







# Universidad de Oviedo

**PROGRAMA DE DOCTORADO: INVESTIGACIÓN EN CIRUGÍA**

**Título de la tesis**

**EXPRESIÓN DE CORTACTINA, QUINASA DE ADHESIÓN FOCAL Y  
PODOPLANINA EN LESIONES POTENCIALMENTE CANCERIZABLES  
Y EN CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LA CAVIDAD  
ORAL: UTILIDAD COMO MARCADORES DE PROGRESIÓN A  
MALIGNIDAD Y FACTORES PRONÓSTICOS**

**Nombre del Autor**

**TANIA RODRÍGUEZ SANTAMARTA**

**2016**









# Universidad de Oviedo

**PROGRAMA DE DOCTORADO: INVESTIGACIÓN EN CIRUGÍA**

**Título de la tesis**

**EXPRESIÓN DE CORTACTINA, QUINASA DE ADHESIÓN FOCAL Y  
PODOPLANINA EN LESIONES POTENCIALMENTE CANCERIZABLES  
Y EN CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LA CAVIDAD  
ORAL: UTILIDAD COMO MARCADORES DE PROGRESIÓN A  
MALIGNIDAD Y FACTORES PRONÓSTICOS**

**Nombre del Autor**

**TANIA RODRÍGUEZ SANTAMARTA**







## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: EXPRESIÓN DE CORTACTINA, QUINASA DE ADHESIÓN FOCAL Y PODOPLANINA EN LESIONES POTENCIALMENTE CANCERIZABLES Y EN CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LA CAVIDAD ORAL: UTILIDAD COMO MARCADORES DE PROGRESIÓN A MALIGNIDAD Y FACTORES PRONÓSTICOS	Inglés: EXPRESSION OF CORTACTIN, FOCAL ADHESION KINASE AND PODOPLANIN IN ORAL POTENTIALLY MALIGNANT DISORDERS AND IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMAS: UTILITY AS BIOMARKERS FOR MALIGNANT PROGRESSION AND PROGNOSTIC FACTORS
2.- Autor	
Nombre: TANIA RODRÍGUEZ SANTAMARTA	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: INVESTIGACIÓN EN CIRUGÍA	
Órgano responsable: CIRUGÍA Y ESPECIALIDADES MÉDICO-QUIRÚRGICAS	

### RESUMEN (en español)

#### INTRODUCCIÓN:

El carcinoma oral de células epidermoides (COCE) es uno de los más frecuentes en la población mundial, se caracteriza por un patrón agresivo, tanto a nivel local como de invasión linfática. Hasta la fecha, no existen marcadores suficientemente avalados para la predicción de progresión a malignidad en el caso de trastornos orales potencialmente cancerizables (TOPC) ni para establecer el pronóstico en el caso de los COCE.

El papel de quinasa de adhesión focal (FAK), Cortactina (CTTN) y Podoplanina en la carcinogénesis se ha relacionado con la progresión a malignidad, la invasión tumoral y el desarrollo de metástasis.

#### MATERIAL Y MÉTODO:

Se ha seleccionado una cohorte de 64 pacientes diagnosticados y tratados por leucoplasias orales con diagnóstico histológico de displasia entre los años 2000 y 2005 y una cohorte de pacientes diagnosticados y tratados por COCE entre los años 1996 y 2006 en el Hospital Universitario Central de Asturias. Obteniendo de manera retrospectiva datos demográficos, clínicos y patológicos.

En el caso de TOPC se clasificó a los pacientes en función de si presentaron o no, transformación maligna de la lesión inicial. Se obtuvieron muestras representativas de tejido parafinado del archivo de Anatomía Patológica del HUCA y se procesaron para su estudio mediante inmunohistoquímica de la expresión de CTTN, FAK y Podoplanina tanto de las lesiones potencialmente malignizables como de los carcinomas epidermoides de la cavidad oral.

#### RESULTADOS:

En TOPC se encontró sobreexpresión de FAK y CTTN en 27 y 52 pacientes respectivamente. La expresión de ambas aumenta con el grado de displasia y en aquellos casos que evolucionaron a COCE. La sobreexpresión de ambas moléculas se asocia significativamente con la progresión a malignidad. La coexpresión de ambas refleja un riesgo de progresión a malignidad superior del que suponen por separado y superior al diagnóstico histológico. Con respecto a podoplanina 22 de 58 pacientes mostraron sobreexpresión. La expresión de podoplanina mostró asociación significativa con el grado de displasia y con el riesgo de progresión a cáncer oral.

En COCE la expresión de FAK se asocia significativamente con la presencia de metástasis ganglionares y peor pronóstico. CTTN se asoció con la presencia de segundos tumores primarios. El patrón de podoplanina se asoció con la diferenciación histológica y con aparición de segundos primarios. No hemos encontrado asociación entre CTTN y podoplanina con la supervivencia.

#### CONCLUSIONES:

FAK, Cortactina y Podoplanina, muestran asociación estadísticamente significativa con la progresión



tumoral con independencia del grado histológico en TOPC.  
En nuestra serie, FAK, Cortactina y podoplanina no han demostrado ser marcadores de evolución ni pronóstico relevantes en la evolución del COCE.

### RESUMEN (en Inglés)

#### INTRODUCTION:

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is one of the most common types of cancer worldwide. It is characterized by an aggressive pattern, both locally and lymphatic invasion.

There is a need for accurate biomarkers capable of predicting the risk of malignant transformation of oral potentially malignant disorders (OPMD) and for establishing the prognosis in the case of OSCC.

The role of focal adhesion kinase (FAK), cortactin (CTTN) and podoplanin in carcinogenesis has been associated with the progression to malignancy, tumor invasion and the ability to metastasize.

#### MATERIALS AND METHODS:

FAK, CTTN and podoplanin immunorexpression was analyzed in a cohort of 62 patients diagnosed for oral leukoplakia that showed epithelial dysplasia between 2000 and 2005, and in a cohort of patients diagnosed and treated for COCE between 1996 and 2006 in the Hospital Universitario Central de Asturias. Demographic, clinical and pathological data were retrospectively collected.

Representative formalin-fixed paraffin-embedded sections from archival tissue blocks at HUCA were immunohistochemically evaluated to investigate the role of CTTN, FAK and podoplanin in both OPMD and OSCC.

#### RESULTS:

In OPMD, FAK and CTTN overexpression was found in 27 and 52 patients, respectively. The expression of both proteins significantly increased with the degree of dysplasia and also in those cases that evolved to OSCC. Interestingly, patients showing strong coexpression of both proteins exhibited a significantly higher cancer risk than those with strong expression of each protein or those showing weak to moderate expression. Regarding podoplanin expression, 22 cases were classified as podoplanin-positive. Podoplanin expression was found to significantly correlate with the grade of dysplasia, and more importantly, with increased risk of progression to oral cancer.

In OSCC, FAK overexpression was associated with the presence of lymph node metastasis and a poor prognosis. Cortactin was associated with the presence of second primary carcinomas. Podoplanin expression pattern was associated with histological differentiation and a trend was found toward an association with the development of second primary carcinomas. We found no association between podoplanin and cortactin expression and patient survival.

#### CONCLUSIONS:

FAK, CTTN and podoplanin expression frequently increases in early stages of oral tumorigenesis and more importantly are significantly correlated with predicting factors for increased cancer risk in oral premalignant lesions and could be valuable biomarkers for risk assessment of malignant transformation

In our series, FAK, CTTN and podoplanin expression showed no association with evolution and prognosis in OSCC.





## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría transmitir mi más sincero agradecimiento a mis directores de esta Tesis Doctoral:

En primer lugar, al Dr. Juan Carlos de Vicente Rodríguez, por darme cabida en el proyecto de investigación del que deriva este trabajo, por su aportación indispensable en todas las fases de la mismo, por transmitirnos diariamente su pasión por la investigación, y, especialmente, por su paciencia y su tiempo.

A la Dra. Juana María García Pedrero por su ayuda para integrar tanta información nueva para mí, su serenidad y por tener siempre palabras de aliento.

Quiero agradecer también su colaboración:

Al Dr. Juan Pablo Rodrigo Tapia, por su aportación a este proyecto y por ser siempre una fuente de respuestas.

A la Dra. Verónica Blanco Lorenzo, por su asistencia para la valoración histopatológica de los casos.

A Eva Allonca y el resto del personal del IUOPA por su contribución en el procesamiento de las muestras.

A mis compañeros del Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del Hospital Universitario de Asturias, por su participación directa o indirecta, especialmente al Dr. Álvaro Fernández del Valle por su ayuda con la

iconografía y el diseño de este trabajo y su contribución al orden de mis pensamientos, al Dr Lucas Villalaín por su compañía en este camino y por su especial visión, al Dr. Manolo González por su ánimo inagotable, al Dr. Pablo Rosado por enseñarme por dónde comenzar y al Dr. Lombardía por compartir su filosofía vital.

Y por último a mi familia y amigos por su apoyo incondicional.

---

## LISTADO DE ABREVIATURAS

<b>CCE</b>	Carcinoma de células escamosas
<b>CECC</b>	Carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello
<b>COCE</b>	Carcinoma oral de células escamosas
<b>CTTN</b>	Cortactina
<b>ECM</b>	Esternocleidomastoideo
<b>FAK</b>	Quinasa de adhesión focal
<b>GLST</b>	Glutation-S-transferasa
<b>GST</b>	Gen supresor de tumores
<b>HPV</b>	Virus del papiloma humano
<b>HR</b>	<i>Hazard ratio</i>
<b>IC</b>	Intervalo de confianza
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>LOH</b>	Pérdida de heterocigosidad
<b>MMPs</b>	Metaloproteasas de matriz extracelular
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OR</b>	<i>Odds ratio</i>
<b>PCNA</b>	Antígeno nuclear de proliferación celular
<b>PET</b>	Tomografía por emisión de positrones
<b>RM</b>	Resonancia Magnética
<b>RT</b>	Radioterapia

<b>TC</b>	Tomografía computadorizada
<b>TOPC</b>	Trastornos orales potencialmente cancerizables
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular



## LISTADO DE TABLAS

- **Tabla 1:** *Trastornos orales potencialmente cancerizables.*
- **Tabla 2:** *Criterios usados para el diagnóstico de displasia. Warnakulasuriya 2008.*
- **Tabla 3:** *Variabilidad intra e interobservador en el diagnóstico de displasia. (Adaptado de Eversole 2009).*
- **Tabla 4 :** *Clasificación TNM (American Joint Committe of Cancer).*
- **Tabla 5 :** *Estadaje tumoral (American Joint Committe of Cancer).*
- **Tabla 6:** *Características clínicas y progresión a malignidad de los TOPC en el análisis de FAK y CTTN.*
- **Tabla 7:** *Características clínicas y progresión a malignidad de los TOPC en el análisis de Podoplanina.*
- **Tabla 8:** *Relación entre la expresión de FAK y el diagnóstico histopatológico.*
- **Tabla 9:** *Relación entre la expresión de CTTN y el diagnóstico histopatológico.*
- **Tabla 10:** *Evolución de los pacientes a carcinoma en función del diagnóstico histológico.*
- **Tabla 11:** *Relación entre la sobreexpresión de FAK y la progresión a cáncer.*
- **Tabla 12:** *Relación entre la sobreexpresión de CTTN y la progresión a cáncer.*
- **Tabla 13:** *Relación entre la sobreexpresión de FAK y CTTN de forma conjunta y la progresión a COCE.*
- **Tabla 14:** *Análisis univariante de Cox (FAK-CTTN).*

- 
- **Tabla 15:** *Análisis multivariante de Cox (FAK-CTTN).*
  - **Tabla 16:** *Asociación entre la expresión de podoplanina y las características clínicas de los pacientes.*
  - **Tabla 17:** *Asociación entre la expresión de podoplanina y el grado de displasia.*
  - **Tabla 18:** *Evolución de los TOPC en función de la expresión de podoplanina.*
  - **Tabla 19:** *Análisis univariante de los factores pronósticos (Kaplan-Meier).*
  - **Tabla 20:** *Análisis univariante de Cox (Podoplanina).*
  - **Tabla 21:** *Análisis multivariante de Cox (Podoplanina).*
  - **Tabla 22:** *Características clínico-patológicas de los casos incluidos (COCE).*
  - **Tabla 23:** *Asociación entre intensidad de tinción de FAK y características clínico-patológicas en COCE.*
  - **Tabla 24:** *Análisis de supervivencia en función de la expresión de FAK.*
  - **Tabla 25:** *Asociación entre intensidad de tinción de cortactina y características clínico-patológicas COCE.*
  - **Tabla 26:** *Análisis de supervivencia en función de la expresión de CTTN.*
  - **Tabla 27:** *Resumen de la valoración de la expresión de podoplanina.*
  - **Tabla 28:** *Asociación entre el patrón de tinción de podoplanina y las características clínico-patológicas.*
  - **Tabla 29:** *Asociación entre la expresión de podoplanina y las características clínico-patológicas.*
  - **Tabla 30:** *Asociación entre intensidad de tinción de podoplanina y el score (intensidad x porcentaje) y características clínico-patológicas.*
  - **Tabla 31:** *Análisis univariante de supervivencia en función de factores pronósticos (Kaplan-Meier).*
  - **Tabla 32:** *Análisis univariante de supervivencia en función de la expresión de podoplanina (Kaplan-Meier).*

---

## LISTADO DE FIGURAS

- **Figura 1:** Modelo genético de carcinogénesis en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello.
- **Figura 2:** Esquema de valoración de la expresión de podoplanina. Adaptado de Kawaguchi y cols.
- **Figura 3:** Clasificación de los TOPC en el análisis de FAK y CTTN.
- **Figura 4:** Distribución de los TOPC en el análisis de podoplanina.
- **Figura 5:** Análisis inmunohistoquímico de la expresión de CTTN y FAK en TOPC.
- **Figura 6:** Curva de supervivencia de Kaplan-Meier en pacientes con TOPC categorizados por grado histológico (log-rank  $p < 0,005$ ).
- **Figura 7:** Curva de supervivencia de Kaplan-Meier en pacientes con TOPC categorizados por sobreexpresión de CTTN (log-rank  $p = 0,001$ ).
- **Figura 8:** Curva de supervivencia de Kaplan-Meier en pacientes con TOPC categorizados por sobreexpresión de FAK (log-rank  $p < 0,0005$ ).
- **Figura 9:** Curva de supervivencia de Kaplan-Meier en pacientes con TOPC categorizados por sobreexpresión simultánea de CTTN - FAK (log-rank  $p = 0,0004$ , grupo 2 versus grupo 1;  $p < 0,0005$ , grupo 2 versus grupo 0; y  $p = 0,93$  grupo 1 versus grupo 0).
- **Figura 10:** Análisis inmunohistoquímico de la expresión de podoplanina.
- **Figura 11 :** Curva de supervivencia de Kaplan-Meier en pacientes con TOPC categorizados por expresión de podoplanina.
- **Figura 12:** Análisis inmunohistoquímico de la expresión de FAK en COCE.

- **Figura 13:** *Curva de supervivencia de Kaplan-Meier en pacientes con carcinoma de células escamosas oral categorizados por expresión de FAK.*
- **Figura 14:** *Análisis inmunohistoquímico de la expresión de CTTN en COCE.*
- **Figura 15:** *Tumor de células escamosas con tinción negativa para podoplanina. Vaso linfático con tinción positiva (control interno)*
- **Figura 16:** *Patrones de inmunotinción de podoplanina.*
- **Figura 17:** *Intensidad de inmunotinción de podoplanina*
- **Figura 18:** *Porcentaje de células teñidas de podoplanina.*

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>16</b>
<b>LISTADO DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>18</b>
<b>LISTADO DE TABLAS.....</b>	<b>20</b>
<b>LISTADO DE FIGURAS .....</b>	<b>22</b>
<b>ÍNDICE.....</b>	<b>24</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>29</b>
<b>MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>35</b>
<b>Carcinomas orales de células escamosas (COCE) .....</b>	<b>35</b>
Epidemiología.....	35
Etiología.....	36
Histología.....	40
Modelo de carcinogénesis .....	41
Tratamiento .....	53
Pronóstico.....	59
<b>Trastornos orales potencialmente cancerizables (TOPC).....</b>	<b>61</b>
Definición.....	61
Clasificaciones: valor pronóstico.....	65
<b>Marcadores moleculares en displasias orales .....</b>	<b>69</b>
Selección de marcadores.....	72
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>85</b>
<b>PACIENTES Y MÉTODO .....</b>	<b>89</b>
<b>Selección de pacientes: .....</b>	<b>89</b>
TRASTORNOS ORALES POTENCIALMENTE CANCERIZABLES.....	89
CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS.....	90
<b>Variables analizadas.....</b>	<b>92</b>
TRASTORNOS ORALES POTENCIALMENTE CANCERIZABLES.....	92
CARCINOMAS ORALES DE CÉLULAS ESCAMOSAS .....	93
<b>Muestras histológicas y análisis inmunohistoquímico .....</b>	<b>96</b>
Técnica de inmunohistoquímica .....	97
<b>Cuantificación de marcadores.....</b>	<b>99</b>
FAK Y CTTN.....	99
PODOPLANINA .....	99
<b>Análisis estadístico.....</b>	<b>102</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>105</b>
<b>Lesiones orales potencialmente malignizables.....</b>	<b>105</b>
Descripción de la muestra.....	105
Análisis de la expresión de FAK.....	109

---

Análisis de la expresión de CTTN .....	110
Análisis de la expresión de podoplanina.....	121
<b>CARCINOMAS ORALES DE CÉLULAS ESCAMOSAS .....</b>	<b>130</b>
Descripción de la muestra.....	130
Análisis de la expresión de FAK.....	132
Análisis de la expresión de cortactina.....	138
Análisis de la expresión de podoplanina.....	141
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>159</b>
<b>Consideraciones sobre las muestras de pacientes estudiadas y parámetros</b>	
<b>clínico-patológicos .....</b>	<b>159</b>
TRASTORNOS ORALES POTENCIALMENTE CANCERIZABLES.....	159
CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS.....	161
<b>Consideraciones sobre los marcadores .....</b>	<b>163</b>
CTTN y FAK.....	163
PODOPLANINA .....	170
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>181</b>
<b>En lesiones de la mucosa oral potencialmente cancerizables: .....</b>	<b>181</b>
<b>En carcinomas orales de células escamosas:.....</b>	<b>183</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS: .....</b>	<b>187</b>

# 1. INTRODUCCIÓN





---

## INTRODUCCIÓN

Los tumores malignos de la cavidad oral suponen un 4% del total de tumores malignos del organismo, y de ellos, el 90% corresponden a carcinomas orales de células escamosas (COCE)<sup>1</sup>.

Anualmente, más de 300.000 nuevos casos de COCE son diagnosticados en todo el mundo<sup>2</sup>. En España, la incidencia del cáncer oral es de 12 a 15 casos/100.000 habitantes/año en hombres y de 2 a 4 casos/100.000 habitantes/año en mujeres, y causa entre el 2 y el 3% de todas las muertes por cáncer en nuestro país<sup>3</sup>. Además, estudios epidemiológicos recientes han demostrado un aumento de la mortalidad anual por cáncer oral, de un 25% para los hombres y de un 9% para las mujeres, durante el período de 1975- 1994, lo que hace que el cáncer oral deba ser considerado un problema de salud pública en España<sup>4</sup>.

El COCE puede ser precedido por trastornos orales precancerosos, que ya muestran muchas de las alteraciones genéticas que están presentes en el COCE<sup>5</sup>. La displasia oral es un precursor frecuente del cáncer oral con una progresión a malignidad entre un 6 y un 36%<sup>6</sup>.

Se conocen diversos factores de riesgo para el COCE, entre los que destacan el consumo de tabaco y alcohol. En las personas que fuman tabaco se producen cambios genéticos que afectan a toda la mucosa aerodigestiva (cavidad oral, nariz, faringe, tráquea, bronquios, pulmones) y que persisten durante muchos años, incluso tras abandonar el hábito tabáquico<sup>7</sup>. El mecanismo más importante por el que el alcohol puede ser cancerígeno es por su oxidación química a acetaldehído por acción de la aldehído deshidrogenasa<sup>8</sup>. El riesgo atribuible de cáncer oral debido a la combinación de alcohol y tabaco se estima en más del 80%. Los grandes fumadores y bebedores tienen un incremento de 38 veces del riesgo de padecer cáncer respecto a los abstemios en ambos productos<sup>9</sup>. Otros

---

factores de riesgo de cáncer oral, descritos en la literatura, son el estilo de vida, la higiene oral deficiente, la dieta pobre en antioxidantes<sup>10</sup> o las infecciones por hongos como la *Candida Albicans*<sup>11</sup> o por virus como el virus del papiloma humano (HPV) <sup>12, 13</sup> o el virus del herpes simple (HSV)<sup>14</sup>.

Muchos de los estudios en trastornos orales potencialmente cancerizables (TOPC) están de acuerdo en que la gravedad de las alteraciones epiteliales no es suficiente para determinar el riesgo de progresión hacia la malignidad<sup>15</sup>. De ahí la importancia de identificar marcadores válidos del riesgo de progresión de estas lesiones.

La tasa de supervivencia a los 5 años de los pacientes aquejados de cáncer oral es del 80% en estadios iniciales, del 40% en neoplasias con extensión regional y de menos de 20% para los pacientes con metástasis a distancia. Y, a pesar de los avances diagnósticos y terapéuticos en este campo, la supervivencia no ha mejorado en las últimas décadas<sup>16</sup>. Una de las posibles razones de ello es que el algoritmo de decisión terapéutico actual, basado en el sistema de clasificación TNM<sup>17</sup> y en el grado de diferenciación histológica, ha demostrado no ser siempre un indicador pronóstico satisfactorio. Por lo tanto, hay una acuciante necesidad de identificar indicadores pronósticos, con el fin de valorar la biológica de las lesiones en cada paciente concreto. La detección precoz del cáncer oral o de los TOPC en estadios asintomáticos, sugiere no sólo un aumento en las tasas de supervivencia sino también una mejora en la calidad de vida como consecuencia de la realización de tratamientos menos agresivos.

El conocimiento de la lógica molecular implicada en la carcinogénesis, proliferación, crecimiento celular y capacidad invasiva de las células tumorales ha permitido la identificación de marcadores tumorales en el COCE que podrían ser de utilidad tanto para predecir su

comportamiento y evolución clínica, de forma individualizada, como para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

En este estudio analizaremos la importancia de la quinasa de adhesión focal (FAK), la cortactina (CTTN) y la podoplanina como marcadores de progresión a malignidad de los TOPC y de la podoplanina como indicador pronóstico en el cáncer oral de células escamosas.



## 2. MARCO TEÓRICO



## MARCO TEÓRICO

### **Carcinomas orales de células escamosas (COCE)**

Siguiendo la última edición de la Clasificación Internacional de Enfermedades de la Organización Mundial de la Salud (OMS), Moore et al.<sup>18</sup> sugieren que las lesiones asentadas en la porción móvil de la lengua, suelo de la boca, mucosa yugal, mucosa de los rebordes alveolares superior e inferior y paladar, deben ser agrupadas bajo la denominación de cáncer oral, y que el cáncer de labio, orofaringe y de glándulas salivales deben ser analizados separadamente.

El carcinoma de células escamosas (COCE) representa entre un 90 y un 95% de todas las lesiones malignas de la cavidad oral<sup>19</sup>.

### **Epidemiología**

El COCE es el undécimo cáncer más común, representa aproximadamente el 4% de todos los cánceres y ocasiona un 2% de las muertes por cáncer en el mundo<sup>20</sup>. La OMS predice un aumento continuo de esta enfermedad en todo el mundo<sup>21</sup>.

Estudios epidemiológicos han mostrado que la incidencia del cáncer oral varía significativamente entre zonas geográficas distintas, y entre países desarrollados y en vías de desarrollo. Aunque el COCE represente menos de 5% de los tumores malignos en los países desarrollados, en India y en el Sudeste de Asia es la neoplasia más frecuente, representando entre un 20 y un 50% de todas ellas<sup>22</sup>.

---

En Estados Unidos (EUA) la predicción en relación al cáncer oral y orofaríngeo es de aproximadamente 30.200 nuevos casos al año (20.200 en varones y 10.000 en mujeres), lo que representa un 3% de todos los cánceres en hombres y un 2% en mujeres, permaneciendo estas estadísticas estables durante años<sup>23</sup>.

En España el COCE supone entre el 3 y el 5% de todos los tumores malignos, con una incidencia que varía entre 12 y 15 casos por 100.000 habitantes/año en los hombres y entre 2 y 4 casos por 100.000 habitantes/año en mujeres<sup>24</sup>. Sin embargo, esta proporción se está modificando en los últimos años, existiendo una tendencia hacia el equilibrio intersexual justificado, en parte, por el mayor consumo de tabaco y alcohol por parte de las mujeres.

Más del 90% de los pacientes con cáncer oral son mayores de 45 años, siendo la edad media de presentación alrededor de los 60 años<sup>25</sup>.

Si excluimos los labios, la lengua es el lugar más frecuentemente afectado (25,1%) seguida, a continuación, por el suelo de la boca (10,2%)<sup>26</sup>.

## Etiología

El COCE tiene una etiología multifactorial con participación de factores intrínsecos al individuo y otros externos.

Entre los factores externos que se han asociado a la aparición del COCE podemos destacar:

- Tabaco: Tanto el hábito de fumar como el uso de otras formas de consumo de tabaco (tabaco de mascar) han sido asociados al cáncer oral<sup>21</sup>. Un fumador de 20 cigarrillos tiene un riesgo 6 veces mayor que un no fumador. Así mismo, el riesgo de desarrollar un segundo cáncer primario se eleva del 6% en los no fumadores al 40% en los que continúan fumando tras el tratamiento. En cuanto a dosis, el efecto del



---

tabaco es dosis-dependiente en relación al tiempo y a la cantidad fumada<sup>27</sup>.

