

UNIVERSIDAD DE OVIEDO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud.

TESIS DOCTORAL

**Transición epitelio-mesenquimal en el carcinoma oral de
células escamosas: significado clínico y pronóstico.**

PRESENTADA POR:

Carmen Vallina Fernández-Kelly

UNIVERSIDAD DE OVIEDO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud.

TESIS DOCTORAL

**Transición epitelio-mesenquimal en el carcinoma oral de
células escamosas: significado clínico y pronóstico.**

PRESENTADA POR:

Carmen Vallina Fernández-Kelly

DIRECTORES:

Juan Carlos de Vicente Rodríguez

Rosa María López-Pintor Muñoz

Oviedo, 2023

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría expresar mi gratitud a mis directores de tesis:

- Prof. Dr. Juan Carlos de Vicente, por ser un ejemplo de trabajo constante, buscando siempre la excelencia. Por haberme brindado la oportunidad de realizar esta tesis, poniendo a mi disposición todos los recursos necesarios para poder llevarla a cabo.
- Prof. Dra. Rosa María López-Pintor, por su apoyo y comprensión en todo momento, por ser capaz de exigir mucho, siempre con una sonrisa. Gracias por querer impulsarnos a todos y por cuidarnos tanto, a nivel no solo profesional sino también personal.

Igualmente, me gustaría dar las gracias a todas las personas del equipo de Medicina Oral de la Universidad Complutense de Madrid. Quisiera agradecer al Prof. Dr. Gonzalo Hernández Vallejo, un referente para todos nosotros, el haber creado un grupo excelente de trabajo tanto en lo humano como en lo profesional. Gracias por haberme dejado formar parte de este equipo. Quisiera dar las gracias también a Julia, Miguel, Lorenzo y, especialmente, a José González Serrano por estar siempre disponibles y dispuestos a ayudar.

Quisiera del mismo modo dar las gracias a todas las personas del Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) y al personal de laboratorio del HUCA y del Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA) implicados en este proyecto.

Mi gratitud también a Corina Lorz, investigadora del CIEMAT, por su ayuda para comprender ciertos términos relativos al mundo de la genética, que para mí eran complicados.

Finalmente, dar las gracias a mi familia. A mi madre, un apoyo constante, por saber estar en todo momento. A mi padre, que es el mejor ejemplo que puedo tener en todos los aspectos de mi vida: el mejor compañero, jefe, profesor y, sobre todo, el mejor padre que podía tener. Gracias a los dos por darlo todo siempre por mí, por inculcarme estos valores y esta educación, y por saber priorizar siempre a la familia. Por último, dar las gracias a Pelayo por su paciencia infinita, por animarme y adaptarse, y por ser capaz de tranquilizarme siempre y sacar lo mejor de mí.

LISTADO DE ABREVIATURAS

ALDH3A1, Aldehyde dehydrogenase 3A1

ARID2, AT Rich Interaction Domain 2

CO, Cáncer oral

COCE, Carcinoma oral de células escamosas

DZIP1, DAZ-interacting protein 1 (DAZ, deleted in azoospermia)

FT, Factor de transcripción

FT-TEM, Factor de transcripción asociado a la transición epitelio-mesenquimal

HMGA, High mobility group proteins characterized by an AT-hook

HNRNPC, Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C

IHC, Inmunohistoquímica

ITGA5, Integrin α 5

PCR, Polymerase chain reaction (en español "reacción en cadena de la polimerasa")

RT-PCR, Real time polymerase chain reaction

SMAD7, Mothers against decapaplegic homolog 7

SRSF3, Serine/arginine-rich splicing factor 3

TEM, Transición epitelio-mesenquimal

ZEB, Zinc finger E-box binding

ÍNDICE

ÍNDICE

1. RESUMEN	16
1.1. RESUMEN.....	16
1.2. ABSTRACT	19
2. INTRODUCCIÓN	23
2.1. CÁNCER ORAL	23
2.1.1. Definición y características clínicas del cáncer oral	23
2.1.2. Epidemiología del cáncer oral	24
2.1.3. Factores de riesgo	24
2.1.4. Carcinogénesis.....	27
2.1.5. Diagnóstico.....	31
2.1.6. Clasificación TNM.....	32
2.1.7. Tratamiento.....	36
2.1.8. Pronóstico	38
2.2. TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL (TEM)	40
2.2.1. Proteínas alteradas en el proceso TEM.....	41
2.2.2. Genes implicados en TEM	48
2.2.3. Factores de transcripción (FT) asociados a TEM.....	52
2.2.4. Factores de señalización asociados a TEM	57
2.2.5. MicroARN y ARN largo no codificante asociados a TEM.....	58
3. JUSTIFICACIÓN	61
4. HIPÓTESIS	65

4.1. Hipótesis general	65
4.2. Hipótesis específicas.....	65
5. OBJETIVOS	67
5.1. Objetivo principal	67
5.2. Objetivos específicos	67
6. MATERIAL Y METODO	69
6.1. Revisión sistemática de los genes implicados en el proceso TEM en el COCE.....	69
6.1.1. Tipo de Estudio.....	69
6.1.2. Pregunta PICO	69
6.1.3. Criterios de inclusión y exclusión	70
6.1.4. Fuentes de información y estrategia de búsqueda.....	71
6.1.5. Registro de los estudios	71
6.1.6. Recogida de datos	72
6.1.7. Riesgo de sesgo individual de los estudios	72
6.2. Análisis de proteínas y factores de transcripción asociados al proceso TEM en COCE.	75
6.2.1. Tipo de Estudio.....	75
6.2.2. Pacientes y muestras de tejido	75
6.2.3. Criterios de inclusión y exclusión	75
6.2.4. Variables clínico-patológicas recogidas	76
6.2.5. Pruebas de inmunohistoquímica (IHC)	77
6.2.6. Pruebas de asociación entre el proceso TEM y la supervivencia.....	78
6.2.7. Cálculo muestral.....	79

6.2.8. Análisis estadístico	79
7. RESULTADOS	82
7.1. Revisión sistemática de los genes implicados en la transición epitelio-mesenquimal en el COCE	82
7.1.1. Selección de los estudios.....	82
7.1.2. Características de los estudios	85
7.1.3. Riesgo de sesgo de los estudios incluidos.....	95
7.1.4. Resultados de los estudios	97
7.2. Análisis de proteínas y FT asociados al proceso TEM en COCE.....	99
7.2.1. Características de la muestra	99
7.2.2. Resultados de las pruebas de inmunohistoquímica realizadas	101
7.2.3. Asociación entre las diferentes proteínas y FT analizados.	102
7.2.4. Asociación de la expresión de las diferentes proteínas y factores de transcripción con las variables clínico-patológicas y el pronóstico de los pacientes.	102
7.2.5 Supervivencia e influencia de las variables clínico-patológicas en la misma.	108
7.2.6. Análisis de supervivencia específica y supervivencia general y su asociación con las proteínas y FTs asociados al proceso TEM.....	108
7.2.7. Análisis de la supervivencia y el estado del proceso TEM.	111
8. DISCUSIÓN.....	113
8.1. Discusión de los resultados de la revisión sistemática de los genes implicados en la transición epitelio-mesenquimal en el COCE.	113
8.2. Discusión de los resultados del estudio acerca del análisis de proteínas y factores de transcripción asociados al proceso TEM en COCE.	118

9. CONCLUSIONES	131
10. ANEXO	134
11.. BIBLIOGRAFÍA	146

1. RESUMEN



Universidad de Oviedo

1. RESUMEN

1.- Título de la Tesis	
Español: Transición epitelio-mesenquimal en el carcinoma oral de células escamosas: significado clínico y pronóstico.	Inglés: Epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma: clinic and prognosis significance.
2.- Autor	
Nombre: Carmen Vallina Fernández-Kelly	DNI/Pasaporte/NIE: 71668628-F
Programa de Doctorado: Ciencias de la Salud	
Órgano responsable: Centro Internacional de Posgrado	

1.1. RESUMEN

<p>Introducción: La transición epitelio-mesenquimal (TEM) es un proceso dinámico presente en cáncer. En él las células cancerosas adquieren un fenotipo invasivo y potencial metastásico. En este proceso juegan un papel importante diferentes biomarcadores como genes, proteínas y factores de transcripción (FTs).</p> <p>Justificación: No existe una evidencia clara del papel del proceso TEM en la metástasis del cáncer <i>in vivo</i>. Además, existen discrepancias sobre la función que juegan los biomarcadores asociados a TEM en el cáncer oral de células escamosas (COCE).</p> <p>Hipótesis: Nuestra hipótesis general fue: ¿La expresión de marcadores del proceso TEM se asocia a las variables clínico-patológicas del COCE?</p>

Objetivo: Nuestro objetivo fue valorar los genes, proteínas y FTs implicados en el proceso TEM en el COCE.

Material y método:

Primer Estudio: Se realizó una revisión sistemática. Nuestra pregunta enfocada fue: ¿Existe algún cambio en la expresión de los genes implicados en el proceso TEM en pacientes que sufren COCE?. Se realizó una búsqueda en 4 bases de datos siguiendo criterios de elegibilidad determinados. De los estudios incluidos se extrajeron los siguientes datos: (a) características generales de los estudios; (b) genes estudiados y pruebas empleadas; y (c) datos sobre proteínas asociadas a TEM expresadas por los genes en relación con las características de los pacientes y a las variables clínico-patológicas del COCE. La calidad metodológica se evaluó mediante la herramienta Newcastle-Ottawa.

Segundo estudio: Estudio de cohortes retrospectivo. Se recogieron muestras de tejido de 165 pacientes con COCE confirmado histológicamente. Todos los pacientes habían sido diagnosticados de COCE y habían recibido resección radical del tumor con disección simultánea de ganglios linfáticos del cuello. Se analizó la expresión de E-Cadherina, N-Cadherina, Vimentina, Snail, Slug, ZEB1, Smad7, Twist y E47 mediante inmunohistoquímica. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS. Se consideraron valores estadísticamente significativos si $p < 0,05$.

Resultados:

Primer estudio: Se incluyeron 8 estudios de cohortes retrospectivos. La alta expresión de los genes HNRNPC, ITGA5, HMGA2 y SRSF3, y la baja expresión de ALDH3A1 y ARID2 promovieron el proceso TEM en COCE.

Segundo estudio: Los biomarcadores más expresados fueron la E-Cadherina y el FT Twist. Hubo asociación estadísticamente significativa entre la ausencia de expresión de E-Cadherina y la expresión de Vimentina, entre Snail y Slug, ZEB1 y E47, Slug y Twist, y entre ZEB1 y E47. La expresión negativa de N-Cadherina y positiva de Vimentina se asoció con mayor tamaño del tumor, estadios clínicos más avanzados y peor grado de diferenciación histológica. La expresión positiva de Vimentina se asoció

con metástasis ganglionar local y un estado clínico más desfavorable al final del seguimiento. La expresión negativa de Slug se asoció con mayor tamaño tumoral y estadio clínico más avanzado. Y la expresión negativa de E47 se asoció con la presencia de invasión perineural. La tasa de supervivencia a 5 años fue del 61% y a 10 años del 53%. La TEM completa se asoció con una supervivencia más pobre comparado con la ausencia de TEM.

Conclusiones:

- La alta expresión de HNRNPC, ITGA5, HMGA2 y SRSF3, y la baja expresión de ALDH3A1 y ARID2 promueven el proceso TEM en el COCE, lo que puede dar lugar a un peor pronóstico de los pacientes.
- La E-Cadherina y Twist fueron la proteína y FT más expresados, respectivamente.
- Existe asociación estadísticamente significativa entre la ausencia de expresión de E-Cadherina y la expresión de Vimentina, entre Snail y Slug, ZEB1 y E47, Slug y Twist, y entre ZEB1 y E47
- La expresión negativa de N-Cadherina, Slug y E47, y la expresión positiva de Vimentina se asociaron significativamente con variables clínico-patológicas desfavorables.
- La TEM completa se asoció con una supervivencia más pobre de los pacientes en comparación con la ausencia de TEM.



Universidad de Oviedo

1.2. ABSTRACT

Introduction: Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a dynamic process present in cancer, in which cancer cells acquire an invasive phenotype and a metastatic potential. Different biomarkers such as genes, proteins, and transcription factors (TFs) play an important role in this process.

Justification: There is no clear evidence of the role of TEM process in cancer metastasis *in vivo*. In addition, there are discrepancies about the function that TEM-associated biomarkers play in oral squamous cell cancer (OSCC).

Hypothesis: Our general hypothesis was: Is the expression of EMT biomarkers associated with clinicopathological variables, with a worse prognosis and lower survival of OSCC?

Aim: Our aim was to assess the genes, proteins, and TFs involved in the EMT process in OSCC.

Materials and methods:

First study: A systematic review was performed. The focused question was: Is there any change in the expression of the genes involved in the TEM process in patients suffering from OSCC? A literature search was carried out in 4 databases following eligibility criteria. Data were extracted from included studies on: (a) general characteristics of the studies; (b) genes studied and tests used; and (c) data on the EMT-associated proteins expressed by the genes in relation to the characteristics of the patients and the clinicopathological variables of the OSCC. The methodological quality of the studies was evaluated using the Newcastle-Ottawa tool.

Second study: Retrospective cohort study. Tissue samples were collected from 165 patients with histologically confirmed OSCC. All patients had been diagnosed with

OSCC and had received radical resection of the tumor with simultaneous dissection of neck lymph nodes. Expression of E-Cadherin, N-Cadherin, Vimentin, Snail, Slug, ZEB1, Smad7, Twist and E47 was analyzed by immunohistochemistry. Statistical analysis was performed using the SPSS and values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results:

First study: A total of 8 retrospective cohort studies were included. The overexpression of the HNRNPC, ITGA5, HMGA2 and SRSF3 genes, and the low expression of ALDH3A1 and ARID2 promoted the EMT process in OSCC.

Second study: The most expressed protein was E-Cadherin and the TF was Twist. There was a statistically significant association between the absence of E-Cadherin expression and the expression of Vimentin, between Snail and Slug, ZEB1 and E47, Slug and Twist, and between ZEB1 and E47. Negative expression of N-Cadherin and positive expression of Vimentin was associated with bigger size of the tumor, more advanced clinical stages, and a worse degree of histological differentiation. Positive Vimentin expression was associated with local lymph node metastases and worse clinical status at the end of follow-up. Slug negative expression was significantly associated with bigger tumor size and more advanced clinical stages. And the negative expression of E47 was associated with the presence of perineural invasion. The 5-year survival rate was 61% and 53% at 10 years. Complete EMT was associated with poorer survival compared to no EMT.

Conclusions:

- High expression of HNRNPC, ITGA5, HMGA2, and SRSF3, and low expression of ALDH3A1 and ARID2 promote the EMT process in OSCC, which may lead to a worse prognosis for patients.
- E-Cadherin and Twist were the most expressed protein and TF, respectively.
- There is a statistically significant association between the negative expression of E-Cadherin and the expression of Vimentin, between the expression of Snail and

Slug, ZEB1 and E47, between the expression of Slug and Twist; and between the expression of ZEB1 and E47.

- Negative expression of N-Cadherin, Slug and E47, and positive expression of Vimentin were significantly associated with unfavorable clinicopathological variables.
- Complete EMT was associated with poorer patient survival compared with no EMT.

2. INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. CÁNCER ORAL

2.1.1. Definición y características clínicas del cáncer oral

El cáncer oral (CO) es una neoplasia maligna caracterizada por inestabilidad, heterogeneidad celular y una alta agresividad (Ali y cols., 2017). El CO incluye neoplasias que aparecen en el interior de la cavidad oral y también en el bermellón (OMS, 2021). Este tipo de cáncer afecta frecuentemente al labio, la lengua, suelo de la boca, mucosa yugal y paladar (Chi y cols., 2015; Ellington y cols., 2020; Han y cols., 2016).

El CO en sus primeros estadios puede pasar desapercibido. Ello se debe a que en etapas iniciales este tumor es indoloro. Sin embargo, en sus fases más avanzadas puede dar lugar a dolor, limitación de movimientos o sensación de ardor, entre otras alteraciones (Markopoulos, 2012). Habitualmente, el carcinoma oral de células escamosas (COCE) que es el tipo más frecuente de CO, se presenta como una úlcera con márgenes exofíticos, fisurados o elevados (Pires y cols., 2013). También puede presentarse como un tumor, como una eritroplasia, como una leucoplasia no homogénea (por ejemplo, como una lesión mixta blanca y roja también denominada eritroleucoplasia) o como un alveolo postextracción que no cura. El CO frecuentemente da lugar a linfadenopatías en los ganglios linfáticos cervicales. Por tanto, es fundamental prestar gran atención a las alteraciones orales anteriormente descritas cuando persisten más de dos semanas (Markopoulos, 2012).

El desarrollo del COCE es progresivo y puede surgir de mucosa oral sana o bien estar precedido de trastornos orales potencialmente malignos (Warnakulasuriya, 2021). Existen diferentes trastornos orales potencialmente malignos que pueden progresar a COCE como la eritroplasia, la leucoplasia, la leucoplasia verrucosa proliferativa, la queilitis actínica, el liquen plano (principalmente el tipo erosivo y atrófico), la fibrosis oral submucosa y el lupus eritematoso (van der Waal, 2009; Warnakulasuriya y cols., 2021). Además, recientemente se ha propuesto la inclusión de las reacciones

liquenoides orales y la enfermedad injerto contra huésped como trastornos orales potencialmente malignos ya que se ha observado evidencia científica que muestra como estas lesiones pueden progresar a CO (Warnakulasuriya y cols., 2021).

2.1.2. Epidemiología del cáncer oral

En el año 2020, el CO fue el decimosexto cáncer más frecuente en todo el mundo (Global Cancer Observatory, 2020). A nivel mundial, en el año 2020 se diagnosticaron 377.713 nuevos casos de CO, incluyendo pacientes de ambos sexos de todas las edades. De ellos, un 17,3% aparecieron en Europa y un 65,8% en Asia. Además, cabe destacar que este tipo de cáncer tiene altas tasas de mortalidad. En el año 2020, 177.757 pacientes fallecieron en el mundo por este motivo. Un 74% de los fallecidos procedían de países asiáticos y un 13,8% de países europeos (Global Cancer Observatory, 2020).

Cabe señalar que el 90% de los casos de CO son COCE (Chi y cols., 2015). El COCE se considera, por tanto, la forma histopatológica más común de CO y es uno de los cánceres más prevalentes en todo el mundo (Graillon y cols., 2022).

2.1.3. Factores de riesgo

Entre los principales factores de riesgo del CO se encuentran el tabaco y el alcohol. El consumo de cigarrillos es el factor de riesgo más frecuentemente estudiado y se ha asociado con el 75% de todos los casos de CO (Ogden, 2005). La probabilidad de desarrollar CO es 5 veces mayor en pacientes que fuman en comparación con pacientes no fumadores (Chaturvedi y cols., 2019). El consumo de tabaco expone al epitelio oral a los radicales libres de oxígeno y al nitrógeno que pueden afectar los mecanismos de defensa. Los niveles elevados de estos radicales libres se encuentran alterados tanto en trastornos orales potencialmente malignos como en CO (Choudhari y cols., 2014).

Sin embargo, también se ha relacionado el CO con otras formas de consumo de tabaco. Un ejemplo de ello es el consumo de *shammah*, una combinación de tabaco en polvo sin humo con otros ingredientes como la lima, la pimienta, la ceniza y otros agentes

aromatizantes (Quadri y cols., 2015). Otro ejemplo es el uso de la pipa de agua, también denominada cachimba o *shisha*, que ha ganado popularidad en todo el mundo, especialmente entre los jóvenes. El humo de la *shisha* contiene agentes químicos potencialmente dañinos, incluyendo carcinógenos y productos tóxicos. Y se ha visto que puede ser un factor de riesgo para varios tipos de cáncer, entre los que se encuentra el CO. Una sesión de fumar *shisha* durante 40 minutos equivale a fumar 100 o más cigarrillos (Patil y cols., 2022).

También, hoy en día es popular el uso de los “vapeadores” y cigarrillos electrónicos (Cohen y cols., 2018). El término “vapeo” indica el uso de cigarrillos electrónicos u otros dispositivos utilizados para inhalar nicotina calentada en forma de aerosol. Recientemente, se ha observado un aumento de su uso, especialmente entre los adolescentes. Estos dispositivos se han presentado como una ayuda a corto plazo para dejar de fumar y como una alternativa a largo plazo del uso de tabaco. Actualmente, se tiene una visión equivocada de que son inocuos para la salud (Petrella, 2021). Dado que los cigarrillos electrónicos son relativamente nuevos en el mercado, no existen estudios que evalúen a largo plazo las consecuencias de su uso (Sultan y cols., 2021). Los resultados de un cuestionario realizado a 19.414 usuarios de cigarrillos electrónicos mostraron como la xerostomía fue el efecto secundario más común que presentaron estos pacientes (Farsalinos y cols., 2014). Sin embargo, los datos sobre el riesgo de desarrollar lesiones displásicas orales o COCE son limitados (Sultan y cols., 2021). Existen estudios *in vitro* que demuestran que los vapeadores son capaces de inducir roturas de la doble cadena del ADN, las cuales son la forma más letal de daño en el ADN. Si no se reparan estas roturas pueden aparecer alteraciones cromosómicas desarrollando el proceso de carcinogénesis. Sin embargo, actualmente, no hay pruebas sólidas que sugieran un papel directo de los cigarrillos electrónicos en la patogenia de los trastornos orales potencialmente malignos o el CO (Sultan y cols., 2021).

El alcohol es otro de los factores de riesgo asociado al CO. Este factor de riesgo puede actuar de forma local y sistémica. El alcohol produce un aumento de la permeabilidad de la mucosa oral, disolviendo los componentes lipídicos del epitelio, provocando atrofia epitelial y alterando la síntesis y reparación del ADN. Su uso crónico se asocia con un deterioro de la inmunidad innata y adquirida, lo que puede dar lugar a una mayor

susceptibilidad a infecciones y neoplasias (Reidy y cols., 2011). El alcohol funciona sinérgicamente con el tabaco en el desarrollo del CO, ya que el alcohol aumenta la permeabilidad de la mucosa oral, lo que da lugar a atrofia epitelial (Rock y cols., 2018). En una revisión sistemática reciente, se observó como el consumo sinérgico de alcohol y tabaco (tanto fumado como sin humo) aumentaba significativamente la probabilidad de aparición de COCE (Mello y cols., 2019).

Si bien el consumo de tabaco y alcohol son tradicionalmente los factores de riesgo más frecuentes, es importante tener en cuenta que en países asiáticos otro factor de riesgo muy importante es la masticación de nuez de betel, siendo el principal factor etiológico de CO en países como la India y la zona del sudeste asiático (Arakeri y Brennan, 2013; Travasso, 2013).

Además, existen otros factores de riesgo microbiológicos que aumentan el riesgo de CO, entre ellos se encuentra el virus del papiloma humano (VPH). Este virus se ha asociado a la aparición de CO en la región orofaríngea. Se sugiere que en ciertos casos la capa basal del epitelio oral podría estar infectada por el VPH, como sucede con el epitelio del cuello de útero, y que una mala higiene oral y la presencia de inflamación gingival podría ayudar a la entrada del VPH en el epitelio oral (Dalla y cols., 2019). La infección por el VPH es una causa bien conocida de cáncer orofaríngeo. Entre los diferentes tipos de VPH el que más se ha asociado a CO es el VPH-16. Yadav y cols. realizaron un estudio observacional prospectivo en el que analizaron 180 pacientes con COCE y cáncer orofaríngeo de células escamosas, y observaron una incidencia de positividad para el VPH-16 del 9,4% (17/180) mostrando que su prevalencia era mayor en pacientes no fumadores, pacientes con enfermedades de transmisión sexual, pacientes con tumores en estadio temprano (T1-T2) y carcinomas escamosos pobremente diferenciados con metástasis ganglionar (Yadav y cols., 2022).

La predisposición genética también juega un papel crítico en el desarrollo de COCE, especialmente de aquellos localizados en lengua y mucosa yugal (Ali y cols., 2017). También, una respuesta inmunológica inadecuada puede predisponer al desarrollo de CO. Por ejemplo, se ha observado mayor riesgo de desarrollar COCE en pacientes infectados por el VIH, en pacientes inmunodeprimidos sometidos a trasplantes de

órganos y en otros pacientes que reciben tratamientos inmunosupresores (Van Leeuwen y cols., 2009). En un estudio reciente que investigó la relación entre carcinoma escamoso de cabeza y cuello y pacientes con VIH, se observó que los pacientes con VIH/SIDA tienen 1,71 veces más probabilidad de padecer cáncer orofaríngeo. Por tanto, se sugiere que el VIH puede desempeñar un papel en la génesis del carcinoma escamoso de cabeza y cuello (Mazul y cols., 2022). También existen trabajos que han mostrado como los pacientes sometidos a trasplante hepático por cirrosis hepática alcohólica tienen mayor riesgo de sufrir cáncer de cabeza y cuello que los pacientes trasplantados de hígado por otra causa (Bellamy y cols., 2001; Vallejo y cols., 2005).

En el caso del COCE de labio, el principal factor etiológico es la radiación ultravioleta, aunque otros autores también lo han asociado con el tabaco, el VPH, las infecciones por *Candida*, déficits nutricionales y la predisposición genética (Pires y cols., 2013). También, existen estudios que han observado como el cáncer de labio es más frecuente en trasplantados de órgano sólido (López-Pintor y cols., 2011; Öhman y cols., 2015; Laprise y cols., 2019).

Por otro lado, la dieta juega un papel importante en el CO. Se ha observado como consumir verduras ricas en betacarotenos (como las zanahorias, calabaza o maíz), verduras crucíferas (como el repollo y la coliflor) y cítricos (como naranja y limón) más de una vez a la semana tiene un efecto protector frente al CO. Por el contrario, la ingesta de carnes rojas más de una vez a la semana aumenta el riesgo de CO, al igual que las comidas muy picantes o calientes (Gupta y cols., 2017). Existen estudios que muestran como la ingesta más alta de cítricos reduce un 50% el riesgo de desarrollar CO y faríngeo, en comparación con los pacientes con una baja ingesta de cítricos (Cirimi y cols., 2018).

2.1.4. Carcinogénesis

Se sabe que el desarrollo de CO tiene lugar a lo largo de un periodo de tiempo en el que ocurren una serie de cambios genéticos y moleculares (Tanaka y Ishigamori, 2011). La carcinogénesis oral es un complejo proceso multifactorial en el que las células epiteliales se ven afectadas por alteraciones genéticas (Fukuda y cols., 2012). Los queratinocitos de

la mucosa oral están expuestos de forma crónica a factores de riesgo ambientales como el tabaco y el alcohol, carcinógenos químicos, radiación y microorganismos que pueden romper la homeostasis y generar inestabilidad genética a nivel celular (Figura 1) (Markopoulous, 2012; Rivera, 2015; Bugshan y Farooq, 2020).

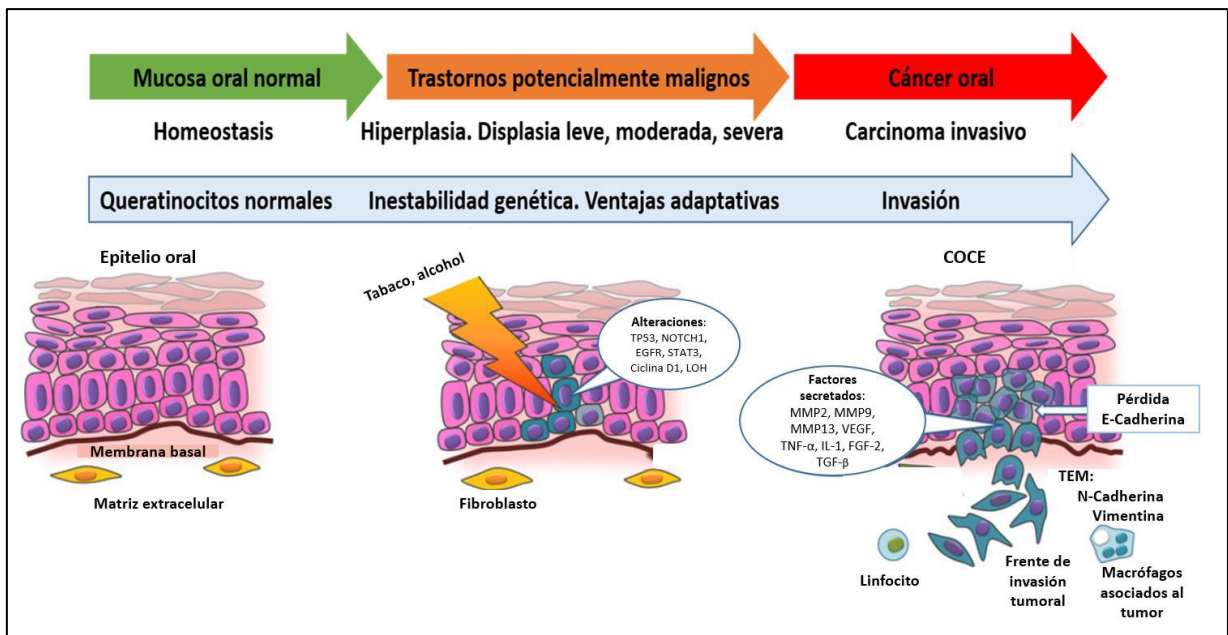


Figura 1. Carcinogénesis. Modificado de Rivera, 2015.

Los queratinocitos normales sufren alteraciones genéticas que modifican su ciclo celular y alteran el mecanismo de reparación del ADN, la diferenciación celular y aumentan la resistencia a la apoptosis. La exposición crónica a carcinógenos puede dañar ciertos genes o porciones más grandes de material genético como cromosomas. Este daño genético puede activar mutaciones o amplificar oncogenes que promueven la supervivencia y proliferación celular (Díez-Pérez y cols., 2011). Como hemos comentado, estos cambios pueden deberse a factores biológicos, a la exposición a carcinógenos o a errores en la reparación del ADN. Todas estas alteraciones conducen a la presencia de queratinocitos inestables y a cambios neoplásicos (Feller y cols., 2013). Y en este microambiente, se ha visto como se promueve la pérdida de adhesión celular y se facilita el proceso de transición epitelio-mesénquima (TEM) (Rivera, 2015), que posteriormente definiremos.

Se considera que el principal factor para la malignización de un trastorno oral potencialmente maligno es la presencia de displasia (Warnakulasuriya y cols., 2009). La displasia oral es un diagnóstico histológico caracterizado por una alteración del epitelio en el que se producen cambios en la arquitectura y atipias celulares (Iocca y cols., 2020). Generalmente, los patólogos clasifican la displasia en tres grados (Figura 2):

1. La displasia leve se define como la alteración arquitectónica limitada al tercio inferior del epitelio con atipias celulares.
2. La displasia moderada se caracteriza por la alteración arquitectónica que se extiende hasta el tercio medio del epitelio con atipias celulares.
3. La displasia severa se caracteriza por alteraciones arquitectónicas más allá de dos tercios inferiores del epitelio y por atipias celulares.

La displasia se observa en casi todos los casos de eritroplasia y entre el 1-30% de los casos de leucoplasia oral en el momento del diagnóstico (Reibel y cols., 2003). La mayoría de los profesionales consideran el grado de displasia como un factor predictor de progresión de los trastornos orales potencialmente malignos a COCE. Se cree que las lesiones con el grado más alto de displasia tienen mayor probabilidad de transformación maligna (Warnakulasuriya y cols., 2011).

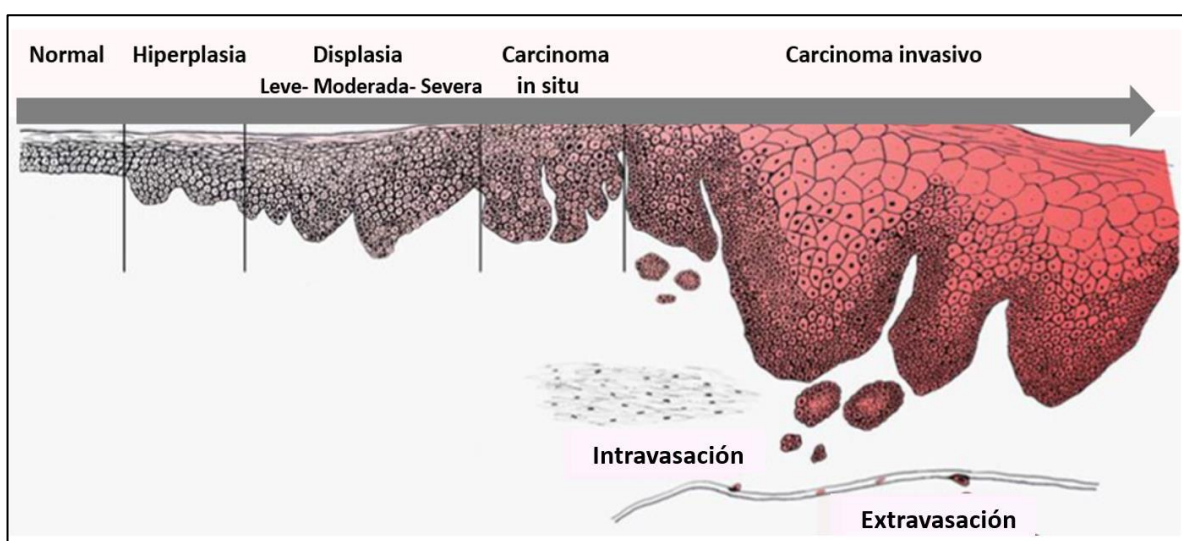


Figura 2. Alteraciones que se observan en las diferentes etapas de la carcinogénesis oral (Modificado de Dionne y cols., 2014).

Sin embargo, existe cierta subjetividad a la hora de establecer la clasificación histológica de la displasia (Fleskens y cols., 2009). Es difícil poder diferenciar entre los diversos grados de displasia, y entre la displasia severa y el carcinoma *in situ*. Por este motivo, se ha intentado categorizar únicamente en dos grupos: alto y bajo riesgo de displasia (Iocca y cols., 2020). Sin embargo, a pesar de ello es difícil diferenciar los trastornos orales potencialmente malignos que progresan a CO, y por tanto el manejo clínico de los pacientes no debe basarse únicamente en este criterio (Kujan y cols., 2006).

El microbioma juega un papel importante en la carcinogénesis. Las alteraciones en el microbioma se han asociado con diferentes enfermedades, entre las que se encuentra el CO (Pushalkar y cols., 2012). La alteración del microambiente es crucial para inducir la carcinogénesis (Orlandi y cols., 2019). Esto se ha observado en otros tipos de carcinomas. Ejemplos de ello son la relación entre el virus de la hepatitis B (VHB) y el cáncer hepatocelular, el virus de Epstein-Barr (VEB) y el linfoma no Hodgkin y el virus del papiloma humano (VPH) y el cáncer de cuello de útero. Actualmente, existe evidencia de mayores concentraciones de ciertas especies como *Streptococcus oralis*, *Ralstonia insidiosa*, *Gemella haemolysans* y *Sphingomonas*, en la superficie de lesiones de CO respecto a tejidos sanos (Pushalkar y cols., 2012). En lo relativo al *Fusobacterium nucleatum*, considerado un patógeno periodontal, se ha visto que promueve el desarrollo de COCE al provocar la rotura de la doble cadena del ADN, promoviendo el crecimiento celular y favoreciendo el mecanismo de desarrollo del COCE. Además, se ha observado como las células infectadas por *Fusobacterium nucleatum* tienen una capacidad proliferativa aumentada (Geng y cols., 2020). Por tanto, el *Fusobacterium nucleatum* es una bacteria que promueve el desarrollo de CO (Peter y cols., 2022). De hecho, esta bacteria también se ha asociado con inflamación crónica, la promoción del proceso TEM en las células epiteliales y la alteración de la respuesta inmunitaria en la cavidad oral, observándose en concentraciones mayores en diferentes enfermedades orales entre las que se encuentra el CO (Shao y cols., 2021). *Fusobacterium nucleatum* también se ha asociado con otros tipos de carcinomas como el cáncer de páncreas, el cáncer hepático y el cáncer de mama (Irfan y cols., 2020) y se considera por tanto un carcinógeno (Su Mun y cols., 2021; Alon-Maimon y cols., 2022; Peter y cols., 2022).

También en el CO, existen estudios que han relacionado el proceso de carcinogénesis con otros microorganismos de los géneros *Streptococcus* y *Prevotella*.

2.1.5. Diagnóstico

El diagnóstico precoz del CO es fundamental para salvar la vida del paciente y minimizar el impacto negativo en la calidad de vida derivado de una cirugía más agresiva (Abati y cols., 2020). En la práctica clínica, es importante identificar a los pacientes con trastornos orales potencialmente malignos, ya que estos procesos pueden evolucionar a CO (Dionne y cols., 2014). El diagnóstico histológico del CO mediante la realización de una biopsia sigue siendo el “gold estándar” (Abati y cols., 2020). Esta prueba también es útil para valorar el riesgo de malignización de los trastornos orales potencialmente malignos, ya que permite detectar la presencia de displasia (Barnes y cols., 2005).

Como hemos mencionado anteriormente, el 90% de los CO son COCE. En cuanto al grado histológico, la mayoría de los tumores son bien diferenciados o moderadamente diferenciados, y se presentan formando nidos y cordones de células poligonales eosinófilas, unidas entre sí por puentes intercelulares y con tendencia a la disqueratosis o queratinización individual o a la formación de perlas córneas. Los núcleos son redondos y grandes, con nucléolo prominente. En los tumores que presentan un alto grado de diferenciación histológica desaparecen los puentes intercelulares y la queratinización y aumentan el hiper cromatismo y el pleomorfismo nuclear, así como las figuras mitóticas. Los tumores pobremente diferenciados presentan alta tasa de proliferación celular (El-Naggar y cols., 2017).

En lo relativo al patrón de invasión, en la última actualización de la clasificación tumoral para el COCE, se incluyó la profundidad de invasión tumoral (DOI, por sus siglas en inglés, “*depth of invasion*”) y la extensión extracapsular de la afectación de ganglios linfáticos cervicales. La profundidad de invasión tumoral (DOI) es la distancia desde una línea superficial de la mucosa hasta el punto más profundo del crecimiento tumoral. Estimar esta profundidad de invasión solamente desde un punto de vista clínico es difícil. Por ese motivo, una alternativa que se propone es el empleo de imágenes preoperatorias

como una resonancia magnética, de tal forma que podamos evaluar la profundidad de invasión y el grosor del tumor. El grado del patrón de invasión se correlaciona con la supervivencia, por lo que determinar esta variable es importante de cara al pronóstico de los pacientes con COCE (Almangush y cols., 2020).

