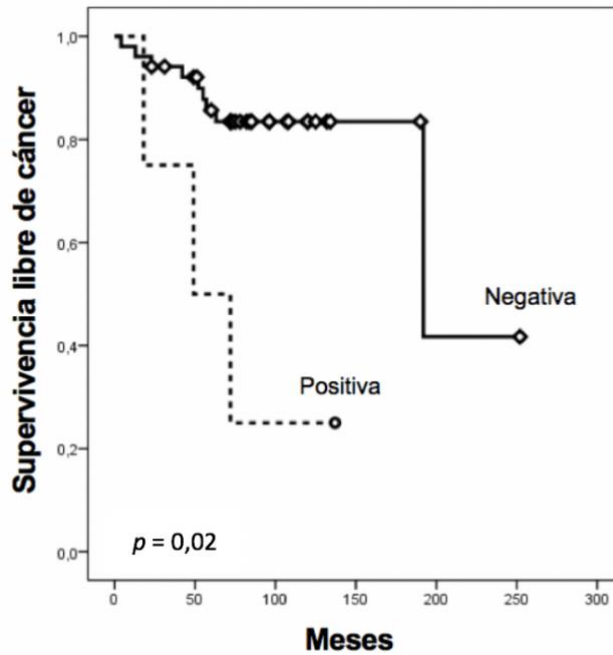
Tabla 18. Evolución de las lesiones premalignas en relación al diagnóstico histopatológico y la expresión de SOX2.

Variable	Número de casos (%)	Progresión a carcinoma (%)	p^*
Diagnóstico histopatológico			
• Displasia de bajo grado	42 (76)	2 (5)	<0,001
• Displasia de alto grado	13 (24)	10 (77)	
Nuclear SOX2 > 10%			
• Negativo	51 (93)	9 (18)	0,02
• Positivo	4 (7)	3 (75)	
Cualquier núcleo positivo SOX2			
• Negativo	39 (71)	5 (13)	0,01
• Positivo	16 (29)	7 (44)	

*Test exacto de Fisher

Con todo ello, podemos destacar que la expresión positiva de SOX2 predice de forma consistente y significativa el riesgo de cáncer oral, ya sea considerando SOX2 > 10% (test de log-rank, $p = 0,02$; Figura 12 A) o SOXany (test de log-rank, $p = 0,01$; Figura 12 B) como puntos de corte.

A SOX2 > 10% núcleos positivos



B SOX2 any núcleos positivos

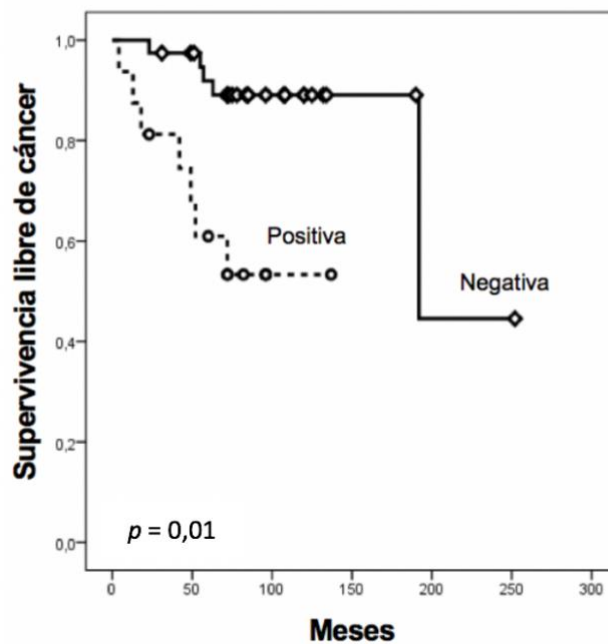


Figura 12. Curvas de Kaplan-Meier para el análisis de supervivencia libre de cáncer en la cohorte de 55 pacientes con displasia epitelial oral, categorizado según la expresión nuclear de SOX2 (positiva vs. negativa) utilizando como punto de corte: **A)** SOX2 > 10% de núcleos positivos, **B)** SOX2any (cualquier núcleo teñido). Los valores de p fueron estimados con el test de log-rank.

Los análisis de supervivencia de Kaplan-Meier y de Cox mostraron que la expresión de SOX2 y el grado histológico se encontraban asociados estadísticamente con el riesgo de desarrollar cáncer oral (Tabla 19). La media de supervivencia libre de cáncer en pacientes con displasia epitelial de alto grado fue significativamente menor que en pacientes con displasia de bajo grado ($p = <0,001$).

De forma consistente, los pacientes con expresión positiva tanto de SOX2 > 10% como de SOXany tenían una media de tiempo de supervivencia libre de cáncer significativamente menor que los pacientes con expresión negativa ($p = 0,002$).

Tabla 19. Análisis univariante de Cox para la supervivencia libre de cáncer en 55 pacientes con displasia oral categorizada según el grado de displasia y la expresión de SOX2.

Variable	Nº	Pacientes censurados (%)	Media de tiempo supervivencia libre de cáncer (IC 95%)	p^*	Hazard Ratio	IC 95%
Displasia epitelial						
• Alto grado	13	3 (23)	100,69 (54,14-147,24)	<0,001	19,08	4,09-89,01
• Bajo grado	42	40 (95)	181,59 (170,21-192,98)			
SOX2 > 10%						
• Positivo	4	1 (25)	69,00 (26,18-111,81)	0,002	6,13	1,62-23,27
• Negativo	51	42 (82)	191,80 (152,14-231,47)			
SOX2any						
• Positivo	16	9 (56)	90,40 (64,14-116,60)	0,002	5,75	1,68-19,74
• Negativo	39	34 (87)	203,22 (162,30-244,15)			

*Los valores de p se estimaron utilizando el test de log-rank. Intervalo de confianza 95% (IC 95%).

Cuando la expresión de SOX2 y el grado histológico se analizaron simultáneamente mediante un análisis multivariante de Cox, tanto la expresión de SOX2 calculada usando SOXany como punto de corte como el grado de displasia fueron predictores independientes significativos de desarrollo de COCE ($p < 0,0001$) (Tabla 20).

Tabla 20. Modelo multivariante de Cox para estimar el riesgo de cáncer oral.

Variable	<i>p</i>	<i>Hazard Ratio</i>	IC (95%)
Histología (alto grado vs. bajo grado)	<0,0001	21,88	4,13-116,07
SOX2>10% (positivo vs. negativo)	0,196	3,0	0,57-15,89
SOX2any (positivo vs. negativo)	0,021	5,83	1,31-26,01

Intervalo de confianza 95% (IC 95%)

Coexpresión de NANOG y SOX2 y el riesgo de progresión a cáncer oral

Dado que SOX2 y NANOG son dos proteínas relacionadas funcionalmente, comparamos la relación con el riesgo de malignización de la expresión combinada de ambas proteínas frente a la expresión individual. Los resultados mostraron de forma consistente que los pacientes con displasias orales con expresión positiva simultánea de SOX2 (sea SOX2 > 10% o SOX2any) y NANOG (expresión citoplasmática o nuclear) mostraron un riesgo significativamente mayor de desarrollar cáncer oral, en comparación con los pacientes con expresión individual de SOX2 o NANOG, o aquellos pacientes con expresión negativa de ambas proteínas (Tablas 21 y 22).

Tabla 21. Análisis univariante de Cox para la supervivencia libre de cáncer en 55 pacientes con displasia oral categorizada según la expresión individual y combinada de SOX2 >10% y NANOG.

Variable	Nº	Pacientes censurados (%)	Media de tiempo supervivencia libre de cáncer (IC 95%)	p	Hazard Ratio	IC 95%
SOX2 > 10% y NANOG nuclear						
• Ambos negativos	51	42 (84)	191,80 (152,13-231,46)		Ref	
• Uno positivo	2	1 (50)	93,00 (32,01-153,98)	0,003	3,72	0,46-29,98
• Ambos positivos	2	42 (82)	45,00 (8,00-97,92)		9,06	1,91-43,00
SOX2 > 10% y NANOG citoplasmático						
• Ambos negativos	45	38 (84)	171,10 (154,24-187,95)		Ref	
• Uno positivo	7	5 (71)	182,28 (101,53-263,03)	<0,005	1,63	0,30-8,71
• Ambos positivos	3	0 (0)	46,33 (15,66-76,99)		10,89	2,74-43,22

Los pacientes cuyas displasias no expresaban ninguno de los dos factores tenían una supervivencia libre de cáncer significativamente mayor que aquellos con la expresión de una o ambas proteínas, reduciéndose esta supervivencia al 50% y al 25%, respectivamente (Tabla 22).

Tabla 22. Análisis univariante de Cox para la supervivencia libre de cáncer en 55 pacientes con displasia oral categorizada según la expresión de SOX2any y NANOG.

Variable	Nº	Pacientes censurados (%)	Media de tiempo supervivencia libre de cáncer (IC 95%)	p	Hazard Ratio	IC 95%
Núcleos positivos SOX2any y NANOG nuclear						
• Ambos negativos	39	34 (87)	203,22 (162,30-244,15)		Ref	
• Uno positivo	14	9 (64)	97,76 (69,96-125,55)	<0,005	4,62	1,23-17,29
• Ambos positivos	2	0 (0)	45,00 (8,00-97,92)		14,82	2,69-81,56
Núcleos positivos SOX2any y NANOG citoplasmático						
• Ambos negativos	36	31 (86)	175,49 (158,40-192,57)		Ref	
• Uno positivo	13	11 (85)	215,99 (170,17-261,81)	<0,005	1,091	0,20-5,85
• Ambos positivos	6	1 (17)	44,50 (21,60-67,40)		11,36	3,18-40,60

Carcinoma oral de células escamosas

Significado clínico de la expresión de los biomarcadores en la progresión del COCE y evolución de la enfermedad

Análisis de la expresión de NANOG

La expresión de la proteína NANOG fue evaluada mediante inmunohistoquímica en una cohorte de 125 pacientes con COCE. La expresión positiva de NANOG (puntuaciones 1 y 2) se detectó en 39 (31%) de 122 carcinomas (3 casos fueron no evaluables); la tinción citoplasmática se observó predominantemente en células tumorales, y fue insignificante en las células estromales (Figura 13 A,B).

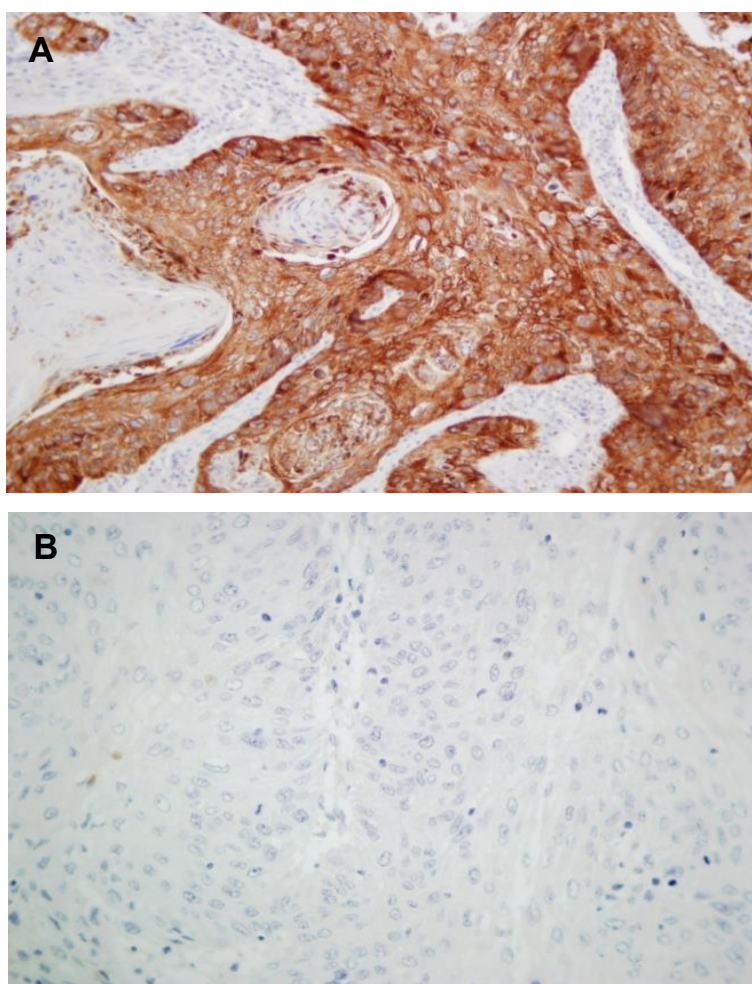


Figura 13. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de NANOG en pacientes con COCE. Imágenes representativas de un carcinoma oral con fuerte tinción positiva para NANOG (citoplasmática y nuclear) **A)** y un ejemplo de carcinoma oral con expresión negativa **B)**.

En relación con las variables clinicopatológicas, la expresión de NANOG fue significativamente más frecuente en hombres (39%) que en mujeres (18%) ($p = 0,02$) (Tabla 23). También se asoció de forma significativa con el hábito tabáquico ($p = 0,009$), y el consumo de alcohol ($p = 0,01$) (Tabla 23). No se observaron asociaciones significativas entre el tamaño tumoral (pT) y el estado ganglionar cervical (pN), siendo la expresión de NANOG similar en pT1 - pT2 y en pT3 - pT4 (33% y 30%, respectivamente; $p = 0,76$) y más frecuente en pN0 y pN+ (35% y 28%, respectivamente; $p = 0,41$). En cuanto a la histología, la expresión de NANOG fue más frecuente en pacientes con tumores más indiferenciados que en tumores bien diferenciados, aunque la asociación no fue estadísticamente significativa (G2 y G3= 40%; G1 = 27%; $p = 0,14$). La expresión de NANOG fue más frecuente en pacientes sin recidivas tumorales que en pacientes con recidiva (38% y 24%, respectivamente), con diferencias cercanas a la significación estadística ($p = 0,09$).

En resumen, aunque no se observaron asociaciones significativas, la expresión positiva de NANOG fue más frecuente en tumores pN0, estadios precoces I-II, y en ausencia de recidivas tumorales (Tabla 23).

Tabla 23. Asociaciones entre la expresión de NANOG y las variables clinicopatológicas en la cohorte de 125 pacientes con COCE.

Variable	Nº de casos (%)	Expresión positiva de NANOG (%)	p
Sexo			
• Hombre	79	31 (39)	0,02
• Mujer	43	8 (18)	
Tabaco			
• Fumador	82	3 (40)	0,005
• No fumador	40	6 (15)	
Consumo de alcohol			
• Bebedor	67	29 (43)	0,003
• No bebedor	55	10 (18)	
pT			
• pT1+2	79	26 (33)	0,76
• pT3+4	43	13 (30)	
pN			
• pN0	75	26 (35)	0,41
• pN+	47	13 (28)	
Estadio clínico			
• I+II	51	20 (39)	0,14
• III+IV	71	19 (27)	
G			
• G1	77	21 (27)	0,14
• G2+G3	45	18 (40)	
Localización tumoral			
• Lengua	50	14 (28)	0,43
• Otras	72	25 (35)	
Localización tumoral			
• Suelo oral	36	13 (36)	0,52
• Otros	86	26 (30)	
Recidiva tumoral			
• No	68	26 (38)	0,09
• Sí	54	13 (24)	
Segundo carcinoma primario			
• No	104	32 (31)	0,49
• Sí	18	7 (39)	
Estado clínico al final del seguimiento			
• Vivo sin recidiva	50	19 (38)	0,48*
• Muerto por cáncer	53	15 (28)	
• Censurado	19	5 (26)	

Test exacto de Fisher y *Chi cuadrado.

Se observó una mayor supervivencia específica de enfermedad a los 5 años en los pacientes con expresión positiva de NANOG, aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística (test de log-rank, $p = 0,389$; Figura 14).

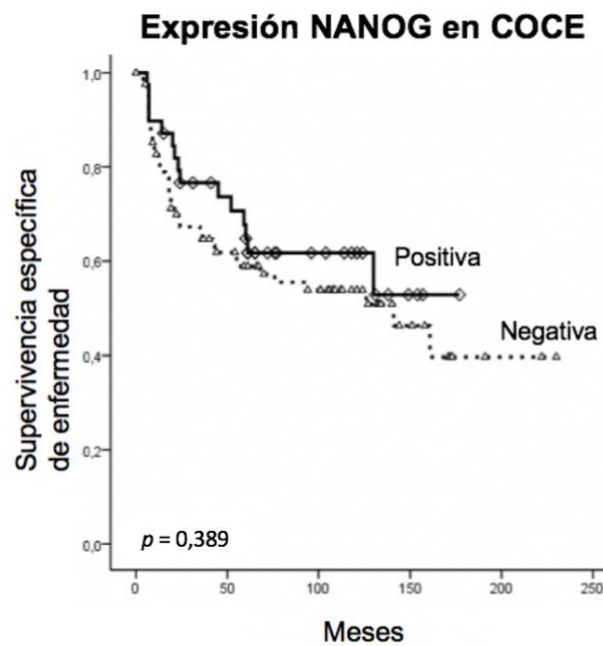


Figura 14. Curvas de Kaplan-Meier para el análisis de supervivencia específica de enfermedad en la cohorte de 125 pacientes con COCE, categorizada según la expresión de NANOG (positiva vs. negativa). El valor de p fue estimado con el test de log-rank.

Análisis de la expresión de SOX2

Se detectó tinción positiva para SOX2 en 49 (39%) de los pacientes con COCE localizada en el núcleo de las células tumorales, mientras que las células estromales y el epitelio normal mostraron ausencia de tinción (Figura 15 A, B).

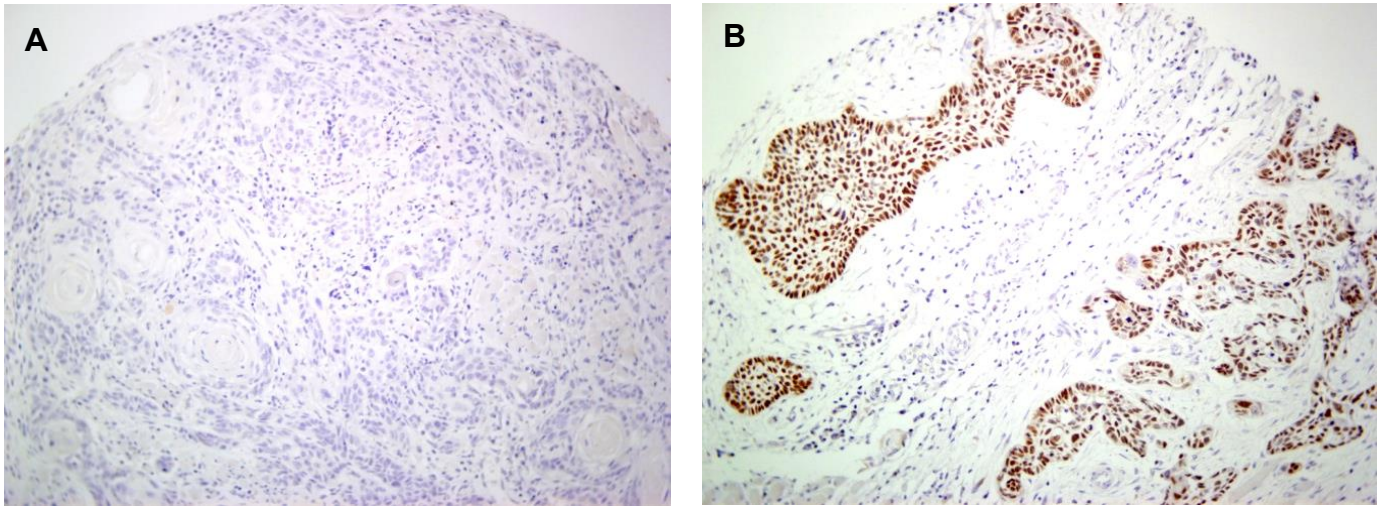


Figura 15. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de SOX2 en pacientes con COCE. Imágenes representativas de un carcinoma oral con tinción positiva para SOX2 localizada en los núcleos de las células tumorales **A)** y un ejemplo de carcinoma oral con expresión negativa **B)**.

No se hallaron asociaciones significativas entre la expresión de SOX2 y las diferentes variables clinicopatológicas estudiadas (Tabla 24). Sin embargo, se observó una tendencia a la asociación de la expresión positiva de SOX2 con tumores de menor tamaño, estadios precoces (I y II), tumores sin afectación metastásica ganglionar (N0) y la localización del suelo oral.

Asimismo, la expresión de SOX2 fue más frecuente en los pacientes vivos al final del seguimiento y sin recidiva tumoral.

Tabla 24. Asociaciones entre la expresión de SOX2 y las variables clinicopatológicas en pacientes con COCE.

Variable	Nº de casos (%)	Expresión positiva de SOX2 (%)	p
Sexo			
• Hombre	80	32 (40)	0,87
• Mujer	41	17 (41)	
Tabaco			
• Fumador	81	34 (42)	0,63
• No fumador	40	15 (37)	
Consumo de alcohol			
• Bebedor	66	29 (44)	0,39
• No bebedor	55	20 (36)	
pT			
• pT1+2	79	36 (46)	0,11
• pT3+4	42	13 (31)	
pN			
• pN0	73	31 (42)	0,58
• pN+	48	18 (37)	
Estadio clínico			
• I+II	50	23 (46)	0,30
• III+IV	71	26 (37)	
G			
• G1	77	31 (40)	0,94
• G2+G3	44	18 (41)	
Localización tumoral			
• Lengua	51	18 (35)	0,32
• Otras	70	31 (44)	
Localización tumoral			
• Suelo oral	35	17 (49)	0,24
• Otros	86	32 (37)	
Recidiva tumoral			
• No	68	30 (44)	0,35
• Sí	53	19 (36)	
Segundo carcinoma primario			
• No	102	41 (40)	0,87
• Sí	19	8 (42)	
Estado clínico al final del seguimiento			
• Vivo sin recidiva	50	24 (48)	0,28
• Muerto por cáncer	52	17 (33)	
• Censurado	19	8 (42)	

Tabla 25. Análisis univariante de Cox para evaluar la asociación de variables clinicopatológicas y la supervivencia específica de la enfermedad en la cohorte de 125 pacientes con COCE.

Parámetro	Nº casos	Pacientes censurados (%)	Tiempo medio de supervivencia (IC 95%)	HR (IC 95%)	p
Localización tumoral					
• Lengua	51	28 (55)	124,43 (94,00-154,86)	Referencia	0,31
• Otras	74	44 (59)	120,47 (101,48-139,47)	0,75 (0,43-1,30)	
Localización tumoral					
• Suelo oral	37	23 (62)	109,11 (85,88-132,33)	Referencia	0,56
• Otras	88	49 (56)	131,16 (108,62-153,70)	1,19 (0,64-2,21)	
Grado					
• Bien diferenciado	80	44 (55)	127,85 (103,73-151,98)	Referencia	0,59
• Moderadamente-diferenciado	45	28 (62)	121,63 (96,25-147,01)	0,85 (0,48-1,52)	
pT					
• T1 + T2	81	53 (65)	151,82 (129,03-174,62)	Referencia	0,001
• T3 + T4	44	19 (43)	77,62 (54,19-101,04)	2,49 (1,44-4,30)	
pN					
• N0	76	49 (64)	127,96 (109,43-146,49)	Referencia	0,01
• N+	49	23 (47)	108,58 (77,88-139,28)	1,92 (1,12-3,31)	
Estadio					
• I + II	52	36 (69)	140,09 (120,15-160,04)	Referencia	0,002
• III + IV	73	36 (49)	113,33 (87,73-138,93)	2,40 (1,33-4,32)	
SOX2 > 10%					
• Negativo	72	37 (51)	116,37 (90,39-142,35)	Referencia	0,07
• Positivo	49	32 (65)	146,66 (117,98-175,35)	0,59 (0,33-1,05)	

En el análisis de supervivencia, no se observó la existencia de una relación estadísticamente significativa entre el tiempo medio de supervivencia y la localización tumoral, siendo similar independientemente del lugar en el que se encuentre el tumor (lengua, suelo oral, otros). Tampoco se observaron diferencias significativas entre la supervivencia y el grado histopatológico de diferenciación tumoral, siendo similar en los tumores bien diferenciados (127,85 [103,73-151,98]) y en los moderadamente o mal diferenciados (121,63 [96,25-147,01]) (test log-rank, $p = 0,59$).

Se observó una asociación significativa entre el tamaño tumoral y la supervivencia, de modo que los pacientes con tumores más pequeños (pT1 y pT2) tuvieron un tiempo medio de supervivencia significativamente mayor que los pacientes con tumores más grandes (pT3 y pT4) (151,82 [129,03-174,62] y 77,62 [54,19-101,04], respectivamente; HR 2,49 [1,44-4,30]; test log-rank, $p = 0,001$).

También se observó una asociación significativa entre el estado ganglionar (pN) y la supervivencia, de tal forma que los pacientes sin afectación ganglionar cervical (pN0) tuvieron un tiempo medio de supervivencia significativamente mayor que los pacientes con metástasis ganglionares (pN+) (127,96 [109,43-146,49] y 108,58 [77,88-139,28], respectivamente; HR 1,92 [1,12-3,31]; test log-rank, $p = 0,01$).

Se observó una asociación significativa entre el estadio tumoral y la supervivencia, con un tiempo medio de supervivencia significativamente mayor para los pacientes con estadios precoces (I y II) frente a los pacientes con estadios más avanzados (III y IV) (140,09 [120,15-160,04] y 113,33 [87,73-138,93], respectivamente; HR 2,40 [1,33-4,32]; test log-rank, $p = 0,002$).

Finalmente, aunque no observó una asociación significativa, los pacientes con expresión positiva de SOX2 mostraron una mayor supervivencia media de 146,66 meses (117,98-175,35) en comparación con los 116,37 meses (90,39-142,35) en los pacientes con expresión negativa de SOX2, con diferencias cercanas a la significación estadística (test log-rank, $p = 0,07$) (Figura 16).

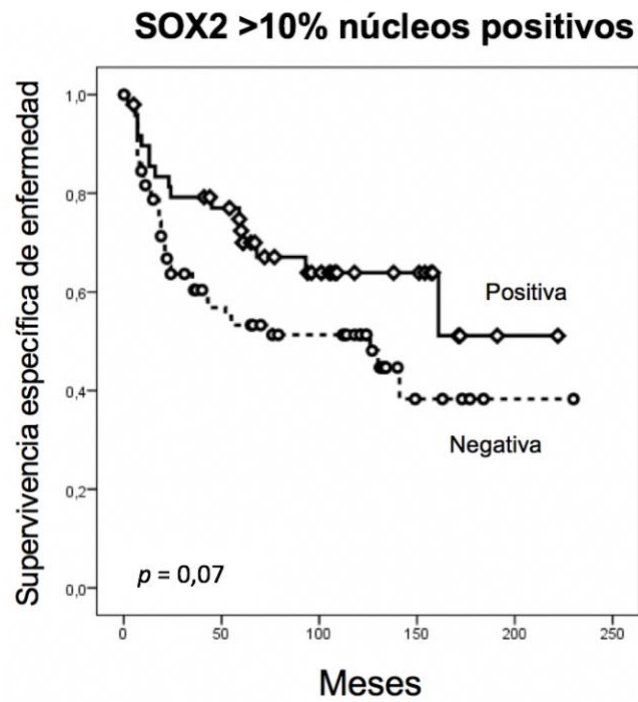


Figura 16. Curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia específica de enfermedad en la cohorte de 125 pacientes con COCE categorizada según la tinción nuclear de SOX2 (positiva vs. negativa). Los valores de p fueron estimados con el test de log-rank.

Análisis *in silico* en pacientes con COCE de las cohortes del TCGA “The Cancer Genome Atlas”

Expresión de ARN mensajero de NANOG y OCT4

El papel de NANOG se investigó ulteriormente mediante un análisis transcriptómico de los datos de ARN-seq disponibles en las cohortes de CECC del TCGA “The Cancer Genome Atlas” (142), utilizando las plataformas cBioPortal (<http://cbioportal.org>) (195) y UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/>) (196). Gracias a la información disponible en estas bases de datos se pudo realizar el análisis de expresión en una cohorte del TCGA que incluye un total de 530 pacientes con CECC. Los resultados de este estudio mostraron que los niveles de ARNm de NANOG eran significativamente mayores en tumores primarios en comparación con muestras de tejido epitelial normal ($p < 0,001$, Figura 17), lo cual concuerda con los resultados de nuestro análisis a nivel de proteína.

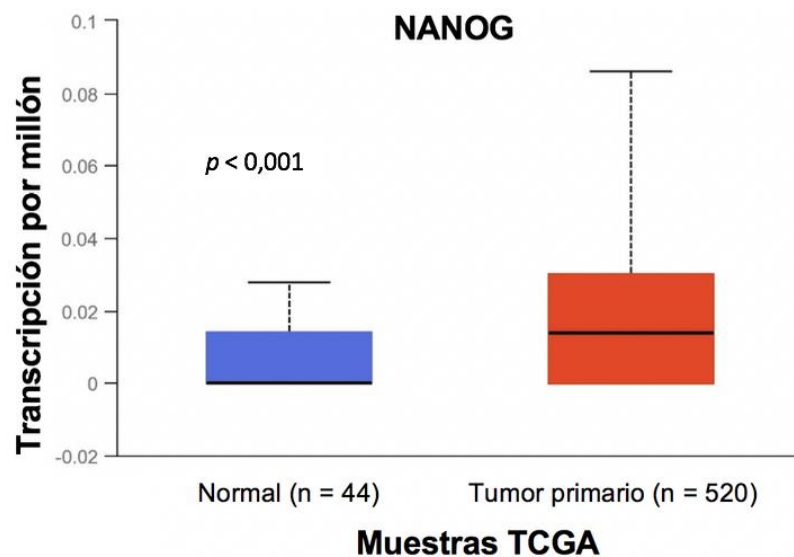


Figura 17. Comparación de los niveles de expresión de ARNm de NANOG en los tumores primarios (rojo) vs. tejido normal (azul) en la cohorte de 530 pacientes con CECC del TCGA usando los recursos online UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/>).

De forma análoga y en la misma cohorte de pacientes, se analizaron los niveles de ARNm de OCT4, otro importante factor de pluripotencialidad y regulador de las CTTs relacionado funcionalmente con NANOG. Además, OCT4 es un factor de transcripción que regula la expresión de NANOG. Los niveles de ARNm de OCT4 aumentan significativamente en los tumores primarios en comparación con los tejidos normales ($p < 0,001$, Figura 18), resultados concordantes a los obtenidos en el análisis de NANOG.

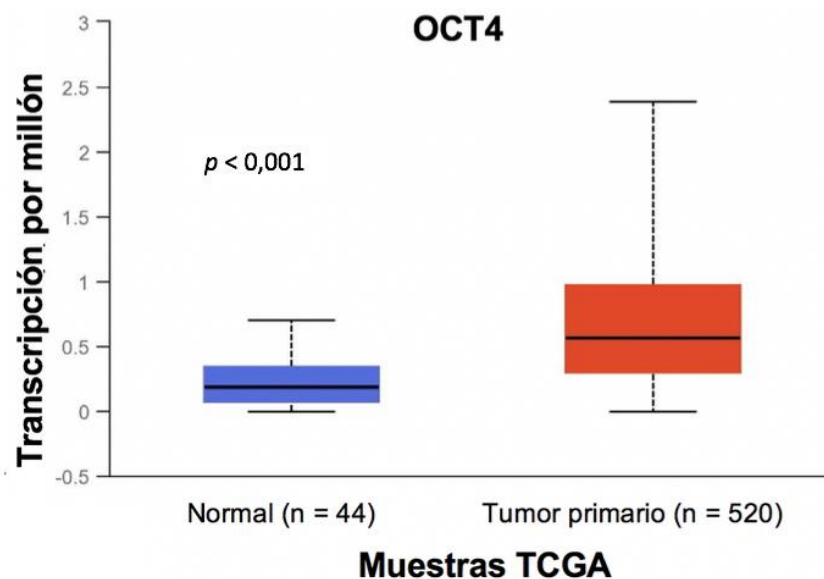


Figura 18. Comparación de los niveles de expresión de ARNm de OCT4 en los tumores primarios (rojo) vs. tejido normal (azul) en la cohorte de 530 pacientes con CECC del TCGA usando los recursos online UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/>).