- Alcohol: A nivel local, se describen varios mecanismos de carcinogénesis, como el aumento de permeabilidad por el efecto disolvente del alcohol sobre las membranas lipídicas, facilitando la penetración de carcinógenos a través de la mucosa oral<sup>28</sup>. El acetaldehído, primer metabolito del etanol, ha demostrado en cultivos celulares su capacidad para interferir en la síntesis y reparación del ADN y producir mutaciones puntuales en genes<sup>29</sup>. El etanol parece incrementar la producción bacteriana de acetaldehído de forma dosis dependiente, con una acción carcinógena apreciable a partir del consumo de 40 gramos de etanol al día<sup>30</sup>.
- La combinación alcohol-tabaco tiene un efecto multiplicativo para el cáncer orofaríngeo y está fuertemente asociado al cáncer de suelo de boca y de la lengua. Los sujetos fumadores y no bebedores tienen de 2 a 4 veces menos riesgo de padecer cáncer oral comparado con aquellos que son fumadores y bebedores. El riesgo entre los fumadores, que además son intensamente bebedores, es de 6 a 15 veces mayor que los que eran abstemios<sup>31</sup>.
- Agentes infecciosos: Se ha sugerido que varios tipos de infecciones pueden jugar un papel etiológico potencialmente relevante en el cáncer oral, bien sean bacterianas como la sífilis, micóticas como la candidiasis crónica o víricas como el HPV y el virus de Epstein-Barr.  
Las proteínas del HPV, especialmente las oncoproteínas E6 y E7 de los virus de HPV de alto riesgo, interaccionan, con distinto grado de afinidad, con las células del huésped alterando la diferenciación epitelial normal y la apoptosis mediante la estimulación de la proliferación

---

celular, la síntesis de ADN y la inhibición de los reguladores del ciclo celular. La expresión mantenida de dichas oncoproteínas acaba provocando una inestabilidad genómica con mutaciones que pueden provocar la transformación maligna. La presencia del HPV ha sido demostrada en células epiteliales neoplásicas en lesiones *in situ*, invasivas y en metástasis en ganglios linfáticos, además de su probable integración con la estructura genética de algunos de estos tumores<sup>32</sup>. La prevalencia de la infección por el HPV en las lesiones premalignas y malignas de la cavidad oral varía ampliamente según los diversos estudios, con una prevalencia de hasta un 61,5% en los COCE y de 27,1% en lesiones premalignas<sup>33</sup>. En una revisión sistemática llevada a cabo por Syrjänen y cols.<sup>34</sup> en 2011, se detectó una fuerte asociación entre la presencia del VPH, específicamente el VPH 16 y el COCE, con una *Odds Ratio* (OR) de 3,98 al hacer la comparación con el grupo control.

- Radiaciones: La radiación ionizante puede provocar alteraciones en la cavidad oral de carácter degenerativo como el “nódulo residual de las radiaciones” que puede ser asiento de un cáncer oral. El intervalo entre la radiación y la subsecuente aparición de una neoplasia maligna puede ser muy largo, y se ha informado de la existencia de tumores que aparecen en campos irradiados con latencias de hasta 40 años<sup>35</sup>.
- Nutrición: Los estados de desnutrición favorecen la oncogénesis. Se ha sugerido que una dieta pobre en vitamina A y/o vitamina C se asocia a un riesgo mayor de padecer cáncer oral. Los cromatos, el arsénico, el cadmio y el zinc parecen tener efectos carcinogénicos, mientras que el selenio, el cobre y el níquel parecen tener efectos protectores<sup>36</sup>.

También se ha señalado el posible papel en el cáncer oral, de los carcinógenos de los alimentos o de sustancias relacionadas como:

---

nitrosaminas, hidrocarburos aromáticos, aflatoxinas, etc., o contaminantes como el asbesto.

El licopeno es un carotenoide sin actividad provitamina A, que se encuentra principalmente en el tomate y en menores cantidades en la calabaza, el pomelo rosa, la sandía y otras hortalizas y frutas. En estudios actuales parece evidenciarse una potente acción anticarcinogénica ya que posee propiedades antioxidantes y capacidad de modular cambios displásicos, deteniendo la progresión de lesiones premalignas como la leucoplasia. Singh y cols. en 2003, observaron que la administración de 8 mg diarios de licopeno ha mostrado la posibilidad de modular cambios displásicos y detener la evolución de lesiones premalignas, observando resultados más favorables respecto a pacientes a los que se les administraban 4 mg y a pacientes que recibían placebo. Por otra parte, confirman que la administración de licopeno no muestra efectos adversos ni toxicidad conocida<sup>37</sup>.

- Factores orales: Se ha relacionado al cáncer oral con la presencia de una higiene oral deficiente, prótesis mal ajustadas, y restauraciones o dientes con bordes afilados. La irritación crónica favorece la acción de los carcinógenos orales y por tanto implica un riesgo más alto de desarrollar cáncer. Se ha comprobado que una mala higiene oral y la pérdida de dientes es un marcador de riesgo para el cáncer oral, de tal modo que la pérdida, sin reemplazo, de 11 dientes o más, multiplica por cuatro el riesgo de padecer cáncer oral<sup>38</sup>.
- Factores ocupacionales: Se han asociado determinadas profesiones con un mayor riesgo de desarrollo de cáncer oral, como los albañiles (cemento), trabajadores metalúrgicos (níquel), textiles (amianto, lana y

---

algodón), o personal relacionado con el gas mostaza o con ácido sulfúrico.

## Histología

Histológicamente el COCE se caracteriza por presentar islotes y/o cordones invasivos de células epiteliales malignas similares a las células de la capa espinosa. Las células neoplásicas presentan, en general, citoplasma eosinófilo abundante con núcleos grandes y un aumento de la relación núcleo-citoplasmática. Frecuentemente, se observan grados variados de pleomorfismo celular y nuclear<sup>39</sup>.

Existen distintas variantes en cuanto al grado de diferenciación, que dependen de la similitud que presente el tumor con la arquitectura normal del epitelio<sup>40</sup>.

- Los carcinomas que producen cantidades importantes de queratina y muestran algún signo de maduración desde la capa basal hacia los estratos superficiales, se denominan bien diferenciados.
- Los que no producen queratina, pero en los que es posible reconocer cierto grado de estratificación, a pesar de su desviación de la estructura normal, se denominan moderadamente diferenciados.
- Cuando no producen queratina, su aspecto apenas muestra semejanza con una estructura epitelial y presentan anomalías celulares frecuentes, se denominan pobremente diferenciados.

El grado histológico del tumor se relaciona con su comportamiento biológico. Tumores bien diferenciados suelen presentar un crecimiento más lento y producir metástasis en estadios más tardíos. En contraste, los tumores pobremente diferenciados suelen crecer más rápidamente y producir metástasis en estadios precoces.

---

Una forma especial de COCE es el carcinoma verrugoso, que se caracteriza desde el punto de vista histológico por su amplia base de implantación y por la formación papilar. Suelen observarse criptas profundas que contienen tapones de queratina entre las proyecciones superficiales alargadas. El epitelio es displásico, pero muestra, en raras ocasiones, rasgos displásicos intensos. La membrana basal permanece intacta y a menudo existe un infiltrado de células inflamatorias crónicas en el tejido conjuntivo subyacente. La interfase entre el tumor y el epitelio normal adyacente está generalmente bien definida con invasión mínima, en caso de que exista, de las células epiteliales<sup>41</sup>.

## Modelo de carcinogénesis

### *Modelo de progresión*

Los fundamentos biológicos de los COCE siguen siendo poco conocidos. Al igual que otras neoplasias epiteliales, parecen desarrollarse siguiendo un proceso con múltiples pasos que involucra cambios moleculares sucesivos.

El estudio de las bases genéticas de los COCE de las vías aerodigestivas superiores ha dado lugar a un modelo de carcinogénesis similar al conocido en otros tumores humanos, de los cuales es paradigma el del carcinoma de colon. En su trabajo, Fearon y Vogelstein<sup>42</sup> identificaron sucesos genéticos discretos que ocurren en la progresión del cáncer de colon a partir de pólipos precancerosos.

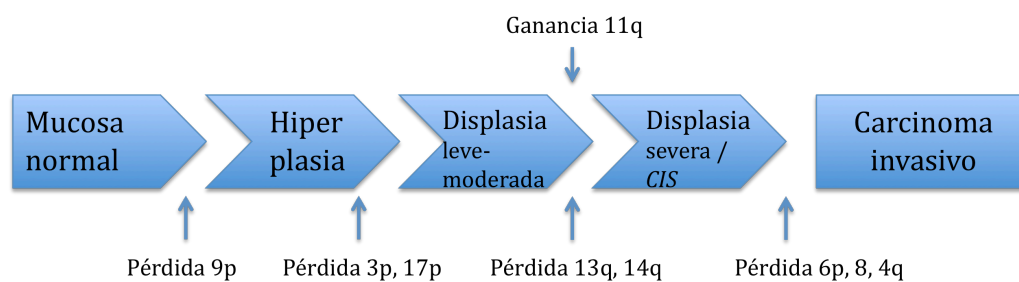
La interacción en el epitelio por factores exógenos (alcohol y tabaco) y endógenos (genes) desencadena el proceso de carcinogénesis, mediante el cual las células normales adquieren, de forma progresiva, las características propias de las células tumorales<sup>43</sup>:

- Proliferación autónoma: en el epitelio normal las células precisan de señales extracelulares para pasar del estado quiescente a la proliferación activa. Alteraciones en las moléculas responsables de la transducción de estas señales de crecimiento pueden activar vías proliferativas.
- Bloqueo de las señales de inhibición de crecimiento: la pérdida de señales inhibitoras del crecimiento mantiene a las células de forma constante en el ciclo de replicación celular.
- Evasión de la muerte celular programada (apoptosis): la apoptosis es un proceso fisiológico, regulado activamente por las propias células de forma que se impide la perpetuación de estirpes celulares con ADN dañado.
- Inmortalización: Las células tumorales adquieren la capacidad para eludir la fase de senescencia, de modo que se replican indefinidamente. En este punto se ha demostrado la implicación de la enzima telomerasa, que extiende la longitud de los telómeros, acortados tras sucesivas divisiones celulares, perpetuando la replicación celular. Mao et al. <sup>44</sup> encontraron sobreexpresión de telomerasa en el 90% de los cánceres invasivos estudiados y en el 100% de las lesiones displásicas.
- Capacidad angiogénica: este proceso por el que el tumor estimula la formación de neovasos sanguíneos para su aporte de nutrientes se compone a su vez de diferentes procesos. Se ha demostrado que la densidad de microvasos es un indicador pronóstico independiente para pacientes con carcinoma de mama, ovario, próstata y

estómago. En el caso de los COCE se ha asociado con mayor incidencia de metástasis cervicales<sup>45</sup>.

- Capacidad de invasión de los tejidos circundantes: Se cree que la proteólisis de la matriz extracelular es un paso crítico para la invasión de tejidos por los tumores<sup>46</sup>.

En los carcinomas de células escamosas de la cabeza y el cuello (CECC) el modelo diseñado por Califano<sup>47</sup> supuso un gran avance pues en él se relacionaba la progresión de los cambios clínico-patológicos (fenotípicos) desde la mucosa normal, pasando por hiperplasia, displasia, carcinoma in situ y cáncer invasivo, con los cambios genéticos (Figura 1).



**Figura 1:** Modelo genético de carcinogénesis en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello.

En su trabajo observaron que al analizar la mucosa aparentemente normal adyacente a lesiones premalignas, algunos de los fenómenos conocidos en las células malignas eran compartidos por estas células morfológicamente benignas. Los fenómenos genéticos posteriores y la evolución de diversos subclones pueden producir alteraciones fenotípicas resultando una variedad de zonas alteradas histopatológicamente en una misma región anatómica. Las principales conclusiones a que llegaron son las siguientes:

- 
- Los genes supresores están implicados en las fases iniciales del proceso.
  - Las alteraciones genéticas del CECC tienden a producirse en orden cronológico y determinan la progresión histopatológica. Así las pérdidas de 9p21 y 3p ya aparecen en la hiperplasia epitelial, incluso antes que las manifestaciones clínicas.
  - Es el sumatorio de alteraciones genéticas y no su orden el que determina la progresión tumoral. Hay alteraciones propias de estadios tardíos como 8p que son, en ocasiones, la única anomalía detectable en lesiones precoces.

### *Cancerización de campo*

El término “cancerización de campo” se ha empleado para describir terrenos de enfermedad precancerosa, con una prevalencia mayor de la esperada de aparición de múltiples tumores primarios o secundarios y la presencia de tumores distantes sincrónicos.

Braakhuis<sup>48</sup>, sobre la base de estudios moleculares de tejidos aparentemente sanos, propone que una exposición continuada a carcinógenos puede causar la transformación maligna independiente de múltiples células epiteliales en distintos lugares. Y en un segundo modelo, estudia las alteraciones moleculares detectadas por pérdida de heterocigosidad (LOH) e inestabilidad de los microsatélites p53 y CDKN2A y establece que los cambios génicos adquiridos en los estadios precoces de la carcinogénesis se muestran en la mayoría de las células tumorales, mientras que los cambios surgidos en estadios posteriores de la evolución tumoral se restringen a determinados subclones celulares<sup>49</sup>.



---

La importancia de la cancerización de campo radica tanto en su frecuencia, como en la influencia negativa sobre el pronóstico que ejerce la aparición de segundos tumores primarios. La frecuencia de segundos tumores en pacientes con CECC oscila entre el 3 % y el 30% de los casos, observándose las tasas más altas de incidencia en pacientes con carcinomas situados en la cavidad oral<sup>50</sup>.

Tras la resección de un COCE hay un alto riesgo de que se desarrolle un nuevo cáncer en la misma región anatómica<sup>51</sup>. En algunos pacientes, este nuevo carcinoma se explica por la recurrencia del tumor inicial, resecado de forma incompleta. Sin embargo, cuando el estudio histopatológico ha demostrado claramente que la resección del carcinoma primario ha sido radical, existe la posibilidad de que el nuevo tumor se desarrolle sobre un campo genéticamente alterado, cuya presencia confiere al paciente un riesgo continuo y elevado de desarrollo de nuevos tumores<sup>52</sup>.

Los campos precancerosos de cavidad oral y orofaringe probablemente tienen su origen en las células progenitoras de la capa basal del epitelio, que son las responsables de su renovación, un proceso que ocurre continuamente en la mucosa oral normal<sup>53</sup>. Mediante análisis de secuenciación y por inmunohistoquímica (IHQ) se ha demostrado que las células progenitoras pueden desarrollar mutaciones del gen p53, con expresión alterada de la proteína codificada por el mismo, que pueden ser transferidas a las células hijas, formando agrupaciones de células portadoras de la alteración genética, denominadas parches (<200 células). La aparición de un parche con mutación de p53 en el epitelio oral presumiblemente es la primera manifestación del COCE<sup>54</sup>. La pérdida del control del ciclo celular mediada por la mutación de p53 confiere una ventaja proliferativa a las células del parche que da lugar a la expansión de una población clonal de células progenitoras ampliando el número de células diana sobre las que pueden actuar nuevos eventos oncogénicos. De

---

esta forma el parche se expande lateralmente transformándose en un campo precanceroso genéticamente alterado que, por definición, no es invasivo y puede extenderse a áreas muy amplias de la cavidad oral<sup>51</sup>.

Esta teoría es congruente con estudios recientes sobre las células madre y su relación con el desarrollo y progresión de los COCE. Se expone la hipótesis del origen del cáncer a partir de células madre inicialmente normales. Estas células, por su capacidad de autorrenovación, tendrían una vida muy larga y mayor oportunidad de acumular mutaciones que precipitarían la carcinogénesis<sup>55</sup>. Las células madre se localizan en nichos del epitelio a nivel de la zona suprabasal, teniendo la capacidad de migrar de un nicho a otro, según las necesidades<sup>56</sup>.

### *Alteraciones genéticas en cáncer*

La carcinogénesis epitelial ha sido dividida en tres fases: iniciación, promoción y progresión. En ellas acontecen alteraciones genéticas que desencadenan cambios anómalos en la diferenciación epitelial y que dan lugar a proliferación celular anormal.

Estas alteraciones deben afectar a diferentes tipos de genes que codifiquen proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular, tales como oncogenes promotores, que desencadenan una proliferación celular descontrolada y genes supresores de tumores, cuya alteración limita su acción inhibidora de la división celular. Además, están también implicados genes reparadores del ADN, involucrados en los procesos de replicación del ADN, y encargados de detener la división celular si detectan errores en la replicación del ADN.

Podemos resumir la historia natural de la carcinogénesis oral en los siguientes pasos:

- Alteración genética en las células de la zona germinativa suprabasal, de forma que la alteración génica inicial se extiende a las generaciones posteriores, sin que haya cambios fenotípicos en la mucosa.
- Persistencia de la exposición a los carcinógenos, con lo que las alteraciones génicas aumentan y se acumulan. En este punto comienza la transformación fenotípica, es decir, aparecen las lesiones precancerosas.
- La progresión de la lesión precancerosa hacia formas más graves o hacia la invasión al sobrepasar la barrera representada por la membrana basal, si los mecanismos de control celular no son capaces de frenarla.

Se estima que se precisan entre 6 y 10 eventos genéticos independientes en una sola célula para el desarrollo de un cáncer en la mucosa de las vías aerodigestivas superiores<sup>57</sup> y el tiempo de latencia entre la exposición a los carcinógenos y la aparición de la invasividad se aproxima a los 25 años.

Las alteraciones genéticas más tempranas aparecen en los cromosomas 9p21 (donde reside el gen p16), 3p (donde hay al menos tres *loci* de genes supresores) y en el cromosoma 17p13 (donde se localiza el gen p53).

## **1. Oncogenes**

Los oncogenes están presentes en la célula normal en forma de proto-oncogenes. Los oncogenes son genes cuyos productos se asocian a la

---

transformación neoplásica a través de la producción de proteínas que regulan el ciclo celular. Según la función de sus productos proteicos, se pueden dividir en: factores de crecimiento, receptores transmembrana, mensajeros citoplasmáticos y factores nucleares de transcripción. Cuando se alteran, la proliferación celular se hace incontrolada. La amplificación genética es uno de los principales mecanismos de activación de los oncogenes.

La amplificación de la región 11q13 (353 genes) es la activación oncogénica más consistentemente descrita en los carcinomas de cabeza y cuello (del 30 al 60 % de los casos)<sup>58</sup>. Recientemente ha sido identificada el núcleo (“core”) de esta amplificación como una región de aproximadamente 1,7 Mb localizada en 11q13.3 que contiene 13 genes amplificados<sup>59</sup>. Varios genes mostraron un aumento de expresión asociada a amplificación, incluyendo Ciclina D1/PRAD1 (CCND1), cortactina (CTTN), TPCN2, FLJ42258, ORAOV1 (TAOS1), FGF19, FADD, PPFIA1. CCND1 y CTTN han sido considerados los mejores candidatos como genes responsables de la amplificación en 11q13 debido a sus características biológicas y también a su frecuente coamplificación y sobreexpresión en varios tumores.

Esta amplificación de 11q13 en los CECC se ha relacionado con enfermedad avanzada, pobre diferenciación histológica y un crecimiento infiltrante, características asociadas a su vez con un peor pronóstico. Los genes CCND1 y CTTN, presentes en la región amplificada 11q13, han sido estudiados como conductores potenciales de la amplificación en varios tipos de tumores. Varios estudios han demostrado la asociación de la amplificación de CTTN con mal pronóstico y progresión tumoral en distintos tipos de cáncer<sup>60, 61</sup>, y Clark et al. demostraron la existencia de asociación entre la amplificación de CTTN, la sobreexpresión de la proteína y el peor pronóstico en CECC<sup>62</sup>. Se ha encontrado asociación entre

---

la sobreexpresión de ciclina D1 y mal pronóstico en CECC, específicamente con recidivas, metástasis linfáticas y pobre supervivencia de los pacientes<sup>63</sup>, si bien esta asociación no pudo ser demostrada cuando se investigaron exclusivamente carcinomas de la cavidad oral<sup>64</sup>.

En los COCE también es habitual observar la amplificación de la región cromosómica 11q13. Los genes TAOS1 (recientemente descubierto) y CTTN se han mostrado como importantes conductores de la amplificación de 11q13 en esta localización<sup>65</sup>.

La región cromosómica 3q26.29, en la que hay 448 genes, ha sido citada como la región cromosómica más frecuentemente amplificada mediante técnicas de hibridación genómica comparativa<sup>66</sup>. Se observa con mayor frecuencia en muestras tumorales con positividad para el HPV que en aquellas negativas<sup>67</sup>. La amplificación de 3q26 en CECC se considera una alteración temprana y se relaciona con un mal pronóstico<sup>68</sup>.

En los CECC la progresión se caracteriza por la amplificación frecuente de los segmentos cromosómicos 3q26.29, 8q23.24 y 11q13, donde podemos encontrar varios genes importantes implicados en la regulación coordinada del citoesqueleto de actina, un paso central en la motilidad celular, la invasividad y el desarrollo de metástasis. Estos eventos génicos se relacionan con una disminución de la supervivencia en los pacientes<sup>69</sup>.

La vía de señalización iniciada por la fosfatidil-inositol-3 quinasa (PI3K), cuyo locus está en 3q26.3, se encuentra también frecuentemente activada en estos carcinomas. Otra molécula de esta vía es la serina treonina quinasa AKT (19q13.2). Se ha hallado amplificación y/o sobreexpresión de alguno de los componentes de esta vía en más de un 50% de los casos.<sup>70</sup>

La amplificación de la región 8q es también muy frecuente en los tumores de cabeza y cuello y ha sido considerada la segunda en frecuencia

---

entre los eventos iniciales en la progresión de estos carcinomas. La más conocida es la subregión 8q23.24, donde hay 273 genes.

## 2. Genes supresores de tumores (GST)

La inactivación de los llamados genes supresores de tumores puede ser también considerada como uno de los eventos iniciales en la carcinogénesis. Estos genes actúan interrumpiendo el ciclo celular o bien induciendo a la célula a sufrir apoptosis, impidiendo por tanto la perpetuación de las mutaciones incompatibles con el funcionamiento normal de la célula. A diferencia de los oncogenes, que pueden ser afectados a través de mutaciones de solamente una de las dos copias de los genes, los genes supresores de tumores son inactivados por mutaciones puntuales, reordenaciones o deleciones en las dos copias de los genes.

Los genes supresores de tumores se dividen en dos grupos. Los llamados *gatekeepers* que controlan las vías de proliferación celular, son reguladores negativos del ciclo celular y los llamados *caretakers* que controlan la precisión del proceso de división celular, están involucrados en la reparación del ADN y en el control de la estabilidad genética. Su inactivación no da lugar a la proliferación celular *per se*, pero permite la adquisición rápida de otras alteraciones genéticas<sup>71</sup>. Se piensa que la inactivación de los GST juega un papel más importante en la carcinogénesis que la activación de los oncogenes.

Las pérdidas genéticas en la región cromosómica 9p21-22 ocurren previamente al desarrollo de la atipia histológica, todavía en el estado de hiperplasia epitelial, y se reconocen como un evento inicial en el desarrollo

---

de los CECC, situando la inactivación del p16 anterior incluso a la inactivación de p53<sup>72</sup>. La inactivación del gen p16INK4a (también llamado CDKN2 o MTS1), que se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 9 (9p21) es la más frecuente en los CECC<sup>73</sup>. Reed et al.<sup>74</sup> encontraron ausencia de expresión de la proteína p16 mediante inmunohistoquímica en el 83% de los casos analizados. La pérdida de la función del p16 facilitaría la activación de dichos complejos ciclina D-CDK4 quinasa y la progresión del ciclo celular.

Actualmente el gen p53 (localizado en 17p13), que se ha encontrado mutado en una amplia variedad de tumores humanos, se considera que juega un papel crucial en la patogénesis de muchos, si no de todos, los cánceres humanos<sup>75</sup>. En condiciones normales p53 funciona como un factor transcripcional y como “control de calidad” del ADN en la fase G1 del ciclo celular, de manera que cuando se detecta una alteración en el ADN celular, aumentan los niveles de p53 y se frena el sistema de replicación celular, dando tiempo a la reparación del ADN, y si ésta no es posible, conduce a la célula a la apoptosis. La inactivación de p53 permite que se acumulen daños en el ADN, que a la larga pueden derivar en transformación maligna<sup>76</sup>.

El gen p53 bloquea también la angiogénesis, relacionada con el grado y el estadio del tumor y el pronóstico del cáncer<sup>77</sup>.

En los carcinomas de cabeza y cuello se halla una función anormal de p53 en al menos el 50% de los casos<sup>78</sup>. Se cree que las anomalías en el gen p53 son un fenómeno de aparición temprana en la carcinogénesis de cabeza y cuello, observándose ya en lesiones displásicas<sup>79</sup>.

También se ha demostrado que la mutación del gen p53 constituye el evento inicial en el desarrollo de una “cancerización de campo” en la mucosa oral<sup>80</sup>.

Aunque en el proceso de carcinogénesis de los tumores de cabeza y cuello se aprecian frecuentemente pérdidas de heterocigosidad (LOH) en el cromosoma 3p los genes localizados en esta región aún no han sido bien definidos. El gen FHIT (tríada de la histidina frágil) ha sido identificado en el cromosoma 3p14 como un posible GST, afectado por deleciones en distintos tumores.



---

## Tratamiento

Actualmente, la cirugía y la radioterapia son las dos modalidades de tratamiento del cáncer oral con potencial curativo, y pueden ser empleadas individualmente o en combinación. El tratamiento del cáncer oral depende principalmente de la localización y del estadio de la lesión. Las lesiones en estadios precoces (I y II) son potencialmente curables con cirugía con o sin radioterapia adyuvante. Las lesiones en estadios avanzados (III y IV) son generalmente tratadas con cirugía seguida de radioterapia. Sin embargo, los resultados de la terapia estándar incluso cuando se emplean la cirugía radical y varias formas de radio y quimioterapia, no han conseguido aumentos notables de la supervivencia en las últimas décadas<sup>81</sup>.

### Cirugía

La resección quirúrgica debe involucrar toda la masa tumoral macroscópica y la presumible extensión microscópica de la enfermedad para ofrecer márgenes quirúrgicos de seguridad oncológica, lo que frecuentemente implica amplias resecciones. Las técnicas quirúrgicas actuales, entre las que destaca la transferencia microquirúrgica de tejidos, permiten la reconstrucción de defectos complejos y extensos con resultados funcionales y estéticos satisfactorios<sup>82</sup>.

La cirugía posee un papel dominante en el manejo de los pacientes con adenopatías cervicales palpables, y el término “vaciamiento” cervical se aplica a este tratamiento, como equivalente al término *neck dissection* de la literatura internacional.

La primera técnica estandarizada fue la disección radical de cuello descrita por Crile en 1906, denominada *disección cervical clásica* y que consiste en

---

la extirpación del tejido celuloganglionar de los niveles I a V, junto con estructuras no ganglionares como la vena yugular interna, el nervio espinal, el músculo esternocleidomastoideo (ECM), el plexo sensitivo cervical y la glándula submaxilar, que queda incluida en el nivel I.