Actualmente, se están empleando diferentes biomarcadores salivales para intentar reconocer el riesgo de transformación maligna de una lesión oral (Abati y cols., 2020). De hecho, se han identificado hasta 100 biomarcadores salivales alterados en trastornos orales potencialmente malignos y CO como ciertas citoquinas (IL-6, IL-8, IL-1b, TNF- α), la fosfatasa, la espermidina, la profilina, la transferrina o la lactatodeshidrogenasa, entre otros (Khurshid y cols., 2018; Iglesias-Velázquez y cols., 2022; Elmahgoub, 2022). Esta línea de investigación prometedora está siendo muy estudiada ya que la recogida de saliva es una técnica sencilla y no invasiva (Khurshid y cols., 2018). De todos modos, diferentes autores consideran que, si bien existen ciertos biomarcadores salivales asociados a COCE, hoy en día el uso de biomarcadores por sí solo no es adecuado para el diagnóstico de CO (Panneerselvam y cols., 2022).

2.1.6. Clasificación TNM

La clasificación TNM es un sistema aceptado a nivel mundial desde la década de 1990 para describir la extensión anatómica de un tumor (Carinci y cols., 1998), y desde entonces han ido surgiendo nuevas actualizaciones a la clasificación inicial. La clasificación actual del cáncer se basa en la evaluación de la extensión del tumor (T), afectación de los ganglios linfáticos (N) y presencia de metástasis a distancia (M). Este sistema que aúna las tres categorías anteriores fue propuesto por la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) y es aceptado internacionalmente como sistema universal e influye en la planificación del tratamiento del cáncer (Amin y cols., 2017). La clasificación TNM es un sistema de estadificación estándar mundial que se utiliza para definir la extensión del cáncer y es un factor pronóstico importante para predecir el resultado de los pacientes (Denaro y cols., 2018).

En el año 2017, la *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* propuso una actualización de la clasificación TNM para el cáncer de cabeza y cuello, siendo esta la octava edición de la estadificación (Tabla 1) (Amin y cols., 2017).

Las principales modificaciones en la octava edición fueron cambios en la categoría T para el cáncer de la cavidad oral al incorporar la profundidad de invasión del tumor primario (DOI) (Almangush y cols., 2020). En esta nueva propuesta, se diferencia entre TX cuando no puede evaluarse el tumor primario, Tis para casos de carcinoma in situ, y T1-T4 a medida que va creciendo de tamaño y su profundidad de invasión (Amin y cols., 2017).

El apartado N, relacionado con la presencia de afectación de ganglios linfáticos cervicales, diferencia entre NX cuando no puede evaluarse la afectación ganglionar, N0 cuando no hay ganglios linfáticos afectados, y N1-N3 en función de si la afectación ganglionar es única o múltiple, ipsilateral, bilateral o contralateral y en función del tamaño. Esto es común a las ediciones anteriores de esta clasificación (Amin y cols., 2017). Sin embargo, la categoría N también fue modificada en la 8ª edición, donde se incluyó la extensión extraganglionar (ENE) (Almangush y cols., 2020). Se ha demostrado que la ENE tiene un profundo efecto en el pronóstico de la mayoría de los cánceres de cabeza y cuello, excepto los tumores asociados con el VPH y, por lo tanto, se incorporó a la categoría N (Wreesmann y cols., 2016). Cuando microscópicamente se diagnostica ENE ya se considera estadio patológico (Kato y cols., 2020). Para clasificar clínicamente la enfermedad como ENE+, debe haber evidencia inequívoca de ENE en el examen clínico respaldada por evidencia radiológica fuerte de ENE. Debe tenerse en cuenta que una vez que se detecta la ENE clínica, la enfermedad es cN3b. En caso de duda, se debe asignar la categoría inferior (ENE-) (Amin y cols., 2017).

Finalmente, el apartado M, relativo a la presencia de metástasis, diferencia entre ausencia (M0) o presencia (M+) de metástasis a distancia.

En base a todas estas combinaciones posibles, se establece un algoritmo para clasificar el tumor en el estadio I, II, III o IV de esta clasificación TNM (Kato y cols., 2020).

Esta clasificación TNM proporciona una buena estratificación del tratamiento de COCE, aunque tiene sus limitaciones y conviene individualizar el tratamiento en función de cada caso (Almangush y cols., 2020).

Tabla 1. 8ª edición de la clasificación TNM según la *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*.

Tamaño (T)	
TX	El tumor primario no se puede evaluar
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor ≤ 2 cm y DOI ≤ 5 mm
T2	Tumor ≤ 2 cm, DOI > 5 mm y ≤ 10 mm o tumor > 2 cm y ≤ 4 cm y DOI ≤ 10 mm
T3	Tumor > 4 cm o cualquier tumor con DOI > 10 mm
T4	
T4a	Tumor invade solo las estructuras adyacentes (p. ej., a través del hueso cortical de la mandíbula o el maxilar, o afecta el seno maxilar, o la piel de la cara)
T4b	Tumor invade el espacio masticador, la zona pterigoidea o la base del cráneo y/o rodea la arteria carótida interna
Evaluación clínica de los ganglios linfáticos regionales (cN)	
NX	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales
N0	Sin metástasis en ganglios linfáticos regionales
N1	Metástasis en un solo ganglio ipsilateral, ≤ 3 cm y ENE-
N2	
N2a	Metástasis en un solo ganglio ipsilateral, 3-6 cm y ENE-
N2b	Metástasis en múltiples ganglios ipsilaterales, ≤ 6 cm y ENE-
N2c	Metástasis en ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales, ≤ 6 cm y ENE-
N3	
N3a	Metástasis en cualquier ganglio, > 6 cm y ENE-
N3b	Metástasis en cualquier ganglio, >6cm y ENE+
Evaluación patológica de los ganglios linfáticos regionales (pN)	
Nx	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales
N0	Sin metástasis en ganglios linfáticos regionales
N1	Metástasis en un solo ganglio ipsilateral, ≤ 3 cm y ENE-
N2	
N2a	Metástasis en un solo ganglio ipsilateral, ≤ 3 cm y ENE+
N2b	Metástasis en un solo ganglio ipsilateral, 3-6 cm y ENE -
N2c	Metástasis en múltiples ganglios ipsilaterales, ≤ 6 cm y ENE-
N2c	Metástasis en ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales, ≤ 6 cm y ENE-
N3	
N3a	Metástasis en cualquier ganglio, > 6 cm y ENE-
N3b	Metástasis en cualquier ganglio, >6cm y ENE+
N3b	Metástasis en múltiples ganglios ipsilaterales/bilaterales/contralaterales con ENE+
Metástasis a distancia (M)	
M0	Ausencia de metástasis a distancia
M+	Presencia de metástasis a distancia

T, tamaño; N, afectación de ganglios linfáticos regionales; M, metástasis a distancia; DOI, por sus siglas en inglés, *depth of invasion*, en español profundidad de invasión; ENE, extensión extraganglionar; cm, centímetros.

2.1.7. Tratamiento

En función del estadio clínico en el que se encuentre el CO, existen diferentes enfoques terapéuticos (Markopoulos, 2012). Generalmente, el COCE en estadios iniciales se trata mediante la realización de cirugía resectiva del tumor. En muchos casos se realiza disección cervical cuando hay evidencia de afectación ganglionar o alto riesgo de metástasis ganglionar (Pagedar y Gilbert, 2009). En los casos con peor pronóstico, suele realizarse también un tratamiento coadyuvante mediante radio y/o quimioterapia (Almangush y cols., 2020).

La radioterapia es una modalidad de tratamiento oncológico que se puede utilizar para tratar aproximadamente el 50% de todos los pacientes con COCE, ya sea sola o en combinación con otras modalidades de tratamiento, como cirugía, quimioterapia o inmunoterapia. Actualmente, los avances tecnológicos en radioterapia permiten una administración de radiación más precisa y minimizan progresivamente el impacto en los tejidos sanos (Olivares-Urbano y cols., 2020). La radioterapia es uno de los tratamientos más comunes para el CO. Sin embargo, se han observado altas tasas de recurrencia y metástasis del CO tras la radioterapia. El mecanismo no está del todo claro, pero se cree que las células madre cancerosas presentan una radio-resistencia innata que les ayuda a sobrevivir más fácilmente cuando se exponen al tratamiento de radioterapia (Liu y cols, 2020).

Otro tipo de tratamiento que a menudo se emplea en el CO es la quimioterapia. La quimioterapia es la administración de medicamentos contra el cáncer o citotóxicos. Estos medicamentos actúan atacando las células cancerosas que se dividen rápidamente, interrumpiendo el crecimiento de las células cancerosas y destruyéndolas. Los diferentes tipos de agentes quimioterapéuticos interrumpen el ciclo de vida de las células cancerosas en diferentes etapas, por lo tanto, la combinación de diferentes agentes puede ser más eficaz para inducir la muerte celular que la quimioterapia con un solo agente (Parmar y cols., 2021).

Los diferentes tipos de agentes quimioterápicos se clasifican de la siguiente manera (Parmar y cols., 2021):

- Agentes alquilantes (platinos): funcionan dañando directamente el ADN y evitando la división de las células cancerosas. Dentro de este tipo están los siguientes: cisplatino, carboplatino, 5-fluoracilo, 1-fluoracilo, etc.
- Antimetabolitos: interfieren con el crecimiento de ADN y ARN. Matan las células cancerosas en una fase de división celular. A este tipo pertenece el uftoral.
- Antibióticos antitumorales: interfieren con las enzimas necesarias para la replicación del ADN. Dentro de este grupo se encuentran la bleomicina y la mitomicina.
- Alcaloides de la vinca: inhiben la mitosis o impiden que las enzimas produzcan las proteínas necesarias para la reproducción celular, por ejemplo, la vinblastina y la vincristina.
- Taxanos: inhiben la mitosis al interrumpir la función de los microtúbulos. Un ejemplo es el docetaxel.

Aunque el tratamiento del CO se suele limitar a la cirugía resectiva con o sin radioterapia, en los últimos años se han ido desarrollando terapias dirigidas que emplean anticuerpos monoclonales. Actualmente, sólo el cetuximab, el pembrolizumab y el nivolumab están aprobados por la FDA como terapias moleculares para el cáncer de cabeza y cuello (Kordbacheh y Farah, 2021). El cetuximab es una versión artificial de un anticuerpo que inhibe el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Este medicamento se utiliza tanto para tratar el cáncer de cabeza y cuello como el cáncer colorrectal (Instituto Nacional de Cáncer, 2022). El pembrolizumab es un tipo de anticuerpo monoclonal inhibidor de puntos de control inmunitario. Es un medicamento que se une a la proteína PD-1 para ayudar a las células inmunitarias a destruir células cancerosas y que se usa para el tratamiento de muchos tipos de cáncer, entre los que destacan el cáncer de mama, cáncer de piel, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, carcinoma de células renales, cáncer de esófago, cáncer de unión gastroesofágica y cáncer de cabeza y cuello (Instituto Nacional de Cáncer, 2022). Y el Nivolumab es un anticuerpo monoclonal inhibidor de puntos de control inmunitario, que se une también a la proteína PD-1 para ayudar a las células inmunitarias a destruir células cancerosas, y que se usa para el tratamiento de muchos tipos diferentes de cáncer (cáncer de esófago, de estómago, colorrectal, de pulmón, de riñón, COCE, linfoma de Hodgkin) (Instituto Nacional de

Cáncer, 2022). Estos tratamientos se suelen aplicar en pacientes en estadios avanzados, con enfermedad recurrente o metastásica, normalmente en combinación con radioterapia y/o quimioterapia. Sin embargo, aunque estas terapias moleculares son prometedoras, la cirugía sigue siendo la primera línea de tratamiento del COCE (Kordbacheh y Farah, 2021).

2.1.8. Pronóstico

El pronóstico de COCE varía en función de una serie de factores relacionados con las características del tumor como la localización, extensión y afectación ganglionar, así como, con las características del tratamiento y del propio paciente (Omar, 2013). El pronóstico del COCE empeora en función del avance del tumor. Además, se sugiere que el pronóstico también es peor a medida que la localización tumoral es menos accesible. En base a esto, el cáncer de labio tiene mejores tasas de supervivencia que el cáncer de orofaringe, por ejemplo. Hoy en día, la evidencia muestra que el estadio clínico y patológico en el momento del diagnóstico de la enfermedad es el factor más importante y que más influye en el pronóstico (Chow, 2020).

El pronóstico es mejor en los COCE diagnosticados en estadios tempranos de la enfermedad, especialmente aquellos que están bien diferenciados y no han dado lugar a metástasis. Sin embargo, la mayoría de los COCE se diagnostican en una etapa tardía. Hoy en día, a pesar de los avances terapéuticos, el CO tiene un mal pronóstico (Taghavi y Yazdi, 2015). Si bien la detección y el tratamiento de la mayoría de los tumores ha mejorado en las últimas décadas, el pronóstico asociado con el COCE se ha mantenido sin cambios importantes (Haddad y Shin, 2008). Cabe destacar que el CO tiene una tasa de supervivencia a los 5 años que varía del 15% al 60 %, según el estadio de la enfermedad. Ello se debe a que muchos de los casos presentan en el momento del diagnóstico invasión local y metástasis, que es la consecuencia más letal de la progresión tumoral (Zanoni y cols., 2019; Wangmo y cols., 2020). Por ello, la tasa de supervivencia general a 5 años para COCE sigue siendo baja, y durante las últimas tres décadas se ha situado en torno al 50% (Taghavi y Yazdi, 2015). Además, se ha visto que cuando la demora del diagnóstico se excede del mes, el riesgo de tener un estadio tumoral de CO

avanzado es significativamente mayor (Gómez y cols., 2009). Las tasas de supervivencia a cinco años en estadios avanzados no superan el 12% y la mayoría de los pacientes con COCE avanzado suelen fallecer pasados menos de 30 meses del diagnóstico de su enfermedad (Zini y cols., 2009). Se ha observado también como el tamaño tumoral es importante. Los pacientes con tumores T1 y T2 tienen una tasa de supervivencia mayor que los pacientes con estadios más avanzados (T3, T4) (De Graaff y cols., 2019).

La demora hasta el tratamiento definitivo puede tener un impacto negativo en la recurrencia de la enfermedad (Murphy y cols., 2016). Sin embargo, aunque hay que evitar demoras innecesarias, debe emplearse el tiempo suficiente para planificar de forma óptima el tratamiento y para reeducar a los pacientes en términos de nutrición, higiene oral y abandono de hábitos nocivos como el tabaco (De Graaff y cols., 2019).

En resumen, la detección temprana del CO da como resultado un mejor pronóstico y tasas más favorables tanto de supervivencia como de morbilidad por el tratamiento (Ford y cols., 2013). Un buen enfoque sería tratar de concienciar a la población y a los profesionales sanitarios de las medidas preventivas y realizar cribados para detectar CO en etapas tempranas. De esta forma se reduciría la demora en el diagnóstico y esto podría salvar la vida de los pacientes (Abati y cols., 2020). Además, es necesario realizar un seguimiento a largo plazo de los pacientes que han sufrido CO, tanto clínica como con pruebas de imagen, ya que hay altas tasas de recurrencia (Wong y Wiesenfeld, 2018).

2.2. TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL (TEM)

El proceso de TEM es una cascada de eventos que se observan en las células epiteliales. Estas células son normalmente inmóviles y cuando sucede el proceso TEM cambian morfológicamente a células móviles de tipo mesenquimal (Kang y Massagué, 2004). En este proceso dinámico, la capacidad migratoria e invasividad de las células epiteliales se ve reforzada por la pérdida de adhesión intercelular y cambios en la polaridad celular. Las células adquieren un fenotipo mesenquimal a medida que pierden sus características epiteliales. Además, las células implicadas en TEM tienen mayor capacidad para autorrenovarse, y pueden diferenciarse en diversos tipos de células tumorales (Yang y cols., 2020).

El proceso TEM juega un papel crucial en la morfogénesis durante el desarrollo embrionario y puede ser silenciada en organismos adultos. Sin embargo, el proceso TEM puede reactivarse en varias condiciones patológicas, incluyendo la aparición de carcinomas. De hecho, se ha planteado la hipótesis de que el proceso TEM confiere a las células cancerosas un fenotipo invasivo que es crucial para invadir el tejido circundante y, finalmente, para colonizar lugares a distancia a través de vasos sanguíneos o linfáticos generando metástasis (Zidar y cols., 2018). Como es bien conocido, la metástasis es un proceso durante el cual las células cancerosas se diseminan desde el tumor primario y establecen tumores secundarios en órganos distantes. El proceso TEM se considera el paso inicial en la cascada invasión-metástasis. En este proceso las células cancerosas adquieren un fenotipo invasivo y un potencial metastásico (Yang y cols., 2020).

En los años 90, se comenzaron a realizar estudios de investigación para identificar los mecanismos reguladores moleculares de TEM (Yang y cols., 2020). Y en las últimas tres décadas se han identificado diferentes biomarcadores asociados a este proceso TEM que serán desarrollados a continuación.

2.2.1. Proteínas alteradas en el proceso TEM

2.2.1.1. Cadherinas

Las cadherinas son una familia de proteínas transmembrana que participan en la adhesión celular (Loh y cols., 2019). Las cadherinas fueron identificadas por primera vez en hámsteres por Takeichi, quien las definió como moléculas de superficie celular involucradas en el mecanismo de adhesión dependiente de calcio en vertebrados (Takeichi, 1990; Loh y cols., 2019). Por tanto, las cadherinas son fundamentales para establecer y mantener las estructuras multicelulares (Takeichi, 1990). Las cadherinas participan en la regulación de la adhesión célula-célula, y además modulan los procesos morfogénéticos y de diferenciación celular, los cuales son cruciales durante el desarrollo embrionario (Vestweber, 2015). Entre sus funciones se incluyen el establecimiento y el mantenimiento de la polaridad celular, así como la diferenciación, migración y señalización en las vías de proliferación celular (Chen y cols., 2014).

Takeichi fue el primero en diferenciar entre E-Cadherina y N-Cadherina (Takeichi, 1990; Vestweber, 2015). La E-Cadherina y N-Cadherina son cadherinas clásicas y comparten estructuras similares. La diferencia estructural entre E-Cadherina y N-Cadherina es que la primera se une con la isoforma más corta de la Catenina-p120, mientras que la N-Cadherina se une a la isoforma más larga de la Catenina-p120 (Figura 3) (Loh y cols., 2019).

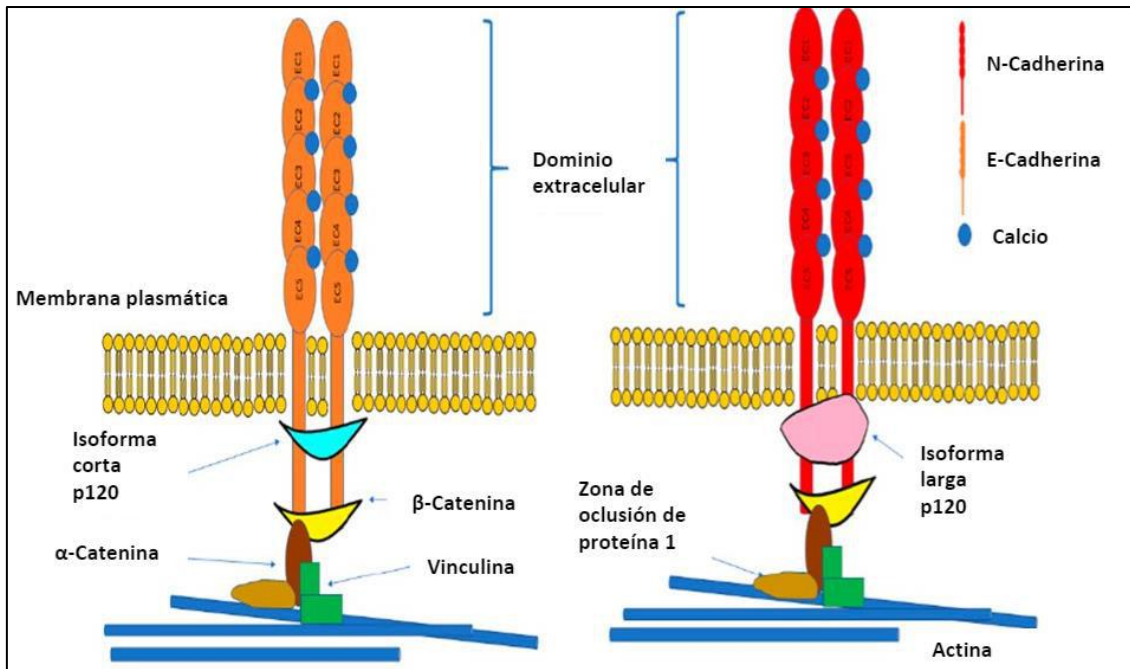


Figura 3. Estructura N-Cadherina y E-Cadherina (Loh y cols., 2019).

2.2.1.1.1. E-Cadherina

La E-Cadherina es una molécula de adhesión celular transmembrana que depende del calcio, y juega un papel importante en la conservación de la estructura epitelial participando en la unión célula-célula y en la señalización intracelular (Günther y Pedernera-Astegiano, 2011). Se ha observado que la disminución de E-Cadherina reduce la adhesión de la célula al sustrato y provoca una alteración significativa de la organización normal de los microtúbulos y el citoesqueleto de actina (Chen y cols., 2014).

La E-Cadherina es una de las proteínas más estudiadas dentro de la familia de las cadherinas. Esta proteína es considerada un importante supresor tumoral, ya que la disminución de E-Cadherina se encuentra asociada a la aparición de cáncer de tipo epitelial (Schneider y Kolligs, 2015). La pérdida de expresión de E-Cadherina se asocia con células malignas más agresivas y menos diferenciadas, y además puede provocar la activación de varios factores de transcripción del proceso TEM (FT-TEM) (Onder y cols., 2008). La pérdida de E-Cadherina se ha asociado con la aparición de diferentes cánceres invasivos y metastásicos como el cáncer de ovario, el cáncer de próstata y el

glioblastoma, lo cual sugiere que la pérdida de E-Cadherina puede promover la actividad metastásica de ciertos tumores (Loh y cols., 2019).

Por el contrario, otros investigadores sostienen que la baja expresión de E-Cadherina no necesariamente desencadena el proceso TEM, y que la restauración de los niveles de E-Cadherina no revierte este proceso (Hollestelle y cols., 2013). De hecho, Chen y cols. en su trabajo de investigación defendieron que la pérdida de E-Cadherina por sí sola es insuficiente para inducir el proceso TEM. Pero observaron que esta pérdida de expresión se asociaba a cambios de remodelación tisular (Chen y cols., 2014). También Schneider y Kolligs sostienen que la pérdida de E-Cadherina no genera cáncer por sí misma, pero sí que promueve el crecimiento tumoral cuando se combina con un segundo factor cancerígeno (Schneider y Kolligs, 2015).

La E-Cadherina es importante para mantener el fenotipo epitelial y, dado que es una molécula imprescindible en la adhesión con otras células, tiene funciones que regulan el comportamiento de las células epiteliales, la formación de tejidos y la supresión del cáncer (Van Roy, 2008). Onder y cols. investigaron la función de la E-Cadherina, y observaron como la interrupción de la adhesión célula-célula por sí misma no desencadenaba metástasis, sin embargo, la pérdida de la proteína E-Cadherina sí lo hacía e inducía el proceso TEM. También, se han realizado estudios de análisis de expresión génica que han comprobado que la pérdida de E-Cadherina provoca la inducción de múltiples FT (Onder y cols., 2008). Estos hallazgos apoyan que la pérdida de E-Cadherina en tumores contribuye a la diseminación metastásica al inducir cambios transcripcionales y funcionales (Onder y cols., 2008).

Además, la baja expresión de E-Cadherina se ha asociado con un mal pronóstico de los pacientes con diferentes tipos de cánceres, como el cáncer gástrico, el cáncer de próstata, el cáncer de páncreas o el cáncer de hígado. Por otro lado, en algunos casos de cáncer de mama, estómago, útero e hígado se ha observado este fenómeno característico del proceso de TEM, con una pérdida combinada de E-Cadherina y p53 (Schneider y Kollings, 2015). Debido a lo anteriormente comentado, algunos autores sugieren que el desarrollo de una terapia contra el cáncer basada en restaurar los niveles

de E-Cadherina podría ser un nuevo enfoque de tratamiento para estos tipos de cáncer (Van Roy, 2008).

En lo relativo al COCE se han realizado varios estudios en los que se ha observado disminución de la expresión de E-Cadherina en los pacientes con COCE. Angadi y cols. estudiaron mediante inmunohistoquímica la expresión de E-Cadherina en casos de COCE y encontraron una disminución de la expresión de E-Cadherina en el 40% de las muestras de COCE, observando una asociación significativa entre la expresión de E-Cadherina y los grados de diferenciación histológica del COCE (Angadi y cols., 2016). Por otro lado, Kadeh y cols. también observaron una expresión reducida de E-Cadherina en el 74% de las muestras de COCE (Kadeh y cols., 2021). Y en el trabajo realizado por López-Verdín y cols. también se observó como la expresión de E-Cadherina fue menor en pacientes con COCE respecto a controles sanos. Sin embargo, no se observó una asociación significativa entre los parámetros clínicos y los niveles de expresión de E-Cadherina. Pero los niveles de expresión fueron más bajos en pacientes con metástasis y afectación de ganglios linfáticos (López-Verdín y cols., 2019). En este año 2023, Lorenzo-Pouso y cols. publicaron una revisión sistemática donde se estudiaba el significado pronóstico de la expresión inmunohistoquímica de la E-Cadherina en pacientes con COCE. Estos autores determinaron que, si se utiliza junto con otros indicadores clínicos e histológicos, la baja expresión de E-Cadherina puede ser un marcador tumoral fiable, ya que indica mayor invasividad y metástasis lo que se asocia a mal pronóstico.

2.2.1.1.2. N-Cadherina

La N-Cadherina es una glicoproteína transmembrana que media la formación e integridad estructural de los vasos sanguíneos (Blaschuk, 2015). Esta proteína fue identificada en la década de los ochenta por dos grupos de investigación Geiger y cols. y Hatta & Takeichi, quienes documentaron que esta proteína tenía dominios extracelulares, transmembrana y citoplasmáticos. Del mismo modo, estos investigadores confirmaron que la N-Cadherina era una molécula de adhesión celular dependiente de calcio (Geiger y cols., 1985; Hatta y Takeichi, 1986; Blaschuk, 2015). La

N-Cadherina participa en la unión intercelular, aunque predomina más en fibroblastos. Y se considera que su adhesión es más dinámica y menos estable que la E-Cadherina (Mrozik y cols., 2018).

La N-Cadherina también se ha asociado con el proceso TEM en varios tipos de tumores (Wang y cols., 2016). Se ha observado como la N-Cadherina juega un papel importante en la regulación de la proliferación, invasión y metástasis de las células cancerosas (Blaschuk, 2015). Wang y cols. observaron como la N-Cadherina podía modular la invasión y migración celular en casos de cáncer de próstata (Wang y cols., 2016). Esto puede deberse a que la N-Cadherina está íntimamente involucrada en la formación de vasos sanguíneos o angiogénesis, y también en el mantenimiento de la estabilidad de dichos vasos sanguíneos. Por tanto, la inhibición de la función de N-Cadherina desestabiliza los microvasos (Paik y cols., 2004). Se ha observado como el crecimiento de los tumores es dependiente de la N-Cadherina y, por tanto, los cambios en la expresión de esta molécula de adhesión celular pueden afectar al crecimiento tumoral (Blaschuk, 2015).

En estudios de investigación se ha observado como la N-Cadherina sirve como un marcador del proceso TEM y su expresión se ha correlacionado con el desarrollo de varios tipos de carcinomas (Jennbacken y cols., 2010; Hui y cols., 2013; Wang y cols., 2016). Por ejemplo, hay estudios que muestran como la N-Cadherina favorece la adhesión entre las células cancerígenas y el estroma en el cáncer de mama. Y también como la sobreexpresión de N-Cadherina se asocia a una mayor invasión en este tipo de carcinomas (Hazan y cols., 2000; Wang y cols., 2016). Por este motivo, la sobreexpresión de N-Cadherina se ha asociado con un peor pronóstico, ya que aumenta el potencial de invasión tumoral (Hazan y cols., 2000; Jennbacken y cols., 2010).

Existen diversos estudios que han demostrado como la pérdida de E-Cadherina y la sobreexpresión de N-Cadherina hace que las células tumorales pierdan su polaridad, sean más resistentes a la apoptosis y adquieran un potencial invasivo y metastásico. Por lo tanto, los antagonistas de la N-Cadherina podrían tener potencial para facilitar la apoptosis de células tumorales y suprimir la metástasis (Blaschuk, 2015). La capacidad de la N-Cadherina para regular el comportamiento de las células tumorales se ha

atribuido en parte a la interacción y activación del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (Blaschuk, 2015). Por tanto, la interrupción de las interacciones intercelulares de N-Cadherina utilizando antagonistas podría ser una estrategia novedosa y prometedora para el tratamiento del cáncer (Blaschuk, 2015).

Respecto al carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, se ha observado como la disminución de los niveles de E-Cadherina (que promueve la adhesión de células epiteliales) se asocia con un aumento de N-Cadherina (que favorece la invasión y migración celular). Este proceso se ha denominado "*Cadherin switching*" (Zeisberg y Neilson, 2009) y se caracteriza por la regulación a la baja de la expresión de E-Cadherina y la sobreexpresión de la N-Cadherina. Esta alteración se ha observado en el proceso TEM. Las uniones intercelulares mediadas por E-Cadherina se disocian debido a su menor expresión, mientras que la N-Cadherina establece una unión relativamente débil (Mrozik y cols., 2018; Loh y cols., 2019).

Por otro lado, la metástasis es una de las principales causas de mortalidad relacionada con el cáncer. Dentro de los tumores primarios, la metástasis se caracteriza por la invasión localizada en el microambiente circundante, la entrada en el sistema vascular y la posterior diseminación a órganos distantes. En muchos cánceres epiteliales, la metástasis se ve facilitada por la reprogramación genética y la transición de las células cancerosas de un fenotipo epitelial a un fenotipo mesenquimal (Mrozik y cols., 2018). El "*Cadherin switching*" en el proceso TEM se asocia con características migratorias e invasivas, lo que provoca una menor tasa de supervivencia de los pacientes (Loh y cols., 2019).

En lo relativo al COCE existen estudios que han observado estos procesos. Por ejemplo, Angadi y cols. observaron mediante técnicas de inmunohistoquímica una reducción en la expresión de E-Cadherina junto a una sobreexpresión de N-Cadherina en el 80% de las muestras de COCE (Angadi y cols., 2016). Esto coincide con los resultados Chandolia y cols. que mostraron como la N-cadherina estaba sobreexpresada en casos de COCE. Además, estos autores observaron como el nivel de expresión de N-Cadherina aumentaba a medida que el COCE progresaba, aunque no obtuvieron una asociación

significativa con el grado de diferenciación histológico del COCE (Chandolia y cols., 2017).

2.2.1.2. Vimentina

La Vimentina es una proteína que normalmente se encuentra en las células mesenquimales, aunque a veces se expresa en células epiteliales migratorias, células que aparecen normalmente durante la embriogénesis y también durante la cicatrización de heridas. Se considera que estas células migratorias son células epiteliales que adquieren características mesenquimales, lo que conlleva una capacidad migratoria aumentada y mayor capacidad de invasión. Se estima que la Vimentina es el componente principal del citoesqueleto de las células mesenquimales, y que por tanto regula la tumorigénesis, el proceso TEM y la diseminación metastásica del cáncer (Kidd y cols., 2014). Su sobreexpresión patológica en las células epiteliales orales se ha asociado con mayor invasión tumoral y metástasis (Chaw y cols., 2012).

Existen autores que han estudiado los marcadores clásicos del proceso TEM y han observado como los niveles de Vimentina se encuentran sobreexpresados en muestras de COCE linguales respecto a muestras de mucosa oral sana (Zhang y cols., 2017). Zhang y cols. estudiaron la expresión de Vimentina mediante inmunohistoquímica en dichos tumores, observando que la expresión de E-Cadherina se encontraba disminuida y que la Vimentina estaba significativamente aumentada en dichas muestras en comparación con los tejidos de la mucosa oral no neoplásica (Zhang y cols., 2017). También en un estudio previo, llevado a cabo por Chaw y cols., se observó que la expresión de ARN de Vimentina fue 3,7 veces mayor en muestras de COCE respecto a tejidos sanos (Chaw y cols., 2012).

Existen trabajos que han mostrado como la mayor expresión de Vimentina se asocia a la recurrencia del COCE lingual (Zhang y cols., 2017). También se ha analizado la Vimentina en cáncer de células escamosas de cabeza y cuello. Existen autores que analizaron mediante inmunohistoquímica la expresión de E-Cadherina y Vimentina y observaron que había una asociación significativa entre la alta expresión de Vimentina y la metástasis a distancia. Pero no observaron una asociación significativa entre la

expresión de Vimentina y la supervivencia de los pacientes (Kim y cols., 2014). También, existen autores que han mostrado como las células de los carcinomas epiteliales adquieren marcadores mesenquimales como la Vimentina y que esto se asocia a una mayor invasión y potencial metastásico (Zeisberg y Neilson, 2009).

Por otro lado, existen trabajos que han mostrado como la expresión de Vimentina aumenta de forma gradual en mucosa sana, fibrosis oral submucosa y COCE, siendo mayor en COCE. Por tanto, los niveles de Vimentina aumentan en trastornos orales potencialmente malignos y alcanza valores superiores en el COCE (Aggarwal y cols., 2022).

En conclusión, en el COCE se observa como la expresión de E-Cadherina disminuye, y la expresión de N-Cadherina y Vimentina aumentan (Smith y cols., 2013). Además, estos cambios se asocian con mayor frecuencia de metástasis a distancia y una disminución de la supervivencia en pacientes con cáncer de cabeza y cuello (Gold y Kim, 2009; Smith y cols., 2013).

2.2.2. Genes implicados en TEM

Los siguientes genes que vamos a describir se han visto asociados al proceso TEM y codifican para proteínas que llevan su mismo nombre. En este apartado no se van a desarrollar, por tanto, los genes de las proteínas previamente comentadas en el apartado anterior. A continuación, se describen algunos de los genes asociados al proceso TEM en COCE.

2.2.2.1. Aldehído deshidrogenasa (ALDH)

Se trata de una familia de proteínas codificadas por el gen del mismo nombre. Dentro de esta familia destacamos la ALDH1 (aldehído deshidrogenasa 1), que es un marcador utilizado para identificar, aislar y rastrear células madre cancerosas en diversos tipos de tumores sólidos humanos (Tian y cols., 2018). La ALDH se ha relacionado con una mayor transformación maligna de los trastornos orales potencialmente malignos (Dionne y cols., 2014). En un estudio recientemente publicado, Dhumal y cols. analizaron la expresión

de las ALDH1 en COCE, trastornos orales potencialmente malignos y muestras sanas. Estos autores observaron una diferencia estadísticamente significativa de los niveles de ALDH1 entre los tres grupos, observándose una mayor expresión en COCE. Además, dentro de los trastornos orales potencialmente malignos, el nivel de ALDH1 fue estadísticamente mayor en las lesiones con displasia en comparación con las lesiones sin displasia, lo que sugiere que ALDH1 puede ser un marcador asociado a displasia y malignización (Dhumal y cols., 2022). También se ha observado una sobreexpresión de ARNm de ALDH1 en cáncer de cabeza y cuello, además la sobreexpresión del ARN de ALDH1 en tumores primarios se asoció con metástasis regionales y peor evolución del paciente. Los autores justifican que estos resultados desfavorables se relacionan con el proceso TEM (Vieira y cols., 2020).

2.2.2.2. AT Rich Interaction Domain (ARID)

Este gen codifica a una proteína encargada de la regulación transcripcional y moduladora del ciclo celular. Esta proteína tiene la capacidad de reparar daños producidos en el ADN, por lo que también se considera un supresor tumoral. Se ha observado una disminución de su expresión en diferentes tipos de carcinomas (Jiang y cols., 2020; Wu y cols., 2020). La familia de genes y proteínas ARID, engloba 15 subtipos diferentes, estudiados en los genomas de humanos, ratones y perros (Wilsker y cols., 2005). En el CO, ARID2 ha sido ampliamente estudiado. Shukla y cols. estudiaron la expresión de ARID2 en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, y observaron como la disminución de su expresión se asociaba a mal pronóstico. Además, este estudio es el primero en demostrar como la disminución de expresión de ARID2 favorece el proceso TEM en COCE (Shukla y cols., 2022). También, existen otros trabajos que muestran como la baja expresión de ARID2 facilita el proceso TEM en CO. De hecho, la alta expresión de ARID2 se relacionó significativamente con la ausencia de metástasis ganglionares en CO, una disminución del tamaño del tumor y, por tanto, con estadios clínicos menos avanzados de la clasificación TNM y con tumores bien y moderadamente diferenciados (Wu y cols., 2020).

2.2.2.3. Ribonucleoproteína C nuclear heterogénea (HNRNPC)

Este gen codifica para una proteína de unión y expresión de ARN considerada como un biomarcador de mal pronóstico en diferentes tipos de carcinomas (Huang y cols., 2020; Liu y cols., 2019; Hou y cols., 2020). Se ha observado como HNRNPC promueve el proceso TEM en COCE y cáncer de esófago (Zhang y cols., 2019). En el caso del CO, los altos niveles de expresión de HNRNPC se han asociado de forma significativa con estadios más avanzados de la clasificación TNM. Además, se ha observado como los pacientes con COCE con niveles altos de HNRNPC sufren más metástasis a distancia, aunque de forma no estadísticamente significativa (Huang y cols., 2020).