A continuación, se analizaron alteraciones de la expresión del ARNm de NANOG y otros genes relacionados con pluripotencialidad y CTTs (como OCT4, SOX2 y Podoplanina [PDPN]), específicamente en el subgrupo de 172 pacientes con COCE provenientes de la cohorte del TCGA. Como se muestra en la representación *Heatmap* (Figura 19), se detectaron niveles elevados de ARNm de NANOG y OCT4 en 5 (2,9%) y 3 (1,7%) pacientes con COCE, respectivamente. Además, la expresión concomitante de NANOG y OCT4 se detectó únicamente en 1 caso (0,6%) y, por tanto, se concluye que es extremadamente infrecuente en pacientes con COCE. Por otro lado, se detectaron

niveles elevados de ARNm de SOX2 y PDPN en 22 (13%) y 6 (3%) pacientes con COCE, respectivamente (Figura 19). Como se puede apreciar, casi no hubo superposición en las alteraciones entre los cuatro genes relacionados con CTTs en la serie analizada de 172 pacientes con COCE del TCGA. Estos resultados indican que la expresión de NANOG y SOX2 no se altera de forma frecuente a nivel transcripcional, comparado con la frecuente expresión detectada a nivel de proteína en nuestra cohorte de pacientes con COCE (31 y 39%, respectivamente).

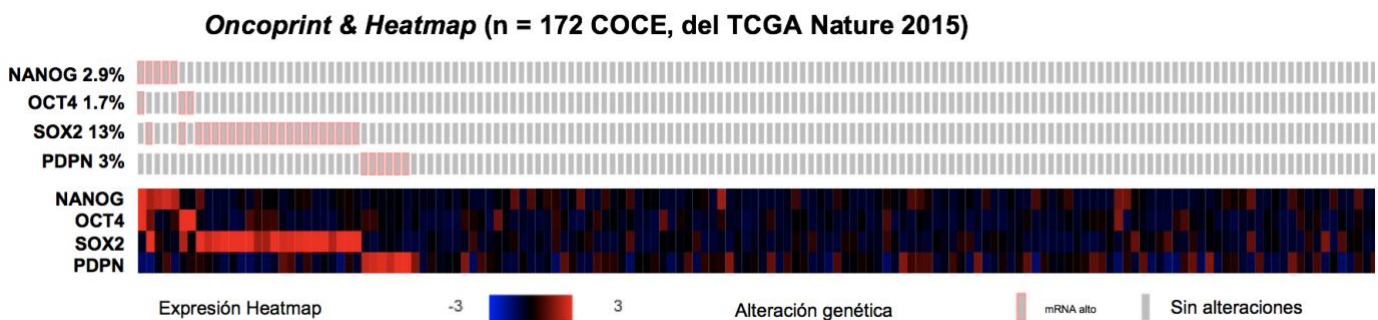


Figura 19. Representaciones de “Oncoprint” y “Heatmap” mostrando el porcentaje de casos con niveles elevados del ARNm de varios genes relacionados con pluripotencialidad y CTTs (NANOG, OCT4, SOX2 y PDPN) en 172 pacientes con COCE de la cohorte CECC del TCGA (142).

Más aún, cuando se evaluó el impacto de la expresión del ARNm de NANOG en la supervivencia de pacientes con COCE del TCGA, se observó que los pacientes portadores de tumores con altos niveles de NANOG (por encima de la mediana) mostraron una mayor supervivencia, aunque no fue estadísticamente significativo ($p = 0,483$, Figura 20).

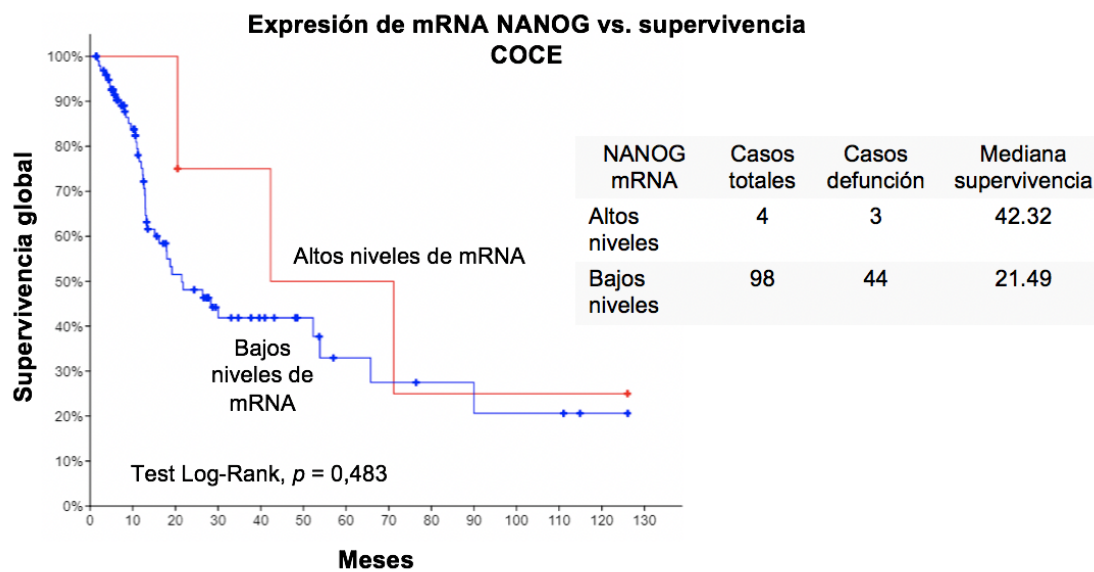


Figura 20. Curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia global según la expresión de ARNm de NANOG (ARN-seq V2 RSEM, umbral de puntuación $z \pm 2$) dicotomizada como altos niveles de ARNm (en rojo, valores por encima de la mediana) vs. bajos niveles de ARNm (en azul, por debajo de la mediana). El valor de p fue estimado usando el test de log-rank.

La asociación entre la expresión proteica de NANOG y PDPN también se estudió en un total de 26 pacientes con TOPC de los cuales se disponían datos (Tabla 26). Encontramos una asociación inversa y significativa entre la expresión de ambas proteínas en los casos de displasias orales (Test de Chi cuadrado, $p = 0,017$).

Tabla 26. Asociación entre la expresión de proteínas NANOG y PDPN en pacientes con TOPC. La expresión positiva de PDPN se definió como la tinción positiva en una o más áreas displásicas más allá de la capa de células basales (con una puntuación de 2 y 3) según lo descrito por de Vicente y cols. (5).

	Puntuación	Expresión de la proteína PDPN		Total
		Negativa	Positiva	
Expresión	0	6 (32)	13 (68)	19 (100)
citoplasmática	1	1 (50)	1 (50)	2 (100)
de NANOG	2	5 (100)	0 (0)	5 (100)
	<i>Total</i>	12 (46)	14 (54)	26 (100)

Las cifras son el número de casos y los porcentajes se encuentran entre paréntesis. (Test de Fisher, $p = 0,017$).

Análisis de la expresión de ARNm de SOX2 y las alteraciones en el número de copias génicas

Dado que el gen SOX2 mapea en 3q26, una región frecuentemente amplificada en CECC y COCE, analizamos la expresión del ARNm de SOX2 y las alteraciones en el número de copias génicas en la serie específica de 172 pacientes con COCE procedente de la cohorte de CECC del TCGA (142) usando la plataforma cBioPortal (<http://cbioportal.org/>) (195).

Como se muestra en la Figura 21, un total de 38 (22%) de los 172 pacientes con COCE albergaban alteraciones del gen SOX2: 22 (13%) casos con niveles elevados del ARNm de SOX2, un caso con mutación y 23 (13%) casos con amplificación de copias del gen de SOX2.

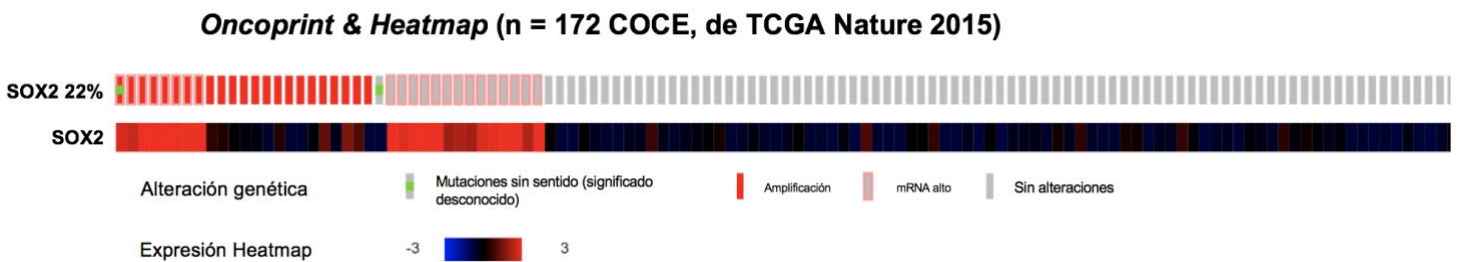


Figura 21. Representaciones “Oncoprint” y “Heatmap” mostrando el porcentaje de casos con niveles elevados del ARNm de SOX2, junto con las mutaciones y amplificación del número de copias del gen SOX2.

Los niveles de ARNm de SOX2 se asociaron con las alteraciones en el número de copias génicas (Figura 22). En general, los tumores con amplificación de SOX2 mostraron mayores niveles de ARNm; sin embargo, sólo en 8 de los 23 casos con amplificación de SOX2 se observó de forma concomitante un aumento de los niveles de ARNm de SOX2.

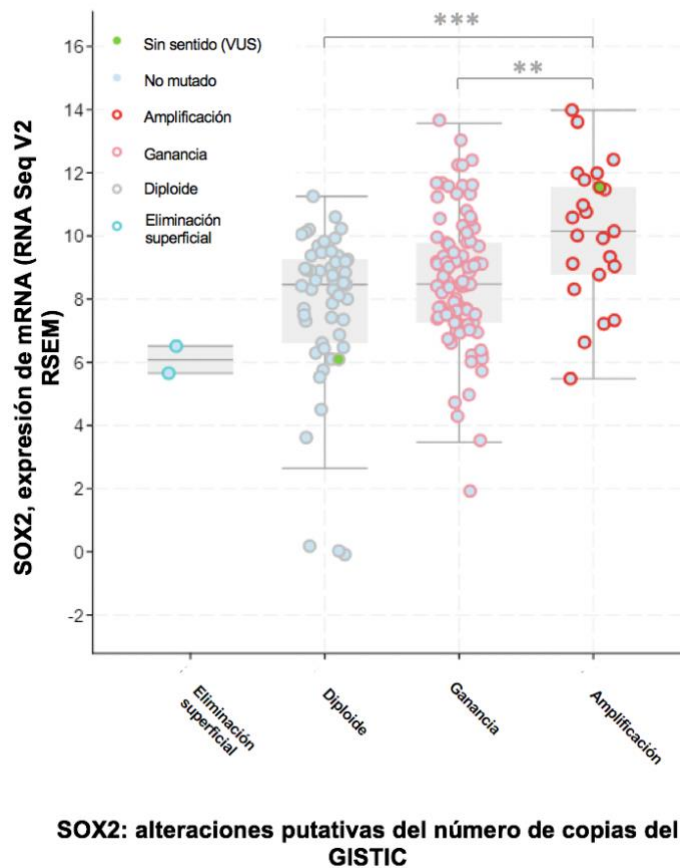


Figura 22. Análisis de la expresión de ARNm de SOX2 en relación con la alteración del número de copias del gen SOX2 (ARN seq V2 RSEM) transformados en Log₂ (eje y). “Box plots” (min. a max.) con los valores medianos; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$, test de ANOVA unifactorial, Test de Tukey.

También se investigó el impacto de la expresión de ARNm de SOX2 en la supervivencia de pacientes con COCE (Figura 23). Los tiempos de supervivencia para pacientes con niveles elevados de ARNm (por encima de la mediana) vs. bajos niveles (por debajo de la mediana) fueron de 26,41 y 19,19 meses, respectivamente, aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística (test de log-rank, $p = 0,496$).

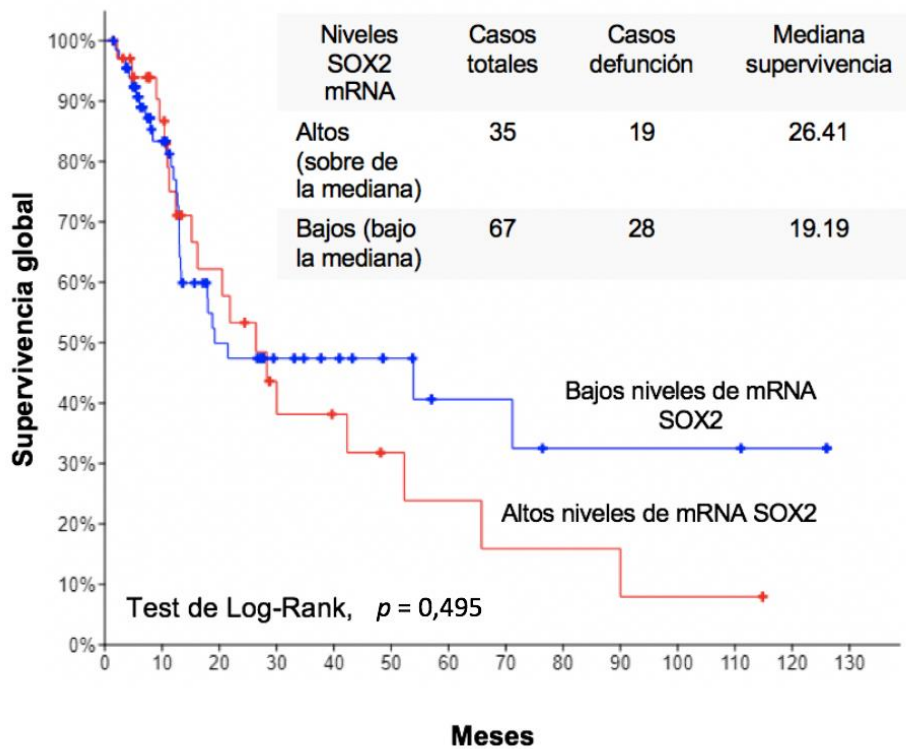


Figura 23. Curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia global según la expresión de ARNm de SOX2 (RNAseq V2 RSEM, puntuación Z con límite ± 2) dicotomizada como altos niveles de ARNm (en rojo, valores por encima de la mediana) vs. bajos niveles de ARNm (en azul, por debajo de la mediana). El valor de p fue estimado usando el test de log-rank.

6. Discusión

DISCUSIÓN

El pronóstico de los pacientes con COCE depende fundamentalmente del estadio tumoral y las características moleculares e histológicas del tumor, de las posibilidades terapéuticas y de la propia comorbilidad del paciente. A pesar de los avances tecnológicos tanto diagnósticos como terapéuticos, el pronóstico de estos pacientes sigue siendo ominoso en muchos casos, con una mortalidad a los 5 años que alcanza hasta el 50% según las series (181). Debido a este pobre avance en la mejora de la supervivencia de estos pacientes, es imperiosa la necesidad de hallar nuevos marcadores diagnósticos así como de nuevas dianas terapéuticas. Una de las prometedoras herramientas en ciernes es la identificación y uso de marcadores moleculares que permitan un diagnóstico más precoz de los COCE, así como identificar de forma más fiable lesiones con alto riesgo de malignización para una mejor y más adecuada estratificación, tratamiento y seguimiento de los pacientes.

Un concepto emergente sobre la carcinogénesis propone la existencia de células troncales tumorales (CTTs), las cuales se definen en general como una pequeña subpoblación de células dentro del tumor que muestran características propias de una célula troncal (*stem cell*), como la división asimétrica y la autorrenovación, originando en consecuencia una diversidad de poblaciones celulares heterogéneas dentro del tumor (197). Se han identificado diferentes marcadores de CTTs en diferentes cánceres, siendo los más comunes y ampliamente aceptados OCT4, SOX2, NANOG, ALDH1, STAT3 fosforilado, CD44, CD24, CD133 y Musashi-1 (177).

Dentro de los trastornos orales potencialmente cancerizables de la cavidad oral, las leucoplasias constituyen el subtipo más frecuente. Hoy en día, el diagnóstico histopatológico se utiliza como *gold estándar* para evaluar el riesgo de progresión de las displasias epiteliales orales a carcinoma invasivo (198). No obstante, la precisión de los distintos sistemas de clasificación histológica de las displasias que han sido desarrollados hasta ahora han demostrado una predictibilidad limitada, además de ser métodos en gran medida subjetivos y verse afectados por una gran variabilidad inter e intraobservador (199). De acuerdo con la clasificación de la OMS del año 2017, no existe un criterio o sistema de clasificación único para la displasia epitelial oral y, en consecuencia, la reproducibilidad diagnóstica se encuentra aún bastante limitada. La

actual clasificación propuesta consta de tres niveles de gradación de la displasia epitelial oral, pudiendo distinguirse entre grado leve, moderado y severo. Otra clasificación propuesta es el sistema de clasificación binario (bajo grado vs. alto grado) (155), el cual surgió para intentar solventar el referido problema de variabilidad. Sin embargo, este sistema binario aún no ha sido validado para su uso en la cavidad oral, a diferencia de lo que ocurre en la laringe, donde esta clasificación binaria ha sido aceptada para el grado de las displasias. Por lo tanto, es de suma importancia identificar nuevos biomarcadores que puedan proporcionar información complementaria a la histología para predecir con mayor precisión y fiabilidad el riesgo de transformación maligna de las leucoplasias orales.

El presente estudio se ha centrado en investigar la relevancia clínica de la expresión de las proteínas NANOG y SOX2 a lo largo de las diferentes etapas del desarrollo y progresión tumoral en la cavidad oral, en concreto analizando: (i) en los trastornos orales potencialmente cancerizables, en concreto las leucoplasias, su posible contribución a la transformación maligna de estas lesiones; (ii) en los COCE, y el significado clínico y pronóstico de ambas proteínas en estadios avanzados de la progresión de la enfermedad.

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que investiga en profundidad el significado clínico de la expresión de NANOG y SOX2 llevando a cabo un completo y detallado análisis a lo largo de las diferentes etapas de la carcinogénesis oral desde los TOPC a los COCE, y ha permitido demostrar por primera vez la relevancia clínica de NANOG y SOX2 en las fases iniciales de la tumorigénesis oral y evidenciar claramente su contribución a la iniciación tumoral frente la progresión en etapas más tardías de la enfermedad.

Consideraciones sobre las características de las cohortes de pacientes estudiadas

Trastornos orales potencialmente cancerizables

Los TOPC constituyen una amplia gama de lesiones cuya clasificación ha sufrido múltiples cambios desde la introducción del concepto de TOPC en la reunión de la OMS del 2005. Dentro de este grupo, la leucoplasia es la más frecuente de todas las lesiones, con una prevalencia mundial aproximada del 2% (150).

Un total de 55 pacientes con diagnóstico de displasia epitelial oral fueron incluidos en el estudio. Veintiséis pacientes (47%) eran hombres y 29 mujeres (53%), con edades comprendidas entre los 39 y 83 años y una edad media de 62,61 años (Desviación Estándar (DE) = 12,56). Estos datos coinciden con los encontrados por otros autores, en los que la edad más frecuente de aparición de estas lesiones se sitúa entre los 55 y 64 años (200,201), lo cual sugiere una razonable validez externa. En cuanto al sexo, existe un mayor porcentaje de mujeres que de hombres, de acuerdo con otras publicaciones en las cuales se muestra que en Europa y países occidentales la incidencia de lesiones displásicas es más frecuente en mujeres (151,202–206), mientras que en la India y países del Este es más frecuente en varones, plausiblemente por el mayor consumo de tabaco en estas regiones (207–209).

El factor etiológico más relacionado con las leucoplasias es el tabaco, siendo hasta 6 veces más frecuente en pacientes fumadores (40), existiendo una relación dosis-respuesta por la cual el riesgo de aparición de una leucoplasia aumenta a medida que lo hace el número de cigarrillos consumidos al día (210). Además, el alcohol también constituye un factor de riesgo independiente (152). Con respecto a estos factores de riesgo asociados, en nuestra cohorte dicha información sólo estaba disponible para 31 pacientes, siendo diez de estos (32%) fumadores y cuatro (13%) bebedores habituales de alcohol. Proporcionalmente, estas cifras son menores en comparación con las aportadas por otros estudios, aunque cabe recalcar la falta de datos a este respecto en el 44% de los pacientes de nuestra muestra.

El porcentaje de fumadores con expresión citoplasmática positiva para NANOG fue del 30%, mientras que ningún caso fue detectado con expresión nuclear de NANOG.

En cuanto a los bebedores, el 75% de ellos mostraron expresión citoplasmática de NANOG, y nuevamente ninguno con expresión nuclear. En cuanto a SOX2, el 10% de los fumadores mostraron expresión positiva para SOX2>10% de núcleos teñidos, frente al 40% para SOX2any. Un 25% de los pacientes bebedores tenían expresión positiva para SOX2>10% y un 50% para SOX2any.

En cuanto a la localización de las leucoplasias, la lengua fue la más frecuente con 20 (36%) casos, dato que coincide con lo referido por otros autores (211), seguida de la encía con 14 (25) casos y la región yugal con 12 (24%) casos.

Con respecto a la histología de las lesiones orales, 42 pacientes (76%) se clasificaron como lesiones displásicas de bajo grado, y 13 (24%) como lesiones de alto grado, de acuerdo con la clasificación binaria de la OMS (155). Del total de 13 (24%) lesiones de alto grado, 10 (77%) malignizaron, y de las 42 (76%) lesiones de bajo grado, sólo dos (5%) progresaron a carcinoma. Por lo tanto, se halló una asociación significativa entre el grado de displasia y el riesgo de progresión a carcinoma ($p < 0,001$), evidencia que concuerda con lo reportado por otros estudios (212). Resumiendo, de las 55 lesiones orales de esta cohorte, un 22% sufrieron una transformación maligna, dato que también está acorde con los porcentajes de malignización referidos en otras series como de Vicente y cols. (22,4%)(4) o Liu y cols. (24,2%) (213).

Carcinoma oral de células escamosas

El cáncer oral es uno de los tumores más frecuentes, con un incremento anual de su incidencia, aunque con una variable distribución mundial. Dentro de sus distintas variantes, el carcinoma de células escamosas constituye el 90% de estos tumores (7,8).

La incidencia del COCE continúa siendo mayor en hombres, aunque existe una tendencia al equilibrio inter-sexual debido a un mayor consumo de tabaco y alcohol por parte de las mujeres, sobre todo en España (214). Una cohorte de 125 pacientes con COCE diagnosticados y tratados en el Hospital Universitario de Asturias fue seleccionada para este estudio. De ellos, 82 eran hombres (66%) y 43 mujeres (34%), con edades comprendidas entre los 28 y 91 años, y una media y mediana de edad de 59 y 57 años, respectivamente. Este dato se aproxima a la edad media con mayor incidencia de cáncer

oral, que es la de 62 años (215). La razón de hombres y mujeres diagnosticados de COCE es de 2:1 en nuestro estudio, lo que concuerda con lo informado por Rhodus y cols. en 2015 (154), aunque es ligeramente superior a la actual a nivel mundial (1,5:1) por la tendencia a la igualdad entre géneros antes comentada (216). No obstante, a día de hoy el cáncer oral sigue siendo más frecuente en los hombres, sobre todo a partir de la quinta década de la vida, incrementándose el riesgo con la edad (217).

Existen multitud de factores de riesgo asociados con el desarrollo del COCE. Se considera que el cáncer es una enfermedad genética adquirida resultante de la combinación de aspectos genéticos, ambientales y hábitos vitales. El tabaco es el principal factor de riesgo del COCE, considerándose la causa del 33% de estos tumores (17). Asimismo, el alcohol es un potenciador multiplicativo del efecto del tabaco en la carcinogénesis oral. En nuestra cohorte, 84 pacientes (67%) eran fumadores y 69 (55%) eran bebedores de alcohol habituales. Estos datos concuerdan con los informados por otros estudios (218,219).

Los tumores linguales fueron los más frecuentes en nuestra cohorte, con un 41% de casos, seguida del suelo de la boca (30%). La localización más frecuente de los tumores de la cavidad oral es la lengua, encontrándose aquí en un 40-50% de los casos (217). Según informaron Siegel y cols. (216), en 2019 hubo un total de 17,060 casos de tumores de la cavidad oral con localización lingual en la población americana.

Con respecto a las características histopatológicas del tumor, en nuestra muestra la mayoría de los tumores eran bien diferenciados (64%) y más del 50% se encontraban en estadios clínicos avanzados (III o IV). El estadio tumoral es un factor predictor de respuesta y de supervivencia global del paciente. El grado de diferenciación tumoral se ha establecido como un factor predictivo para la diseminación tumoral a los ganglios linfáticos regionales, siendo los de menor grado de diferenciación los que exhiben mayor riesgo de recidivas locales y un menor intervalo libre de enfermedad (220).

En 49 casos (39%) de nuestra muestra existían metástasis ganglionares cervicales y recidivas locales en 54 casos (43%). La afectación ganglionar constituye un factor predictivo de recidiva locorregional y de metástasis a distancia, siendo la supervivencia inversamente proporcional al número y tamaño de ganglios afectados (121,129–131). En nuestra cohorte, ningún paciente tenía enfermedad metastásica a distancia en el momento del diagnóstico. En general, casi el 50% de todos los carcinomas localizados

en la lengua muestran ya metástasis al diagnóstico, y de un 35% a 40% adicional las desarrollan en los cinco siguientes años (72,217,221–223).

Se administró radioterapia adyuvante en 75 pacientes (60%) y quimioterapia adyuvante en 14 pacientes (11,2 %). La radioterapia es el tratamiento complementario a la cirugía más estandarizado, y recientemente se ha demostrado su beneficio en tumores con afectación ganglionar N1 (121).

El seguimiento de los pacientes se llevó a cabo entre 1 a 230 meses, siendo la mediana 61 meses. Durante dicho seguimiento fallecieron 53 pacientes. El tiempo medio de seguimiento fue de 71,82 meses (DE: 57,55). Las tasas de supervivencia específica de enfermedad a los 5 y 10 años fueron del 60% y 44%, respectivamente. Los tiempos de supervivencia medio y mediano fueron de 132,74 meses (IC 95%: 113,25 a 152,22 meses), y 141 meses (IC 95%: 102,40 a 179,59 meses), respectivamente. Los datos de supervivencia coinciden con los de otras series, en las que aproximadamente la mitad de los pacientes con carcinoma oral sobreviven a esta enfermedad a los 5 años, a excepción de los tumores linguales, cuya supervivencia global disminuye al 33% (217,221–224).

Consideraciones sobre los marcadores moleculares estudiados

Expresión de NANOG en los TOPC

NANOG es un factor de transcripción crítico para el desarrollo embrionario y para el mantenimiento de la pluripotencialidad celular (225,226). Los avances recientes en la Secuenciación de Nueva Generación (NGS) y las tecnologías ómicas han contribuido enormemente a desvelar la enorme complejidad y heterogeneidad de los oncogenomas (227,228). En un tumor existe una gran diversidad de alteraciones genéticas y epigenéticas que van contribuir a la heterogeneidad tumoral, pero además la interacción del propio tumor con el microambiente que le rodea también va a modular de forma dinámica dicha heterogeneidad (229). Más allá, también se ha demostrado la plasticidad de las propias CTTs y la transición epitelio-mesénquima, que en respuesta a señales ambientales, contribuyen también a potenciar la heterogeneidad tumoral y tienen un papel clave en la diseminación metastásica y el desarrollo de resistencia a tratamientos en pacientes con cáncer (230,231).

Los COCE muestran una arquitectura heterogénea cuando la comparamos con la del epitelio de la mucosa oral, lo cual ha llevado a la hipótesis de que una subpoblación celular clonogénica sería responsable de generar los tumores, y por ello han sido denominadas CTTs o células iniciadoras de tumor (CITs) (232). Se han identificado diferentes marcadores de CTTs, varios de ellos comunes en diferentes tipos tumorales, como es el caso de los factores de pluripotencialidad NANOG, SOX2 y OCT4. La podoplanina (PDPN) se ha identificado como un marcador de CTTs en los carcinomas de células escamosas (233), y las células PDPN positivas más allá de la membrana basal del epitelio oral se han interpretado como una expansión clonal posterior de las células troncales durante la carcinogénesis (234). De acuerdo con este papel, la expresión de PDPN se detecta de forma temprana en los TOPC y se ha asociado con un riesgo significativamente mayor de transformación maligna en diferentes estudios (5,234,235).

NANOG juega un papel crítico durante el desarrollo embrionario como un regulador clave de la pluripotencialidad, no sólo en tejidos embrionarios (226,236), sino también en el epitelio estratificado adulto, incluyendo la mucosa oral (194). Junto con otros factores de transcripción como OCT4 y SOX2, median en la capacidad auto-regenerativa de las células troncales embrionarias. Se ha demostrado que la expresión de NANOG se

silencia por hipermetilación durante la diferenciación en las células troncales (237). NANOG parece ser necesario para alcanzar un estado pluripotente en la fase final de la reprogramación cuando otros factores clave ya se encuentran presentes, completando NANOG el proceso (238).

OCT4 es un regulador transcripcional fundamental de NANOG, aunque la expresión de NANOG también puede detectarse en ausencia del factor OCT4 (236). Se han descrito diferentes rutas de señalización reguladas por NANOG que establecen un vínculo funcional con múltiples y cruciales procesos biológicos “*hallmarks*” de la célula tumoral, como la proliferación, la movilidad, la transición epitelio-mesénquima, la capacidad de auto-renovación, la evasión del sistema inmune y la resistencia a tratamientos. Cabe destacar que todos estos procesos están estrechamente relacionados con las propiedades y funciones de las CTTs (239,240).

No todas las células de un tumor poseen capacidad tumorigénica o iniciadora de tumor; en general, las CTTs o CITs constituyen un pequeño porcentaje del total de células de la masa tumoral. Las estrategias terapéuticas dirigidas contra las células más activas y proliferativas de la masa tumoral pueden conllevar el desarrollo de recidivas o resistencias. Si las terapias no son eficaces contra las subpoblaciones de CTTs, sus capacidades tumorigénicas y de célula *stem*, permitirían la regeneración del tumor tras el tratamiento, contribuyendo así a la recidiva tumoral o a la diseminación metastásica. Por este motivo, para conseguir una erradicación tumoral completa es fundamental la precisa identificación y efectiva eliminación de las subpoblaciones de CTTs (239). El origen de las CTTs puede encontrarse en las células troncales epiteliales adultas normales, lo que podría estar asociado al concepto de cancerización de campo (241). Este concepto fue introducido por primera vez en 1953 por Slaughter para explicar la presencia de una o varias regiones en la mucosa con células epiteliales que tienen alteraciones genéticas y epigenéticas asociadas al tumor (3), sin capacidad invasiva ni metastásica, y las cuales pueden tener o no manifestación fenotípica.

En experimentos de fusión celular se han identificado algunos factores en células embrionarias que inducen la reprogramación de núcleos somáticos humanos en células troncales pluripotentes inducidas (iPS) (242,243). Dos de los cuatro factores que dan lugar a dicha reprogramación son OCT4 y NANOG. Funcionalmente, NANOG bloquea la diferenciación (244) manteniendo la pluripotencialidad, y en un análisis comparativo

centrado en la autorrenovación de las células embrionarias, de entre 17.342 genes NANOG se clasificó dentro del 1% superior (245).

La sobreexpresión de NANOG ha sido detectada en múltiples tumores, incluyendo los CECC (182). Recientemente, también se ha identificado NANOG como un factor clave en las etapas iniciales de la carcinogénesis laríngea (186). Particularmente destacable, la expresión de NANOG ha demostrado ser un potente predictor del riesgo de cáncer laríngeo en pacientes con lesiones precancerosas (186).