Con el objetivo de disminuir la morbi-mortalidad asociada a este procedimiento, posteriormente se describieron variaciones a la técnica clásica, que Spiro<sup>83</sup> ha clasificado en:

- *Dissección cervical radical modificada tipo I (DCRM-I)*: incluye los niveles ganglionares I a V, al igual que la clásica, pero conserva selectivamente el nervio espinal.
- *Dissección cervical radical modificada tipo II (DCRM-II)*: se extirpan los niveles ganglionares I a V pero se conservan el nervio espinal y el ECM, sacrificando la vena yugular interna junto con el tejido ganglionar.
- *Dissección cervical radical modificada tipo III (DCRM-III) o dissección cervical funcional*: se extirpan los niveles ganglionares I a V, conservando el nervio espinal, el ECM y la vena yugular interna.
- *Dissecciones cervical supraomohioidea y supraomohioidea ampliada*: consiste en la extirpación selectiva de los niveles ganglionares I, II y III. Si a estos niveles se les añade el nivel IV, se denomina dissección cervical supraomohioidea ampliada.
- *Dissección cervical lateral (anterolateral)*: consiste en la extirpación de los niveles ganglionares II, III y IV.

- 
- *Dissección cervical posterolateral*: consiste en la extirpación de los grupos linfáticos de los niveles ganglionares II, III, IV y V, así como los ganglios suboccipitales superficiales y profundos y los retroauriculares.
  - *Dissección cervical radical ampliada*: se denomina así a la extirpación de estructuras vasculares, neurales o musculares que no se incluyen en las dissecciones regladas (ganglios linfáticos retrofaríngeos, ganglios parafaríngeos, adenopatías del mediastino superior o del vértice axilar, o estructuras no ganglionares como pares craneales, arteria carótida, musculatura del triángulo posterior del cuello o de la piel cervical...), junto con la realización de una dissección cervical clásica.

El trabajo de Weiss y cols.<sup>84</sup> establece un umbral del 20% de probabilidad de metástasis como indicación electiva para el tratamiento del cuello en los CECC. Aunque existen argumentos contradictorios con respecto al tratamiento de los COCE clínicamente N0, habitualmente el tratamiento indicado en un COCE N0 es una dissección cervical supraomohioidea. El tratamiento quirúrgico en el caso de pacientes con COCE N+ incluye una dissección radical estándar (DCR) o una dissección radical modificada<sup>85</sup>.

### **Radioterapia**

Es responsabilidad de la Radioterapia (RT), no solo lograr un mayor control de la enfermedad, sino disminuir las secuelas que esta y los tratamientos empleados producen en los pacientes.

El desarrollo de las técnicas de imagen (TC, RM, PET) y de la moderna tecnología de planificación en oncología radioterápica, ha facilitado la delimitación, tanto de los volúmenes macroscópicos como de los

---

volúmenes con riesgo de enfermedad subclínica, permitiendo ir aumentando la dosis administrada en el tumor y controlando o limitando la dosis sobre tejidos sanos.

Las indicaciones de tratamiento con radioterapia, son las siguientes:

- Radioterapia Radical: Muy útil en tumores de base de lengua o laringe, ya que permite la preservación del órgano y una mayor función. La elección del tipo de tratamiento debe ser individual, considerando los resultados de control tumoral, estético y funcional, la preferencia del paciente y su estado general.
- Radioterapia adyuvante: Los pacientes en situación de estadio avanzado (resecable) se beneficiarán de la combinación de tratamiento quirúrgico más radioterapia postoperatoria.

Indicaciones generales de tratamiento adyuvante con radioterapia son:

- Borde quirúrgico próximo o afecto.
  - T3 o T4 con gran invasión local.
  - Lesiones poco diferenciadas o indiferenciadas.
  - Invasión perineural, vascular o linfática.
  - Afectación ósea o de cartílago.
  - Afectación ganglionar múltiple, presencia de una adenopatía metastásica mayor de 1,5 cm o ganglios en diversos niveles.
  - Extensión extracapsular ganglionar con infiltración de partes blandas.
- 
- Radioterapia paliativa: La radioterapia puede constituir un tratamiento sintomático eficaz en pacientes con mal estado general, tumores muy avanzados no candidatos a tratamiento oncológico

---

radical e incluso en recidivas. Está indicada para tratamiento antiálgico, disminución de la disfagia o prevención de hemorragia o ulceración cutánea por el tumor

Se considera que el control de la enfermedad mediante radioterapia es dependiente de la dosis<sup>86</sup>. Con radioterapia externa las dosis máximas toleradas con relación a los órganos críticos oscilan entre los 50 y los 76 Gy con fraccionamiento convencional de 1,8 a 2 Gy/sesión, cinco veces por semana.

### *Quimioterapia*

En la actualidad, el papel de la quimioterapia está establecido en algunas situaciones de tumores localmente avanzados como tratamiento de inducción, administrado de manera concomitante a la radioterapia con finalidad radical o adyuvante y en enfermedad metastásica. Y, también forma parte de los diferentes esquemas de tratamiento de preservación de órgano.

El beneficio de la quimioterapia en el tratamiento de estos tumores se pone de manifiesto en el metaanálisis publicado en el 2000 por Pignon y Bourhis<sup>87</sup> que concluye lo siguiente:

- La administración de quimioterapia complementaria al tratamiento locorregional ofrece un beneficio absoluto en supervivencia del 4% a 2 y 5 años, aunque dicho beneficio varía en función del momento de administración de la misma. La quimioterapia adyuvante no aporta beneficio al tratamiento locorregional. La administración de quimioterapia de inducción no tiene impacto significativo en la

supervivencia, aunque sí cuando se analizan esquemas basados en cisplatino y 5-fluorouracilo; existe un beneficio global en supervivencia a favor del tratamiento de quimiorradioterapia simultánea.

- La quimiorradioterapia concomitante o la quimioterapia seguida de radioterapia, evita cirugías agresivas y mutilantes sin menoscabo de la supervivencia.

Algunos fármacos, como los taxanos y el cisplatino, poseen un efecto radiosensibilizante administrados concomitantemente con la radioterapia, incrementando la actividad de la misma. A su vez, la quimiorradioterapia permite la administración de un tratamiento locorregional eficaz desde el inicio.

En la actualidad, está demostrado el mayor beneficio de la administración simultánea de quimioterapia y radioterapia adyuvante tras la cirugía en tumores localmente avanzados resecables y en tumores irresecables de cabeza y cuello, en términos de respuesta y supervivencia, frente a la radioterapia sola.

El tratamiento postoperatorio de quimioterapia concomitante con la radioterapia está indicada si existen uno o ambos de los considerados “factores adversos mayores” ó dos o más de los “factores adversos menores”. Los factores adversos mayores son: márgenes quirúrgicos afectos y/o invasión ganglionar extracapsular. Los factores adversos menores son: pT3 ó pT4 del primario (excluyendo el T3 N0 laríngeo), afectación ganglionar N2 ó N3, afectación ganglionar en los niveles IV ó V en primario de cavidad oral y orofaríngea, invasión perineural y embolismo vascular.

### *Nuevas alternativas terapéuticas*

Los avances en el conocimiento de la biología molecular del cáncer han permitido desarrollar nuevas estrategias terapéuticas dirigidas contra dianas tumorales específicas, como el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que se encuentra sobreexpresado en más del 90% de los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello y se correlaciona con una menor supervivencia global y supervivencia libre de recurrencia.

- El cetuximab (Erbix) es un anticuerpo monoclonal dirigido contra el dominio extracelular del EGFR, con una gran afinidad y especificidad. En la actualidad, está indicado en combinación con radioterapia, en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello localmente avanzado.
- Otras moléculas en investigación en la actualidad son los inhibidores de la actividad de la tirosín cinasa como gefitinib (Iressa) y erlotinib (Tarceva) y los inhibidores de la angiogénesis como bevacizumab (Avastín)<sup>88</sup>.

### **Pronóstico**

El pronóstico del COCE depende de factores relacionados con el tumor, con el tratamiento y con el paciente.

La tasa de supervivencia a los 5 años es del 80% en estadios iniciales, del 40% en neoplasias con afectación regional, y de menos del 20% en pacientes con metástasis a distancia<sup>89</sup>. De ahí la importancia de la

---

detección precoz de la enfermedad, ya que aumenta significativamente la posibilidad de curación del paciente. En el momento del diagnóstico del cáncer oral, el 36% de los pacientes presentan enfermedad localizada, un 43% presentan enfermedad con afectación regional, un 9% presentan metástasis a distancia, y para el 12% restante el estadio de la enfermedad no se puede identificar<sup>90</sup>.

El tratamiento tiene una gran relevancia en el pronóstico. Histológicamente, la afectación de los bordes de resección posee un fuerte valor predictivo. El grado histológico del COCE también se ha relacionado con la supervivencia, así como también lo han sido la infiltración peri/endoneural y la afectación ósea.

La presencia de metástasis ganglionares es el factor pronóstico más relevante, reduciendo la supervivencia hasta el 50%. El estadio pN es un predictor independiente de la mortalidad pero el significado pronóstico de las micrometástasis y de las células tumorales aisladas no se conoce.

Los pacientes con carcinoma de células escamosas de la cavidad oral y de la orofaringe tienen riesgo de múltiples tumores primarios en la faringe y orofaringe, así como en la región traqueobronquial y esófago. De este modo, el riesgo de una recurrencia o de la aparición de un segundo cáncer se ha estimado en entre un 10 y 40% tras el tratamiento. La lesión primaria es la causa de la mitad de las muertes asociadas al cáncer oral, un cuarto de las muertes se deben a una segunda lesión primaria y el resto se atribuyen a otras enfermedades<sup>91</sup>.



## Trastornos orales potencialmente cancerizables (TOPC)

### Definición

La clasificación actual de la OMS define como lesiones potencialmente cancerizables a aquellas que habiendo sido identificadas inicialmente como lesiones precancerosas se ha podido observar su malignización a lo largo del seguimiento, se ha visto una coexistencia en los márgenes de carcinomas orales de células escamosas, se han detectado alteraciones morfológicas y citológicas similares a las observadas en lesiones epiteliales malignas, pero sin haber invadido el tejido conectivo y se han podido identificar algunas de las alteraciones cromosómicas, genómicas y moleculares encontradas en carcinomas orales claramente invasivos<sup>92</sup>. En la tabla 1 se citan las lesiones catalogadas como potencialmente malignizables:

---

### TRASTORNOS ORALES POTENCIALMENTE CANCERIZABLES

---

Leucoplasia

Eritroplasia

Lesiones palatinas en en hábito de fumar invertido

Fibrosis oral submucosa

Queratosis actínica

Liquen plano

Lupus eritematoso discoide

Enfermedades hereditarias: disqueratosis conténita, epidermolisis bullosa

---

**Tabla 1:** Trastornos orales potencialmente cancerizables.

De los trastornos referidos, solo nos ocuparemos de las leucoplasias, por ser ellas las estudiadas aquí. El término *leucoplasia* fue propuesto en 1877 por Ernst Schimmer a partir de las palabras griegas “leuco”, blanco, y “plakos”, placa. Tras múltiples redefiniciones, en 2005, la OMS propuso la siguiente definición: “placas blancas con riesgo de malignización cuestionable habiendo excluido otras enfermedades o alteraciones conocidas que no conlleven un riesgo aumentado de cáncer”<sup>92</sup>.

La prevalencia mundial estimada de leucoplasia oral es de 1,72% a 2,60%. Los datos de prevalencia varían según el sexo, la edad, la raza y el área geográfica de residencia, lo que se atribuye fundamentalmente a los diferentes hábitos<sup>93</sup>. Se estima que menos del 1% de los hombres afectados son menores de 30 años y que la prevalencia aumenta al 8% en hombres mayores de 70 años y al 2% en mujeres de la misma edad<sup>94</sup>. En los países desarrollados la leucoplasia afecta a individuos entre la cuarta y séptima décadas de la vida, mientras que en los países en vías de desarrollo la aparición se anticipa de 5 a 10 años<sup>50</sup>.

En cuanto a su etiología la mayoría de los informes coinciden en que el tabaquismo y el abuso del alcohol, y especialmente una combinación de estos dos factores perjudiciales, son los principales factores de riesgo reconocidos, existiendo informaciones contradictorias sobre el papel de la polución ambiental, la alimentación, la enfermedad por reflujo gastroesofágico, y de la infección por HPV<sup>50</sup>. Syrjänen y cols.<sup>34</sup> detectaron una fuerte asociación entre la presencia del HPV, especialmente HPV 16, y la existencia de lesiones potencialmente malignizables como el liquen plano oral, la leucoplasia y la displasia epitelial.

El término leucoplasia describe el aspecto clínico de la lesión no teniendo ningún tipo de sustrato histológico. En este sentido, las

---

alteraciones del epitelio varían desde reacciones fisiológicas normales hasta cambios benignos, premalignos y malignos. Las alteraciones epiteliales más comunes son un aumento de espesor de la capa de queratina (hiperortoqueratosis o hiperparaqueratosis) y un aumento de espesor del estrato espinoso (acantosis) ó atrofia. Por otro lado, puede existir o no displasia epitelial. La hiperqueratosis moderada y la hiperplasia epitelial no displásica son los hallazgos histológicos más frecuentemente descritos en la leucoplasia<sup>95</sup>.

Se han descrito diversos factores asociados con un riesgo aumentado de transformación maligna, considerándose principalmente la presencia de displasia epitelial, normalmente correlacionada con un subtipo no-homogéneo (eritro-leucoplasia). Otros factores a considerar serían el sexo femenino, leucoplasia de larga duración, leucoplasia en no-fumadores, localización en la lengua y/ó en el suelo de la boca y tamaño mayor de 200 mm<sup>2</sup> <sup>96, 97</sup>. Holsmstrump y cols.<sup>98</sup>, tras el análisis retrospectivo de 254 leucoplasias, observaron que las variables que influyeron en la malignización de las lesiones fueron el tipo clínico de leucoplasia (las no homogéneas presentaron una OR=7 comparadas con las homogéneas) y el tamaño de la lesión (las lesiones con un tamaño superior a 200 mm<sup>2</sup> mostraron una probabilidad 5,4 veces mayor de malignizarse que las de tamaño inferior). Otras variables como el grado de displasia inicial, la localización, el hábito tabáquico y el tratamiento o no con cirugía no mostraron significación estadística.

Entre un 16 y un 62% de los COCE se han asociado a la presencia de leucoplasia oral en el momento del diagnóstico, por lo que se trata de una entidad estrechamente asociada al cáncer de cabeza y cuello<sup>99</sup>. Se ha sugerido que los COCE que emergen de lesiones pre-existentes se comportan menos agresivamente que aquellas en las que el tumor aparece

---

de novo<sup>100</sup>. Asimismo, se ha podido observar como pacientes diagnosticados de COCE con leucoplasias concomitantes presentaban estadios tumorales menos avanzados que aquellos en los que sólo existían COCE.<sup>101</sup> La leucoplasia puede preceder a la aparición del cáncer en meses ó años y, obviamente, pueden simultanear su presencia.

Holmstrup y cols.<sup>98</sup> describen cifras de malignización de hasta un 14% en leucoplasias con un grado inicial de displasia leve. En la revisión sistemática llevada a cabo por Petti y cols.<sup>93</sup> se calculó una tasa de transformación global de un 1,36% por año.

Con respecto a su tratamiento, El principal objetivo del tratamiento de las leucoplasias es la prevención de su transformación maligna y, secundariamente, lograr la resolución clínica. El primer paso consiste en la eliminación de factores etiológicos evidentes. En el caso de que no haya una evidente respuesta se proponen diferentes tratamientos como retinoides, antimicóticos, escisión quirúrgica, criocirugía o tratamiento con láser, no existiendo actualmente consenso en cuanto a cuál de todos ellos es el más apropiado. Hasta la fecha ningún tratamiento ha demostrado efectividad a la hora de prevenir la transformación maligna de la leucoplasia o de evitar su recidiva<sup>102</sup>.

Dado el alto riesgo de recurrencia y de desarrollo de cáncer de cabeza y cuello a distancia del foco leucoplásico primario, estos pacientes deben ser seguidos durante el resto de su vida a intervalos regulares que pueden variar de entre 3 a 12 meses<sup>103</sup>.

## Clasificaciones: valor pronóstico

Las leucoplasias orales pueden ser homogéneas (predominantemente blancas, planas, de superficie fina) y no homogéneas (patrón blanco y/o rojizo (eritroleucoplasia) irregular con superficie nodular o exofítica). Se cree que las leucoplásias homogéneas tienen un bajo riesgo de transformación maligna, la eritroleucoplasia un riesgo intermedio y las lesiones eritroplásicas puras el mayor riesgo de desarrollar un carcinoma, aunque ninguna tan elevado como la leucoplasia verrugosa proliferativa<sup>104</sup>. Sin embargo ninguna de estas imágenes puede ser utilizada como un indicador de los cambios en el epitelio, y el análisis histopatológico de las mismas es obligatorio para tratar de determinar su potencial evolutivo.

Si bien la clasificación de la OMS<sup>105</sup> reconoce 5 estadios histopatológicos en los TOPC, la clasificación de Ljubljana<sup>106</sup>, que seguiremos en este estudio, agrupa displasia grave y carcinoma in situ como equivalentes:

- *Hiperplasia escamosa*: suele acontecer en el estrato espinoso (acantosis) y/ó en el estrato basal/parabasal (hiperplasia de las células basales). La arquitectura muestra una estratificación normal sin la existencia de atipia celular
- *Displasia leve*: en general la alteración arquitectural y la atipia celular quedan limitados al tercio inferior del epitelio.

- *Displasia moderada*: la alteración arquitectural se extiende hasta el tercio medio, no obstante el grado de atipia celular podría requerir la necesidad de encuadrar la lesión en un grado superior de displasia.
- *Displasia grave*: la aberración arquitectural a la par que la atipia celular afectan a más de dos tercios del epitelio - *Carcinoma in situ*: alteración arquitectural casi completa del epitelio en conjunción con atipia celular muy pronunciada. Con frecuencia se observan mitosis atípicas y anormalmente superficiales<sup>92</sup>.

Esta clasificación supuso un considerable avance al relacionar el grado de alteración estructural epitelial con el riesgo de transformación maligna.

Arquitectura	Citología
Estratificación irregular del epitelio	Variación anormal del tamaño nuclear (anisocariosis)
Pérdida de polaridad de las células basales	Variación anormal de la forma nuclear (pleomorfismo nuclear)
Crestas interpapilares delgadas y alargadas	Variación anómala del tamaño celular (anisocitosis)
Aumento del número de figuras de mitosis	Variación anormal del tamaño celular (pleomorfismo celular)
Mitosis en las capas superficiales	Aumento de la proporción núcleo/citoplasma
Queratinización individual (disqueratosis)	Aumento del tamaño nuclear
Globos córneos en las crestas interpapilares	Figuras de mitosis atípicas
	Aumento del tamaño y número de los nucléolos
	Hipercromasía

**Tabla 2:** Criterios usados para el diagnóstico de displasia. Warnakulasuriya 2008<sup>92</sup>.

Sin embargo, es preciso indicar que no existe una correlación individual directa entre el grado de displasia y el desarrollo del cáncer

invasivo. Así pues, se observa que las leucoplasias homogéneas y las que muestran una histopatología de displasia leve, pueden evolucionar a neoplasias infiltrantes<sup>107</sup>, e incluso lesiones con aspecto clínico-histológico de normalidad pueden presentar alteraciones cromosómicas y moleculares precoces<sup>108</sup>. Así pues, el diagnóstico histopatológico de displasia, en sus diferentes grados, no ha demostrado ser un marcador pronóstico fiable de evolución a malignidad.

Otro factor a tener en cuenta es la variabilidad inter e intra-observador existente en el diagnóstico del grado de displasia epitelial<sup>104</sup> (Tabla 3).

<b>Autor (año)</b>	<b>Sistema de clasificación</b>	<b>% de acuerdo interobservador (Kappa)</b>	<b>% de acuerdo intraobservador (Kappa)</b>
Kujan (2006)	5 grados OMS	K 0.50	
Karabulut (1995)	5 grados OMS	K 0.27-0.45	
Abbey (1995)	4 grados OMS	50.5%	50.8%
	Displasia vs no displasia	81%	80.3%
Fischer (2004)	5 grados OMS	K 0.59	
Brothwell (2003)	5 grados OMS	K 0.51	

**Tabla 3:** Variabilidad intra e interobservador en el diagnóstico de displasia. (Adaptado de Eversole 2009)<sup>109</sup>.

Por ello, la información aportada por la histopatología no es suficiente para anticipar la evolución de una displasia oral. En consecuencia, es

preciso encontrar métodos complementarios al diagnóstico histológico de los TOPC que aporten más información pronóstica.



## Marcadores moleculares en displasias orales

Diversas moléculas vinculadas con el proceso de carcinogénesis pueden ser útiles como marcadores de progresión de los TOPC y, potencialmente, como marcadores pronósticos de las lesiones malignas desarrolladas a partir de aquellos. Estos marcadores moleculares pueden agruparse en<sup>110</sup>:

- *Marcadores de crecimiento tumoral:*

El papel de las proteínas reguladoras del ciclo celular como p16, p21, p27, p53 o ciclina D1 ha sido extensamente estudiado en distintos trabajos en las últimas dos décadas<sup>72-78</sup>. Pese a ello, ninguno ha sido considerado un marcador de riesgo útil hasta la fecha. El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) ha sido inversamente asociado con el grado de diferenciación<sup>111</sup>.

- *Marcadores de supresión tumoral y de respuesta antitumoral:*

La expresión de la proteína FHIT ha sido estudiada recientemente en CECC y lesiones premalignas, observándose una disminución de su expresión en el 42% de los tumores y en el 23% de las lesiones premalignas<sup>107</sup>. Los resultados de este estudio indican que las alteraciones de FHIT pueden jugar un papel importante en los eventos iniciales de la carcinogénesis<sup>112</sup>.

- *Marcadores de angiogénesis:*

La angiogénesis es un requisito necesario para el crecimiento neoplásico. En los carcinomas de cabeza y cuello se ha hallado

---

frecuentemente una sobreexpresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el cual se induce en condiciones de hipoxia y estimula la angiogénesis, favoreciendo el crecimiento tumoral y la aparición de metástasis<sup>113</sup>.

- *Marcadores de invasión tumoral y de potencial metastatizante:* Las metaloproteasas de la matriz extracelular (MMPs) son metaloenzimas de zinc cuya expresión se ha puesto de manifiesto en el carcinoma de células escamosas oral y se relaciona con el estadio del tumor<sup>114</sup>.

Entre las integrinas la  $\alpha\beta_6$  se expresa en el carcinoma de células escamosas de la cavidad oral<sup>115</sup>.

- *Marcadores celulares de superficie:*

Diversas moléculas de adhesión muestran una expresión reducida en los carcinomas de cabeza y cuello. Entre ellas, se hallan el complejo E-cadherina-cateninas y las CD44<sup>116</sup>. La sobreexpresión de CD44 podría formar parte de los múltiples mecanismos que contribuyen al desarrollo y evolución de las lesiones preneoplásicas en los CECC y podría, por tanto, ser un predictor de riesgo de transformación maligna válido<sup>117</sup>.

La E-cadherina es una molécula clave en el mantenimiento de la adhesión intercelular y participa también en la mediación de los mecanismos de transducción de señales que controlan la polaridad, diferenciación, crecimiento y migración celular<sup>118</sup>. La infrarregulación de la adhesión celular mediada por la cadherina-E ha sido asociada con la progresión tumoral en diversos cánceres y en la cavidad oral se ha demostrado su asociación con mayor agresividad histológica<sup>119</sup>.

---

Por otra parte, la quinasa de adhesión focal (FAK), que transmite al núcleo las señales procedentes de las integrinas también se encuentra sobreexpresada en estos carcinomas<sup>120</sup>.

- *Marcadores intracelulares*

Las citoqueratinas son estructuras proteicas de las células epiteliales. La malignización de los TOPM se asocia con la pérdida de expresión de las citoqueratinas. Se ha visto que la expresión de CK19 en la capa celular suprabasal de la mucosa oral puede utilizarse como marcador diagnóstico de lesiones precancerosas orales<sup>121</sup>.

- *Marcadores derivados del ácido araquidónico y marcadores enzimáticos*

Los metabolitos de la lipooxigenasa, incluyendo la prostaglandina E2, el ácido hidroxieicosatetraenoico y el leucotrieno B4, se encuentran incrementados en el COCE. Sin embargo, no se ha profundizado en el estudio del papel que desempeñan en la potencialidad de malignización<sup>122</sup>.

La glutatión S-transferasa (GST) es un isoenzima que actúa en la segunda fase del metabolismo celular y desarrolla un papel importante de protección celular frente a agentes citotóxicos y carcinogénicos. Se ha demostrado que existe una sobreexpresión de GST<sup>-1</sup> en lesiones orales precancerosas y durante la carcinogénesis oral experimental. Por tanto, puede emplearse como marcador tumoral de TOPC<sup>123</sup>.

---

## Selección de marcadores

### *FAK*

La sobreexpresión de la quinasa de adhesión focal (FAK) ha sido documentada en los CECC<sup>124</sup>, aunque no siempre se corresponde con una amplificación del gen *FAK*. Ocurre como evento en las primeras fases de la transformación maligna en los CCE, asociándose a un aumento de la invasividad y el potencial metastásico de estos tumores. Se ha probado a su vez como diana molecular en algunos estudios con terapias biológicas<sup>125</sup>.

La amplificación de *FAK* en los CCE se ha asociado frecuentemente con ganancias en otros 2 genes de la misma región 8q24, *PTP4a3* y *KHDRBs3*<sup>120</sup>, que se han encontrado co-amplificados con él en muchos casos. Sin embargo otro oncogén, *C-MYC*, uno de los más conocidos y estudiados en distintos tipos de tumores, se acompaña del aumento en el número de copias de *FAK* sólo en un 30% casos<sup>120</sup>.

La amplificación de la región 8q23-24 ha sido definida como un importante evento inicial en la carcinogénesis en los CECC.<sup>126</sup> El gen *FAK/PKT2* es uno de los más importantes de dicha región y codifica la proteína FAK o quinasa de adhesión focal que actúa como un transductor de señales hacia el núcleo, desde las integrinas<sup>127</sup>. La pérdida de adhesión entre las células epiteliales y la matriz extracelular es una de las vías fundamentales que utilizan las células tumorales para favorecer la migración, invasión y metástasis<sup>126,127</sup>. La quinasa de adhesión focal participa en el control de las interacciones entre las células y la matriz que posibilita la estabilidad de los tejidos<sup>120</sup>.

---

Hay evidencias que sugieren que la FAK es una “llave” en las vías de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)<sup>128</sup>. La identificación de la mayoría de los procesos biológicos regulados por FAK se ha hecho en células no neoplásicas, donde se ha documentado bien como la activación de FAK contribuye a la regulación de las integrinas y las señales del factor de crecimiento que promueven la adhesión celular, la independencia del anclaje, la motilidad celular y la apoptosis<sup>129</sup>.

La inmunotinción de FAK se demostró en CECC en la mucosa normal, de forma débil y confinada a la capa basal del epitelio, con un patrón de expresión citoplasmático. Se ha observado tinción positiva en células del endotelio vascular y en células acinares de las glándulas seromucosas, no detectándose expresión legible en el estroma<sup>130</sup>.