2.2.2.4. Integrina alfa (ITGA)

Este gen codifica para la proteína ITGA implicada en la adhesión, proliferación y migración celular (Wang y cols., 2020). Las integrinas son una superfamilia de glucoproteínas que participan mayoritariamente en la unión de las células con la matriz extracelular, y se han relacionado con el proceso TEM y con el mal pronóstico de algunos tipos de carcinomas (Xiao y cols., 2018; Wang y cols., 2020; Deng y cols., 2019). Dentro de esta familia, se ha investigado el papel que juega ITGA5 en el CO. La alta expresión de ITGA5 se ha asociado con estadios clínicos más avanzados de la clasificación TNM y peor pronóstico del CO (Deng y cols., 2019). Existen estudios realizados en líneas celulares, que han mostrado como las células con niveles más altos de ITGA5 migraron e invadieron más fácilmente que aquellas con baja expresión, y mostraron tasas de proliferación celular más altas. Así mismo, se observó que tanto los niveles proteicos como de ARN de los marcadores mesenquimales N-Cadherina, Vimentina y Snail se incrementaron en las células con niveles más altos de ITGA5, mientras que los marcadores epiteliales como la E-Cadherina disminuyeron (Deng y cols., 2019).

2.2.2.5. Gen de la proteína 1 que interactúa con DAZ (DZIP1)

Este gen codifica para una proteína implicada en diversas vías de señalización que tiene funciones de circulación del ARN. Se ha visto como el aumento de expresión de DZIP1, uno de los tipos de DAZ, promueve la proliferación, migración e invasión del COCE. Además, la sobreexpresión de DZIP1 promueve el proceso TEM en CO (Yan y cols., 2019).

En lo relativo al proceso TEM en casos de COCE, se ha observado que la expresión de los marcadores mesenquimales como N-Cadherina, Snail y Vimentina aumentaron con la sobreexpresión de DZIP1 y disminuyeron en casos de menor expresión de DZIP1. Por tanto, DZIP1 promueve la proliferación, invasión y migración a través del proceso TEM (Yan y cols., 2019).

2.2.2.6. Gen del *high mobility group proteins characterized by an AT-hook* (HMGA)

Este gen codifica para proteínas cromosómicas no histonas encargadas de regular la transcripción de genes. Estas proteínas se encuentran sobreexpresadas durante el desarrollo embrionario y generalmente están presentes en diversas neoplasias malignas. Este gen se considera un regulador clave en el desarrollo del cáncer y la metástasis (Mahmood y cols., 2021).

HMGA2 en relación con el proceso TEM ha sido estudiada en otros tipos de cáncer. Por ejemplo, Hawsawi y cols. han determinado que HMGA2 puede promover el proceso TEM en el cáncer de próstata (Hawsawi y cols., 2018). En lo que respecta al CO, se ha observado que la alta expresión de HMGA2 promueve el proceso TEM, y además se ha relacionado su alta expresión con estadios clínicos más avanzados y peor pronóstico de los pacientes con COCE (Zhao y cols., 2016; Zhang y cols., 2017). Además, Zhang y cols. evaluaron la recurrencia de los pacientes con COCE y determinaron que aquellos que exhibían mayor expresión de HMGA2 presentaban mayores tasas de recurrencia (Zhang y cols., 2017).

2.2.2.7. Gen del factor de unión rico en serina/arginina (SRSF)

Este gen codifica para un grupo de proteínas que median la unión del ARN y se encuentran involucradas en la integridad del genoma. Las proteínas asociadas a este gen se encuentran sobreexpresadas en algunos carcinomas (Corbo y cols., 2012; Xu y cols., 2019).

Dentro de este grupo cabe destacar SRSF3. La sobreexpresión de SRSF3 se ha asociado con el proceso de TEM en el CO, observando como una mayor expresión de SRSF3 se asocia con estadios clínicos más avanzados de la clasificación TNM y un peor pronóstico de la enfermedad. También la sobreexpresión de SRSF3 se ha asociado con metástasis en ganglios linfáticos cervicales (Peiqi y cols., 2016).

2.2.3. Factores de transcripción (FT) asociados a TEM

Un factor de transcripción es, por definición, cualquier proteína necesaria para iniciar el proceso de transcripción (Atlas Genetics Oncology, 2022). La transcripción es el proceso de generación de una copia de ARN a partir de una secuencia de ADN de un gen. En los seres humanos, el ARN se desplaza desde el núcleo celular al citoplasma de la célula donde se usa para sintetizar la proteína codificada (National Human Research Institute, 2022). Muchos de los factores de transcripción actúan mediante el reconocimiento de posiciones que forman parte de los promotores o intensificadores de los genes (Atlas Genetics Oncology, 2022).

Los FTs asociados al proceso TEM (FT-TEM) favorecen la progresión del cáncer al promover la invasión y la resistencia a los fármacos (Nieto, 2017). A continuación, se describirán los más frecuentemente asociados al proceso TEM.

2.2.3.1. Snail o Snail1

Snail, también llamado Snail1, es un regulador clave del proceso TEM por su función en la progresión del cáncer (Morais y cols., 2023). Se ha visto como aumenta la resistencia

a los medicamentos antitumorales y la invasión de células cancerosas (Zhao y cols., 2016). Zhao y cols. analizaron la expresión de E-Cadherina, Vimentina y Snail en COCE lingual. Mediante técnicas de Western Blott, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia midieron la expresión y localización de los marcadores clásicos del proceso TEM tanto en COCE lingual como en tejidos sanos. Observaron cómo los tejidos de COCE lingual pobremente diferenciados expresaban niveles mucho más altos de Snail y Vimentina, pero un nivel más bajo de E-Cadherina que los tejidos de COCE lingual bien diferenciados. Snail estaba sobreexpresado en casos de metástasis ganglionar, lo que sugiere que puede desempeñar un papel importante en el proceso de metástasis a través del proceso TEM en el COCE lingual (Zhao y cols., 2016).

Estos mismos autores analizaron la importancia clínico-patológica y pronóstica de Snail en el COCE lingual mediante inmunohistoquímica. En este trabajo se observó como la expresión de Snail se asoció significativamente con el estadio clínico, la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos, el grado de diferenciación histológica y la supervivencia de los pacientes. Por tanto, se sugiere que la sobreexpresión de Snail en COCE lingual se asocia a una mayor progresión del cáncer, a metástasis y un peor pronóstico (Zhao y cols., 2016). Otros autores, como Gold y Kim, también han observado como la sobreexpresión de Snail se asociaba con la metástasis y el mal pronóstico del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Gold y Kim, 2009).

En un estudio reciente, Morais y cols., evaluaron el impacto que tiene Snail en la apoptosis, proliferación, migración e invasión celular en casos de COCE lingual. Determinaron que el silenciamiento de Snail provocaba un aumento de la expresión de E-Cadherina y suprimía la expresión de Vimentina en líneas celulares de COCE. Además, el silenciamiento de Snail frenaba la capacidad proliferativa de las células cancerígenas. Por tanto, estos autores sugieren que Snail juega un papel clave en el proceso TEM, y sugieren que puede ser una diana terapéutica por su capacidad para inhibir la migración e invasión celular (Morais y cols., 2023).

2.2.3.2. Slug o Snail2

Slug, también denominado Snail 2, es un FT asociado a TEM que se expresa más en células cancerígenas y se ha involucrado en el agravamiento de ciertos tumores. Durante el proceso TEM, Snail y Slug reprimen la transcripción de E-Cadherina. Slug y Snail se expresan de manera aberrante en algunos tipos de cánceres y regulan muchos tipos de procesos, como la proliferación celular y la apoptosis. De hecho, se ha observado como Slug aumenta la resistencia a los fármacos antitumorales incrementando las propiedades invasivas del tumor (Nakamura y cols., 2018).

Nakamura y cols. demostraron que los niveles de Slug estaban elevados en las células de COCE humanas. Del mismo modo, observaron como las células que tienen Slug silenciado presentaban mayor sensibilidad a los fármacos antitumorales. Estos autores también detectaron presencia de Slug en la mayoría de las líneas celulares del COCE, observando como la expresión de este FT era mayor en muestras de COCE que en tejidos sanos (Nakamura y cols., 2018).

En el cáncer de cabeza y cuello se ha podido evidenciar como el ARN de Slug se expresa más que en células cancerosas de otros tumores. Por lo tanto, Slug puede desempeñar un papel importante en la progresión del cáncer en las células de COCE (Nakamura y cols., 2018).

2.2.3.3. Twist

El FT Twist es considerado un regulador de la morfogénesis embrionaria por su capacidad para reorganizar tejidos jugando un papel esencial en la metástasis (Castañón y Baylies, 2002). Yang y cols. estudiaron la expresión de ARN de Twist mediante la reacción cuantitativa de la cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) en células tumorales y células epiteliales sanas de mamíferos, observando como Twist contribuía a las metástasis al promover el proceso TEM. Estos autores también pudieron ver como Twist provocaba directa o indirectamente la represión de transcripción de E-Cadherina y promovía el crecimiento tumoral (Yang y cols., 2004).

También Zhao y cols., estudiaron la expresión de Twist en COCE lingual en tejidos y en líneas celulares. Para ello, estudiaron su ARN y proteínas codificadas, utilizando técnicas de RT-PCR y técnicas de inmunohistoquímica. Estos autores comprobaron como Snail y Twist se asociaban al desarrollo de metástasis en COCE lingual y afirmaron que la activación de Snail y Twist puede inducir el proceso TEM. El aumento de expresión de Snail y Twist provoca una mayor progresión del cáncer, metástasis y mal pronóstico del COCE (Zhao y cols., 2016).

2.2.3.4. E47

El FT E47 es un represor directo de la E-Cadherina y un inductor del proceso TEM (Zhu y cols. 2016). Se ha estudiado su presencia en diversos tipos de carcinomas, como por ejemplo el cáncer de colon. En este trabajo se observó como al disminuir la expresión de E-Cadherina, disminuía la adhesión célula-célula, aumentaba la migración celular y la invasión in vitro, promoviendo la metástasis en un modelo de xenoinjerto de cáncer de colon. Además, se observó que la alta expresión de E47 se asociaba con carcinomas de colon más agresivos (Zhu y cols. 2016). Pero, no existen estudios sobre el papel de FT E47 en COCE.

2.2.3.5. Zinc finger E-box binding (ZEB)

La familia del FT ZEB juega un papel clave durante el desarrollo embrionario y la diferenciación celular. Los FTs ZEB son capaces de inducir el proceso TEM. Se ha observado como la sobreexpresión de ZEB se asocia con una mayor agresividad y metástasis de numerosos carcinomas humanos primarios en modelos de ratón. La familia ZEB comprende dos proteínas, ZEB1 y ZEB2. Ambas proteínas ZEB han ido cobrando importancia en el campo de la oncología por su papel en la tumorigénesis, la invasividad y las metástasis tumorales. Además, se han asociado con una mayor resistencia a la quimioterapia y otros tratamientos oncológicos (Sánchez-Tillo y cols., 2011).

Existe un trabajo que ha analizado la expresión de ZEB1 y E-Cadherina en pacientes con COCE. Para ello utilizaron técnicas de inmunohistoquímica. Observaron expresión de ZEB1 en el 53,3% de los casos de COCE y de E-Cadherina en el 44,2%. La expresión de ZEB1 se asoció de forma significativa con una mayor tasa de recurrencia y metástasis en los ganglios linfáticos. En este trabajo también se analizó mediante RT-PCR la expresión de ZEB1 y se pudo ver como la expresión de ZEB1 fue mayor en casos de COCE respecto a tejidos sanos adyacentes. Además, estos autores observaron cómo los pacientes con alta expresión de ZEB1 y pérdida de expresión de E-Cadherina tenían un peor pronóstico del COCE (Yao y cols., 2017). En el caso de ZEB2, Kong y cols. estudiaron mediante inmunohistoquímica la expresión de algunos FTs asociados a TEM (Twist, Snail, Slug, ZEB1, ZEB2) y determinaron que la expresión de Twist y ZEB2 en COCE se asociaba significativamente con una supervivencia general más pobre, especialmente en pacientes sin metástasis en ganglios linfáticos cervicales (Kong y cols., 2015).

2.2.3.6. Mothers Against Decapaplegic homolog 7 (Smad7)

Smad7 es un inhibidor clave de la señalización del receptor del factor de crecimiento transformante β (TGF β) (Chen y cols., 2013; Ge y cols., 2016). Smad7 es considerado un potente regulador de la proliferación celular (Ge y cols., 2016). Otra de sus funciones es regular la alteración de la invasión de las células cancerosas a través de la conversión de células epiteliales a mesenquimales. Por ello, se considera un supresor tumoral (Ge y cols., 2016).

Existen contradicciones acerca del papel de Smad7 en la progresión del cáncer. Heikkinen y cols. estudiaron la expresión de Smad7 en muestras de COCE y otros cánceres orofaríngeos. Estos autores analizaron la presencia de Smad7 mediante Western Blot y PCR observando como en tejidos bien oxigenados (normoxia) Smad7 es un potente inhibidor de la invasión tumoral. Sin embargo, en situaciones de hipoxia la expresión de Smad7 está regulada al alza promoviendo la progresión tumoral. Hay que destacar que muchos de los tumores sólidos malignos son hipóxicos (Heikkinen y cols., 2010).

Por otro lado, Chen y cols. recogieron muestras de mucosa oral de 75 pacientes que tenían hiperplasia epitelial (n=20), displasia leve (n=11), displasia moderada y severa (n=11) y COCE (n=43). Estos autores analizaron mediante inmunohistoquímica la expresión de la proteína Smad7 y observaron un aumento significativo en Smad7 en tejidos humanos con displasia epitelial y COCE. Por tanto, esto indica que la sobreexpresión de Smad7 es un evento temprano en el desarrollo de CO. Y estos resultados sugieren que Smad7 es un marcador asociado a malignidad que favorece la transformación de lesiones de displasia epitelial oral a COCE (Chen y cols., 2013).

2.2.4. Factores de señalización asociados a TEM

Definimos una vía de señalización como el conjunto de reacciones químicas en las que un grupo de moléculas celulares trabajan juntas para controlar las funciones celulares, como la multiplicación o destrucción celular. Los factores de señalización ya sean hormonas o factores de crecimiento, se unen a un receptor específico y de esta manera envían una señal a la célula. La activación anormal de las vías de señalización puede producir algunas enfermedades, como el cáncer (Instituto Nacional del Cáncer, 2023). A continuación, describiremos algunos de los factores de señalización asociados al proceso TEM.

2.2.4.1. Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)

Los factores de crecimiento desempeñan un papel importante en varias etapas del desarrollo y morfogénesis, así como en los procesos de angiogénesis y cicatrización de heridas (Zakrzewska y cols., 2008).

Un ejemplo de este factor de crecimiento es el FGF-1. Debido a su participación en algunas funciones fisiológicas como la mitosis, angiogénesis y supervivencia celular, el FGF-1 puede contribuir al inicio y desarrollo del cáncer (Zakrzewska y cols., 2008).

Otro ejemplo es el FGF-2, asociado con la invasividad tumoral, la proliferación celular, la angiogénesis y las metástasis. En un estudio sobre COCE lingual, la expresión de FGF-2

regulación de varios procesos biológicos como la diferenciación celular, la proliferación, la apoptosis y en el desarrollo embrionario y tisular (Giner y cols., 2016).

Los ARNs largos no codificantes (lncRNAs por su nombre en inglés, *long noncoding RNAs*) son definidos como aquellas transcripciones de ARN que presentan al menos 200 nucleótidos de longitud (Atkinson y cols., 2012). Como regla general, se asume que estos ARNs no producen proteínas, aunque se ha observado que algunos de ellos podrían dar lugar a pequeños péptidos funcionales (Li y cols., 2017).

Recientemente se ha descubierto que estos tipos de ARN juegan un papel clave en el proceso TEM al regular la expresión de genes implicados en este proceso (Yang y cols., 2020). Algunos de estos tipos de ARN se han relacionados con malignidad y crecimiento tumoral en algunos carcinomas. Por ejemplo, Dan y cols. han relacionado la presencia de miR-21 con el crecimiento tumoral y metástasis del cáncer de mama (Dan y cols., 2021).

Con relación al CO, una revisión sistemática reciente concluyó que miR-21 es un marcador pronóstico en el CO. Estos autores consideran que estudiando miR-21 se puede definir el pronóstico del COCE en el momento del diagnóstico y hacer un abordaje terapéutico en función de su presencia (Dioguardi y cols., 2022). De igual forma, Scholtz y cols. analizaron la presencia de miR-345 y miR-31-5p en la saliva de pacientes con COCE. Estos autores observaron como estos micro-ARN se encontraban aumentados y podrían considerarse biomarcadores específicos del COCE, siendo de ayuda para realizar un diagnóstico temprano del mismo (Scholtz y cols., 2022).

3. JUSTIFICACIÓN

3. JUSTIFICACIÓN

El COCE es el tipo más frecuente de CO, siendo uno de los cánceres más prevalentes a nivel mundial (Graillon y cols., 2022). Este tipo de CO está frecuentemente asociado a invasión local y metástasis. Ello da lugar a bajas tasas de supervivencia a los 5 años, que varían del 15 al 60% (Zanoni y cols., 2019; Wangmo y cols., 2020).

El proceso TEM es un proceso dinámico en el que las células adquieren un fenotipo mesenquimal a medida que pierden sus características epiteliales. Las células cancerosas implicadas en el proceso TEM se vuelven más móviles, tienen mayor capacidad para autorrenovarse y pueden diferenciarse en diversos tipos de células tumorales (Yang y cols., 2020). El proceso TEM confiere a las células cancerosas un fenotipo invasivo que es crucial para invadir el tejido circundante y, posteriormente, llegar a localizaciones a distancia a través de los vasos sanguíneos o linfáticos para generar metástasis (Zidar y cols., 2018).

Algunos de los hallazgos acerca del papel que juega el proceso TEM en el COCE y en otros tumores han sido observados en modelos experimentales y en cultivos de líneas celulares (Chui, 2013), por lo que, hay autores que afirman que no hay evidencia clara del papel que juega el proceso TEM en la metástasis del cáncer *in vivo* (Chui, 2013; Tarin y cols., 2005; Tarin, 2012; Tarin, 2013).

Existen ciertos estudios que muestran como ciertas proteínas están asociadas al proceso TEM, pero todavía existen controversias. Una de ellas es la E-Cadherina. Existen autores que sostienen que la pérdida de E-Cadherina se asocia con el proceso TEM en varios tipos de cáncer, especialmente en cáncer de ovario, próstata y glioblastoma (Loh y cols., 2019). Por el contrario, otros investigadores sostienen que la baja expresión de E-Cadherina no necesariamente desencadena el proceso TEM (Hollestelle y cols., 2013). Por ello, sería interesante valorar qué papel juega en el COCE.

Otra discrepancia existente es el papel que juega el FT Smad7 en el proceso TEM. Algunos autores sostienen que en presencia de oxígeno es un inhibidor tumoral, pero en situaciones de hipoxia está sobreexpresado y promueve la progresión tumoral (Heikkinen y cols., 2010). Sin embargo, otros autores defienden un aumento significativo

de este FT en tejidos con displasia epitelial y COCE, sugiriendo que la sobreexpresión de Smad7 es un evento temprano en el desarrollo de COCE (Chen y cols., 2013).

Aparte de las controversias previamente comentadas, existe la necesidad de aportar una visión global sobre el proceso TEM en el COCE. Hasta la fecha, existen estudios publicados en la literatura científica sobre diferentes genes implicados en el proceso, pero que estudian genes particulares. En los últimos años, se ha investigado la expresión de múltiples genes en diferentes tipos de cáncer, incluido el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, como se puede observar en *The Cancer Genome Atlas* (Cerami y cols., 2012; The Cancer Genome Atlas Network, 2015). Sin embargo, no existen estudios previos publicados en la literatura científica sobre la firma de expresión de TEM en COCE. Por este motivo, estimamos que es oportuno realizar una revisión sistemática que aporte una visión global de los genes asociados al proceso TEM en el COCE.

Además, existen múltiples estudios que han valorado diferentes proteínas asociadas al proceso TEM en el COCE, como la E-Cadherina (Angadi y cols., 2016; López-Verdín y cols., 2019; Kadeh y cols., 2021), la N-Cadherina (Zeisberg y Neilson, 2009; Angadi y cols., 2016; Chandolia y cols., 2017) y la Vimentina (Chaw y cols., 2012; Kim y cols., 2014; Zhang y cols., 2017). También hay estudios sobre los FTs asociados al proceso TEM en el COCE como Snail (Gold y Kim, 2009; Zhao y cols., 2016), Slug (Nakamura y cols., 2018), Twist (Zhao y cols., 2016), ZEB1 (Yao y cols., 2017) y Smad7 (Heikkinen y cols., 2020; Chen y cols., 2013). Los estudios previamente mencionados valoran diferentes proteínas y FTs por separado, pero no analizan todos estos biomarcadores implicados en el proceso TEM al mismo tiempo en un amplio número de muestras de COCE. Además, algunos de estos marcadores asociados al proceso se han analizado en líneas celulares y no en muestras de tejidos de COCE en humanos. Y todavía no existen estudios que hayan evaluado qué papel juega E47 en el COCE.

Otro punto que es necesario estudiar es la asociación entre la expresión de los diferentes biomarcadores y las variables clínico-patológicas del COCE. Si bien es cierto que todos los autores concuerdan en que en el COCE existe una disminución de la expresión de E-Cadherina (López-Verdín y cols., 2019; Angadi y cols., 2016), no en todos los estudios los resultados fueron estadísticamente significativos. Y lo mismo sucede con la posible

asociación entre la expresión de E-Cadherina y los grados de diferenciación histológica del COCE (Angadi y cols., 2016; Kadeh y cols., 2021). Por tanto, creemos que es de interés realizar un nuevo estudio que analice de forma global la expresión de las proteínas implicadas en TEM como la E-Cadherina, N-Cadherina y Vimentina, así como de los FTs asociados a TEM Twist, Snail, Slug, Smad7, E47 y ZEB en un amplio número de pacientes con COCE en los que se hayan recogido variables clínico-patológicas asociadas al tumor y posteriormente hayan recibido tratamiento para el mismo y hayan sido seguidos durante un tiempo considerable. De ese modo, se podría asociar la expresión de los diferentes biomarcadores con las variables clínico-patológicas, el pronóstico y la supervivencia del COCE, ya que la evidencia científica disponible no deja claro si la expresión de las Cadherinas y la Vimentina, así como del resto de FTs-TEM, se asocian a dichas variables (Takkunen y cols., 2006; Wangmo y cols., 2020; Scanlon y cols., 2013).

Además, sería interesante valorar si la expresión de los diferentes biomarcadores asociados a TEM se relacionan entre sí, ya que no todos los estudios disponibles evalúan este punto.

Creemos que el estudiar los genes, proteínas y FT implicados al proceso TEM en el COCE ayudará a esclarecer si el estudio de estos biomarcadores puede ayudar a predecir el pronóstico de los pacientes y, por tanto, a definir los casos de COCE con peor pronóstico. Ello podría ayudar a establecer tratamientos individualizados en función de cada caso, aumentando la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes con COCE.

4. HIPÓTESIS

4. HIPÓTESIS

4.1. Hipótesis general

En los pacientes con COCE se pueden identificar genes, proteínas y FTs alterados asociados al proceso TEM. ¿La expresión de estos biomarcadores se asocia a las variables clínico-patológicas del COCE y a un peor pronóstico?

1.2. Hipótesis específicas

1. ¿Existe evidencia científica que muestre que los pacientes con COCE presentan alteraciones en ciertos genes asociados al proceso TEM?
2. ¿Existe una expresión alterada de las proteínas y FTs asociados a TEM en el COCE?
3. ¿Existe una asociación entre la expresión de proteínas y FTs implicados en el proceso de TEM en el COCE?
4. ¿Existe una asociación entre la expresión de genes, proteínas y FTs implicados en el proceso de TEM en el COCE y las variables clínico-patológicas y pronóstico del mismo?
5. ¿El tipo de proceso TEM (completo, parcial o ausente) influye en el pronóstico del COCE?

5. OBJETIVOS

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo principal

Evaluar los genes, proteínas y FTs implicados en el proceso TEM en el COCE.

5.2. Objetivos específicos

1. Realizar una revisión sistemática para estudiar la expresión de los genes implicados en el proceso TEM en el COCE confirmados por la expresión de proteínas y su posible asociación con las variables pronósticas del COCE.
2. Analizar la expresión de proteínas y FTs implicados en el proceso TEM en una muestra de pacientes con COCE.
3. Analizar si la expresión de las proteínas y los FTs implicados en el proceso TEM en COCE se asocian entre sí.
4. Valorar si la expresión de proteínas y FTs vinculados al proceso TEM se asocian a variables clínico-patológicas del COCE relacionadas con un peor pronóstico.
5. Estimar la relevancia pronóstica del proceso TEM, según sea completa, parcial o ausente.

6. MATERIAL Y MÉTODO

6. MATERIAL Y METODO

6.1. Revisión sistemática de los genes implicados en el proceso TEM en el COCE

6.1.1. Tipo de Estudio

Revisión sistemática realizada siguiendo las guías PRISMA, por sus siglas en inglés: *“Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analysis Protocols”* (Moher y cols., 2009).

6.1.2. Pregunta PICO

La pregunta estructurada planteada que pretende resolver esta revisión sistemática es la siguiente: ¿Existe algún cambio en la expresión de los genes implicados en el proceso TEM en pacientes que sufren COCE?

La población de estudio fueron aquellos pacientes con COCE diagnosticados clínica e histológicamente que aún no habían recibido tratamiento oncológico. En las muestras de COCE de estos pacientes se debían evaluar los genes relacionados con el proceso TEM. Se definió como CO aquellos tumores localizados en el labio o en la cavidad oral, incluyendo aquellos que aparecían en la mucosa yugal y los labios, los dos tercios anteriores de la lengua, la encía, el suelo de la boca, el paladar duro y el triángulo retromolar (National Cancer Institute, 2020). El cáncer oral se desarrolla a partir de la mucosa oral. Mandíbula y maxilar superior son huesos. Si se desarrolla un cáncer en ellos (por ejemplo, un carcinoma intraóseo primitivo) se trata de un cáncer maxilar o mandibular, no oral. Obviamente, el cáncer oral puede invadir los maxilares en el curso de su progresión.

Para validar la asociación de los genes con el proceso TEM, en los estudios se debía analizar la expresión de las proteínas asociadas a dicho proceso. Además, la expresión de estas proteínas podía ser asociada a los datos demográficos, clínicos y pronósticos de

los pacientes con COCE. Dentro de estas variables se incluyeron la localización y el tamaño (T) del tumor, la presencia de ganglios linfáticos regionales afectados (N), la presencia de metástasis a distancia (M), el estadio clínico según la clasificación TNM, el grado histológico, el grado de diferenciación tumoral y la recurrencia. No fue necesario que los estudios incluidos evaluaran todas las variables clínico-patológicas anteriormente comentadas para ser incluidos en la revisión sistemática.

6.1.3. Criterios de inclusión y exclusión

Se incluyeron estudios longitudinales prospectivos y retrospectivos, sin restricción de fecha inicial y con fecha límite de búsqueda a 17 de septiembre del 2020.

Dichos estudios debían:

- a) Comparar la alta y baja expresión de las proteínas codificadas por los genes implicados en el proceso TEM.
- b) Incluir pacientes diagnosticados clínica e histológicamente de COCE.
- c) Recoger los resultados de los genes y proteínas seleccionadas antes de recibir los pacientes ningún tratamiento para el COCE.
- d) Ser estudios realizados exclusivamente en humanos.
- e) Ser estudios con disponibilidad a texto completo.
- f) Ser estudios escritos en inglés.
- g) Ser estudios publicados en revistas científicas con revisión por pares.

Los criterios de exclusión fueron:

- a) Ser estudios no realizados sobre muestras de pacientes con COCE.
- b) Ser estudios llevados a cabo en líneas celulares.
- c) Ser estudios sobre ARN largo no codificante y microARN.

- d) Tener los siguientes diseños de estudio: revisiones bibliográficas, casos clínicos, estudios piloto, estudios preliminares, estudios experimentales y capítulos de libro.

6.1.4. Fuentes de información y estrategia de búsqueda

Se realizó una búsqueda exhaustiva de la literatura científica sin restricción de fecha inicial hasta el 17 de septiembre del 2020 en las bases de datos electrónicas: Pubmed/MEDLINE, Web of Science, Cochrane Library y Scopus.

Esta revisión sistemática fue registrada previamente en PROSPERO (*International Prospective Register of Systematic Reviews*) con el número de registro: CRD42020204101.

La estrategia de búsqueda realizada que fue adaptada a las diferentes bases de datos fue la siguiente:

((oral cancer) OR (mouth cancer) OR (tongue cancer) OR (oral squamous cell carcinoma) OR (oscc) OR (tongue squamous cell carcinoma) OR (tscc) OR (oral tongue squamous cell carcinoma) OR (otscc) OR (oral neoplasm) OR (mouth neoplasm)) AND ((epithelial mesenchymal transition) OR (epithelial-to-mesenchymal transition) OR (epithelial-mesenchymal transition marker) OR (epithelial-mesenchymal transition cascade) OR (EMT) OR (epithelial mesenchymal transition genes)).

6.1.5. Registro de los estudios

Dos investigadores, Carmen Vallina (CV) y José González-Serrano (JGS), de forma independiente realizaron las búsquedas y compararon los resultados de las búsquedas realizadas en cada base de datos para garantizar la integridad de la búsqueda y eliminar los duplicados. Ambos revisores examinaron por separado los títulos completos y los resúmenes de los artículos identificados. Tras esta evaluación, los dos investigadores seleccionaron para revisar el texto completo los trabajos de investigación que cumplieran los criterios de elegibilidad anteriormente descritos. Cualquier discrepancia en la

inclusión de los estudios fue discutida con un tercer revisor, Corina Lorz (CL), hasta conseguir un consenso. Además, se revisaron las referencias bibliográficas de los estudios incluidos para valorar la posible inclusión de otros artículos previamente no identificados en la búsqueda bibliográfica.

6.1.6. Recogida de datos

Los artículos seleccionados en base a los criterios de inclusión fueron revisados por CV y JGS, quienes extrajeron los datos. Los datos que se extrajeron de los diferentes trabajos de investigación incluidos fueron los siguientes:

- a) Las características generales de los estudios: título del artículo, primer autor, año de publicación, tipo de estudio, revista en la que estaba publicado, centro/hospital y país donde fueron llevados a cabo.
- b) Genes estudiados y pruebas utilizadas para el análisis de los genes y proteínas asociadas al proceso TEM expresadas por dichos genes.
- c) Datos sobre las proteínas asociadas al proceso TEM expresadas por los genes estudiados en cada estudio incluido en relación con las características de los pacientes con COCE (sexo, edad, hábitos de consumo de tabaco y alcohol) y las variables clínico-patológicas (tamaño, localización, afectación ganglionar, metástasis a distancia, estadio clínico, grado histológico, seguimiento, recurrencia y pronóstico).

6.1.7. Riesgo de sesgo individual de los estudios

La calidad metodológica de los estudios incluidos fue evaluada por CV y JGS de forma independiente (CV, JGS). Para la evaluación se utilizó la herramienta Newcastle-Ottawa (Wells y cols., 2021). Esta escala contiene tres secciones o apartados principales (selección, comparabilidad y resultados) con un total de 8 ítems.

El apartado “Selección” tiene cuatro ítems o subapartados: la representatividad de la cohorte expuesta, la selección de la cohorte no expuesta, la determinación de la exposición y la demostración de que el resultado de interés no estaba presente al comienzo del estudio.

El apartado “Comparabilidad” solamente presenta un ítem o subapartado que incluye la comparabilidad de las cohortes sobre la base del diseño o el análisis.

Y el apartado “Resultados” cuenta con tres ítems: la evaluación de los resultados, el apartado que evalúa si el seguimiento fue lo suficientemente prolongado en el tiempo para que se produjeran los resultados, y por último la adecuación del seguimiento de las cohortes.

Con la herramienta Newcastle-Ottawa se puede otorgar un máximo de una estrella/puntos por cada ítem del apartado de “Selección” y “Resultados”, y dos por “Comparabilidad”. Por ello, cada estudio puede tener un máximo de nueve estrellas o puntos.

Tras realizar esta evaluación, los estudios fueron clasificados en calidad buena, media y baja según las recomendaciones de la *Agency for Healthcare Research and Quality's* (AHRQ). Esta agencia propone el siguiente algoritmo de puntuación (McPheeters y cols., 2012):

- Buena calidad: ≥ 3 estrellas en “Selección” y 1-2 estrellas en “Comparabilidad” y ≥ 2 estrellas en “Resultados”.
- Calidad media: 2 estrellas en “Selección”, ≥ 1 estrella en “Comparabilidad” y ≥ 2 estrellas en “Resultados”.
- Baja calidad: 0-1 estrella en “Selección”, 0 estrellas en “Comparabilidad” y 0-1 estrella en “Resultados”.

La tabla 2 resume los ítems, subapartados y puntuación máxima de la herramienta Newcastle-Ottawa y de las recomendaciones de la AHRQ.

Tabla 2. Escala de Newcastle-Ottawa (McPheeters y cols., 2012) y recomendaciones de la AHRQ.

Apartados principales	Selección				Comparabilidad	Resultados			Resultado AHRQ
Ítems o subapartados	Representatividad de la cohorte expuesta	Selección de la cohorte no expuesta	Determinación de la exposición	Demostración de que el resultado de interés no estaba presente al inicio del estudio	Comparabilidad de cohortes sobre la base del diseño o análisis controlado por factores de confusión	Evaluación del resultado	¿El seguimiento fue suficientemente prolongado para que se produjeran los resultados?	Adecuación del seguimiento de las cohortes	
Puntuación en cada ítem	Máximo 1*	Máximo 1*	Máximo 1*	Máximo 1*	Máximo 2 *	Máximo 1*	Máximo 1*	Máximo 1*	Máximo 9 *
Buena calidad	3 ó 4*				1 ó 2 *	2 ó 3 *			Buena calidad
Calidad media	2 *				1 ó 2 *	2 ó 3 *			Calidad media
Baja calidad	0 ó 1 *				0 *	0 ó 1 *			Baja calidad

AHRQ, Agency for Healthcare Research and Quality's; *, estrella o punto.

6.2. Análisis de proteínas y factores de transcripción asociados al proceso TEM en COCE.

6.2.1. Tipo de Estudio

El estudio realizado fue un estudio de cohortes retrospectivo.

Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fueron aprobados por el Comité Ético Institucional del Hospital Universitario Central de Asturias y por el Comité Ético Regional del Principado de Asturias (fecha de aprobación 14 de mayo de 2019; número de aprobación 136/19, para el proyecto PI19/01255). Debido a la naturaleza retrospectiva del estudio, no fue necesario el consentimiento informado por escrito de los pacientes.

6.2.2. Pacientes y muestras de tejido

Se recogieron retrospectivamente muestras de tejido quirúrgico de 165 pacientes con COCE confirmado histológicamente. Dichos pacientes se sometieron a tratamiento quirúrgico con fines curativos en el Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) entre el 1 de marzo de 2000 y el 31 de diciembre de 2010, de acuerdo con las directrices aprobadas por la Junta de revisión institucional.

Las muestras de tejido fueron proporcionadas por el Biobanco del Principado de Asturias (PT17/0015/0023), integrado en la Red Nacional de Biobancos de España, y se obtuvieron áreas tisulares representativas de los 165 COCE a partir de bloques embebidos en parafina de archivo para construir microarrays tisulares como se describió anteriormente en el estudio de De Vicente y cols. (De Vicente y cols., 2017).

6.2.3. Criterios de inclusión y exclusión

Los criterios de inclusión de los casos incluidos en el estudio fueron:

- a) Muestras de tejido de pacientes diagnosticados clínica e histológicamente de COCE.
- b) Los pacientes debían haber recibido resección radical del tumor primario con disección simultánea de ganglios linfáticos del cuello. El estadio de la enfermedad se definió de acuerdo con la octava edición del Manual de estadificación del cáncer del *American Joint Committee on Cancer* (Lydiatt y cols., 2017).
- c) El seguimiento de los pacientes debía ser de al menos 5 años en los casos censurados.

Los criterios exclusión establecidos fueron:

- a) Pacientes que no pudieron ser seguidos porque fallecieron en el postoperatorio.
- b) Pacientes sin suficiente material histológico archivado para realizar los estudios de inmunohistoquímica.

6.2.4. Variables clínico-patológicas recogidas

Los datos clínico-patológicos se recogieron de las historias clínicas electrónicas de los pacientes.

Las variables clínicas asociadas al paciente recogidas fueron las siguientes:

- a) Sexo: hombre o mujer.
- b) Consumo de tabaco: fumador o no fumador.
- c) Consumo de alcohol: bebedor o no bebedor.

También se recogieron las siguientes variables anatomo-patológicas asociadas al tumor:

- a) Tamaño tumoral (T): T1, T2, T3 y T4
- b) Afectación ganglionar local (N): NO (ganglios no afectados), N+ (ganglios afectados).
- c) Estadio clínico: I, II, III y IV.

- d) Grado de diferenciación: bien diferenciado, moderadamente diferenciado o mal diferenciado.
- e) Localización tumoral: lengua, suelo de boca u otra localización.
- f) Invasión perineural: sin invasión perineural o con presencia de invasión perineural.
- g) Invasión vascular: presencia de invasión vascular o sin presencia de invasión vascular.
- h) Estado clínico al final del seguimiento: vivo sin recurrencia, fallecido por el COCE, censurado o con segundo cáncer primario.

6.2.5. Pruebas de inmunohistoquímica (IHC)

Las pruebas de IHC se realizaron en el Departamento de Bioquímica del HUCA y en el ISPA.

Para ello, las matrices tisulares (“tissue microarrays”) se cortaron en secciones de 3 μm y se secaron en portaobjetos de microscopio Flex IHC (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca). Las secciones se desparafinizaron con xileno y se hidrataron a través de alcoholes graduados en agua.

La recuperación del antígeno se realizó calentando las secciones con solución Envision Flex Target Retrieval a pH 9 durante 20 minutos a 95°C en un PTLINK (Dako).

La tinción se realizó a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos primarios:

- Anticuerpo monoclonal de ratón para N-Cadherina (Casa comercial Novus Biologicals, N° de catálogo 13A9 NBP1-48309) a una dilución de 1:100.
- Anticuerpo monoclonal de ratón para E-Cadherina (Casa comercial BD Biosciences, N° de catálogo 610181, Clon 36/E-Cadherin) a una dilución 1:4000.
- Anticuerpo monoclonal de ratón para Vimentina (Casa comercial Abcam, N° de catálogo ab8978, Clon RV202) a una dilución 1:200.
- Anticuerpo monoclonal de ratón para Twist (10E4E6) (Casa comercial Abcam, N° de catálogo ab175430) a una dilución 1:500.