En conjunto, todos estos datos ponen de manifiesto el elevado potencial de aplicabilidad de la expresión de NANOG como biomarcador de riesgo precoz de cáncer en las lesiones epiteliales en diferentes regiones de la cabeza y el cuello. Teniendo en cuenta que la evaluación inmunohistoquímica de NANOG es un método relativamente sencillo y objetivo, podría ser plausible su implemento en la práctica clínica como un biomarcador complementario al grado histólogo para la evaluación del riesgo de cáncer en pacientes con TOPC. No obstante, previo a la implementación rutinaria de esta técnica molecular se requiere confirmación adicional de estos prometedores resultados en futuros estudios de validación utilizando amplias series independientes de pacientes (186).

Por otro lado, varios estudios afirman que NANOG se encuentra altamente expresado en carcinomas en estadios avanzados, pobremente diferenciados y metastásicos (182,246–248). Sin embargo, aunque estos datos sugieren que altos niveles de NANOG se asocian con fenotipos tumorales agresivos, existen resultados controvertidos sobre la posible relevancia pronóstica de este factor.

Los resultados presentados en esta tesis demuestran por primera vez la relevancia clínica de la expresión de NANOG en estadios precoces de la tumorigénesis oral. En la cohorte de 55 displasias orales epiteliales, la expresión nuclear y citoplasmática de NANOG se detecta de forma temprana en displasias epiteliales orales, mientras que la expresión es negativa en el epitelio normal adyacente. Además, se observó una asociación significativa entre la expresión citoplasmática de NANOG y el consumo de alcohol en los 31 pacientes con datos disponibles. Según Vasiliou y cols. (249), el alcohol puede aumentar los niveles de expresión de la proteína NANOG a través de la vía TLR4, que a su vez induce la expresión de IGF2BP3, y éste inhibe la función de p53, siendo ésta

última diana frecuentemente asociada con alteraciones precoces displásicas en la mucosa oral (94) y la cancerización de campo (83).

Otra importante evidencia original de este estudio ha sido la asociación significativa entre la expresión positiva de NANOG en las displasias orales, tanto a nivel citoplasmático como nuclear, con un mayor riesgo de progresión a carcinoma invasivo ($p = 0,02$ y $p = 0,04$, respectivamente). En otras palabras, el 60% de los pacientes con expresión intensa de NANOG citoplasmático y el 100% de los pacientes con expresión nuclear positiva de NANOG desarrollaron un COCE.

El análisis de la supervivencia libre de cáncer también aporta valiosa información a este estudio. El grado de displasia se correlacionó de forma significativa con la supervivencia libre de cáncer, de forma que los pacientes con displasias de alto grado mostraron significativamente una menor supervivencia libre de cáncer. Además, y de forma consistente, tanto los pacientes con expresión citoplasmática como nuclear de NANOG mostraron tiempos de supervivencia libres de cáncer significativamente menores que aquellos pacientes con expresión negativa. Es más, el tiempo de supervivencia libre de cáncer fue menor cuanto mayor era la intensidad de la tinción de NANOG (test de long-rank, $p = 0,002$).

En el análisis multivariante de Cox, el grado histopatológico fue el único predictor independiente significativo del desarrollo de cáncer oral en este estudio. Sin embargo, los pacientes con lesiones que tenían una fuerte expresión citoplasmática de NANOG mostraron un mayor riesgo de progresión ($HR > 4$), dato que se aproximó a la significación estadística ($p = 0,07$). No obstante, dado que la expresión de NANOG se detectó sólo en 5 de los 12 pacientes con TOPC que posteriormente desarrollaron un carcinoma, esto podría sugerir que NANOG contribuye parcialmente como un gen conductor “*driver*” o promotor activo de la tumorigénesis en la cavidad oral. La falta de expresión de NANOG en el resto de TOPC que posteriormente progresaron a un COCE podría ser explicada por razones témporo-espaciales, puesto que sería razonable suponer que la biopsia se haya realizado antes de que se produjera la expresión anómala de NANOG, o que el carcinoma se haya desarrollado en lesiones clínicamente imperceptibles en el momento de la biopsia y consecuentemente no exploradas ni analizadas.

Expresión de NANOG en los COCE. Significado clínico y pronóstico

Para ampliar y extender significativamente nuestros datos obtenidos sobre la cohorte de TOPC, en este estudio también se incluyó un análisis de la expresión de la proteína NANOG en una cohorte de 125 pacientes con COCE. Estos pacientes fueron diagnosticados y tratados homogéneamente mediante cirugía en la misma institución, el Hospital Universitario Central de Asturias. La expresión positiva de NANOG se detectó en 39 (31%) de las 125 muestras de COCE analizadas y se asoció significativamente con el consumo de tabaco y alcohol. Hasta donde tenemos conocimiento, este es el primer estudio que informa sobre la asociación entre la expresión de NANOG y el consumo de tabaco y alcohol en el cáncer, lo cual desvela un posible vínculo entre NANOG como marcador de CTTs y los carcinógenos clásicos en los COCE.

El gen p53 funciona como un factor transcripcional y controlador clave de la calidad del ADN durante el ciclo celular, cuyo gen *TP53* ha sido ampliamente relacionado con la carcinogénesis de los CECC, y también es bien conocido que se encuentra frecuente y típicamente mutado en los cánceres relacionados con el consumo de tabaco. Lee y cols. (250) observaron que existe una asociación positiva entre la expresión de NANOG y la mutación de *TP53*. Estas observaciones sugieren que el consumo de alcohol y tabaco podrían ser desencadenantes de la carcinogénesis en la cavidad oral, regulando no solo la actividad de p53 de forma temprana, sino también la expresión y función de factores reguladores de las CTTs, como NANOG, que tienen un papel clave en la iniciación tumoral. En este aspecto, se ha demostrado que la nicotina induce la expresión de distintos marcadores de CTTs como NANOG, OCT4, CD44 y BMI1, y es capaz de aumentar las propiedades *stem* y el potencial tumorigénico de las CTTs en modelos de CECC *in vitro* e *in vivo* (251). No obstante, se necesitan más estudios para demostrar funcionalmente esta relación y los posibles mecanismos implicados.

En nuestra cohorte de pacientes con COCE no se observaron otras asociaciones estadísticamente significativas en nuestras series entre la expresión de NANOG y otros factores pronósticos conocidos, como el estadio clínico, el tamaño tumoral o la afectación ganglionar metastásica. De forma similar a nuestros resultados, Rasti y cols. (239) informaron que la expresión de NANOG tampoco se asoció con ningún parámetro

histopatológico en carcinomas de células renales, aunque la expresión citoplasmática de NANOG se asoció de forma significativa con menores tasas de supervivencia.

Al evaluar el impacto de la expresión citoplasmática de NANOG en la supervivencia específica de enfermedad en los pacientes con COCE, observamos una mayor supervivencia en pacientes con expresión positiva de NANOG, aunque esta asociación no alcanzó significación estadística.

Por otro lado, el análisis de los niveles de ARNm de NANOG en 172 casos de COCE de la cohorte del *"The Cancer Genomes Atlas"* (TCGA) aportó valiosa información complementaria a este estudio. Por un lado, como validación de nuestros resultados de NANOG a nivel de proteína en una amplia serie independiente de pacientes con COCE y por otro lado proporciona importante información adicional acerca de los mecanismos de regulación de la expresión de NANOG en estos tumores. En este sentido, se halló también una mayor supervivencia en pacientes con altos niveles de ARNm de NANOG, resultados concordantes con lo observado para la proteína en nuestra cohorte de pacientes con COCE. En línea con estos resultados, también encontramos que la expresión de NANOG era más frecuente en tumores de tamaños pequeños (pTNO), estadios tumorales tempranos (I-II) y en pacientes sin metástasis en ganglios cervicales (N0) ni recidivas tumorales. En concordancia, la alta expresión de otros dos factores implicados en la reprogramación celular, en concreto OCT4 y SOX2, se ha asociado con estadios tumorales más tempranos, tamaños tumorales pequeños y con la ausencia de metástasis ganglionares. Además, altos niveles de expresión de SOX2 se han asociado con mayor supervivencia específica de enfermedad en pacientes con COCE (181).

Además, también encontramos que la expresión de NANOG fue más frecuente en tumores poco o moderadamente diferenciados en comparación con los bien diferenciados, pero esta asociación no resultó estadísticamente significativa. Estos hallazgos podrían reflejar la pluripotencialidad de las CTTs y de las células cancerosas invasivas (252,253), mostrando que la expresión de NANOG no se limita sólo a las CTTs sino también a células indiferenciadas y altamente proliferativas. Por lo tanto, los tumores con una expresión negativa de NANOG podrían contener un número limitado de células indiferenciadas de COCE, incluyendo CTTs (247). Esto sugiere que NANOG podría ser importante para el mantenimiento del estado indiferenciado de las células tumorales y para el desarrollo de resistencia al tratamiento (247).

Existen resultados contradictorios en cuanto al valor pronóstico de la expresión de la proteína NANOG. Las posibles explicaciones a las diferencias observadas podrían incluir diferencias en cuanto a la metodología o la evaluación inmunohistoquímica de la expresión de NANOG (como por ejemplo el uso de diferentes anticuerpos o el uso de distintos sistemas de evaluación y/o puntuación de la tinción), la heterogeneidad de la población muestral y la heterogeneidad morfológica o genética de los diferentes tipos de tumores sólidos. De acuerdo con las evidencias aquí presentadas, es plausible que estas discrepancias puedan reflejar también un papel más prominente de la expresión de NANOG en los estadios precoces de la carcinogénesis oral como factor iniciador tumoral, en lugar de un factor pronóstico en los estadios avanzados de la enfermedad neoplásica.

El análisis *in silico* de los datos del transcriptoma del TCGA (142) contribuyó más allá a demostrar aspectos mecanísticos de la regulación de la expresión del ARNm de NANOG y otros genes relacionados con CTTs en pacientes con COCE, proporcionando valiosa información que se resumen en los siguientes ítems:

- i. Se detectan niveles elevados de expresión del ARNm de NANOG en COCE, aunque su frecuencia es mucho menor que la expresión detectada para la proteína NANOG, lo que sugiere la participación de mecanismos post-transcripcionales.
- ii. Dentro de los pacientes con COCE, también se detectan niveles elevados de ARNm de otros genes relacionados con CTTs (como OCT4, SOX2 y PDPN), aunque estas alteraciones no se superponían, ni tampoco con los niveles de ARNm de NANOG. Esto indicaría que la regulación transcripcional de NANOG en COCE parece independiente de OCT4.
- iii. Tampoco se observó superposición entre la expresión de las proteínas NANOG y PDPN en los TOPC, a pesar de que la expresión de cada proteína predice significativamente un mayor riesgo de progresión maligna, lo que sugiere un papel independiente de estas proteínas durante la carcinogénesis oral y la existencia de diferentes subpoblaciones de CTTs o CITs en estas lesiones.

- iv. Los pacientes con altos niveles de ARNm de NANOG mostraron una mayor supervivencia, como también se observó para los pacientes con expresión de NANOG a nivel de proteína en nuestra cohorte de COCE.

Expresión de SOX2 en los TOPC

Como ya hemos mencionado anteriormente, al conjunto de células pertenecientes a una subpoblación celular tumoral con capacidad de iniciar tumores y de mantener la auto-renovación tumoral se le conoce como CTTs (197). El gen SOX2 es un factor de transcripción que se encuentra naturalmente implicado en múltiples vías de transducción de señales y se ha demostrado que se encuentra involucrado tanto en el desarrollo normal como en procesos patológicos, tales como la proliferación celular, la migración, la invasión, la pluripotencialidad, la tumorigénesis, la evasión de la apoptosis y la quimiorresistencia (187,188).

El gen *SOX2* se localiza en 3q26, una región frecuentemente amplificada en varios tipos de cáncer, entre los que se encuentran los CECC y los COCE. Actualmente, se ha establecido como un importante marcador de CTTs y una molécula clave en el desarrollo de la tumorigénesis de diferentes tipos de cáncer (254) y, en consecuencia, se ha propuesto como un oncogén (255,256). Existen varios estudios realizados para profundizar en el conocimiento del papel de SOX2 en el desarrollo tumoral y su posible función en las CTTs. Arnold y cols. (257) informaron de que las células troncales epiteliales adultas que expresan SOX2 pueden ser nidos residuales de células troncales que se originan a partir de progenitores tisulares embrionarios positivos para SOX2. Cai cols. (258) investigaron los papeles de OCT4 y SOX2 en la reprogramación de las células troncales en el cáncer oral. Mediante la transducción lentiviral, consiguieron inmortalizar células epiteliales orales y descubrieron que las células con doble transducción positiva para OCT4 y SOX2 podían desencadenar la formación de tumores en ratones inmunodeficientes; sin embargo, aquellas células con transducción simple, bien para OCT4 o para SOX2, no mostraron esa capacidad tumorigénica. También informaron que la carcinogénesis oral puede derivar de las células troncales reprogramadas con expresión positiva de OCT4 y SOX2, en las que SOX2 juega un papel

importante en la regulación del nicho de CTTs (258). Por consiguiente, se ha propuesto que, en ausencia de la expresión de SOX2, se impediría la autorrenovación de las CTTs que sostiene el crecimiento tumoral; por ello, Cai y cols. (258) han propuesto la inhibición de SOX2 como una prometedora diana terapéutica para el cáncer oral.

Los estudios publicados hasta la fecha que evalúan la expresión de SOX2 y su relevancia clínica y pronóstica en el COCE han arrojado resultados contradictorios. Se ha descrito que una expresión alta de SOX2 se asocia significativamente con una peor supervivencia en COCE con ganglios negativos (259), mientras que otros autores han encontrado que una expresión alta de SOX2 se correlacionó con metástasis regionales en los ganglios linfáticos (192,256,260). Esto último podría explicarse por el papel relevante de SOX2 como un inductor de la transición epitelio-mesénquima, actuando a través de las vías de señalización de Wnt / β -catenina y fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) promoviendo la oncogénesis, la invasión y la diseminación metastásica (261,262). Sin embargo, también podemos encontrar el punto de vista opuesto en los pacientes con COCE en estadios tempranos, donde se ha correlacionado la regulación positiva de SOX2 con una menor incidencia de metástasis en los ganglios linfáticos (181,263). La controversia de estos resultados podría explicarse en base a la heterogeneidad de los diferentes tumores, así como por los distintos mecanismos moleculares subyacentes al complejo proceso de metástasis. La mayoría de los estudios mostraron que la sobreexpresión de SOX2 promueve la progresión del cáncer; sin embargo, también se ha reportado que la sobreexpresión de SOX2 inhibe la proliferación celular (254). Además, se cree que SOX2 estabiliza el fenotipo de las células troncales y promueve la transición epitelio-mesénquima (264) y, en contraposición, en otras publicaciones se describe que SOX2 podría prevenir la transición epitelio-mesénquima, atenuando así el fenotipo invasivo (265).

La mayoría de los estudios han demostrado que la tasa de supervivencia de pacientes con COCE que expresan niveles bajos de SOX2 es mayor que en aquellos con niveles altos de SOX2 (254), aunque Züllig y cols. (263) y Fu y cols. (181) encontraron que una expresión baja de SOX2 se asoció significativamente con una peor supervivencia. Del mismo modo, otros estudios sobre carcinomas de células escamosas de distintas localizaciones describieron una asociación entre la expresión elevada de SOX2 con una mayor supervivencia (266–269).

Como sistemas de clasificación de las displasias epiteliales orales, tenemos el sistema de tres niveles y el sistema binario (155), el cual aún no ha sido validado para la cavidad oral. Se ha demostrado que SOX2 desempeña un papel central en el mantenimiento de la pluripotencialidad de las CTTs y la autorrenovación (257), emergiendo así como un marcador prometedor para la carcinogénesis oral. Luiz cols. (198) realizaron un estudio retrospectivo para comparar la expresión de SOX2 en leucoplasias orales con la mucosa oral normal, y describieron que la expresión de SOX2 era mayor en leucoplasias orales, aunque no evaluaron la relación con el riesgo de cáncer oral.

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que investiga la expresión de la proteína SOX2 a lo largo de las diferentes etapas de la carcinogénesis oral, desde leucoplasias orales a carcinomas invasivos, para determinar su contribución tanto en el desarrollo e iniciación tumoral como en las etapas más tardías de la progresión de la enfermedad.

Se conoce que la presencia de características displásicas en el epitelio de la cavidad oral es relevante para la transformación maligna de las leucoplasias orales. En nuestro estudio, los pacientes con displasia de alto grado mostraron un riesgo significativamente mayor de progresión maligna (HR = 19.08). Además, se observó una asociación significativa entre el grado de displasia y la expresión de SOX2, de forma que a mayor grado de displasia, mayor expresión de esta proteína tanto en la clasificación de la OMS como en la binaria y de forma consistente en los diferentes puntos de corte empleados para la expresión de SOX2 ($p = 0,001$ y $p = 0,002$, respectivamente, en el caso de SOX2>10%, y $p = 0,055$ y $p = 0,02$, respectivamente, en el caso de SOX2any).

Nuestros resultados también revelan por primera vez la expresión de SOX2 como un predictor significativo del riesgo de desarrollo de cáncer (HR de 6.13 y 5.75 dependiendo del punto de corte de SOX2 utilizado). Aún más importante, la clasificación del grado de displasia y la expresión de SOX2 fueron predictores independientes significativos del riesgo de cáncer oral en el análisis multivariante.

Expresión de SOX2 en los COCE. Significado clínico y pronóstico

La expresión de SOX2 también se ha analizado durante la progresión tumoral de los COCE. Freier y cols. (270) encontraron expresión de SOX2 en un 18% de los COCE, y otros estudios sobre CECC de laringe, faringe y cavidad oral encontraron frecuencias de hasta el 86% (155,271–273). En nuestra cohorte de 125 muestras de COCE, se detectó una expresión positiva de SOX2 en el 39% de los tumores, mientras que las frecuencias de expresión de SOX2 informadas en un estudio anterior, realizado en nuestro laboratorio para tumores con otras localizaciones dentro de la región de cabeza y cuello, fueron del 38% en hipofaringe, el 42% en laringe y el 14% en cáncer sinusal. En consecuencia, las frecuencias de expresión de SOX2 en la cavidad oral fueron similares a las observadas en tejidos vecinos como la hipofaringe y la laringe, pero mucho más altas que en el tracto sinusal. En nuestro estudio, la expresión de SOX2 no se correlacionó con la clasificación T, metástasis en los ganglios linfáticos del cuello, estadio de la enfermedad, grado histológico, recidiva tumoral ni desarrollo de un segundo carcinoma primario.

El análisis *in silico* de los datos de ARNseq en 172 pacientes con COCE de la cohorte CECC del TCGA (142) contribuyó además a demostrar que los niveles de ARNm de SOX2 estaban aumentados en el 13% de los pacientes con COCE. Además, la amplificación del gen *SOX2* se observó en el 13% de los casos; sin embargo, sólo el 5% de los casos que albergaban la amplificación de *SOX2* se acompañaron concomitantemente de una mayor expresión del ARNm, lo que indica que mecanismos adicionales deben estar contribuyendo a la expresión de SOX2 en el COCE. En este sentido, existen varios plausibles mecanismos reguladores de la transcripción, como los factores de transcripción OCT4 y YAP1 o HIF1 α , que se ha demostrado modulan la expresión de *SOX2* (274,275). Además, la expresión de la proteína SOX2 se detectó en porcentajes más altos (38%) en nuestra cohorte de COCE que la expresión del ARNm de SOX2 (13%), lo que sugiere la posible participación de mecanismos post-transcripcionales. Se han descrito observaciones similares para otros factores relacionados con CTTs, como los hallados en el estudio NANOG o PDPN, detectados en más del 30% de los pacientes con COCE a nivel de proteína (276), en comparación con los niveles de ARNm del 3% encontrados en la cohorte de 172 pacientes con COCE del TCGA.

De forma análoga a lo observado para la expresión de NANOG en los COCE, la expresión de SOX2 se detectó con mayor frecuencia en tumores de menor tamaño, tumores N0 con ausencia de metástasis y estadios precoces (I-II) de la enfermedad. Concordantemente, los pacientes con expresión positiva de SOX2 exhibieron una mejor supervivencia que aquellos con expresión negativa, aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística ($p = 0,07$).

Es posible que todos los resultados contradictorios sobre el significado pronóstico de SOX2 descritos hasta ahora en la literatura estén relacionados con diferencias metodológicas en la evaluación inmunohistoquímica de SOX2, diferencias entre las cohortes de pacientes analizadas o debidas a la heterogeneidad morfológica y genética observada en los tumores sólidos. Otra posible explicación puede ser que tanto la amplificación como la expresión de SOX2 jueguen un papel crítico como eventos tempranos en la formación del tumor, y que este gen pierda relevancia en etapas posteriores de la progresión tumoral, el desarrollo de fenotipos más agresivos de la enfermedad o durante la diseminación metastásica (22). Los resultados concordantes obtenidos del estudio de NANOG y SOX2, ambos factores de pluripotencialidad implicados en la iniciación tumoral, avalan esta hipótesis.

COEXPRESIÓN DE NANOG Y SOX2

Los factores de transcripción SOX2 y NANOG son dos proteínas funcionalmente relacionadas, por lo que en este estudio también exploramos el posible papel de la expresión conjunta de SOX2 y NANOG en el riesgo de progresión a cáncer oral. Los resultados arrojaron datos muy interesantes, puesto que pacientes con displasias con coexpresión de ambas proteínas, ya sea NANOG citoplasmático o nuclear y SOX2 (independientemente del punto de corte SOX2>10% o SOX2any), mostraron consistentemente un riesgo significativamente mayor de progresión a cáncer oral, en comparación con aquellos pacientes con displasias con expresión de una de las dos proteínas o pacientes con expresión negativa de los dos factores. Esto sugiere un papel oncogénico cooperativo de estas dos proteínas en la oncogénesis oral.

7. Conclusiones

CONCLUSIONES

Como parte final de este estudio, el análisis de los resultados permite obtener las siguientes conclusiones:

1. La expresión de NANOG y SOX2 se detecta de forma temprana en la tumorigénesis oral, en el 16% y 29% de las displasias orales, respectivamente, mientras que no se observó expresión de estas proteínas en el epitelio normal adyacente.
2. La expresión citoplasmática de NANOG y la expresión nuclear de SOX2 se asociaron significativamente con el grado de displasia, y con un mayor riesgo de progresión a carcinoma oral en pacientes con TOPC. Los casos con expresión conjunta de ambas proteínas exhibieron un mayor riesgo de progresión, comparado con la expresión individual, lo que sugiere un papel cooperativo de ambos factores.
3. La expresión nuclear de SOX2 y el grado de displasia fueron predictores independientes del riesgo de desarrollo de cáncer oral en el análisis multivariante, lo que avala una posible aplicación clínica conjunta para mejorar la evaluación del riesgo de cáncer en pacientes con TOPC.
4. La expresión citoplasmática de NANOG y nuclear de SOX2 fue detectada en el 31% y 39% de los pacientes con COCE, respectivamente. De forma análoga, también se observó aumento en los niveles de ARNm de NANOG y SOX2, aunque con una menor frecuencia (3-13%) que lo observado a nivel proteína, lo que refleja una posible regulación por mecanismos post-transcripcionales.
5. La expresión de NANOG se asoció significativamente con el consumo de tabaco y alcohol en pacientes con COCE.

6. No se hallaron asociaciones significativas de la expresión de NANOG y SOX2 con las variables clinicopatológicas o el pronóstico de los pacientes con COCE.

7. La expresión de NANOG y SOX2 era más frecuente en estadios tumorales tempranos (I-II) y tumores sin metástasis ganglionares cervicales (N0) y se asociaba con una mejor supervivencia. Estos resultados refuerzan un papel más prominente para NANOG y SOX2 en la carcinogénesis oral y transformación maligna, en lugar en estadios avanzados de la progresión de los COCE.

8. Referencias bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jamison DT, Nugent R, Gelband H, Horton S, Jha P, Laxminarayan R, et al. DISEASE CONTROL PRIORITIES • THIRD EDITION. Cancer Dis Control Priorities, third Ed. 2015;3.
2. International Agency for Research on Cancer. Epidemiologia España 2018. Glob cancer Obs [Internet]. 2019;172:2018–9. Available from: <http://gco.iarc.fr/>
3. Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. Nat Rev Cancer [Internet]. 2011;11(1):9–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2982>
4. Vicente JC de, Rodrigo JP, Rodriguez-santamarta T, Lequerica-fernández P, Allonca E, García-pedrero JM. Cortactin and focal adhesion kinase as predictors of cancer risk in patients with premalignant oral epithelial lesions. Oral Oncol [Internet]. 2012;48(7):641–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2012.02.004>
5. Vicente JC de, Rodrigo JP, Rodriguez-santamarta T, Lequerica-fernández P, Allonca E, García-pedrero JM. Podoplanin expression in oral leukoplakia : Tumorigenic role. Oral Oncol [Internet]. 2013;49(6):598–603. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.02.008>
6. Shah J, Patel S, Singh B, Wong R. Jatin Shah's Head and Neck Surgery and Oncology 5th Edition. Elsevier. 2019;
7. García-García V, Bascones MA. Cáncer oral: Puesta al día. Av Odontoestomatol. 2009;25(5):239–48.
8. Montero PH, Patel SG. Cancer of the Oral Cavity. Surg Oncol Clin N Am [Internet]. 2015;24(3):491–508. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soc.2015.03.006>
9. Farr HW, Arthur K. Epidermoid carcinoma of the mouth and pharynx 1960-1964. R Soc Med. 1971;(May):243–53.
10. Shoab T, Soutar DS, Ch M, Macdonald DG, Camilleri IG, Dunaway DJ, et al. The Accuracy of Head and Neck Carcinoma Sentinel Lymph Node Biopsy in the Clinically N0 Neck. Cancer. 2001;91:2077–83.
11. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018 Nov;68(6):394–424.
12. Kalavrezos N, Scully C. Mouth cancer for clinicians Part 2: Epidemiology. Dent Update. 2016;43(2):354–9.
13. Índice de desarrollo humano. [Internet]. Available from: https://es.wikipedia.org/wiki/Índice_de_desarrollo_humano
14. Jones AS, Morar P, Phillips DE, Field JK, Husband D, Helliwell TR. Second primary tumors in patients with head and neck cancer. Cancer. 1995;75(6):1343–52.
15. Priante AVM, Castilho EC, Kowalski LP. Second primary tumors in patients with head and neck cancer. Curr Oncol Rep. 2011;13(2):132–7.
16. Liao CT, Kang CJ, Chang JTC, Wang HM, Ng SH, Hsueh C, et al. Survival of second and multiple primary tumors in patients with oral cavity squamous cell carcinoma in the betel quid chewing area. Oral Oncol. 2007;43(8):811–9.
17. Agudo A, Bonet C, Travier N, González CA, Vineis P, Bueno-de-Mesquita HB, et

- al. Impact of cigarette smoking on cancer risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition study. *J Clin Oncol*. 2012;30(36):4550–7.
18. Rivera C, Bonet C, Travier N, González C, Vineis P, Bueno-de-Mesquita H, et al. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8:11884–94.
 19. Varela Centelles P, Romero Méndez M, Varela Centelles A, Rodríguez González V. Riesgo de cáncer oral atribuible al consumo de alcohol y tabaco en la Zona de Salud de Burela (Lugo). *RCOE Rev del Ilus Cons Gen Colegios Odontólogos y Estomatólogos España*. 2007;12(3):177–81.
 20. Warnakulasuriya S, Sutherland G, Scully C. Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence. *Oral Oncol*. 2005;41(3):244–60.
 21. Consumo de tabaco en España. p. <https://www.epdata.es/datos/consumo-tabaco-espana->.
 22. Ghantous Y, Schussel JL, Brait M. Tobacco and alcohol-induced epigenetic changes in oral carcinoma. *Curr Opin Oncol*. 2018;30(3):152–8.
 23. Figuero Ruiz E, Carretero Peláez MÁ, Cerero Lapiedra R, Esparza Gómez G, Moreno López LA. Efectos del consumo de alcohol etílico en la cavidad oral: Relación con el cáncer oral. *Med Oral*. 2004;9(1):14–23.
 24. Scott J, Burns J, Flower EA. Histological analysis of parotid and submandibular glands in chronic alcohol abuse: A necropsy study. *J Clin Pathol*. 1988;41(8):837–40.
 25. Seitz H, Matsuzaki S, Yokoyama A, Homann N, Väkeväinen S, Dong Wang X. Alcohol and Cancer. *Alcohol Clin Exp Res*. 2002;25(5):137S-143S.
 26. Wight AJ, Ogden GR. Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer - A review. *Oral Oncol*. 1998;34(6):441–7.
 27. Valentine JA, Scott J, West CR, St. Hill CA. A histological analysis of the early effects of alcohol and tobacco usage on human lingual epithelium. *J Oral Pathol Med*. 1985;14(8):654–65.
 28. García-Pola Vallejo M, López Arranz J. Criterios clínicos para calcular el riesgo de malignización de la lesión leucoplásica. *Av Odontoestomatol*. 1991;7:89–102.
 29. Franceschi S, Talamini R, Barra S, Baron AE, Bidoli E, Serraino D, et al. Smoking and Drinking in Relation to Cancers of the Oral Cavity, Pharynx, Larynx, and Esophagus in Northern Italy. *Cancer Res*. 1995;50(20):6502–7.
 30. Eriksson CJP. The Role of Acetaldehyde in the Actions of Alcohol (Update 2000). *Alcohol Clin Exp Res*. 2001;25(s1):15S-32S.
 31. IARC M. The evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: allyl components, aldehydes, epoxides and peroxides. *Int Agency Res cancer*. 1985;71.
 32. Homann N, Jousimies-Somer H, Jokelainen K, Heine R, Salaspuro M. High acetaldehyde levels in saliva after ethanol consumption: Methodological aspects and pathogenetic implications. *Carcinogenesis*. 1997;18(9):1739–43.
 33. Popp W, Wolf R, Vahrenholz C, Radtke J, Schell C, Kraus R, et al. Sister chromatid exchange frequencies in lymphocytes of oral cancer patients seem to be influenced by drinking habits. *Carcinogenesis*. 1994;15(8):1603–7.
 34. Yokoyama A, Muramatsu T, Ohmori T, Higuchi S, Hayashida M, Ishii H. Esophageal cancer and aldehyde dehydrogenase-2 genotypes in Japanese males. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1996;5(2):99–102.
 35. La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. Epidemiology,

- etiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol.* 1997;33(5):302–12.
36. Blot WJ. Alcohol and Cancer. *CANCER Res* 52. 1992;52:2119–23.
 37. Du X, Squier CA, Kremer MJ, Wertz PW. Penetration of N-nitrosornicotine (NNN) across oral mucosa in the presence of ethanol and nicotine. *J Oral Pathol Med.* 2000;29(2):80–5.
 38. Ogden GR, Wight AJ, Rice P. Effect of alcohol on the oral mucosa assessed by quantitative cytomorphometry. *J Oral Pathol Med.* 2007;28(5):216–20.
 39. Homann N, Tillonen J, Meurman JH, Rintamäki H, Lindqvist C, Rautio M, et al. Increased salivary acetaldehyde levels in heavy drinkers and smokers: A microbiological approach to oral cavity cancer. *Carcinogenesis.* 2000;21(4):663–8.
 40. Moreno-López LA, Esparza-Gómez GC, González-Navarro A, Cerero-Lapiedra R, González-Hernández MJ, Domínguez-Rojas V. Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: A case-control study in Madrid, Spain. *Oral Oncol.* 2000;36(2):170–4.
 41. Kalavrezos N, Scully C. Mouth cancer for clinicians part 5: Risk factors (other). *Dent Update.* 2015;42(8):766–78.
 42. Bernard WS, Christopher PW. World cancer report 2014. World Heal Organ [Internet]. 2014;630. Available from: <http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>
 43. Feller L, Wood NH, Khammissa RAG, Lemmer J. Human papillomavirus-mediated carcinogenesis and HPV-associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 1: Human papillomavirus-mediated carcinogenesis. *Head Face Med.* 2010;6(1):1–5.
 44. Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;91(6):622–35.
 45. Syrjänen S. Oral manifestations of human papillomavirus infections. *Eur J Oral Sci.* 2018;126:49–66.
 46. Nieminen MT, Uittamo J, Salaspuro M, Rautemaa R. Acetaldehyde production from ethanol and glucose by non-*Candida albicans* yeasts in vitro. *Oral Oncol* [Internet]. 2009;45(12):e245–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2009.08.002>
 47. Pushalkar S, Ji X, Li Y, Estilo C, Yegnanarayana R, Singh B, et al. Comparison of oral microbiota in tumor and non-tumor tissues of patients with oral squamous cell carcinoma. *BMC Microbiol* [Internet]. 2012;12(1):1. Available from: *BMC Microbiology*
 48. Homann N, Kärkkäinen P, Koivisto T, Nosova T, Jokelainen K, Salaspuro M. Effects of acetaldehyde on cell regeneration and differentiation of the upper gastrointestinal tract mucosa. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89(22):1692–7.
 49. Homann N, Tillonen J, Rintamäki H, Salaspuro M, Lindqvist C, Meurman JH. Poor dental status increases acetaldehyde production from ethanol in saliva: A possible link to increased oral cancer risk among heavy drinkers. *Oral Oncol.* 2001;37(2):153–8.
 50. Brozos VE, Vazquez RF, Cueva BJ, Barón DFJ. Supervivientes Al Cáncer En España: Situación Actual. *Monográfico SEOM* [Internet]. 2013;7–15. Available from:

- https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/infopublico/publicaciones/MONOGRAFICO_SEOM_LARGOS_SUPERVIVIENTES_I.pdf
51. Awan KH, Hegde R, Cheever VJ, Carroll W, Khan S, Patil S, et al. Oral and pharyngeal cancer risk associated with occupational carcinogenic substances: Systematic review. *Head Neck*. 2018;40(12):2724–32.
 52. Manoharan S, Nagaraja V, Esllick GD. Ill-fitting dentures and oral cancer: A meta-analysis. *Oral Oncol* [Internet]. 2014;50(11):1058–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.08.002>
 53. Keibel A, Singh V, Sharma M. Inflammation, Microenvironment, and the Immune System in Cancer Progression. *Curr Pharm Des*. 2009;15(17):1949–55.
 54. Pérez MA, Raimondi AR, Itoiz ME. An experimental model to demonstrate the carcinogenic action of oral chronic traumatic ulcer. *J Oral Pathol Med*. 2005;34(1):17–22.
 55. Kawanishi S, Hiraku Y, Pinlaor S, Ma N. Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis. *Biol Chem*. 2006;387(4):365–72.
 56. Taghavi N, Yazdi I. Type of food and risk of oral cancer. Review article. *Arch Iran Med*. 2007;10(2):227–32.
 57. Doerr TD, Prasad AS, Marks SC, Shamsa FH, Penny HS, Mathog RH. Zinc deficiency in head and neck cancer patients. *J Am Coll Nutr*. 1997;16(5):418–22.
 58. Moses LE, Rotsides JM, Balogun FO, Persky MS, Muggia FM, Persky MJ. Oral Squamous Cell Carcinoma as a Complication of Treatment for Recurrent High-Grade Serous Cancer. 2019;1–4.
 59. Mayer C, Brucker J, Schuetz F, Domschke C, Bechstein S, Heil J, et al. Efficacy and toxicity profile of pegylated liposomal doxorubicin in patients with advanced ovarian cancer. *Arch Gynecol Obstet*. 2016;294(1):123–9.
 60. Bonomi MR, Misiukiewicz K, Posner M, Maki RG. Squamous Cell Carcinoma of the Oral Tongue in Two Patients Previously Exposed to Long-Term Pegylated Liposomal Doxorubicin. *Oncologist*. 2012;17:1594–5.
 61. Nomura H, Sakamoto K, Sugihara T, Okamoto S, Aoki Y, Tanigawa T, et al. Oral leukoplakia, a precancerous lesion of squamous cell carcinoma, in patients with long-term pegylated liposomal doxorubicin treatment. *Med (United States)*. 2018;97(7):2–4.
 62. Zamoiski RD, Yanik E, Gibson TM, Cahoon EK, Margaret M, Lynch CF, et al. Risk of second malignancies in solid organ transplant recipients who develop keratinocyte cancers. *Cancer Res*. 2018;77(15):4196–203.
 63. Garewal H., Katz R., Meyskens F, Al E. β -Carotene Produces Sustained Remissions in Patients With Oral Leukoplakia. Results of a Multicenter Prospective Trial. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1999;125(12):1305–10.
 64. Nagao T, Ikeda N, Warnakulasuriya S, Fukano H, Yuasa H, Yano M, et al. Serum antioxidant micronutrients and the risk of oral leukoplakia among Japanese. *Oral Oncol*. 2000;36(5):466–70.
 65. López Arranz J, de Vicente Rodríguez JC, Junquera-Gutiérrez LM. *Patología Quirúrgica Maxilofacial*. Síntesis Editorial, editor. 1998. 268–269 p.
 66. Sánchez López JD, Chamorro Santos C, Esquivias López-Cuervo J, Valencia Laseca E. Factores histopatológicos en el carcinoma lingual de células escamosas. *Rev Española Patol* [Internet]. 2006;39(2):99–104. Available from:

- [http://dx.doi.org/10.1016/S1699-8855\(06\)70020-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1699-8855(06)70020-4)
67. Broders A. Grading and practical application. *Arch Pathol.* 1926;2:376–81.
 68. Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, van der Waal I. *Histological Typing of Cancer and Precancer of the Oral Mucosa.* Berlin: Springer-Verlag. 1997;
 69. Matsushita Y, Yanamoto S, Takahashi H, Yamada S, Naruse T, Sakamoto Y, et al. A clinicopathological study of perineural invasion and vascular invasion in oral tongue squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2015;44(5):543–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijom.2015.01.018>
 70. Moeckelmann N, Ebrahimi A, Tou YK, Gupta R, Low TH (Hubert), Ashford B, et al. Prognostic implications of the 8th edition American Joint Committee on Cancer (AJCC) staging system in oral cavity squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* [Internet]. 2018;85(August):82–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.08.013>
 71. Benito M. GENES REPARADORES DEL DNA.
 72. Hanahan D, Weinberg R. The Hallmarks of Cancer. *Cell.* 2000;100:57–70.
 73. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
 74. Catherine Sánchez N. Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Rev Médica Clínica Las Condes.* 2013;24(4):553–62.
 75. Deberardinis RJ, Thompson CB. Cellular metabolism and disease: What do metabolic outliers teach us? *Cell* [Internet]. 2012;148(6):1132–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.032>
 76. 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(11):2488–92.
 77. Ferlay JS, Ervik M, Al. E. GLOBOCAN 2012 cancer incidence and mortality worldwide: IARC cancerbase No11. Lyon France. *Int Agency Res Cancer.* 2013;
 78. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. “Field cancerization” in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. *Cancer.* 1953;6(5):963–8.
 79. Braakhuis BJM, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of slaughter’s concept of field cancerization: Evidence and clinical implications. *Cancer Res.* 2003;63(8):1727–30.
 80. Dakubo GD, Jakupciak JP, Birch-Machin MA, Parr RL. Clinical implications and utility of field cancerization. *Cancer Cell Int.* 2007;7:1–12.
 81. Aparna M, Shenai P, Chatra L, Veena K, Rao P, Prabhu R, et al. Field cancerization: A review. *Arch Med Heal Sci.* 2013;1(2):136.
 82. Tabor M, Brakenhoff R, Ruijter-Schippers H, Kummer J, Leemans C, Braakhuis J. Genetically Altered Fields as Origin of Locally Recurrent Head and Neck Cancer A Retrospective Study. *Clin Cancer Res.* 2004;10(11):3607–13.
 83. Boudewijn K, Braakhuis BJM, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of slaughter’s concept of field cancerization: Evidence and clinical implications. *Cancer Res.* 2003;63(8):1727–30.
 84. Fauci, Braunwald, Kasper, Hauser, Longo, Jameson, et al. *Harrison. Principios de Medicina Interna.* 17ª Edición. McGraw Hill; 2009. 486–511 p.
 85. Gollin SM. Chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of the head

- and neck: Window to the biology of disease. *Head Neck*. 2001;23(3):238–53.
86. Slebos R, Yi Y, Ely K, Al E. Gene expression differences associated with human papillomavirus status in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2006;12 (3 Pt 1):701–9.
 87. Singh B, Stoffel A, Gogineni S, Al. E. Amplification of the 3q26.3 locus is associated with progression to invasive cancer and is a negative prognostic factor in head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Pathol*. 2002;161 (2):365–71.
 88. Rubin Grandis J, Zeng Q, Drenning S. Epidermal growth factor receptor-mediated Stat3 signaling blocks apoptosis in head and neck cancer. *Laryngoscope*. 2000;110:868–74.
 89. Yin X, Donovan-Peluso M, Whiteside T, Johnson J, Day R, Heberman R, et al. Gene Amplification and Gene Dosage in Cell Lines Derived From Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Wiley Online Libr*. 1991;
 90. Michalides R, VanVeelen N, Hart A, Loftus B, Wientjens E, Balm A. Overexpression of cyclin D1 correlates with recurrence in a group of forty-seven operable squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res*. 1995;55:975–8.
 91. Jones P, Fernandez P, Campo P. PRAD1/cyclin D1 gene amplification correlates with messenger RNA overexpression and tumor progression in human laryngeal carcinomas. *Cancer Res*. 1994;54:4183–7.
 92. Fracchiolla N, Pruneri G, Pignataro L, Al. E. Molecular and immunohistochemical analysis of the bcl-1/cyclin D1 gene in laryngeal squamous cell carcinomas: Correlation of protein expression with lymph node metastases and advanced clinical stage. *Cancer*. 1997;79:1114–21.
 93. Michalides R, van Veelen N, Kristel P, Al. E. Overexpression of cyclin D1 indicates a poor prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1997;123:497–502.
 94. Coco Martin J, Balkenende A, Verschoor T, Lallemand F, Michalides R. Cyclin D1 overexpression enhances radiation-induced apoptosis and radiosensitivity in a breast tumor cell line. *Cancer Res*. 1999;78:390–5.
 95. Roz L, Wu C, Porter S, Al. E. Allelic imbalance on chromosome 3p in oral dysplastic lesions: an early event in oral carcinogenesis. *Cancer Res*. 1996;56:1228–1231.
 96. Wu C, Roz L, Sloan P, Al. E. Deletion mapping defines three discrete areas of allelic imbalance on chromosome arm 8p in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Genes Chromosom Cancer*. 1997;20:347–53.
 97. van der Riet P, Nawroz H, Hruban R, Al. E. Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. *Cancer Res*. 1994;54:1156–8.
 98. Jeannon J, Wilson J. Cyclins, cyclin-dependent kinases, cyclin-dependent kinase inhibitors and their role in head and neck cancer. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1998;23:420–4.
 99. Tan B, Park C, Ailles L, Weissman J. The cancer stem cell hypothesis a work in progress. *Lab invest*. 2006;86:1203–7.
 100. Rodrigo J, Coto E, González M, Maldonado M, Suárez C. P53 allelic loss and the outcome of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2001;258:255–8.

101. Nakashima T, Pak S, Silverman G, Spring P, Frederick M, Clayman G. Genomic cloning, mapping, structure and promoter analysis of HEADPIN, a serpin which is down-regulated in head and neck cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1492:441–6.
102. Spring P, Nakashima T, Frederick M, Henderson Y, Clayman G. Identification and cDNA cloning of headpin, a novel differentially expressed serpin that maps to chromosome 18q. *Biochem Biophys Res Comm*. 1999;264:299–304.
103. Pearlstein R, Benninger M, Carey T, Al. E. Loss of 18q predicts poor survival of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Genes Chromosom Cancer*. 1998;2:333–9.
104. Califano J, Westra WH, Meininger G, Corio R, Koch WM, Sidransky D. Genetic progression and clonal relationship of recurrent premalignant head and neck lesions. *Clin Cancer Res*. 2000;6(2):347–52.
105. Ellis MA, Graboyes EM, Wahlquist AE, Neskey DM, Kaczmar JM, Schopper HK, et al. Primary Surgery vs Radiotherapy for Early Stage Oral Cavity Cancer. *Otolaryngol - Head Neck Surg (United States)*. 2018;158(4):649–59.
106. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Head and neck cancers (version 2.2017) [Internet]. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/head-and-neck.pdf. Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/head-and-neck.pdf.
107. Hoffman H, Karnell L, Funk G, Robinson R, Menck H. The National Cancer Data Base report on cancer of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998;124:951–62.
108. Weatherspoon D, Chattopadhyay A, Boroumand S, Garcia I. Oral cavity and oropharyngeal cancer incidence trends and disparities in the United States: 2000–2010. *Cancer Epidemiol*. 2015;39:497–504.
109. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines[®]). National Comprehensive Cancer Network. 2019.
110. Anderson CR, Sisson K, Moncrieff M. A meta-analysis of margin size and local recurrence in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* [Internet]. 2015;51(5):464–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2015.01.015>
111. Zanon DK, Migliacci JC, Xu B, Katabi N, Montero PH, Ganly I, et al. A proposal to redefine close surgical margins in squamous cell carcinoma of the oral tongue. *JAMA Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2017;143(6):555–60.
112. Robertson A, Soutar D, Paul J, Al. E. Early closure of a randomized trial: surgery and postoperative radiotherapy versus radiotherapy in the management of intra-oral tumours. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 1998;10(3):155–60.
113. Iyer N, Tan D, Tan V, Al. E. Randomized trial comparing surgery and adjuvant radiotherapy versus concurrent chemoradiotherapy in patients with advanced, nonmetastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: 10-year update and subset analysis. *Cancer*. 2015;121(10):1599–607.
114. Spiro R, Strong E, Shah J. Classification of neck dissections: variations on a new theme. *Am J Surg*. 1994;168:415–8.
115. D’Cruz A, Vaish R, Kapre N, Mitali D. Elective versus Therapeutic Neck Dissection in Node-Negative Oral Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373:521–9.
116. Shah J, Patel S, Singh B. Jatin Shah’s Head and Neck Surgery and Oncology.

- Fourth Edition. Elsevier. 2012.
117. Abu-Ghanem S, Yehuda M, Carmel N, Al. E. Elective neck dissection vs observation in early-stage squamous cell carcinoma of the oral tongue with no clinically apparent lymph node metastasis in the neck: a systematic review and meta-analysis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2016;142(9):857–65.
 118. Liu M, Wang S, Yang X, Peng H. Diagnostic efficacy of sentinel lymph node biopsy in early oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis of 66 studies. *PLoS One.* 2017;12(1):e0170322.
 119. Byers R, Weber R, Andrews T, McGrill D, Kare R, Wolf P. Frequency and therapeutic implications of “skip metastases” in the neck from squamous carcinoma of the oral tongue. *Head Neck.* 1997;19(1):14–9.
 120. de Vicente J, Rodríguez-Santamarta T, Peña I, Villalaín L, Fernández-Valle A, González-García M. Relevance of level IIb neck dissection in oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2015;20(5):e547-53.
 121. Torrecillas V, Shepherd HM, Francis S, Buchmann LO, Monroe MM, Lloyd S, et al. Adjuvant radiation for T1-2N1 oral cavity cancer survival outcomes and utilization treatment trends: Analysis of the SEER database. *Oral Oncol.* 2018;85(July):1–7.
 122. Caballero M, Grau JJ, Casellas S, Bernal-Sprekelsen M, Blanch JL. El papel de la quimioterapia en el cáncer de la cavidad oral avanzado. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2009;60(4):260–7.
 123. El-Sayed S, Nelson N. Adjuvant and adjunctive chemotherapy in the management of squamous cell carcinoma of the head and neck region. A meta-analysis of prospective and randomized trials. *J Clin Oncol.* 1996;14(3):838–47.
 124. Duran G. Estudio farmacogenético de variantes polimórficas en genes reparadores del ADN y otros marcadores de resistencia en pacientes con cancer de cabeza y cuello. 2015.
 125. Pignon JP, Maître A le, Maillard E, Bourhis J. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): An update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol [Internet].* 2009;92(1):4–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.radonc.2009.04.014>
 126. Vermorken J, Mesia R, Rivera F, Al. E. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2008;359:1116–27.
 127. Mesía R, Rivera F, Kawecki A, Al. E. Quality of life of patients receiving platinum-based chemotherapy plus cetuximab first line for recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann Oncol.* 2010;21:1967–73.
 128. De Vicente JC, Rodríguez-Santamarta T, Rodrigo JP, Blanco-Lorenzo V, Allonca E, García-Pedrero JM. PD-L1 expression in tumor cells is an independent unfavorable prognostic factor in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2019;28(3):546–54.
 129. Huang S, Hwang D, Lockwood G, Goldstein D, Osullivan B. Predictive value of tumor thickness for cervical lymph-node involvement in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer.* 2009;115(7):1489–97.
 130. Liao C-T, Wang H-M, Chang J-C, Al. E. Analysis of risk factors for distant metastases in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer.* 2007;110(7):1501–8.
 131. Liu C-H, Chen H-J, Wang P-C, Chen Y-L. Patterns of recurrence and second

- primary tumors in oral squamous cell carcinoma treated with surgery alone. *J Med Sci*. 2013;29(10):554–9.
132. Moore C, Flynn M, Greenberg R. Evaluation of size in prognosis of oral cancer. *Cancer*. 1986;58(1):158–62.
 133. Laske RD, Scholz I, Ikenberg K, Meerwein C, Vital DG, Studer G, et al. Perineural Invasion in Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity: Histology, Tumor Stage, and Outcome. *Laryngoscope Investig Otolaryngol*. 2016;1(1):13–8.
 134. Temam S, Flahault A, Perie S, Monceaux G, Coulet F, Callard P, et al. p53 gene status as a predictor of tumor response to induction chemotherapy of patients with locoregionally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Clin Oncol*. 2000;18(2):385–94.
 135. Couture C, Raybaud-Diogene H, Tetu B, Bairati L. Couture C, Raybaud-Diogene H, Tetu B, Bairati I, Murry D, Allard J, et al. p53 and Ki-67 as markers of radioresistance in head and neck carcinoma. *Cancer*. 2002;94(3):713–22.
 136. Wakisaka N, Wen Q, Yoshizaki T, Nishimura T, Furukawa M, Kawahara E, et al. Association of vascular endothelial growth factor expression with angiogenesis and lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope*. 1999;109(5):810–4.
 137. Kyzas P, Cunha I, Ioannidis J. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Clin Cancer Res*. 2005;11(4):1434–40.
 138. Ang K, Berkey B, Tu X, Zhang H, Katz R, Hammond E, et al. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res*. 2002;62(24):7350–6.
 139. Eriksen J, Steiniche T, Askaa J, Alsner J, Overgaard J. The prognostic value of epidermal growth factor receptor is related to tumor differentiation and the overall treatment time of radiotherapy in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;58(2):561–6. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*.
 140. Wang F, Zhang H, Xue Y, Wen J, Zhou J, Yang X, et al. A systematic investigation of the association between HPV and the clinicopathological parameters and prognosis of oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Cancer Med*. 2017;6(5):910–7.
 141. Rietbergen M, Brakenhoff R, Bloemena E, Witte B, Snijders P, Heideman D, et al. Human papillomavirus detection and comorbidity: critical issues in selection of patients with oropharyngeal cancer for treatment De-escalation trials. *Ann Oncol*. 2013;24:2740–2745.
 142. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*. 2015;517(7536):576–82.
 143. Hermida-prado F, Menéndez ST, Albornoz-Afanasyev P, Granda-Díaz R, Álvarez-Teijeiro S, Villaronga MÁ, et al. Distinctive Expression and Amplification of Genes at 11q13 in Relation to HPV Status with Impact on Survival in Head and Neck Cancer Patients. *J Clin Med*. 2018;7:501.
 144. O’Rorke, MA, Ellison M, Murray L, Moran M, James J, Anderson L. Human papillomavirus related head and neck cancer survival: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol*. 2012;48:1191–201.

145. Tian S, Switchenko J, Jhaveri J, Cassidy R, Ferris M, Press R, et al. Survival outcomes by high-risk human papillomavirus status in nonoropharyngeal head and neck squamous cell carcinomas: a propensity-scored analysis of the national cancer data base. *Cancer*. 2019;125(16):2782–93.
146. Brockmeyer P, Hemmerlein B, Kruppa J, Kauffmann P, Tröltzsch M, Schliephake H, et al. The time interval between primary surgery and adjuvant therapy determines prognosis of oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 2015;51(11):e82–5.
147. Ranganathan K, Loganathan K. Oral epithelial dysplasia: Classifications and clinical relevance in risk assessment of oral potentially malignant disorders. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2019;23(1):19–27.
148. van der Waal I, Schepman K, van der Meij E, Smeele L. Oral leukoplakia: A clinicopathological review. *Oral Oncol*. 1997;33:291–301.
149. Warnakulasuriya S, Johnson N, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*. 2007;36:575–80.
150. Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral Oncol*. 2003;39:770–80.
151. van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol* [Internet]. 2009;45(4–5):317–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.05.016>
152. Bagan J, Jimenez Y, Murillo J, et al. Lack of association between proliferative verrucous leukoplakia and human papillomavirus infection. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007;65:46–9.
153. Cabay R, Morton T, Epstein J. Proliferative verrucous leukoplakia and its progression to oral carcinoma: a review of the literature. *J Oral Pathol Med*. 2007;36:255–61.
154. Rhodus NL, Kerr AR, Patel K. Oral Cancer. Leukoplakia, Premalignancy, and Squamous Cell Carcinoma. *Dent Clin North Am*. 2014;58(2):315–40.
155. Takata T, Slootweg PJ, El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR. Tumors of the Oral Cavity and Mobile Tongue. *Who Classif Head Neck Tumours*, 4th ed. 2017;(International Agency For Research on Cancer (IARC): Lyon, France):105–31.
156. Barnes L, Eveson J, Reichart P, D S. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics. Head and neck tumours. *World Heal Organ*. 2005;
157. Gupta P, Mehta F, Daftary D, et al. Incidence rates of oral cancer and natural history of oral precancerous lesions in a 10-year follow-up study of Indian villagers. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1980;8:283–333.
158. Yap T, Celentano A, Seers C, McCullough MJ, Farah CS. Molecular diagnostics in oral cancer and oral potentially malignant disorders—A clinician’s guide. *J Oral Pathol Med*. 2019;(June):1–8.
159. Edwards N. Protein identification from tandem mass spectra by database searching. *Methods. Mol Biol*. 2017;1558:357–80.
160. McLean C, Gluckman P, Sheppard A. Phenotypic diversity and epigenomic variation – The utility of mass spectrometric analysis of DNA methylation. *J*

- Proteomics. 2012;75(12):3400–9.
161. Sarode GS, Sarode SC, Maniyar N, Sharma N, Yerwadekar S, Patil S. Recent trends in predictive biomarkers for determining malignant potential of oral potentially malignant disorders. *Oncol Rev.* 2019;13(2):141–50.
 162. Chimenos Küstner E, Font Costa I, López López J. Riesgo de cáncer oral y marcadores moleculares. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2004;9(5):377–84.
 163. Werkmeister R, Brandt B, Joos V. Clinical relevance of erbB-1 and -2 oncogenes in oral carcinomas. *Oral Oncol.* 2000;36:100–5.
 164. Mineta H, Miura K, Takebayashi S, Ueda Y, Misawa K, Haida H, et al. Cyclin D1 overexpression correlates with poor prognosis in patients with tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2000;36:194.8.
 165. Schliephake H. Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer -A review. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003;32:233–45.
 166. Tumuluri V, Thomas G, Fraser I. Analysis of the Ki-67 antigen at the invasive tumour front of human oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2002;31:598–604.
 167. Ries, JC, Hassfurth E, Steininger H, Kloss F, Wiltfang J, Girod S, et al. Correlation of telomerase activity, clinical prognosis and therapy in oral carcinogenesis. *Anticancer Res.* 2001;21:1057-64.
 168. Lee B-K, Diebel E, Neukam F, Wiltfang J, Ries J. Diagnostic and prognostic relevance of expression of human telomerase subunits in oral cancer. *Int J Oncol.* 2001;10:1063-8.
 169. Whyte D, Broton C, Shillitoe E. The unexplained survival of cells in oral cancer: what is the role of p53? *Pathol Med.* 2002;31:25–33.
 170. Hamidi S, Salo T, Kainulainen T, Epstein J, Lerner K, Larjava H. Expression of $\alpha\beta 6$ integrin in oral leukoplakia. *Brit J Cancer.* 2000;82:1433–40.
 171. Bautista A, Santiago R. Immunolocalization of p53, Glutathione S-transferase pi and CD57 antigens in oral leukoplakia. *Anticancer Res.* 2001;21:379–86.
 172. von Zeidler S, de Souza Botelho T, Mendonça E, Batista A. E-cadherin as a potential biomarker of malignant transformation in oral leukoplakia: a retrospective cohort study. *BMC Cancer.* 2014;14:972.
 173. Nie M, Zhong L, Zeng G, Li B. The changes of cytokeratin 19 during carcinogenesis. *Zo Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2002;37:187–90.
 174. Schildt E, Nylander K, Eriksson M, Hardell L, Magnusson A, Roos G. Expression of p53, PCNA, ki-67 and bcl-2 in relation to risk factors in oral cancer –a molecular epidemiological study. *Int J Oncol.* 2003;22:861-8.
 175. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell.* 2006;126(4):663–76.
 176. Maherali N., Sridharan R., Xie W., Utikal J., Eminli S., Arnold K., Stadtfeld M., Yachechko R., Tchieu J. JR. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell.* 2007;1:55–70.
 177. Baillie R, Tan ST, Itinteang T. Cancer stem cells in oral cavity squamous cell carcinoma: A review. *Front Oncol.* 2017;7(JUN):1–10.
 178. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, et al. Functional Expression Cloning of Nanog , a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic

- Stem Cells. 2003;113:643–55.
179. Rodda D, Chew J, Lim L, Loh Y, Wang B, Ng H, et al. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem* (2005) 280(26):24731–7. doi:10.1074/jbc.M502573200. *J Biol Chem*. 2005;280(6):24731–7.
 180. Loh Y, Wu Q, Chew J, Vega V, Zhang W, Chen X, et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet*. 2006;38(4):431–.
 181. Fu T, Hsieh I, Cheng J, Tsai M, Hou Y, Lee J, et al. Association of OCT4, SOX2, and NANOG expression with oral squamous cell carcinoma progression. *J Oral Pathol Med*. 2016;45(2):89–95.
 182. Chiou SH, Yu CC, Huang CY, Lin SC, Liu CJ, Tsai TH, et al. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008;14(13):4085–95.
 183. Tsai LL, Yu CC, Chang YC, Yu CH, Chou MY. Markedly increased Oct4 and Nanog expression correlates with cisplatin resistance in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2011;40(8):621–8.
 184. Lee H, Kang Y, Lee J, Byun J, Kim U, Jang S, et al. Positive expression of NANOG, mutant p53, and CD44 is directly associated with clinicopathological features and poor prognosis of oral squamous cell carcinoma. *BMC Oral Health*. 2015;15(1):1–11.
 185. Ram R, Brasch H, Dunne J, Davis P, Tan S, Itinteang T, et al. The identification of three cancer stem cell subpopulations within moderately differentiated lip squamous cell carcinoma. *Front Surg*. 2017;4:12.
 186. Rodrigo JP, Villaronga MÁ, Menéndez ST, Hermida-Prado F, Quer M, Vilaseca I, et al. A Novel Role for Nanog As An Early Cancer Risk Marker in Patients with Laryngeal Precancerous Lesions. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–7.
 187. Liu K, Lin B, Zhao M, Yang X, Chen M, Gao A, et al. The multiple roles for Sox2 in stem cell maintenance and tumorigenesis. *Cell Signal*. 2013;25(5):1264–71.
 188. Chou M, Hu F, Yu C, Yu C. Sox2 expression involvement in the oncogenicity and radiochemoresistance of oral cancer stem cells. *Oral Oncol*. 2015;51(1):31–9.
 189. Pozzi, V, Sartini D, Rocchetti R, Santarelli A, Rubini C, Morganti S, et al. Identification and characterization of cancer stem cells from head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Cell Physiol Biochem*. 2015;36(2):784–98.
 190. González-Márquez R, Llorente JL, Rodrigo JP, García-Pedrero JM, Álvarez-Marcos C, Suárez C, et al. SOX2 expression in hypopharyngeal, laryngeal, and sinonasal squamous cell carcinoma. *Hum Pathol [Internet]*. 2014;45(4):851–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2013.12.004>
 191. Granda-Díaz R, Menéndez ST, Mallo DP, Hermida-Prado F, Rodríguez R, Suárez-Fernández L, et al. The novel role of SOX2 as an early predictor of cancer risk in patients with laryngeal precancerous lesions. *Cancers (Basel)*. 2019;11(3):1–11.
 192. Michifuri Y, Hirohashi Y, Torigoe T, Miyazaki A, Kobayashi J, Sasaki T, et al. High expression of ALDH1 and SOX2 diffuse staining pattern of oral squamous cell carcinomas correlates to lymph node metastasis. *Pathol Int*. 2012;62(10):684–9.
 193. Pfister DG, Spencer S, Adelstein D, Al. E. NCCN Guidelines Version 2.2018: Head and Neck Cancers. *Natl Compr Cancer Netw*. 2016;227.
 194. Piazzolla D, Palla AR, Pantoja C, Cañamero M, Castro IP De, Ortega S, et al. Lineage-restricted function of the pluripotency factor NANOG in stratified

- epithelia ~. 2014;(May).
195. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2012;2(5):401–4.
 196. Chandrashekar DS, Bashel B, Akshaya S, Balasubramanya H, Creighton CJ, Ponce-rodriguez I, et al. UALCAN : A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression. *Neoplasia* [Internet]. 2017;19(8):649–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neo.2017.05.002>
 197. Costea DE, Tsinkalovsky O, Vintermyr OK, Johannessen AC, Mackenzie IC. Cancer stem cells - New and potentially important targets for the therapy of oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis.* 2006;12(5):443–54.
 198. Luiz ST, Modolo F, Mozzer I, dos Santos EC, Nagashima S, Camargo Martins AP, et al. Immunoexpression of SOX-2 in oral leukoplakia. *Oral Dis.* 2018;24(8):1449–57.
 199. Abbey LM, Kaugars GE, Gunsolley JC, Burns JC, Page DG, Svirsky JA, et al. Intraexaminer and interexaminer reliability in the diagnosis of oral epithelial dysplasia. :188–91.
 200. Li S, Lee YCA, Li Q, Chen CJ, Hsu WL, Lou PJ, et al. Oral lesions, chronic diseases and the risk of head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2015;51(12):1082–7.
 201. Silverman S, Gorsky M, Lozada F. Oral Leukoplakia and Malignant Transformation. *Cancer.* 1984;53:563–8.
 202. Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: Significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14:47–62.
 203. Smith L, Bhargava K, Mani N, Malaowalla A, Silverman S J. Oral cancer and precancerous lesions in 57,518 industrial workers of Gujarat, India. *Indian J Cancer.* 1975;12:118–23.
 204. Napier S, Speight P. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: An overview of the literature. *J Oral Pathol Med.* 2008;37:1–10.
 205. Ray J, Ranganathan K, Chattopadhyay A. Malignant transformation of oral submucous fibrosis: Overview of histopathological aspects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2016;122:200–9.
 206. Silverman S, Bhargava K, Smith L, Malaowalla A. Malignant transformation and natural history of oral leukoplakia in 57,518 industrial workers of Gujarat, India. *Cancer.* 1976;38:1790–5.
 207. Lumerman H, Freedman P, Kerpel S. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995;79:321–9.
 208. Hamadah O, Goodson M, Thomson P. Clinicopathological behaviour of multiple oral dysplastic lesions compared with that of single lesions. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2010;48:503–6.
 209. Yang S, Tsai C, Lee Y, Chen T. Treatment outcome of dysplastic oral leukoplakia with carbon dioxide laser – Emphasis on the factors affecting recurrence. *J Oral Maxillofac Surg.* 2011;69:e78–87.
 210. Roed-Petersen B. Effect on oral leukoplakia of reducing or ceasing tobacco smoking. *Acta Derm Venereol.* 1982;62(2):164–7.
 211. Kalavrezos N, Scully C. Mouth cancer for clinicians part 6: Potentially malignant