Hoy en día ha quedado claro que FAK ejerce muchos de sus efectos en la motilidad a través de la asociación quinasa-independiente con multitud de señales y proteínas efectoras<sup>131</sup>. Entre ellas está la capacidad de FAK para influenciar la activación de Cdc42, Rac y Rho, ayudando a regular el citoesqueleto de actina durante el movimiento celular<sup>131, 132</sup>.

### *Cortactina*

El citoesqueleto de actina es una red dinámica de polímeros de actina y una gran variedad de proteínas asociadas. Sus principales funciones fisiológicas están relacionadas con la motilidad celular y los cambios de forma de la célula durante el ciclo celular. También participa en la adhesión, la fagocitosis, la citoquinesis, el movimiento de las partículas intracelulares en el citoplasma y la organización de los receptores transmembrana<sup>133,134</sup>. Hoy en día se sabe que las proteínas involucradas

---

en las vías de señalización de tirosin-quinasa y la familia de Rho GTPasas juegan un importante papel cooperando en la regulación del citoesqueleto de actina<sup>133</sup>. Las moléculas que intervienen en estas vías, como la cortactina (codificada por el gen *CTTN*), participan en la integración y mediación de las respuestas celulares<sup>134</sup>.

La cortactina está relacionada con la organización del citoesqueleto y las estructuras de adhesión celular, cuyo gen codificante (*CTTN*) se encuentra en el mismo cromosoma que la ciclina D1, 11q13<sup>140</sup>. Como ya se ha comentado, este gen se encuentra sobreexpresado en un 31% de tumores de cabeza y cuello, y se relaciona con un fenotipo de alta malignidad<sup>58</sup>.

La cortactina es una proteína de unión a la actina relacionada según se ha visto con vías de señalización de tirosin-quinasa y Rho GTPasas que desembocan en cambios estructurales en el citoesqueleto que a su vez pueden dar lugar a alteraciones en la morfología celular. Así pues, estos estudios<sup>135</sup> determinan que juega un importante papel en la integración y mediación de vías de señalización basadas en la fosforilación de tirosina que regulan la red de filamentos de actina, la organización de los receptores transmembrana y las dinámicas en la membrana. Se cree que la fosforilación de cortactina es promovida directamente por la proteína Src, si bien el mecanismo exacto no ha sido totalmente demostrado hasta la fecha<sup>135</sup>.

Algunas células malignas, durante el fenómeno invasivo, exhiben prolongaciones o pseudópodos, estructuras ricas en actina asociadas a la degradación de la matriz extracelular, que colectivamente ayudan en la motilidad celular. Se ha descrito el papel de la cortactina como promotor de la secreción de metaloproteasas (MMPs) necesarias para la degradación

---

de la matriz en el proceso de formación de estas estructuras y también la posible implicación de la misma en la formación de pseudópodos o podosomas<sup>135</sup> Ello puede ofrecer una explicación a la asociación entre la sobreexpresión de cortactina y el peor pronóstico en CECC y otros tipos de carcinomas.

Van Rossum y cols.<sup>136</sup>, describen la función de la cortactina como estabilizador de las redes de filamentos de actina al promover mediante la activación del complejo Arp2/3 (proteína relacionada con la actina 2/3) la polimerización de dichos filamentos. Se encarga así de la regulación de las adhesiones intercelulares, proceso importante en los fenómenos de motilidad celular, así como la fosforilación de cortactina a través de Src<sup>136</sup>. La adhesión celular a la matriz extracelular está mediada por integrinas, que agrupan filamentos de actina, proteínas de unión a la actina y proteínas de señalización, promoviendo de esta manera la formación de adhesiones focales.<sup>137</sup> Las uniones célula-célula están mediadas por cadherinas y se acompañan de una profunda remodelación del citoesqueleto de actina. El complejo Arp 2/3 está implicado en la formación de contactos de adhesión basados en E-cadherina.<sup>138</sup> Tomados en conjunto, estos datos sugieren que la activación de Arp 2/3 y la estabilización de la red de actina es una función celular propia de la cortactina, aunque no exclusiva de ella, y su actividad está directamente relacionada con la motilidad basada en los filamentos de actina, así como indirectamente a través de la interacción de proteínas de unión a SH3 que regulan de forma dinámica la organización de proteínas transmembrana<sup>138</sup>. El incremento de los niveles de cortactina, demostrado en diversos trabajos y en diferentes tipos de cánceres, aumenta la adhesión de las células tumorales, la migración celular y facilita el fenómeno de invasividad.<sup>139</sup>

---

La amplificación de la región cromosómica 11q13 se ha descrito en varios tipos de carcinomas humanos, incluyendo los de cabeza y cuello, mama, pulmón, esófago, ovario y vejiga.<sup>140</sup> Esta alteración genética es una de las que con mayor frecuencia se observan en CECC (20-52%), encontrándose correlación con el crecimiento agresivo tumoral, la presencia de metástasis linfáticas y un peor pronóstico<sup>126</sup>. Rodrigo y cols.<sup>58,141</sup> investigaron el papel de *CCND1* y *CTTN* como genes “conductores” de la amplificación en 11q13, demostrando la asociación entre la amplificación de *CTTN* con un peor pronóstico y disminución de la supervivencia en pacientes con CECC, sugiriendo que la amplificación de este gen, contribuye directamente a la agresividad tumoral. Líneas celulares aisladas de pacientes con amplificación de la región 11q13 muestran un incremento de los niveles de mRNA y de la proteína correspondiente, evidenciándose que la sobreexpresión de cortactina juega un importante papel en los tumores con amplificación de 11q13<sup>58</sup>.

La amplificación de los genes *TAOS1* y *CTTN*, ambos localizados en 11q13, ha sido analizada en muestras de lesiones premalignas orales (leucoplasias) y carcinomas de células escamosas orales, concluyendo que pueden ser un evento inicial en la carcinogénesis oral<sup>65</sup>. Los resultados de este estudio muestran la existencia de una asociación entre la amplificación de estos genes y el incremento de las metástasis linfáticas, una pobre diferenciación histológica y un estadio clínico avanzado<sup>63</sup>.

En un estudio reciente<sup>142</sup>, se demostró que el estado de expresión de la proteína constituye un factor pronóstico independiente para el riesgo de recurrencia local, supervivencia total y libre de enfermedad. También se observó que un subgrupo de pacientes en los que se sobreexpresaba cortactina y tenían bajos niveles de EGFR, presentaban cifras de supervivencia comparables a los que tenían un incremento en la expresión



---

de ambas: EGFR y cortactina. Estos hallazgos identifican a la cortactina como un marcador pronóstico relevante e incluso como una posible diana molecular en el desarrollo de nuevos agentes antitumorales. De todos los genes localizados en el amplicón 11q13, la expresión de cortactina ha demostrado ser el mejor predictor de baja supervivencia en estadios avanzados de CECC<sup>143</sup>.

### **Podoplanina**

La Podoplanina es una pequeña glicoproteína transmembrana tipo mucinosa importante en la linfangiogénesis y que se expresa en humanos en condiciones normales en los podocitos, músculo esquelético, placenta, pulmón, corazón, mama y glándulas salivares<sup>144</sup>. Ocasionalmente la expresión focal de podoplanina se puede apreciar en áreas circunscritas de la capa basal de la epidermis<sup>145</sup>. Dado que la podoplanina se expresa en los vasos linfáticos pero no en el endotelio vascular, ha sido usada con frecuencia como marcador específico para las células del endotelio linfático y la linfangiogénesis<sup>146</sup>. Se ha observado como la deficiencia de podoplanina dificulta la normal formación de vasos linfáticos y causa linfedema en modelos animales donde se elimina su expresión<sup>147</sup>. También es capaz de inducir la agregación plaquetaria *in vitro*<sup>148</sup>.

La expresión de podoplanina se ve aumentada en gran variedad de cánceres entre los que se encuentran los carcinomas de células escamosas de la cavidad oral, esófago, pulmón, cervix y piel, así como en disgerminomas ováricos, mesoteliomas y ciertos tumores del SNC<sup>149, 150</sup>. Su expresión en los CECC es generalmente heterogénea y con dos patrones básicos: expresión difusa en muchas células tumorales y expresión focal en la periferia proliferativa de los nidos celulares sin expresarse en las áreas centrales<sup>149</sup>.

El factor de crecimiento epidérmico, el factor básico de crecimiento fibroblástico (FGF2) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  estimulan la expresión de podoplanina en células tumorales de mama, y la bradicinina hace lo propio en fibroblastos 3T3<sup>150</sup>. La expresión de podoplanina también se ha encontrado aumentada en el proceso de regeneración epidérmica, y se especula con el hecho de que la podoplanina forme parte de una vía que regule la migración celular en el contexto de la reparación tisular y que esa misma vía sea utilizada por las células cancerígenas durante la invasión tumoral, confiriéndoles ventajas selectivas frente a las otras células epiteliales<sup>150</sup>.

Durante la llamada transición epitelio-mesenquimal las células pierden marcadores epiteliales, como la E-cadherina y expresan marcadores mesenquimales, como N-cadherina y vimentina. La formación de grandes nidos celulares en el tejido circundante, llamada habitualmente migración celular colectiva, es menos conocida. Recientes estudios experimentales han demostrado que la podoplanina es mediadora en vías que posibilitan este tipo de migración celular colectiva y la invasión *in vivo* e *in vitro*<sup>151</sup>.

La invasión tumoral ocasionada por células que expresan podoplanina parece estar también en relación con la actividad de las metaloproteasas de la matriz (MMPs) y puede ser reprimida por TIMP2, un inhibidor de MMP<sup>150,151</sup>.

La sobreexpresión de podoplanina se ha identificado como marcador de progresión hacia malignidad y peor pronóstico en cáncer oral, siendo considerado predictor de riesgo de metástasis linfáticas regionales y de una disminución de la supervivencia<sup>129</sup>.

Kawaguchi y cols<sup>152</sup> en su estudio en lesiones precancerosas orales demuestran que la podoplanina, en conjunción con el análisis histopatológico, puede servir como un valioso biomarcador para predecir el riesgo de desarrollar un cáncer en los pacientes con TOPC. En las lesiones precancerosas orales la podoplanina se expresaba en la membrana celular, predominantemente en el estrato basal, aunque en ciertas muestras se extendía a la capa suprabasal, en forma de uno o múltiples nidos. La expresión se incrementa conforme aumenta la gravedad de la displasia histológica. Podoplanina ha sido considerada en este estudio<sup>152</sup> el único factor pronóstico independiente para el desarrollo de un cáncer oral en el análisis multivariante, lo que sugiere que nos podría dar más información que el examen histopatológico convencional.



# 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



## HIPÓTESIS

El desarrollo de un carcinoma oral de células escamosas (COCE) conlleva diferentes alteraciones secuenciales en los mecanismos de regulación celular, cuyo resultado es una proliferación incontrolada. Conocer las alteraciones en las moléculas que intervienen en el control del ciclo celular contribuye a comprender la patogenia de esta enfermedad y a su vez a realizar un diagnóstico más precoz, a llevar a cabo una orientación pronóstica con mayor exactitud y a un abordaje terapéutico más adecuado. El COCE presenta un comportamiento biológico diferente dependiendo de factores como la localización, el tipo histológico, el estadio clínico y la susceptibilidad individual de cada paciente.

La hipótesis que sustenta el presente estudio considera que los cambios moleculares son más precoces que los cambios histológicos y están fuertemente relacionados con la evolución y el pronóstico de las lesiones orales. Por ello, el análisis inmunohistoquímico puede aportar una información superior sobre la evolución y el pronóstico, tanto en lesiones premalignas como en carcinomas infiltrantes, que el estadiaje clásico y el análisis histológico.





## OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es investigar el papel de la cortactina, la quinasa de adhesión focal (FAK) y la podoplanina en la carcinogénesis y progresión de los COCE, así como averiguar si el estudio de su expresión es útil como indicador de riesgo de progresión a malignidad en TOPC y/o para establecer un pronóstico evolutivo en los COCE.

Para ello nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la expresión de FAK, cortactina y podoplanina en las lesiones de la mucosa oral potencialmente cancerizables (TOPC).
2. Evaluar la potencial asociación entre la inmunoexpresión de FAK, cortactina y podoplanina y la transformación cancerosa de los TOPC.
3. Estudiar la expresión de FAK, cortactina y podoplanina en los COCE.
4. Analizar la posible asociación entre la expresión de FAK, cortactina y podoplanina y las variables clinicopatológicas relevantes.
5. Evaluar el valor pronóstico de la expresión de FAK, cortactina y podoplanina en los COCE.



## 4. PACIENTES Y MÉTODO



## PACIENTES Y MÉTODO

### Selección de pacientes:

Se han seleccionado dos cohortes: (I) una constituida por pacientes diagnosticados de trastornos orales potencialmente cancerizables y (II) otra formada por pacientes tratados de carcinomas de células escamosas de la cavidad oral.

### TRASTORNOS ORALES POTENCIALMENTE CANCERIZABLES

Se seleccionaron pacientes diagnosticados de TOPC en el Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) entre los años 2000 y 2007 que cumplieran los siguientes criterios de inclusión:

- Lesiones orales con características clínicas de leucoplasia o eritroplasia.
- Sometidas a estudio histológico (hiperplasia, displasia, carcinoma *in situ*)
- Sin antecedentes de carcinomas de células escamosas en la cabeza y el cuello.
- Tratamiento de la lesión mediante escisión o destrucción completa con láser de CO<sub>2</sub>.

Los pacientes fueron seguidos cada 2 meses durante los primeros 6 meses después de completar el tratamiento, cada 3 meses hasta el segundo año, y cada 6 meses posteriormente, hasta el fin del estudio.

El seguimiento mínimo fue de 5 años en el caso de pacientes en los que no hubo progresión a malignidad, o hasta que esta se produjo, en el resto de los casos. Los pacientes en los que se observó progresión a malignidad en menos de 6 meses desde el diagnóstico del TOPC, fueron excluidos del análisis.

En los casos de pacientes con múltiples biopsias se seleccionó la primera, según orden cronológico, en la que se presentó displasia.

Para la evaluación de FAK y CNNT se incluyeron 64 pacientes en el estudio, y para la evaluación de podoplanina 58 pacientes.

## CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS

Se consideraron pacientes diagnosticados de carcinoma de células escamosas de la cavidad oral, en el Hospital Universitario Central de Asturias, entre los años 1996 y 2006, que no tuviesen antecedentes de carcinomas en el área de la cabeza y el cuello, y que hubiesen sido intervenidos quirúrgicamente con intención curativa.

Se excluyeron del presente estudio los pacientes:

- En cuyo historial clínico faltasen datos relevantes.
- Sin material histológico archivado suficiente para su estudio.
- Aquellos aquejados de carcinomas labiales.

- Los que no se sometieron a disección cervical, bien por contraindicación para la anestesia general o bien por ser tratados mediante técnica del ganglio centinela.
- Los que recibieron quimio o radioterapia preoperatoria en el territorio de la cabeza o el cuello.

El seguimiento mínimo fue de 5 años tras el tratamiento. Los pacientes fueron seguidos cada 2 meses durante los primeros 6 meses después de completar el tratamiento, cada 3 meses hasta el segundo año, y cada 6 meses posteriormente.

## Variables analizadas

Se recogieron de la historia clínica de todos los pacientes las siguientes variables:

- Demográficas:
  - Sexo
  - Edad en el momento del diagnóstico
- Factores de riesgo
  - Tabaco, se registró el consumo de tabaco en unidades de cigarrillos diarios y los años de hábito. Se consideró exfumadores a los pacientes con más de dos años de abandono del hábito tabáquico.
  - Alcohol, se clasificó a los pacientes como bebedores habituales si superaban el consumo de 30gr de alcohol/día.

## TRASTORNOS ORALES POTENCIALMENTE CANCERIZABLES

Además de los datos epidemiológicos y de factores de riesgo se incluyó:

- Histología de la lesión: (según criterios de la OMS)
  - Hiperplasia
  - Displasia leve
  - Displasia moderada
  - Displasia grave o carcinoma *in situ*



- Estado final:
  - Sin progresión
  - Progresión a carcinoma de células escamosas infiltrante
  - Evolución a carcinoma verrugoso
- Tiempo de seguimiento

## CARCINOMAS ORALES DE CÉLULAS ESCAMOSAS

Se registraron, en cada paciente, las siguientes variables:

- Clínicas
  - Localización anatómica:
    - Lengua
    - Suelo oral
    - Paladar
    - Encía
    - Mucosa yugal
    - Retromolar/orofarínge
  - Tamaño de la lesión (T) (Tabla 4)
  - Presencia de ganglios linfáticos con metástasis (N) (Tabla 4)
  - Presencia de metástasis a distancia (M)(Tabla 4)
  - Estadio tumoral (Tabla 5)
  - Afectación ósea
  - Tipo de reconstrucción del defecto

- Recidiva (número y localización).
  - Local
  - Regional
  - A distancia
- Tratamiento complementario con radioterapia
- Tratamiento complementario con quimioterapia
- Estado al final del seguimiento
  - Vivo y libre de enfermedad
  - Muerto por la enfermedad o recidiva no tratable
  - Perdido o muerto por otra causa (censurado)
- Histológicas
  - Diferenciación histológica:
    - Bien diferenciado
    - Moderadamente diferenciado
    - Poco Diferenciado
  - Estado de los bordes: considerándose bordes afectos aquellas resecciones con márgenes afectos o con tumor a menos de 1mm del borde de resección.
- Tiempo de seguimiento

<b>TAMAÑO DEL TUMOR PRIMARIO (T)</b>	
TX	Tumor primario no puede ser valorado
T0	No existe evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ
T1	Lesión menor de 2cm en su máximo diámetro
T2	Lesión mayor de 2cm y menor de 4cm en su máximo diámetro
T3	Lesión mayor de 4cm en su máximo diámetro
T4	Lesión que invade estructuras adyacentes (huesos, músculos extrínsecos o piel)
<b>GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES (N)</b>	
NX	Adenopatía cervical no valorable
N0	Sin adenopatías cervicales clínicamente positivas
N1	Un solo ganglio homolateral positivo con 3cm o menos de diámetro
N2a	Un solo ganglio homolateral positivo mayor de 3cm y menor de 6cm de diámetro
N2b	Múltiples ganglios homolaterales positivos menores de 6cm de diámetro
N2c	Ganglios bilaterales o contralaterales positivos, menores de 6cm de diámetro
N3	Uno o más ganglios positivos mayores de 6cm de diámetro
<b>METÁSTASIS A DISTANCIA (M)</b>	
MX	Metástasis a distancia no valorable
M0	No existe metástasis a distancia
M1	Existe metástasis a distancia.

**Tabla 4 :** Clasificación TNM y estadiaje tumoral AJCC <sup>153</sup>.

<b>ESTADIOS</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio II	T2	N0	M0
Estadio III	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
Estadio IV A	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	Cualquier T	N2	M0
Estadio IV B	Cualquier T	N3	M0
Estadio IV C	Cualquier T	Cualquier N	M1

**Tabla 5:** Clasificación TNM y estadiaje tumoral AJCC <sup>153</sup>.

## Muestras histológicas y análisis inmunohistoquímico

Se recogieron muestras representativas de las lesiones, conservadas en parafina, del archivo anatomopatológico del HUCA.

Los TOPC se clasificaron en tres categorías hiperplasia o displasia leve, displasia moderada o displasia grave, según la clasificación de la OMS<sup>154</sup>. También se obtuvieron muestras representativas del tejido tumoral en aquellos pacientes cuyas lesiones evolucionaron hacia carcinoma de células escamosas invasivo.

---

Como control negativo, se utilizó mucosa oral de pacientes sanos procedente de la cirugía de extirpación de terceros molares no erupcionados.

Las muestras de COCE procedieron igualmente de bloques de tejido parafinado del archivo anatomopatológico del Hospital Universitario Central de Asturias. Se valoró la diferenciación tumoral y la proximidad de los bordes de resección. Otros parámetros como la profundidad tumoral, el patrón de invasión o la presencia de infiltración perineural no estaban disponibles para todos los pacientes por lo que no pudieron ser tenidos en cuenta.

## Técnica de inmunohistoquímica

De cada bloque de tejido se realizaron secciones seriadas de 3  $\mu\text{m}$  que fueron adheridas en portas Flex IHC microscope (Dako). Las secciones fueron desparafinadas con xileno estándar, e hidratadas en concentraciones graduales decrecientes de alcohol.

El desenmascaramiento antigénico se llevó a cabo utilizando Envision Flex Target Retrieval solution (Dako) a pH 9,0 en el caso de FAK y CTTN y en tampón citrato a pH 6,0 para podoplanina.

El protocolo específico para cada marcador se detalla a continuación:

- **FAK:** La tinción de las secciones se realizó automáticamente a temperatura ambiente en una estación de trabajo (*Dako Autostainer Plus*), utilizando el anticuerpo monoclonal Anti-FAK, clon 4.47 (*Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY*) en dilución 1:250. Se utilizó

como sistema de visualización el kit Dako EnVision Flex (*Dako Autostainer*).

- **CTTN:** Tinción de las secciones automáticamente a temperatura ambiente en una estación de trabajo (*Dako Autostainer Plus*) utilizando el anticuerpo monoclonal Anti-Cortactina, clon 30 (*BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA*) en dilución 1:200. Se utilizó como sistema de visualización el kit Dako EnVision Flex (*Dako Autostainer*).

- **PODOPLANINA:** Los cortes de tejido se incubaron durante toda la noche a 4 ° C en una cámara húmeda con anticuerpos monoclonales IgG de ratón anti-podoplanina, clon D2-40 (*Covance Inc.* anteriormente *Signet* N ° de catálogo 730-01) a una dilución 1:100. La tinción se realizó mediante el uso del sistema DakoCytomation Envision Plus con peroxidasa de ratón y el cromógeno diaminobencidina como sustrato (*DakoCytomation*). La expresión de podoplanina en las células endoteliales linfáticas del estroma sirvió como un control positivo interno. El control negativo se realizó con la omisión del antisuero de la incubación primaria.

Finalmente se realizó la contratinción con hematoxilina durante 8 minutos.

Después de la tinción, las preparaciones fueron deshidratadas a través de alcoholes de graduación creciente y montadas con un cubreobjetos según un método estándar.

---

## Cuantificación de marcadores

Las preparaciones fueron analizadas por dos observadores, un miembro de nuestro equipo y un patólogo, de forma independiente y sin conocimiento de los datos clínicos. La concordancia interobservador se situó en torno al 95%.

### FAK Y CTTN

La inmunotinción fue valorada tanto en TOPM como en COCE utilizando una escala semicuantitativa, de acuerdo con la intensidad de la tinción<sup>155</sup>:

- negativa (0)
- débil (+)
- moderada (++)
- intensa (+++).

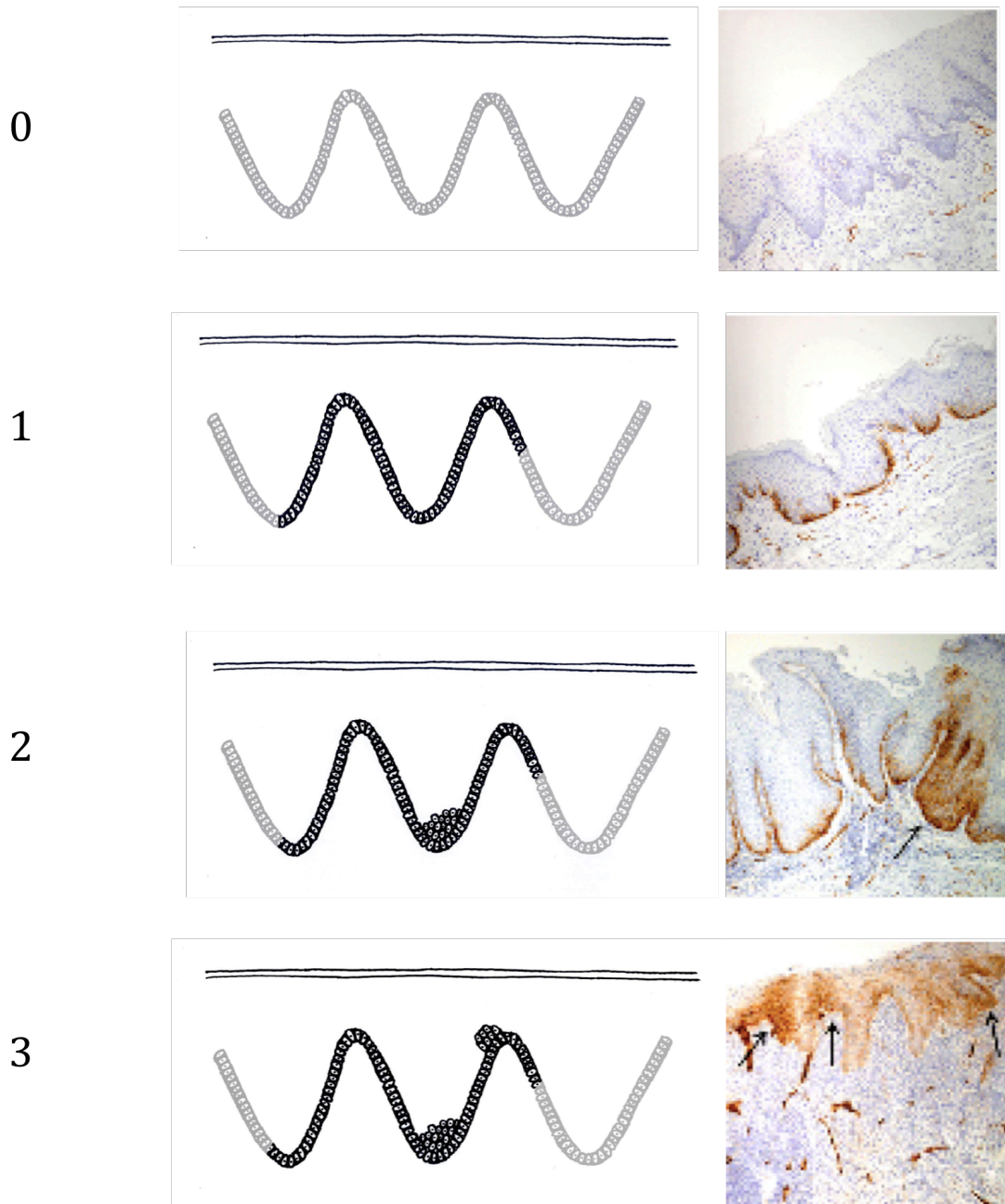
### PODOPLANINA

La cuantificación se realizó según criterios previamente establecidos, dependiendo del tipo de lesión estudiada.