- Anticuerpo monoclonal de conejo para Snail2/Slug (C19G7) (Casa comercial Cell Signaling Technology, N° de catálogo 9585) desenmascaramiento a pH 9 durante 30 min a 95° y una dilución 1:200.
- Anticuerpo monoclonal de ratón para Snail1 (L70G2) (Casa comercial Cell Signaling Technology, N° de catálogo 3895) a una dilución 1:200.
- Anticuerpo monoclonal de ratón para Smad7 (Casa comercial RD Systems, N° de catálogo MAB2029, Clon 293039) a una dilución de 1:20.
- Anticuerpo monoclonal de ratón para ZEB1 (Casa comercial Novus Biologicals, N° de catálogo NBP2-52866, Clon CL0151) a una dilución de 1:200.
- Anticuerpo policlonal de conejo para ZEB2 (Casa comercial Novus Biologicals, N° de catálogo NBP1-82991) a una dilución de 1:200.
- Anticuerpo policlonal de conejo TCF3 para E47 (Casa comercial Invitrogen, Thermo Fisher, N° de catálogo PA5-84553) a una dilución de 1:200.

Para visualizar los resultados se utilizó el sistema de visualización Dako EnVision Flex + (Dako Autostainer) y cromógeno de diaminobencidina como sustrato. Los controles negativos se prepararon omitiendo el anticuerpo primario. La contratinción con hematoxilina fue el paso final.

Los resultados de la IHC fueron evaluados por tres observadores (Juan Pablo Rodrigo, Héctor Enrique Torres y Verónica Blanco) de forma independiente y cegados a los datos clínicos. La expresión de los diferentes biomarcadores se clasificó en presencia de expresión o ausencia de expresión.

6.2.6. Pruebas de asociación entre el proceso TEM y la supervivencia

Para analizar la asociación entre el proceso TEM y la supervivencia, se utilizó el índice de Wangmo y cols. (Wangmo y cols., 2020). Para ello, se realizó una evaluación combinada de E-Cadherina y Vimentina, y los pacientes se clasifican en tres grupos de la siguiente manera:

- Sin TEM, definido como expresión de E-Cadherina positiva y Vimentina negativa.

- TEM completa, definida como expresión negativa de E-Cadherina y Vimentina positiva.
- TEM parcial, definida como expresión de E-Cadherina y Vimentina positivas o de E-Cadherina y Vimentina negativas.

6.2.7. Cálculo muestral

El número de muestras analizadas fue el correspondiente a los pacientes que cumplían los criterios de inclusión en el estudio al realizar un tratamiento quirúrgico con fines curativos de COCE en el Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) entre el 1 de marzo de 2000 y el 31 de diciembre de 2010. El número de muestras incluidas es de 165.

6.2.8. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS para Windows (versión 27.0.1, IBM-SPSS Inc., EE. UU.).

El análisis descriptivo de las características clínico-patológicas de los pacientes se presentará como frecuencias absolutas, porcentajes, medias y medianas. El análisis inferencial bivariado para estudiar la asociación entre las variables clínico-patológicas y la expresión de las diferentes proteínas y factores de transcripción se realizó mediante la prueba de χ^2 o la prueba exacta de Fisher.

La supervivencia específica de la enfermedad se determinó desde la fecha de finalización del tratamiento hasta la muerte por el tumor. Se censuraron los pacientes que estaban vivos en el momento del último seguimiento y los que fallecieron por causas distintas al cáncer.

Se consideró supervivencia global al porcentaje de pacientes con COCE que siguieron vivos transcurrido el período de tiempo definido de evaluación desde el tratamiento. La supervivencia específica se definió como el tiempo que pasó desde la fecha del diagnóstico o el comienzo del tratamiento de COCE hasta la fecha de la muerte por la enfermedad (Instituto Nacional del Cáncer, 2022).

La supervivencia global y específica se estimaron utilizando el método de Kaplan-Meier y se compararon con la prueba de *log rank*. Se calculó el cociente de riesgo o Hazard ratio (HR) junto con su intervalo de confianza (IC) al 95 % para las diferentes variables clínico-patológicas. Para ello se utilizó el modelo de riesgos proporcionales de Cox univariado y multivariado. Todas las pruebas realizadas fueron bilaterales y se consideraron valores de p estadísticamente significativos aquellos inferiores a 0,05.

7. RESULTADOS

7. RESULTADOS

7.1. Revisión sistemática de los genes implicados en la transición epitelio-mesenquimal en el COCE

7.1.1. Selección de los estudios

La estrategia de búsqueda dio lugar a 3.542 resultados: 1.191 obtenidos en Pubmed, 1.196 en Web of Science, 22 en Cochrane y 1.133 en Scopus. Tras eliminar los duplicados resultaron ser un total de 2.064 artículos. Como se comentó, dos investigadores independientes (CV, JGS) revisaron todos los títulos y resúmenes de los 2.064 artículos.

De ellos, se excluyeron un total de 1.988 artículos por las siguientes causas:

- a) Un total de 1.923 artículos por no tratar sobre genes implicados en el proceso TEM en el COCE.
- b) Un total de 37 artículos por haber sido realizados en animales.
- c) Otros 14 por ser revisiones bibliográficas.
- d) Un total de 9 trabajos por estar realizados en líneas y cultivos celulares.
- e) Dos trabajos porque fueron artículos retractados después de su publicación.
- f) Y otros tres trabajos: uno de ellos por ser un caso clínico, otro por ser un estudio *in vitro* y el último por estar escrito en chino.

Después de leer a texto completo los 76 artículos incluidos para ser revisados a texto completo, otros 68 artículos fueron excluidos por los siguientes motivos:

- a) Un total de 28 estudios por haber sido realizados en líneas celulares.
- b) Otros 20 artículos por estar realizados en animales.
- c) Otros 7 trabajos por no reflejar datos de genes sino sólo de proteínas implicadas en el proceso TEM.

- d) Un total de 5 artículos por analizar carcinomas escamosos de cabeza y cuello, incluyendo laringe e hipofaringe sin especificar datos sobre COCE.
- e) Otros 4 por dar datos sobre genes implicados en el proceso TEM tras recibir tratamiento para el COCE.
- f) Dos por no validar los datos de la participación de los genes estudiados a través del análisis de las proteínas involucradas en el proceso TEM.
- g) Y otros dos, uno por no tratar sobre genes implicados en TEM en COCE y otro por no proporcionar datos sobre los pacientes incluidos.

Finalmente, se incluyeron 8 artículos en esta revisión sistemática. El diagrama de flujo se puede observar en la Figura 4.

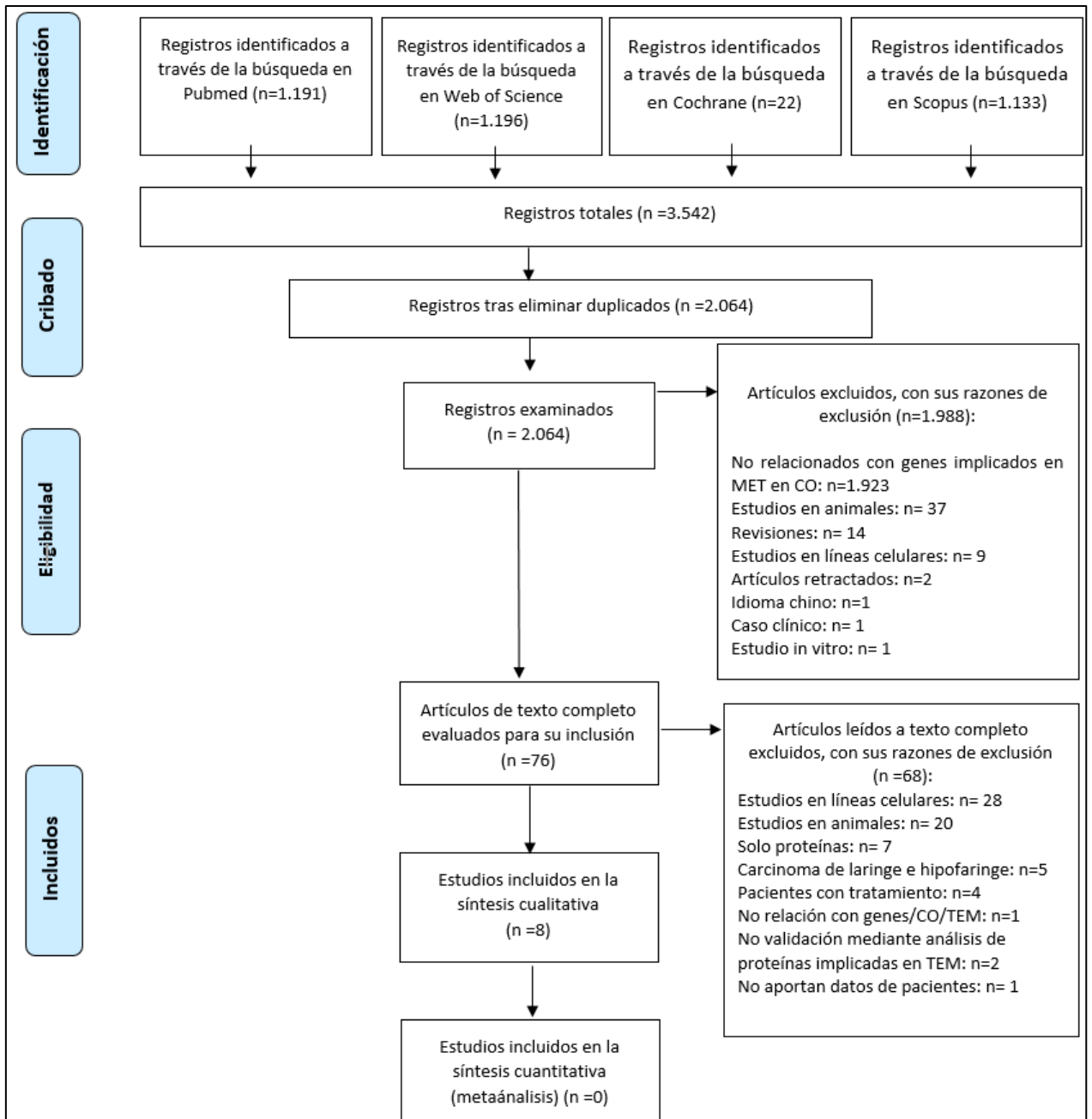


Figura 4. Diagrama de flujo de la revisión sistemática según las guías PRISMA.

7.1.2. Características de los estudios

Todos los estudios incluidos en esta revisión sistemática fueron estudios de cohortes retrospectivos publicados en la última década, específicamente entre los años 2016 y 2020. Todos los trabajos fueron realizados en China (Tabla 3) e incluyeron un total de 671 pacientes con COCE, de los cuales el 69% eran hombres y el 31% mujeres.

Tabla 3. Datos generales de los artículos incluidos en la revisión sistemática.

Autor y año de publicación	Revista científica	Centro/hospital	País	Tipo de estudio	Nº de pacientes	Fecha recogida datos
Wu y cols., 2020	Biomedicine & Pharmacotherapy	Stomatological Hospital of Nanjing Medical University	China	Estudio de cohortes	n= 97	2014-2016
Qu y cols., 2020	Journal of Cancer	Stomatology Hospital of Capital Medical University	China	Estudio de cohortes	n= 72	2010-2013
Huang y cols., 2020	Aging (Albany NY)	Nanfang Hospital, Southern Medical University	China	Estudio de cohortes	n= 80	ND
Deng y cols., 2019	Cancer Management and Research	Hospital of Sun Yat-Sen University	China	Estudio de cohortes	n= 105	ND
Yan y cols., 2019	Translational Oncology	Hospital of Sun Yat-Sen University	China	Estudio de cohortes	n=100	ND
Zhang y cols., 2017	Oral Diseases	Xiangya Hospital of Central South University	China	Estudio de cohortes	n=80	2010-2012
Zhao y cols., 2016	Journal of Translational Medicine	Sun Yat-sen Memorial Hospital	China	Estudio de cohortes	n=60	2008-2012
Peiqi y cols., 2016	International Journal of Medical Sciences	School & Hospital of Stomatology, Wuhan University	China	Estudio de cohortes	n= 97	ND

Los genes estudiados en los diferentes estudios fueron los siguientes:

- a) Gen ARID2 (Wu y cols., 2020).
- b) Gen ALDH3A1 (Qu y cols., 2020).
- c) Gen HNRNPC (Huang y cols., 2020).
- d) Gen ITGA5 (Deng y cols., 2019).
- e) Gen DZIP1 (Yan y cols., 2019).
- f) Gen HMGA2 (Zhang y cols., 2017; Zhao y cols., 2016).
- g) Gen SRSF3 (Peiqui y cols., 2016).

La función de estos genes analizados, así como su proceso biológico y su función en el COCE o en el proceso TEM se encuentran resumidos en la Tabla 4.

Tabla 4. Descripción de los genes incluidos en la revisión sistemática.

Gen	Nombre del gen	Función del gen	Proceso biológico	Función en cancer/TEM
ARID2	<i>AT Rich Interaction Domain 2</i>	Factor de remodelación de la cromatina	Regulación transcripcional; modulación del ciclo celular; desarrollo embrionario; reparación de daños en el ADN	Supresor tumoral; reprime el proceso TEM; inhibe la transcripción de Snail (Jiang y cols., 2020); regulado a la baja/mutado en carcinoma hepatocelular (Jiang y cols., 2020), colorrectal (Bala y cols., 2021) y CO (Wu y cols., 2020).
ALDH3A1	<i>Aldehyde dehydrogenase 3A1</i>	Enzima dependiente de NAD(P)+-; oxidación de aldehídos	Proliferación; diferenciación; supervivencia celular; respuesta/protección al estrés oxidativo	Sobreexpresado promueve el proceso TEM en cáncer gástrico (Wu y cols., 2016), melanoma y cáncer de pulmón (Terzuoli y cols., 2019); involucrado en la resistencia al tratamiento contra el cáncer (Muzio y cols., 2012); asociado al proceso TEM en COCE, baja expresión asociada con metástasis y mal pronóstico (Qu y cols., 2020).
HNRNPC	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C</i>	Proteína de unión a ARN; lector de modificación de N6-metiladenosina en ARN	Unión y expresión de ARN; media la exportación de ARN de secuencia no específica; regula el procesamiento y la traducción del extremo 3' del ARN	Promueve la TEM en COCE y cáncer de esófago (Zhang y cols., 2019; Liu y cols., 2020); biomarcador de mal pronóstico en diferentes tipos de tumores, incluido el carcinoma hepatocelular (Liu y cols., 2019), colorrectal (Hou y cols., 2020), cáncer de páncreas (Xu y cols., 2020), cáncer de esófago y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Huang y cols., 2020; Zhao y cols., 2019).
ITGA5	<i>Integrin alpha-5</i>	Subunidad alfa del receptor de fibronectina	Adhesión celular; proliferación; migración	Promueve el proceso TEM y la metástasis ósea en el cáncer de mama (Xiao y cols., 2018); asociado a TEM, mal pronóstico y/o metástasis en carcinoma hepatocelular (Wang y cols., 2020), gástrico (Yan y cols., 2018), colorrectal (Yu y cols., 2019) y cáncer de cabeza y cuello (Deng y cols., 2019; Zou y cols., 2019).

DZIP1	<i>DAZ-interacting protein 1</i>	Proteína de dedos de zinc; interactúa con la proteína de unión a ARN DAZ	Ciliogénesis, tráfico de ARN; vías de señalización Hedgehog y Wnt	Promueve la proliferación, migración e invasión en COCE (Yan y cols., 2019); gen supresor tumoral en el cáncer de mama (Mansoori y cols., 2021).
HMGA2	<i>High mobility group proteins characterized by an AT-hook</i>	Proteína cromosómica no histona	Regulación de la transcripción de genes inducibles; promoción de la adipogénesis; altamente expresada durante el desarrollo embrionario y se vuelve a expresar en casi todas las neoplasias malignas en humanos	Regulador clave en el desarrollo del cáncer, la inducción de la transformación neoplásica y la promoción de la progresión metastásica de las células cancerosas (Mahmood y cols., 2021); promueve el proceso TEM en COCE lingual (Zhao y cols., 2016).
SRSF3	<i>Serine/arginine-rich splicing factor 3</i>	Unión de ARNm	Regulación de la unión, traducción y poliadenilación de ARN; regulación del proceso de miARN; involucrado en la integridad del genoma y del transcriptoma	Sobreexpresado en cáncer de colon (Corbo y cols., 2012), cáncer de mama (Xu y cols., 2019) y COCE (Peiqi y cols., 2016); promueve TEM en COCE (Peiqi y cols., 2016).

Todos los estudios incluidos utilizaron la RT-qPCR con transcripción inversa para evaluar la expresión genética. Todos los autores excepto Yan y cols. (Yan y cols., 2019), analizaron las proteínas asociadas al proceso TEM expresadas por los genes implicados en tejidos de COCE mediante inmunohistoquímica (Wu y cols., 2020; Qu y cols., 2020; Huang y cols., 2020; Deng y cols., 2019; Zhang y cols., 2017; Zhao y cols., 2016; Peiqi y cols., 2016), y Yan y cols. utilizaron la prueba Western Blot para estudiar los niveles de las proteínas asociadas al proceso TEM (Yan y cols., 2019).

Los datos clínicos de los pacientes sobre el consumo de tabaco no fueron recogidos en cinco estudios (Qu y cols., 2020; Huang y cols., 2020; Deng y cols., 2019; Zhang y cols., 2017; Zhao y cols., 2016), y solamente dos estudios proporcionaron datos sobre el consumo de alcohol (Wu y cols., 2020; Peiqi y cols., 2016).

En cuanto a los marcadores clásicos del proceso TEM, Zhang y cols. (Zhang y cols., 2017) estudiaron la expresión de E-Cadherina y Vimentina mediante inmunohistoquímica en COCE de lengua. Del mismo modo, Zhao y cols. (Zhao y cols., 2016) analizaron la E-Cadherina, Vimentina y Snail mediante inmunohistoquímica en COCE lingual. También Zhao y cols. en 2016 estudiaron la expresión de Snail mediante RT-PCR en COCE lingual.

La localización del COCE no fue especificada en cuatro estudios (Qu y cols., 2020; Huang y cols., 2020; Yan y cols., 2019; Peiqi y cols., 2016), y en cuanto a las características clínico-patológicas, el tamaño del tumor no fue analizado en tres estudios (Deng y cols., 2019; Yan y cols., 2019; Peiqi y cols., 2016), mientras que los datos relativos a metástasis ganglionares (N) fueron recogidos en todos los estudios incluidos. El estadio clínico fue estudiado por todos los autores excepto por Qu y cols. (Qu y cols., 2020) y Zhang y cols. (Zhang y cols., 2017). El grado de diferenciación tumoral no fue proporcionado por cuatro de los estudios (Huang y cols., 2020; Deng y cols., 2019; Yan y cols., 2019; Peiqi y cols., 2016). La recurrencia únicamente se mostró en el estudio de Zhang y cols. (Zhang y cols., 2017), y las metástasis a distancia solamente fueron estudiadas por Huang y cols. (Huang y cols., 2020). Todos los datos sobre las características demográficas de los pacientes y las variables clínico-patológicas del COCE y su relación con las proteínas expresadas por los genes implicados en el proceso TEM se muestran en las Tablas

Tabla 5. Relación entre las características de los pacientes con COCE en los diferentes estudios y la expresión de los genes/proteínas.

Autor, año, nº de pacientes y proteína estudiada	Edad		Sexo		Tabaco		Alcohol	
	EN/ BE	AE	EN/ BE	AE	EN/ BE	AE	EN/ BE	AE
Wu y cols., 2020 n= 97, ARID2	≤60: 17/34; 50,0%	≤60: 20/63; 31,7%	H: 19/34; 55,9%	H: 29/63; 46,0%	Si: 7/34; 20,6%	Si: 10/63; 15,9%	Si: 5/34; 14,7%	Si: 10/63; 15,9%
	>60: 17/34; 50,0%	>60: 43/63; 68,3%	M: 15/34; 44,1%	M: 34/63; 54,0%	No: 27/34; 79,4%	No: 53/63; 84,1%	No: 29/34; 85,3%	No: 53/63; 84,1%
	p=0,078		p=0,36		p=0,56		p=0,88	
Qu y cols., 2020 n= 72, ALDH3A1	<61: 17/40; 42,5%	<61: 17/32; 53,1%	H: 25/40; 62,5%	H: 22/32; 68,8%	ND	ND	ND	ND
	≥61: 23/40; 57,5%	≥61: 15/32; 46,9%	M: 15/40; 37,5%	M: 10/32; 31,2%				
	p= 0,37		p= 0,58					
Huang y cols., 2020 n=80, HNRNPC	≥60: 10/ 41; 24,4%	≥60: 12/39; 30,8%	H: 20/28; 71,4%	H: 41/ 52; 78,8%	ND	ND	ND	ND
	<60: 31/41; 75,6%	<60: 27/39; 69,2%	M: 8/28; 28,6%	M: 11/52; 21,2%				
	p= 0,62		p= 0,58					
Deng y cols., 2019 n= 105, ITGA5	<60: 12/29; 41,4%	<60: 38/76; 50,0%	H: 27/29; 93,1%	H: 48/76; 63,2%	ND	ND	ND	ND
	≥60: 17/29; 58,6%	≥60: 38/76; 50,0%	M: 2/29; 6,9%	M: 28/76; 36,8%				
	p >0,05		p= ND					
Yan y cols., 2019 n= 100, DZIP1	<60:12/31; 38,7%	<60:33/69; 47,8%	H: 27/31; 87,1%	H: 42/69; 60,9%	ND	ND	ND	ND
	≥60: 19/31; 61,3%	≥60: 36/69; 52,2%	M: 4/31; 12,9%	M: 27/69; 39,1%				
	p>0,05		p=ND					
Zhang y cols., 2017 n= 80, HMGA2	Negativa: >60: 1/21; 4,8%	Moderada: >60: 2/29; 6,9%	Negativa: H:19/21; 90,5%	Moderada: H: 28/32; 87,5%	Negativa: ≥20:7/21; 33,3%	Moderada: ≥20: 13/29; 44,8%	ND	ND
	≤60: 20/21; 95,2%	≤60: 27/29; 93,1%	M:2/21; 9,5%	M: 4/32; 12,5%	<20: 1/21; 4,8%	<20: 6/29; 20,7%		
	Débil: >60: 8/12; 66,7%	Fuerte: >60: 5/23; 21,7%	Débil: H:12/14; 85,7%	Fuerte: H: 9/13; 69,2%	Débil: ≥20: 4/12; 33,3%	Fuerte: ≥20: 8/18; 44,4%		
	≤60:4/12; 33,3%	≤60:18/23; 78,3%	M:2/14; 14,3%	M: 4/13; 30,8%	<20: 6/12; 50,0%	<20: 4/18; 22,2%		
	p=0,92		p=0,13		p=0,33			

Zhao y cols., 2016 n= 60, HMGA2	≤55: 12/23; 52,2%	≤55: 22/37; 59,5%	H: 9/23; 39,1%	H: 28/37; 75,7%	ND	ND	ND	ND
	>50: 11/23; 47,8%	>50: 15/37; 40,5%	M: 14/23; 60,9%	M: 9/37; 24,3%				
	p= 0,863		p= 0,005*		ND		ND	
Peiqi y cols., 2016 n=77, SRSF3	Negativa:	Moderada	Negativa:	Moderada:	Negativa:	Moderada:	Negativa:	Moderada:
	≤55: 13/24; 54,2%	≤55: 6/19; 31,6%	H: 17/23; 73,9%	H: 13/18; 72,2%	Si:11/24; 45,8%	Si: 9/20; 45,0%	Si: 7/24; 29,2%	Si: 10/20; 50,0%
	>50: 11/24; 45,8%	>50: 13/19; 68,4%	M: 6/23; 26,1%	M: 5/18; 27,8%	No:13/24; 54,2%	No: 11/20; 55,0%	No: 17/24; 70,8%	No: 10/20; 50,0%
	Débil:	Fuerte:	Débil:	Fuerte:	Débil:	Fuerte:	Débil:	Fuerte:
≤55: 14/24; 58,3%	≤55: 5/10; 50,0%	H: 19/26; 73,1%	H: 9/10; 90,0%	Si: 15/24; 62,5%	Si: 6/9; 66,7%	Si:12/24; 50,0%	Si: 5/9; 55,6%	
>50: 10/24; 41,7%	>50: 5/10; 50,0%	M: 7/26; 26,9%	M: 1/10; 10,0%	No: 9/24; 37,5%	No: 3/9; 33,3%	No: 12/24; 50,0%	No: 4/9; 44,4%	
	p=0,30		p=0,55		p=0,59		ND	

EN, cohorte de expresión negativa; BE, cohorte de baja expresión; AE, cohorte de alta expresión; n, número de pacientes; H, hombre; M, mujer; ND, no disponible; p, valor p.

Tabla 6. Relación entre las características clínico-patológicas de los casos de CO en los diferentes estudios y la expresión de los genes/proteínas estudiadas.

Autor, año de publicación, número de pacientes y proteínas analizadas	T		N		Estadio clínico TNM (AJCC)		Localización		Grado de diferenciación/histológico		Otros	
	EN/ BE	AE	EN/ BE	AE	EN/ BE	AE	EN/ BE	AE	EN/ BE	AE	EN/ BE	AE
Wu y cols., 2020 n= 97, ARID2	≤4cm: 18/34; 52,9%	≤4cm: 50/63; 79,4%	NO: 22/34; 64,7%	NO: 55/63; 87,3%	I, II: 16/34; 47,1%	I, II: 47/63; 76,6%	Lengua: 6/34; 17,6% Labio: 1/34; 2,9% M. Yugal: 12/34; 35,3% Suelo de boca: 2/34; 5,9% Maxilar: 4/34; 11,8% Encía: 8/34; 23,5%	Lengua: 20/63; 31,3% Labio: 7/63; 11,0% M. Yugal: 18/63; 28,2% Suelo de boca: 4/63; 6,1% Maxilar: 2/63; 3,0% Encía: 13/63; 20,4%	BD + MD: 20/34; 58,8%	BD + MD: 52/63; 85,3%	ND	ND
	>4cm: 16/34; 47,1%	>4cm: 13/63; 20,6%	N+: 12/34; 35,3%	N+: 8/63; 12,7%	III, IV: 18/34; 52,9%	III, IV: 16/63; 23,4%			PD: 14/34; 41,2%	PD: 11/63; 14,7%		
	p <0,05		p <0,05		p <0,05		p=0,17		p <0,05			
Qu y cols., 2020 n= 72, ALDH3A1	T1, T2: 17/40; 42,5%	T1, T2: 12/32; 37,5%	NO: 19/40; 47,5%	NO: 23/32; 71,9%	ND	ND	ND	ND	BD: 4/40; 10,0%	BD: 6/32; 18,8%	ND	ND
	T3, T4: 23/40; 57,5%	T3, T4: 20/32; 62,5%	N+: 21/40; 52,5%	N+: 9/32; 28,1%					MD +PD: 36/40; 90,0%	MD + PD: 26/32; 81,2%		
	p= 0,67		p= 0,04						p= 0,29			
Huang y cols., 2020 n= 80, HNRNPC	T1: 6/33; 18,2%	T1: 4/ 47; 8,5%									Metástasis a distancia	
	T2: 22/33; 66,7%	T2: 30/47; 63,8%	N0, N1: 32/38; 84,1%	N0, N1: 27/42; 64,3%	I, II: 27/39; 69,2%	I, II: 19/41; 46,3%					M0: 33/39; 84,6%	M0: 29/41; 70,7%
	T3: 2/33; 6,1%	T3: 4/47; 8,5%	N2, N3: 6/38; 15,8%	N2, N3: 15/42; 35,7%	III, IV: 12/39; 30,8%	III, IV: 22/ 41; 53,7%	ND	ND	ND	ND	M1: 6/39; 15,4%	M1: 12/41; 29,3%
	T4: 3/33; 9,1%	T4: 9/ 47; 19,1%										

	p= 0,40		p= 0,04		p= 0,04						p= 0,14	
Deng y cols., 2019 n= 105, ITGAS	ND	ND	NO: 16/29;55,2%	NO: 56/76;73,9%	I, II: 15/29;51,7%	I, II: 25/76;32,9%	Lengua: 29/29;100%	Lengua: 76/76;100%	ND	ND	ND	ND
			N+: 13/29;44,8%	N+: 20/76;26,1%	III, IV: 14/29; 48,3%	III, IV: 51/76;67,1%						
			p<0,01		p<0,01							
Yan y cols., 2019 n= 100, DZIP1	ND	ND	NO: 18/31;58,1%	NO: 50/67;72,5%								
			N+: 13/31;41,9%									

Peiqi y cols., 2016 n=77, SRSF3	ND	ND	Negativa: NO: 16/26; 61,5% N+: 10/26; 8,5% Débil: NO: 14/22; 63,6% N+: 8/22; 36,4%	Moderada: NO: 5/20; 25,0% N+: 15/20; 75,0% Fuerte: NO: 4/9; 44,4% N+: 5/9; 55,6%	Negativa: I: 8/24; 33,3% I-II: 11/24; 45,9% II-III: 5/24; 20,8% Débil: I: 3/26; 11,5% I-II: 18/26; 69,2% II-III: 5/26; 19,2%	Moderada: I: 1/19; 5,3% I-II: 16/19; 84,2% II-III: 2/19; 10,5% Fuerte: I: 0/8; 0,0% I-II: 4/8; 50,0% II-III: 4/8; 50,0%	ND	ND	ND	ND	ND	ND
			p=0,04		p=0,02							

EN, cohorte de expresión negativa; BE, cohorte de baja expresión; AE, cohorte de alta expresión; n, número de pacientes; ND, no disponible; p, valor-p; T, tamaño del tumor, N, afectación de ganglios linfáticos cervicales; M, metástasis a distancia; TNM, clasificación TNM propuesta por AJCC; BD, bien diferenciados; MD, moderadamente diferenciados; PD, pobremente diferenciados; cm, centímetros.

7.1.3. Riesgo de sesgo de los estudios incluidos

Después de analizar el riesgo de sesgo con la herramienta Newcastle-Ottawa, descrita anteriormente, se estableció que todos los estudios incluidos tenían un bajo riesgo de sesgo.

Todos los estudios incluidos recibieron como mínimo 3 estrellas en el apartado “Selección”. Además, siete estudios proporcionaron datos relativos a “selección de la cohorte no expuesta” (Wu y cols., 2020; Qu y cols., 2020; Huang y cols., 2020; Deng y cols., 2019; Zhang y cols., 2017; Zhao y cols., 2016; Peiqi y cols., 2016). En el ítem de “Comparabilidad” todos los estudios recibieron dos estrellas, excepto el estudio de Yan y cols. (Yan y cols., 2019) que solo recibieron una, ya que no cumplía los criterios sobre comparación de cohortes sobre la base del diseño o un análisis controlado por factores de confusión. En la sección “Resultados”, todos los estudios recibieron dos estrellas para “adecuación de los resultados” y en el subapartado correspondiente a si “el seguimiento fue lo suficientemente prolongado en el tiempo para que se produjeran los resultados “. Sin embargo, sólo los estudios llevados a cabo por Wu y cols. (Wu y cols., 2020) y Qu y cols. (Qu y cols., 2020) recibieron tres estrellas, debido a que sólo ellos proporcionaban datos sobre el tiempo de seguimiento y este era adecuado. Por esta razón, consideramos que todos los estudios tenían una buena calidad metodológica según el algoritmo de la *Agency for Health Research and Quality* (AHRQ), ya que todos ellos tienen como mínimo tres estrellas en el apartado “Selección”, una en “Comparabilidad” y dos en “Resultados” (Tabla 7).

Tabla 7. Riesgo de sesgo de los artículos incluidos.

Autor y año	Selección				Comparabilidad	Resultados			Resultado AHRQ
	Representatividad de la cohorte expuesta	Selección de la cohorte no expuesta	Determinación de la exposición	Demostración de que el resultado de interés no estaba presente al inicio del estudio	Comparabilidad de cohortes sobre la base del diseño o análisis controlado por factores de confusión	Evaluación del resultado	¿El seguimiento fue suficientemente prolongado para que se produjeran los resultados?	Adecuación del seguimiento de las cohortes	
Wu y cols., 2020	*	*	*	*	**	*	*	*	BC
Qu y cols., 2020	*	*	*	*	**	*	*	*	BC
Huang y cols., 2020	*	*	*	*	**	*	*		BC
Deng y cols., 2019	*	*	*	*	**	*	*		BC
Yan y cols., 2019	*		*	*	*	*	*		BC
Zhang y cols., 2017	*	*	*	*	**	*	*		BC
Zhao y cols., 2016	*	*	*	*	**	*	*		BC
Peiqi y cols., 2016	*	*	*	*	**	*	*		BC

AHRQ, Algoritmo de la Agency for Health Research and Quality; BC, buena calidad.

7.1.4. Resultados de los estudios

En los estudios incluidos en nuestra revisión sistemática se pudo observar como la alta expresión de HNRNPC, ITGA5, DZIP1, HMGA2 y SRSF3 se asoció con el proceso TEM en COCE. Los resultados del presente trabajo mostraron como sólo la expresión del modulador de transcripción HMGA2, que está comúnmente aumentada en tejidos adultos cuando aparecen tumores, se asoció con el sexo de los pacientes en uno de los estudios (Zhao y cols., 2016). Se observó como en el grupo de alta expresión el 75,7% eran hombres (Zhao y cols., 2016). Ninguno de los otros genes o proteínas estudiados se asociaron de forma significativa con la edad, ni con el consumo de tabaco y alcohol (Tabla 4).

La alta expresión de los niveles de HNRNPC, ITGA5, HMGA2 y SRSF3 se asociaron de forma significativa a estadios clínicos más avanzados en la clasificación TNM (Huang y cols., 2020; Deng y cols., 2019; Zhao y cols., 2016; Peiqi y cols., 2016). Del mismo modo, se observó una asociación estadísticamente significativa entre la alta expresión de HNRNPC, HMGA2 y SRSF3 y una mayor presencia de metástasis ganglionares (Huang y cols., 2020; Zhao y cols., 2016; Peiqi y cols., 2016). Además, los pacientes con altos niveles de HNRNPC sufrieron más metástasis a distancia, aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos (Tabla 6).

HMGA2 es un biomarcador bien estudiado que se ha observado que es un regulador del cáncer en humanos. Se ha visto como su mayor expresión se asocia significativamente con casos de COCE moderadamente diferenciados (grado II) y pobremente diferenciados (grado III) (Zhao y cols., 2016). Los resultados de los diferentes estudios mostraron como la alta expresión de HNRNPC, ITGA5, HMGA2 y SRSF3 estuvo asociada a un peor pronóstico de la enfermedad (estadios TNM más avanzados) (Huang y cols., 2020; Deng y cols., 2019; Zhao y cols., 2016; Peiqi y cols., 2016). Y sólo Zhang y cols. evaluaron la recurrencia y sus resultados mostraron como los pacientes con alta expresión de HMGA2 tenían una mayor tasa de recurrencia (Zhang y cols., 2017) (Tabla 6).

Por el contrario, la baja expresión de la enzima ALDH3A1 (Qu y cols., 2020) y del factor remodelador de cromatina ARID2 (Wu y cols., 2020) favorecieron el proceso TEM en el

COCE. No se encontró asociación estadísticamente significativa entre la baja expresión de los diferentes genes/proteínas asociadas a ALDH3A1 y ARID2 y el sexo, edad, consumo de tabaco y alcohol, así como con localización del COCE (Tablas 5 y 6). Respecto a las características del COCE, la alta expresión de ARID2 y ALDH3A1 se asoció significativamente con la ausencia de metástasis ganglionar (Wu y cols., 2020; Qu y cols., 2020). También, la alta expresión de ARID2 se asoció de forma significativa con un menor tamaño tumoral, con estadios clínicos menos avanzados en la clasificación TNM y con casos de COCE bien y moderadamente diferenciados, grados grado I y II (Wu y cols., 2020) (Tabla 6).

7.2. Análisis de proteínas y FT asociados al proceso TEM en COCE.

7.2.1. Características de la muestra

Se analizaron muestras de 165 pacientes, de los cuales 113 (68,5%) eran hombres y 52 (31,5%) mujeres. La edad media fue de 63,8 años (desviación estándar 12,65), con edades comprendidas entre los 30 y los 92 años. Del total de pacientes, 107 (64,8%) eran fumadores, mientras que 89 (53,9%) eran consumidores de alcohol (Tabla 8).

En cuanto a las características clínico-patológicas de los COCE incluidos (Tabla 8) podemos destacar como la localización primaria de 75 casos (45,5%) fue la lengua, 34 (20,6%) el suelo de la boca, 23 (13,9%) la encía, 12 (7,3%) la mucosa yugal, 12 (7,3%) el trigono retromolar, 7 (4,2%) el paladar y 2 casos (1,2%) aparecieron en múltiples localizaciones.

En lo relativo al tamaño tumoral (T) se observó como 42 casos (26,8%) fueron T1, 72 (45,9%) fueron T2, 24 (15,3%) fueron T3 y 19 (12,7%) fueron T4. En 8 casos, el tamaño tumoral no pudo ser determinado con precisión.

Con respecto a la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos cervicales, 95 de los casos (57,6%) no tuvieron afectación ganglionar, 31 (18,8%) fueron N1, 8 (4,8%) fueron N2a, 18 (10,9%) fueron N2b, 5 (3%) N2c y 1 caso (0,6%) fue N3. En 7 casos no se efectuó una disección cervical, ya que esta había sido realizada en una intervención previa por otro tumor distinto.

Al evaluar el estadio clínico, pudimos observar que 37 (22,4%) COCE se encontraban en estadio I, 51 (30,9%) en estadio II, 30 (18,2%) en estadio III y 47 (28,5%) en estadio IV.

En cuanto a la diferenciación tumoral los registros mostraron como 105 tumores (63,6%) se encontraban bien diferenciados, 51 (30,9%) fueron tumores moderadamente diferenciados y 47 (5,5%) pobremente diferenciados.

Por último, al analizar el estado clínico de los pacientes al final del seguimiento se observó como 77 (46,7%) pacientes se encontraban vivos y sin recurrencia al final del seguimiento, 67 (40,6%) pacientes habían fallecido por este motivo o presentaban

recurrencias no tratables, 18 (10,9%) fueron censurados y 3 (1,8%) habían presentado un segundo tumor primario.