- disorders. *Dent Update*. 2015;42(9):866–77.
212. Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: Predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med*. 2008;37:127–33.
 213. Liu W, Bao Z, Shi L, Tang G, Zhou Z. Malignant transformation of oral epithelial dysplasia: clinicopathological risk factors and outcome analysis in a retrospective cohort of 138 cases. *Histopathology*. 59(4):733-740.
 214. Diz P, Meleti M, Diniz-Freitas M, Vescovi P, Warnakulasuriya S, Johnson N, et al. Oral and pharyngeal cancer in Europe: Incidence, mortality and trends as presented to the Global Oral Cancer Forum. *Transl Res Oral Oncol*. 2017;2:1–13.
 215. Cáncer oral y orofaríngeo: Estadísticas. <https://www.cancer.net/es/tipos-de-cáncer/cáncer-oral-y-orofar%C3%ADngeo/estad%C3%ADsticas>.
 216. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019;69(1):7–34.
 217. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* [Internet]. 2009;45(4–5):309–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.06.002>
 218. Lewin F, Norell S, Johansson H, et al. Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*. 1998;82:1367–75.
 219. Mashberg A, Garfinkel L, Harris S. Alcohol as a primary risk factor in oral squamous cell carcinoma. *CA Cancer J Clin*. 1981;31:146–55.
 220. Woolgar J, Scott J. Prediction of cervical lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue/floor of mouth. *Head Neck*. 1995;17:463–72.
 221. Shiboski C, Shiboski S, Silverman S J. Trends in oral cancer rates in the United States, 1973-1996. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2000;28:249–56.
 222. Forastiere A, Koch W, Trotti A, Al. E. Head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2001;345:1890–900.
 223. Silverman S J. Oral cancer. 5th edition. Hamilt (ON), London BC Decker. 2003;1–128.
 224. Axell T, Pindborg J, Smith C, Al. E. Oral white lesions with special reference to pre-cancerous and tobacco-related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden, May 18–21, 1994. *J Oral Pathol Med*. 1996;25:49–54.
 225. Chambers I, et al. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature*. 2007;450:1230–4.
 226. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, et al. The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells. 2003;113:631–42.
 227. Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science (80-)*. 2011;333:1157–60.
 228. Hedberg ML, Goh G, Chiosea SI, Bauman JE, Freilino ML, Zeng Y, et al. Genetic landscape of metastatic and recurrent head and neck squamous cell carcinoma. 2016;126(1):169–80.
 229. Álvarez-Teijeiro S, García-Inclán C, Villaronga MA, Casado P, Hermida-Prado F, Granda-Díaz R, et al. Factors Secreted by Cancer-Associated Fibroblasts that

- Sustain Cancer Stem Properties in Head and Neck Squamous Carcinoma Cells as Potential. 2018;
230. Prasetyanti PR, Medema JP. Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective. 2017;1–9.
 231. Biddle A, Gammon L, Liang X, Elena D, Mackenzie IC. Phenotypic Plasticity Determines Cancer Stem Cell Therapeutic Resistance in Oral Squamous Cell Carcinoma. *EBioMedicine* [Internet]. 2016;4:138–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.01.007>
 232. Al-hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. 2004;7274–82.
 233. Atsumi N, Ishii G, Kojima M, Sanada M, Fujii S, Ochiai A. Podoplanin, a novel marker of tumor-initiating cells in human squamous cell carcinoma A431. *Biochem Biophys Res Comm*. 2008;373:36–41.
 234. Kawaguchi H, El-naggar AK, Papadimitrakopoulou V, Ren H, Fan Y, Feng L, et al. Podoplanin : A Novel Marker for Oral Cancer Risk in Patients With Oral Premalignancy. 2008;26(3).
 235. Rodrigo JP, García-carracedo D, González M V, Mancebo G, Fresno MF, García-pedrero J. Podoplanin expression in the development and progression of laryngeal squamous cell carcinomas. 2010;1–9.
 236. Chambers I, Colby D, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. 2003;113:643–55.
 237. Navarro P, Festuccia N, Colby D, Gagliardi A, Mullin NP, Zhang W, et al. OCT4/SOX2- independent Nanog autorepression modulates heterogeneous Nanog gene expression in mouse ES cells. *EMBO J* [Internet]. 2012;31(24):4547–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2012.321>
 238. Silva J, Nichols J, Theunissen TW, Guo G, Oosten AL Van, Barrandon O, et al. Nanog Is the Gateway to the Pluripotent Ground State. *Cell* [Internet]. 2009;138(4):722–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.039>
 239. Rasti A, Mehrazma M, Madjd Z, Abolhasani M. Co-expression of Cancer Stem Cell Markers OCT4 and NANOG Predicts Poor Prognosis in Renal Cell Carcinomas. 2018;(July):1–11.
 240. Wang M, Chiou S. Targeting cancer stem cells : emerging role of Nanog transcription factor. 2013;1207–20.
 241. Sinha N, Mukhopadhyay S, Das DN, Panda PK, Bhutia SK. Relevance of cancer initiating/stem cells in carcinogenesis and therapy resistance in oral cancer. *Oral Oncol* [Internet]. 2013;49(9):854–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.06.010>
 242. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. 2007;448(July):313–8.
 243. Yu J, Yu J, Vodyanik MA, Smuga-otto K, Antosiewicz-bourget J, Frane JL, et al. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *PLoS One*. 2007;7.
 244. Abelev GI, Lazarevich NL. Control of Differentiation in Progression of Epithelial Tumors. 2006;(06).
 245. Dowell KG, Simons AK, Bai H, Kell B, Wang ZZ, Yun K, et al. Novel Insights into Embryonic Stem Cell Self-Renewal Revealed Through Comparative Human and

- Mouse Systems Biology. *Stem Cells*. 2014;32(5):1161–72.
246. Ravindran G, Sawant SS, Hague A, Kingsley K, Devaraj H. Association of differential β -catenin expression with Oct-4 and Nanog in Oral Squamous Cell Carcinoma and their correlation with Clinicopathological factors and Prognosis. *Head Neck*. 2015;37:982–93.
 247. Watanabe M, Ohnishi Y, Inoue H. NANOG expression correlates with differentiation, metastasis and resistance to preoperative adjuvant therapy in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*. 2014;7:35–40.
 248. Wang S, Fan H, Xu J, Zhao E, Wang S. Prognostic implication of NOTCH1 in early stage oral squamous cell cancer with occult metastases. *Clin Oral Investig*. 2018;22:1131–8.
 249. Vasiliou V, Zakhari S, Seitz HK, Hoek JB. Biological Basis of Alcohol-Induced Cancer. Vol. 815, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2015. 139–140 p.
 250. Lee HJ, Kang YH, Lee JS, Byun JH, Kim UK, Jang SJ, et al. Positive expression of NANOG, mutant p53, and CD44 is directly associated with clinicopathological features and poor prognosis of oral squamous cell carcinoma. *BMC Oral Health* [Internet]. 2015;15(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12903-015-0120-9>
 251. Yu MA, Kiang A, Wang-rodriguez J, Rahimy E, Haas M, Yu V, et al. Nicotine Promotes Acquisition of Stem Cell and Epithelial-to-Mesenchymal Properties in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. 2012;7(12):1–14.
 252. Gu T, Liu S. Cytoplasmic NANOG-Positive Stromal Cells Promote Human Cervical Cancer Progression. *Am J Pathol*. 2012;181(2):652–61.
 253. Luo W, Li S, Peng B, Ye Y, Deng X, Yao K. Embryonic Stem Cells Markers SOX2, OCT4 and Nanog Expression and Their Correlations with Epithelial-Mesenchymal Transition in Nasopharyngeal Carcinoma. *PLoS One*. 2013;8(2).
 254. Ren ZH, Zhang CP, Ji T. Expression of SOX2 in oral squamous cell carcinoma and the association with lymph node metastasis (Review). *Oncol Lett*. 2016;11(3):1973–9.
 255. Lu Y, Futtner C, Rock JR, Xu X, Whitworth W, Hogan BLM, et al. Evidence that SOX2 overexpression is oncogenic in the lung. *PLoS One*. 2010;5(6).
 256. Liu X, Qiao B, Zhao T, Hu F, Lam AKY, Tao Q. Sox2 promotes tumor aggressiveness and epithelial-mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med*. 2018;42(3):1418–26.
 257. Arnold K, Sarkar A, Yram MA, Polo JM, Bronson R, Sengupta S, et al. Sox2 + adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2011;9(4):317–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2011.09.001>
 258. Cai J, He B, Li X, Sun M, Lam AKY, Qiao B, et al. Regulation of tumorigenesis in oral epithelial cells by defined reprogramming factors Oct4 and Sox2. *Oncol Rep*. 2016;36(2):651–8.
 259. Du L, Yang Y, Xiao X, Wang C, Zhang X, Wang L, et al. Sox2 nuclear expression is closely associated with poor prognosis in patients with histologically node-negative oral tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* [Internet]. 2011;47(8):709–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.05.017>

260. Qiao B, He B, Cai J, Yang W. The expression profile of Oct4 and Sox2 in the carcinogenesis of oral mucosa. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(1):28–37.
261. Ye X, Wu F, Wu C, Wang P, Jung K, Gopal K, et al. β -Catenin, a Sox2 binding partner, regulates the DNA binding and transcriptional activity of Sox2 in breast cancer cells. *Cell Signal [Internet]*. 2014;26(3):492–501. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.11.023>
262. Gen Y, Yasui K, Nishikawa T, Yoshikawa T. SOX2 promotes tumor growth of esophageal squamous cell carcinoma through the AKT/mammalian target of rapamycin complex 1 signaling pathway. *Cancer Sci*. 2013;104(7):810–6.
263. Züllig L, Roessle M, Weber C, Graf N, Haerle SK, Jochum W, et al. High sex determining region Y-box 2 expression is a negative predictor of occult lymph node metastasis in early squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Eur J Cancer*. 2013;49(8):1915–22.
264. Thierauf J, Veit JA, Hess J. Epithelial-to-mesenchymal transition in the pathogenesis and therapy of head and neck cancer. *Cancers (Basel)*. 2017;9(7):1–13.
265. He S, Chen J, Zhang Y, Zhang M, Yang X, Li Y, et al. Sequential EMT-MET induces neuronal conversion through Sox2. *Cell Discov [Internet]*. 2017;3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/celldisc.2017.17>
266. Wilbertz T, Wagner P, Petersen K, Stiedl AC, Scheble VJ, Maier S, et al. SOX2 gene amplification and protein overexpression are associated with better outcome in squamous cell lung cancer. *Mod Pathol*. 2011;24(7):944–53.
267. Bass AJ, Watanabe H, Mermel CH, Yu S, Perner S, Verhaak RG, et al. SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nat Genet [Internet]*. 2009;41(11):1238–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.465>
268. Ge N, Lin HX, Xiao XS, Guo L, Xu HM, Wang X, et al. Prognostic significance of Oct4 and Sox2 expression in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *J Transl Med*. 2010;8:1–7.
269. Zhang X, Yu H, Yang Y, Zhu R, Bai J, Peng Z, et al. SOX2 in gastric carcinoma, but not hsth1, is related to patients' clinicopathological features and prognosis. *J Gastrointest Surg*. 2010;14(8):1220–6.
270. Freier K, Knoepfle K, Flechtenmacher C, Pungs S, Devens F, Toedt G, et al. Recurrent Copy Number Gain of Transcription Factor SOX2 and Corresponding High Protein Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2010;47:500–9.
271. Hermsen M, Guervós MA, Meijer G, Van Diest P, Nieto CS, Marcos CA, et al. Chromosomal changes in relation to clinical outcome in larynx and pharynx squamous cell carcinoma. *Cell Oncol*. 2005;27(3):191–8.
272. Järvinen AK, Autio R, Kilpinen S, Saarela M, Leivo I, Grénman R, et al. High-Resolution Copy Number and Gene Expression Microarray Analyses of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines of Tongue and Larynx. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008;47(October 2013):238–46.
273. Lin SC, Liu CJ, Ko SY, Chang HC, Liu TY, Chang KW. Copy number amplification of 3q26-27 oncogenes in microdissected oral squamous cell carcinoma and oral brushed samples from areca chewers. *J Pathol*. 2005;206(4):417–22.
274. Bora-Singhal N, Nguyen J, Schaal C, Perumal D, Singh S, Coppola D, et al. YAP1

- regulates OCT4 activity and SOX2 expression to facilitate self-renewal and vascular mimicry of stem-like cells. *Stem Cells*. 2015;33(6):1705–18.
275. Bae KM, Dai Y, Vieweg J, Siemann DW. Hypoxia regulates SOX2 expression to promote prostate cancer cell invasion and sphere formation. *Am J Cancer Res*. 2016;6(5):1078–88.
276. de Vicente JC, Santamarta TR, Rodrigo JP, García-Pedrero JM, Allonca E, Blanco-Lorenzo V. Expression of podoplanin in the invasion front of oral squamous cell carcinoma is not prognostic for survival. *Virchows Arch*. 2015;466:549–558.

Anexo 1: Artículos publicados.

- ✓ de Vicente, J.C.; Rodríguez-Santamarta, T.; Rodrigo, J.P.; Allonca, E.; Vallina, A.; Singhanía, A.; Donate-Pérez Del Molino, P.; García-Pedrero, J.M. **The Emerging Role of NANOG as an Early Cancer Risk Biomarker in Patients with Oral Potentially Malignant Disorders.** *J. Clin. Med.* 2019, 8, 1376.
- ✓ de Vicente, J.C.; Donate-Pérez Del Molino, P.; Rodrigo, J.P.; Allonca, E.; Hermida-Prado, F.; Granda-Díaz, R.; Rodríguez-Santamarta, T.; García-Pedrero, J.M. **SOX2 Expression Is an Independent Predictor of Oral Cancer Progression.** *J. Clin. Med.* 2019, 8, 1744.



Article

The Emerging Role of NANOG as an Early Cancer Risk Biomarker in Patients with Oral Potentially Malignant Disorders

Juan C. de Vicente ^{1,2,3,4,*} , Tania Rodríguez-Santamarta ^{1,2,3,4}, Juan P. Rodrigo ^{2,3,4,5,6},
Eva Allonca ^{3,4,6}, Aitana Vallina ^{3,4,7}, Anusha Singhanía ⁸, Paula Donate-Pérez del Molino ^{1,2} and
Juana M. García-Pedrero ^{2,3,4,5,6,*}

- ¹ Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), C/Carretera de Rubín, s/n, 33011 Oviedo, Asturias, Spain
 - ² Department of Surgery, University of Oviedo, Asturias 33006, Spain
 - ³ Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), C/Carretera de Rubín, s/n, 33011 Oviedo, Asturias, Spain
 - ⁴ Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), University of Oviedo, Asturias 33006, Spain
 - ⁵ Department of Otolaryngology, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), C/Carretera de Rubín, s/n, 33011 Oviedo, Asturias, Spain
 - ⁶ Ciber de Cáncer (CIBERONC), Instituto de Salud Carlos III, Av. Monforte de Lemos, 3-5, 28029 Madrid, Spain
 - ⁷ Department of Pathology, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), IUOPA, C/Carretera de Rubín, s/n, 33011 Oviedo, Asturias, Spain
 - ⁸ Christian Medical College and Hospital, Ludhiana 141008, Punjab, India
- * Correspondence: jvicente@uniovi.es (J.C.d.V.); juanagp.finba@gmail.com (J.M.G.-P.);
Tel.: +34-85-103638 (J.C.d.V.); +34-985-107937 (J.M.G.-P.)

Received: 29 July 2019; Accepted: 30 August 2019; Published: 3 September 2019



Abstract: NANOG, a key regulator of pluripotency and self-renewal in embryonic and adult stem cells, is frequently overexpressed in multiple cancers, including oral squamous cell carcinoma (OSCC). It has been frequently associated with poor outcomes in epithelial cancers, and recently implicated in laryngeal tumorigenesis. On this basis, we investigated the role of NANOG protein expression as an early cancer risk biomarker in oral potentially malignant disorders (OPMD), and the impact on prognosis and disease outcomes in OSCC patients. NANOG expression was evaluated by immunohistochemistry in 55 patients with oral epithelial dysplasia, and 125 OSCC patients. Correlations with clinical and follow-up data were assessed. Nuclear NANOG expression was detected in 2 (3.6%) and cytoplasmic NANOG expression in 9 (16.4%) oral dysplasias. NANOG expression increased with the grade of dysplasia. Cytoplasmic NANOG expression and the histopathological grading were significantly correlated with oral cancer risk, although dysplasia grading was the only significant independent predictor of oral cancer development in multivariate analyses. Cytoplasmic NANOG expression was also detected in 39 (31%) OSCC samples. Positive NANOG expression was significantly associated with tobacco and alcohol consumption, and was more frequent in pN0 tumors, early I-II stages. These data unveil the clinical relevance of NANOG in early stages of OSCC tumorigenesis rather than in advanced neoplastic disease. NANOG expression emerges as an early predictor of oral cancer risk in patients with OPMD.

Keywords: oral squamous cell carcinoma; oral cancer risk; oral epithelial dysplasia; NANOG; immunohistochemistry

1. Introduction

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is a malignancy characterized by genomic instability, cellular heterogeneity, and a dismal prognosis, since more than 50% of patients still die of this disease or complications within 5 years [1]. OSCC may develop from histologically normal oral mucosa or from oral potentially malignant disorders (OPMDs), such as oral leukoplakia (OLK), erythroplakia, or lichen planus, in a process which takes place at the normal epithelium, progressing through hyperplasia to dysplasia and culminating in an invasive carcinoma [2]. OPMDs may show many of the genetic alterations which are present in OSCC [3], even in the absence of histologically defined dysplasia [4], which currently remains the best predictor of progression to invasive carcinoma [5].

In view of an emerging concept of carcinogenesis, the cancer stem cell hypothesis, a subpopulation of cells termed as cancer stem cells (CSCs) or tumor initiating cells (TICs) play a crucial role not only in tumor initiation and maintenance, but also in tumor aggressiveness, microenvironment modulation, evasion of apoptosis, and metastatic spreading [6–10]. The early transcription factors NANOG, OCT4, and SOX2 play pivotal roles in the maintenance of pluripotency and self-renewal capability in both embryonic and adult stem cells. In addition, it has been demonstrated that these factors are key regulators of CSCs properties and self-renewal in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) [11]. Specifically, NANOG has been shown to be upregulated in different types of cancers including OSCC, and its overexpression has been correlated with poor differentiation status, poor prognosis, and chemoresistance [11,12], suggesting that NANOG may promote aggressive tumor phenotypes [13]. However, Hwang et al. [14] and Vaz et al. [15] respectively found that NANOG expression was not related to prognosis in esophageal and rectal cancers. Therefore, the prognostic value of NANOG expression in solid tumors remains controversial. On the other hand, a recent paper by Rodrigo et al. [16] uncovered a novel role for NANOG in the early stages of laryngeal tumorigenesis, and more importantly, its clinical application as a biomarker for cancer risk assessment in patients with laryngeal precancerous lesions.

The present study was conducted to comprehensively investigate the clinical relevance of NANOG expression in both early stages of oral carcinogenesis and late stages of disease progression, by analyzing NANOG protein expression using immunohistochemistry in large series of oral dysplastic lesions and OSCC tissue specimens, to establish correlations with the risk of progression to oral cancer, impact on OSCC prognosis and patient outcome.

2. Methods and Materials

2.1. Patients and Tissue Specimens

Surgical tissue specimens from 55 patients with a diagnosis of oral epithelial dysplasia at the Hospital Universitario Central de Asturias between 2000 and 2005 were retrospectively collected. Patients included in this study had to meet the following criteria: (i) pathological diagnosis of oral epithelial dysplasia; (ii) feature lesions of the oral mucosa (leukoplakia); (iii) no previous history of head and neck cancer, (iv) complete excisional biopsy of the lesion; and (v) a minimum follow-up of five years (or until progression to malignancy occurred). Fifty-five patients who met these criteria were included in this study. Patients were followed-up every two months for the first six months after completing the treatment, every three months until the second year, and every six months thereafter. Representative tissue sections were obtained from archival, paraffin-embedded blocks and the histological diagnosis was confirmed by an experienced pathologist. The premalignant lesions were classified into the categories of low-grade and high-grade dysplasia, following the current WHO classification [17]. Alveolar mucosa obtained from unerupter third molars surgery was used as control. All patients gave their consent to excise this normal tissue.

Additionally, an independent cohort of 125 patients with histologically confirmed OSCC who underwent surgical treatment with curative purposes at the Hospital Universitario Central de Asturias between 1996 and 2007 were retrospectively collected, in accordance with approved institutional review

board guidelines. All experimental procedures were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Ethics Committee of the Hospital Universitario Central de Asturias and by the Regional CEIC from Principado de Asturias (date of approval 5 May 2016; approval number: 70/16) for the project PI16/00280. Informed consent was obtained from all patients. Clinicopathologic data were collected from medical records, as summarized in Supplementary Table S1. Tissue samples and data from donors included in this study were provided by the Principado de Asturias BioBank (PT17/0015/0023), integrated in the Spanish National Biobanks Network and they were processed following standard operating procedures with the appropriate approval of the Ethical and Scientific Committees. Representative tissue samples were obtained from archival, formalin-fixed paraffin-embedded blocks to construct tissue microarrays.

2.2. Tissue Microarray (TMA) Construction

Three morphological representative areas were selected from each individual paraffin block, and 1 mm diameter tissue cores were transferred to the recipient master block to construct the TMAs. The original archived hematoxylin- and eosin-stained slides were reviewed by an experienced pathologist, who identified the areas of interest and confirmed the histological diagnosis. Each TMA block also included three cores of normal epithelium as an internal control. These samples were obtained from non-oncological patients undergoing oral surgery. In order to check the histopathological diagnosis and the adequacy of tissue sampling, a section from each microarray was stained with hematoxylin and eosin and examined by light microscopy.

2.3. Immunohistochemistry (IHC)

The TMAs were cut into 3 μm sections and dried on Flex IHC microscope slides (DakoCytomation, Glostrup, Denmark). The sections were deparaffinized with standard xylene and hydrated through graded alcohols into water. Antigen retrieval was performed by heating the sections with Envision Flex Target Retrieval solution, high pH (Dako). Staining was performed at room temperature on an automatic staining workstation (Dako Autostainer Plus, Dako) with NANOG (D73G4) XP[®] rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling technology, Inc.) at 1:200 dilution, using the Dako EnVision Flex + Visualization System (Dako Autostainer, DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Negative controls were prepared by omitting the primary antibody. Counterstaining with hematoxylin was the final step.

The IHC results were independently evaluated by two observers (JPR, and JMG-P), blinded to clinical data. Given that CSC subpopulations could represent a very small percentage of cells, hence NANOG expression in few cells even as low as 1% could be intrinsically meaningful into the CSC concept. Taking this into consideration, any NANOG-positive cell was considered even 1% of positive cells. A semiquantitative scoring system based on staining intensity was applied, as previously established [16], divided into three categories: negative (absence of staining, score 0); weak to moderate (some cytoplasmic staining in dysplastic areas, score 1); and strong protein expression (intense and homogeneous cytoplasmic staining in dysplastic areas, score 2), with an inter-observer concordance higher than 95%. As in some cases nuclear staining was observed, the cases were also scored as positive/negative based on the presence of nuclear staining in dysplastic areas. In OSCC, also a semiquantitative scoring system based on staining intensity was applied as: negative (0), weak (1) and strong protein expression (2), as previously established [18]. Since any NANOG-positive staining could be meaningful, these criteria were used as a cut-off point to establish positive NANOG expression (scores 1 and 2) vs. negative expression (score 0). Human seminoma was used as positive control, showing strong nuclear NANOG staining.

2.4. Statistical Analysis

Bivariate analyses by χ^2 and Fisher's exact tests were used for comparison between NANOG expression and clinicopathological categorical variables. Disease-specific survival (DSS) was determined for the date of treatment completion to death for the tumor. For time-to-event analysis,

survival curves were estimated using the Kaplan–Meier method. The log-rank test was used to compare the survival curves. Hazard ratios (HR), with their 95% confidence intervals (CI) for clinicopathological variables, were calculated using the univariate Cox proportional hazards model. All tests were two-sided and *p* values less than 0.05 were considered statistically significant. All statistical analyses were performed using SPSS version 18 (IBM Co., Armonk, NY, USA).

3. Results

3.1. Patient Characteristics

A total of 55 patients diagnosed with oral epithelial dysplasia were selected for study. Twenty-six patients (53%) were men and the remaining 29 women (47%), with a mean age of 62.61 years (SD 12.56, range 39 to 83 years). Regarding tobacco and alcohol consumption, information was only available for 31 patients, and ten of these patients (32%) were smokers and 4 (13%) habitual alcohol drinkers. Forty-two of 55 patients (76%) were classified as low-grade dysplasia, and 13 (24%) as high-grade dysplasia, according to the current WHO classification [17].

The clinical and pathological characteristics of the 125 OSCC patients selected for study are shown in Supplementary Table S1. This cohort was composed of 82 (66%) men and 43 (34%) women, with a median age of 57 years ranging from 28 to 91 years. Eighty-four patients (67%) were smokers and 69 (55%) were habitual alcohol drinkers. Most of the tumors were well differentiated (64%), more than 50% of cases were in advanced clinical stages (III or IV), and the most common site of tumor origin was the tongue (41%) followed by the floor of the mouth (30%). Neck node metastases were present in 49 (39%) cases, and local recurrences were found in 54 (43%) cases. No patient had distant metastasis at the time of diagnosis. Adjuvant radiotherapy was administered to 75 patients (60%), and adjuvant chemotherapy was administered to 14 patients (11.2%).

3.2. Immunohistochemical Analysis of NANOG Expression in Oral Epithelial Dysplasias

NANOG protein expression was evaluated by immunohistochemistry in a set of 55 oral epithelial dysplasias. Nuclear NANOG expression was detected in 2 (3.6%) cases. Positive cytoplasmic NANOG expression was detected in 9 (16.4%) oral dysplasias: five (9.1%) lesions showed strong staining (score 2) and four (7.2%) lesions weak to moderate staining (score 1). Figure 1 shows representative examples of nuclear/cytoplasmic NANOG expression in oral dysplasias, compared to the negative expression in normal adjacent epithelia (Figure 1A–C). Strong nuclear NANOG staining was detected in human seminoma, used as a positive control (Figure 1D).

Cytoplasmic NANOG expression was significantly correlated with the histopathological classification. Thus, 4 (10%) of 42 lesions with low-grade dysplasia, and 5 (38%) of 13 lesions with high-grade dysplasia exhibited cytoplasmic NANOG protein expression (Fisher's exact test $p = 0.02$) (Table 1). Nuclear NANOG expression showed a trend to associate with a higher grade of dysplasia (Fisher's exact test $p = 0.05$) (Table 1).

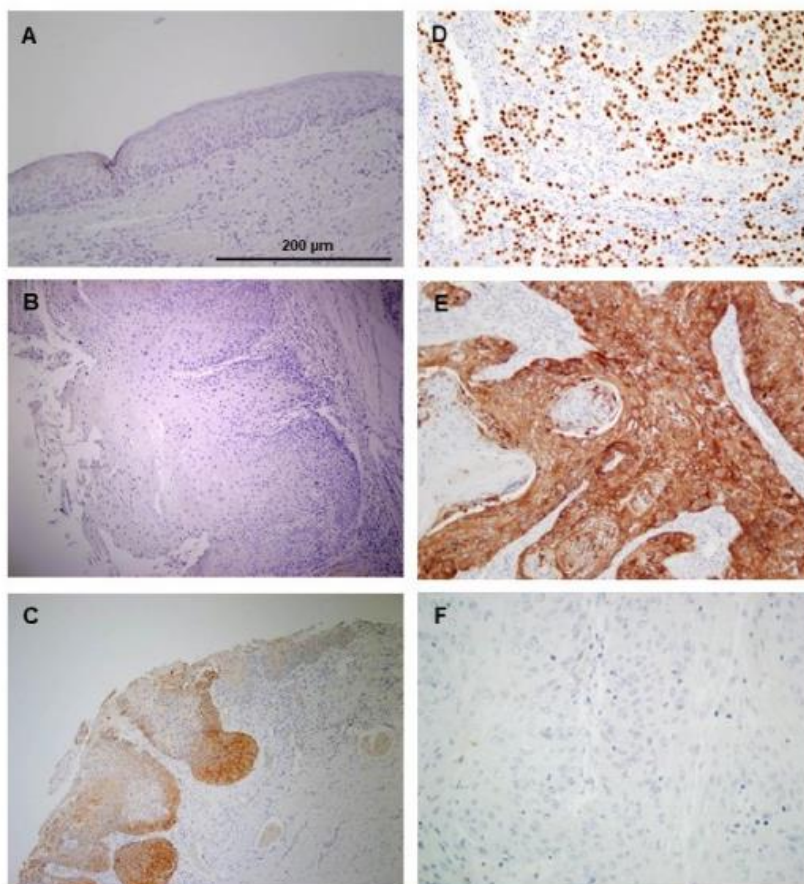


Figure 1. Immunohistochemical analysis of NANOG expression in oral epithelial dysplasias and oral squamous cell carcinoma (OSCC). The normal adjacent epithelium exhibited negative staining (A). Representative examples of oral dysplasias showing negative (B), and positive NANOG staining (C), human seminoma as a positive control (D). Examples of oral squamous cell carcinomas with positive (E), and negative NANOG staining (F). Magnification 200×. Scale bar 200 µm.

Table 1. Associations between NANOG protein expression and clinicopathological features in patients with oral dysplasia.

Characteristic	Cytoplasmic NANOG Protein Staining Scores			<i>p</i> [*]	Nuclear NANOG Expression		<i>p</i> [†]
	0	1	2		Negative	Positive	
Age (years), Mean (SD)	63 (12)	57 (18)	65 (14)	0.69	62 (13)	69 (13)	0.46
Gender, number (%)							
Female	26 (90)	1 (3)	2 (7)	0.42	28 (97)	1 (3)	
Male	20 (77)	3 (11)	3 (11)		25 (96)	1 (4)	
Smoking, number (%)							
Yes	7 (70)	1 (10)	2 (20)	1.00	10 (100)	0 (0)	1.00
No	16 (76)	2 (10)	3 (14)		19 (90)	2 (10)	
Ethanol intake, number (%)							
Yes	1 (25)	2 (50)	1 (25)	0.02	4 (100)	0 (0)	1.00
No	22 (81)	1 (4)	4 (15)		25 (93)	2 (7)	
Dysplasia grading							
Low-grade	38 (90)	1 (3)	3 (7)	0.02	42 (100)	0 (0)	0.05
High-grade	8 (62)	3 (23)	2 (15)		11 (85)	2 (15)	

* Chi square and † Fisher's exact tests. Data on tobacco and alcohol intake was only available for 31 patients.

3.3. Association of NANOG Protein Expression with Oral Cancer Risk

During the follow-up period, 12 (22%) of 55 patients developed an invasive OSCC at the same site of the previous premalignant lesion. The mean and median times to cancer diagnosis in the cases that progressed were 184 months (range 145 to 222 months) and 192 months (range 24 to 359 months), respectively. The histopathological grade of dysplasia was significantly correlated with the risk of progression from oral epithelial dysplasia to invasive carcinoma in the present cohort ($p < 0.001$; Table 2). In addition, patients harboring NANOG-positive dysplasias either considering cytoplasmic or nuclear NANOG expression were consistently and significantly associated with an increased risk of progression to oral cancer ($p = 0.02$ and $p = 0.04$, respectively) (Table 2). Univariate Kaplan–Meier and Cox analysis also showed that cytoplasmic NANOG, nuclear NANOG, and the histological grade of dysplasia were significantly associated with oral cancer risk ($p = 0.002$, $p = 0.001$ and $p < 0.001$, respectively) (Table 3 and Figure 2). When these three factors were simultaneously analyzed using a multivariate Cox analysis, dysplasia grading was the only significant independent predictor of oral cancer development (HR = 17.88, 95% CI 3.59 to 89.04; $p < 0.001$) (Table 4). In addition, patients carrying strong cytoplasmic NANOG expression (score 2) experienced a higher progression to OSCC than those with negative to moderate (scores 0 and 1) expression, and these differences almost reached statistical significance (HR = 4.35, 95% CI 0.88 to 22.42; $p = 0.07$).