En TOPC, la cuantificación de la inmunotinción se llevó a cabo aplicando un sistema de puntuación similar al previamente descrito por Kawaguchi y cols<sup>152</sup> (Figura 2), de la siguiente manera:

- (0) no se observó expresión en ninguna parte del epitelio
- (1) expresión restringida a la capa basal del epitelio
- (2) expresión en las capas basales y suprabasales, en una única área

(3) expresión extendida a la capa suprabasal, en dos o más áreas.



**Figura 2:** Esquema de valoración de la expresión de podoplanina. Adaptado de Kawaguchi y cols<sup>152</sup>.



En las muestras correspondientes a COCE se valoró:

- Presencia de tinción
- Patrón de tinción: difuso /periférico
- Intensidad de la tinción: +/++/+++
- Porcentaje de células teñidas: 0%, 1% a 33%, 34% a 66%, >66%
- *Score* combinando intensidad y porcentaje (0-9). Resultado del producto de la puntuación en intensidad (tinción negativa=0/+ =1/++ =2/+++ =3) por la puntuación en porcentaje de células teñidas (0%=0/1%-33%=1/34%-66%=2/>66%=3).
  - 0-4 baja expresión
  - 5-9 alta expresión

## **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante el software SPSS para Windows versión 20.0 (SPSS Inc., Chicago, ILL, EEUU).

Los contrastes entre variables categóricas se llevaron a cabo mediante el test de Chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher (cuando los efectivos esperados en alguna casilla eran menores de 5). La relación entre la edad y variables categóricas binarias se determinó mediante la prueba *t* de Student-Fisher. Las correlaciones entre variables ordinales fueron analizadas mediante la prueba de Spearman.

Para el análisis de supervivencia, se utilizó el test de Kaplan-Meier. Las diferencias entre los diversos tiempos de supervivencia se analizaron mediante la prueba de log-rank. Se utilizó también el modelo de riesgos proporcionales de Cox para los análisis uni y multivariante. En ambos se calcularon los *Hazard Ratios* (HR) con intervalos de confianza del 95% (IC). Los valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## 5. RESULTADOS



## RESULTADOS

### Lesiones orales potencialmente malignizables

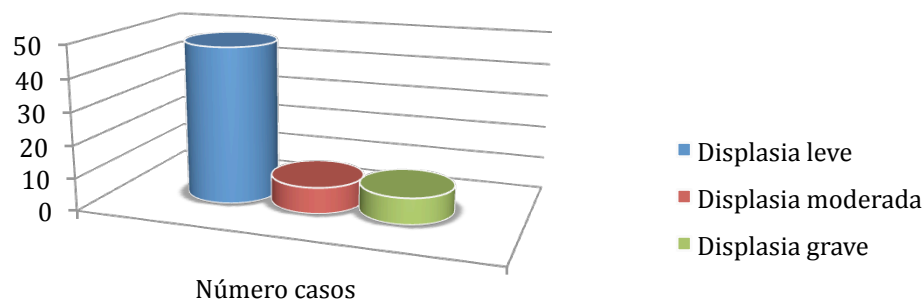
#### Descripción de la muestra

##### FAK-CTTN

La muestra analizada en esta parte del estudio estaba formada por 64 pacientes, de los cuales 32 eran hombres y 32 mujeres, con edades comprendidas entre los 39 y los 89 años, siendo la edad media 64 años (DS 12,8).

Cincuenta y uno de los 64 pacientes (80%) eran fumadores, con un consumo medio de 20 cigarrillos/día. Treinta y nueve sujetos (60%) eran consumidores habituales de alcohol.

Con respecto a la histología de los TOPC, 48 casos fueron clasificados como hiperplasia o displasia leve (75%), 8 casos (12,5%) como displasia moderada y, por último, 8 casos como displasia grave o *carcinoma in situ* (Figura 3).



**Figura 3:** Clasificación de los TOPC en el análisis de FAK y CTTN.

A lo largo del seguimiento clínico 17 casos (26%) evolucionaron a carcinoma invasor, siendo cuatro de ellos clasificados como carcinomas verrugosos.

Las características demográficas y anatomoclínicas de los pacientes se resumen en la tabla 6:

	<b>TOPC sin transformación maligna</b>	<b>TOPC con transformación maligna</b>	<b><i>p</i></b>
<b>Edad (años)</b>			
Media (DS)	63,8 (12,7)	64,7 (13,5)	0,36
Rango	39 – 87	46-83	
<b>Sexo número (%)</b>			
Mujeres	22 (47,8)	10 (58,8)	0,31
Hombres	24 (52,2)	7 (41,2)	
<b>Consumo tabaco número (%)</b>			
Fumadores	5 (23,8)	6 (42,9)	0,21
No fumadores	16 (76,2)	8 (57,1)	
<b>Consumo alcohol número (%)</b>			
Habitual	1 (4,8)	3 (21,4)	0,16
No	20 (95,2)	11 (78,6)	
<b>Displasia</b>			
Leve	42 (91,3)	5 (29,4)	< 0,0005
Moderada	2 (4,3)	6 (35,3)	
Grave	2 (4,3)	6 (35,3)	

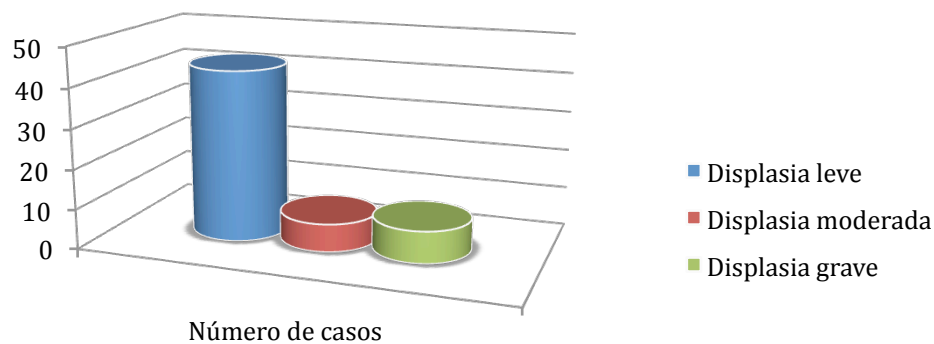
**Tabla 6:** Características clínicas y progresión a malignidad de los TOPC en el análisis de FAK y CTTN.

## PODOPLANINA

La muestra seleccionada para esta segunda parte del estudio estaba formada por 58 pacientes, de los cuales 27 (46,6%) fueron hombres y 31 (54,4%) mujeres. La edad media fue de 64 años (DS 12,9), con un rango de 39 a 87 años.

Treintaicinco de los 58 pacientes (60%) eran fumadores, con un consumo medio de 20 cigarrillos al día. Veintiocho pacientes (48%) consumían habitualmente alcohol.

Histológicamente, 43 casos (74,1%) fueron clasificados como hiperplasia o displasia leve, 7 casos (12,1%) como displasia moderada y 8 casos (13,8%) como displasia grave o carcinoma *in situ* (Figura 4).



**Figura 4:** Distribución de los TOPC en el análisis de podoplanina.

A lo largo del seguimiento 13 de los 58 pacientes (22,4%) evolucionaron a carcinoma de células escamosas invasor.

Las características de los pacientes se resumen en la tabla 7.

	<b>Displasia sin transformación maligna</b>	<b>Displasias con transformación maligna</b>	<b>p</b>
<b>Edad (años)</b>			
Media (DS)	63,8 (12,7)	64,1 (13,8)	
Rango	39 - 87	46-83	0,36
<b>Sexo número (%)</b>			
Mujeres	22 (49)	9 (69)	
Hombres	23 (51)	4 (31)	0,37
<b>Consumo tabaco número (%)</b>			
Fumadores	29 (64,4)	6 (46)	
No fumadores	16 (35,6)	7 (53,8)	0,39
<b>Consumo alcohol número (%)</b>			
Habitual	25 (55,5)	2 (23)	
No	20 (44,5)	10 (77)	0,25
<b>Displasia</b>			
Leve	41 (91)	2 (15,4)	
Moderada	2 (4,5)	5 (38,5)	< 0,0005
Grave	2 (4,5)	6 (46,2)	

**Tabla 7:** Características clínicas y progresión a malignidad de los TOPC en el análisis de Podoplanina.



## Análisis de la expresión de FAK

En las 64 secciones en las que se analizó la inmunoexpresión de FAK se incluyó epitelio normal como control interno. En este, la expresión de FAK se restringe a la capa de células basales, siendo despreciable en las células estromales.

En las zonas displásicas la tinción se valoró según su intensidad como leve, moderada o fuerte (Figura 5). En las áreas displásicas, 27 de las 64 lesiones (42%) presentaron sobreexpresión de FAK (intensidad moderada o fuerte) en relación con el resto del epitelio. En 17 casos (26%) se detectó expresión con intensidad fuerte.

El patrón de tinción fue de predominio citoplasmático, no obstante algunas células manifestaron refuerzo periférico.

En función de la clasificación histopatológica previa se observó que la intensidad de la tinción aumentó con el grado de displasia, como se resume en la tabla 8.

Asociación claramente significativa en el test de Chi-cuadrado ( $p < 0,0005$ ).

	<b>D. leve (48)</b>	<b>D. moderada (8)</b>	<b>D. severa (8)</b>	<b>P</b>
<b>Expresión intensa FAK</b>	6 (12%)	5 (62%)	6 (75%)	<0,0005

**Tabla 8:** Relación entre la expresión de FAK y el diagnóstico histopatológico.

En la cohorte de pacientes que evolucionaron a carcinomas orales de células escamosas (COCE) se analizó también la expresión de esta

---

proteína, estando presente en 15 (88%) de las muestras estudiadas. En cada paciente, la expresión de FAK en la muestra tumoral se comparó con la obtenida previamente en el correspondiente TOPC, observando que la expresión se mantuvo o incluso aumentó en la muestra con COCE, en comparación con la muestra previa.

## Análisis de la expresión de CTTN

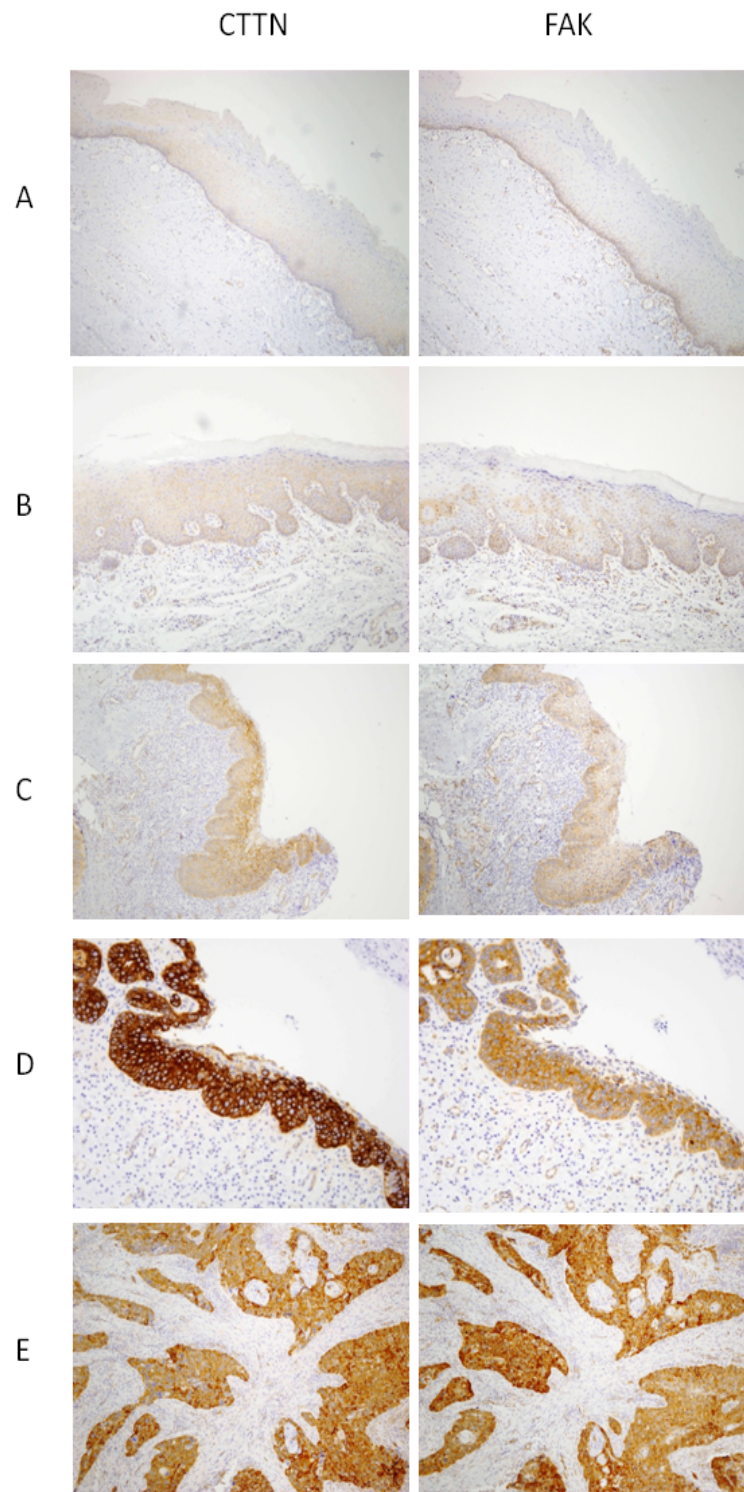
En las muestras estudiadas se observó, en el epitelio sano, tinción débil con CTTN en los estratos más diferenciados y, al igual que con FAK, tinción despreciable en las células estromales.

El patrón de tinción fue de predominio citoplasmático y, en algunos casos, enriquecimiento proteico en la membrana celular (Figura 5).

Se encontraron niveles elevados de expresión de CTTN (++ y +++) en las áreas displásicas de 52 (81%) de los 64 TOPC estudiados. Siendo de intensidad fuerte (+++) en 25 casos (39%).

El análisis mediante inmunohistoquímica de muestras del mismo individuo tomadas en distintos momentos mostró que el grado de expresión de la proteína estudiada se mantuvo estable.

Al analizar la expresión de CTTN con respecto a la clasificación histopatológica de los TOPC encontramos que la expresión proteica aumenta con el grado de displasia, observándose una asociación estadísticamente significativa ( $p=0,004$ ) (Tabla 9).



**Figura 5:** Análisis inmunohistoquímico de la expresión de CTTN y FAK en TOPC. A: Epitelio normal con tinción negativa. B-D: Muestras representativas de lesiones potencialmente malignizables - B: Expresión leve. C: Expresión moderada. D: Expresión fuerte. E: COCE con expresión proteica fuerte.

	<b>D. leve (48)</b>	<b>D. moderada (8)</b>	<b>D. severa (8)</b>	<b>P</b>
<b>Expresión intensa CTTN</b>	14 (29%)	7 (87%)	4 (50%)	0,004

**Tabla 9:** *Relación entre la expresión de CTTN y el diagnóstico histopatológico*

La expresión proteica fue también evaluada en los COCE de aquellos pacientes que presentaron progresión a malignidad a lo largo del seguimiento clínico en la cohorte de pacientes estudiados. En cada paciente, la expresión de CTTN en la muestra tumoral se comparó con la obtenida previamente en el correspondiente TOPC.

Se observó sobreexpresión de CTTN (++ y +++) en 13 (77%) de los 17 COCE, comprobándose que la expresión de la proteína se mantuvo o incrementó en el tumor con respecto a la muestra de TOPC.

### **Expresión de FAK y CTTN y progresión a COCE**

En el presente estudio encontramos asociación estadísticamente significativa entre el grado de displasia y la progresión a COCE. (Tabla 10)

<b>Grado de displasia</b>	<b>Número de casos (%)</b>	<b>Progresión COCE Número (%)</b>	<b>P</b>
Leve	48 (75%)	5 (29,4%)	<0,0005
Moderada	8 (12,5%)	6 (35,3%)	
Grave	8 (12,5%)	6 (35,3%)	

**Tabla 10:** *Evolución de los pacientes a carcinoma en función del diagnóstico histológico.*

Cuando analizamos la relación entre la sobreexpresión de FAK y CTTN y la progresión a cáncer, agrupamos, para el análisis estadístico, por una parte las lesiones que presentaron una inmunotinción negativa o una intensidad baja o moderada (0/+ /++) y, por otro lado, aquellas cuya expresión fue puntuada como intensa (+++).

Observamos la existencia de una asociación entre la expresión de FAK y la progresión a carcinoma. De hecho, 11 de 17 muestras con expresión elevada (+++) de FAK evolucionaron a COCE frente a 6 de 47 que no presentaban expresión o lo hacían con intensidad leve o moderada (0/+ /++). Los resultados fueron estadísticamente significativos (Tabla 11, Test exacto de Fisher,  $p = 0,0005$ ).

<b>Expresión FAK</b>	<b>Número de casos (%)</b>	<b>Progresión OSSC Número (%)</b>	<b>P</b>
Leve-Moderada (0/+ /++)	47 (73,4%)	6 (35%)	<0,0005
Intensa (+++)	17 (26,6%)	11 (65%)	

**Tabla 11:** Relación entre la sobreexpresión de FAK y la progresión a cáncer

En cuanto a CTTN, se observó una asociación significativa entre la expresión intensa de cortactina y la evolución a COCE. Trece de los 25 casos con expresión intensa (+++) progresaron a malignidad frente a 4 casos de los 39 con expresión débil o moderada (Tabla 12). Test exacto de Fisher,  $p < 0,0005$ ).

<b>Expresión CTTN</b>	<b>Número de casos (%)</b>	<b>Progresión COCE Número (%)</b>	<b><i>p</i></b>
Leve-Moderada (0/+ /+++)	39 (61%)	4 (23%)	<0,0005
Intensa (+++)	25 (39%)	13 (77%)	

**Tabla 12:** Relación entre la sobreexpresión de CTTN y la progresión a cáncer.

Analizando conjuntamente los dos marcadores incrementamos la significación del test, como se resume en la tabla 13:

<b>Expresión CTTN-FAK</b>	<b>Número de casos (%)</b>	<b>Progresión COCE Número (%)</b>	<b><i>p</i></b>
Leve-moderada (0/+ /+++)	36 (56%)	4 (23%)	<0,0001
CTTN+++ o FAK+++	14 (22%)	2 (12%)	
CTTN+++ y FAK+++	14 (22%)	11 (65%)	

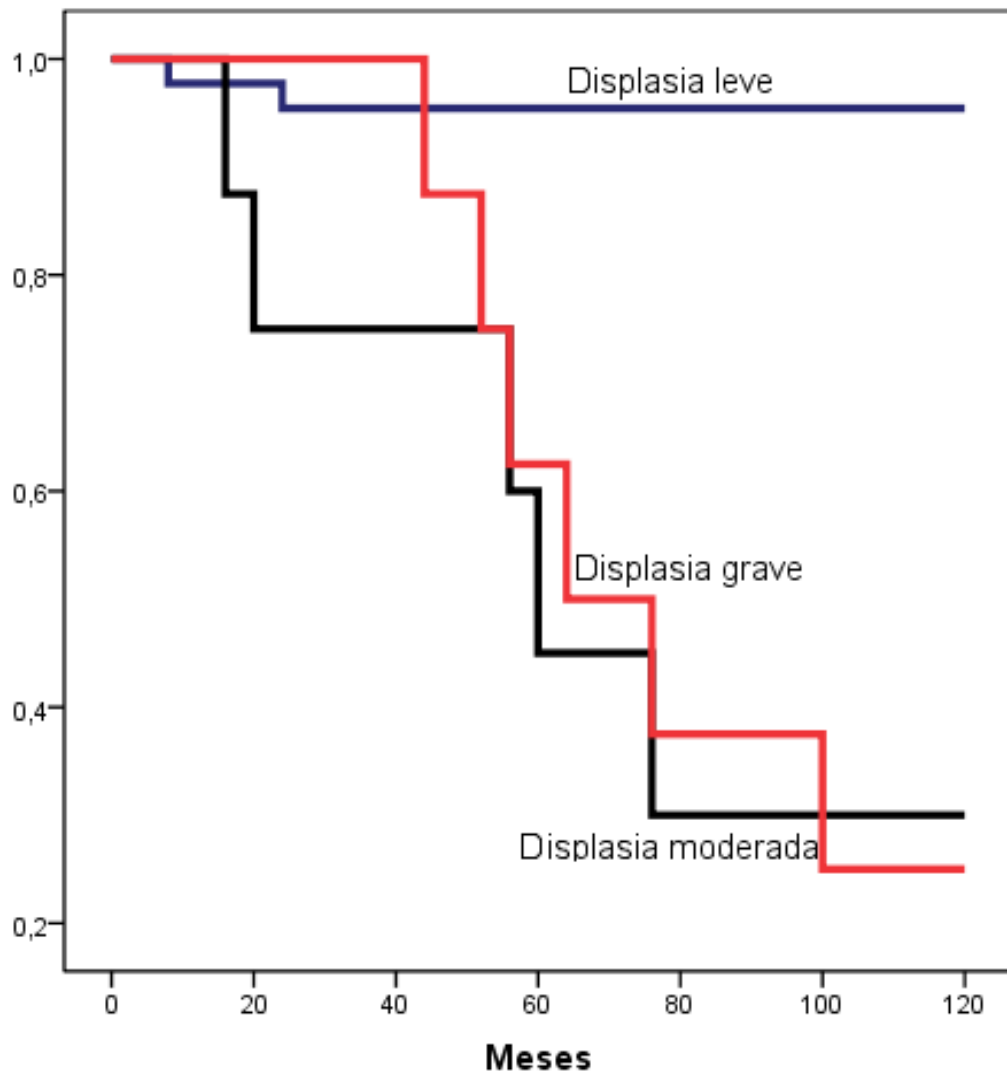
**Tabla 13:** Relación entre la sobreexpresión de FAK y CTTN de forma conjunta y la progresión a COCE.

En el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier, hemos encontrado que la progresión a COCE se asocia significativamente con el grado histopatológico (figura 6) (log-rank  $p < 0,0005$ ), con la expresión intensa

---

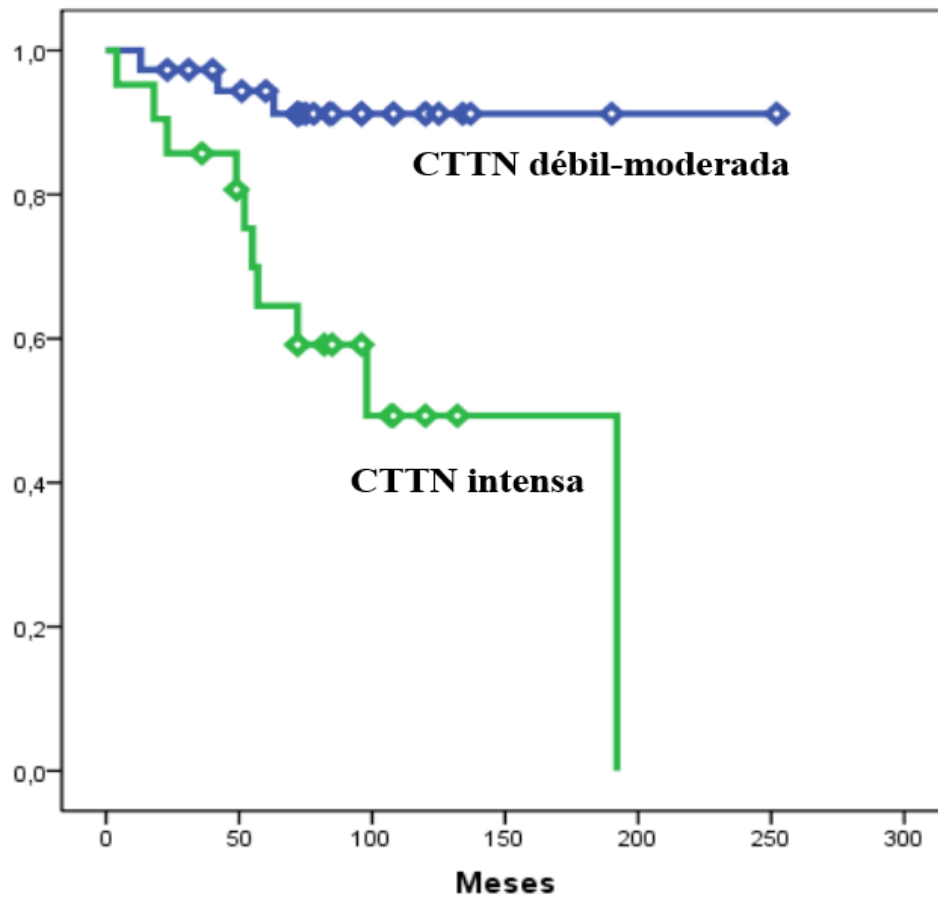
de CTTN (figura 7) (log-rank  $p = 0,001$ ) y con la expresión intensa de FAK (figura 8) (log-rank  $p < 0,0005$ ).

Cuando analizamos el potencial predictivo de la expresión conjunta de CTTN y FAK, se objetiva como las lesiones con una expresión intensa (+++) de ambas proteínas (grupo 2) tienen un riesgo de evolución significativamente mayor que aquellas sin expresión intensa (grupo 0) o que aquellas otras con expresión intensa de sólo una de ellas (grupo 1) (Figura 9)(log-rank  $p = 0,0004$ , grupo 2 versus grupo 1;  $p < 0,0005$ , grupo 2 versus grupo 0; y  $p = 0,93$  grupo 1 versus grupo 0).