Tabla 8. Características clínicas de 165 pacientes con COCE.

Características de la muestra	Número de casos	(%)
Género		
Hombres	113	68,5
Mujeres	52	31,5
Consumo de tabaco	107	64,8
Consumo de alcohol	89	53,9
Localización primaria		
Lengua	75	45,5
Suelo de boca	34	20,6
Encía	23	13,9
Mucosa yugal	12	7,3
Retromolar	12	7,3
Paladar	7	4,2
Múltiples	2	1,2
Tamaño (T)		
T1	42	26,8
T2	72	45,9
T3	24	15,3
T4	19	12,7
Presencia de metástasis en ganglios cervicales (N)		
N0	95	57,6
N1	31	18,8
N2a	8	4,8
N2b	18	10,9
N2c	5	3
N3	1	0,6
Estadio clínico		
I	37	22,4
II	51	30,9
III	30	18,2
IV	47	28,5
Diferenciación tumoral		
Bien diferenciada	105	63,6
Moderadamente diferenciada	51	30,9
Pobremente diferenciada	9	5,5
Estado clínico al final del seguimiento		
Vivo y sin recurrencia	77	46,7
Fallecimiento o recurrencia no tratable	67	40,6
Censurado	18	10,9
Segundo tumor primario	3	1,8

7.2.2. Resultados de las pruebas de inmunohistoquímica realizadas

Al realizar las pruebas de IHQ una muestra no pudo ser evaluada para ninguno de los biomarcadores asociados al proceso TEM. Además, 5 casos más no pudieron ser evaluados para N-Cadherina y 2 de las muestras para E- Cadherina y Vimentina. Por último, 5 casos no pudieron ser evaluados para ninguno de los FTs asociados al proceso TEM y 2 muestras más para el FT Twist.

Hubo expresión de E-Cadherina en 89 muestras de COCE (54,5 %), Vimentina en 65 casos (39,6 %) y la N-Cadherina sólo se expresó en 4 muestras (2,5 %). Los resultados de las pruebas de inmunohistoquímica para los diferentes FTs mostraron una expresión de Twist en 155 muestras (94,5%), de Slug en 47 casos (28,8%), de Smad7 en 11 casos (6,7%), Snail en 10 muestras (6,1%), de E47 en 7 de las muestras analizadas (4,2%) y de ZEB1 en 5 muestras (3%). Cabe destacar que no se encontró expresión de ZEB2 en ninguna de las muestras estudiadas (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados de la inmunohistoquímica para E-Cadherina, N-Cadherina, Vimentina y los FTs -TEM.

Marcadores	Muestras de COCE analizadas (N)	Expresión positiva de los diferentes marcadores	%
Twist	148	155	94,5%
E-Cadherina	153	89	54,5%
Vimentina	153	65	39,6%
Slug	150	47	28,8%
Smad7	150	11	6,7%
Snail	150	10	6,1%
E47	150	7	4,2%
ZEB1	150	5	3%
N-Cadherina	150	4	2,5%
ZEB2	150	0	0%

7.2.3. Asociación entre las diferentes proteínas y FT analizados.

Se observó la existencia de una asociación estadísticamente significativa entre la ausencia de expresión de E-Cadherina y la expresión de Vimentina ($p=0,004$).

También se observaron asociaciones estadísticamente significativas entre la expresión de Snail y Slug ($p = 0,001$), ZEB1 ($p = 0,002$) y E47 ($p = 0,005$). Además, la expresión de Slug se asoció significativamente con la expresión de Twist ($p = 0,045$). Del mismo modo, la expresión de ZEB1 se asoció con la expresión de E47 ($p < 0,0001$).

7.2.4. Asociación de la expresión de las diferentes proteínas y factores de transcripción con las variables clínico-patológicas y el pronóstico de los pacientes.

La Tabla 10 resume las asociaciones entre la expresión de E-Cadherina, N-Cadherina y Vimentina con las diferentes características clínico-patológicas. Se pudo observar como la pérdida de expresión de E-Cadherina se asoció de forma casi significativa con la invasión perineural, ya que en la cohorte de baja expresión hubo más invasión perineural (78% de los pacientes) (prueba exacta de Fisher, $p=0,05$).

También se observó como la N-Cadherina se asociaba significativamente con la clasificación T (prueba exacta de Fisher, $p=0,02$), el estadio avanzado de la enfermedad (prueba exacta de Fisher, $p=0,03$) y con tumores moderadamente diferenciados (prueba exacta de Fisher, $p=0,01$).

Todos los pacientes de la cohorte de ausencia de expresión de N-Cadherina presentaban el mayor tamaño tumoral (T4). Lo mismo ocurría con el estadio clínico del tumor, ya que el 100% de los pacientes de la cohorte de ausencia de expresión de N-Cadherina presentaron un estadio IV, el más avanzado. Finalmente, y en relación con el grado de diferenciación celular, la mayoría de los tumores de la cohorte de falta de expresión de N-Cadherina (93%) estaban moderada o pobremente diferenciados. Por tanto, la ausencia de expresión de N-Cadherina se asoció a circunstancias desfavorables en cuanto a T, estadio clínico y diferenciación celular.

La expresión de Vimentina se asoció significativamente con la clasificación pT avanzada (χ^2 , $p = 0,02$), la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos del cuello (χ^2 , $p = 0,002$), el estadio clínico avanzado (χ^2 , $p = 0,03$), la muerte por el cáncer al final del seguimiento Fisher, $p = 0,004$), así como con tumores moderadamente o poco diferenciados (Fisher, $p = 0,001$).

En la tabla 11 se recogen los resultados de la asociación de la expresión de los FTs -TEM con las diferentes características clínico-patológicas. Se pudo observar cómo la expresión de Slug se asoció significativamente con el tamaño del tumor T (Fisher, $p = 0,01$) y con el estadio clínico (Fisher, $p = 0,01$). El mayor tamaño tumoral (T4) se relacionó con la ausencia expresión de Slug, ya que lo presentaron el 84% de las muestras de la cohorte de ausencia de expresión. En cuanto al estadio tumoral, la mayoría de los tumores más avanzados (estadio IV) tuvo lugar en la cohorte de ausencia de expresión de Slug. Por tanto, la ausencia de expresión de Slug conllevó mayor tamaño y estadio más avanzado del tumor.

También, la expresión de E47 se asoció significativamente con invasión perineural (Fisher, $p = 0,04$). La mayor parte de los pacientes de la cohorte de ausencia de expresión de E47 (78%) presentaron invasión perineural.

No se observaron más asociaciones estadísticamente significativas entre otros FTs del proceso TEM y los parámetros clínico-patológicos estudiados.

Tabla 10. Expresión de E-Cadherina, N-Cadherina y Vimentina y su asociación con las variables clínico-patológicas de la cohorte de 165 pacientes con COCE.

Variable	E-Cadherina		p	N-Cadherina		p	Vimentina		p
	N y (%) (-)	(+)		N y (%) (-)	(+)		N y (%) (-)	(+)	
Sexo									
Hombres	48 (43)	64 (57)	0,27	108 (97)	3 (3)	0,63	67 (60)	45 (40)	0,83
Mujeres	27 (52)	25 (48)		49 (98)	1 (2)		32 (61)	20 (39)	
Consumo de tabaco									
Fumadores	45 (42)	61 (58)	0,25	103 (98)	2 (2)	0,61	67 (63)	39 (37)	0,31
No fumadores	30 (52)	28 (48)		54 (96)	2 (4)		32 (55)	26 (45)	
Consumo de alcohol									
Bebedores	35 (40)	53 (60)	0,09	73 (99)	1 (1)	0,62	55 (63)	33 (37)	0,54
No bebedores	40 (53)	36 (47)		84 (97)	3 (3)		44 (58)	32 (42)	
pT									
pT1	16 (31)	26 (69)	0,74	41 (100)	0 (0)	0,02	27 (64)	15 (36)	0,02
pT2	32 (45)	39 (55)		69 (99)	1 (1)		46 (64)	26 (36)	
pT3	10 (42)	14 (58)		20 (87)	3 (13)		14 (61)	9 (39)	
pT4	10 (53)	9 (47)		19 (100)	0 (0)		9 (47)	10 (53)	
pN									
pN0	39 (41)	56 (59)	0,27	91 (97)	3 (3)	0,48	66 (69)	29 (31)	0,002
pN+	31 (50)	31 (50)		60 (98)	1 (2)		28 (45)	34 (55)	
Estadio clínico									
I	13 (35)	24 (65)	0,18	36 (100)	0 (0)	0,02	25 (67)	12 (33)	0,03
II	21 (41)	30 (59)		49 (98)	1 (2)		36 (71)	15 (29)	
III	14 (48)	15 (52)		26 (90)	3 (10)		18 (60)	12 (40)	
IV	27 (57)	20 (43)		46 (100)	0 (0)		20 (43)	26 (57)	
Grado de diferenciación									
Bien	46 (44)	58 (56)	0,61	102 (100)	0 (0)	0,01	73 (70)	32 (30)	0,001
Moderado/mal	29 (48)	31 (51)		55 (93)	4 (7)		26 (44)	33 (56)	
Localización tumoral									
Lengua	33 (44)	42 (56)	0,68	73 (99)	1 (1)	0,62	46 (61)	29 (39)	0,81
Otros sitios	42 (47)	47 (53)		84 (97)	3 (3)		53 (60)	36 (40)	
Localización tumoral									
Suelo de la boca	13 (39)	20 (61)	0,41	31 (94)	2 (6)	0,18	25 (73)	9 (27)	0,07
Otros sitios	62 (47)	69 (53)		126 (98)	2 (2)		74 (57)	56 (43)	
Invasión perineural									
No	68 (44)	87 (56)	0,05	148 (97)	4 (3)	0,79	95 (61)	60 (39)	0,48
Si	7 (78)	2 (22)		9 (100)	0 (0)		4 (44)	5 (56)	
Invasión vascular									
No	71 (45)	86 (55)	0,40	150 (97)	4 (3)	0,83	95 (60)	62 (40)	1,00
Si	4 (57)	3 (43)		7 (100)	0 (0)		4 (57)	3 (43)	

Estado clínico al final del seguimiento:									
Vivo sin recurrencia	33 (43)	43 (57)	0,71	73 (99)	1 (1)	0,62	56 (73)	21 (27)	0,004
Fallecido por COCE	34 (51)	33 (49)		63 (95)	3 (5)		30 (45)	36 (55)	
Censurado	7 (39)	11 (61)		18 (100)	0 (0)		12 (67)	6 (33)	
Segundo cáncer primario	1 (33)	2 (67)		3 (100)	0 (0)		1 (33)	2 (66)	

Tabla 11. Expresión de FTs -TEM y su asociación con las variables clínico-patológicas de la cohorte de 165 pacientes con COCE.

Variable	SNAIL N y (%)		p	SLUG N y (%)		p	ZEB1 N y (%)		p	TWIST N y (%)		p	SMAD7 N y (%)		p	E47 N y (%)		p
	(-)	(+)		(-)	(+)		(-)	(+)		(-)	(+)		(-)	(+)		(-)	(+)	
Sexo																		
Hombres	105 (94)	7 (6)	0,60	76 (68)	35 (32)	0,26	111 (98)	2 (2)	0,18	6 (5)	106 (95)	1,0	106 (94)	7 (6)	0,74	109 (96)	4 (4)	0,67
Mujeres	49 (94)	3 (6)		40 (77)	12 (23)		49 (94)	3 (6)		3 (6)	49 (94)		48 (92)	4 (8)		49 (94)	3 (6)	
Consumo de tabaco																		
Fumadores	99 (93)	7 (7)	0,50	83 (93)	6 (7)	0,08	105 (98)	2 (2)	0,34	4 (4)	102 (96)	0,28	100 (93)	7 (7)	1,0	104 (97)	3 (3)	0,24
No fumadores	55 (95)	3 (5)		71 (95)	4 (5)		55 (95)	3 (5)		5 (9)	53 (91)		54 (93)	4 (7)		54 (93)	4 (7)	
Consumo de alcohol																		
Bebedores	83 (93)	6 (7)	0,75	61 (69)	27 (31)	0,57	88 (99)	1 (1)	0,18	2 (2)	86 (98)	0,054	82 (92)	7 (8)	0,55	85 (95)	4 (5)	1,0
No bebedores	71 (95)	4 (5)		55 (73)	20 (27)		72 (95)	4 (5)		7 (9)	69 (91)		72 (95)	4 (5)		73 (96)	3 (4)	
pT																		
pT1	41 (98)	1 (2)	0,64	24 (57)	18 (43)	0,01	41 (98)	1 (2)	0,22	1 (2)	40 (98)	0,19	40 (95)	2 (5)	0,20	40 (95)	2 (5)	0,053
pT2	65 (91)	6 (9)		50 (70)	21 (30)		71 (99)	1 (1)		3 (4)	69 (96)		66 (92)	6 (8)		71 (99)	1 (1)	
pT3	23 (96)	1 (4)		21 (91)	2 (9)		22 (98)	2 (2)		3 (12)	21 (88)		24 (100)	0 (0)		23 (96)	1 (4)	
pT4	18 (95)	1 (5)		16 (84)	3 (16)		18 (95)	1 (5)		2 (11)	17 (89)		16 (84)	3 (16)		16 (84)	3 (16)	
pN																		
pN0	89 (95)	5 (5)	0,51	65 (69)	29 (31)	0,80	92 (97)	3 (3)	0,66	3 (3)	91 (97)	0,44	90 (95)	5 (5)	0,51	91 (96)	4 (4)	1,0
pN+	58 (92)	5 (8)		44 (71)	18 (29)		61 (97)	2 (3)		4 (6)	59 (94)		58 (92)	5 (8)		60 (95)	3 (5)	

Estadio clínico																
I	35 (95) 2 (5)	0,86	20 (54) 17 (46)	0,01	35 (95) 2 (5)	0,19	1 (3) 35 (97)	0,17	35 (95) 2 (5)	0,67	35 (95) 2 (5)	0,76				
II	47 (94) 3 (6)		39 (78) 11 (22)		51 (100) 0 (0)		1 (2) 50 (98)		48 (94) 3 (6)		50 (98) 1 (2)					
III	29 (97) 1 (3)		26 (87) 4 (13)		28 (93) 2 (7)		4 (13) 26 (87)		29 (97) 1 (3)		29 (97) 1 (3)					
IV	43 (92) 4 (8)		31 (67) 15 (33)		46 (98) 1 (2)		3 (6) 44 (94)		42 (89) 5 (11)		44 (94) 3 (6)					
Grado de diferenciación																
Bien	100 (95) 5 (5)	0,34	75 (71) 30 (29)	0,92	102 (97) 3 (3)	1,0	5 (5) 99 (95)	0,72	98 (93) 7 (7)	1,0	101 (96) 4 (4)	0,70				
Moderado/mal	54 (92) 5 (8)		41 (71) 17 (29)		58 (97) 2 (3)		4 (7) 56 (93)		56 (93) 4 (7)		57 (95) 3 (5)					
Invasión perineural																
No	146 (94) 9 (6)	0,44	110 (71) 44 (29)	0,71	152 (97) 4 (3)	0,24	9 (6) 146 (94)	1,0	146 (94) 10 (6)	0,44	151 (97) 5 (3)	0,04				
Si	8 (89) 1 (11)		6 (67) 3 (33)		8 (89) 1 (11)		0 (0) 9 (100)		8 (89) 1 (11)		7 (78) 2 (22)					
Invasión vascular																
No	148 (94) 9 (6)	0,36	113 (72) 43 (28)	0,10	153 (97) 5 (3)	0,80	9 (6) 148 (94)	1,0	147 (93) 11 (7)	1,0	151 (96) 7 (4)	0,10				
Si	6 (86) 1 (14)		3 (43) 4 (57)		7 (100) 0 (0)		0 (0) 7 (100)		7 (100) 0 (0)		7 (100) 0 (0)					
Estado clínico al final del seguimiento:																
Vivo sin recurrencia	73 (96) 3 (4)	0,25	51 (68) 24 (32)	0,22	74 (96) 3 (4)	1,0	7 (5) 72 (95)	1,0	73 (95) 4 (5)	0,25	75 (97) 2 (3)	0,51				
Fallecido por COCE	63 (94) 4 (6)		52 (78) 15 (22)		65 (97) 2 (3)		5 (7) 62 (93)		60 (90) 7 (10)		63 (94) 4 (6)					
Censurado	15 (83) 3 (17)		12 (67) 6 (33)		18 (100) 0 (0)		0 (0) 18 (100)		18 (100) 0 (0)		17 (94) 1 (6)					
Segundo cáncer primario	3 (100) 0 (0)		1 (33) 2 (67)		3 (100) 0 (0)		0 (0) 3 (100)		3 (100) 0 (0)		3 (100) 0 (0)					

7.2.5 Supervivencia e influencia de las variables clínico-patológicas en la misma.

En el momento del último seguimiento (rango de 1 a 221 meses), 67 pacientes (40,4%) habían fallecido previamente por el COCE que habían sufrido. La media y mediana de los tiempos de seguimiento fueron 62,58 (DE: 53,60) y 59, respectivamente.

La tasa de supervivencia de la enfermedad a los 5 años fue del 61% y a los 10 años del 53%, siendo el tiempo medio de supervivencia de 132,73 meses (IC 95 %: 116,49-148,96 meses).

En el análisis de supervivencia se pudo observar como el tamaño del tumor y la extensión local (T1-2 frente a T3-4), el estado de afectación de los ganglios del cuello (N0 frente a N+) y el estadio de la enfermedad se asociaron significativamente con la supervivencia ($p < 0,0005$; HR = 3,9, HR = 3,8; HR = 4,3, respectivamente).

7.2.6. Análisis de supervivencia específica y supervivencia general y su asociación con las proteínas y FTs asociados al proceso TEM.

Los resultados del análisis de supervivencia mediante la prueba de análisis univariante de Kaplan-Meier revelaron que los pacientes con expresión de Vimentina (*log rank*, $p = 0,001$, HR = 2,18) y N-Cadherina (*log rank*, $p = 0,01$, HR = 1,77) mostraron una supervivencia específica significativamente menor. La Figura 5 muestra las curvas de supervivencia específica de la E-Cadherina, N-Cadherina y Vimentina.

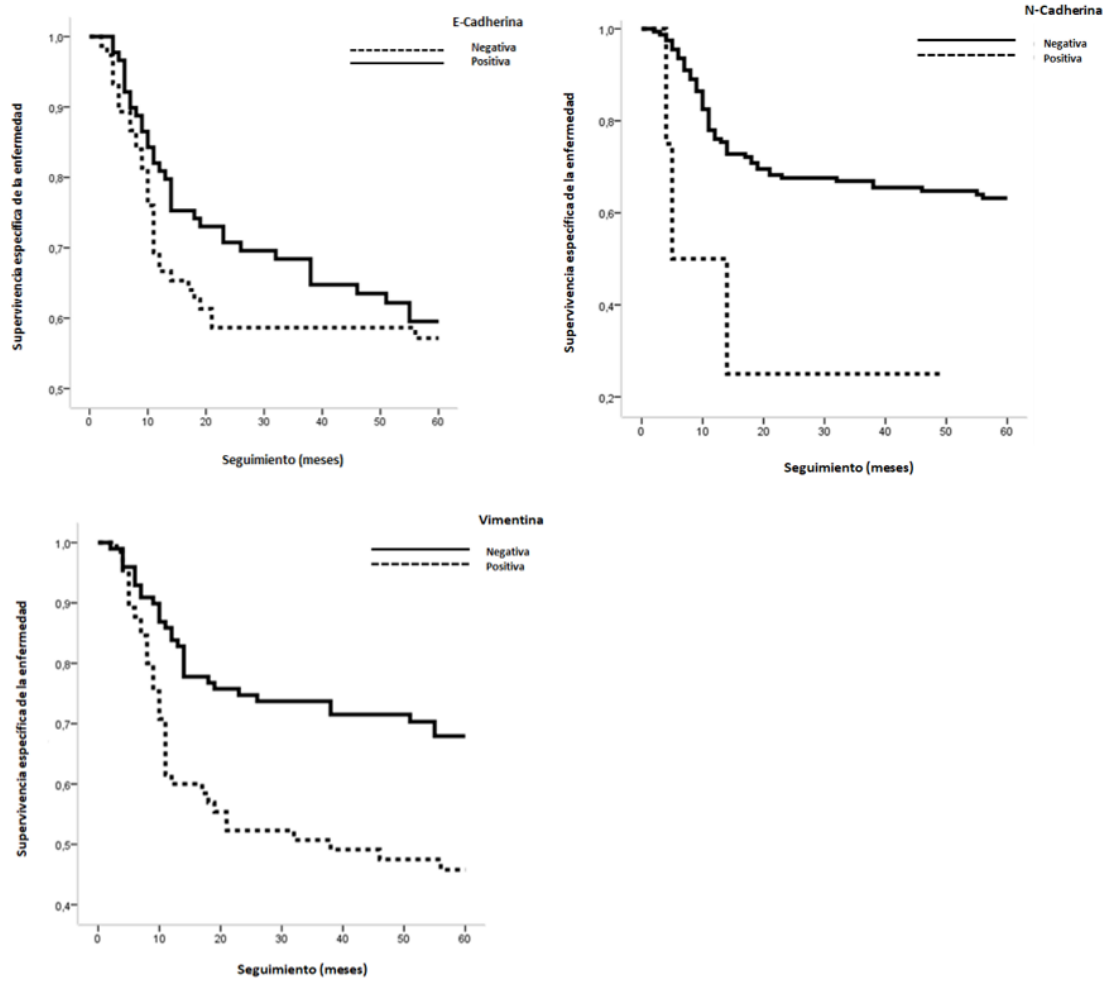


Figura 5. Curvas de supervivencia específica de la E-Cadherina, N-Cadherina y Vimentina.

También la supervivencia general fue menor en los sujetos con expresión de Vimentina (*log rank*, $p = 0,001$, HR = 1,77) y N-Cadherina (*log rank*, $p = 0,01$, HR = 3,29).

El análisis multivariante de Cox, que incluyó Vimentina y N-Cadherina, mostró además que solo la Vimentina era un predictor independiente estadísticamente significativo de una supervivencia general (SG) más pobre ($p = 0,005$; HR = 1,831, IC del 95 %: 1,197–2,799) y una supervivencia específica también menor ($p = 0,001$; HR = 2,209, IC 95%: 1.356 – 3.601) (Figura 6).

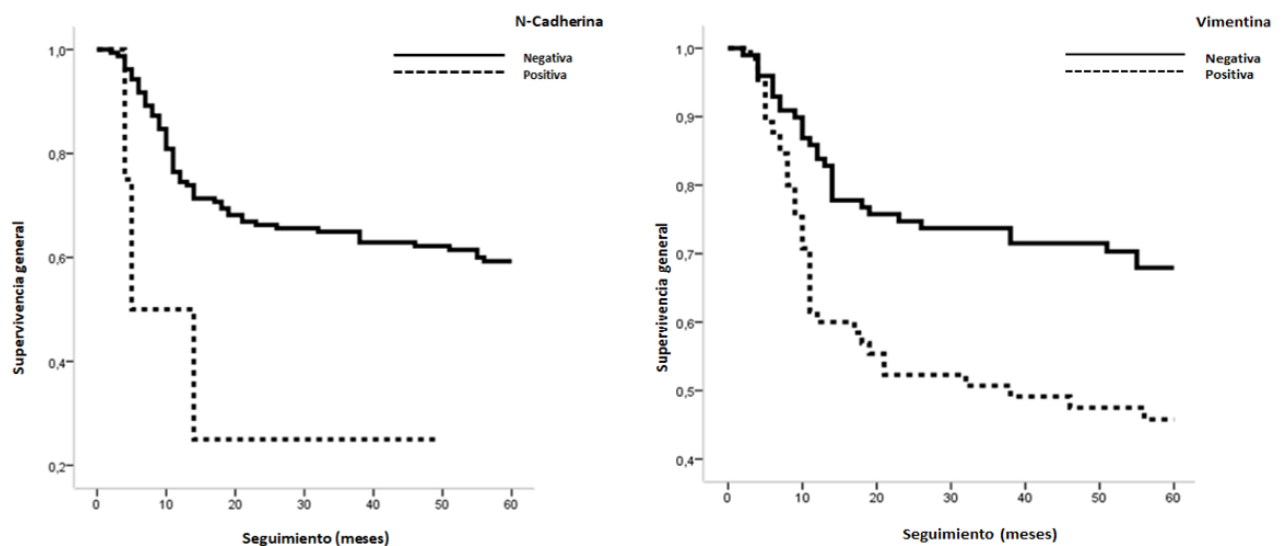


Figura 6. Curvas de supervivencia general de N-Cadherina y Vimentina.

Ninguno de los FTs evaluados asociados al proceso TEM se asoció significativamente con la supervivencia.

7.2.7. Análisis de la supervivencia y el estado del proceso TEM.

Siguiendo la clasificación de Wangmo y cols. de 2020, 63 (38%) tumores no exhibieron TEM, 64 (39%) exhibieron TEM parcial y 38 (23%) exhibieron TEM completa. El estado del proceso TEM no se asoció significativamente con ninguna característica clínico-patológica. Sin embargo, los análisis de Kaplan-Meier y Cox univariados mostraron que la TEM completa se asoció con una supervivencia más pobre ($p = 0,014$; HR = 2,18, intervalo de confianza del 95 % = 1,17 – 4,06) en comparación con la ausencia de TEM. Sin embargo, la TEM parcial no mostró una supervivencia significativamente menor que la ausencia de TEM ($p = 0,14$) o la TEM completa ($p = 0,24$). La curva de supervivencia específica en función de TEM parcial, TEM completa y no TEM se muestra en la Figura 7.

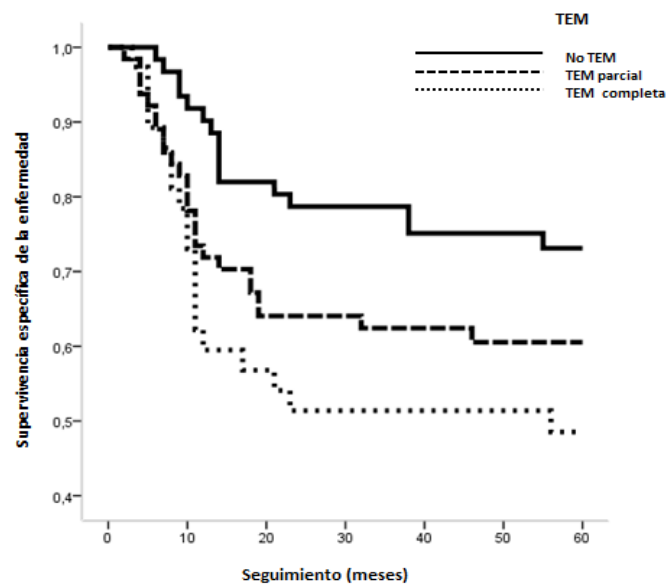


Figura 7. Relación de la supervivencia y el proceso TEM.

8. DISCUSIÓN

8. DISCUSIÓN

8.1. Discusión de los resultados de la revisión sistemática de los genes implicados en la transición epitelio-mesenquimal en el COCE.

La evidencia científica actual muestra como existen trabajos que han evaluado como el proceso TEM es relevante en el pronóstico del COCE. Como vimos en la introducción, el proceso TEM está asociado a un aumento de la invasión y metástasis (Zhao y cols., 2016; Chang y cols., 2019), así como a una mayor resistencia a diferentes tratamientos como la inmunoterapia y la quimioterapia (Wangmo y cols., 2020). Hoy en día, el estudio de la expresión de ciertos genes es una herramienta aplicada en numerosas áreas médicas, y la determinación de diferentes genes asociados a procesos oncológicos puede ser útil en la prevención y tratamiento de ciertos tumores (The Cancer Genome Atlas Network, 2015).

En la revisión sistemática realizada se han analizado diferentes genes implicados en el proceso TEM en el COCE. Los genes asociados a TEM en COCE que se han identificado en este trabajo han sido HMGA2, ITGA5, ALDH3A1, HNRNPC, SRSF3, ARID2 y DZIP1. Estos genes, como hemos mostrado, tienen diferentes funciones biológicas. HMGA2 es una proteína cromosómica que puede actuar como un FT y que presenta potencial metastásico en células tumorales. ITGA5 es un miembro de la familia de las integrinas que participa en el proceso de adhesión celular y que media en la unión de las células a la fibronectina. ALDH3A1 codifica una enzima con el mismo nombre, y entre sus funciones se encuentra la del metabolismo de los aldehídos y otros sustratos, manteniendo el balance celular y la integridad de estructuras, como la córnea. HNRNPC pertenece a la subfamilia de ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas. SRSF3 participa en la unión del ácido nucleico y RNA. ARID2 codifica para un miembro de la familia de proteínas de unión al ADN que contiene un dominio interactivo rico en AT (ARID). Los miembros de la familia ARID tienen un papel en el desarrollo embrionario, la regulación genética celular, el control del ciclo celular, la regulación transcripcional y la modificación de la estructura de la cromatina. Y finalmente, DZIP1 es un oncogén

implicado en la progresión de carcinomas a través de la vía de la Wnt/ β -catenina (Genecards, 2021).

Todos los estudios que se han incluido en la revisión sistemática evaluaron la expresión de diferentes genes implicados en el proceso TEM mediante PCR. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la relación entre las variables clínico-patológicas de los casos de COCE y los genes asociados al proceso TEM fue analizada mediante la detección de las correspondientes proteínas en los tejidos de COCE mediante inmunohistoquímica (Wu y cols., 2020; Qu y cols., 2020; Zhang y cols., 2017; Zhao y cols., 2016; Peiqi y cols., 2016). Generalmente, la validación de los genes implicados en TEM se realiza mediante inmunohistoquímica, porque la extracción de material genético de tejidos tumorales recogidos previamente es difícil y cara. Además, muchas veces las muestras no se encuentran en las mejores condiciones. Por esta razón, en la mayoría de los casos se emplean pruebas de inmunohistoquímica, ya que son más baratas y fáciles de realizar (Doleshal y cols., 2008). Respecto a esto, creemos como otros autores, que los niveles de expresión proteica se corresponden en su mayoría con los niveles de expresión genética (Qu y cols., 2020).

Existe evidencia que muestra como los estadios clínicos más avanzados de la clasificación TNM se asocian a un peor pronóstico del cáncer (Almangush y cols., 2020). En la revisión sistemática que hemos llevado a cabo, los estadios clínicos más avanzados de COCE (III y IV) fueron asociados a la alta expresión de HNRNPC (Huang y cols., 2020), ITGA5 (Deng y cols., 2019), HMGA2 (Zhao y cols., 2016) y SRSF3 (Peiqi y cols., 2016). Por otro lado, los estadios clínicos más avanzados de la clasificación TNM se asociaron con la baja expresión de ARID2, que es un supresor tumoral que puede inhibir el proceso TEM (Wu y cols., 2020). Por tanto, la alta expresión de HNRNPC, ITGA5, HMGA2 y SRSF3, y la baja expresión de ARID2 en muestras de COCE, se asocia a un peor pronóstico de la enfermedad. En base a estos resultados, creemos que la detección de estos genes/proteínas en COCE podría ser útil para predecir el pronóstico de este tipo de cáncer.

La recurrencia local y metástasis son factores clave en el pronóstico del COCE (Zhang y cols., 2017). Sin embargo, de todos los estudios incluidos en la revisión sistemática sólo

Huang y cols. estudiaron la relación de la alta o baja expresión de HNRNPC con la metástasis a distancia, sin encontrar asociación estadísticamente significativa entre la expresión de dicho gen y el desarrollo de metástasis (Huang y cols., 2020). Debido a la importancia de la presencia de metástasis de cara al tratamiento y pronóstico de los pacientes con COCE, creemos que esta variable debería ser analizada en futuros estudios sobre este tema.

Solo Zhang y cols. (Zhang y cols., 2017) investigaron la relación de la recurrencia local con la expresión de HMGA2. Determinaron que había una asociación significativa entre la alta expresión de HMGA2 y la recurrencia local, la cual estaba presente en el 27,8% de los casos incluidos en el grupo de alta expresión. En base a estos resultados, estos autores comentan en su trabajo que la detección de HMGA2 podría ser de ayuda para predecir casos de alto riesgo de recurrencia.

Solo dos estudios de los incluidos en la revisión sistemática especifican el tiempo de seguimiento. Los pacientes del estudio de Wu y cols. (Wu y cols., 2020) tuvieron un seguimiento de 5 años, mientras que Qu y cols. (Qu y cols., 2020) sometieron a sus pacientes a un seguimiento cada 3-6 meses hasta el quinto año. Aunque el resto de los autores no especificaron el tiempo de seguimiento en sus trabajos, sí que realizaron un seguimiento de sus pacientes, ya que sus resultados aportan datos de supervivencia y fallecimiento (Zhao y cols., 2016), así como de recurrencia tumoral (Zhang y cols., 2017). Consideramos que en el futuro se necesitan más estudios que arrojen datos específicos sobre el tiempo de seguimiento de los pacientes con COCE para aumentar la calidad metodológica de los mismos. De igual forma, creemos conveniente que el tiempo de seguimiento sea mayor en futuros estudios.

En nuestra revisión sistemática, observamos que solo dos estudios (Zhang y cols., 2017; Zhao y cols., 2016) analizaron el mismo gen, el gen HMGA2. Ello ha sido una limitación importante de nuestro trabajo. No encontrar estudios homogéneos que evalúen el mismo gen asociado al proceso TEM ha impedido poder realizar un metaanálisis. Los dos estudios que analizaron el gen HMGA2 fueron estudios de cohortes retrospectivos que recogieron casos de COCE de lengua. Ambos estudios analizaron el sexo y edad de los pacientes incluidos, y ambos autores concuerdan en que no existen diferencias significativas que relacionen la edad y los niveles de expresión de HMGA2. Respecto al

sexo de los pacientes, Zhao y cols. (Zhao y cols., 2016) encontraron que la expresión de la proteína HMGA2 era significativamente mayor en pacientes varones. Zhang y cols. (Zhang y cols., 2017) mostraron que había más pacientes varones en el grupo de alta expresión, pero sin obtener diferencias significativas. Respecto a hábitos tóxicos, ninguno de los autores analizó el consumo de alcohol. Solo Zhang y cols. (Zhang y cols., 2017) tuvieron en cuenta el consumo de tabaco, sin encontrar una asociación significativa entre la expresión de HMGA2 y el número de cigarrillos. Los dos estudios analizaron el tamaño tumoral (T), sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de expresión negativa o baja y el grupo de alta expresión. Ambos estudios mostraron la relación entre la expresión de HMGA2 y la presencia de metástasis en ganglios linfáticos regionales (N). Zhang y cols. establecieron tres grupos: ausencia de metástasis, N1 y N2, sin encontrar una asociación significativa con la expresión (Zhang y cols., 2017). Por el contrario, Zhao y cols. diferenciaron únicamente entre ausencia y presencia de metástasis ganglionar, determinando que existía asociación significativa entre la afectación ganglionar y la alta expresión de HMGA2 (Zhao y cols., 2016). Otro parámetro patológico que los dos estudios tuvieron en cuenta fue el grado de diferenciación tumoral o el grado histológico tumoral. Zhang y cols. diferenciaron entre bien diferenciado, moderadamente diferenciado y pobremente diferenciado, sin encontrar asociación significativa con los niveles de expresión (Zhang y cols., 2017). Sin embargo, Zhao y cols. establecieron dos grupos: bien diferenciado, y moderado y pobremente diferenciado, y mostraron que existía una relación significativa entre un peor grado de diferenciación tumoral y la alta expresión de HMGA2 (Zhao y cols., 2016). Una de las principales diferencias entre estos dos estudios es que Zhang y cols. evaluaron la recurrencia y Zhao y cols. no lo hicieron. Los pacientes con alta expresión de HMGA2 mostraron mayores tasas de recurrencia, aunque no se obtuvieron datos significativos (Zhang y cols., 2017). Por otro lado, Zhao y cols. consideraron que los estadios clínicos más avanzados en la clasificación TNM (III, IV) estaban asociados significativamente a un mayor nivel de expresión de HMGA2 (Zhao y cols., 2016). En resumen, si analizamos juntos los resultados de ambos estudios, podemos concluir como los estadios clínicos más avanzados de la clasificación tumoral y los casos de peor diferenciación tumoral están asociados con la alta expresión de HMGA2.

En general, dentro de las limitaciones de este trabajo de revisión sistemática se encuentra, como hemos comentado, el hecho de que solo dos estudios analizaran la implicación del mismo gen (HMGA2) en el proceso TEM (Zhang y cols., 2017; Zhao y cols., 2016). Ello ha hecho que no sea posible realizar un metaanálisis sobre los genes implicados en el proceso TEM en el COCE. Otra importante limitación es el número de estudios incluidos en la revisión sistemática (n=8). Además, no todos los estudios incluyeron las mismas variables clínicas ni anatómo-patológicas, y además algunos de ellos recogieron las variables clínico-patológicas de diferente forma. En el futuro pensamos que sería conveniente homogeneizar las variables a recoger con el objetivo de establecer conclusiones más precisas.

Otra limitación es que todos los estudios incluidos fueron llevados a cabo en China. Hay que considerar la posibilidad de que la dieta o hábitos de los pacientes puedan afectar al desarrollo de COCE en estos casos. Consideramos que en un futuro será necesario realizar estudios en otros países para poder extrapolar los resultados.

8.2. Discusión de los resultados del estudio acerca del análisis de proteínas y factores de transcripción asociados al proceso TEM en COCE.

En el estudio realizado en el HUCA, tras analizar las proteínas clásicas implicadas en el proceso TEM, se determinó que la expresión de N-Cadherina mostró una asociación significativa con el tamaño tumoral y el estadio clínico. Se pudo observar cómo en la cohorte de ausencia de expresión existían tumores de menor tamaño y estadios clínicos menos avanzados de COCE. Tras analizar la expresión de Vimentina, se establecieron asociaciones significativas con el tamaño tumoral, el grado de diferenciación tumoral, la afectación de ganglios linfáticos regionales, y con el estadio clínico. En cuanto a los FTs-TEM, Slug se asoció significativamente con el tamaño del tumor y con el estadio clínico. También, la expresión de E47 se asoció significativamente con invasión perineural, se observó cómo el 97% de los casos de la cohorte de ausencia de expresión no presentaron invasión. No se observaron más resultados estadísticamente significativos de asociación entre otros FTs del proceso TEM y los parámetros clínico-patológicos estudiados.