Table 2. Evolution of the premalignant lesions in relation to histopathological diagnosis, and nuclear and cytoplasmic NANOG expression.

Characteristic	Number of Cases (%)	Progression to Carcinoma (%)	<i>p</i>
Dysplasia Grade			
Low-grade	42 (76)	2 (5)	<0.001 †
High-grade	13 (24)	10 (77)	
Cytoplasmic NANOG			
Score 0	46 (84)	7 (15)	0.02 *
Score 1	4 (7)	2 (50)	
Score 2	5 (9)	3 (60)	
Nuclear NANOG expression			
Negative	53 (96)	10 (19)	0.04 †
Positive	2 (4)	2 (100)	

* Chi square and † Fisher’s exact tests.

Table 3. Univariate Kaplan–Meier and Cox cancer-free survival analysis in 55 patients with oral dysplasias categorized by dysplasia grading, and cytoplasmic and nuclear NANOG expression.

Characteristic	No Cases	Censored Patients (%)	Mean Cancer-Free Survival Time (95% CI)	<i>p</i>	Hazard Ratio	95% Confidence Interval
Dysplasia Grade						
Low-grade	42	40 (95)	181.59 (170.21–192.98)	<0.001	Reference	4.09–89.01
High-grade	13	3 (23)	100.69 (54.14–147.24)			
Cytoplasmic NANOG						
Score 0	46	39 (85)	171.57 (155.07–188.07)	0.002	Reference	2.30
Score 1	4	2 (50)	156.25 (62.07–250.43)			
Score 2	5	2 (40)	43.40 (17.52–69.27)			
Nuclear NANOG						
Negative	53	43 (81)	189.58 (150.36–228.81)	0.001	Reference	8.13
Positive	2	0 (0)	45.00 (0.00–97.92)			

p Values were estimated using the log-rank test. 95% CI: 95% Confidence Interval.

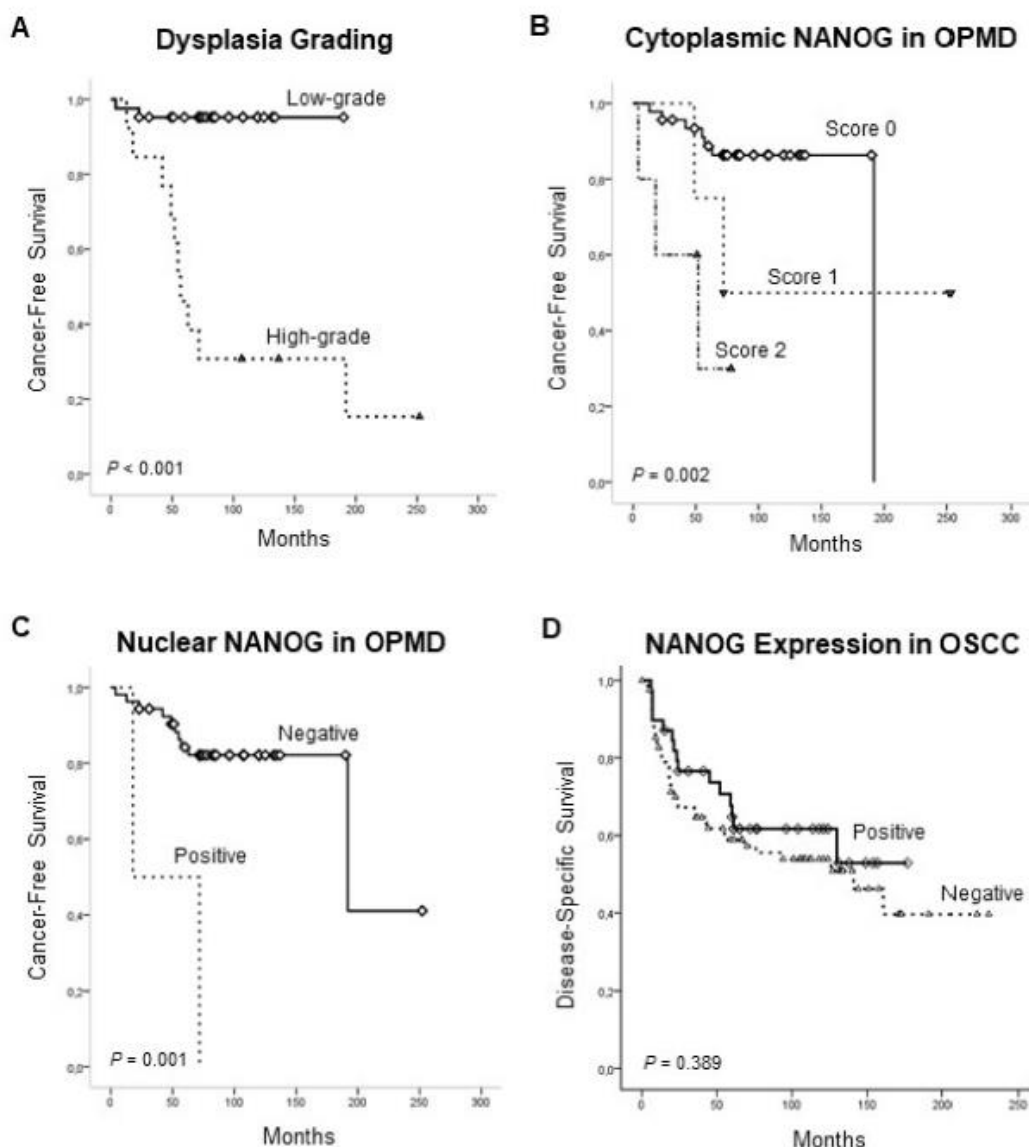


Figure 2. Kaplan–Meier cancer-free survival curves in the cohort of 55 patients with oral epithelial dysplasia categorized by histological grading (low-grade vs. high-grade) (A), cytoplasmic NANOG (Staining scores 0, 1 and 2) (B) and nuclear NANOG expression (positive vs. negative) (C). Disease-specific survival curves in the cohort of 125 OSCC patients dichotomized according to NANOG expression (positive vs. negative) (D).

Table 4. Multivariate Cox proportional hazards model to estimate oral cancer risk.

Variable	<i>p</i>	Hazard Ratio	95% Confidence Interval
Histology (High-grade vs. low-grade dysplasia)	<0.001	17.88	3.59–89.04
Cytoplasmic NANOG	0.082		
Score 0	Reference	Reference	
Score 1	0.54	0.55	0.08–3.63
Score 2	0.07	4.45	0.88–22.42
Nuclear NANOG (positive vs. negative)	0.48	2.014	0.28–14.25

3.4. Clinical Significance of NANOG Protein Expression in OSCC Progression and Disease Outcome

NANOG protein expression was evaluated by immunohistochemistry in a cohort of 125 OSCC patients (Supplementary Table S1). Positive NANOG expression (scores 1 and 2) was detected in 39 (31%) of 122 carcinomas (3 cases were not evaluable); cytoplasmic staining was predominantly observed in tumor cells, and negligible staining in stromal cells (Figure 1E,F). Regarding the clinicopathological variables, positive NANOG expression was significantly correlated with smoking habit ($p = 0.009$), and alcohol consumption ($p = 0.01$) (Table 5). Even though no other significant correlations were observed, positive NANOG expression was more frequent in pN0 tumors, early I-II stages, and absence of tumor recurrences (Table 5).

Table 5. The relationship between clinicopathological variables and NANOG expression in the cohort of 125 OSCC patients.

Variable	No Cases	Positive NANOG Expression (%)	<i>p</i>
Gender			
Men	79	31 (39)	0.02
Women	43	8 (18)	
Tobacco use			
Smoker	82	33 (40)	0.005
Non-smoker	40	6 (15)	
Alcohol use			
Drinker	67	29 (43)	0.003
Non-drinker	55	10 (18)	
pT			
pT1 + 2	79	26 (33)	0.76
pT3 + 4	43	13 (30)	
pN			
pN0	75	26 (35)	0.41
pN+	47	13 (28)	
Clinical stage			
I + II	51	20 (39)	0.14
III + IV	71	19 (27)	
G status			
G1	77	21 (27)	0.14
G2 + G3	45	18 (40)	
Tumor location			
Tongue	50	14 (28)	0.43
Other sites	72	25 (35)	
Tumor location			
Floor of the mouth	36	13 (36)	0.52
Other sites	86	26 (30)	
Tumor recurrence			
No	68	26 (38)	0.09
Yes	54	13 (24)	
Second primary carcinoma			
No	104	32 (31)	0.49
Yes	18	7 (39)	
Clinical status at the end of the follow-up			
Alive without recurrence	50	19 (38)	0.48 *
Dead of index cancer	53	15 (28)	
Censored	19	5 (26)	

Fisher's exact and * Chi-square tests.

Over a median follow-up of 61 months (range, 1 to 230 months), 53 deaths occurred. The mean and median follow-up times were 71.82 (SD: 57.55), and 61.0, respectively. The 5- and 10-year disease-specific survival rates were 60% and 44%, respectively. The mean and median survival times were 132.74 months (95% CI: 113.25 to 152.22 months), and 141 months (95% CI: 102.40 to 179.59

months), respectively. In the survival analyses, tumor size and local extension (T), neck node status (N), and clinical stage were significantly correlated to survival ($p = 0.001$, $p = 0.01$, and $p = 0.002$, respectively). Positive NANOG expression was associated with a higher 5-year disease-specific survival, although this relationship did not reach statistical significance ($p = 0.389$) (Figure 2).

3.5. In Silico Analysis of NANOG and OCT4 mRNA Expression Using TCGA Data

The role of NANOG was further investigated by a transcriptomic analysis of RNAseq data available from The Cancer Genome Atlas (TCGA) HNSCC cohorts [19], using the platforms cBioPortal (<http://cbioportal.org/>) [20] and UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/>) [21]. Thus, analysis of an extended TCGA cohort of 530 HNSCC patients showed that NANOG mRNA levels significantly increased in primary tumors compared to normal tissue samples ($p < 0.001$, Figure 3A), in agreement with our results at protein level. Similarly, OCT4 mRNA levels were found to significantly increase in primary tumors compared to normal tissues ($p < 0.001$, Figure 3A). OCT4 is an important CSC regulator functionally related to NANOG and also a transcription factor known to regulate NANOG expression. We next assessed the alteration frequency of NANOG mRNA and other CSC-related genes (i.e., OCT4, SOX2 and Podoplanin, PDPN) specifically in the subset of 172 OSCC patients from the TCGA cohort. As shown by heatmap analysis (Figure 3B), NANOG and OCT4 mRNA levels were found to be upregulated in 5 (2.9%) and 3 (1.7%) cases, respectively. Moreover, concomitant NANOG and OCT4 expression was only detected in 1 case (0.6%), and as such extremely rare in OSCC patients. These data indicate that NANOG expression is not frequently altered at transcriptional level. In addition, when evaluating the impact of NANOG mRNA expression on OSCC patient survival, patients carrying NANOG up-regulation exhibited higher survival, although statistical significance was not attained ($p = 0.483$, Figure 3C). Up-regulation of SOX2 and PDPN mRNAs was detected in 22 (13%) and 6 (3%) cases, respectively (Figure 3B). Notably, there was almost no overlap in alterations between all four CSC-related genes in this subset of 172 OSCC patients. The correlation between NANOG and PDPN protein expression was also assessed in 26 OPMDs with data available (Supplementary Information Table S2). We found a significant inverse association between NANOG and PDPN proteins in OPMDs (Chi square test, $p = 0.017$).

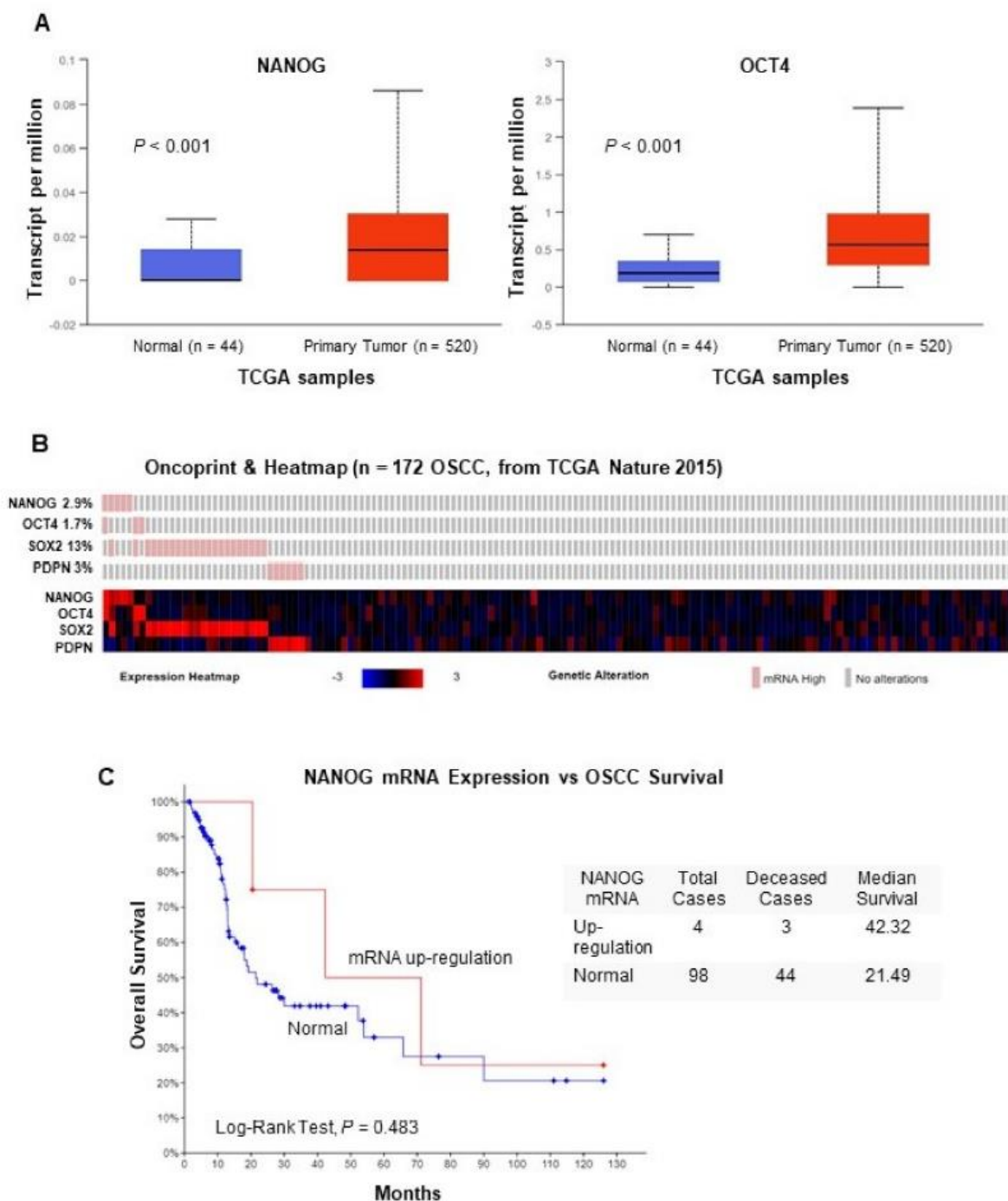


Figure 3. Analysis of NANOG and OCT4 mRNA expression using RNAseq data from the The Cancer Genome Atlas (TCGA) head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) cohorts. **(A)** Box plots comparing the mRNA expression levels of NANOG and OCT4 in primary tumors (in red) VS. normal tissue (in blue) in the TCGA cohort of 530 HNSCC patients using the UALCAN online resources (<http://ualcan.path.uab.edu/>). **(B)** Oncoprint and heatmap representations showing the percentage of cases with mRNA upregulation of each CSC-related gene assessed in the subset of 172 OSCC patients from the TCGA HNSCC cohort [19]. **(C)** Kaplan–Meier survival curves categorized by NANOG mRNA expression (RNA seq V2 RSEM, z-score threshold ± 2) dichotomized as normal vs. upregulation, P value estimated using the Log-rank test.

4. Discussion

This study is the first to demonstrate the clinical significance of NANOG expression in early stages of oral tumorigenesis. Cytoplasmic and nuclear NANOG expression was detected early in oral epithelial dysplasias while being absent in normal adjacent epithelia, and positive NANOG expression in oral dysplasias was significantly correlated with a higher risk of progression to invasive carcinoma. In multivariate Cox analysis, histopathological grading was the only significant independent predictor of oral cancer development in our series; however, patients harboring lesions with strong NANOG expression clearly showed a higher risk of progression (HR >4), almost reaching statistical significance ($p = 0.07$). Nevertheless, since NANOG expression was only detected in 5 out of 12 OPMDs that subsequently progressed to carcinoma, this suggests that NANOG seems to partially contribute as a driver gene to promote OSCC tumorigenesis. Alternatively, spatial-temporal reasons could also explain the lack of NANOG expression in OPMD that lately progressed to OSCC, as plausibly, OPMDs could have been biopsied before aberrant NANOG expression occurred, or cancer could develop from lesions not clinically visible at the time of biopsy and consequently unexamined.

The histological grade of epithelial dysplasia in OPMDs is still currently used as the best predictor of progression to cancer [5]. However, the accuracy of the grading system is largely subjective and affected by a great inter-examiner and intra-examiner variability [22]. The identification of better and more accurate biomarkers capable of robustly predicting the malignant transformation of OPMDs therefore emerges as a valuable strategy to counteract these limitations [23]. In this sense, we and others have contributed to identify various cancer risk biomarkers that exhibited higher predictability beyond dysplasia grading, such as Cortactin (CTTN), the focal adhesion kinase (FAK) and Podoplanin (PDPN) that were strong independent predictors of oral cancer risk but not histopathological diagnosis [24,25]. Noteworthy, the WHO three-tier grading was used in all these studies, while we have used the new binary grading system (high-grade vs low-grade) proposed in the 2017 fourth edition of the WHO Classification. This could also play a role in the differences of predictive values observed with the present study.

Recent advances in next-generation sequencing (NGS) and omics technologies have enormously contributed to uncovering the high complexity and heterogeneity of oncogenomes [26,27]. Beyond the great diversity of genetic and epigenetic alterations found within a tumor, the interaction with the surrounding microenvironment also dynamically modulates the tumor heterogeneity [28]. In addition, epithelia to mesenchymal transition and CSC plasticity has also been demonstrated to fuel tumor heterogeneity in response to environmental cues to drive tumor spreading and therapeutic resistance [29,30]. The fact that OSCC show a heterogeneous architecture compared with healthy oral mucosa has also led to the hypothesis that only a small, clonogenic subpopulation of cells considered CSC or tumor-initiating cells (TICs) is responsible for generating tumors [31]. In this regard, PDPN has been identified as a marker for tumor-initiating cells (TIC) in squamous cell carcinomas [32], and PDPN-positive cells beyond the basal layer of the oral epithelium have been interpreted as an upward clonal expansion of stem cells during carcinogenesis [33]. Consistent with this role, PDPN-positive OPMDs harboring such clonal expansion exhibited a significantly higher risk of malignant transformation, as we and others demonstrated [25,33,34].

NANOG is a transcription factor that plays a critical role during embryonic development and is a key regulator of pluripotency in both embryonic stem cells [35,36], adult stratified epithelia, including oral mucosa [18]. Together with other transcription factors such as OCT4 and SOX2 that mediate embryonic stem cell self-renewal, NANOG is down-regulated via hypermethylation during differentiation in embryonic cells [37]. Interestingly, it has been shown that NANOG is required for attaining a pluripotent ground state in the final phase of reprogramming when other key factors are already present and may be fulfilled by activation of NANOG [38]. NANOG is one of the primary downstream targets of OCT4, but the expression of NANOG can also be sustained in the absence of OCT4 [35]. The discovery of downstream regulatory pathways mediated by NANOG indicates that it regulates several biological processes implicated in cancer development, such as self-renewal, tumor

cell proliferation, motility, epithelial-mesenchymal transition, escape from the immune system, and drug resistance, which are all defined features for CSCs [39,40]. The majority of cancer cells in a tumor are non-tumorigenic, and therapeutic strategies targeting these cells may cause tumor regression. However, if therapy fails to target the subpopulations of tumorigenic CSCs within a tumor, these cells could regenerate the tumor after treatment, thereby contributing to the appearance of tumor recurrence or metastatic dissemination. Hence, complete eradication of cancers requires the effective targeting and elimination of the CSC subpopulations [39]. CSCs may arise from normal adult epithelial stem cells, and the displacement of normal stem cells by CSCs could be associated with the development of oral field cancerization [2]. OCT4 and NANOG are two of the four factors that give rise to the reprogramming of human somatic cells into germ-line-competent induced pluripotent stem (iPS) cells [41,42]. Functionally, NANOG blocks differentiation [43], and in a comparative analysis focused on the self-renewal of embryonic stem cells, among 17,342 genes, NANOG was ranked within the top 1% [44].

NANOG has been found overexpressed in various human cancers, including head and neck squamous cell carcinomas [13]. It has also been recently implicated in early stages of laryngeal carcinogenesis [16]. In agreement with our results, NANOG expression was also revealed as a strong significant predictor of laryngeal cancer risk in patients with precancerous lesions, beyond histological grading [16]. Altogether these data unveil the great applicability potential of NANOG expression as an early cancer risk biomarker, commonly in epithelial premalignancies at different head and neck subsites. Accordingly, since immunohistochemical NANOG evaluation is a relatively simple and objective method that could be easily implemented in the clinical practice, quite reasonably, it emerges as a valuable complementary marker jointly with histological grading for cancer risk assessment. Nevertheless, routine implementation of this molecular test will require further confirmation of these results in future large-sample prospective studies [16].

On the other hand, various studies support the notion that NANOG is highly expressed in late-stage, poorly differentiated, and metastatic carcinomas [13,45–47]. However, even though these data suggest that high levels of NANOG are associated with aggressive tumor phenotypes, there are conflicting results on the possible prognostic relevance. In this regard, to further and significantly extend our data in OPMD, this study also included the analysis of NANOG protein expression in a large cohort of 125 OSCC patients homogeneously diagnosed and treated using surgery at the same institution. Positive NANOG expression was detected in 39 (31%) OSCC tissue samples and was significantly associated with tobacco and alcohol consumption. To our knowledge, this is the first study to report a correlation between NANOG expression with smoking and alcohol-drinking habits in cancer, which uncovers a potential relationship between stemness, by means of NANOG as a CSC marker, and classical chemical carcinogens in OSCC. Lee et al. [11] observed a positive correlation between high NANOG expression and mutant p53, and it is well known that p53 is typically mutated in smoking-related cancers. These observations suggest that alcohol and tobacco consumption could trigger oral cavity carcinogenesis, regulating the expression/function of CSC regulatory factors such as NANOG. In this sense, it has been demonstrated that nicotine induced the expression of various CSC markers NANOG, OCT4, CD44 and BMI1, and enhanced CSC properties and tumorigenic potential in HNSCC models *in vitro* and *in vivo* [48]. Nevertheless, future studies are needed to deeply investigate this possibility and the underlying mechanisms.

No other significant correlations were observed in our series between NANOG expression with known prognostic factors, such as clinical stage, tumor size or neck lymph node metastasis. Similarly to our results, Rasti et al. [39] reported that NANOG expression did not correlate with any clinicopathological parameters in renal cell carcinomas, although conversely, cytoplasmic NANOG expression was significantly associated to lower survival rates. The impact of cytoplasmic NANOG expression on the disease-specific survival was also assessed in the present study. Kaplan–Meier analysis showed a tendency, but not significant, between positive NANOG expression and better survival in our cohort of OSCC patients. We obtained analogous findings by analyzing NANOG

mRNA levels in an independent cohort of 172 OSCC from the TCGA cohort. Thus, higher survival was also observed in patients harboring NANOG mRNA up-regulation. Consistent with this, we also found that positive NANOG expression was more frequent in pN0 tumors, early I-II stages, and the absence of tumor recurrences. In line with our findings, high expression of OCT4 and SOX2 has been associated with earlier stage, small tumor size, and the absence of lymph node metastasis, and high SOX2 expression was significantly associated with better disease-specific survival in OSCC [1]. In addition, we also found that NANOG expression was more frequent in moderately and poorly differentiated OSCC than in well-differentiated tumors, but statistical significance was not reached. These findings may reflect the pluripotency of CSCs and invasive cancer cells [49,50], showing that NANOG expression is not only restricted to CSCs, but also undifferentiated and highly proliferative cells. Thus, NANOG-negative tumors may contain a limited number of undifferentiated OSCC cells, including CSCs [46]. This indicates that NANOG could also be important for the maintenance of an undifferentiated state of malignant cells and development of resistance to therapy [46].

Possible explanations for the contradictory data on the prognostic significance of NANOG protein expression may include methodological differences related to the immunohistochemical NANOG evaluation (i.e., different antibodies and staining scoring system), heterogeneity of patient populations or morphological and genetic heterogeneity in different solid tumors. According to the evidences herein presented, it is also plausible that these discrepancies could underscore the prominent role of NANOG expression in early stages of oral tumorigenesis as a tumor-initiating factor, rather than as a prognostic factor in advanced stages of the neoplastic disease.

In silico analysis of the transcriptome data from the TCGA [19] further contributed to demonstrate the up-regulation of NANOG mRNA expression and other CSC-related genes in OSCC patients. Furthermore, these data provided valuable mechanistic information, as it follows: (i) NANOG mRNA up-regulation is detected in OSCC although at much lower frequency than NANOG protein expression, suggesting the involvement of post-transcriptional mechanisms rather than OCT4-dependent transcriptional regulation; (ii) patients carrying NANOG mRNA up-regulation exhibited higher survival, as likewise observed for the patients with NANOG-positive expression in our OSCC cohort; (iii) mRNA levels of other CSC-related genes OCT4, SOX2 and PDPN were found to be consistently up-regulated in OSCC patients, although these alterations did not overlap; (iv) NANOG and PDPN protein expression in OPMDs also showed no overlap despite the expression of each protein significantly predicted an increased risk of malignant progression, thereby suggesting an independent role of these proteins as CSC or TIC during oral carcinogenesis.

5. Conclusions

Taken together, this study provides original evidence demonstrating the early occurrence and clinically relevant role of NANOG expression in oral tumorigenesis, rather than in late stages of OSCC progression or patient prognosis. Remarkably, our findings uncover the potential application of NANOG expression as an early predictor of oral cancer risk in patients with oral potentially malignant disorders.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2077-0383/8/9/1376/s1>, Table S1. Clinical and pathological characteristics of the cohort of 125 patients with OSCC selected for study. Table S2. Cross-tab to evaluate the correlation between NANOG and PDPN protein expression in OPMDs.

Author Contributions: T.R.-S., A.V. and P.D.-P.d.M. collected and reviewed tissue samples and clinical data; E.A. and A.S. carried out experiments and analyzed data; J.P.R. conceived experiments and analyzed data; J.C.d.V. and J.M.G.-P. conceived experiments, analyzed data and were involved in writing the manuscript. J.C.d.V., T.R.-S., J.P.R., E.A., A.V., A.S., P.D.-P.d.M. and J.M.G.-P. reviewed and approved the final version of the manuscript.

Funding: This study was supported by grants from the Plan Nacional de I + D + I 2013-2016 ISCIII PI16/00280 and CIBERONC (CB16/12/00390), Fundación Merck Salud (17-CC-008), the Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), PCTI-Asturias (GRUPIN14-003), Fundación Bancaria Caja de Ahorros de Asturias-IUOPA and the FEDER Funding Program from the European Union.