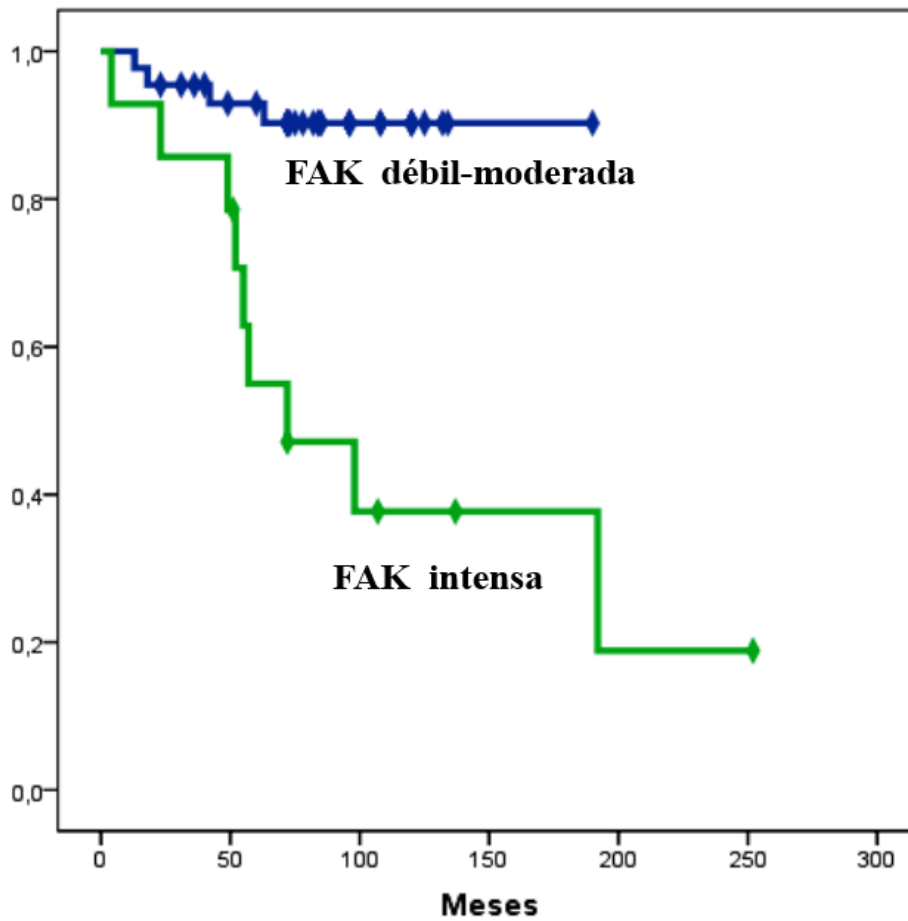


**Figura 6:** Curva de supervivencia de Kaplan-Meier en pacientes con TOPC categorizados por grado histológico (log-rank  $p < 0,005$ ).

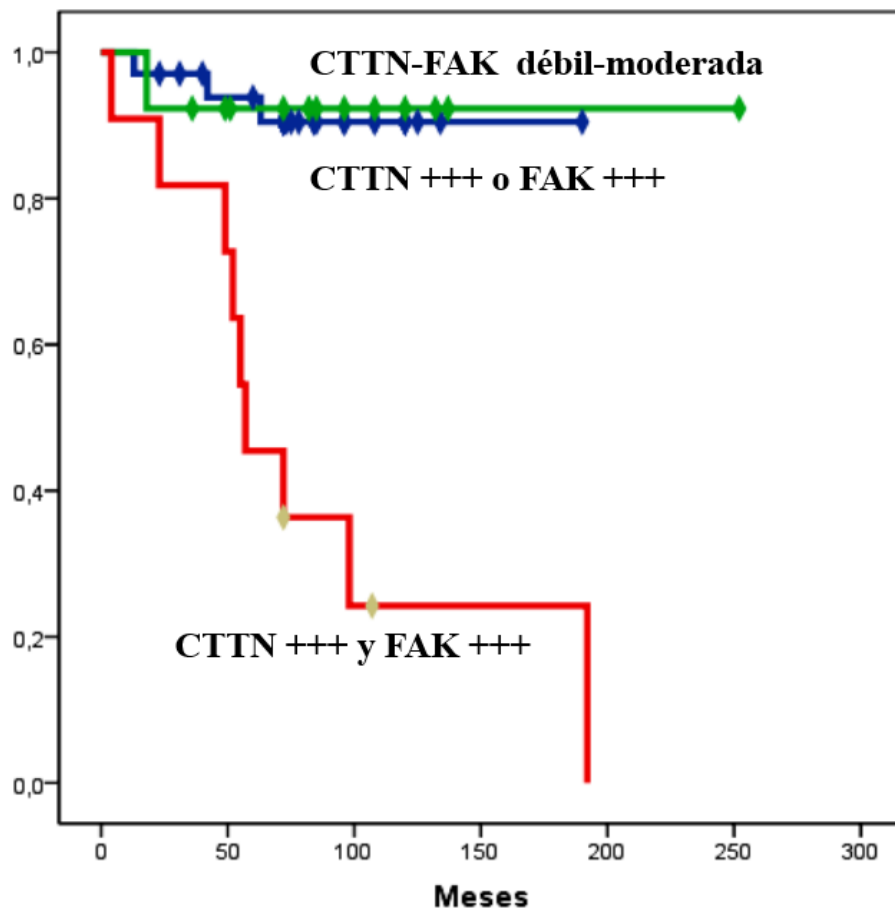




**Figura 7:** Curva de supervivencia de Kaplan-Meier en pacientes con TOPC categorizados por sobreexpresión de CTTN ( $\log\text{-rank } p = 0,001$ ).



**Figura 8:** Curva de supervivencia de Kaplan-Meier en pacientes con TOPC categorizados por sobreexpresión de FAK (log-rank  $p < 0,0005$ ).



**Figura 9:** Curva de supervivencia de Kaplan-Meier en pacientes con TOPC categorizados por sobreexpresión simultánea de CTTN - FAK [log-rank  $p = 0,0004$ , grupo 2 (expresión intensa FAK y CTTN) versus grupo 1 (expresión intensa de FAK o CTTN);  $p < 0,0005$ , grupo 2 versus grupo 0 (expresión débil o moderada de FAK y CTTN); y  $p = 0,93$  grupo 1 versus grupo 0].

El análisis univariante de Cox (Tabla 14) confirmó que la expresión intensa de FAK y CTTN, así como el grado histopatológico se asocian significativamente con el incremento de riesgo de progresión a COCE.

<b>Factores</b>	<b>p</b>	<b>HR</b>	<b>IC 95%</b>
Consumo de tabaco	0,06	2,8	0,924-8,572
Consumo de alcohol	0,35	1,8	0,491-7,272
Displasia (severa vs leve-moderada)	0,007	4,5	1,527-13,481
CTTN ( +++ vs 0/+ / ++)	0,005	6,3	1,775-22,187
FAK (+++ vs 0/+ /+++)	0,001	6,8	2,089-22,187
CTTN y/o FAK (+++ vs 0/+ /+++)	0,001	9,2	2,487-33,964

**Tabla 14:** Análisis univariante de Cox. HR: Hazard Ratio.

En el análisis multivariante de Cox (Tabla 15), se incluyeron las variables que habían sido significativas en el análisis univariante y, entre las que aportaban información redundante, las que alcanzaron un mayor valor HR. Solamente la expresión intensa de CTTN y/o FAK se mantuvo como predictor pronóstico independiente de progresión a COCE (HR =6,298; IC95% 1,551-25,581; log-rank p=0,01).

<b>Factores</b>	<b>p</b>	<b>HR</b>	<b>IC 95%</b>
Displasia (grave vs leve-moderada)	0,069	2,935	0,921-9,357
CTTN y/o FAK (+++ vs 0/+ /+++)	0,01	6,298	1,551-25,581

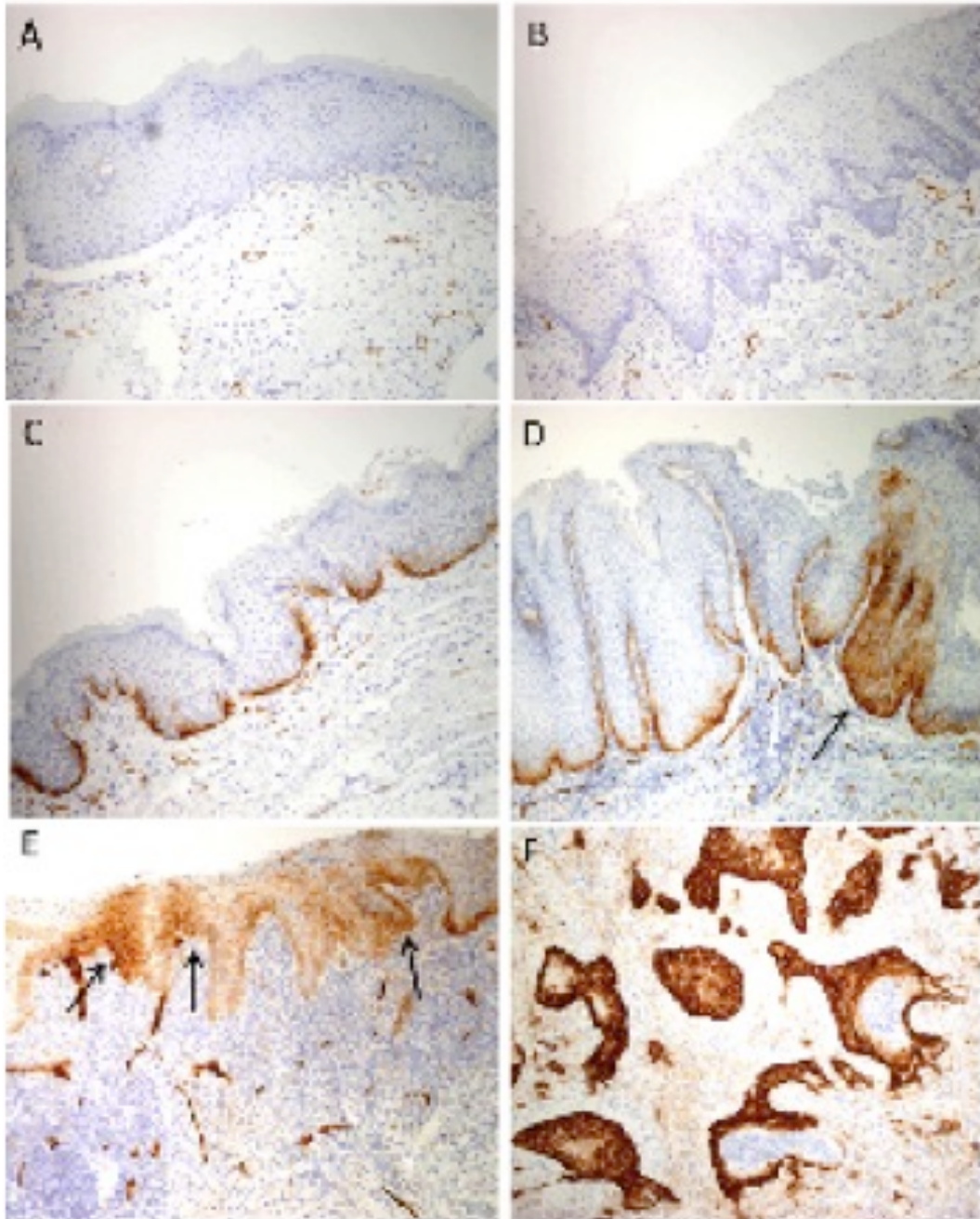
**Tabla 15:** Análisis multivariante de Cox

---

## Análisis de la expresión de podoplanina

El análisis inmunohistoquímico de la expresión de podoplanina se realizó en un conjunto de 58 TOPC. Las secciones seleccionadas para estudio contenían también epitelio normal como control interno. La expresión de podoplanina fue detectada consistentemente en las células endoteliales de los vasos linfáticos, como se esperaba de acuerdo con su función bien establecida como marcador linfático. En contraste, la expresión de podoplanina en el epitelio oral normal era insignificante o estaba restringida a pequeños grupos de células dentro de la capa basal que mostró tinción principalmente en la membrana y en el citoplasma (Figura 10- A). La expresión en el epitelio oral displásico fue muy variable, detectándose un patrón membranoso predominantemente en la capa basal (Figura 10 B-E). En algunos casos, la expresión se extendió a la capa suprabasal en una o múltiples zonas (Figura 10 D-E).

Entre las 58 lesiones displásicas analizadas, 18 casos (31%) no mostraron ninguna expresión detectable de podoplanina en el epitelio [marcado como 0 (Figura 10-B)], 18 (31%) mostraron expresión de podoplanina sólo en ciertas células basales [marcado como 1, (Figura 10-C)], 7 (12%) exhibieron expresión de podoplanina extendida a la capa suprabasal en un área [marcado como 2, (Figura 10- D)], y 15 (26%) en dos o más áreas [marcado como 3, (Figura 10-E)].



**Figura 10:** expresión de podoplanina. A: epitelio normal. B-E: Epitelio con displasia - B: score 0. C: score 1. D: score 2. E: score 3. F: COCE con expresión positiva de podoplanina.

La edad de los pacientes ( $p = 0,23$ ), el sexo ( $p = 0,5$ ) y los hábitos de estilo de vida como el tabaquismo ( $p = 0,49$ ) y el consumo de etanol ( $p = 0,64$ ) no mostraron una asociación significativa con la expresión de podoplanina (Tabla 16).

	<b>Expresión negativa (0-1)</b>	<b>Expresión positiva (2-3)</b>	<b>P</b>
<b>Edad (años)</b>			
- Media (DS)	60,25(12,6)	65,9 (12,9)	0,23
<b>Sexo - Número (%)</b>			
Mujeres	18 (58)	13 (42)	0,50
Hombres	18 (67)	9 (33)	
<b>Consumo tabaco - Número (%)</b>			
Fumadores	11 (31)	24 (69)	0,49
No fumadores	9 (39)	14 (61)	
<b>Consumo alcohol - Número (%)</b>			
Habitual	10 (36)	18 (64)	0,65
No	11 (25)	19 (75)	

**Tabla 16:** Asociación entre la expresión de podoplanina y las características clínicas de los pacientes.

La expresión de podoplanina se asoció con el grado de displasia (Tabla 17). Específicamente, 9 (21%) de las 43 lesiones con displasia leve, 6 (85,7%) de las 7 lesiones con displasia moderada, y 7 (87,5%) de los 8 lesiones con displasia grave / carcinoma *in situ* presentaron expresión positiva de podoplanina (puntuaciones de 2 o 3) ( $p < 0,0005$ ).

<b>Displasia - Número (%)</b>			
Leve	34 (79)	9 (21)	
Moderada	1 (14,3)	6 (85,7)	< 0,0005
Grave	1 (12,5)	7 (87,5)	

**Tabla 17:** Asociación entre la expresión de podoplanina y el grado de displasia.

La expresión de podoplanina también se evaluó en los 13 tumores invasivos desarrollados en nuestra cohorte. Para cada paciente, la expresión de la proteína en el tumor invasivo se comparó con la de la lesión premaligna previa correspondiente. El aumento de expresión de podoplanina se observó en 11 (84,6%) de los 13 tumores invasivos, con una fuerte tinción positiva en 10 (77%) de los casos. El análisis estadístico reveló una fuerte correlación positiva entre la expresión de podoplanina en los TOPC y en los tumores invasivos (coeficiente de correlación de Spearman 0,701,  $p = 0,008$ ). En general, se observó que la expresión de podoplanina se mantuvo o aumentó aún más en el tumor en comparación con la lesión preinvasiva del paciente.



### *Expresión de podoplanina y progresión a COCE.*

La tabla 18 presenta la asociación entre la expresión de podoplanina y la evolución del TOPC. Veintidós de las 58 lesiones (38%) fueron clasificadas como podoplanina-positivas (puntuaciones 2 y 3), y las 36 restantes (62%) fueron consideradas como negativas (0 y 1) ( $p=0.0005$ ).

<b>Expresión Podoplanina</b>	<b>Número de casos (%)</b>	<b>Progresión COCE Número (%)</b>	<b><i>p</i></b>
Score 0	18 (31%)	1 (7,7%)	<0,0005
Score 1	18 (31%)	1 (7,7%)	
Score 2	7 (12%)	1 (7,7%)	
Score 3	15 (26%)	10 (76,9%)	

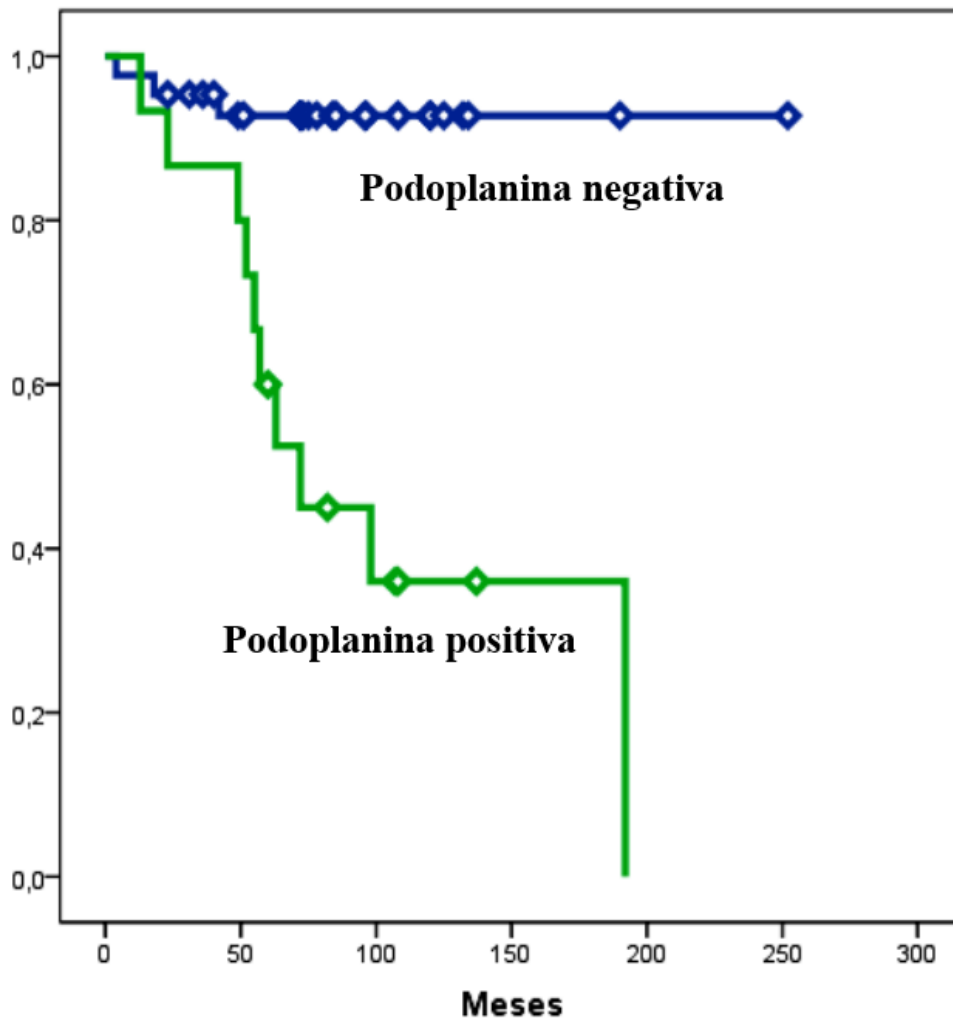
**Tabla 18:** *Evolución de los TOPC en función de la expresión de podoplanina.*

Hubo una asociación estadísticamente significativa en la cohorte presente entre el grado histopatológico y el riesgo de progresión de la displasia de cáncer oral ( $p < 0,0005$ ) (Tablas 17 y 19).

<b>Factor pronóstico</b>	<b>Número</b>	<b>Sin transformación maligna Número (%)</b>	<b>Tiempo de supervivencia (meses) Media; ES (IC 95%)</b>	<b>P</b>
<b>Consumo tabaco – número (%)</b>				
Fumadores	35	16 (45,7)	95; 24 (47,9 – 142,1)	0,04
No fumadores	23	16 (69,6)	166,8; 23,5 (120,7 - 212,9)	
<b>Displasia</b>				
Leve	43	41 (95,3)	181,7; 5,6 (170,6 – 192,9)	<0,0005
Moderada	7	2 (28,6)	92,4; 34,3 (25,2 - 159,7)	
Grave	8	2 (25)	110,3; 29,4 (52,6 – 168)	
<b>Podoplanina</b>				
Negativa (0-1)	36	34 (94,4)	238,6; 9,2 (220-256)	<0,0005
Positiva (2 -3)	22	11 (50)	11,4; 17,5 (80 -148,8)	

**Tabla 19:** Análisis univariante de los factores pronósticos (Kaplan-Meier).

Además, los pacientes que en los que se observó expresión positiva de podoplanina (puntuación 2 ó 3) presentaron una incidencia significativamente mayor de cáncer oral que aquellos con expresión negativa de esta proteína (log-rank  $p < 0,0005$ ) (Fig. 11).



**Figura 11** : Curva de supervivencia de Kaplan-Meier en pacientes con TOPC categorizados por expresión de podoplanina.

En el análisis de Kaplan-Meier, el hábito de fumar fue otra variable significativamente asociada con la transformación maligna (Tabla 19).

El análisis univariante de Cox mostró que la expresión de podoplanina, así como el grado de displasia epitelial se asociaron significativamente con el riesgo de cáncer oral (Tabla 20).

<b>Factores</b>	<b>p</b>	<b>HR</b>	<b>IC 95%</b>
Tabaco	0,058	3,6	0,96 – 9,76
Alcohol	0,34	1,92	0,49 – 7,4
Displasia (grave vs leve -moderada)	0,006	4,82	1,57 – 14,78
Expresión de Podoplanina (0-1 vs 2-3)	0,002	11,27	2,47 – 51,42

**Tabla 20:** Análisis univariante de Cox.

Los factores que tuvieron un impacto significativo en la transformación maligna, en el análisis univariante (expresión de podoplanina, displasia epitelial, y hábito de fumar), se incluyeron en un modelo de multivariante de regresión de Cox (Tabla 21). En este análisis, la expresión de podoplanina fue el único predictor independiente significativo del desarrollo del cáncer oral (HR = 8,738; IC = 1,83-41,63 95%, p = 0,007).

---

<b>Factores</b>	<b><i>p</i></b>	<b>HR</b>	<b>IC 95%</b>
Tabaco	0,11	2,56	0,792 – 8,283
Displasia (severa vs leve -moderada)	0,14	2,33	0,747 – 7,277
Expresión de Podoplanina (0-1 vs 2-3)	0,007	8,74	1,834 – 41,634

***Tabla 21: Análisis multivariante de Cox.***

---

## CARCINOMAS ORALES DE CÉLULAS ESCAMOSAS

### Descripción de la muestra

La muestra estudiada incluyó 92 pacientes, cuya edad media fue de 55,8 (SD 15,47) años, con un rango de 24 a 88 años. De los sujetos de la muestra, 61 (66%) fueron hombres y 31 mujeres (34%). Veintisiete (29%) de los 92 pacientes no habían consumido tabaco a lo largo de su vida, mientras que 52 (57%) eran consumidores habituales de tabaco, con un consumo medio de 20 cigarrillos al día y 9 (10%) lo habían sido con anterioridad, pero ya no lo eran. Con respecto al consumo de alcohol, el 55% de los pacientes eran consumidores habituales.

La localización tumoral más frecuente fue en la lengua, registrándose 39 casos (42%), seguido del suelo oral, con 22 casos (24%). El resto de características de los tumores se recoge en la tabla 22.

De los 92 pacientes de la muestra, 41 recibieron tratamiento complementario con radioterapia. Treintaicinco pacientes (38%) presentaron recidiva tumoral, siendo la media de recidivas 1,48 (rango 1-5). En total se registraron 41 recidivas a nivel local y 7 a nivel regional. Tres pacientes fueron diagnosticados de metástasis a distancia. Un 8% de los pacientes desarrollo a lo largo del seguimiento un segundo CCE en el área de la cabeza y el cuello.

<b>Características</b>	<b>Número</b>	<b>%</b>
<b>Localización</b>		
Lengua	39	42
Suelo oral	22	24
Encía	19	21
Paladar	2	2,2
Mucosa yugal	4	4,3
Retromolar/orofaríngea	6	6,5
<b>T</b>		
T1	19	21
T2	32	35
T3	15	16
T4	26	28
<b>N</b>		
N0	52	56,5
N+	40	43,5
<b>Estadio</b>		
I	14	15
II	17	18
III	21	23
IV	40	44
<b>Diferenciación tumoral</b>		
Bien diferenciado	58	63
Moderado	28	30,4
Poco diferenciado	6	6,6

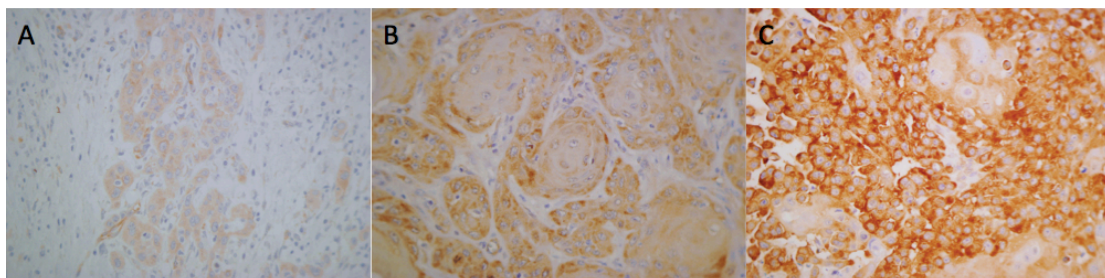
**Tabla 22:** Características clínico-patológicas de los casos incluidos.

Al finalizar el seguimiento, 35 pacientes (38%) estaban vivos y libres de enfermedad, mientras que 47 pacientes (51%) fallecieron a causa del COCE o presentaban una recidiva no curable. Diez pacientes (11%) abandonaron el seguimiento, fallecidos por otra causa.

El seguimiento medio fue 54 meses (rango entre 1 y 196 meses). La media de seguimiento de los pacientes que estaban vivos y libres de enfermedad en la última visita fue de 90 meses (rango 37-196 meses). El 42% de los pacientes falleció en los cinco primeros años tras el diagnóstico.

### Análisis de la expresión de FAK

La expresión de la quinasa de adhesión focal (FAK) fue valorada en cuatro niveles: negativa, +, ++ y +++. Los resultados de su expresión en 92 carcinomas orales fue la siguiente: un caso (1,1%) fue negativo, 27 (29,3%) mostraron una expresión leve (+)(Figura 12-A), 32 casos (34,8%) una expresión moderada (++) (Figura 12-B), y, finalmente, los restantes 32 casos (34,8%), una expresión intensa (Figura 12-C).



**Figura 12:** Análisis inmunohistoquímico de la expresión de FAK en COCE. A: Expresión leve. B: Expresión moderada. C: Expresión intensa.



### *Asociación entre la expresión de FAK y variables clínico-patológicas*

La intensidad de la inmunoexpresión de FAK, analizada según la escala de valoración precitada, no se asoció significativamente con ninguna de las variables clinicopatológicas estudiadas (Tabla 23).

Agrupando los resultados de la inmunoexpresión de FAK en dos grupos, por un lado aquellos en los que la expresión es nula o baja y por otro, los casos en los que la expresión de FAK es moderada o intensa, se observó una asociación significativa con metástasis ganglionares. Específicamente, de los 40 casos con metástasis ganglionares regionales, 8 (20%) mostraron expresión nula o escasa de FAK y, los 32 restantes (80%), expresión moderada o intensa ( $p = 0,045$ ).