En nuestro estudio, la expresión de E-Cadherina se detectó en 89 muestras de COCE (54,5 %). Por el contrario, la E-Cadherina no se expresó en 75 muestras (45,5%). Angadi y cols. también realizaron un estudio donde analizaron mediante IHQ la E-Cadherina en muestras de COCE observando una expresión reducida de E-Cadherina en el 40% de las muestras (Angadi y cols., 2016). Existen otros autores que han mostrado una baja expresión de E-Cadherina en el 74% de los COCE (Kadeh y cols., 2021). Y también en un estudio reciente se encontraron diferencias significativas en la expresión del gen E-Cadherina entre casos de COCE y un grupo control sano. Los autores de este trabajo sostienen que la E-Cadherina se regula a la baja en casos de COCE (López-Verdín y cols., 2019).

En nuestro estudio no se encontró una asociación significativa entre la expresión de E-Cadherina y las variables clínico-patológicas y la supervivencia. Esto concuerda con los resultados del estudio de López-Verdín y cols. que tampoco encontraron asociación entre la expresión de E-Cadherina y ciertas variables como el tamaño tumoral, la afectación ganglionar local, los resultados de la clasificación TNM o la supervivencia de

los pacientes con COCE. Pese a que estos autores no observaron resultados significativos, sí que pudieron observar como a medida que aumentaba el estadio clínico (estadios clínicos más avanzados), los niveles de expresión de E-Cadherina disminuían. Del mismo modo, también constataron como los niveles de expresión de E-Cadherina fueron más bajos en pacientes con metástasis y afectación de ganglios linfáticos (López-Verdin y cols., 2019). Kadeh y cols. también observaron cómo a medida que el grado de diferenciación progresaba de bien diferenciado a pobremente diferenciado, la expresión de E-Cadherina disminuía. Sin embargo, estos cambios no fueron estadísticamente significativos (Kadeh y cols., 2021). Y Angadi y cols. mostraron una asociación significativa entre la baja expresión de E-Cadherina y los grados de diferenciación histológica más bajos (Angadi y cols., 2016).

Existen trabajos que han estudiado también la expresión de E-Cadherina en muestras de trastornos orales potencialmente malignos como la leucoplasia oral encontrando niveles altos de E-Cadherina en muestras con displasia leve. Sin embargo, la expresión disminuye cuando la displasia va avanzando, siendo la expresión menor en los casos de displasia severa. Por tanto, estos autores defienden que la pérdida de expresión de E-Cadherina puede usarse como marcador tumoral (Sathish y cols., 2020). Sin embargo, algunos autores no están de acuerdo con esto. Si bien la E-Cadherina está regulada a la baja en las primeras etapas del COCE, sus niveles de expresión no cambian significativamente en etapas más avanzadas de la enfermedad. López-Verdin y cols. sugieren que esto supone una limitación para poder predecir el progreso del COCE (López-Verdin y cols., 2019).

En nuestro estudio, el 45,5% de los pacientes tuvo ausencia de expresión de E-Cadherina. Dentro del grupo de ausencia de expresión de E-Cadherina, el 35% de los pacientes padecía un COCE en estadio I, el 41% en estadio II, el 48% en estadio III, y el 58% en estadio IV. Sin embargo, no obtuvimos resultados estadísticamente significativos entre el nivel de expresión de E-Cadherina y el estadio clínico del COCE. Pero como en estudios previos se observa una tendencia que muestra mayor ausencia de expresión cuando aumenta el estadio. Otros autores como Morais y cols. defienden que una baja expresión de E-Cadherina se asocia significativamente con una pobre supervivencia global en los pacientes con COCE lingual (Morais y cols., 2023). Sin embargo, nosotros

no podemos afirmar que la E-Cadherina sea un buen biomarcador del pronóstico del COCE.

En cuanto a la N-Cadherina, en nuestro estudio este marcador sólo fue detectado en 4 muestras (2,5%) de COCE. En estudios previos se ha observado como la N-Cadherina se expresa en ciertos tumores, como el cáncer de próstata (Nalla y cols. 2011), el cáncer de páncreas (Nakajima y cols., 2004) o el COCE (Di Domenico y cols., 2011). El estudio de Angadi y cols. mostró un aumento de la expresión de N-Cadherina en el 80% de los casos de COCE (Angadi y cols., 2016). Esto también concuerda con Chandolia y cols., quienes observaron como la N-Cadherina está regulada al alza en el COCE (Chandolia y cols., 2017). Nuestros resultados no coinciden con estos estudios previos en COCE, ya que la expresión de N-Cadherina encontrada fue muy baja.

En el presente trabajo, hemos encontrado una relación significativa entre la ausencia expresión de N-Cadherina y el tamaño tumoral, estadios más avanzados de COCE y tumores moderadamente diferenciados. Respecto al tamaño, los tumores considerados T4 (máximo tamaño de la clasificación) se correspondieron un 100% a la cohorte de ausencia de expresión de N-Cadherina, lo mismo ocurría con el estadio clínico, ya que el más avanzado (IV de la clasificación TNM) fue observado en el 100% de tumores de la cohorte de ausencia de expresión de esta proteína. Respecto al grado de diferenciación tumoral, el 93% de los tumores de la cohorte de ausencia de expresión estaban moderada o pobremente diferenciados. Por tanto, se encontraron peores resultados en la cohorte de baja expresión de N-Cadherina. Sin embargo, la evidencia científica muestra que la expresión elevada de N-Cadherina está relacionada con la agresividad tumoral (Cao y cols., 2019). Y el estudio realizado por Chandolia y cols. también sugiere que la N-Cadherina aumenta su expresión a medida que aumenta la progresión tumoral. Sin embargo, estos autores no correlacionaron el grado de diferenciación histológico del COCE con la expresión de N-Cadherina (Chandolia y cols., 2017).

Por otro lado, la relación entre la expresión de N-Cadherina y las metástasis a distancia ha sido confirmada en modelos tumorales de ratón de neoplasias malignas de cáncer de mama (Hazany cols., 2000), cáncer de próstata (Tanaka y cols., 2010) y melanoma (Li y cols., 2001). De hecho, Cao y cols. afirman que la N-Cadherina podría ser un importante biomarcador de la presencia de metástasis en cáncer y ser un objetivo terapéutico (Cao

y cols., 2019). Sin embargo, en nuestro estudio, la expresión de N-Cadherina solo estuvo presente en el 2,5% de las muestras y no observamos una asociación significativa entre la expresión de N-Cadherina y la presencia de metástasis ganglionar ni tampoco con estado del paciente al final del seguimiento. Debido a que nuestros resultados no siguen la línea de estudios previos y además la positividad de N-Cadherina en las muestras de COCE de nuestro trabajo fue muy baja, creemos que es necesario realizar más estudios que analicen este biomarcador en muestras de COCE en un futuro. De ese modo, se podrán obtener conclusiones acerca del papel que juega la N-Cadherina en el COCE.

Como se comentó en la introducción, en estudios previos de COCE y otros tumores se ha visto que la expresión reducida de E-Cadherina y la sobreexpresión de N-Cadherina están estrechamente asociadas entre sí en casos de CO (Pyo y cols., 2007). Kadeh y cols. confirmaron que una expresión reducida de E-Cadherina se acompaña de una alta expresión de N-Cadherina (Kadeh y cols., 2021). Sin embargo, en nuestro estudio la E-Cadherina se expresó en 89 muestras (54,5%) mientras que la N-Cadherina se expresó en solo 4 muestras (2,5%) de COCE. Por lo que, nuestros resultados contradicen esta afirmación y también este punto deberá ser contrastado en estudios futuros realizados en muestras de COCE.

En lo relativo a la expresión de Vimentina, en el presente estudio se ha observado una expresión de Vimentina en un 39,6% de las muestras de COCE. Otros autores como Liu y cols. habían estudiado este marcador de TEM con anterioridad en COCE, observando como los niveles de Vimentina se encontraban sobreexpresados en muestras de COCE lingual respecto a tejidos orales sanos (Liu y cols., 2017). También en el estudio de Chaw y cols. se observó que la expresión de ARN de Vimentina fue 3,7 veces superior en muestras de COCE respecto a muestras sanas (Chaw y cols., 2012).

En nuestro estudio, de las tres proteínas asociadas a TEM, la Vimentina es la que se ha asociado con más variables clínico-patológicas del COCE. Esto concuerda con los resultados de Liu y cols., quienes demostraron que entre cinco marcadores asociados al proceso TEM (Snail, Twist, E-Cadherina, N-Cadherina y Vimentina), la Vimentina era el marcador pronóstico más prometedor (Liu y cols., 2017). En nuestro trabajo, se ha encontrado una asociación significativa entre la expresión de Vimentina y el tamaño

tumoral, la afectación de ganglios linfáticos locales, estadios clínicos más avanzados, tumores moderada y pobremente diferenciados y también se ha asociado con los casos de muerte por COCE. En la cohorte de ausencia de expresión, el porcentaje de tumores de menor tamaño (T1, T2 y T3) fue mayor que en el grupo donde la Vimentina estaba expresada. Por el contrario, los tumores de mayor tamaño (T4), predominaron en el grupo donde hubo expresión de Vimentina (53%). Lo mismo ocurre con el estadio clínico, ya que en el grupo de expresión ausente de Vimentina predominaron los estadios I, II y III. Sin embargo, el estadio más avanzado (IV) fue superior en las muestras de presencia de expresión de Vimentina. En lo relativo a la afectación ganglionar, el 66% de los pacientes con ausencia de expresión no tuvieron metástasis en ganglios linfáticos cervicales, mientras que el 55% de los pacientes de la cohorte con expresión de Vimentina sí presentaron metástasis ganglionar. En cuanto al grado de diferenciación tumoral, en el grupo de ausencia de expresión el 70% de los tumores fueron considerados bien diferenciados, mientras que en el grupo de expresión de Vimentina el porcentaje se situó en el 30%. Por tanto, en lo relativo a este biomarcador nuestros resultados son similares a estudios previos que consideran que la Vimentina es un marcador mesenquimal y está relacionada con mayor invasión celular y peor pronóstico de la enfermedad (Reigosa y cols., 2017; Dmello y cols., 2018). De hecho, hay estudios que han mostrado un aumento gradual de los niveles de Vimentina en mucosa oral sana, trastornos orales potencialmente malignos y COCE (Aggarwal y cols., 2022; Dmello y cols., 2018).

Sobre el estado clínico de los pacientes al final del seguimiento, destacamos que, dentro de la cohorte de ausencia de expresión de Vimentina, el 73% de los pacientes estaban vivos y sin recurrencia. Por el contrario, en el grupo de expresión de Vimentina, solo un 27% estaban vivos al final del seguimiento. Además, en la cohorte de ausencia de expresión el 33% de los pacientes presentaron un segundo tumor primario, mientras que en el grupo de presencia expresión un 66% lo desarrollaron. Otros estudios previos realizados en COCE, muestran como la mayor expresión de Vimentina se asocia a una pobre diferenciación celular y a metástasis en los ganglios linfáticos en casos de COCE lingual (Liu y cols., 2017). También Kim y cols. estudiaron la expresión de Vimentina en cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, y determinaron que había una

asociación significativa entre la alta expresión de Vimentina y la supervivencia de los pacientes (Kim y cols., 2014). En base a nuestros resultados creemos que nuestro trabajo sigue la tendencia de otros trabajos previos respecto a este biomarcador y como Aggarwal y cols. pensamos que la expresión de Vimentina puede ser un indicador útil de mal pronóstico del COCE (Aggarwal y cols., 2022).

En cuanto a los FTs asociados al proceso TEM, en este estudio se ha analizado la expresión de Snail, Slug, ZEB1, ZEB2, Twist, Smad7 y E47. Twist se expresó en el 94,5% de las muestras, Slug en el 28,8%, Smad7 en el 6,7%, Snail en el 6,1%, E47 en el 4,2%, ZEB1 en el 3% y ZEB2 no se expresó en ninguna de las muestras analizadas. Los resultados de nuestro trabajo mostraron que la expresión de los FTs -TEM estudiados no se asoció con variables como el género, el consumo de tabaco y el consumo de alcohol. Tampoco la expresión de los FTs -TEM se asoció con las variables clínico-patológicas como la afectación de ganglios linfáticos locales, el grado de diferenciación, la invasión vascular y el estado clínico de los pacientes al finalizar el seguimiento. Solamente observamos una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de Slug y el tamaño tumoral y el estadio clínico de la enfermedad. Además, la expresión de E47 se asoció de forma significativa con la invasión perineural.

Como hemos comentado, en el presente trabajo, Snail se expresó en el 6,1% de las muestras. Sin embargo, existen estudios previos que detectaron la presencia de Snail en el 40,45% de muestras de COCE lingual (Zheng y cols.,2015). Nuestros resultados difieren de los obtenidos por Zhen y cols. por lo que son necesarios más estudios al respecto. Del mismo modo, el presente trabajo no encontró asociación entre la expresión de Snail y las diferentes variables clínico-patológicas analizadas. Sin embargo, en otros estudios previos si se ha observado asociación significativa entre la expresión de Snail y el patrón de invasión celular en leucoplasias y COCE (Lopes y cols., 2018). Por otra parte, Zhao y cols. determinaron la expresión de Snail en COCE lingual observando una asociación entre la expresión de Snail y el estadio clínico del tumor, la afectación de los ganglios linfáticos, el grado de diferenciación histológica y la supervivencia de los pacientes (Zhao y cols., 2016). Gold y Kim (2009) también observaron una asociación entre la expresión de Snail y la presencia de metástasis y el mal pronóstico del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Gold y Kim, 2009). Y Liu y cols., en tejidos de

COCE lingual, observaron cómo los tumores con estadios más avanzados expresaban niveles más altos de Snail. Sin embargo, no encontraron relación significativa entre la expresión de Snail y el tamaño o profundidad de invasión tumoral (Liu y cols., 2017). Dada la baja presencia de Snail en las muestras analizadas, nuestros resultados no pueden apoyar los resultados de estudios previos y creemos que son necesarios más estudios al respecto.

En cuanto a FT del proceso TEM Slug, éste se expresó en el 28,8% de las muestras analizadas. Zheng y cols. evaluaron la expresión de Slug en COCE lingual humano mediante análisis de IHQ obteniendo presencia de Slug en el 43,82% de los casos (Zheng y cols., 2015). En el estudio de cohortes de Nakamura y cols. que incluyó pacientes con COCE lingual, se observó un aumento del nivel de expresión de Slug en tejidos de COCE, en comparación con los tejidos sanos adyacentes. Además, estos autores, también observaron que Slug se expresaba en la mayoría de las líneas celulares de COCE y que la expresión era mayor en muestras de COCE que en tejidos sanos (Nakamura y cols., 2018). También observaron como la disminución de la expresión de Slug, aumentaba la expresión de Snail y viceversa (Nakamura y cols., 2018). Del mismo modo, Zheng y cols. determinaron que Slug se expresaba junto con Snail en el 33,71% de los casos (Zheng y cols., 2015).

Tal y como hemos descrito anteriormente, en nuestro estudio únicamente se encontró una asociación significativa entre la ausencia de expresión de Slug y el tamaño del tumor y el estadio clínico tumoral. En lo relativo al tamaño tumoral, el 84% de los pacientes del grupo de ausencia de expresión presentaron un T4, frente al 16% del grupo de alta expresión. De igual manera, en cuanto al estadio tumoral, el 67% de los pacientes de la cohorte de ausencia de expresión de Slug presentaban el estadio tumoral más avanzado, el estadio IV, mientras que en el grupo de presencia de expresión solamente el 33% de los pacientes se encontraban en este estadio tumoral. Sin embargo, en estudios previos la alta expresión de Slug se asoció con un mal pronóstico en otros carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello en humanos, como en el cáncer de esófago (Hasan y cols., 2013) y en el de laringe (Cappelleso y cols., 2015). Por lo que nuestros resultados no son similares a estudios previos y son necesarios más estudios al respecto.

Respecto al FT-TEM ZEB1 en nuestro estudio se ha expresado sólo en el 3% de las muestras analizadas. Nuestro resultado es muy bajo en comparación con el obtenido en el estudio de Yao y cols. Estos autores observaron una expresión de ZEB1 en el 53,3% de las muestras de COCE, y además determinaron que la expresión de este FT fue mayor en casos de COCE respecto a tejidos sanos adyacentes (Yao y cols., 2017). Por tanto, nuestros resultados no siguen la línea de estudios previos. Además, en nuestro estudio no hemos encontrado asociación significativa entre la expresión de ZEB1 y las variables clínico-patológicas estudiadas. Sin embargo, otros autores defienden que la sobreexpresión de este FT se asocia con mayor agresividad y metástasis en diversos carcinomas en modelos de ratón (Sánchez-Tillo y cols., 2011). En casos de COCE, algunos autores han asociado la expresión de ZEB1 con mayores tasas de recurrencia y metástasis en los ganglios linfáticos, lo que conlleva un peor pronóstico del COCE (Yao y cols., 2017). Nuestros resultados, sin embargo, no pueden apoyar dichos resultados y serán necesarios futuros estudios para valorar si ZEB1 puede ser un marcador útil asociado al proceso TEM en COCE.

En la presente investigación, el FT Twist se expresó en el 94,5% de las muestras. También Seyedmajidi y cols. estudiaron la expresión de Twist en COCE, y determinaron que la expresión de este FT aumentó significativamente en casos de COCE en comparación con la mucosa oral sana. La expresión de Twist se observó en el 76,6% de los casos de COCE en la tinción nuclear, mientras que la expresión en el citoplasma se dio en el 100% de las muestras (Seyedmajidi y cols., 2018). En nuestro estudio, no se ha podido establecer ninguna asociación significativa entre la expresión de Twist y las variables clínico-patológicas asociadas a los casos de COCE recogidas. Sin embargo, Zhao y cols., estudiaron la expresión de Twist en COCE linguales en tejidos y en líneas celulares. Estos autores comprobaron el desarrollo de metástasis en COCE lingual, y afirmaron que la activación de Snail y Twist puede inducir el proceso TEM lo que conduce a la progresión del cáncer, metástasis y mal pronóstico del COCE (Zhao y cols., 2016). También Seyedmajidi y cols. establecieron una asociación estadísticamente significativa de la presencia de Twist con el estadio clínico y la metástasis en los ganglios linfáticos. Sin embargo, la expresión de Twist en el COCE no se asoció con ningún otro factor clínico-patológico en otros estudios (Seyedmajidi y cols., 2018). En los casos de COCE del

presente estudio, la presencia de Twist fue alta, pero nuestros resultados no pueden apoyar una asociación entre la presencia de este biomarcador y el pronóstico del COCE. Por lo que son necesario futuros estudios.

En nuestro estudio, solamente hubo expresión de Smad7 en el 6,7% de los casos. Además, no se observó asociación estadísticamente significativa entre la expresión de Smad7 y las variables clínico-patológicas analizadas. En los estudios previos realizados no existe una postura clara acerca del papel que juega el FT Smad7 en la progresión tumoral. Algunos autores observaron como en tejidos bien oxigenados actúa como un inhibidor tumoral. Sin embargo, en situaciones de hipoxia se encontraba sobreexpresado y promueve la progresión tumoral. Cabe destacar como la mayor parte de los tumores malignos sólidos, entre los que se encuentra el COCE, se encuentran en situación de hipoxia (Heikkinen y cols., 2010). De hecho, existen estudios que han observado mayor expresión de Smad7 en tejidos con displasia epitelial y COCE, sugiriendo que la sobreexpresión de Smad7 es un evento temprano en el desarrollo de COCE y que este FT-TEM podría ser considerado un marcador de riesgo de malignidad en casos de COCE (Chen y cols., 2013). Sin embargo, los resultados de nuestro trabajo no pueden apoyar estos resultados y son necesarios más estudios al respecto.

Finalmente, el FT-TEM E47 es considerado un represor de la E-Cadherina (Zhu y cols. 2016). En nuestro trabajo, E47 se expresó sólo en el 4,2% de las muestras analizadas. Y no existen estudios previos que analicen este FT en pacientes con COCE. Sin embargo, en un estudio *in vitro* previo realizado en cáncer de colon, se asoció la expresión de E47 con una menor expresión de E-Cadherina y una consiguiente migración e invasión celular (Zhu y cols. 2016). En el presente estudio, únicamente se ha observado una asociación de E47 con la invasión perineural, no estudiada en investigaciones previas. Por ello, es necesario realizar más trabajos al respecto.

En cuanto a la asociación entre sí de las proteínas asociadas a TEM, en nuestro estudio encontramos una asociación estadísticamente significativa entre la ausencia de expresión de E-Cadherina y la expresión de Vimentina. En lo relativo a FTs asociados al proceso TEM, también se observaron asociaciones estadísticamente significativas entre la expresión de Snail y Slug, Snail y ZEB1, y Snail y E47. Además, la expresión de Slug se asoció significativamente con la expresión de Twist. Del mismo modo, la expresión de

ZEB1 se asoció con la expresión de E47. En línea con nuestro trabajo, Nakamura y cols. defienden una asociación entre la expresión de Snail y Slug en células cancerígenas en humanos. En relación con el COCE, otros autores analizaron 89 muestras de COCE lingual y observaron una coexpresión de Snail y Slug en 30 muestras (33,71%) (Zheng y cols., 2015). Y existen estudios previos que han observado como la expresión de Snail o de Slug o la co-expresión de ambos se asocia significativamente con el tamaño tumoral, el grado histológico y las metástasis en los ganglios linfáticos (Zheng y cols., 2015). Además, determinaron que los pacientes con alta expresión de Snail o Slug o su co-expresión tuvieron peor pronóstico que los que no tenían expresión (Zheng y cols., 2015). Por tanto, en base a los estudios previos y nuestros resultados parece que la co-expresión de estos FTs se relaciona con variables clínico-patológicas más desfavorables en COCE.

Recientemente, Morais y cols. analizaron el impacto de Snail en 41 muestras de COCE lingual. Estos autores determinaron que la ausencia de expresión de Snail provocó un aumento en la expresión de E-Cadherina y suprimió la expresión de Vimentina, en líneas celulares. Así mismo, el silenciamiento de Snail dio lugar a una reducción significativa de la capacidad proliferativa de las células cancerígenas, lo cual conlleva un mejor pronóstico (Morais y cols., 2023). En nuestro caso, sin embargo, no hemos podido observar asociaciones entre la expresión de Snail y la expresión de E-Cadherina y Vimentina.

Por último, en cuanto al pronóstico y supervivencia de los pacientes con COCE, hay que destacar que pese a la mayor importancia del diagnóstico precoz y a los avances en el tratamiento del COCE, el pronóstico de los pacientes sigue siendo malo. En términos generales, el COCE presenta una tasa de supervivencia a los 5 años que varía del 15% al 60%, según el estadio de la enfermedad. Ello se debe a que presenta con frecuencia invasión local y metástasis, que es la consecuencia más letal de la progresión tumoral (Zanoni y cols., 2019; Wangmo y cols., 2020). El tiempo de seguimiento de los pacientes del presente estudio varió entre 1 y 221 meses. En otros estudios previos, el tiempo de seguimiento de los pacientes es menor. Por ejemplo, los pacientes con COCE del estudio de Yao y cols. fueron seguidos durante un rango de 8 a 116 meses (Yao y cols., 2017). Y otros autores como Wu y cols. o Qu y cols. establecieron un seguimiento de 5 años, es

decir 60 meses (Wu y cols., 2020; Qu y cols., 2020). Por tanto, el seguimiento amplio de nuestro grupo de pacientes es una fortaleza de nuestro trabajo.

La tasa de supervivencia de los pacientes de nuestro trabajo fue del 61% a los 5 años, y del 53% a los 10 años. La tasa de supervivencia general a 5 años para el COCE sigue siendo la más baja entre las neoplasias malignas, y durante las últimas tres décadas se ha situado en torno al 50% (Taghavi y Yazdi, 2015). Si comparamos nuestra supervivencia con otros trabajos previos podemos observar como la supervivencia a 5 años en el estudio de Taghavi y Yazdi fue menor, del 50%, y en el estudio de Yao y cols. fue mayor, en este caso del 68,3% (Taghavi y Yazdi, 2015; Yao y cols., 2017). Por tanto, la supervivencia de nuestros pacientes está entre las dos series previamente analizadas.

Cabe destacar como de las proteínas asociadas a TEM (E-Cadherina, N-Cadherina y Vimentina) y de los FTs-TEM estudiados (Snail, Slug, ZEB, Twist, Smad7 y E47), solamente la Vimentina y N-Cadherina mostraron una asociación significativa entre su expresión y la supervivencia de los pacientes con COCE de nuestro estudio. De los pacientes vivos sin recurrencia al final del seguimiento, el 73% pertenecían a la cohorte de ausencia de expresión de Vimentina. Además, el número de pacientes fallecidos fue superior en el grupo con expresión de Vimentina. Por tanto, este biomarcador puede ser útil para valorar el pronóstico de los pacientes con COCE.

Respecto al análisis de la supervivencia en función de si el proceso TEM era completo, parcial o ausente, en nuestro estudio determinamos que la TEM completa se asoció con una supervivencia más pobre de los pacientes con COCE, en comparación con la ausencia del proceso TEM. La TEM parcial no mostró una supervivencia significativamente menor en comparación con la TEM ausente o la TEM completa. Wangmo y cols. analizaron mediante IHQ 200 muestras de COCE, de las cuales el 49,5% no mostró TEM, el 43,5% tuvo una TEM parcial, y el 7,5% una TEM completa. Estos autores determinaron que la TEM completa, entendiendo como tal la ausencia de expresión de E-Cadherina y la expresión combinada Vimentina y N-Cadherina, mostró una importancia pronóstica mayor que la expresión individual de alguna de estas proteínas (Wangmo y cols., 2020). Por tanto, nuestros resultados están en línea con este trabajo.

En cuanto a las limitaciones del presente estudio, destacamos que tras analizar la expresión de algunas proteínas y FTs clásicos del proceso TEM, hemos observado que algunos resultados no siguen la línea de estudios publicados previamente. Esto puede deberse a que las técnicas de análisis utilizadas son diferentes a estudios previamente realizados o también a que los estudios previos se llevaron a cabo en líneas celulares y los resultados pueden no ser los mismos en muestras de COCE en humanos. Otra limitación de nuestro trabajo es haber categorizado la expresión de los marcadores TEM en presencia o ausencia de expresión, mientras que en otros estudios publicados hablan de alta y baja expresión. Por tanto, la forma de graduar la expresión es diferente y puede hacer que los resultados difieran. También los resultados de nuestro trabajo pueden no ir en línea con estudios previos por la procedencia de los pacientes. Cabe destacar que la mayor parte de los estudios publicados se llevaron a cabo en países asiáticos como India (Angadi y cols., 2016; Sathish y cols., 2020; Chandolia y cols., 2017; Aggarwal y cols., 2022), China (Cao y cols., 2019; Zheng y cols., 2015; Yao y cols., 2017), Japón (Nakamura y cols., 2018), Taiwán (Liu y cols., 2017; Chen y cols., 2013), Irán (Kadeh y cols., 2021) y Tailandia (Wagmno y cols., 2020). Dos fueron realizados en México (Reigosa y cols., 2017, López-Verdín y cols., 2019), dos en Brasil (Lopes y cols., 2018; Morais y cols., 2023) y otro en Australia (Chaw y cols., 2012). Dos se llevaron a cabo en Estados Unidos (Gold y Kim, 2009; Zaroni y cols., 2019) y sólo uno fue realizado en Europa, concretamente en Finlandia (Heikkinen y cols., 2010). Esto podría influir claramente en los resultados, puesto que los hábitos y estilo de vida de los pacientes pueden variar en función de la zona geográfica de procedencia.

9. CONCLUSIONES

9. CONCLUSIONES

1. De acuerdo con los resultados obtenidos de la revisión sistemática, podemos concluir que la alta expresión de HNRNPC, ITGA5, HMGA2 y SRSF3 promueve el proceso TEM en el COCE. De igual forma, la baja expresión de ALDH3A1 y ARID2 facilita el proceso TEM.
2. Tras analizar la expresión de proteínas y FTs implicados en el proceso TEM en un amplio número de muestras de COCE, observamos que la expresión de E-Cadherina tuvo lugar en el 54,5% de las muestras, la de Vimentina en el 39,6% de los casos y la de N-Cadherina en el 2,5% de las muestras. En cuanto a la expresión de los FTs, Twist se expresó en el 94,5% de las muestras, Slug en el 28,8%; Smad7 en el 6,7%; Snail en el 6,1%, E47 en el 4,2% y ZEB1 en el 3%. ZEB2 no se expresó en ninguna de las muestras analizadas.
3. En cuanto a la asociación entre sí de las proteínas y FTs asociados a TEM, encontramos una asociación estadísticamente significativa entre la ausencia de expresión de E-Cadherina y la expresión de Vimentina. También se observaron asociaciones estadísticamente significativas entre la expresión de Snail y Slug, Snail y ZEB1, y Snail y E47. Además, la expresión de Slug se asoció significativamente con la expresión de Twist. Del mismo modo, la expresión de ZEB1 se asoció con la expresión de E47.
4. Tras el análisis de la expresión de proteínas y FTs implicados en el proceso TEM de nuestro estudio retrospectivo en pacientes con COCE, hemos observado como la ausencia de expresión de N-Cadherina y la presencia de Vimentina se asocian con mayor tamaño tumoral, estadios clínico más avanzado y grados de diferenciación histológica menos diferenciados. Así mismo, la presencia de Vimentina se asoció con la afectación de ganglios linfáticos locales y con un estado clínico de los pacientes al final del seguimiento más desfavorable. Únicamente la Vimentina se asoció significativamente con el estado de los

pacientes al final del seguimiento, donde observamos que la mayoría de los pacientes vivos sin recurrencia se encontraban en la cohorte de ausencia de expresión. En cuanto a los FTs asociados a TEM, únicamente la ausencia de expresión de Slug se asoció significativamente con mayor tamaño tumoral y el estadio clínico más avanzado, y la baja expresión de E47 se asoció con la presencia de invasión perineural. El resto de FTs-TEM no se asociaron con ninguna de las variables clínico-patológicas analizadas.

5. En relación con la supervivencia y al estado del proceso TEM, se observó que la TEM completa se asociaba con una supervivencia más pobre de los pacientes, en comparación con la ausencia del proceso TEM. La TEM parcial no mostró una supervivencia significativamente menor en comparación con la TEM completa ni con la ausencia de TEM.

10. ANEXO

10. ANEXO

Publicación:

Vallina C, López-Pintor RM, González-Serrano J, De Vicente JC, Hernández G, Lorz C. Genes involved in the epithelial-mesenchymal transition in oral cancer: A systematic review. *Oral Oncol.* 2021; 117: 105310.

Table 1
General data of identified studies.

Author and year of publication	Journal	Center/ hospital	Country	Type of study	N° of patients	Collection date
Wu et al., 2020	Biomedicine & Pharmacotherapy	Stomatological Hospital of Nanjing Medical University	China	Cohort study	n = 97	2014–2016
Qu et al., 2020	Journal of Cancer	Stomatology Hospital of Capital Medical University	China	Cohort study	n = 72	2010–2013
Huang et al., 2020	Aging (Albany, NY)	Nanfang-Hospital, Southern-Medical University	China	Cohort study	n = 80	NA
Deng et al., 2019	Cancer Management and Research	Hospital of Sun Yat-Sen University	China	Cohort study	n = 105	NA
Yan et al., 2019	Translational Oncology	Hospital of Sun Yat-Sen University	China	Cohort study	n = 100	NA
Zhang et al., 2017	Oral Diseases	Xiangya Hospital of Central South University	China	Cohort study	n = 80	2010–2012
Zhao et al., 2016	Journal of Translational Medicine	Sun Yat-sen Memorial Hospital	China	Cohort study	n = 60	2008–2012
Peiqi et al., 2016	International Journal of Medical Sciences	School & Hospital of Stomatology, Wuhan University	China	Cohort study	n = 77	NA

NA, not available.

Table 2
Description of the genes selected in the study.

Gene symbol	Gene name	Gene function	Biological process	Role in cancer/EMT
ARID2	AT-rich interaction domain-containing protein 2	Chromatin remodeling factor	Transcriptional regulation; cell cycle modulation; embryonic development; DNA damage repair	Tumor suppressor; represses EMT; inhibits Snail transcription [31]; downregulated/mutated in hepatocellular carcinoma [31], colorectal [32] and oral cancer [18,33]
ALDH3A1	Aldehyde dehydrogenase, family 3, subfamily A, member 1	NAD(P) ⁺ dependent enzyme; aldehyde oxidation	Proliferation; differentiation; cell survival; response/protection to oxidative stress	Upregulated/promotes EMT in gastric [34], melanoma and lung cancer [35]; involved in resistance to anticancer drugs [36]; EMT inhibitor in OSCC, low expression associated with metastasis and poor outcome [19]
HNRNPC	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C	RNA-binding protein; reader of N6-methyladenosine modification in RNA	RNA splicing and expression; mediates sequence-non-specific RNA export; regulates RNA 3' end processing and translation	Promotes EMT in OSCC and esophageal cancer [20,37]; poor prognosis biomarker in different tumor types including hepatocellular carcinoma [38], colorectal [39], pancreatic cancer [40], esophageal and HN SCC [20,41,42]
ITGA5	Integrin alpha-5	Alpha subunit of the fibronectin receptor	Cell adhesion; proliferation; migration	Promotes EMT and metastasis to bone in breast cancer [43–45]; associated with EMT, poor prognosis and/or metastasis in hepatocellular carcinoma [46], gastric [47–49], lung [50,51], colorectal [52,53] and HN cancer [21,54–56]
DZIP1	DAZ-interacting zinc finger protein 1	Zinc finger protein; interacts with the RNA-binding protein DAZ	Ciliogenesis, RNA trafficking; Hedgehog and Wnt signaling pathways	Promotes proliferation, migration and invasion in OSCC [22]; putative tumor suppressor gene in breast cancer [57]
HMG2	High mobility group at hook 2	Non-histone chromosomal protein	Regulation of inducible gene transcription; promotion of adipogenesis; highly expressed during embryo development is re-expressed in nearly all human malignancies	Key regulator in cancer development, induction of neoplastic transformation and promotion of metastatic progression of cancer cells [58]; promotes EMT in tongue SCC [23,24]; poor prognosis marker in oral and HN SCC [59–63]
SRSF3	Serine/arginine-rich splicing factor 3	mRNA splicing	Regulation of RNA splicing, export, translation and polyadenylation; regulation of miRNA process; involved in genome and transcriptome integrity	Upregulated/involved in ovarian [64], colon [65], breast cancer [66] and OSCC [25,67]; promotes EMT in OSCC [25]; suppresses EMT and prevents carcinogenesis in hepatocellular carcinoma [68]

long enough for outcomes to occur?, and adequacy of follow up of cohorts) (Table 5). A maximum of one star can be awarded to each item within “Selection” and “Outcome”, and two to “Comparability”, so that each study can obtain a maximum of nine stars.

Studies were rated as good, fair, or poor quality (GQ, FQ, or PQ) following the Agency for Healthcare Research and Quality’s (AHRQ) proposed scoring algorithm: GQ: ≥ 3 stars in the Selection domain and 1–2 stars in the Comparability domain and ≥ 2 in the Outcome domain; FQ: 2 stars in the Screening domain and ≥ 1 stars in the Comparability domain and ≥ 2 in the Results domain; and PQ: 0–1 stars in the Selection domain and 0 stars in the Comparability domain and 0–1 in the Outcome domain [17].

Results

Study selection

The search strategy yielded 3542 results, which after eliminating duplicates turned out to be 2064. Two independent researchers (CV, JGS) reviewed all titles and abstracts of the 2064 articles. A total of 1988 articles were excluded: 1923 for not dealing with genes involved in EMT in OSCC, 37 for being conducted in animals, 14 for being literature reviews, 9 for being conducted in cell lines and cultures, 2 were excluded because they were retracted, 1 for being a case report, 1 for being an in vitro study and 1 for being written in Chinese.

After reading the full text of the remaining studies, another 68 articles were excluded: 28 for being carried out on cell lines and cultures, 20

Table 3
Relationship between the characteristics of OC patients in the different studies and the expression of the genes/ proteins studied.