Acknowledgments: We want to particularly acknowledge for its collaboration, the Principado de Asturias BioBank (PT17/0015/0023), financed jointly by Servicio de Salud del Principado de Asturias, Instituto de Salud Carlos III and Fundación Bancaria Cajastur and integrated in the Spanish National Biobanks Network. We also thank Juan Pérez Ortega for his excellent administrative support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Fu, T.Y.; Hsieh, I.C.; Cheng, J.T.; Tsai, M.H.; Hou, Y.Y.; Lee, J.H.; Liou, H.H.; Huang, S.F.; Chen, H.C.; Yen, L.M.; Tseng, H.H.; Ger, L.P. Association of OCT4, SOX2, and NANOG expression with oral squamous cell carcinoma progression. *J. Oral Pathol. Med.* **2016**, *45*, 89–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Sinha, N.; Mukhopadhyay, S.; Das, D.N.; Panda, P.K.; Bhutia, S.K. Relevance of cancer initiating/stem cells in carcinogenesis and therapy resistance in oral cancer. *Oral Oncol.* **2013**, *49*, 854–862. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Califano, J.; Westra, W.H.; Meininger, G.; Corio, R.; Koch, W.M.; Sidransky, D. Genetic progression and clonal relationship of recurrent premalignant head and neck lesions. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 347–352. [[PubMed](#)]
4. Mithani, S.K.; Mydlarz, W.K.; Grumbione, F.L.; Smith, I.M.; Califano, J.A. Molecular genetics of premalignant oral lesions. *Oral Dis.* **2007**, *13*, 126–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Luiz, S.T.; Modolo, F.; Mozzer, I.; Dos Santos, E.C.; Nagashima, S.; Camargo Martins, A.P.; de Azevedo, M.L.V.; Azevedo Alanis, L.R.; Hardy, A.M.T.G.; de Moraes, R.S.; et al. Immunoexpression of SOX-2 in oral leukoplakia. *Oral Dis.* **2018**, *24*, 1449–1457. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Teodorczyk, M.; Kleber, S.; Wollny, D.; Seifried, J.P.; Aykut, B.; Mateos, A.; Herhaus, P.; Sancho-Martinez, I.; Hill, O.; et al. CD95 promotes metastatic spread via Sck in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Death Differ.* **2015**, *22*, 1192–1202. [[CrossRef](#)]
7. Hussenet, T.; Dali, S.; Exinger, J.; Monga, B.; Jost, B.; Dembelé, D.; Martinet, N.; Thibault, C.; Huelsken, J.; Brambilla, E.; et al. SOX2 is an oncogene activated by recurrent 3q26.3 amplifications in human lung squamous cell carcinomas. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e8960. [[CrossRef](#)]
8. Habu, N.; Imanishi, Y.; Kameyama, K.; Shimoda, M.; Tokumaru, Y.; Sakamoto, K.; Fujii, R.; Shigetomi, S.; Otsuka, K.; Sato, Y.; et al. Expression of Oct3/4 and Nanog in the head and neck squamous carcinoma cells and its clinical implications for delayed neck metastasis in stage I/II oral tongue squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* **2015**, *15*, 730. [[CrossRef](#)]
9. Albers, A.E.; Chen, C.; Köberle, B.; Qian, X.; Klussmann, J.P.; Wollenberg, B.; Kaufmann, A.M. Stem cells in squamous head and neck cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2012**, *81*, 224–240. [[CrossRef](#)]
10. Costea, D.E.; Tsinkalovsky, O.; Vintermyr, O.K.; Johannessen, A.C.; Mackenzie, I.C. Cancer stem cells—New and potentially important targets for the therapy of oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis.* **2006**, *12*, 443–454. [[CrossRef](#)]
11. Lee, H.J.; Kang, Y.H.; Lee, J.S.; Byun, J.H.; Kim, U.K.; Jang, S.J.; Rho, G.J.; Park, B.W. Positive expression of NANOG, mutant p53, and CD44 is directly associated with clinicopathological features and poor prognosis of oral squamous cell carcinoma. *BMC Oral Health* **2015**, *15*, 153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Tsai, L.L.; Yu, C.C.; Chang, Y.C.; Yu, C.H.; Chou, M.Y. Markedly increased Oct4 and Nanog expression correlates with cisplatin resistance in oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* **2011**, *40*, 621–628. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Chiou, S.H.; Yu, C.C.; Huang, C.Y.; Lin, S.C.; Liu, C.J.; Tsai, T.H.; Chou, S.H.; Chien, C.S.; Ku, H.H.; Lo, J.F. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 4085–4095. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Hwang, C.C.; Nieh, S.; Lai, C.H.; Tsai, C.S.; Chang, L.C.; Hua, C.C.; Chi, W.Y.; Chien, H.P.; Wang, C.W.; Chan, S.C.; et al. A retrospective review of the prognostic value of ALDH-1, Bmi-1 and Nanog stem cell markers in esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e105676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Vaz, M.A.; Martinez, J.C.; Devesa, J.M.; Trill, J.D.; Abaira, V.; Riquelme, A.; Carrato, A. Prognostic value of stem cell quantification in stage II colon cancer. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e88480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Rodrigo, J.P.; Villaronga, M.Á.; Menéndez, S.T.; Hermida-Prado, F.; Quer, M.; Vilaseca, I.; Allonca, E.; Pedregal Mallo, D.; Astudillo, A.; García-Pedrero, J.M. A Novel Role For Nanog As An Early Cancer Risk Marker In Patients With Laryngeal Precancerous Lesions. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 11110. [[CrossRef](#)]

17. Takata, T.; Slootweg, P.J. Tumors of the Oral Cavity and Mobile Tongue. In *WHO Classification of Head and Neck Tumours*, 4th ed.; El-Naggar, A.K., Chan, J.K.C., Grandis, J.R., Takata, T., Slootweg, P.J., Eds.; International Agency for Research on Cancer (IARC): Lyon, France, 2017; pp. 105–131.
18. Piazzolla, D.; Palla, A.R.; Pantoja, C.; Cañamero, M.; de Castro, I.P.; Ortega, S.; Gómez-López, G.; Dominguez, O.; Megías, D.; Roncador, G.; et al. Lineage-restricted function of the pluripotency factor NANOG in stratified epithelia. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4226. [[CrossRef](#)]
19. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* **2015**, *517*, 576–582. [[CrossRef](#)]
20. Cerami, E.; Gao, J.; Dogrusoz, U.; Gross, B.E.; Sumer, S.O.; Aksoy, B.A.; Jacobsen, A.; Byrne, C.J.; Heuer, M.L.; Larsson, E.; et al. The cBio cancer genomics portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* **2012**, *2*, 401–404. [[CrossRef](#)]
21. Chandrashekar, D.S.; Bashel, B.; Balasubramanya, S.A.H.; Creighton, C.J.; Rodriguez, I.P.; Chakravarthi, B.V.S.K.; Varambally, S. UALCAN: A portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses. *Neoplasia* **2017**, *19*, 649–658. [[CrossRef](#)]
22. Abbey, L.M.; Kaugars, G.E.; Gunsolley, J.C.; Burns, J.C.; Page, D.G.; Svirsky, J.A.; Eisenberg, E.; Krutchkoff, D.J.; Cushing, M. Intraexaminer and interexaminer reliability in the diagnosis of oral epithelial dysplasia. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **1995**, *80*, 188–191. [[CrossRef](#)]
23. Lauritano, D.; Lucchese, A.; Contaldo, M.; Serpico, R.; Lo Muzio, L.; Biolcati, F.; Carinci, F. Oral squamous cell carcinoma: Diagnostic markers and prognostic indicators. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **2016**, *30*, 169–176. [[PubMed](#)]
24. de Vicente, J.C.; Rodrigo, J.P.; Rodriguez-Santamarta, T.; Lequerica-Fernández, P.; Allonca, E.; García-Pedrero, J.M. Cortactin and focal adhesion kinase as predictors of cancer risk in patients with premalignant oral epithelial lesions. *Oral Oncol.* **2012**, *48*, 641–646. [[CrossRef](#)]
25. de Vicente, J.C.; Rodrigo, J.P.; Rodriguez-Santamarta, T.; Lequerica-Fernández, P.; Allonca, E.; García-Pedrero, J.M. Podoplanin expression in oral leukoplakia: Tumorigenic role. *Oral Oncol.* **2013**, *49*, 598–603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Stransky, N.; Egloff, A.M.; Tward, A.D.; Kostic, A.D.; Cibulskis, K.; Sivachenko, A.; Kryukov, G.V.; Lawrence, M.S.; Sougnez, C.; McKenna, A.; et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* **2011**, *333*, 1157–1160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Hedberg, M.L.; Goh, G.; Chiosea, S.I.; Bauman, J.E.; Freilino, M.L.; Zeng, Y.; Wang, L.; Diergaarde, B.B.; Gooding, W.E.; Lui, V.W.; et al. Genetic landscape of metastatic and recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 1606. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Álvarez-Teijeiro, S.; García-Inclán, C.; Villaronga, M.Á.; Casado, P.; Hermida-Prado, F.; Granda-Díaz, R.; Rodrigo, J.P.; Calvo, F.; Del-Río-Ibáñez, N.; Gandarillas, A.; et al. Factors Secreted by Cancer-Associated Fibroblasts that Sustain Cancer Stem Properties in Head and Neck Squamous Carcinoma Cells as Potential Therapeutic Targets. *Cancers* **2018**, *10*, 334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Prasetyanti, P.R.; Medema, J.P. Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective. *Mol. Cancer* **2017**, *16*, 41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Biddle, A.; Gammon, L.; Liang, X.; Costea, D.E.; Mackenzie, I.C. Phenotypic Plasticity Determines Cancer Stem Cell Therapeutic Resistance in Oral Squamous Cell Carcinoma. *EBioMedicine* **2016**, *4*, 138–145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Al-Hajj, M.; Clarke, M.F. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* **2004**, *23*, 7274–7282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Atsumi, N.; Ishii, G.; Kojima, M.; Sanada, M.; Fujii, S.; Ochiai, A. Podoplanin, a novel marker of tumor-initiating cells in human squamous cell carcinoma A431. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *373*, 36–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Kawaguchi, H.; El-Naggar, A.K.; Papadimitrakopoulou, V.; Ren, H.; Fan, Y.H.; Feng, L.; Lee, J.J.; Kim, E.; Hong, W.K.; Lippman, S.M.; et al. Podoplanin: A novel marker for oral cancer risk in patients with oral premalignancy. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 354–360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Rodrigo, J.P.; García-Carracedo, D.; González, M.V.; Mancebo, G.; Fresno, M.F.; García-Pedrero, J. Podoplanin expression in the development and progression of laryngeal squamous cell carcinomas. *Mol. Cancer* **2010**, *9*, 48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]







35. Chambers, I.; Colby, D.; Robertson, M.; Nichols, J.; Lee, S.; Tweedie, S.; Smith, A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **2003**, *113*, 643–655. [[CrossRef](#)]
36. Mitsui, K.; Tokuzawa, Y.; Itoh, H.; Segawa, K.; Murakami, M.; Takahashi, K.; Maruyama, M.; Maeda, M.; Yamanaka, S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* **2003**, *113*, 631–642. [[CrossRef](#)]
37. Navarro, P.; Festuccia, N.; Colby, D.; Gagliardi, A.; Mullin, N.P.; Zhang, W.; Karwacki-Neisius, V.; Osorno, R.; Kelly, D.; Robertson, M.; et al. OCT4/SOX2-independent Nanog autorepression modulates heterogeneous Nanog gene expression in mouse ES cells. *EMBO J.* **2012**, *31*, 4547–4562. [[CrossRef](#)]
38. Silva, J.; Nichols, J.; Theunissen, T.W.; Guo, G.; van Oosten, A.L.; Barrandon, O.; Wray, J.; Yamanaka, S.; Chambers, I.; Smith, A. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* **2009**, *138*, 722–737. [[CrossRef](#)]
39. Rasti, A.; Mehrazma, M.; Madjd, Z.; Abolhasani, M.; Saeednejad Zanjani, L.; Asgari, M.L. Co-expression of cancer stem cell markers OCT4 and NANOG predicts poor prognosis in renal cell carcinomas. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 11739. [[CrossRef](#)]
40. Wang, M.L.; Chiou, S.H.; Wu, C.W. Targeting cancer stem cells: Emerging role of Nanog transcription factor. *Onco Targets Ther.* **2013**, *6*, 1207–1220. [[CrossRef](#)]
41. Okita, K.; Ichisaka, T.; Yamanaka, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **2007**, *448*, 313–317. [[CrossRef](#)]
42. Yu, J.; Vodyanik, M.A.; Smuga-Otto, K.; Antosiewicz-Bourget, J.; Frane, J.L.; Tian, S.; Nie, J.; Jonsdottir, G.A.; Ruotti, V.; Stewart, R.; et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **2007**, *318*, 1917–1920. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Abelev, G.I.; Lazarevich, N.L. Control of differentiation in progression of epithelial tumors. *Adv. Cancer Res.* **2006**, *95*, 61–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Dowell, K.G.; Simons, A.K.; Bai, H.; Kell, B.; Wang, Z.Z.; Yun, K.; Hibbs, M.A. Novel insights into embryonic stem cell self-renewal revealed through comparative human and mouse systems biology networks. *Stem Cells* **2014**, *32*, 1161–1172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Ravindran, G.; Sawant, S.S.; Hague, A.; Kingsley, K.; Devaraj, H. Association of differential β -catenin expression with Oct-4 and Nanog in oral squamous cell carcinoma and their correlation with clinicopathological factors and prognosis. *Head Neck* **2015**, *37*, 982–993. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Watanabe, M.; Ohnishi, Y.; Inoue, H.; Wato, M.; Tanaka, A.; Kakudo, K.; Nozaki, M. NANOG expression correlates with differentiation, metastasis and resistance to preoperative adjuvant therapy in oral squamous cell carcinoma. *Oncol. Lett.* **2014**, *7*, 35–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Wang, S.; Fan, H.; Xu, J.; Zhao, E. Prognostic implication of NOTCH1 in early stage oral squamous cell cancer with occult metastases. *Clin. Oral Investig.* **2018**, *22*, 1131–1138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Yu, M.A.; Kiang, A.; Wang-Rodriguez, J.; Rahimy, E.; Haas, M.; Yu, V.; Ellies, L.G.; Chen, J.; Fan, J.B.; Brumund, K.T.; et al. Nicotine promotes acquisition of stem cell and epithelial-to-mesenchymal properties in head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e51967. [[CrossRef](#)]
49. Gu, T.T.; Liu, S.Y.; Zheng, P.S. Cytoplasmic NANOG-positive stromal cells promote human cervical cancer progression. *Am. J. Pathol.* **2012**, *181*, 652–661. [[CrossRef](#)]
50. Luo, W.; Li, S.; Peng, B.; Ye, Y.; Deng, X.; Yao, K. Embryonic stem cells markers SOX2, OCT4 and Nanog expression and their correlations with epithelial-mesenchymal transition in nasopharyngeal carcinoma. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e56324. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article

SOX2 Expression Is an Independent Predictor of Oral Cancer Progression

Juan C. de Vicente ^{1,2,3,*} , Paula Donate-Pérez del Molino ^{1,2}, Juan P. Rodrigo ^{2,3,4,5} ,
Eva Allonca ^{3,5} , Francisco Hermida-Prado ^{3,5} , Rocío Granda-Díaz ^{3,5},
Tania Rodríguez Santamarta ^{1,2,3}  and Juana M. García-Pedrero ^{3,4,5,*} 

- ¹ Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). C/Carretera de Rubín, s/n, 33011 Oviedo, Asturias, Spain; pauladonatepdm@gmail.com (P.D.-P.d.M.); tanciasantamarta@gmail.com (T.R.S.)
 - ² Department of Surgery, University of Oviedo. Avda. Julián Clavería, s/n, 33006 Oviedo, Asturias, Spain; jprodrigot@telefonica.net
 - ³ Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), Universidad de Oviedo. C/Carretera de Rubín, s/n, 33011 Oviedo, Asturias, Spain; ynk1@hotmail.com (E.A.); franjhermida@gmail.com (F.H.-P.); rocig281@gmail.com (R.G.-D.)
 - ⁴ Department of Otolaryngology, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). C/Carretera de Rubín, s/n, 33011 Oviedo, Asturias, Spain
 - ⁵ Ciber de Cáncer (CIBERONC), Instituto de Salud Carlos III, Av. Monforte de Lemos, 3-5. 28029 Madrid, Spain
- * Correspondence: jvicente@uniovi.es (J.C.d.V.); juanagp.finba@gmail.com (J.M.G.-P.); Tel.: +34-85-103638 (J.C.d.V.); +34-985-107937 (J.M.G.-P.)

Received: 4 September 2019; Accepted: 16 October 2019; Published: 21 October 2019



Abstract: Potentially malignant oral lesions, mainly leukoplakia, are common. Malignant transformation varies widely, even in the absence of histological features such as dysplasia. Hence, there is a need for novel biomarker-based systems to more accurately predict the risk of cancer progression. The pluripotency transcription factor SOX2 is frequently overexpressed in cancers, including oral squamous cell carcinoma (OSCC), thereby providing a link between malignancy and stemness. This study investigates the clinical relevance of SOX2 protein expression in early stages of oral carcinogenesis as a cancer risk biomarker, and also its impact on prognosis and disease outcome at late stages of OSCC progression. SOX2 expression was evaluated by immunohistochemistry in 55 patients with oral epithelial dysplasia, and in 125 patients with OSCC, and correlated with clinicopathological data and outcomes. Nuclear SOX2 expression was detected in four (7%) cases of oral epithelial dysplasia, using a cut-off of 10% stained nuclei, and in 16 (29%) cases when any positive nuclei was evaluated. Univariate analysis showed that SOX2 expression and histopathological grading were significantly associated with oral cancer risk; and both were found to be significant independent predictors in the multivariate analysis. Nuclear SOX2 expression was also found in 49 (39%) OSCC cases, was more frequent in early tumor stages and N0 cases, and was associated with a better survival. In conclusion, SOX2 expression emerges as an independent predictor of oral cancer risk in patients with oral leukoplakia. These findings underscore the relevant role of SOX2 in early oral tumorigenesis rather than in tumor progression.

Keywords: oral cancer risk; oral epithelial dysplasia; SOX2; immunohistochemistry; oral squamous cell carcinoma

1. Introduction

Squamous cell carcinoma (SCC) of the oral cavity (OSCC) afflicts about 300,400 new cases and causes 145,400 deaths worldwide each year [1], with a predilection for South Asian and Southeast Asian populations [2]. According to the World Health Organization (WHO) mortality projections, there is an estimate of 679,941 mouth and oropharynx cancer-related deaths by 2060 [3]. OSCC shows an aggressive growth pattern with a high degree of local invasiveness and a propensity to metastasize to the cervical lymph nodes, even in early stages. In fact, metastases to neck lymph nodes occur in 40% of cases, which remain the main factor associated with poor prognosis [4]. Additionally, between 26% and 80% of patients with early-stage OSCC develop locoregional recurrence or distant metastasis [4]. Despite aggressive treatment, the prognosis of this disease remains dismal, with a five-year survival rate at around 55%–60% [2].

OSCC may develop from an apparently normal oral mucosa or from oral potentially malignant disorders (OPMDs), mainly oral leukoplakia (OLK), which shows a malignant transformation rate of 0.1% to 36% [5]. All premalignant lesions, such as OLK, erythroplakia, submucosal fibrosis, or oral lichen planus, may harbor many genetic alterations present in OSCC [6].

Oral cancer exhibits cellular heterogeneity and is composed by three different types of cells including highly differentiated bulk tumor cells, transit cells with maximum proliferation capacity, and a small subpopulation of cells with elevated self-renewal capacity and plasticity called cancer stem cells (CSCs) [7]. The CSCs are capable of long-term self-renewal and generation of the phenotypically diverse tumor cell population [8], and may be responsible for the genesis, anchorage-independent growth, cellular migration, and metastatic spread of the tumor [9,10]. Meantime, investigations by Takahashi and Yamanaka [11] revealed that the expression of four transcription factors (SOX2, Oct4, c-Myc, and Klf4) was sufficient to reprogram differentiated cells into induced pluripotent stem cells (iPSCs). One of these genes, the so-called sex-determining region Y (SRY)-related high-mobility-group (HMG)-box 2 (SOX2), located on chromosome 3q26, is implicated in the maintenance of embryonic stem cell pluripotency [12]. Numerous evidences indicate that SOX2 is involved in tumorigenesis, thereby acting as a link between malignancy and stemness [13]. Moreover, the proliferation of CSCs in head and neck SCC was inhibited both *in vitro* and *in vivo* when SOX2 was suppressed by all-trans-retinoic acid [14]. The degree of similarity to OSCC found in premalignant lesions depend upon the presence of atypia; however, individual lesions exhibit molecular genetic traits in common with OSCC, even in the absence of histologically-defined dysplasia [15]. Hence, better biomarker-based detection systems need to be developed to more accurately predict the risk of cancer progression in potentially malignant oral disorders.

It has been described that OLK lesions show higher expression of SOX2 than normal oral mucosa, suggesting its contribution to the pathogenesis of OSCC [16]. Consequently, SOX2 could be a potentially useful predictor of cancer risk in the oral cavity. SOX2 is mainly expressed in CSCs [13], and is one of the amplified genes in OSCC, where its expression has been closely associated with lymph node metastasis [17] and poor prognosis [18]. In marked contrast, several studies have demonstrated that increased levels of SOX2 were significantly associated with better prognosis in patients with OSCC, and also in squamous cell lung cancer [19,20]. Therefore, the role of SOX2 expression in OSCC prognosis remains controversial.

This prompted us to perform a thorough study to investigate the clinical significance of SOX2 in the development and progression of OSCC. To accomplish this, the expression pattern of SOX2 was evaluated at different stages of oral tumorigenesis, from potentially malignant oral disorders (i.e., oral epithelial dysplastic lesions) to invasive carcinomas, to ascertain its contribution to tumor initiation and malignant transformation, and also late stages of disease progression.

2. Materials and Methods

2.1. Patients and Tissue Specimens

Surgical tissue specimens from 55 patients who were diagnosed with oral mucosa dysplasia at the Hospital Universitario Central de Asturias between 2000 and 2005 were retrospectively collected. All selected patients met the following inclusion criteria: (i) pathological diagnosis of oral epithelial dysplasia; (ii) lesions of the oral mucosa (leukoplakia); (iii) no previous history of head and neck cancer; (iv) complete excisional biopsy of the lesion; and (v) a minimum follow-up of five years (or until progression). Patients were followed up as previously described [21].

In addition, surgical tissue specimens from 125 patients with histologically-confirmed OSCC surgically treated at the Hospital Universitario Central de Asturias between 1996 and 2007 were retrospectively collected, in accordance to approved institutional review board guidelines. All experimental procedures were conducted in accordance to the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Ethics Committee of the Hospital Universitario Central de Asturias and by the Regional (CEIC) from Principado de Asturias (date of approval 5th of May 2016; approval number: 70/16) for the project PI16/00280. Informed consent was obtained from all patients.

Tissue samples and data from donors were provided by the Principado de Asturias BioBank (PT17/0015/0023), integrated in the Spanish National Biobanks Network, and processed following standard operating procedures with the appropriate approval of the Ethical and Scientific Committees. Representative tissue samples were obtained from archival, formalin-fixed, paraffin-embedded blocks and the histological diagnosis was confirmed by an experienced pathologist.

2.2. Tissue Microarray (TMA) Construction

As previously described [21], three representative tissue cores (1 mm diameter) were taken from each tumor block to construct OSCC TMAs. Each TMA block also included three cores of normal epithelium as an internal control. These samples were obtained from non-oncological patients undergoing oral surgery.

2.3. Immunohistochemistry (IHC)

The TMAs were cut into 3 μm sections and dried on Flex IHC microscope slides (DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Antigen retrieval was performed by heating the sections with Envision Flex Target Retrieval solution, high pH (Dako, Glostrup, Denmark). Staining was done at room temperature on an automatic staining workstation (Dako Autostainer Plus, Glostrup, Denmark) with anti-SOX2 rabbit polyclonal antibody (AB5603, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) at 1:1000 dilution using the Dako EnVision Flex + Visualization System (Dako Autostainer, Glostrup, Denmark) and diaminobenzidine chromogen as substrate. Counterstaining with hematoxylin was the final step.

The IHC results were independently evaluated by two observers (JPR, and JMG-P), blinded to clinical data. SOX2 staining was evaluated as the percentage of cells with nuclear staining in the dysplastic epithelium or in the tumor tissue. SOX2 staining scores were classified as negative or positive staining on the basis of values below or above the median value of 10%. Since CSC-like subpopulations are usually limited to a very small percentage of cells, SOX2 staining in the dysplastic areas was also scored considering any positive nuclei.

2.4. Statistical Analysis

Bivariate analysis by χ^2 and Fisher's exact tests were used for comparison between SOX2 expression and clinicopathological categorical variables. Disease-specific survival (DSS) was determined from the date of treatment completion to the death of the tumor. For time-to-event analysis, survival curves were estimated using the Kaplan–Meier method. The log-rank test was used to compare the survival curves. Hazard ratios (HRs) with their 95% confidence intervals (CIs) for clinicopathological variables were calculated using univariate and multivariate Cox proportional hazards model. All tests were

two-sided and *P*-values less than 0.05 were considered statistically significant. All statistical analyses were performed using SPSS version 18 (IBM Co., Armonk, NY, USA).

3. Results

3.1. Clinicopathological Features and Follow-Up in Patients with Oral Epithelial Dysplasia

Twenty-six patients (47%) were men and the remaining 29 were women (53%), with a mean age of 62.61 years (SD 12.56, range 39 to 83 years). Ten patients (18%) were smokers and four (7%) were habitual alcohol drinkers. Forty-two of 55 premalignant lesions (76%) were classified as mild dysplasia, six (11%) as moderate dysplasia, and the remaining seven (13%) as severe dysplasia, according to the WHO classification [22]. During the follow-up period (mean: 85.47, SD: 44.41, median: 75, range: four to 252 months), 12 (22%) of 55 patients developed an invasive OSCC. The most relevant clinical and pathological characteristics are summarized in Table S1.

3.2. SOX2 Protein Expression in Oral Epithelial Dysplasia

Nuclear SOX2 expression was detected in four (7%) cases when a cut-off of 10% stained nuclei was used (SOX2 > 10), and in 16 (29%) when any positive nuclei was applied (SOX2any). Normal adjacent epithelia showed negative SOX2 expression (Figure 1A–C). SOX2 protein expression was found to significantly increase with the grade of dysplasia (Table 1). In addition to the WHO three-tier classification, the binary WHO grading system (low-grade vs. high-grade) was used and correlated with SOX2 expression.

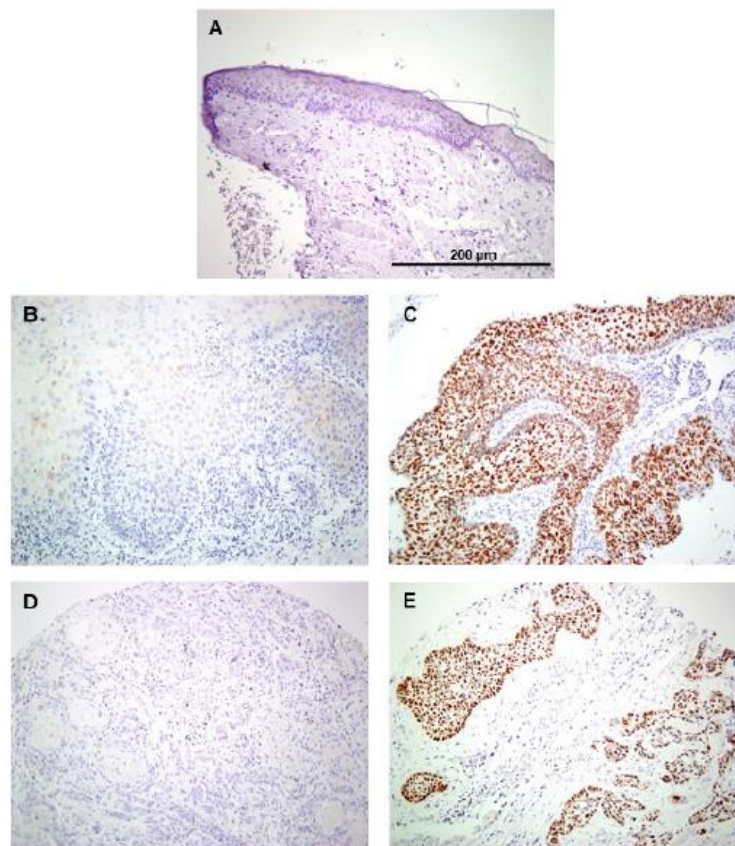


Figure 1. Immunohistochemical analysis of SOX2 expression in oral epithelial dysplasia. Normal adjacent epithelia showed negative staining (A). Representative examples of oral dysplasia showing negative (B) and positive nuclear SOX2 staining (C), and oral squamous cell carcinomas with negative (D) and positive SOX2 staining (E). Magnification 20 ×; scale bar 200 μm.

Table 1. Associations between SOX2 expression and patient characteristics.

Characteristics	SOX2 > 10% Positive Nuclei		P	SOX2 any Positive Nuclei		P
	Negative	Positive		Negative	Positive	
Age (years), Mean (SD)	62.93 (12.69)	60.50 (13.20)	0.72	61.00 (12.69)	65.55 (12.35)	0.34
Gender, number (%)						
• Female	27 (93)	2 (7)	1.00	22 (76)	7 (24)	0.39
• Male	24 (92)	2 (8)		17 (65)	9 (35)	
Smoking, number (%)						
• Yes	9 (90)	1 (10)	1.00	6 (60)	4 (40)	0.71
• No	18 (86)	3 (14)		14 (67)	7 (33)	
Ethanol intake, number (%)						
• Yes	3 (75)	1 (25)	0.44	2 (50)	2 (50)	0.60
• No	24 (89)	3 (11)		18 (67)	9 (33)	
Epithelial dysplasia						
• Mild	42 (100)	0 (0)	0.001	33 (79)	9 (21)	0.055
• Moderate	5 (83)	1 (17)		3 (50)	3 (50)	
• Severe	4 (57)	3 (43)		3 (43)	4 (57)	
Epithelial dysplasia						
• Low-grade	42 (100)	0 (0)	0.002	33 (79)	9 (21)	0.02
• High-grade	9 (69)	4 (31)		6 (46)	7 (54)	

There was a statistically significant correlation between the histopathological grade (both the WHO histological classification and the binary dysplasia grading) and the risk of progression to oral cancer in this cohort (log-rank test, $P < 0.001$; Figure 2A,B) (Table 2). In addition, positive SOX2 expression also significantly predicted oral cancer risk either considering SOX2 > 10 (log-rank test, $P = 0.02$; Figure 2C) or SOX2any (log-rank test, $P = 0.01$; Figure 2D) as cut-off points. Univariate Kaplan–Meier and Cox analysis showed that the SOX2 expression and histological grading were significantly associated with oral cancer risk (Table 3). When these factors were simultaneously analyzed using a multivariate Cox analysis, only SOX2 expression calculated using SOX2any as the cut-off point and the dysplasia grading were significant independent predictors of OSCC development (Table 4).

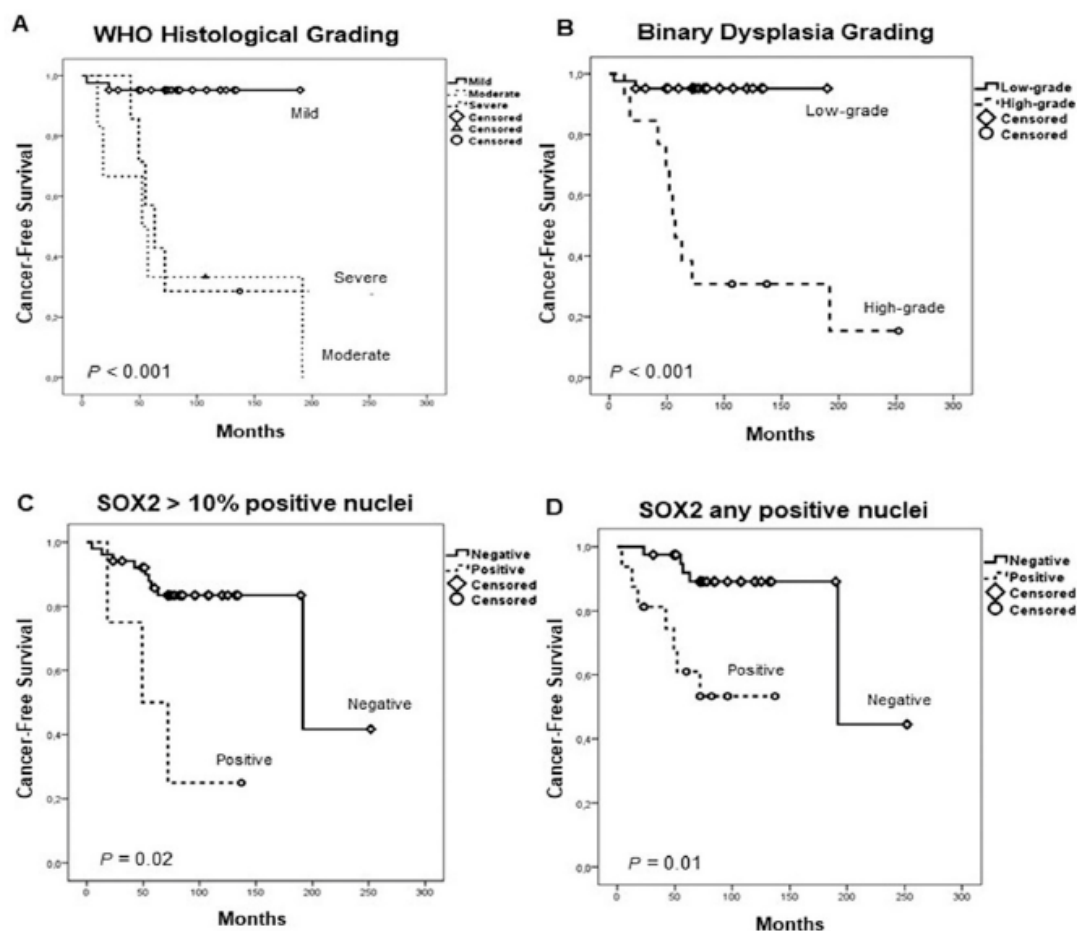


Figure 2. Kaplan–Meier cancer-free survival curves in the cohort of 55 patients with oral epithelial dysplasia categorized by the World Health Organization (WHO) histological grading (A), the binary dysplasia grading (B), and SOX2 protein expression dichotomized using the cut-off values of SOX2 staining > 10% positive nuclei (C) or SOX2 staining any positive nuclei (D).

Table 2. Evolution of the premalignant lesions in relation to histopathological diagnosis and SOX2 expression.

Variable	Number of Cases (%)	Progression to Carcinoma (%)	P*
Histopathological diagnosis			
• Low-grade dysplasia	42 (76)	2 (5)	<0.001
• High-grade dysplasia	13 (24)	10 (77)	
SOX2 > 10% positive nuclei			
• Negative	51 (93)	9 (18)	0.02
• Positive	4 (7)	3 (75)	
SOX2 any positive nuclei			
• Negative	39 (71)	5 (13)	0.01
• Positive	16 (29)	7 (44)	

* Fisher exact test.

Table 3. Cont.

Variable	No.	Censored Patients (%)	Mean Cancer-Free Survival Time (95% CI)	P	Hazard Ratio	95% CI
Epithelial Dysplasia						
• High-grade	13	3 (23)	100.69 (54.14–147.24)	< 0.001	19.08	4.09–89.01
• Low-grade	42	40 (95)	181.59 (170.21–192.98)			
SOX2 > 10% positive nuclei						
• Positive	4	1 (25)	69.00 (26.18–111.81)	0.002	6.13	1.62–23.27
• Negative	51	42 (82)	191.80 (152.14–231.47)			
SOX2 any positive nuclei						
• Positive	16	9 (56)	90.40 (64.14–116.66)	0.002	5.75	1.68–19.74
• Negative	39	34 (87)	203.22 (162.30–244.15)			

P-values were estimated using the log-rank test.