	Intensidad de la inmunoexpresión de FAK				<i>p</i>
	-	+	++	+++	
<b>Sexo</b>					
Hombre	1	16	19	25	0,27
Mujer	0	11	13	7	
<b>Consumo de tabaco</b>					
Fumadores	1	16	16	19	0,85
No fumadores	0	9	11	7	
Exfumadores	0	2	3	4	

**Tabla 23:** Asociación entre intensidad de tinción de FAK y características clínico-patológicas. (continúa →)

	Intensidad de la inmunoexpresión de FAK				<i>p</i>
	-	+	++	+++	
<b>Consumo de alcohol</b>					
Habitual	1	15	16	19	0,84
No bebedores	0	12	14	11	
<b>Localización tumoral</b>					
Lengua	1	10	18	10	
Suelo oral	0	4	9	9	
Encía	0	9	3	7	
Paladar	0	0	0	2	0,23
Yugal	0	2	0	2	
Retromolar	0	2	2	2	
<b>T</b>					
T1	0	4	11	4	
T2	0	8	12	12	
T3	1	5	5	4	0,10
T4	0	10	4	12	
<b>N</b>					
N0	0	20	15	17	0,07
N+	1	7	17	15	
<b>Estadio</b>					
I	0	4	7	3	
II	0	7	4	6	0,59
III	0	4	10	7	
IV	1	12	11	16	
<b>Diferenciación tumoral</b>					
Bien	1	17	21	19	
Moderado	0	9	8	11	0,92
Poco	0	1	3	2	

**Tabla 23:** Asociación entre intensidad de tinción de FAK y características clínico-patológicas. (continúa →)

	<b>Intensidad de la inmunoexpresión de FAK</b>				<b>P</b>
	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>+++</b>	
<b>Recidiva</b>					
No	1	15	18	23	0,40
Sí	0	12	14	9	
<b>Segundo tumor primario</b>					
No	1	25	29	29	0,80
Sí	0	1	3	3	

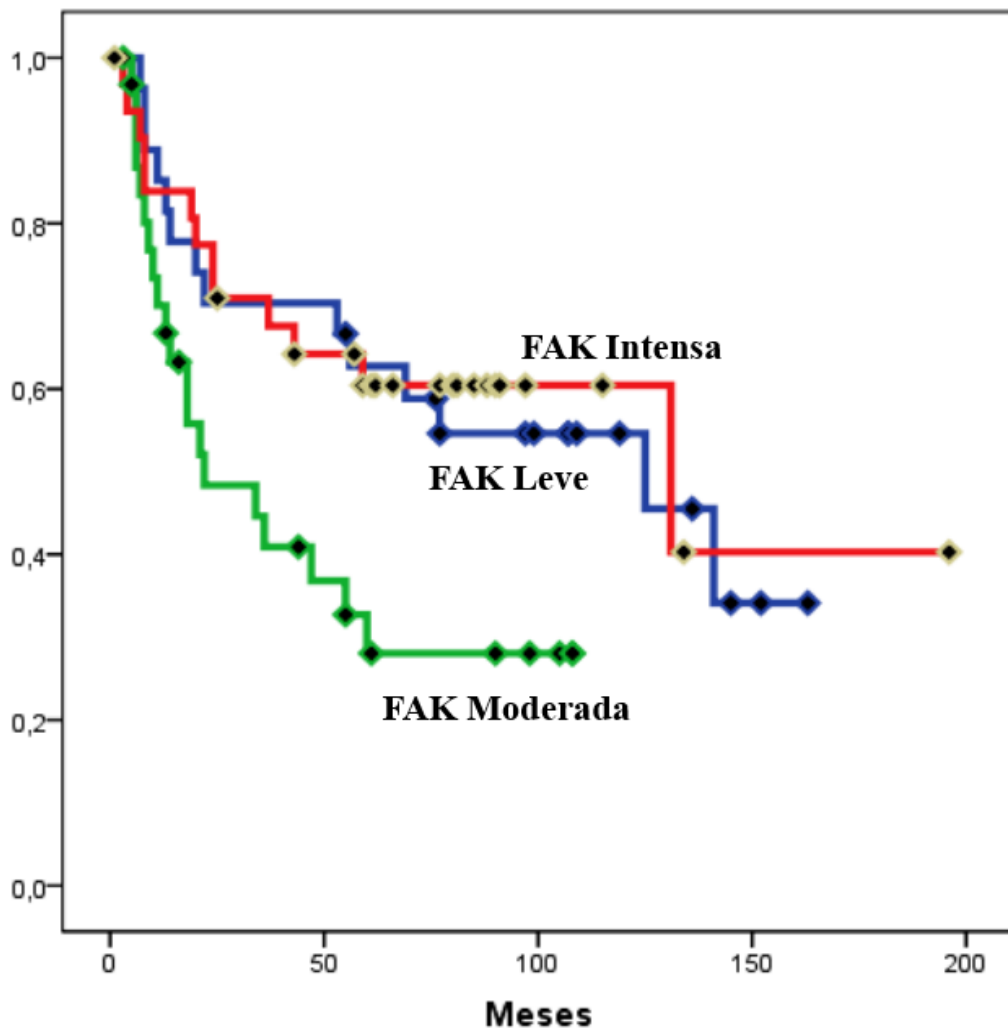
**Tabla 23:** Asociación entre intensidad de tinción de FAK y características clínico-patológicas.

### **Asociación entre FAK y supervivencia**

En el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier, hemos prescindido del caso en que FAK fue negativa, porque al tratarse de un caso censurado, el programa no ha calculado los estadísticos propios del análisis. Considerando los tres casos restantes, la supervivencia fue significativamente menor en los 32 tumores con expresión moderada de FAK ( $p = 0,01$ )(Tabla 24). No obstante, los casos con expresión intensa mostraron una mejor supervivencia que los casos con expresión discreta (Figura 13). En consecuencia, esta falta de tendencia nos sugiere que debemos contemplar estos resultados con cautela.

<b>Intensidad de la expresión de FAK</b>	<b>Número</b>	<b>Supervivencia número (%)</b>	<b>Tiempo de supervivencia (meses) media; mediana, IC95%</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b><i>p</i></b>
+	27	13 (48)	96,9; 125 (72 - 121)		
++	32	12 (37)	46; 22 (30 - 61)	7,9	0,01
+++	32	19 (59)	114; 131 (80 - 148)		

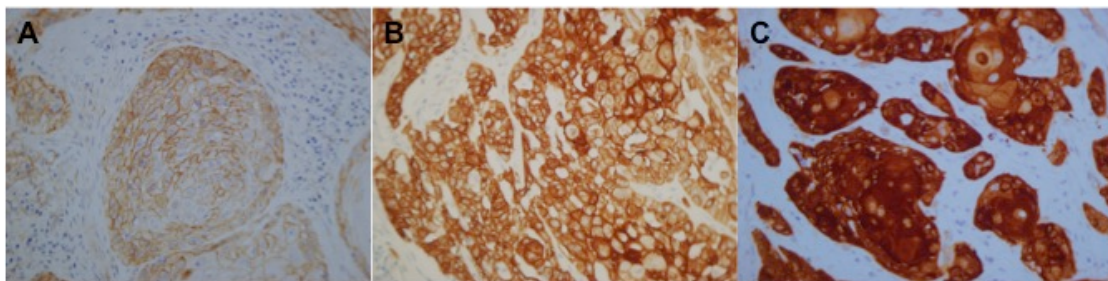
**Tabla 24:** Análisis de supervivencia en función de la expresión de FAK.



**Figura 13:** Curva de supervivencia de Kaplan-Meier en pacientes con carcinoma de células escamosas oral categorizados por expresión de FAK.

## Análisis de la expresión de cortactina

En la expresión de cortactina se valoró la intensidad de su expresión, la cual, en los casos en que fue positiva, se asignó a una escala de tres niveles: en 2 casos (2,2%) la expresión fue negativa, en 36 casos (39,1%) la expresión fue leve (+)(Figura 14-A), en otros 36 casos (39,1%) fue moderada (++) (Figura 14-B) y, finalmente, en 18 casos (19,6%) fue intensa (Figura 14-C).



**Figura 14:** Análisis inmunohistoquímico de la expresión de CTTN en COCE.

*A: Expresión leve. B: Expresión moderada. C: Expresión fuerte.*

### *Asociación entre la expresión de cortactina y variables clínico-patológicas*

De todas las variables clinicopatológicas estudiadas, la intensidad de la inmunoexpresión de cortactina, tan solo se asoció significativamente con la aparición de segundos tumores primarios ( $p = 0.02$ ) (Tabla 25). Agrupando la intensidad de expresión de cortactina en dos grupos, por un lado los casos en los que la expresión fue negativa, débil o moderada y, por otro, los casos en los que la expresión fue intensa, el riesgo de desarrollar un segundo tumor primario fue, en el primer grupo, de 0,041 y, en el segundo, de 0,222; con un riesgo relativo (RR) de 6,67.

	<b>Intensidad de la inmunoexpresión de cortactina</b>				<b>p</b>
	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>+++</b>	
<b>Sexo</b>					
Masculino	2	21	26	12	0,51
Femenino	0	15	10	6	
<b>Consumo de tabaco</b>					
Fumadores	2	16	24	10	0,42
No fumadores	0	14	9	4	
Exfumadores	0	4	3	2	
<b>Consumo de alcohol</b>					
Habitual	2	17	23	9	0,50
No bebedores	0	17	13	7	
<b>Localización tumoral</b>					
Lengua	1	18	14	6	0,34
Suelo oral	0	6	9	7	
Encía	1	9	6	3	
Paladar	0	1	0	1	
Yugal	0	2	2	0	
Retromolar	0	0	5	1	
<b>T</b>					
T1	0	7	6	6	0,46
T2	0	15	10	7	
T3	1	5	8	1	
T4	1	9	12	4	
<b>N</b>					
N0	0	23	18	11	0,27
N+	2	13	18	7	

**Tabla 25:** Asociación entre intensidad de tinción de cortactina y características clínico-patológicas. (Continúa →)

	<b>Intensidad de la</b>	<b>P</b>
--	-------------------------	----------

	<b>inmunoexpresión de cortactina</b>				
	-	+	++	+++	
<b>Estadio</b>					
I	0	6	3	5	
II	0	8	7	2	0,67
III	0	8	8	5	
IV	2	14	18	6	
<b>Diferenciación tumoral</b>					
Bien	1	23	22	12	
Moderado	1	10	11	6	0,89
Poco	0	3	3	0	
<b>Recidiva</b>					
No	2	23	19	13	
Sí	0	13	17	5	0,43
<b>Segundo tumor primario</b>					
No	2	33	35	14	
Sí	0	3	0	4	0,02

**Tabla 25:** Asociación entre intensidad de tinción de cortactina y características clínico-patológicas.

### **Asociación entre cortactina y supervivencia**

En el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier, la inmunoexpresión de cortactina no ha mostrado relación con supervivencia ( $p = 0,66$ ) (Tabla 26).



Intensidad de la expresión de cortactina	Número	Supervivencia número (%)	Tiempo de supervivencia (meses) media, mediana, IC95%	$\chi^2$	<i>p</i>
Negativa, +, ++	74	36 (48,6)	97,4; 69 (76,3 – 118,5)	0,18	0,66
+++	18	9 (50)	75; 60 (45,1 – 104,8)		

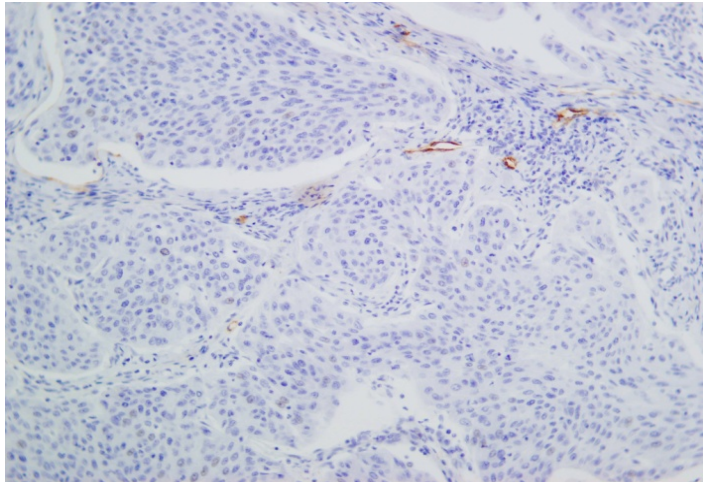
**Tabla 26:** Medias y medianas del análisis de supervivencia.

## Análisis de la expresión de podoplanina

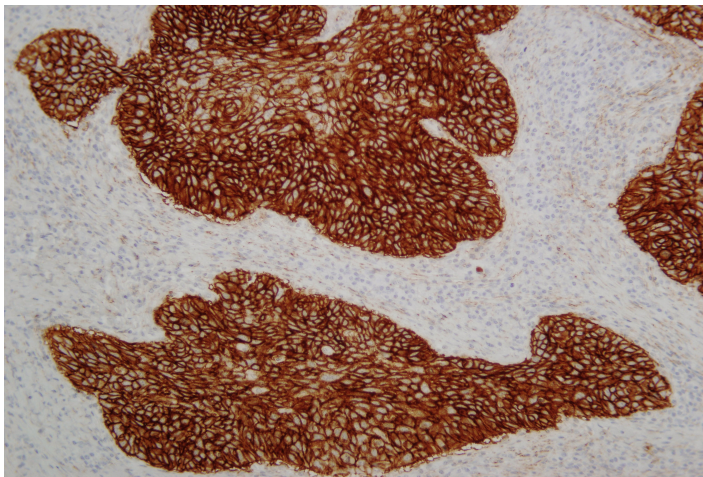
La expresión de podoplanina en el endotelio de los vasos linfáticos se utilizó como control positivo. (Figura 15) Se diferenciaron dos patrones predominantes en el tejido tumoral, difuso (Figura 16-A) y periférico (Figura 16-B). En ambos casos la tinción celular fue predominantemente membranosa.

De las 92 muestras analizadas, 4 (4,3%) no exhibieron tinción, 30 (33%) mostraron un patrón difuso y 58 (63%) un patrón periférico (Figura 16).

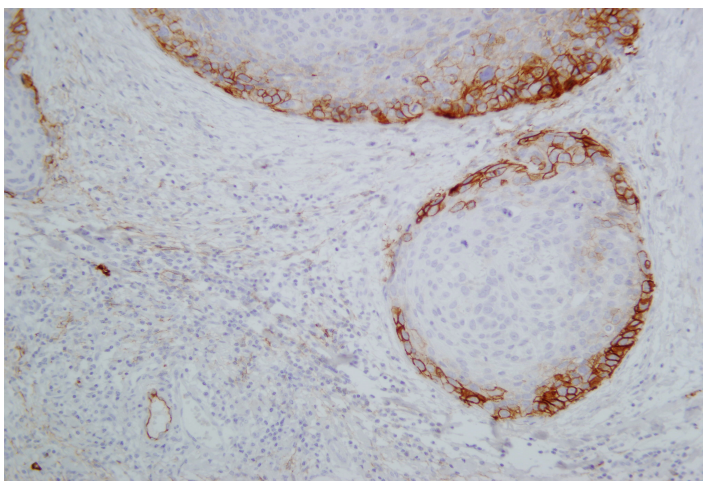
La intensidad de la tinción fue débil (Figura 17-A) (+) en 30 casos (32%), moderada (Figura 17 -B) (++) en 36 casos (40%) e intensa (Figura 17- C) (+++) en 26 casos (28%).



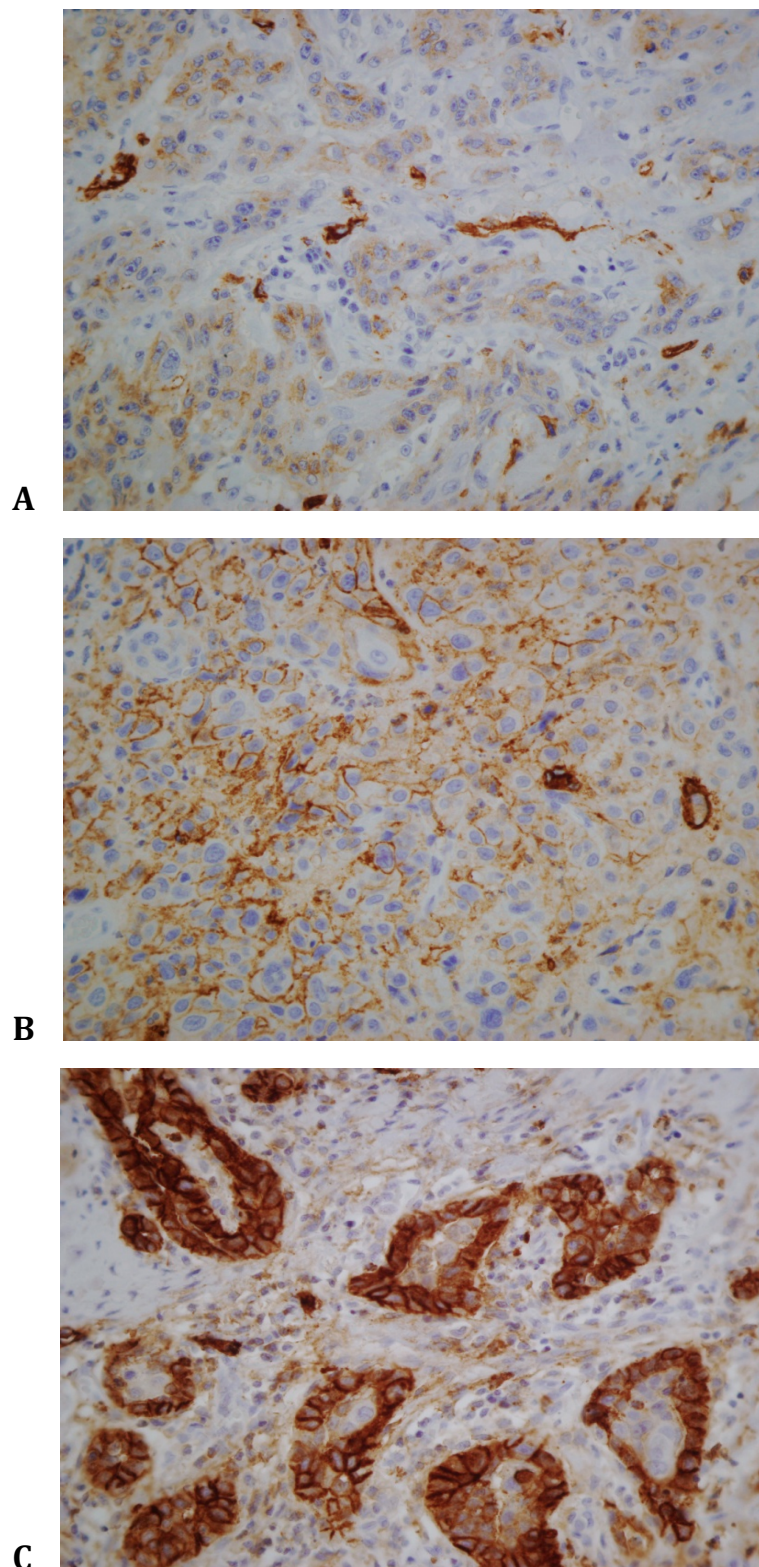
**Figura 15:** Tumor de células escamosas con tinción negativa para podoplanina. Vaso linfático con tinción positiva (control interno)



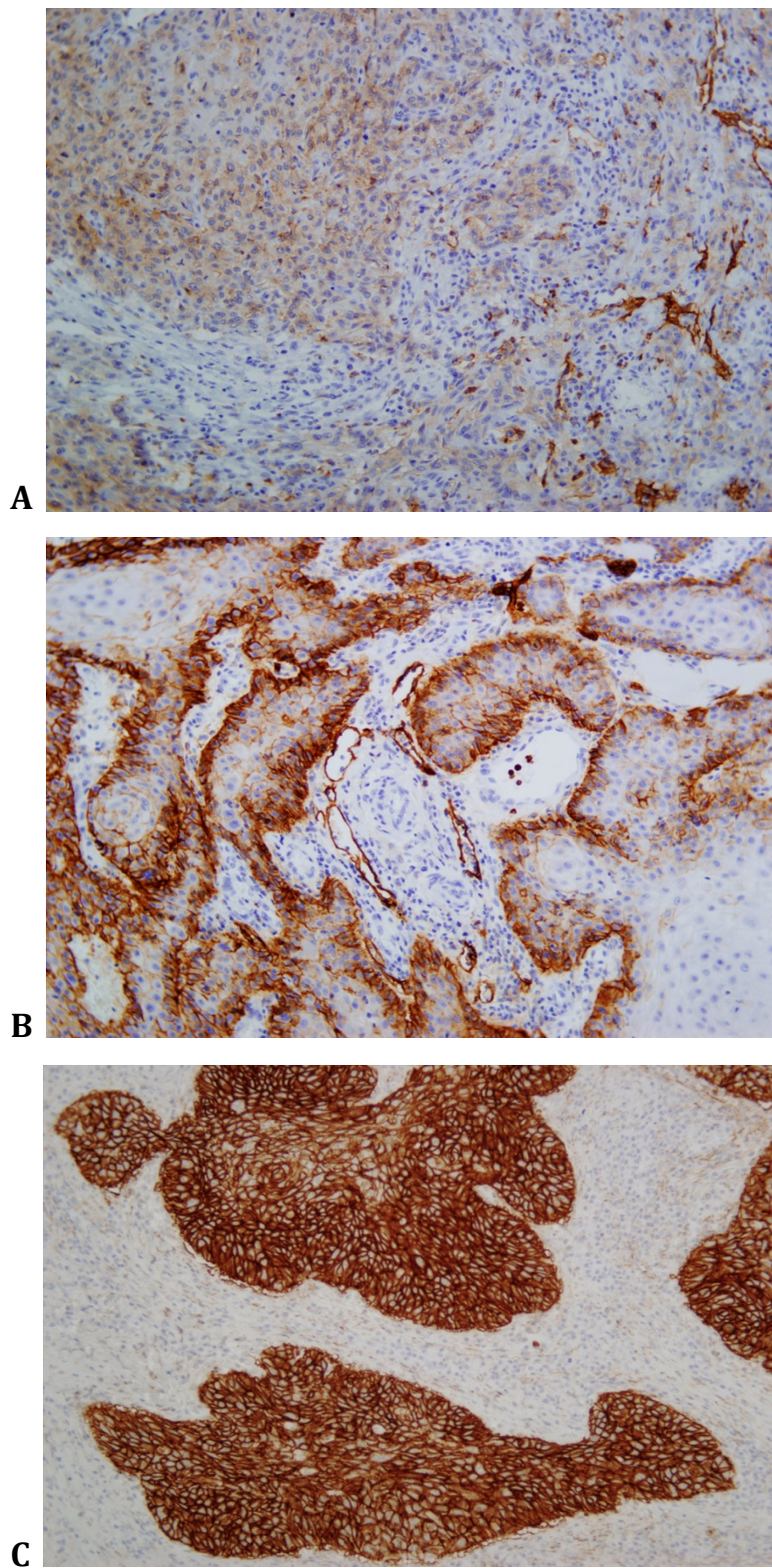
**Figura 16-A:** Patrón difuso.



**Figura 16-B:** Patrón periférico



**Figura 17:** *A – Intensidad débil (+); B – Intensidad moderada (++); C – Intensidad elevada (+++).*



**Figura 18:** *A* < 33% de células teñidas; *B* 34%-66% de células teñidas; *C* >66% de células teñidas.

Con respecto al recuento celular, se observó expresión baja (Figura 18-A) (<33% células teñidas) en 34 casos (38%), expresión moderada (Figura 18 -B) (entre un 34% y un 66% de las células) en 33 casos (36%) y expresión alta (Figura 18 - C) (por encima del 66% de células positivas) en 21 casos (22%).

Para el análisis de los datos, se consideraron con baja expresión aquellas preparaciones con un *score*  $\leq 4$ , mientras que aquellas con *score*  $>4$  se consideraron como de intensidad alta.

<b>Características</b>	<b>Número</b>	<b>%</b>
<b>Inmunolocalización</b>		
Difuso	30	33
Periférico	58	63
Negativo	4	4
<b>Recuento celular</b>		
1-33%	34	38
34-66%	33	36
>66%	21	22
Negativo	4	4
<b>Intensidad</b>		
+	26	28
++	36	40
+++	26	28
Negativo	4	4
<b>Score</b>		
$\leq 4$	60	65
$> 4$	32	35

**Tabla 27:** Resumen de la valoración de la expresión de podoplanina.

### *Asociación entre podoplanina y variables clínico-patológicas*

La expresión de podoplanina se asoció con el grado histológico del tumor ( $p = 0,003$ ).

La tinción difusa de podoplanina disminuyó significativamente del 43% en el caso de tumores bien diferenciados al 37% en los moderadamente diferenciados y al 20% en los carcinomas poco diferenciados.

El patrón periférico se observó en un 72% de tumores bien diferenciados, en un 27% de los moderadamente diferenciados y en ningún caso de los carcinomas poco diferenciados.

De los pacientes que manifestaron un patrón de tinción difuso, el 13% presentaron un segundo tumor primario a lo largo del seguimiento, frente a un 3% en el caso de aquellos con patrón periférico ( $p=0,055$ ).

	Inmunolocalización de podoplanina			<i>p</i>
	Negativo	Difuso	Periférico	
<b>Sexo</b>				
Hombre	3	21	37	0,85
Mujer	1	9	21	
<b>Consumo de tabaco</b>				
Fumadores	1	5	21	0,29
No fumadores	3	19	30	
Exfumadores	0	3	6	
<b>Consumo de alcohol</b>				
Habitual	2	20	29	0,11
No bebedores	2	7	28	

**Tabla 28:** Asociación entre el patrón de tinción de podoplanina y las características clínico-patológicas. (Continúa →)

	<b>Inmunolocalización de podoplanina</b>			<i>p</i>
	<b>Negativo</b>	<b>Difuso</b>	<b>Periférico</b>	
<b>Localización tumoral</b>				
Lengua	0	11	28	0,21
Suelo oral	0	9	13	
Encía	3	6	10	
Paladar	0	1	1	
Yugal	0	1	3	
Retromolar	1	2	3	
<b>T</b>				
T1	1	4	14	0,11
T2	0	9	23	
T3	0	5	10	
T4	3	12	11	
<b>N</b>				
N0	3	18	31	0,70
N+	1	12	27	
<b>Estadio</b>				
I	1	3	10	0,48
II	0	4	13	
III	0	7	14	
IV	3	16	21	
<b>Diferenciación tumoral</b>				
Bien	3	13	42	0,003
Moderado	1	11	16	
Poco	0	6	0	
<b>Recidiva</b>				
No	3	21	33	0,47
Sí	1	9	25	
<b>Segundo tumor primario</b>				
No	3	25	56	0,06
Sí	1	4	2	

**Tabla 28:** Asociación entre el patrón de tinción de podoplanina y las características clínico-patológicas.

La proporción de células teñidas (Tabla 29) y el *score* (Tabla 30) se asoció significativamente con el grado de diferenciación tumoral ( $p=0,03$  y  $p=0,01$ , respectivamente). El 43% de los tumores bien diferenciados, el 38% de los moderadamente diferenciados y el 19% de los poco diferenciados, expresaron podoplanina en más del 66% de sus células. De manera similar, el 43% de los tumores bien diferenciados, el 43% de los moderadamente diferenciados y el 12% de los poco diferenciados obtuvieron un *score* superior a 4.