Author, year, number of patients and protein	Age		Sex		Smoking		Alcohol	
	NE/ LE	HE	NE/ LE	HE	NE/ LE	HE	NE/ LE	HE
Wu et al., 2020 n = 97, ARID2	<60: 17/34; 50.0%	<60: 20/63; 31.7%	M: 19/34; 55.9%	M: 29/63; 46.0%	Yes: 7/34; 20.6%	Yes: 10/63; 15.9%	Yes: 5/34; 14.7%	Yes: 10/63; 15.9%
	>60: 17/34; 50.0%	>60: 43/63; 68.3%	F: 15/34; 44.1%	F: 34/63; 54.0%	No: 27/34; 79.4%	No: 53/63; 84.1%	No: 29/34; 85.3%	No: 53/63; 84.1%
	p = 0.078		p = 0.36		p = 0.56		p = 0.88	
Qu et al., 2020 n = 72, ALDH3A1	<61: 17/40; 42.5%	<61: 17/32; 53.1%	M: 25/40; 62.5%	M: 22/32; 68.8%	NA	NA	NA	NA
	>61: 23/40; 57.5%	>61: 15/32; 46.9%	F: 15/40; 37.5%	F: 10/32; 31.2%				
	p = 0.37		p = 0.58					
Huang et al., 2020 n = 80, HNRNPC	>60: 10/41; 24.4%	>60: 12/39; 30.8%	M: 20/28; 71.4%	M: 41/52; 78.8%	NA	NA	NA	NA
	<60: 31/41; 75.6%	<60: 27/39; 69.2%	F: 8/28; 28.6%	F: 11/52; 21.2%				
	p = 0.62		p = 0.58					
Deng et al., 2019 n = 105, ITGA5	<60: 12/29; 41.4%	<60: 38/76; 50.0%	M: 27/29; 93.1%	M: 48/76; 63.2%	NA	NA	NA	NA
	>60: 17/29; 58.6%	>60: 38/76; 5.00%	F: 2/29; 6.9%	F: 28/76; 36.8%				
	p > 0.05		p = NA					
Yan et al., 2019 n = 100, DZIP1	<60:12/31; 38.7%	<60:33/69; 47.8%	M: 27/31; 87.1%	M: 42/69; 60.9%	NA	NA	NA	NA
	>60: 19/31; 61.3%	>60: 36/69; 52.2%	F: 4/31; 12.9%	F: 27/69; 39.1%				
	p > 0.05		p = NA					
Zhang et al., 2017 n = 80, HMGA2	Negative: >60: 1/21; 4.8%	Moderate: >60: 2/29; 6.9%	Negative: M:19/21; 90.5%	Moderate: M: 28/32; 87.5%	Negative: >20:7/21; 33.3%	Moderate: >20: 13/29; 44.8%	NA	NA
	<60: 20/21; 95.2%	<60: 27/29; 93.1%	F:2/21; 9.5%	F: 4/32; 12.5%	<20: 1/21; 4.8%	<20: 6/29; 20.7%		
	Weak: >60: 8/12; 66.7%	Strong: >60: 5/23; 21.7%	M:12/14; 85.7%	Strong: M: 9/13; 69.2%	No:13/21; 61.9%	No: 10/29; 34.5%		
	<60:4/12; 33.3%	<60:18/23; 78.3%	F:2/14; 14.3%	F: 4/13; 30.8%	Weak: >20: 4/12; 33.3%	Strong: >20: 8/18; 44.4%		
					<20: 6/12; 50.0%	<20: 4/18; 22.2%		
					No: 2/12; 16.7%	No: 6/18; 33.4%		
	p = 0.92		p = 0.13		p = 0.33			
Zhao et al., 2016 n = 60, HMGA2	<55: 12/23; 52.2%	<55: 22/37; 59.5%	M: 9/23; 39.1%	M: 28/37; 75.7%	NA	NA	NA	NA
	>50: 11/23; 47.8%	>50: 15/37; 40.5%	F: 14/23; 60.9%	F: 9/37; 24.3%				
	p = 0.863		p = 0.005*					
Peiqi et al., 2016 n = 77, SRSF3	Negative: <55: 13/24; 54.2%	Moderate: <55: 6/19; 31.6%	Negative: M: 17/23; 73.9%	Moderate: M: 13/18; 72.2%	Negative: Yes:11/24; 45.8%	Moderate: Yes: 9/20; 45.0%	Negative: Yes: 7/24; 29.2%	Moderate: Yes: 10/20; 50.0%
	>50: 11/24; 45.8%	>50: 13/19; 68.4%	F: 6/23; 26.1%	F: 5/18; 27.8%	No:13/24; 54.2%	No: 11/20; 55.0%	No: 17/24; 70.8%	No: 10/20; 50.0%
	Weak: <55: 14/24; 58.3%	Strong: <55: 5/10; 50.0%	M: 19/26; 73.1%	M: 9/10; 90.0%	Weak: Yes:15/24; 62.5%	Strong: Yes: 6/9; 66.7%	Weak: Yes:12/24; 50.0%	Strong: Yes: 5/9; 55.6%
	>50: 10/24; 41.7%	>50: 5/10; 50.0%	F: 7/26; 26.9%	F: 1/10; 10.0%	No: 9/24; 37.5%	No: 3/9; 33.3%	No: 12/24; 50.0%	No: 4/9; 44.4%
	p = 0.30		p = 0.55		p = 0.59			

NE, negative expression; LE, low expression cohort; HE, high expression cohort; n, number of patients; OSCC, oral squamous cell carcinoma; M, male; F, female; y, year; NA, not available; p, p-value; NS, not statistically significant.

for being on animals, 7 for not reflecting the study of genes but only of proteins involved in EMT, 5 for being performed in HNSCC including larynx and hypopharynx without offering specific data from OSCC patients, 4 for giving EMT gene data after OC treatment, 2 for not validating the participation of the studied genes through the analysis of the proteins involved in the EMT process, 1 for not dealing with genes involved in EMT at OSCC and 1 for not providing data about patients. Finally, 8 articles were included in this systematic review (Fig. 1).

Study characteristics

All studies included in this systematic review were retrospective cohort studies. All studies were published in the last decade, specifically

between 2016 and 2020. All studies were carried out in China (Table 1) and included a total of 671 OSCC patients, of which 69% were male.

The genes studied were as follows: AT-rich interaction domain-containing protein 2 (ARID2) [18], aldehyde dehydrogenase family 3 member A1 (ALDH3A1) [19], heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (HNRNPC) [20], integrin alpha-5 (ITGA5) [21], DAZ-interacting zinc finger protein 1 (DZIP1) [22], high mobility group at hook 2 (HMGA2) [23,24] and serine/arginine-rich splicing factor 3 (SRSF3) [25] (Table 2). All included studies used reverse transcription-quantitative-polymerase chain reaction (RT-qPCR) to evaluate gene expression. All authors, except Yan et al. [22], analyzed EMT-associated proteins

Table 4
Relationship between the clinicopathological features of OC cases in the different studies and the expression of the genes/proteins studied.

Author, year, number of patients and protein	T		N		Clinical stage TNM, (AJCC edition)		Location		Differentiation/histological grade		Other		
	NE/LE	HE	NE/LE	HE	NE/LE	HE	NE/LE	HE	NE/LE	HE	NE/LE	HE	
Wu et al., 2020 n = 97, ARID2	≤4cm: 18/34 42.9%	≤4cm: 50/63 79.4%	N0: 22/34 64.7%	N0: 55/63 87.3%	I, II: 16/34 47.1%	I, II: 47/63 76.6%	Tongue: 6/ 34	Tongue: 20/ 63	Well + Mod.: 20/ 34	Well + Mod.: 52/63	NA	NA	
	>4cm: 16/34 47.1%	>4cm: 13/63 20.6%	N1: 12/34 35.3%	N1: 8/63 12.7%	III, IV: 18/34 52.9%	III, IV: 16/63 23.4%	Lip: 1/34 2.9%	Lip: 7/63 11.0%	Poor: 14/34 41.2%	Well + Mod.: 58.8%	Well + Mod.: 85.3%	NA	NA
Qu et al., 2020 n = 72, ALDH3A1	T1: 12/17/40; 42.9%	T1: 12/32; 37.5%	N0: 19/40; 47.5%	N0: 23/32; 71.9%	NA	NA	NA	NA	p < 0.05	Well: 4/40; 10.0%	Well: 6/32; 18.8%	NA	NA
	T3, T4: 23/40; 57.5%	T3, T4: 20/ 32/62.5%	N1: 21/40; 52.5%	N1: 9/32; 28.1%	NA	NA	NA	NA	p = 0.17	Mod. + Poor: 36/ 40; 90.0%	Mod. + Poor: 26/ 32; 81.2%	NA	NA
Huang et al., 2020 n = 80, HNRNPc	T1: 6/33; 18.2%	T1: 4/47; 8.5% T2: 30/47; 63.8%	N0: 11/33; 33.3%	N0: 32/38; 84.2%	I, II: 27/39; 69.2%	I, II: 19/41; 46.3%	NA	NA	p < 0.05	Mod. + Poor: 36/ 40; 90.0%	Mod. + Poor: 26/ 32; 81.2%	NA	NA
	T2: 22/33; 66.7%	T3: 4/47; 8.5% T4: 9/47; 19.1%	N1: 13/33; 39.4%	N1: 6/38; 15.8%	III, IV: 12/39; 30.8%	III, IV: 22/41; 53.7%	NA	NA	p = 0.29	NA	NA	Distant metastases M0: 33/39; 84.6% M1: 6/39; 15.4%	M0: 29/41; 70.7% M1: 12/41; 29.3%
Deng et al., 2019 n = 105, ITGAS	NA	NA	N0: 16/29 55.2%	N0: 56/76 73.9%	I, II: 15/29 51.7%	I, II: 25/76 32.9%	Tongue: 29/ 29	Tongue: 76/ 76	NA	NA	NA	NA	NA
	NA	NA	N1: 13/29 44.8%	N1: 20/76 26.1%	III, IV: 14/29 48.3%	III, IV: 51/76 67.1%	100%	100%	NA	NA	NA	NA	NA
Yan et al., 2019 n = 100, DZIP1	NA	NA	N0: 18/31 58.1%	N0: 50/67 74.6%	I, II: 10/31 32.3%	I, II: 25/69 36.2%	NA	NA	p < 0.01	NA	NA	NA	NA
	NA	NA	N1: 13/31 41.9%	N1: 18/67 27.5%	III, IV: 21/31 67.7%	III, IV: 44/69 63.8%	NA	NA	p < 0.01	NA	NA	NA	NA
Zhang et al., 2017 n = 80, HMGA2	Negative: T1: 5/21 23.8%	Moderate: T1: 15/29 51.7%	N0: 10/21 47.6%	N0: 20/29 69.0%	NA	NA	Tongue: 33/ 33	Tongue: 47/ 47	NA	Negative: Well: 4/21 19.1%	Moderate: Well: 11/29 37.9%	Recurrence Negative: Yes: 7/21 33.3%	Moderate: Yes: 15/29 51.7%
	T2: 14/21 66.7%	T2: 9/29 31.0%	N1: 1/21 4.8%	N1: 4/29 13.8%	p < 0.01	p < 0.01	100%	100%	NA	Mod: 12/21 57.1%	Mod: 12/29 41.4%	Mod: 14/21 66.7%	Mod: 14/21 48.3%
Zhang et al., 2017 n = 80, HMGA2	T3: 2/21 9.5%	T3: 4/29 13.8%	N2: 10/21 47.6%	N2: 5/29 17.2%	NA	NA	NA	NA	NA	Poor: 6/29 20.7%	Poor: 6/29 20.7%	Weak: Yes: 3/12 25.0%	Weak: Yes: 3/12 25.0%
	T4: 0/21 0.0%	T4: 1/29 3.5%	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Zhang et al., 2017 n = 80, HMGA2	Weak: T1: 6/12 50.0%	Strong: T1: 6/18 33.3%	N1: 2/12 16.7%	N1: 4/18 22.2%	NA	NA	NA	NA	NA	Weak: Well: 4/14 28.6%	Strong: Well: 4/16 25.0%	Weak: Yes: 5/18 27.8%	Weak: Yes: 5/18 27.8%

(continued on next page)

Table 5
Risk of bias of cohort studies.

Author, year	Selection				Comparability	Outcome			AHRQ result
	Representativeness of the exposed cohort	Selection of the non-exposed cohort	Ascertainment of exposure	Demonstration that outcome of interest was not present at start of study	Comparability of cohorts on the basis of the design or analysis controlled for confounders	Assessment of outcome	Was follow-up long enough for outcomes to occur?	Adequacy of follow-up of cohorts	
Wu et al., 2020	*	*	*	*	**	*	*	*	GQ
Qu et al., 2020	*	*	*	*	**	*	*	*	GQ
Huang et al., 2020	*	*	*	*	**	*	*	*	GQ
Deng et al., 2019	*	*	*	*	**	*	*	*	GQ
Yan et al., 2019	*	*	*	*	*	*	*	*	GQ
Zhang et al., 2017	*	*	*	*	**	*	*	*	GQ
Zhao et al., 2016	*	*	*	*	**	*	*	*	GQ
Peiqi et al., 2016	*	*	*	*	**	*	*	*	GQ

AHRQ, Agency for Health Research and Quality; GQ, good quality.

expressed by studied genes in OC tissues by immunohistochemistry [18-21,23-25]. Yan et al. used western blot to study protein levels [22]. Data about tobacco consumption were not collected in five studies [19-22,24]. Only two studies provided data on alcohol consumption [18,25].

Regarding classical EMT markers, Zhang et al. [23] studied the expression of E-cadherin and Vimentin by immunohistochemistry in tongue cancer. Similarly, Zhao et al. [24] analyzed E-cadherin, Vimentin, and Snail by immunohistochemistry in tongue tumors. They also studied the expression of Snail by RT-PCR in tongue tumors [24].

OC location was not specified in four studies [19,20,22,25]. In terms of clinicopathological characteristics, the size of the tumor was not analyzed in three studies [21,22,25], while data on nodal metastasis (N) were collected in all the included studies. The clinical stage was studied by all studies except Qu et al. [19] and Zhang et al. [23]. The degree of tumor differentiation was not provided in four studies [20-22,25]. Recurrence was only shown in Zhang et al.'s study [23]. Distant metastasis was studied by only Huang et al. [20]. All the data about demographic and clinicopathological characteristics and their relationship with the EMT proteins expressed by genes studied are shown in Tables 3 and 4.

Risk of bias within studies

We established that the included studies had low risk of bias according to the 8 items for assessing risk of bias (Newcastle-Ottawa tool, previously described). All the included studies received at least three stars in the "Selection" item. In addition, seven studies provided data relating to "selection of the non-exposed cohort" [18-21,23-25]. In the item "Comparability" all studies received two stars except Yan et al.'s study, which only received one [22]. In "Outcome", all the studies received two stars for "assessment of outcome" and "was follow-up long enough for outcomes to occur?". However, only the studies conducted by Wu et al. [18] and Qu et al. [19] received three stars, due to the fact that they provided data about follow-up and its adequacy. For this reason, we considered all studies to be of GQ as established by AHRQ, as all studies received at least three stars in Selection domain, one in "Comparability" domain and two stars in "Outcome" domain (Table 5).

Results of individual studies

High expression of HNRNPC, ITGA5, DZIP1, HMGA2, and SRSF3 is associated to promotion of EMT in different cancers, including OC (Table 2). Only the expression of the transcriptional modulator HMGA2, whose increased expression in adult tissues is commonly associated with tumor development, was significantly associated with the sex of the patients in one of the studies [24]. In the high expression group 75.7% were male [24]. None of the other genes/proteins studied were significantly related to age, alcohol or tobacco consumption. Only Wu et al. addressed [18] the relationship between expression level and OC location, and found it not significant (Table 4).

High expression levels of the RNA-binding protein HNRNPC, the fibronectin receptor ITGA5, the protein coding gene HMGA2 and the splicing factor SRSF3 were significantly associated with more advanced clinical stages of the TNM classification [20,21,24,25]. Similarly, a significant association was observed between high expression of HNRNPC, HMGA2 and SRSF3 and a greater presence of nodal metastases [20,24,25]. In addition, patients with high levels of HNRNPC suffered more distant metastases, though, the result was not statistically significant [20] (Table 4).

HMGA2 is a well-established regulator in human cancer and its expression was significantly associated with moderately differentiated OC (grade II) and poorly differentiated OC (grade III) [24]. The results of the different studies showed that high expression of HNRNPC, ITGA5, HMGA2 and SRSF3 was associated with a worse prognosis (advanced TNM stages) [20,21,24,25]. Only Zhang et al. assessed recurrence and suggested that patients with high expression of HMGA2 had more recurrences [23] (Table 4).

In contrast, low expression of ALDH3A1 enzyme [19] and the chromatin remodeling factor ARID2 [18] facilitate the OC EMT-process. No significant association was found between sex, age, tobacco, alcohol consumption and OC location and low-expression of the different studied genes/proteins (Tables 3 and 4). In terms of OC-related characteristics, the high expression of ARID2 and ALDH3A1 was significantly related to the absence of nodal metastasis [18,19]. High ARID2

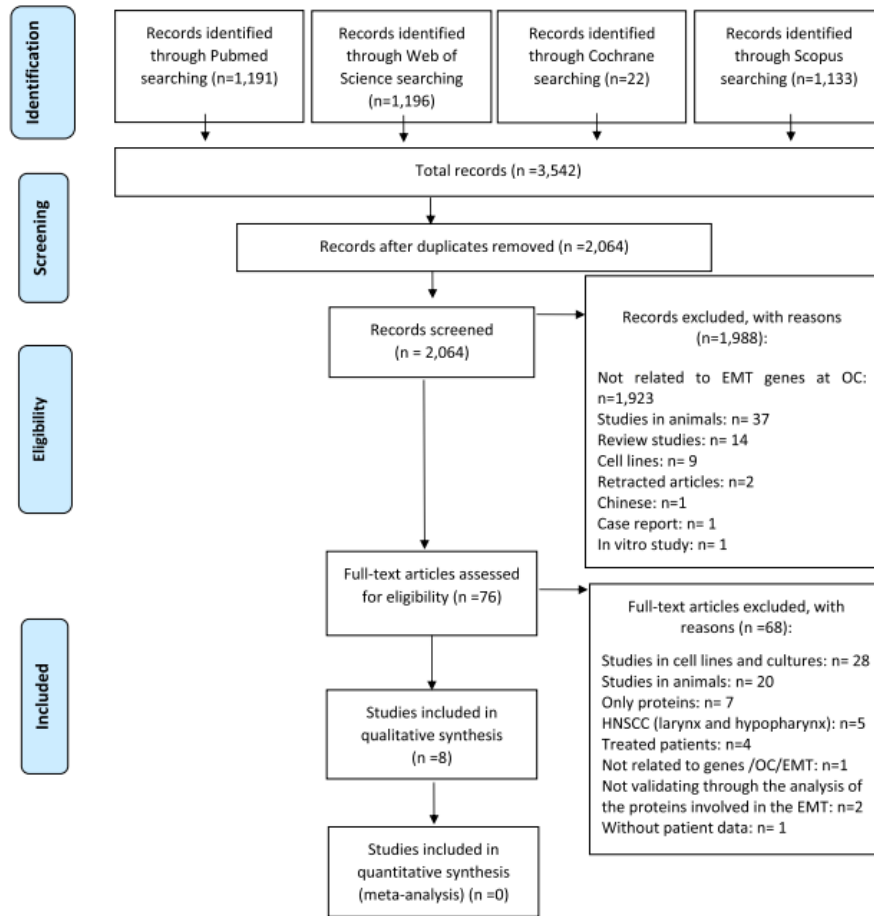


Figure 1. Diagram Flow of the literature research.

expression was also significantly associated with decreased tumor size, with less advanced clinical stages of the TNM classification, and with well and moderately differentiated OC (grade I and II) [18] (Table 4).

Discussion

Synthesis of results

Current scientific evidence shows that EMT is relevant in the prognosis of OC. EMT process is associated with increased invasion and metastasis [24,26], as well as resistance to different treatments such as immunotherapy and chemotherapy [27]. Gene expression is a tool that is being applied to numerous medical areas, and its knowledge might be leveraged in prevention and therapy across tumor types [13]. Due to this, in this systematic review we have analyzed the genes involved in EMT in OC. The genes that have been identified in this systematic review are HMGA2, ITGA5, ALDH3A1, HNRNPC, SRSF3, ARID2 and DZIP1.

These genes have different biological functions (Table 2). HMGA2 is

a non-histone chromosomal protein that can act as a transcription factor and has been linked to "metastatic potential" in tumor cells. ITGA5 is a member of the integrin family that participates in cellular adhesion processes and mediates binding of cells to fibronectin. ALDH3A1 encodes an enzyme with the same name, and its purposes include the metabolism of aldehydes and other substrates, maintenance of the cellular redox balance and maintenance of the integrity of structures, such as the cornea. HNRNPC belongs to the subfamily of ubiquitously expressed heterogeneous nuclear ribonucleoproteins. SRSF3 participates in nucleic acid binding and RNA binding. ARID2 encodes a member of the AT-rich interactive domain (ARID)-containing family of DNA-binding proteins. Members of the ARID family have roles in embryonic patterning, cell lineage gene regulation, cell cycle control, transcriptional regulation and chromatin structure modification. Finally, DZIP1 is an oncogene involved in the progression of carcinoma and stemness through the Wnt/ β -catenin pathway [28].

All the included studies evaluated the expression of the different

genes involved in the EMT process by PCR. However, in most of the cases, the relationship between clinicopathological variables of OSCC and the EMT genes was analyzed by detecting the corresponding proteins in OC tissues using immunohistochemistry [18,19,23–25]. Usually, the validation of gene involvement in EMT is done by immunohistochemistry because the extraction of genetic material from previously collected tumor tissues is difficult, expensive and the tissues may be in poor condition. For this reason, immunohistochemical tests are used in most cases, as they are cheaper and easier to perform [29]. In this regard, we are in agreement with other authors that the results are valid, as the levels of protein expression are mostly consistent with the levels of gene expression [19].

It is well known that more advanced stages of TNM classification are associated with a worse prognosis [30]. In this systematic review, the most advanced clinical stages (III and IV) were associated to high expression of HNRNPC [20], ITGA5 [21], HMGA2 [24] and SRSF3 [25]. These four genes have been observed to be involved in tumor progression in other types of cancer (Table 2). On the other hand, the more advanced clinical stages of the TNM classification were significantly associated with low expression of ARID2, a tumor suppressor that can inhibit the EMT process [18]. Therefore, high expression of HNRNPC, ITGA5, HMGA2 and SRSF3 and low expression of ARID2 in OSCC samples would be associated with a worse prognosis. We believe that detection of these genes/proteins in biopsies of OC cases could be useful in predicting the prognosis of the tumor.

Local recurrence and metastasis are key factors in the prognosis of OSCC [23]. However, only Huang et al. investigated the relationship of high or low expression of HNRNPC with the presence of distant metastasis, finding no significant differences between the development of metastasis and its expression [20]. Due to the importance of the presence of metastases in the treatment and prognosis of OC patients, we believe that this variable should be analyzed in future studies on this topic.

Only Zhang et al., [23] investigated the relationship of local recurrence with HMGA2 expression. They determined that there was a significant relationship between high HMGA2 expression and local recurrence, which was present in 27.8% of cases in the strong expression subgroup. Therefore, we believe that the detection of HMGA2 could help to predict cases with a high risk of recurrence.

Only two studies specified follow-up time. Wu et al. [18] patients showed a 5-year follow-up, while Qu et al. [19] said that their patients were followed up every 3–6 months until the fifth year. Although the rest of the authors do not specify the follow-up time, they do keep track of their patients as their results showed data on survival and death [24], as well as tumor recurrence [23]. We believe it is necessary that future studies in this field specify the follow-up time. Similarly, studies with a longer follow-up of patients are needed.

In this systematic review it should be noted that only two studies [23,24] analyzed the same gene, HMGA2, which is a major limitation when drawing conclusions. The two studies are retrospective cohort-studies and all the cases were tongue cancers. Both studies analyzed the sex and age of the patients included, and both studies agreed that age was not significantly associated with expression levels. Regarding sex, Zhao et al. [24] found that expression of the HMGA2 protein was statistically higher in male patients. Zhang et al., [23] showed more male patients in the high expression group, but without significant differences. With respect to toxic habits, none of the authors analyzed alcohol consumption. Only Zhang et al. [23] considered tobacco consumption, finding no significant relationship between HMGA2 expression and the number of cigarettes smoked. The two studies analyzed tumor size (T) without finding statistically significant differences between the low/negative and high expression groups. Both studies showed the relationship between HMGA2 expression and the presence of regional lymph node metastasis (N). Zhang et al. discriminated absence of metastasis, N1 and N2, finding no significant relationship with expression [23]. In contrast, Zhao et al. differentiated between absence and

presence of nodal metastasis, determining that there was a statistically significant relationship between regional nodal involvement and high expression of HMGA2 [24]. Another pathological parameter that these two authors collected was the degree of differentiation or histological grade of the tumor. Zhang et al. separated well-differentiated, moderately differentiated, and poorly differentiated tumors, finding no significant relationship with expression levels [23]. However, Zhao et al. established two groups: well differentiated, and moderately and poorly differentiated, and they showed a significant relationship between a worse degree of tumor differentiation and high expression of HMGA2 [24]. One of the main differences between the two studies was that Zhang et al. evaluated recurrence and Zhao et al. did not. Patients with high HMGA2 expression showed a higher rate of recurrence, but no significant data were obtained [23]. On the other hand, Zhao et al. considered the clinical stage (TNM), and more advanced clinical stages (III, IV) were associated with significantly higher HMGA2 expression level [24]. Therefore, if the results of both studies are analyzed together, it seems that the most advanced clinical stages in the TNM classification and the lesser degree of tumor differentiation were associated with high expression of HMGA2.

Limitations

The fact that only two studies investigated the involvement of the same gene in the EMT process (HMGA2) [23,24] is the main cause that prevents us from performing a meta-analysis on the genes involved in the EMT in OC. Another important limitation is the number of studies included (n = 8) and that all studies have been conducted in China. It is possible that there may be some influence of the diet or other habits of the patients included, thus affecting OSCC development, so future studies in other populations are needed to validate these results. A further limitation is that not all studies included the same clinical and anatomopathological variables and some of them were collected differently throughout the studies. In future research it would be more convenient to homogenize the variables analyzed in order to be able to reach conclusions.

Conclusions

EMT is a process that favors invasion and metastasis during tumor progression. When EMT occurs, a higher rate of metastasis is observed, with a worse prognosis and a lower survival of patients. According to the results of the present study we can conclude that high expression of HNRNPC, ITGA5, HMGA2 and SRSF3 promotes EMT in OSCC. Similarly, low expression of ALDH3A1 and ARID2 facilitates the EMT process. Therefore, the over- and under-expression of the above-mentioned genes may lead to a worse prognosis of OSCC patients. For that reason, detection of these genes/proteins in OC biopsies could be useful in order to predict the prognosis of patients. However, we believe that further studies on this subject are needed in different countries to be able to compare the results of the genes already studied and to analyze new genes involved in the EMT process. We believe research in this field has applications in daily clinical practice to predict which patients will have a poor prognosis of their OSCC and to establish individualized treatments for each patient.

Declaration of Competing Interest

The author declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Norman Feltz for proofreading the article.

Grant Support

CL received funding from the Instituto de Salud Carlos III (Ministry of Science and Innovation) cofounded by the European Regional Development Fund projects: PI 18/00263 and CIBERONC CB/16/00228.

genes involved in the EMT process by PCR. However, in most of the cases, the relationship between clinicopathological variables of OSCC and the EMT genes was analyzed by detecting the corresponding proteins in OC tissues using immunohistochemistry [18,19,23-25]. Usually, the validation of gene involvement in EMT is done by immunohistochemistry because the extraction of genetic material from previously collected tumor tissues is difficult, expensive and the tissues may be in poor condition. For this reason, immunohistochemical tests are used in most cases, as they are cheaper and easier to perform [29]. In this regard, we are in agreement with other authors that the results are valid, as the levels of protein expression are mostly consistent with the levels of gene expression [19].

It is well known that more advanced stages of TNM classification are associated with a worse prognosis [30]. In this systematic review, the most advanced clinical stages (III and IV) were associated to high expression of HNRNPC [20], ITGA5 [21], HMGA2 [24] and SRSF3 [25]. These four genes have been observed to be involved in tumor progression in other types of cancer (Table 2). On the other hand, the more advanced clinical stages of the TNM classification were significantly associated with low expression of ARID2, a tumor suppressor that can inhibit the EMT process [18]. Therefore, high expression of HNRNPC, ITGA5, HMGA2 and SRSF3 and low expression of ARID2 in OSCC samples would be associated with a worse prognosis. We believe that detection of these genes/proteins in biopsies of OC cases could be useful in predicting the prognosis of the tumor.

Local recurrence and metastasis are key factors in the prognosis of OSCC [23]. However, only Huang et al. investigated the relationship of high or low expression of HNRNPC with the presence of distant metastasis, finding no significant differences between the development of metastasis and its expression [20]. Due to the importance of the presence of metastases in the treatment and prognosis of OC patients, we believe that this variable should be analyzed in future studies on this topic.

Only Zhang et al., [23] investigated the relationship of local recurrence with HMGA2 expression. They determined that there was a significant relationship between high HMGA2 expression and local recurrence, which was present in 27.8% of cases in the strong expression subgroup. Therefore, we believe that the detection of HMGA2 could help to predict cases with a high risk of recurrence.

Only two studies specified follow-up time. Wu et al.s [18] patients showed a 5-year follow-up, while Qu et al. [19] said that their patients were followed up every 3–6 months until the fifth year. Although the rest of the authors do not specify the follow-up time, they do keep track of their patients as their results showed data on survival and death [24], as well as tumor recurrence [23]. We believe it is necessary that future studies in this field specify the follow-up time. Similarly, studies with a longer follow-up of patients are needed.

In this systematic review it should be noted that only two studies [23,24] analyzed the same gene, HMGA2, which is a major limitation when drawing conclusions. The two studies are retrospective cohort-studies and all the cases were tongue cancers. Both studies analyzed the sex and age of the patients included, and both studies agreed that age was not significantly associated with expression levels. Regarding sex, Zhao et al. [24] found that expression of the HMGA2 protein was statistically higher in male patients. Zhang et al., [23] showed more male patients in the high expression group, but without significant differences. With respect to toxic habits, none of the authors analyzed alcohol consumption. Only Zhang et al. [23] considered tobacco consumption, finding no significant relationship between HMGA2 expression and the number of cigarettes smoked. The two studies analyzed tumor size (T) without finding statistically significant differences between the low/negative and high expression groups. Both studies showed the relationship between HMGA2 expression and the presence of regional lymph node metastasis (N). Zhang et al. discriminated absence of metastasis, N1 and N2, finding no significant relationship with expression [23]. In contrast, Zhao et al. differentiated between absence and

presence of nodal metastasis, determining that there was a statistically significant relationship between regional nodal involvement and high expression of HMGA2 [24]. Another pathological parameter that these two authors collected was the degree of differentiation or histological grade of the tumor. Zhang et al. separated well-differentiated, moderately differentiated, and poorly differentiated tumors, finding no significant relationship with expression levels [23]. However, Zhao et al. established two groups: well differentiated, and moderately and poorly differentiated, and they showed a significant relationship between a worse degree of tumor differentiation and high expression of HMGA2 [24]. One of the main differences between the two studies was that Zhang et al. evaluated recurrence and Zhao et al. did not. Patients with high HMGA2 expression showed a higher rate of recurrence, but no significant data were obtained [23]. On the other hand, Zhao et al. considered the clinical stage (TNM), and more advanced clinical stages (III, IV) were associated with significantly higher HMGA2 expression level [24]. Therefore, if the results of both studies are analyzed together, it seems that the most advanced clinical stages in the TNM classification and the lesser degree of tumor differentiation were associated with high expression of HMGA2.

Limitations

The fact that only two studies investigated the involvement of the same gene in the EMT process (HMGA2) [23,24] is the main cause that prevents us from performing a meta-analysis on the genes involved in the EMT in OC. Another important limitation is the number of studies included (n = 8) and that all studies have been conducted in China. It is possible that there may be some influence of the diet or other habits of the patients included, thus affecting OSCC development, so future studies in other populations are needed to validate these results. A further limitation is that not all studies included the same clinical and anatomopathological variables and some of them were collected differently throughout the studies. In future research it would be more convenient to homogenize the variables analyzed in order to be able to reach conclusions.

Conclusions

EMT is a process that favors invasion and metastasis during tumor progression. When EMT occurs, a higher rate of metastasis is observed, with a worse prognosis and a lower survival of patients. According to the results of the present study we can conclude that high expression of HNRNPC, ITGA5, HMGA2 and SRSF3 promotes EMT in OSCC. Similarly, low expression of ALDH3A1 and ARID2 facilitates the EMT process. Therefore, the over- and under-expression of the above-mentioned genes may lead to a worse prognosis of OSCC patients. For that reason, detection of these genes/proteins in OC biopsies could be useful in order to predict the prognosis of patients. However, we believe that further studies on this subject are needed in different countries to be able to compare the results of the genes already studied and to analyze new genes involved in the EMT process. We believe research in this field has applications in daily clinical practice to predict which patients will have a poor prognosis of their OSCC and to establish individualized treatments for each patient.

Declaration of Competing Interest

The author declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Norman Feltz for proofreading the article.

Grant Support

CL received funding from the Instituto de Salud Carlos III (Ministry of Science and Innovation) cofounded by the European Regional Development Fund projects: PI 18/00263 and CIBERONC CB/16/00228.

11. BIBLIOGRAFÍA

11.. BIBLIOGRAFÍA

1. Abati S, Bramati C, Bondi S, Lissoni A, Trimarchi M. Oral cancer and precancer: A narrative review on the relevance of early diagnosis. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(24):9160.
2. Aggarwal S, Singh B, Sharma SC et al. Circulating Vimentin over-expression in patients with oral submucosal fibrosis and oral squamous cell carcinoma. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2022. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s12070-021-03018-5>
3. Ali J, Sabiha B, Jan HU, Haider SA, Khan AA, Ali SS. Genetic etiology of oral cancer. *Oral Oncol*. 2017;70:23-8.
4. Almangush A, Bello IO, Heikkinen I, Hagström J, Haglund C, Kowalski LP, et al. Improving risk stratification of early oral tongue cancer with TNM-Immune (TNM-I) staging system. *Cancers*. 2020;13(13):3235.
5. Almangush A, Makitie AA, Triantafyllou A, de Bree R, Strojan P, Rinaldo A, et al. Staging and grading of oral squamous cell carcinoma: an update. *Oral Oncol*. 2020;107:104799.
6. Almangush A, Pirinen M, Youssef O, Mäkitie AA, Leivo I. Risk stratification in oral squamous cell carcinoma using staging of the eighth American Joint Committee on Cancer: Systematic review and meta-analysis. *Head & Neck*. 2020;42(10):3002-17.
7. Alon-Maimon T, Mandelboim O, Bachrach G. *Fusobacterium nucleatum* and cancer. *Periodontology 2000*. 2022;89:166–80.
8. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging:

- The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(2):93-9.
9. Angadi PV, Patil PV, Angadi V, Mane D, Shekar S, Hallikerimath S, Kale AD, Kardesai SG. Immunoexpression of epithelial mesenchymal transition proteins E-Cadherin, β -Catenin, and N-Cadherin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Surg Pathol.* 2016;24(8):696-703.
 10. Arakeri G, Brennan PA. Oral submucous fibrosis: an overview of the aetiology, pathogenesis, classification, and principles of management. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2013;51(7):587-93.
 11. Atkinson SR, Marguerat S, Bähler J. Exploring long non-coding RNAs through sequencing. *Semin Cell Dev Biol.* 2012;23(2):200-5.
 12. Atlas Genetics Oncology, 2022. Disponible en: <https://atlasgeneticsoncology.org/teaching/30147/factores-de-transcripci-oacute>
 13. Bala P, Kumar S, Kavadipular P, Kotapalli V, Sabarinathan R, Bashyam MD. Exome sequencing identifies ARID2 as a novel tumor suppressor in early-onset sporadic rectal cancer. *Oncogen.* 2021;40:863-74.
 14. Barnes L, Everson J, Reichardt P, Sidransky D. WHO Clasification of tumours. Pathology and genetics. Head and neck tumours. IARCPress. Lyon. 2005; 109-21.
 15. Bellamy COC, DiMartini AM, Ruppert K, Jain A, Dodson F, Torbenson M, et al. Liver transplantation for alcoholic cirrhosis: long term follow-up and impact of disease recurrence. *Transplantation.* 2001;72(4):619-26.
 16. Blaschuk OW. N-cadherin antagonists as oncology therapeutics. *Phil Trans R Soc B.* 2015;370(1661):20140039.
 17. Bugshan A, Farooq I. Oral squamous cell carcinoma: metastasis, potentially associated malignant disorders, etiology and recent advancements in diagnosis. *Res.* 2020;9:229.