Table 4. Multivariate Cox proportional hazards model to estimate oral cancer risk.

Variable	P	Hazard Ratio	95% CI
Histology (high-grade vs. low-grade)	< 0.0001	21.88	4.13–116.07
SOX2 > 10% (positive vs. negative)	0.196	3.0	0.57–15.89
SOX2 any (positive vs. negative)	0.021	5.83	1.31–26.01

Similarly, we have recently reported a novel role for another pluripotency factor NANOG as a cancer risk marker using the same subset of 55 patients with oral epithelial dysplasia [21]. Since SOX2 and NANOG are functionally-related proteins, this prompted us to assess the impact of combined expression of SOX2 and NANOG in regards to malignization risk. Interestingly, results consistently showed that patients harboring positive expression of SOX2 (either SOX2 > 10% or SOX2any) and NANOG (either cytoplasmic or nuclear expression) significantly exhibited a much higher risk of developing oral cancer, compared to patients with positive expression of either SOX2 or NANOG or those patients with negative expression (Table 5).

Table 5. Univariate Cox cancer-free survival analysis in 55 patients with oral dysplasia categorized by both SOX2 and NANOG expression.

Variable	No.	Censored Patients (%)	Cancer-Free Survival Time (95% CI)	P	Hazard Ratio	95% CI
SOX2 > 10% positive nuclei and nuclear NANOG						
• Both negative	51	42 (84)	191.80 (152.13–231.46)	0.003	Ref	
• One positive	2	1 (50)	93.00 (32.01–153.98)		3.72	0.46–29.98
• Both positive	2	0 (0)	45.00 (8.00–97.92)		9.06	1.91–43.00
SOX2 > 10% positive nuclei and cytoplasmic NANOG						
• Both negative	45	38 (84)	171.10 (154.24–187.95)	< 0.0005	Ref	
• One positive	7	5 (71)	182.28 (101.53–263.03)		1.63	0.30–8.71
• Both positive	3	0 (0)	46.33 (15.66–76.99)		10.89	2.74–43.22

Table 5. Cont.

Variable	No.	Censored Patients (%)	Cancer-Free Survival Time (95% CI)	P	Hazard Ratio	95% CI
SOX2 any positive nuclei and cytoplasmic NANOG						
• Both negative	36	31 (86)	175.49 (158.40–192.57)	< 0.0005	Ref	
• One positive	13	11 (85)	215.99 (170.17–261.81)		1.091	0.20–5.85
• Both positive	6	1 (17)	44.50 (21.60–67.40)		11.36	3.18–40.60
SOX2 any positive nuclei and nuclear NANOG						
• Both negative	39	34 (87)	203.22 (162.30–244.15)	< 0.0005	Ref	
• One positive	14	9 (64)	97.76 (69.96–125.55)		4.62	1.23–17.29
• Both positive	2	0 (0)	45.00 (8.00–97.92)		14.82	2.69–81.56

3.3. Clinicopathological Features and Follow-Up in the Cohort of OSCC Patients

The mean and median follow-up times were 71.82 (SD: 57.55) and 61.0, respectively. Neck node metastases were present in 49 (39%) cases, and local recurrences were found in 54 (43%) cases. No patient had distant metastasis at the time of diagnosis. The five- and 10-year disease-specific survival rates were 60% and 44%, respectively. The mean and median survival times were 132.74 months (95% CI: 113.25 to 152.22 months) and 141 months (95% CI: 102.40 to 179.59 months), respectively. The remaining relevant clinical and pathological characteristics are summarized in Table S2.

3.4. SOX2 Protein Expression and Its Relation with Clinicopathological Variables and Follow-Up

Positive SOX2 staining was found in 49 (39%) cases located in the nucleus of tumor cells, whereas stromal cells and normal epithelium showed negligible expression (Figure 1A,D,E). SOX2 expression did not show any significant association with the clinicopathological variables studied (Table S3). In the survival analysis, tumor size and local extension (pT), neck node status (pN), and stage were significantly correlated to survival (Table S4). Positive SOX2 expression was associated with a longer disease-specific survival, although differences did not reach statistical significance (log-rank test, $P = 0.07$; Figure 3).

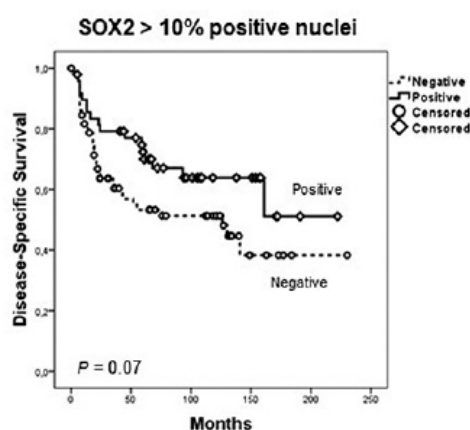


Figure 3. Kaplan–Meier disease-specific survival curves in the cohort of 125 patients with oral squamous cell carcinoma dichotomized according to SOX2 staining (positive versus negative). P-values were estimated using the log-rank test.

3.5. In Silico Analysis of SOX2 mRNA Expression and Copy Number Alterations using the Cancer Genome Atlas (TCGA) Data

The role of SOX2 mRNA expression and copy number alterations in OSCC was investigated by analyzing a subset of 172 OSCC patients from the TCGA Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

(HNSCC) cohort [23] using the platform cBioPortal (<http://cbioportal.org/>) [24]. As shown in Figure 4A, SOX2 gene alterations were present in a total of 38 (22%) of 172 OSCC patients. Twenty-two (13%) cases harbored SOX2 mRNA up-regulation as previously reported [21], and 23 (13%) cases harbored SOX2 gene amplification. SOX2 mRNA levels were associated to copy number alterations (Figure 4B). Overall, SOX2-amplified tumors showed higher mRNA levels; however, SOX2 amplification was only concomitantly accompanied by gene expression up-regulation in eight cases (5%). The impact of SOX2 mRNA expression on OSCC patient survival was also assessed (Figure 4C). The median survival times for patients with high (above the median) and low SOX2 mRNA levels (below the median) were 26.41 and 19.19 months, respectively, although differences did not reach statistical significance ($P = 0.495$, log-rank test).

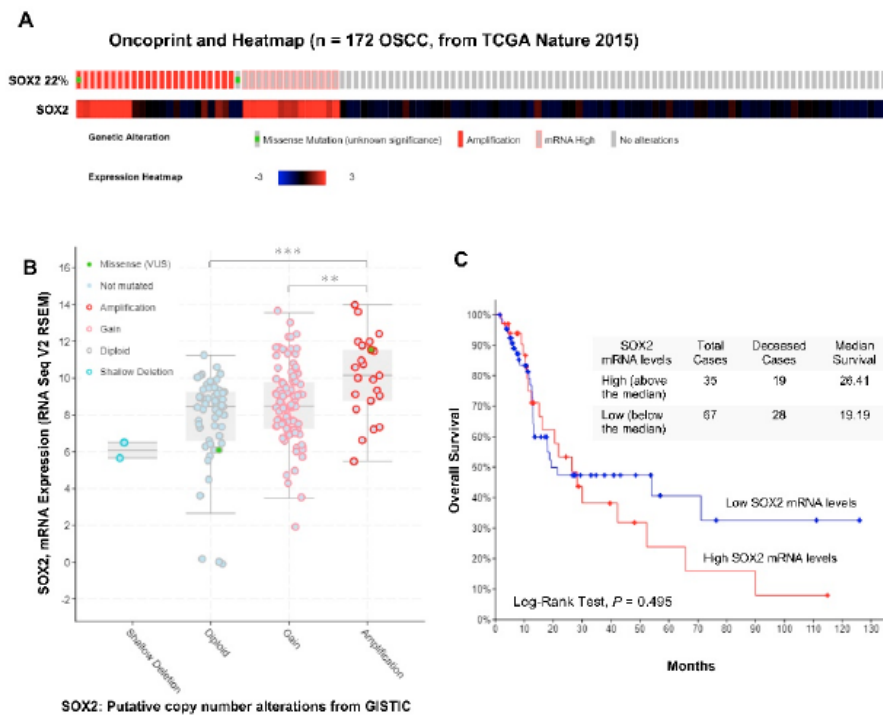


Figure 4. In silico analysis of mRNA expression and copy number alterations of SOX2 in the subset of 172 oral squamous cell carcinoma patients from The Cancer Genome Atlas (TCGA) Head and Neck Squamous Cell Carcinoma cohort [23] using the platform cBioPortal. (A) Oncoprint and heatmap representations showing the percentage of cases with SOX2 gene amplification, mutation, and mRNA up-regulation. (B) SOX2 mRNA expression analysis in relation to the copy number alterations of SOX2 gene (RNA seq V2 RSEM) values were Log2 transformed (y -axis). Whiskers plot (min. to max.) with median values; $** P < 0.01$ and $*** P < 0.001$, one-way ANOVA, Tukey’s test. (C) Kaplan–Meier survival curves categorized by SOX2 mRNA expression (RNA seq V2 RSEM, z -score threshold ± 2) dichotomized as high mRNA levels (above the median) versus low mRNA levels (below the median), P -value estimated using the log-rank test.

4. Discussion

To the best of our knowledge this is the first study to investigate SOX2 protein expression along the different stages of oral carcinogenesis, from potentially malignant oral disorders, such as leukoplakia, to invasive carcinomas, to ascertain its contribution to tumor initiation and malignant transformation, and also late stages of disease progression.

Cancer stem cells (CSCs) are defined as a small subpopulation of cells in the tumors that possess the ability to initiate neoplasms and sustain tumor self-renewal [7]. SOX2 gene mapping at 3q26 is frequently amplified in OSCC and other cancers. It has been established as an important CSC marker and a key molecule in the development of tumorigenesis in various cancers [13] and

thus proposed as an oncogene [25,26]. Arnold et al. [27] reported that epithelial adult stem cells expressing SOX2 may be residual stem niches that originate from embryonic SOX2-positive tissue progenitors. Cai et al. [28] investigated the roles of OCT4 and SOX2 in the reprogramming of oral cancer stem cells. They immortalized oral epithelial cells by lentiviral transduction and found that double-transduced OCT4⁺SOX2⁺ cells were able to trigger tumor formation in immunodeficient mice; however, single-transduced OCT4⁺ or SOX2⁺ cells did not show tumorigenic capacity. They also stated that oral carcinogenesis may derive from OCT4⁺SOX2⁺ reprogrammed stem cells, in which SOX2 plays a major role in the regulation of the CSC niche [28]. Accordingly, it has been proposed that, in the absence of SOX2 expression, CSC self-renewal that sustains tumor growth could be abrogated; therefore, supporting SOX2 inhibition as a potentially relevant therapeutic target for oral cancer [28].

OLK is the most frequent potentially malignant disorder in the oral cavity. Histologic grading of epithelial dysplasia in OLK is currently still the gold standard in the clinical practice to evaluate the risk of progression to invasive carcinoma [16]. However, the accuracy of the various grading systems so far developed have shown limited predictability, are largely subjective, and affected by a great inter- and intra-examiner variability [29]. According to the WHO 2017 classification there is not a unique criteria or grading system for oral epithelial dysplasia, and as a consequence diagnostic reproducibility is still limited. In addition to the currently accepted WHO three-tier classification for oral epithelial dysplasia, a binary grading system (low-grade vs. high-grade) has also been proposed [22]. However, this binary system has not yet been validated for use in the oral cavity. It is; therefore, of paramount importance to identify novel biomarkers that could provide complementary information to histology to more accurately predict the risk of malignant transformation of OLK. SOX2 has been demonstrated to play a central role in the maintenance of CSC pluripotency and self-renewal [27], thereby emerging as a promising marker for oral carcinogenesis. Luiz et al. [16] conducted a retrospective study to compare the expression of SOX2 in OLK with normal oral mucosa, and found that SOX2 expression was higher in OLK, although the relationship with oral cancer risk was not evaluated.

The presence of dysplastic features in the epithelium of the oral cavity are thought to be relevant to malignant transformation in OLK. In our study, patients harboring high-grade dysplasia indeed showed a significantly higher risk of malignant progression (HR = 19.08). SOX2 expression was also found to be a significant predictor of risk of cancer development (HRs of 6.13 and 5.75 depending on the cut-off used). Furthermore, dysplasia grading and SOX2 expression were both found to be significant independent predictors of oral cancer risk in multivariate analysis. Similarly, we recently demonstrated that NANOG expression was a novel cancer risk marker using the same subset of patients with oral epithelial dysplasia [21]. Importantly, this study further extends these data to show that patients harboring positive expression of both SOX2 and NANOG significantly exhibited a much higher risk of progression to oral cancer, thereby suggesting a cooperative oncogenic role of these two proteins in oral pathogenesis and malignant transformation.

SOX2 expression has also been analyzed during tumor progression. Freier et al. [30] reported SOX2 expression in 18% of OSCC, and other studies on SCC of larynx, pharynx, and oral cavity found frequencies up to 86% [22,31–33]. In our cohort of 125 OSCC cases, positive SOX2 expression was detected in 39% of cases, while the frequencies of SOX2 expression reported in a previous study, performed at our laboratory for other head and neck subsites, were 38% in hypopharynx, 42% in larynx, and 14% in sinonasal cancer. In consequence, SOX2 expression frequencies in the oral cavity were similar to those observed in neighboring tissues such as hypopharynx and larynx, but much higher than in the sinonasal tract. In silico analysis of RNAseq data in a subset of 172 OSCC patients from the TCGA HNSCC cohort [23] further contributed to demonstrate that SOX2 mRNA levels were up-regulated in 13% of OSCC patients. In addition, SOX2 gene amplification was also observed in 13% of cases; however, only 5% of cases harboring SOX2 amplification were concomitantly accompanied by increased gene expression, indicating that additional mechanisms must be contributing to SOX2 expression in OSCC. In this sense, there are various plausible transcriptional regulatory mechanisms, such as the transcription factors OCT4 and YAP1 or the hypoxic factor HIF1 α , found to modulate SOX2

expression [34,35]. Moreover, SOX2 protein expression was detected at much higher percentages (38%) in our OSCC cohort than SOX2 mRNA expression (13%), thereby suggesting the possible involvement of post-transcriptional mechanisms. Similar observations have been reported for other CSC-related factors, such as NANOG or PDPN, detected in over 30% of OSCC patients at the protein level [21,36] compared to 3% at mRNA levels according to the TCGA data from 172 OSCC patients [21].

Studies published to date assessing the expression of SOX2 and its clinical and prognostic relevance in OSCC have led to contradictory results. It has been reported that a high expression of SOX2 was significantly associated with poorer survival in node-negative OSCC [18], while others [17,26,37] found that a high expression of SOX2 correlated with lymph node metastasis. The latter could be explained by the relevant role of SOX2 as an epithelial–mesenchymal transition (EMT) inducer, thereby acting through the Wnt/ β -catenin and phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathways [38,39] to promote oncogenesis, invasion, and metastasis. Nonetheless, the opposite viewpoint is represented by patients with early-stage OSCC, where upregulation of SOX2 has been correlated with a lower incidence of lymph node metastasis [2,20]. These controversial results could be explained by the heterogeneity of different tumors, as well as by different molecular mechanisms underlying the complex process of metastasis. The majority of studies showed that SOX2 overexpression may promote cancer progression; however, it has also been reported that SOX2 overexpression inhibits cell proliferation [13]. Furthermore, SOX2 is thought to stabilize stem cell phenotype and prevent EMT [40], and even more, SOX2 could promote mesenchymal–epithelial transition (MET), attenuating the invasive phenotype [41]. In our study, the expression of SOX2 did not correlate to T classification, neck lymph node metastasis, disease stage, histological grade, tumor recurrence, and second primary carcinomas development.

Most studies showed that the survival rate of OSCC patients harboring low levels of SOX2 increased compared to those with high levels of SOX2 [13], although Züllig et al. [20] and Fu et al. [2] found that low expression of SOX2 was significantly associated with worse survival. Similarly, other studies on SCC from various locations described an association of elevated SOX2 expression with longer survival [19,42–44]. We herein observed that SOX2 expression was more frequently observed in early tumor stages as well as in N0 cases, and patients with positive SOX2 expression exhibited a better survival than those with negative expression, although differences did not reach statistical significance ($P = 0.07$).

It is possible that all these contradictory results are related to methodological differences in SOX2 IHC scoring, as well as in the heterogeneity of patient populations or even in the morphological and genetic heterogeneity observed in solid tumors. Another explanation may be that SOX2 copy number gain and expression are early tumor-initiating events, but this gene can lose its relevance in conveying an aggressive or metastasizing phenotype [22].

5. Conclusions

Together, our results reveal that SOX2 expression is a clinically relevant feature in early stages of oral tumorigenesis, and provide original evidence of its potential utility as biomarker for oral cancer risk assessment. According to these data, SOX2 expression emerges as an important determinant in the pathogenesis of a subset of OSCC, thereby contributing to tumor initiation and acquisition of an invasive phenotype rather than late stages of disease progression.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2077-0383/8/10/1744/s1>, Table S1. Clinical and pathological characteristics of the 55 patients with oral epithelial dysplasia. Table S2. Clinical and pathological characteristics of the 125 patients with OSCC selected for study. Table S3. Relationship between the clinicopathological variables and SOX2 expression in OSCC patients. Table S4. Univariate Kaplan–Meier and Cox analysis to assess the association of clinicopathological variables on disease-specific survival in 125 OSCC patients.

Author Contributions: Conceptualization, J.C.d.V., J.P.R. and J.M.G.-P.; data curation, T.R.S.; formal analysis, J.C.d.V. and F.H.-P.; funding acquisition, J.P.R. and J.M.G.-P.; investigation, J.C.d.V., P.D.-P.d.M., J.P.R., E.A., R.G.-D., T.R.S. and J.M.G.-P.; methodology, J.C.d.V., P.D.-P.d.M., J.P.R. and E.A.; project administration, J.M.G.-P.; resources,

J.P.R.; supervision, J.C.d.V., and J.M.G.-P.; validation, T.R.S.; visualization, J.C.d.V., P.D.-P.d.M., J.P.R., F.H.-P. and J.M.G.-P.; writing—original draft, J.C.d.V. and J.M.G.-P.

Funding: This study was supported by grants from the Plan Nacional de I+D+I 2013–2016 ISCIII PI16/00280 and CIBERONC (CB16/12/00390), Fundación Merck Salud (17-CC-008), the Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), PCTI-Asturias (GRUPIN14-003), Fundación Bancaria Caja de Ahorros de Asturias-IUOPA, and the FEDER Funding Program from the European Union.

Acknowledgments: We thank the samples and technical assistance kindly provided by the Principado de Asturias BioBank (PT13/0010/0046), financed jointly by Servicio de Salud del Principado de Asturias, Instituto de Salud Carlos III, and Fundación Bancaria Cajastur, and integrated in the Spanish National Biobanks Network. We also thank Juan Pérez Ortega for his excellent administrative support.

Conflicts of Interest: All the authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Torre, L.A.; Bray, F.; Siegel, R.L.; Ferlay, J.; Lortet-Tieulent, J.; Jemal, A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin.* **2015**, *65*, 87–108. [[CrossRef](#)]
2. Fu, T.Y.; Hsieh, I.C.; Cheng, J.T.; Tsai, M.H.; Hou, Y.Y.; Lee, J.H.; Liou, H.H.; Huang, S.F.; Chen, H.C.; Yen, L.M.; et al. Association of OCT4, SOX2, and NANOG expression with oral squamous cell carcinoma progression. *J. Oral Pathol. Med.* **2016**, *45*, 89–95. [[CrossRef](#)]
3. World Health Organization. Global Health Estimates (GHE) 2013: Global Deaths by Income Group, Cause and Year (2016–2060). Available online: https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections/en/ (accessed on 23 June 2019).
4. Chhetri, D.K.; Rawnsley, J.D.; Calcaterra, T.C. Carcinoma of the buccal mucosa. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* **2000**, *123*, 566–571. [[CrossRef](#)]
5. Yanik, E.L.; Katki, H.A.; Silverberg, M.J.; Manos, M.M.; Engels, E.A.; Chaturvedi, A.K. Leukoplakia, oral cavity cancer risk, and cancer survival in the U.S. elderly. *Cancer Prev. Res.* **2015**, *8*, 857–863. [[CrossRef](#)]
6. Califano, J.; Westra, W.H.; Meininger, G.; Corio, R.; Koch, W.M.; Sidransky, D. Genetic progression and clonal relationship of recurrent premalignant head and neck lesions. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 347–352. [[PubMed](#)]
7. Costea, D.E.; Tsinkalovsky, O.; Vintermyr, O.K.; Johannessen, A.C.; Mackenzie, I.C. Cancer stem cells—New and potentially important targets for the therapy of oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis.* **2006**, *12*, 443–454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Sinha, N.; Mukhopadhyay, S.; Das, D.N.; Panda, P.K.; Bhutia, S.K. Relevance of cancer initiating/stem cells in carcinogenesis and therapy resistance in oral cancer. *Oral Oncol.* **2013**, *49*, 854–862. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Teodorczyk, M.; Kleber, S.; Wollny, D.; Sefrin, J.P.; Aykut, B.; Mateos, A.; Herhaus, P.; Sancho-Martinez, I.; Hill, O.; Gieffers, C.; et al. CD95 promotes metastatic spread via Sck in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Death Differ.* **2015**, *22*, 1192–1202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Hussenet, T.; Dali, S.; Exinger, J.; Monga, B.; Jost, B.; Dembelé, D.; Martinet, N.; Thibault, C.; Huelsken, J.; Brambilla, E.; et al. SOX2 is an oncogene activated by recurrent 3q26.3 amplifications in human lung squamous cell carcinomas. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e8960. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **2006**, *126*, 663–676. [[CrossRef](#)]
12. Dalerba, P.; Cho, R.W.; Clarke, M.F. Cancer stem cells: Models and concepts. *Annu. Rev. Med.* **2007**, *58*, 267–284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Ren, Z.H.; Zhang, C.P.; Ji, T. Expression of SOX2 in oral squamous cell carcinoma and the association with lymph node metastasis. *Oncol. Lett.* **2016**, *11*, 1973–1979. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Lim, Y.C.; Kang, H.J.; Kim, Y.S.; Choi, E.C. All-trans-retinoic acid inhibits growth of head and neck cancer stem cells by suppression of Wnt/ β -catenin pathway. *Eur. J. Cancer* **2012**, *48*, 3310–3318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Mithani, S.K.; Mydlarz, W.K.; Grumbione, F.L.; Smith, I.M.; Califano, J.A. Molecular genetics of premalignant oral lesions. *Oral Dis.* **2007**, *13*, 126–133. [[CrossRef](#)]
16. Luiz, S.T.; Modolo, F.; Mozzer, I.; Dos Santos, E.C.; Nagashima, S.; Camargo Martins, A.P.; de Azevedo, M.L.V.; Azevedo Alanis, L.R.; Hardy, A.M.T.G.; de Moraes, R.S.; et al. Immunoexpression of SOX-2 in oral leukoplakia. *Oral Dis.* **2018**, *24*, 1449–1457. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Michifuri, Y.; Hirohashi, Y.; Torigoe, T.; Miyazaki, A.; Kobayashi, J.; Sasaki, T.; Fujino, J.; Asanuma, H.; Tamura, Y.; Nakamori, K.; et al. High expression of ALDH1 and SOX2 diffuse staining pattern of oral

- squamous cell carcinomas correlates to lymph node metastasis. *Pathol. Int.* **2012**, *62*, 684–689. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Du, L.; Yang, Y.; Xiao, X.; Wang, C.; Zhang, X.; Wang, L.; Zhang, X.; Li, W.; Zheng, G.; Wang, S.; et al. Sox2 nuclear expression is closely associated with poor prognosis in patients with histologically node-negative oral tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* **2011**, *47*, 709–713. [[CrossRef](#)]
 19. Wilbertz, T.; Wagner, P.; Petersen, K.; Stiedl, A.C.; Scheble, V.J.; Maier, S.; Reischl, M.; Mikut, R.; Altorki, N.K.; Moch, H.; et al. SOX2 gene amplification and protein overexpression are associated with better outcome in squamous cell lung cancer. *Mod. Pathol.* **2011**, *24*, 944–953. [[CrossRef](#)]
 20. Züllig, L.; Roessle, M.; Weber, C.; Graf, N.; Haerle, S.K.; Jochum, W.; Stoeckli, S.J.; Moch, H.; Huber, G.F. High sex determining region Y-box 2 expression is a negative predictor of occult lymph node metastasis in early squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Eur. J. Cancer* **2013**, *49*, 1915–1922. [[CrossRef](#)]
 21. de Vicente, J.C.; Rodríguez-Santamarta, T.; Rodrigo, J.P.; Allonca, E.; Vallina, A.; Singhania, A.; Donate-Pérez Del Molino, P.; García-Pedrero, J.M. The Emerging Role of NANOG as an Early Cancer Risk Biomarker in Patients with Oral Potentially Malignant Disorders. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 1376. [[CrossRef](#)]
 22. Takata, T.; Slootweg, P.J. Tumors of the oral cavity and mobile tongue. In *WHO Classification of Head and Neck Tumours*, 4th ed.; International Agency for Research on Cancer (IARC); IARC: Lyon, France, 2017; pp. 105–131.
 23. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* **2015**, *517*, 576–582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 24. Cerami, E.; Gao, J.; Dogrusoz, U.; Gross, B.E.; Sumer, S.O.; Aksoy, B.A.; Jacobsen, A.; Byrne, C.J.; Heuer, M.L.; Larsson, E.; et al. The cBio cancer genomics portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* **2012**, *2*, 401–404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 25. Lu, Y.; Futtner, C.; Rock, J.R.; Xu, X.; Whitworth, W.; Hogan, B.L.; Onaitis, M.W. Evidence that SOX2 overexpression is oncogenic in the lung. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e11022. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 26. Liu, X.; Qiao, B.; Zhao, T.; Hu, F.; Lam, A.K.; Tao, Q. Sox2 promotes tumor aggressiveness and epithelial-mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma. *Int. J. Mol. Med.* **2018**, *42*, 1418–1426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 27. Arnold, K.; Sarkar, A.; Yram, M.A.; Polo, J.M.; Bronson, R.; Sengupta, S.; Seandel, M.; Geijsen, N.; Hochedlinger, K. Sox2(+) adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice. *Cell Stem Cell* **2011**, *9*, 317–329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 28. Cai, J.; He, B.; Li, X.; Sun, M.; Lam, A.K.; Qiao, B.; Qiu, W. Regulation of tumorigenesis in oral epithelial cells by defined reprogramming factors Oct4 and Sox2. *Oncol. Rep.* **2016**, *36*, 651–658. [[CrossRef](#)]
 29. Abbey, L.M.; Kaugars, G.E.; Gunsolley, J.C.; Burns, J.C.; Page, D.G.; Svirsky, J.A.; Eisenberg, E.; Krutchkoff, D.J.; Cushing, M. Intraexaminer and interexaminer reliability in the diagnosis of oral epithelial dysplasia. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Med.* **1995**, *80*, 188–191. [[CrossRef](#)]
 30. Freier, K.; Knoepfle, K.; Flechtenmacher, C.; Pungs, S.; Devens, F.; Toedt, G.; Hofele, C.; Joos, S.; Lichter, P.; Radlwimmer, B. Recurrent copy number gain of transcription factor SOX2 and corresponding high protein expression in oral squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* **2010**, *49*, 9–16. [[CrossRef](#)]
 31. Hermsen, M.; Alonso Guervós, M.; Meijer, G.; van Diest, P.; Suárez Nieto, C.; Marcos, C.A.; Sampedro, A. Chromosomal changes in relation to clinical outcome in larynx and pharynx squamous cell carcinoma. *Cell Oncol.* **2005**, *27*, 191–198. [[CrossRef](#)]
 32. Järvinen, A.K.; Autio, R.; Kilpinen, S.; Saarela, M.; Leivo, I.; Grénman, R.; Mäkitie, A.A.; Monni, O. High-resolution copy number and gene expression microarray analyses of head and neck squamous cell carcinoma cell lines of tongue and larynx. *Genes Chromosomes Cancer* **2008**, *47*, 500–509. [[CrossRef](#)]
 33. Lin, S.C.; Liu, C.J.; Ko, S.Y.; Chang, H.C.; Liu, T.Y.; Chang, K.W. Copy number amplification of 3q26-27 oncogenes in microdissected oral squamous cell carcinoma and oral brushed samples from areca chewers. *J. Pathol.* **2005**, *206*, 417–422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 34. Bora-Singhal, N.; Nguyen, J.; Schaal, C.; Perumal, D.; Singh, S.; Coppola, D.; Chellappan, S. YAP1 Regulates OCT4 Activity and SOX2 Expression to Facilitate Self-Renewal and Vascular Mimicry of Stem-Like Cells. *Stem Cells* **2015**, *33*, 1705–1718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 35. Bae, K.M.; Dai, Y.; Vieweg, J.; Siemann, D.W. Hypoxia regulates SOX2 expression to promote prostate cancer cell invasion and sphere formation. *Am. J. Cancer Res.* **2016**, *6*, 1078–1088. [[PubMed](#)]

36. de Vicente, J.C.; Santamarta, T.R.; Rodrigo, J.P.; García-Pedrero, J.M.; Allonca, E.; Blanco-Lorenzo, V. Expression of podoplanin in the invasion front of oral squamous cell carcinoma is not prognostic for survival. *Virchows Arch.* **2015**, *466*, 549–558. [[CrossRef](#)]
37. Qiao, B.; He, B.; Cai, J.; Yang, W. The expression profile of Oct4 and Sox2 in the carcinogenesis of oral mucosa. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2013**, *7*, 28–37.
38. Ye, X.; Wu, F.; Wu, C.; Wang, P.; Jung, K.; Gopal, K.; Ma, Y.; Li, L.; Lai, R. β -Catenin, a Sox2 binding partner, regulates the DNA binding and transcriptional activity of Sox2 in breast cancer cells. *Cell Signal* **2014**, *26*, 492–501. [[CrossRef](#)]
39. Gen, Y.; Yasui, K.; Nishikawa, T.; Yoshikawa, T. SOX2 promotes tumor growth of esophageal squamous cell carcinoma through the AKT/mammalian target of rapamycin complex 1 signaling pathway. *Cancer Sci.* **2013**, *104*, 810–816. [[CrossRef](#)]
40. Thierauf, J.; Veit, J.A.; Hess, J. Epithelial-to-Mesenchymal Transition in the Pathogenesis and Therapy of Head and Neck Cancer. *Cancers* **2017**, *3*, 76. [[CrossRef](#)]
41. He, S.; Chen, J.; Zhang, Y.; Zhang, M.; Yang, X.; Li, Y.; Sun, H.; Lin, L.; Fan, K.; Liang, L.; et al. Sequential EMT-MET induces neuronal conversion through Sox2. *Cell Discov.* **2017**, *3*, 17017. [[CrossRef](#)]
42. Bass, A.J.; Watanabe, H.; Mermel, C.H.; Yu, S.; Perner, S.; Verhaak, R.G.; Kim, S.Y.; Wardwell, L.; Tamayo, P.; Gat-Viks, I.; et al. SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nat Genet.* **2009**, *41*, 1238–1242. [[CrossRef](#)]
43. Ge, N.; Lin, H.X.; Xiao, X.S.; Guo, L.; Xu, H.M.; Wang, X.; Jin, T.; Cai, X.Y.; Liang, Y.; Hu, W.H.; et al. Prognostic significance of Oct4 and Sox2 expression in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *J. Transl. Med.* **2010**, *8*, 94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Zhang, X.; Yu, H.; Yang, Y.; Zhu, R.; Bai, J.; Peng, Z.; He, Y.; Chen, L.; Chen, W.; Fang, D.; et al. SOX2 in gastric carcinoma, but not Hath1, is related to patients' clinicopathological features and prognosis. *J. Gastrointest. Surg.* **2010**, *14*, 1220–1226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