18. Cao ZQ, Wang Z, Leng P L. Aberrant N-cadherin expression in cancer. *Biomed. Pharmacother.* 2019; 118: 109320.
19. Cappelleso R, Marioni G, Crescenzi M, et al. The prognostic role of the epithelial-mesenchymal transition markers E-cadherin and slug in laryngeal squamous cell carcinoma. *Histopathology.* 2015;67: 491-500.
20. Carinci F, Pelucchi S, Farina A, Calearo C. A comparison between TNM and TANIS stage grouping for predicting prognosis of oral and oropharyngeal cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1998;56(7):832-6.
21. Castanon I, Baylies MK. A Twist in fate: evolutionary comparison of Twist structure and function. *Gene.* 2002;287(1-2):11-22.
22. 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;2:401–4.
23. Chandolia B, Parkash R, Bajpai, Arora M. Prognostic Potential of N-Cadherin in Oral Squamous Cell Carcinoma via Immunohistochemical Methods. *JCPSP.* 2017;27 (8): 475-8.
24. Chang A-C, Lien M-Y, Tsai M-H, Hua C-H, Tang C-H. WISP-1 promotes epithelialmesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma cells via the miR-153-3p/ Snail Axis. *Cancers.* 2019;11:1903–20.
25. Chang C, Geng F, Shi X, Li Y, Zhang X, Zhao X, et al. The prevalence rate of periodontal pathogens and its association with oral squamous cell carcinoma. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019;103(3):1393-404.
26. Chaturvedi P, Singh A, Chien C-Y, Warnakulasuriya S. Tobacco related oral cancer. *BMJ.* 2019;l2142.
27. Chaw SY, Abdul Majeed A, Dalley AJ, Chan A, Stein S, Farah CS. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers – E-cadherin, beta-catenin, APC and

- Vimentin – in oral squamous cell carcinogenesis and transformation. *Oral Oncol.* 2012;48(10):997-1006.
28. Chen A, Beetham H, Black MA, Priya R, Telford BJ, Guest J, et al. E-cadherin loss alters cytoskeletal organization and adhesion in non-malignant breast cells but is insufficient to induce an epithelial-mesenchymal transition. *BMC Cancer.* 2014;14(1):552.
 29. Chen Y-K, Huang AH-C, Cheng P-H, Yang S-H, Lin L-M. Overexpression of Smad proteins, especially Smad7, in oral epithelial dysplasias. *Clin Oral Invest.* 2013;17(3):921-32.
 30. Chi AC, Day TA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma-an update: Oral & Oropharyngeal Cancer Update. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(5):401-21.
 31. Choudhari SK, Chaudhary M, Gadbail AR, Sharma A, Tekade S. Oxidative and antioxidative mechanisms in oral cancer and precancer: A review. *Oral Oncol.* 2014;50(1):10-8.
 32. Chow LQM. Head and neck cancer. Longo DL, editor. *N Engl J Med.* 2020;382(1):60-72.
 33. Chui MH. Insights into cancer metastasis from a clinicopathologic perspective: Epithelial-Mesenchymal Transition is not a necessary step. *Int J Cancer.* 2013;132(7):1487-95.
 34. Cirmi S, Navarra M, Woodside JV, Cantwell MM. Citrus fruits intake and oral cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *Pharmacol Res.* 2018;133:187-94.
 35. Cohen N, Fedewa S, Chen AY. Epidemiology and demographics of the head and neck cancer population. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2018;30(4):381-95.
 36. Corbo C, Orrù S, Gemei M, Di Noto R, Mirabelli P, Imperlini E, et al. Protein cross-talk in CD133+ colon cancer cells indicates activation of the Wnt pathway and

- upregulation of SRp20 that is potentially involved in tumorigenicity. *Proteomics*. 2012;12:2045-59.
37. Dalla Torre D, Burtscher D, Sölder E, Rasse M, Puelacher W. The correlation between the quality of oral hygiene and oral HPV infection in adults: a prospective cross-sectional study. *Clin Oral Invest*. 2019;23(1):179-85.
 38. Dan T, Shastri AA, Palagani A, Buraschi S, Neill T, Savage JE, Kapoor A, DeAngelis T, Addya S, Camphausen K, Iozzo RV, Simone NL. miR-21 plays a dual role in tumor formation and cytotoxic response in breast tumors. *Cancers*. 2021;13(4):888
 39. Dmello C, Sawant S, Chaudhari PR, Dongre H, Ahire C, D'Souza ZC, Charles SE, Rane P, Costea DE, Chaukar D et al. Aberrant expression of vimentin predisposes oral premalignant lesion derived cells towards transformation. *Exp Mol Pathol*. 2018;105:243–51.
 40. Denaro N, Russi EG, Merlano MC. Pros and Cons of the New Edition of TNM Classification of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Oncology*. 2018;95(4):202-10.
 41. Deng Y, Wan Q, Yan W. Integrin $\alpha 5$ /ITGA5 promotes the proliferation, migration, invasion and progression of oral squamous carcinoma by epithelial–mesenchymal transition. *Cancer Manag Res*. 2019;11:9609–20.
 42. De Graaff LH, Platek AJ, Iovoli AJ, Wooten KE, Arshad H, Gupta V, et al. The effect of time between diagnosis and initiation of treatment on outcomes in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2019;96:148-52.
 43. De Jong OG, Van Der Waals LM, Kools FRW, Verhaar MC, Van Balkom BWM. Lysyl oxidase-like 2 is a regulator of angiogenesis through modulation of endothelial-to-mesenchymal transition. *J Cell Physiol*. 2018;234:10260–9.
 44. De Vicente JC, Peña I, Rodrigo JP, Rodríguez- Santamarta T, Lequerica-Fernández P, Suarez-Fernández L, Allonca E, García- Pedrero JM. Phosphorylated ribosomal

- protein S6 correlation with p21 expression and inverse association with tumor size in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2017; 39(9):1876-87.
45. Dhumal SN, Choudhari SK, Patankar S, Ghule SS, Jadhav YB, Masne S. Cancer stem cell markers, CD44 and ALDH1, for assessment of cancer risk in OPMDs and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck Pathol*. 2022;16(2):453-65.
 46. Di Domenico M, Pierantoni GM, Feola A, Esposito F, Laino L, De Rosa A, et al. Prognostic significance of N-cadherin expression in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2011;31:4211–8.
 47. Díez-Pérez R, Bascones-Martinez, Campo Trapero J, Cano Sanchez J, López Durán M, González Moles M, et al. Methylation in oral cancer and pre-cancerous lesions (Review). *Oncol Rep*. 2011: 25(5).
 48. Dioguardi M, Spirito F, Sovereto D, Alovise M, Troiano G, Aiuto R, Garcovich D, Crincoli V, Laino L, Cazzolla AP, Caloro GA, Di Cosola M, Lo Muzio L. MicroRNA-21 expression as a prognostic biomarker in oral cancer: systematic review and meta-analysis. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(6):3396.
 49. Dionne KR, Warnakulasuriya S, Binti Zain R, Cheong SC. Potentially malignant disorders of the oral cavity: Current practice and future directions in the clinic and laboratory: review. *Int J Cancer*. 2014;136(3):503-15.
 50. Doleshal M, Magotra AA, Choudhury B, Cannon B, Labourier E, Szafranska AE. Evaluation and validation of total RNA extraction methods for microRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn*. 2008;10:203–11.
 51. El-Naggar AK, Chan JKC, Takata T, Sllotweg PJ. WHO clasiffication or head and neck tumours. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017.

52. Ellington TD, Henley SJ, Senkomago V et al. Trends in incidence of cancers of the oral cavity and pharynx- United States 2007-2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2020;69:433-8.
53. Elmahgoub F. Could salivary biomarkers be useful in the early detection of oral cancer and oral potentially malignant disorders, and is there a relationship between these biomarkers and risk factors? *Evid Based Dent.* 2022;23(1):30-1.
54. Farsalinos KE, Romagna G, Tsiapras D, Kyrzopoulos S, Voudris V. Characteristics, perceived side effects and benefits of electronic cigarette use: a worldwide survey of more than 19,000 consumers. *Int J Environ Res Public Health.* 2014;11(4):4356 -73.
55. Feller LL, Khammissa RR, Kramer BB, Lemmer JJ. Oral squamous cell carcinoma in relation to field precancerisation: pathobiology. *Cancer Cell Int.* 2013;13(1):31.
56. Fleskens S, Slootweg P. Grading systems in head and neck dysplasia: their prognostic value, weaknesses and utility. *Head Neck Oncol.* 2009;1(1):11.
57. Ford PJ, Farah CS. Early detection and diagnosis of oral cancer: Strategies for improvement. *J Cancer Policy.* 2013;1(1-2):2-7.
58. Fujiwara T, Eguchi T, Sogawa C, Ono K, Murakami J, Ibaragi S, Asaumi JI, Calderwood SK, Okamoto K, Kozaki KI. Carcinogenic epithelial-mesenchymal transition initiated by oral cancer exosomes is inhibited by anti-EGFR antibody cetuximab. *Oral Oncol.* 2018;86:251-257.
59. Fukuda M, Ohmori Y, Sakashit H. The Role of Tumor Microenvironment in Oral Cancer. En: Biswas S, editor. *Tumor Microenvironment and Myelomonocytic Cells InTech*; 2012. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/tumor-microenvironment-and-myelomonocytic-cells/the-role-of-tumor-microenvironment-in-oral-cancer>
60. Ge W-L, Xu J-F, Hu J. Regulation of oral squamous cell carcinoma proliferation through crosstalk between SMAD7 and CYLD. *Cell Physiol Biochem.* 2016;38(3):1209-17.

61. GeneCards. The Human Gene Database. Available in: <https://www.genecards.org> (last accessed March 26, 2021).
62. Geng F, Zhang Y, Lu Z, Zhang S, Pan Y. *Fusobacterium nucleatum* Caused DNA Damage and Promoted Cell Proliferation by the *Ku70 / p53* Pathway in Oral Cancer Cells. *DNA Cell Biol.* 2020;39(1):144-51.
63. Geiger B, Volk T, Volberg T. Molecular heterogeneity of adherens junctions. *J Cell Biol.* 1985;101(4):1523-31.
64. Giner M, Montoya MJ, Vázquez MA, Miranda C, Miranda MJ, Pérez-Cano R. ¿Qué son los microARNs?: posibles biomarcadores y dianas terapéuticas en la enfermedad osteoporótica. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2016; 8(1): 40-4.
65. Global Cancer Observatory, 2020. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/1-Lip-oral-cavity-fact-sheet.pdf>
66. Gold KA, Kim ES. Role of molecular markers and gene profiling in head and neck cancers. *Curr Opin Oncol.*2009;21(3):206-11.
67. Gómez I, Seoane J, Varela-Centelles P, Diz P, Takkouche B. Is diagnostic delay related to advanced-stage oral cancer? A meta-analysis. *Eur J Oral Sci.* 2009;117(5):541-6.
68. Graillon N, Iocca O, Carey RM, Benjamin K, Cannady SB, Hartner L, Newman JG, Rajasekaran K, Brant JA, Shanti RM. What has the National Cancer Database taught us about oral cavity squamous cell carcinoma? *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2022;51(1):10-7.
69. Gupta B, Bray F, Kumar N, Johnson NW. Associations between oral hygiene habits, diet, tobacco and alcohol and risk of oral cancer: A case–control study from India. *Cancer Epidemiol.* 2017;51:7-14.
70. Haddad RI, Shin DM. Recent Advances in Head and Neck Cancer. *N Engl J Med.* 2008;359(11):1143-54.

71. Han AY, Kuan EC, Mallen- St Clair J et al. Epidemiology of squamous cell carcinoma of the lip in the United States: a population-bases cohort analysis. *JAMA Otolaryngol. Head and Neck Surg.* 2016;142:1216-23.
72. Hao Y, Xiao Y, Liao X, Tang S, Xie X, Liu R, Chen Q. FGF8 induces epithelial-mesenchymal transition and promotes metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Sci.* 2021;13(1):6.
73. Hasan MR, Sharma R, Saraya A, et al. Slug is a predictor of poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma patients. *PLoS One.* 2013;8:82846.
74. Hatta K, Takeichi M. Expression of N-cadherin adhesion molecules associated with early morphogenetic events in chick development. *Nature.* 1986;320(6061):447-9.
75. Hawsawi O, Henderson V, Burton LJ, Dougan J, Nagappan P, Odero-Marah V. High mobility group A2 (HMGA2) promotes EMT via MAPK pathway in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;504(1):196-202.
76. Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA. Exogenous Expression of N-Cadherin in Breast Cancer Cells Induces Cell Migration, Invasion, and Metastasis. *J Cell Biol.* 2000;148(4):779-90.
77. Heikkinen PT, Nummela M, Jokilehto T, Grenman R, Kähäri V-M, Jaakkola PM. Hypoxic Conversion of SMAD7 Function from an Inhibitor into a Promoter of Cell Invasion. *Cancer Res.* 2010;70(14):5984-93.
78. Hollestelle A, Peeters JK, Smid M, Timmermans M, Verhoog LC, Westenend PJ, et al. Loss of E-cadherin is not a necessity for epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;138(1):47-57.
79. Hou J, Wang Z, Li H, Zhang H, Luo L. Gene signature and identification of clinical trait-related m6A regulators in pancreatic cancer. *Front Genet.* 2020;11:522.

80. Huang G-Z, Wu Q-Q, Zheng Z-N, Shao T-R, Chen Y-C, Zeng W-S, et al. M6A-related bioinformatics analysis reveals that HNRNPC facilitates progression of OSCC via EMT. *Aging*. 2020;12:11667–84.
81. Hui L, Zhang S, Dong X, Tian D, Cui Z, Qiu X. Prognostic significance of Twist and N-Cadherin expression in NSCLC. *PLoS ONE*. 2013;8(4):62171.
82. Iglesias-Velázquez Ó, López-Pintor RM, González-Serrano J, Casañas E, Torres J, Hernández G. Salivary LDH in oral cancer and potentially malignant disorders: A systematic review and meta-analysis. *Oral Dis*. 2022;28(1):44-56.
83. Instituto Nacional de Cáncer, 2022. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/buscar/resultados?swKeyword=cetuximab>
84. Instituto Nacional de Cáncer, 2022. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/buscar/resultados?swKeyword=nivolumab>
85. Instituto Nacional de Cáncer, 2022. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/buscar/resultados?swKeyword=pembrolizumab>
86. Instituto Nacional de Cáncer, 2022. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/supervivencia-general>
87. Instituto Nacional de Cáncer, 2022. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/via-de-senalizacion>
88. Iocca O, Sollecito TP, Alawi F, Weinstein GS, Newman JG, De Virgilio A, et al. Potentially malignant disorders of the oral cavity and oral dysplasia: A systematic review and meta-analysis of malignant transformation rate by subtype. *Head & Neck*. 2020;42(3):539-55.
89. Irfan M, Delgado RR, Frias-Lopez J. The oral microbiome and cancer. *Front Immunol*. 2020;11:591088.

90. Günther J, Pedernera-Astegiano E. E-Cadherin: a key in neoplastic transformation. *Rev Eviden Invest Clin*. 2011;4(1):15-20.
91. Jennbacken K, Tešan T, Wang W, Gustavsson H, Damber J-E, Welén K. N-cadherin increases after androgen deprivation and is associated with metastasis in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2010;17(2):469-79.
92. Jiang H, Cao HJ, Ma N, Bao WD, Wang JJ, Chen TW, et al. Chromatin remodeling factor ARID2 suppresses hepatocellular carcinoma metastasis via DNMT1-Snail axis. *Proc Natl Acad Sci Usa*. 2020;117:4770-80.
93. Kadeh H, Saravani S, Miri Moghaddam E. Immunohistochemical expression of epithelial mesenchymal transition proteins in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Iran J Pathol*. 2021;16(4):354-61.
94. Kang Y, Massagué J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell*. 2004;118(3):277-9.
95. Kato MG, Baek C-H, Chaturvedi P, Gallagher R, Kowalski LP, Leemans CR, et al. Update on oral and oropharyngeal cancer staging – International perspectives. *World J Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 2020;6(1):66-75.
96. Khurshid Z, Zafar MS, Khan RS, Najeeb S, Slowey PD, Rehman IU. Role of Salivary Biomarkers in Oral Cancer Detection. *Adv Clin Chem*. 2018: 23-70.
97. Kidd ME, Shumaker DK, Ridge KM. The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013;130827094923003.
98. Kim KH, Kim L, Choi SJ, Han JY, Kim JM, Chu YC, et al. The clinicopathological significance of epithelial mesenchymal transition associated protein expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Korean J Pathol*. 2014;48(4):263.
99. Kong YH, Syed Zanuuddin SN, Lau SH, Ramanathan A, Kallarakkal TG, Vincent-Chong VK, Wan Mustafa WM, Abraham MT, Abdul Rahman ZA, Zain RB, Cheong

- SC. Co-Expression of TWIST1 and ZEB2 in Oral Squamous Cell Carcinoma Is Associated with Poor Survival. *PLoS One*. 2015;10(7):e0134045.
100. Kordbacheh F, Farah CS. Current and Emerging Molecular Therapies for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cancers. 2021;13(21):5471.
 101. Kujan O, Glenny A-M, Oliver R, Thakker N, Sloan P. Screening programmes for the early detection and prevention of oral cancer. The Cochrane Collaboration, Cochrane Database of Systematic Reviews. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2006. CD004150.pub2.
 102. Laprise C, Cahoon EK, Lynch CF, Kahn AR, Copeland G, Gonsalves L, Madeleine MM, Pfeiffer RM, Engels EA. Risk of lip cancer after solid organ transplantation in the United States. *Am J Transplant*. 2019;19(1):227-37.
 103. Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res*. 2001;61(9):3819–25.
 104. Li LJ, Leng RX, Fan YG, Pan HF, Ye DQ. Translation of noncoding RNAs: Focus on lncRNAs, pri-miRNAs, and circRNAs. *Exp Cell Res*. 2017;361(1):1-8.
 105. Liu PF, Kang BH, Wu YM, Sun JH, Yen LM, Fu TY, Lin YC, Liou HH, Lin YS, Sie HC, Hsieh IC, Tseng YK, Shu CW, Hsieh YD, Ger LP. Vimentin is a potential prognostic factor for tongue squamous cell carcinoma among five epithelial-mesenchymal transition-related proteins. *PLoS One*. 2017;12(6):e0178581
 106. Liu X, Liu L, Dong Z, Li J, Yu Y, Chen X, et al. Expression patterns and prognostic value of m6A-related genes in colorectal cancer. *Am J Transl Res*. 2019;11:3972-91.
 107. Liu Y, Yang M, Luo J, Zhou H. Radiotherapy targeting cancer stem cells "awakens" them to induce tumour relapse and metastasis in oral cancer. *Int J Oral Sci*. 2020;12(1):19.

108. Loh C-Y, Chai J, Tang T, Wong W, Sethi G, Shanmugam M, et al. The E-Cadherin and N-Cadherin switch in epithelial-to-mesenchymal transition: Signaling, therapeutic implications, and challenges *Cells*. 2019;8(10):1118.
109. Lopes NM, Xavier FCA, Ortiz RC, Amôr NG, Garlet GP, Lara VS, Batista AC, Costa NL, Rodini CO. Subcellular localization and expression of E-cadherin and SNAIL are relevant since early stages of oral carcinogenesis. *Pathol Res Pract*. 2018;214(8):1185-91.
110. López-Pintor RM, Hernández G, de Arriba L, de Andrés A. Lip cancer in renal transplant patients. *Oral Oncol*. 2011;47(1):68-71.
111. López-Verdín S, Martínez-Fierro ML, Garza-Veloz I, Zamora-Perez A, Grajeda-Cruz J, González-González R, Molina-Frechero N, Arocena-Sutz M, Bologna-Molina R. E-Cadherin gene expression in oral cancer: Clinical and prospective data. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2019;24(4):444-51.
112. Lorenzo-Pouso AI, Silva FFE, Pérez-Jardón A, Chamorro-Petronacci CM, Oliveira-Alves MG, Álvarez-Calderón-Iglesias Ó, Caponio VCA, Pinti M, Perrotti V, Pérez-Sayáns M. Overexpression of E-Cadherin Is a Favorable Prognostic Biomarker in Oral Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biology (Basel)*. 2023;12(2):239.
113. Lydiatt WM, Patel SG, O'Sullivan B, Brandwein MS, Rigde JA, Migliacci JC, Loomis AM, Shah JP. Head and neck cancers-major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. 2017; 67(2):122-37.
114. Mahmood N, Mushtaq S, Jamal Q, Hanif M, Akhlaq H, Rehman DE, Awan R. Potential utility of cell free high mobility group AT-hook 2 (HMGA2) as a prognostic biomarker in liquid biopsies of oral squamous cell carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2021;22:407-12.

115. Mansoori B, Mohammadi A, Ditzel HJ, Duijf PHG, Khaze V, Gjerstorff MF, Baradaran B. HMGA2 as a critical regulator in cancer development. *Genes*. 2021;12:269.
116. Mariz B, Soares CD, de Carvalho MGF, Jorge-Júnior J. FGF-2 and FGFR-1 might be independent prognostic factors in oral tongue squamous cell carcinoma. *Histopathology*. 2019;74(2):311-20.
117. Markopoulos AK. Current aspects on oral squamous cell carcinoma. *Open Dent J*. 2012;6:126-30.
118. Mazul AL, Hartman CM, Mowery YM, Kramer JR, White DL, Royse KE, Raychaudhury S, Sandulache VC, Ahmed ST, Zevallos JP, Richardson PA, Sikora AG, Chiao EY. Risk and incidence of head and neck cancers in veterans living with HIV and matched HIV-negative veterans. *Cancer*. 2022;128(18):3310-8.
119. McPheeters ML, Kripalani S, Peterson NB, Idowu RT, Jerome RN, Potter SA, Andrews JC. Closing the quality gap: revisiting the state of the science. 2012; 208(3):1-475.
120. Mello FW, Melo G, Pasetto JJ, Silva CAB, Warnakulasuriya S, Rivero ERC. The synergistic effect of tobacco and alcohol consumption on oral squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig*. 2019;23(7):2849-59.
121. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, PRISMA Group. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med*. 2009;6:e1000097.
122. Morais EF, de Farias Morais HG, Franca GM, Haach F, Cavalcanti Galvao H, Salo T, Coletta RD, Almeida Freitas R. SNAIL1 is involved in the control of the epithelial-mesenchymal transition in oral tongue squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2023.

123. Mrozik KM, Blaschuk OW, Cheong CM, Zannettino ACW, Vandyke K. N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer. *BMC Cancer*. 2018;18(1):939.
124. Muzio G, Maggiora M, Paiuzzi E, Oraldi M, Canuto RA. Aldehyde dehydrogenases and cell proliferation. *Free Radic*. 2012;52:735–46.
125. Murphy CT, Galloway TJ, Handorf EA, Egleston BL, Wang LS, Mehra R, et al. Survival impact of increasing time to treatment initiation for patients with head and neck cancer in the United States. *J Clin Oncol*. 2016;34(2):169-78.
126. Nakajima S, Doi R, Toyoda E, Tsuji S, Wada M, Koizumi M, et al. N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004; 10:4125–33.
127. Nakamura R, Ishii H, Endo K, Hotta A, Fujii E, Miyazawa K, et al. Reciprocal expression of Slug and Snail in human oral cancer cells. *PLoS One*. 2018;13(7):0199442.
128. Nalla AK, Estes N, Patel J, Rao JS. N-cadherin mediates angiogenesis by regulating monocyte chemoattractant protein-1 expression via P13K/Akt signaling in prostate cancer cells. *Exp Cell Res*. 2011;317:2512–21.
129. National Cancer Institute. Dictionary of Cancer Terms 2020. Available in: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/oral-cavity-cancer> (last accessed March 19, 2021).
130. National Human Research Institute, 2022. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Transcripcion>
131. Nieto MA. Context-specific roles of EMT programmes in cancer cell dissemination. *Nat Cell Biol*. 2017;19(5):416-8.
132. Ogden GR. Alcohol and oral cancer. *Alcohol*. 2005;35(3):169-73.

133. Öhman J, Rexus H, Mjörnstedt L, Gonzalez H, Holmberg E, Dellgren G, Hasséus B. Oral and lip cancer in solid organ transplant patients--a cohort study from a Swedish Transplant Centre. *Oral Oncol.* 2015;51(2):146-50.
134. Olivares-Urbano MA, Griñán-Lisón C, Marchal JA, Núñez MI. CSC Radioresistance: A Therapeutic Challenge to Improve Radiotherapy Effectiveness in Cancer. *Cells.* 2020;9(7):1651.
135. Omar EA. The outline of prognosis and new advances in diagnosis of oral squamous cell carcinoma (OSCC): Review of the Literature. *J Oral Oncol.* 2013;2013:1-13.
136. OMS, 2021. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/oral-health><https://www.proteinatlas.org/ENSG00000071564-TCF3>
137. Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. Loss of E-Cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res.* 2008;68(10):3645-54.
138. Orlandi E, Iacovelli NA, Tombolini V, Rancati T, Polimeni A, De Cecco L, et al. Potential role of microbiome in oncogenesis, outcome prediction and therapeutic targeting for head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2019;99:104453.
139. Pagedar NA, Gilbert RW. Selective neck dissection: A review of the evidence. *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):416-20.
140. Paik J-H, Skoura A, Chae S-S, Cowan AE, Han DK, Proia RL, et al. Sphingosine 1-phosphate receptor regulation of N-cadherin mediates vascular stabilization. *Genes Dev.* 2004;18(19):2392-403.
141. Panneerselvam K, Ishikawa S, Krishnan R, Sugimoto M. Salivary Metabolomics for Oral Cancer Detection: A Narrative Review. *Metabolites.* 2022;12(5):436.
142. Parmar A, Macluskey M, Mc Goldrick N, Conway DI, Glenny AM, Clarkson JE, Worthington HV, Chan KK. Interventions for the treatment of oral cavity and

- oropharyngeal cancer: chemotherapy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2021; 12(12):CD006386.
143. Patil S, Mahuli AV, Warnakulasuriya S. Effects of smoking shisha, cancer risk, and strategies for prevention of shisha habit. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2022;12(4):439-43.
 144. Peinado H, Moreno-Bueno G, Hardisson D, Pérez-Gómez E, Santos V, Mendiola M, et al. Lysyl Oxidase–Like 2 as a new poor prognosis marker of squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* 2008;68(12):4541-50.
 145. Peiqi L, Zhaozhong G, Yaotian Y, Jun J, Jihua G, Rong J. Expression of SRSF3 is correlated with carcinogenesis and progression of oral squamous cell carcinoma. *Int J Med Sci.* 2016;13:533–9.
 146. Peter TK, Withanage MHH, Comnick CL, Pendleton C, Dabdoub S, Ganesan S, Drake D, Banas J, Xie XJ, Zeng E. Systematic review and meta-analysis of oral squamous cell carcinoma associated oral microbiome. *Front Microbiol.* 2022;13:968304.
 147. Petrella F. Electronic cigarettes, vaping-related lung injury and lung cancer: where do we stand? *Eur J Cancer Prev.* 2021;30(4):293-6.
 148. Pidone Ribeiro FAP, Noguti J, Oshima CTF, Ribeiro DA. Effective targeting of the epidermal growth factor receptor (EGFR) for treating oral cancer: a promising approach. *Anticancer Res.* 2014;34(4):1547-52.
 149. Pires FR, Ramos AB, Oliveira JBC de, Tavares AS, Luz PSR da, Santos TCRB dos. Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features from 346 cases from a single Oral Pathology service during an 8-year period. *J Appl Oral Sci.* 2013;21(5):460-7.
 150. 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.* 2012;12(1):144.
 151. Pyo SW, Hashimoto M, Kim YS, Kim CH, Lee SH, Johnson KR, Wheelock MJ, Park JU. Expression of E-cadherin, P-cadherin and N-cadherin in oral squamous cell

- carcinoma: correlation with the clinicopathologic features and patient outcome. *J Craniomaxillofac Surg.* 2007;35(1):1-9.
152. Qu Y, He Y, Yang Y, Li S, An W, Li Z, et al. ALDH3A1 acts as a prognostic biomarker and inhibits the epithelial mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma through IL-6/STAT3 signaling pathway. *J Cancer.* 2020;11:2621–31.
 153. Quadri MFA, Alharbi F, Bajonaid AMS, Moafa IHY, Sharwani AA, Alamir AHA. Oral squamous cell carcinoma and associated risk factors in Jazan, Saudi Arabia: A hospital based case control study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(10):4335-8.
 154. Reibel J. Prognosis of oral premalignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(1):47-62.
 155. Reidy J, McHugh E, Stassen LFA. A review of the relationship between alcohol and oral cancer. *The Surgeon.* 2011;9(5):278-83.
 156. Reigosa A, Pérez C, Perozo M, Caleiras E, Saldivia F, Fernández-Tortolero A. Expression of vimentin and its relationship with the classes molecular factors and prognosis in breast cancer. *Gac Méd Caracas.* 2017;125(3):207-17.
 157. Rivera C. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(9):11884-94.
 158. Rock LD, Rosin MP, Zhang L, Chan B, Shariati B, Laronde DM. Characterization of epithelial oral dysplasia in non-smokers: First steps towards precision medicine. *Oral Oncol.* 2018;78:119-25.
 159. Sánchez-Tilló E, Siles L, de Barrios O, Cuatrecasas M, Vaquero EC, Castells A, Postigo A. Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression. *Am J Cancer Res.* 2011;1(7):897-912.
 160. Sasabe E, Tomomura A, Liu H, Sento S, Kitamura N, Yamamoto T. Epidermal growth factor/epidermal growth factor receptor signaling blockage inhibits tumor cell-derived exosome uptake by oral squamous cell carcinoma through macropinocytosis. *Cancer Sci.* 2022;113(2):609-21.

161. Sathish II, Asokan K, C L K, Ramanathan A. Expression of E-Cadherin and levels of dysplasia in oral leukoplakia - A prospective cohort study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2020;21(2):405-10.
162. Scanlon CS, Van Tubergen EA, Inglehart RC, D'Silva NJ. Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. *J Dent Res.* 2013;92(2):114-21.
163. Schneider MR, Kolligs FT. E-cadherin's role in development, tissue homeostasis and disease: Insights from mouse models: Tissue-specific inactivation of the adhesion protein E-cadherin in mice reveals its functions in health and disease. *BioEssays.* 2015;37(3):294-304.
164. Scholtz B, Horváth J, Tar I, Kiss C, Márton IJ. Salivary miR-31-5p, miR-345-3p, and miR-424-3p Are reliable biomarkers in patients with oral squamous cell carcinoma. *Pathogens.* 2022;11(2):229.
165. Seyedmajidi M, Seifi S, Moslemi D, Mozaffari SF, Gholinia H, Zolfaghari Z. Immunohistochemical expression of TWIST in oral squamous cell carcinoma and its correlation with clinicopathologic factors. *J Cancer Res Ther.* 2018;14(5):964-9.
166. Shao W, Fujiwara N, Mouri Y, Kisoda S, Yoshida K, Yoshida K et al. Conversion from epithelial to partial-EMT phenotype by *Fusobacterium nucleatum* infection promotes invasion of oral cancer cells. *Sci Rep.* 2021; 11:1–14.
167. Shukla P, Dange P, Mohanty BS, Gadewal N, Chaudhari P, Sarin R. ARID2 suppression promotes tumor progression and upregulates cytokeratin 8, 18 and β -4 integrin expression in TP53-mutated tobacco-related oral cancer and has prognostic implications. *Cancer Gene Ther.* 2022.
168. Smith A, Teknos TN, Pan Q. Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncology.* 2013;49(4):287-92.

169. Sultan AS, Jessri M, Farah CS. Electronic nicotine delivery systems: Oral health implications and oral cancer risk. *J Oral Pathol Med*. 2021;50(3):316-22.
170. Su Mun L, Wye Lum S, Kong Yuiin Sze G, Hock Yoong C, Ching Yung K, Kah Lok L, et al. Association of microbiome with oral squamous cell carcinoma: a systematic review of the metagenomic studies. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18:7224.
171. Taghavi N, Yazdi I. Prognostic factors of survival rate in oral squamous cell carcinoma: clinical, histologic, genetic and molecular concepts. *Arch Iran Med*. 2015;18(5):314-9.
172. Takeichi M. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem*. 1990;59(1):237-52.
173. Takkunen M, Grenman R, Hukkanen M, Korhonen M, García de Herreros A, Virtanen I. Snail-dependent and -independent epithelial-mesenchymal transition in oral squamous carcinoma cells. *J Histochem Cytochem*. 2006;54(11):1263-75.
174. Tanaka H, Kono E, Tran CP, Miyazaki H, Yamashiro J, Shimomura T, et al. Monoclonal antibody targeting of N-cadherin inhibits prostate cancer growth, metastasis and castration resistance. *Nat Med*. 2010;16(12):1414–20.
175. Tanaka T, Ishigamori R. Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer. *J Oncol*. 2011;2011:1-10.
176. Tarin D. Inappropriate gene expression in human cancer and its far-reaching biological and clinical significance. *Cancer Metastasis Rev*. 2012;31(1-2):21-39.
177. Tarin D. Role of the host stroma in cancer and its therapeutic significance. *Cancer Metastasis Rev*. 2013;32(3-4):553-66.
178. Tarin D, Thompson EW, Newgreen DF. The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. *Cancer Res*. 2005;65(14):5996-6000.
179. Terzuoli E, Bellan C, Aversa S, Ciccone V, Morbidelli L, Giachetti A, et al. ALDH3A1 overexpression in melanoma and lung tumors drives cancers stem cell

- expansion, impairing immune surveillance through enhanced PD-L1 output. *Cancers*. 2019;11:1963.
180. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*. 2015;517(7536):576-82.
 181. Tian S, Liu D-H, Wang D, Ren F, Xia P. Aldehyde Dehydrogenase 1 (ALDH1) promotes the toxicity of trail in non-small cell lung cancer cells via post-transcriptional regulation of MEK-1 expression. *Cell Physiol Biochem*. 2018;51(1):217-27.
 182. Travasso C. Betel quid chewing is responsible for half of oral cancer cases in India, finds study. *BMJ*. 2013;347(29):7536.
 183. Vallejo GH, Romero CJ, de Vicente JC. Incidence and risk factors for cancer after liver transplantation. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005;56(1):87-99.
 184. Van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncology*. 2009;45(4-5):317-23.
 185. Van Leeuwen MT, Grulich AE, McDonald SP, McCredie MRE, Amin J, Stewart JH, et al. Immunosuppression and other risk factors for lip cancer after kidney transplantation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(2):561-9.
 186. Van Roy F, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(23):3756-88.
 187. Vestweber D. Cadherins in tissue architecture and disease. *J Mol Med*. 2015;93(1):5-11.
 188. Vieira V, Campos LH, Jesus LH, Klabunde C, Gamba TD, Flores IL, Oliveira MG, Rados PV. Overexpression of ALDH1 and EMT marker profile are linked with unfavorable outcome in head and neck cancer. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2020;25(6):752-61.

189. Wang JF, Wang Y, Zhang SW, Chen YY, Qiu Y, Duan SY, et al. Expression and prognostic analysis of integrins in gastric cancer. *J Oncol*. 2020;30:886.
190. Wang M, Ren D, Guo W, Huang S, Wang Z, Li Q, et al. N-cadherin promotes epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell-like traits via ErbB signaling in prostate cancer cells. *Int J Oncol*. 2016;48(2):595-606.
191. Wangmo C, Charoen N, Jantharapattana K, Dechaphunkul A, Thongsuksai P. Epithelial–mesenchymal transition predicts survival in oral squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2020;26:1511–8.
192. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*. 2009;45(4-5):309-16.
193. Warnakulasuriya S, Cain N. Screening for oral cancer: contributing to the debate: Screening for oral cancer. *J Investig Clin Dent*. 2011;2(1):2-9.
194. Warnakulasuriya S, Kujan O, Aguirre-Urizar JM, Bagan JV, González-Moles MÁ, Kerr AR, et al. Oral potentially malignant disorders: A consensus report from an international seminar on nomenclature and classification, convened by the WHO Collaborating Centre for Oral Cancer. *Oral Dis*. 2021;27(8):1862-80.
195. Wells GA, Shea B, O’Connell D, Peterson J, Welch V, Losos M, et al. The Newcastle–Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomized studies in metaanalyses. Available in: http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.htm (last accessed March 19, 2021).
196. Wilsker D, Probst L, Wain HM, Maltais L, Tucker PW, Moran E. Nomenclature of the ARID family of DNA-binding proteins. *Genomics*. 2005;86(2):242-51
197. Wong T, Wiesenfeld D. Oral Cancer. *Aust Dent J*. 2018;63:91-9.
198. Wreesmann VB, Katabi N, Palmer FL, Montero PH, Migliacci JC, Gönen M, Carlson D, Ganly I, Shah JP, Ghossein R, Patel SG. Influence of extracapsular nodal spread

- extent on prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2016;38(1):1192-9.
199. Wu D, Mou YP, Chen K, Cai JQ, Zhou YC, Pan Y, et al. Aldehyde dehydrogenase 3A1 is robustly upregulated in gastric cancer stem-like cells and associated with tumorigenesis. *Int J Oncol*. 2016;49:611-22.
 200. Wu M, Duan Q, Liu X, Zhang P, Fu Y, Zhang Z, et al. MiR-155-5p promotes oral cancer progression by targeting chromatin remodeling gene ARID2. *Biomed Pharmacotherapy*. 2020;122:109696.
 201. Xiao Y, Li Y, Tao H, Humphries B, Li A, Jiang A, et al. Integrin α 5 down-regulation by miR-205 suppresses triple negative breast cancer stemness and metastasis by inhibiting the Src/Vav2/Rac1 pathway. *Cancer Lett*. 2018;433:199-209.
 202. Xu L, Pan J, Pan H. Construction and validation of an m6A RNA methylation regulators-based prognostic signature for esophageal cancer. *Cancer Manag Res*. 2020;12:5385–94.
 203. Xu X, Yang J, Zhou W, Wang L, Lu Q, Wang X, et al. Genetic variations within alternative splicing associated genes are associated with breast cancer susceptibility in Chinese women. *Gene*. 2019;706:140-5.
 204. Yadav S, Sehra R, Singh SN, Agarwal S, Singhal P, Meena R. An observational study depicting role of p16 in detecting human papilloma virus in oral and oropharyngeal cancer and associated factors. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2022;74(2):2088-94
 205. Yan W, Deng Y, Zhang Y, Luo J, Lu D, Wan Q, et al. DZIP1 promotes proliferation, migration and invasion of oral squamous carcinoma through the GLI1/3 pathway. *Transl Oncol*. 2019;12:1504–15.
 206. Yang J, Antin P, Berx G, Blanpain C, Brabletz T, Bronner M, et al. Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(6):341-52.

207. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*. 2004;117(7):927-39.
208. Yao X, Sun S, Zhou X, Zhang Q, Guo W, Zhang L. Clinicopathological significance of ZEB-1 and E-cadherin proteins in patients with oral cavity squamous cell carcinoma. *Onco Targets Ther*. 2017;10:781-90.
209. Yu M, Chu S, Fei B, Fang X, Liu Z. O-GlcNAcylation of ITGA5 facilitates the occurrence and development of colorectal cancer. *Exp Cell Res*. 2019;382:111464.
210. Zakrzewska M, Marcinkowska E, Wiedlocha A. FGF-1: from biology through engineering to potential medical applications. *Crit Rev Clin Lab*. 2008;45(1):91-135.
211. Zanoni DK, Montero PH, Migliacci JC, Shah JP, Wong RJ, Ganly I, Patel SG. Survival outcomes after treatment of cancer of the oral cavity (1985-2015). *Oral Oncol*. 2019;90:115-21.
212. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1429-37.
213. Zhang H, Tang Z, Deng C, He Y, Wu F, Liu O, et al. HMGA2 is associated with the aggressiveness of tongue squamous cell carcinoma. *Oral Dis*. 2017;23(2):255-64.
214. Zhang Y, Chen W, Pan T, Wang H, Zhang Y, Li C. LBX2-AS1 is activated by ZEB1 and promotes the development of esophageal squamous cell carcinoma by interacting with HNRNPC to enhance the stability of ZEB1 and ZEB2 mRNAs. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;511:56672.
215. Zhao X-P, Zhang H, Jiao J-Y, Tang D-X, Wu Y, Pan C-B. Overexpression of HMGA2 promotes tongue cancer metastasis through EMT pathway. *J Transl Med*. 2016;14(1):26.

216. Zheng M, Jiang YP, Chen W, Li KD, Liu X, Gao SY, Feng H, Wang SS, Jiang J, Ma XR, Cen X, Tang YJ, Chen Y, Lin YF, Tang YL, Liang XH. Snail and Slug collaborate on EMT and tumor metastasis through miR-101-mediated EZH2 axis in oral tongue squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2015; 30;6(9):6797-810.
217. Zhu G, Li X, Guo B, Ke Q, Dong M, Li F. PAK5-mediated E47 phosphorylation promotes epithelial–mesenchymal transition and metastasis of colon cancer. *Oncogene*. 2016;35(15):1943-54.
218. Zidar N, Boštjančič E, Malgaj M, Gale N, Dovšak T, Didanovič V. The role of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Virchows Arch*. 2018;472(2):237-45.
219. Zini A, Czerninski R, Sgan-Cohen HD. Oral cancer over four decades: epidemiology, trends, histology, and survival by anatomical sites: Oral cancer over four decades. *J Oral Pathol Med*. 2009;39(4):299-305.
220. Zou B, Wang D, Xu K, Yuan DY, Meng Z, Zhang B. Integrin α -5 as a potential biomarker of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*. 2019;18:4048-55.