	Inmunoexpresión de podoplanina				<i>p</i>
	Negativo	1-33%	34-66%	>66%	
<b>Sexo</b>					
Masculino	3	21	21	16	0,42
Femenino	1	14	12	5	
<b>Consumo de tabaco</b>					
Fumadores	3	18	19	12	0,07
No fumadores	0	14	11	2	
Exfumadores	0	2	33	4	
<b>Consumo de alcohol</b>					
Habitual	2	17	18	14	0,24
No bebedores	1	17	15	4	
<b>Localización tumoral</b>					
Lengua	0	20	11	8	<0,05
Suelo oral	0	6	6	10	
Encía	2	7	9	1	
Paladar	0	0	2	0	
Yugal	0	1	2	1	
Retromolar	1	1	3	1	

**Tabla 29:** Asociación entre la expresión de podoplanina y las características clínico-patológicas (Continúa →)



	Inmunoexpresión de podoplanina				<i>p</i>
	Negativo	1-33%	34-66%	>66%	
<b>T</b>					
T1	0	7	8	4	0,70
T2	0	13	11	8	
T3	0	7	4	4	
T4	3	8	10	5	
<b>N</b>					
N0	2	20	18	12	0,98
N+	1	15	15	9	
<b>Estadio</b>					
I	0	6	5	3	0,81
II	0	7	7	3	
III	0	9	5	7	
IV	3	13	16	8	
<b>Diferenciación tumoral</b>					
Bien	2	28	19	9	0,03
Moderado	1	7	12	8	
Poco	0	0	2	4	
<b>Recidiva</b>					
No	2	21	19	15	0,83
Sí	1	14	14	6	
<b>Segundo tumor primario</b>					
No	3	33	30	18	0,63
Sí	0	2	2	3	

**Tabla 29:** Asociación entre la expresión de podoplanina y las características clínico-patológicas

La proporción de células teñidas se correlacionó con la localización tumoral. En el 38% de los carcinomas de lengua y en el 47% de los carcinomas del suelo oral, se observó una tinción positiva en más del 66% de sus células, mientras que en el resto de localizaciones tumorales esta

proporción se observó en menos del 5% de los casos ( $p < 0,05$ ). Además los carcinomas de lengua y suelo oral mostraron tinciones de intensidad fuerte (38% y 34% respectivamente) y *scores* > 4 en un 40% y 37% de los casos, con respecto a otras localizaciones donde se mantuvieron entre un 0 y un 11% de los casos.

No se observó relación entre la expresión de podoplanina y el resto de características clínico-patológicas.

	Intensidad de podoplanina				<i>p</i>	Score		<i>p</i>
	-	+	++	+++		≤4	>4	
<b>Sexo</b>								
Masculino	3	17	21	20	0,50	38	23	0,49
Femenino	1	9	15	6		22	9	
<b>Consumo de tabaco</b>								
Fumadores	3	16	16	17	0,85	33	19	0,15
No fumadores	1	7	14	5		21	6	
Exfumadores	0	2	4	3		5	4	
<b>Consumo de alcohol</b>								
Habitual	2	14	17	18	0,36	31	20	0,17
No bebedores	2	11	17	7		28	9	
<b>Localización tumoral</b>								
Lengua	0	13	16	10	0,02	26	13	0,03
Suelo oral	0	2	11	9		10	12	
Encía	3	6	7	3		16	3	
Paladar	0	1	1	0		2	0	
Yugal	0	1	0	3		1	3	
Retromolar	1	3	1	1		5	1	

**Tabla 30:** Asociación entre intensidad de tinción de podoplanina y el score (intensidad x porcentaje) y características clínico-patológicas.  
(Continúa →)

	Intensidad	de	<i>p</i>	Score	<i>p</i>
--	------------	----	----------	-------	----------

	podoplanina						≤4	>4	
	-	+	++	+++					
<b>T</b>									
T1	1	3	10	5		11	8		
T2	0	9	15	8	0,29	21	11	0,70	
T3	0	6	3	6		9	6		
T4	3	8	8	7		19	7		
<b>N</b>									
N0	3	13	23	13	0,53	33	19	0,68	
N+	1	13	13	13		27	13		
<b>Estadio</b>									
I	1	3	7	3		9	5		
II	0	4	11	2	0,26	12	5	0,83	
III	0	6	6	9		12	9		
IV	3	13	12	12		27	13		
<b>Diferenciación tumoral</b>									
Bien	3	21	22	12		44	14		
Moderado	1	4	12	11	0,23	14	14	0,01	
Poco	0	1	2	3		2	4		
<b>Recidiva</b>									
No	3	16	21	17	0,92	36	21	0,59	
Sí	1	10	15	9		24	11		
<b>Segundo tumor primario</b>									
No	3	24	33	24	0,57	55	29	0,69	
Sí	1	2	2	2		4	3		

**Tabla 30:** Asociación entre intensidad de tinción de podoplanina y el score (intensidad x porcentaje) y características clínico-patológicas.

### *Asociación entre podopanina y supervivencia*

En el análisis univariante de supervivencia de Kaplan-Meier (Tabla 31) el estadio T ( $p=0,01$ ), la presencia de metástasis ganglionares ( $p=0,01$ ), el estadio clínico ( $p=0,004$ ), la localización tumoral ( $p=0,04$ ), el estado del borde de resección ( $p<0,0005$ ) y la recidiva tumoral ( $p<0,0005$ ) se asociaron significativamente con una peor supervivencia.

<b>Factor pronóstico</b>	<b>Número</b>	<b>Supervi- vencia número (%)</b>	<b>Tiempo de supervivencia (meses) media, mediana, IC95%</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b><math>p</math></b>
<b>Sexo</b>					
Hombre	64	31 (48)	95,60,(26-94)	1,105	0,29
Mujer	36	20 (56)	99,125,(80-169)		
<b>T</b>					
T1 +T2	58	33 (57)	103, 125,(79-171)	5,56	0,01
T3 + T4	42	18 (43)	76, 47, (2-92)		
<b>N</b>					
N0	60	36 (60)	103, 125, (83-198)	6,5	0,01
N+	40	15(37)	76, 47, (2-92)		
<b>Estadio</b>					
I + II	38	24(63)	115, 141, (83-198)	8,341	0,004
III+IV	62	27(43%)	82, 37, (6-68)		
<b>Localización tumoral</b>					
Lengua	43	18(42)	71,53, (25-80)	11,3	0,04
Suelo oral	26	16(61)	103, 131, (0-265)		
Encía	19	10(52)	93, 125, (56-193)		
Paladar	2	2(100)			
Yugal	4	3(75)	126		
Retromolar	6	2(33)	32, 8, (0-20)		

**Tabla 31:** Análisis univariante en función de factores pronósticos (Kaplan-Meier) (Continúa →)

<b>Factor pronóstico</b>	<b>Número</b>	<b>Supervivencia número (%)</b>	<b>Tiempo de supervivencia (meses) media, mediana, IC95%</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b><i>p</i></b>
<b>Diferenciación tumoral</b>					
Bien	64	32(50)	90, 93, (29-156)	0,73	0,69
Moderado	30	17(56)	83, 77, (28-126)		
Poco	6	2(33)	76, 13, (0-43)		
<b>Margen tumoral</b>					
Libre	90	50(55)	107, 125, (63-186)	26,8	<0,0005
Afecto	10	1(10)	17, 7, (5-9)		
<b>Recidiva</b>					
No	64	48(75)	123, 141, (119-162)	41,9	<0,0005
Sí	36	3(8)	40, 18, (7-28)		
<b>Segundo tumor primario</b>					
No	89	45(51)	88, 61, (12-110)	0,55	0,4
Sí	10	5(50)	115, 125, (90-159)		
>4	32	15(47)	72, 43, (0-92)		

**Tabla 31:** Análisis univariante de supervivencia en función de factores pronósticos (Kaplan-Meier)

La supervivencia en los casos que mostraron un patrón periférico o un score >4 no mostró un descenso significativo frente a aquellos con patrón difuso o score  $\leq 4$  ( $p=0,45$  y  $p=0,52$  respectivamente) (Tabla 32).

Factor pronóstico	Número	Supervi vencia número (%)	Tiempo de supervivencia (meses) media, mediana, IC95%	$\chi^2$	$p$
<b>Inmunolocalización de podoplanina</b>					
Negativa	4	1(25)	66, 14, (0-93)		
Difuso	30	17(57)	102, 131, (50-211)	1,598	0,45
Peritérico	58	27(46)	83, 59, (35-82)		
<b>Expresión de podoplanina</b>					
Negativa	3	1(33)	24, 14, (0-31)		
1-33%	35	15(43)	71, 56, (40-71)	3,323	0,34
34-66%	33	19(57)	114, 141, (17-264)		
>66%	21	10(47)	75, 43, (7-78)		
<b>Intensidad de podoplanina</b>					
Negativa	4	1(25)	66, 14, (0-93)		
+	26	13(50)	98, 56, (0-148)	1,983	0,57
++	36	20(55)	92		
+++	26	11(42)	69, 37, (0-48)		
<b>Score</b>					
$\leq 4$	60	30(50)	100, 77, (8-145)	0,401	0,52
>4	32	15(47)	72, 43, (0-92)		

**Tabla 32:** Análisis univariante de supervivencia en función de la expresión de podoplanina (Kaplan-Meier)

---

En estadios iniciales (T1-2) los pacientes con score >4 presentaron una menor supervivencia, con una media de 43 meses frente a 141 meses de los que puntúan por debajo de 4 ( $p=0,04$ ). Sin embargo, esta relación no se mantiene en tumores de mayor tamaño o extensión.

En pacientes N0 con score >4 se observa también una peor supervivencia que en aquellos de score <4, no siendo esta diferencia significativa ( $p = 0,08$ ).

En el análisis multivariante de Cox únicamente se confirman como predictores independientes de baja supervivencia la presencia de márgenes de resección afectos (HR = 5,17; 95%CI = 2,3 a 11,4;  $p < 0,0005$ ) y la recidiva tumoral (HR = 5,49; 95%CI = 2,9 a 10,2;  $p < 0,0005$ ).





## 6.DISCUSIÓN



---

## DISCUSIÓN

Existe un gran interés en identificar marcadores moleculares que aumenten la sensibilidad y mejoren el poder predictivo de las actuales técnicas diagnósticas clínico-patológicas y que ayuden a predecir el riesgo de malignización en pacientes con TOPC y a distinguir diferentes niveles pronósticos en pacientes con COCE.

En este estudio hemos observado que la inmunexpresión de las proteínas FAK, CTTN y podoplanina, en TOPC parece ser un mejor predictor independiente del riesgo de progresión a cáncer que el grado de displasia histológica.

Dado que en las últimas décadas apenas ha mejorado la supervivencia de pacientes con COCE, también es necesario profundizar en la búsqueda de dianas moleculares que nos permitan aumentar la eficacia de los tratamientos actuales y mejorar el control de la enfermedad con combinaciones de fármacos adaptadas a las condiciones biológicas de cada tumor con mayor eficacia, selectividad y menor toxicidad que los quimioterápicos de uso convencional.

### **Consideraciones sobre las muestras de pacientes estudiadas y parámetros clínico-patológicos**

## TRASTORNOS ORALES POTENCIALMENTE CANCERIZABLES

Los TOPC representan un campo de difícil estudio debido a los cambios en la nomenclatura y definición que han sufrido desde sus

---

primeras descripciones. Si analizamos la literatura existente sobre TOPC, observamos que los criterios de inclusión y exclusión, los intervalos de seguimiento y las características de los pacientes, varían según los distintos autores, dificultando la comparación de nuestros resultados con los suyos <sup>156,157</sup>.

Decidimos, basándonos en la literatura<sup>156,157</sup>, excluir del estudio de supervivencia a los pacientes que desarrollaron un CCE en los 6 meses posteriores a la biopsia, eliminado así el posible error en la elección de la zona de la toma de biopsia. Las características de los pacientes en el presente estudio, tales como edad y sexo fueron similares a las de otros estudios publicados previamente<sup>152,158</sup>. Estas similitudes indican que los resultados de nuestro estudio serían fácilmente generalizables, lo que sugiere una razonable validez externa. En nuestra cohorte, hemos observado una edad media de aparición de los TOPC que se sitúa en torno a los 64 años, edad ligeramente superior a la reflejada en otros estudios que la sitúan entre la cuarta y la sexta década de la vida<sup>159, 160</sup>.

En cuanto al sexo, observamos una afectación similar entre hombres y mujeres obteniendo una relación de 1:1, resultados similares a los encontrados por otros autores <sup>161, 162</sup>.

El factor etiológico más claramente relacionado con la leucoplasia es el consumo de tabaco en todas sus formas<sup>98, 163</sup>. Este se ha asociado a un riesgo 6 veces mayor de desarrollo de leucoplasia cuando se comparan fumadores con no fumadores<sup>164</sup>. Se ha demostrado también la existencia de una relación dosis- respuesta, es decir, se asiste a un aumento del riesgo de aparición de leucoplasia a medida que aumenta el número de cigarrillos consumidos por día<sup>165</sup>.

En nuestro estudio, el porcentaje de fumadores fue del 60% en la muestra de FAK y CTTN y del 80% en la muestra de podoplanina. El consumo de alcohol se situó en el 48% y el 60% respectivamente. Estas cifras son

---

análogas a las encontradas en estudios similares<sup>166, 167</sup>. En nuestra primera cohorte, 17 pacientes de 64 (26%) sufrieron una transformación maligna, mientras que 13 de 58 (22,4%) lo experimentaron en la segunda cohorte, cifras similares a las referidas por Liu<sup>162</sup> (26,8%), Ho<sup>168</sup> (24,2%) y Silverman<sup>166</sup> (36%).

## CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS

Aunque los carcinomas de células escamosas localizados en la región de la cabeza y el cuello presentan características clínico-patológicas similares, la biología tumoral muestra cambios significativos de una localización a otra. Agrupar lesiones de distintas localizaciones supone una pérdida de información respecto al comportamiento de lesiones asentadas en localizaciones específicas. Un buen ejemplo de ello lo constituye la combinación de los cánceres labial e intraoral. Con el objetivo de estudiar una muestra más homogénea, en el presente estudio nos limitamos a los tumores localizados dentro de la cavidad oral: lengua, suelo de boca, encía del reborde alveolar superior e inferior, mucosa yugal, paladar duro y trigono retromolar.

Al analizar la supervivencia del cáncer oral, es de obvia importancia asegurarse de que todos los pacientes fueron examinados durante un tiempo de seguimiento mínimo, dentro del cual suelen ocurrir la mayoría de las muertes asociadas a esta enfermedad. Whitehurst y Droulias<sup>169</sup> han descrito que el 85% de las recidivas del cáncer de lengua ocurren en el primer año, 95% en los 2 primeros años y el 100% en los 3 primeros años. A su vez, Decroix y Ghossein<sup>170</sup> han descrito que la mayoría de las muertes asociadas a la enfermedad, en los pacientes con cáncer de lengua, ocurren en los 3 primeros años post-tratamiento. En nuestro estudio todos los

---

pacientes presentaron un seguimiento mínimo de 5 años o hasta que ocurrió la muerte por la enfermedad neoplásica.

El grupo de pacientes analizado mostró una media de edad similar a las descritas en otros estudios<sup>166-169</sup>. La proporción entre hombres y mujeres también se aproximó a las descritas en la mayoría de los estudios<sup>166</sup>.

El pronóstico de los pacientes con CCEO es determinado directamente por la extensión y en particular la diseminación del tumor a los ganglios linfáticos cervicales<sup>16,17,20</sup>. El sistema TNM es aceptado mundialmente como un sistema de clasificación para el cáncer. Este sistema valora la extensión anatómica de los tumores sólidos malignos, la cual es uno de los indicadores más importantes para el tratamiento y un importante factor de predicción del pronóstico.

Algunos estudios parecen indicar que la diseminación metastásica a los ganglios linfáticos cervicales se correlaciona directamente con el tamaño del tumor primario<sup>171</sup>. Se ha demostrado que tumores T1 de lengua y suelo de boca presentan metástasis cervicales en el 14% y el 11%, respectivamente, mientras los tumores T4 las presentan en el 76,5% y el 53,5%, respectivamente<sup>171</sup>.

El grado de diferenciación tumoral ha sido considerado como un factor predictivo importante de la diseminación tumoral a los ganglios linfáticos cervicales<sup>172</sup>. Los tumores menos diferenciados se asociaron con una mayor incidencia de recidivas locales y un menor intervalo libre de enfermedad<sup>172</sup>. Además, los tumores bien diferenciados presentaron un pronóstico más favorable en comparación con los tumores moderadamente diferenciados<sup>172</sup>.

Para algunos autores, uno de los factores pronósticos individuales más importantes es la extirpación quirúrgica completa de la lesión, siendo

---

el fracaso en la erradicación del tumor primario la principal causa de muerte en estos pacientes. Si las células neoplásicas están presentes en el margen de resección, la tasa de recidiva local aumenta sustancialmente y la tasa de supervivencia disminuye<sup>173</sup>. Por otro lado, la identificación de los márgenes quirúrgicos positivos para infiltración neoplásica mediante histología parece ser insuficiente, por lo que se ha propuesto un sistema de estadiaje molecular basado en alteraciones genéticas para detectar células neoplásicas. La detección de mutaciones en el gen P53 mediante PCR, permitió la identificación de células neoplásicas en pacientes con márgenes quirúrgicos negativos histológicamente, prediciendo la aparición de recidivas locales<sup>174</sup>. La presencia de alteraciones genéticas en el epitelio histológicamente normal adyacente al tumor podría explicar la falta de relación entre el estado de los bordes quirúrgicos y la supervivencia encontradas en éste y otros estudios<sup>174</sup>.

## Consideraciones sobre los marcadores

### CTTN y FAK

Como hemos comentado previamente, la carcinogénesis oral es un proceso de múltiples etapas que resulta de la acumulación y la interacción de diversos eventos moleculares en varios cromosomas y genes a lo largo del tiempo de desarrollo del cáncer.<sup>175</sup>

La cortactina puede ser candidato a marcador de progresión a cáncer debido a sus múltiples funciones biológicas. En estudios previos, se ha demostrado que CTTN promueve la progresión del ciclo celular mediante la regulación negativa de la expresión de p21<sup>WAF1 / Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> y p57<sup>Kip2</sup> y modula los niveles de Cip/Kip CDKIs<sup>176</sup>. La cortactina es una proteína de

---

unión a la actina relacionada con vías de señalización de tirosin-quinasas y Rho GTPasa que desembocan en cambios estructurales en el citoesqueleto. Cortactina también es un sustrato de c-Src. La activación de esta familia de tirosina quinazas está críticamente involucrada en la migración de células de carcinoma, la degradación de la matriz extracelular y el comportamiento invasivo<sup>176</sup>. Se postula que c-Src se comporta como una diana de regulación a la baja del EGFR en las células cancerosas<sup>177</sup>. Estos resultados proporcionan indicios importantes sobre el papel oncogénico de cortactina y su sobreexpresión se ha asociado con carcinogénesis, presencia de metástasis ganglionares y peor pronóstico<sup>178, 179</sup>.

Los resultados de varios estudios en cultivos celulares<sup>180,181</sup> han contribuido enormemente a caracterizar las funciones biológicas de CTTN en procesos relativos a la tumorigénesis y a identificar las asociaciones de CTTN. Estos indican que la sobreexpresión de CTTN incrementa la migración celular y la invasión en gran variedad de tumores<sup>182, 183, 184</sup>. Se ha postulado también que cortactina podría participar en la endocitosis mediada por el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Por lo tanto, la sobreexpresión de cortactina atenúa la regulación a la baja inducida por ligando de EGFR y da lugar a la activación sostenida de la señalización del EGFR, por lo que la sobreexpresión de CTTN ha sido ligada a la resistencia al inhibidor de la quinasa EGFR, Gefitinib <sup>185</sup>, subrayando que la *CTTN* también puede tener un importante papel en la respuesta terapéutica de los CECC. La amplificación de 11q13 es una alteración genética prevalente en los CECC<sup>58-60</sup>. Los casos con amplificación desarrollan con mayor frecuencia recidivas y tienen un incremento del riesgo de muerte asociado al tumor <sup>186, 187</sup>. El gen *CTTN*, localizado en esta región amplificada, ha sido intensamente estudiado como conductor potencial de esta amplificación. Varios estudios <sup>58-60</sup> han demostrado la asociación de la amplificación de *CTTN* con el crecimiento agresivo



---

tumoral, la presencia de metástasis linfáticas y un peor pronóstico en distintos tipos de carcinomas.

Por su parte, FAK podría contribuir a la carcinogénesis oral incrementando la proliferación celular y suprimiendo la apoptosis celular.<sup>188</sup> Además, FAK controla la regulación dinámica de las adhesiones focales, las adherencias célula-célula cadherin-dependientes y las estructuras periféricas de actina<sup>124, 132</sup>. FAK también se ha implicado en la expresión de las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) y por lo tanto en la invasión mesenquimal, y tiene un papel directo en el crecimiento del tumor, a través de la vía ERK-MAPK<sup>189</sup>.

La amplificación de la región 8q23-24 ha sido definida como un importante evento inicial en la carcinogénesis de los COCE y el gen *FAK/PKT2* se ha revelado como uno de los más importantes de dicha región. La sobreexpresión de la proteína FAK, aunque no siempre se corresponde con una amplificación del gen *FAK*, ha sido documentada en los CECC<sup>132</sup>. Ocurre como evento precoz de la transformación maligna en los carcinomas de células escamosas, asociándose a un aumento de la invasividad y el potencial metastásico de estos tumores<sup>120</sup>.

La proteína tirosina quinasa Src integra varias vías de señalización implicadas en procesos de proliferación, invasión y adhesión entre otros. Se ha descrito que la sobreactivación de Src está asociada con la progresión tumoral y el potencial metastásico, por lo que la inhibición de la vía de señalización de la quinasa Src podría representar una atractiva diana terapéutica en cáncer<sup>190</sup>. Cortactina y FAK son importantes dianas de regulación por Src, que poseen un papel clave como reguladores de invasión. Inhibidores de la actividad quinasa de Src, como Saracatinib y

---

Dasatinib, se encuentran actualmente sometidos a ensayos clínicos.<sup>191, 192, 193,194.</sup>

Hasta donde sabemos, en el presente estudio hemos analizado por primera vez el papel de la expresión proteica de CTTN y FAK en la transformación maligna de los TOPC, relacionando los datos con parámetros clínico-patológicos y pronósticos. Nuestros resultados muestran que tanto FAK como CTTN se sobreexpresan en las primeras etapas de la tumorigénesis oral y que aquellos pacientes con expresión fuerte de CTTN o FAK en lesiones displásicas presentan una incidencia de cáncer significativamente mayor que aquellos con expresión débil o moderada. Por otro lado, en este estudio se encontró una expresión débil o moderada de CTTN en cuatro de los 17 COCE (23%), lo que pone de manifiesto la diversidad genética de estos tumores. Este hallazgo es congruente con la presencia de un gen supresor con mayor actividad represora que el potencial oncogénico de CTTN, también situado en 11q13 y adyacente a la región de CTTN<sup>176</sup>.

Se ha descrito que la presencia de displasia en el epitelio de la cavidad oral se asocia con una mayor probabilidad de progresión a cáncer<sup>40,50</sup>. En este estudio, los pacientes con displasia grave mostraron mayor riesgo de progresión maligna (HR = 4,5), y la relación entre la histología y el riesgo de cáncer fue estadísticamente significativa en el análisis univariante. Además, en el análisis univariante, la expresión de CTTN y/o FAK fueron predictores significativos de riesgo desarrollo de cáncer (HR de 6,3 y 6,8; respectivamente). Sin embargo, en el análisis multivariante, sólo la co-expresión de las proteínas CTTN y FAK mantuvo la significación estadística ( $p = 0,04$ ), mientras que la displasia epitelial no lo hizo ( $p = 0,069$ ). Estos datos contribuyen a reforzar el valor limitado de clasificación histopatológica en la predicción evolutiva de los TOPC.

---

En nuestra cohorte, la expresión intensa de FAK y CTTN mostró una asociación sólida con un mayor riesgo de cáncer oral y lo más importante, la co-expresión intensa de FAK y CTTN fue un predictor independiente en el análisis multivariante. Aun así, la sobreexpresión de cortactina y FAK puede no ser suficiente para promover el inicio de la tumorigénesis, dado que 4 pacientes (23%) desarrollaron cánceres a partir de lesiones que manifestaron expresión de FAK y CTTN débil o moderada. Una explicación alternativa es que estas lesiones fueran biopsiadas antes de que ocurriera la alteración molecular, o bien que el cáncer se originase a partir de otras lesiones no visibles clínicamente en el momento de la biopsia y por lo tanto no examinadas.

Nuestros resultados revelaron que la sobreexpresión de ambas proteínas en los TOPC, fue detectada en las primeras etapas de la tumorigénesis oral, y que su frecuencia aumentó a medida que lo hizo el grado de displasia, lo que sugiere que FAK y CTTN son factores importantes en la patogénesis, el desarrollo y la progresión de un subconjunto significativo de carcinomas orales de células escamosas. De acuerdo con estos datos, encontramos pacientes que muestran una sobreexpresión intensa de CTTN y/o FAK en la muestra tumoral, mientras que en la correspondiente muestra previa de TOPC la expresión de ambas proteínas fue débil o moderada. Además nuestros hallazgos muestran que la expresión de CTTN y FAK se mantiene o incrementa en el tumor con respecto a la lesión premaligna, en todos los casos estudiados. Todo ello apoya el importante papel biológico y clínico de CTTN y FAK en el desarrollo y progresión del cáncer oral.

El diagnóstico histopatológico de los TOPC es el “gold standard” usado en la práctica clínica diaria para determinar el riesgo de progresión hacia COCE y la toma de decisiones en lo relativo al seguimiento y control

---

más o menos exhaustivo de los pacientes. La combinación de CTTN y FAK mostró una mayor significación estadística en términos de valor predictivo y sensibilidad. Dado que el análisis inmunohistoquímico de cortactina y FAK es relativamente sencillo, barato y fácil de interpretar por cualquier patólogo, parece razonable recomendarlo en el estudio de las displasias de la cavidad oral. No obstante la utilización rutinaria de estos biomarcadores requiere confirmar nuestros datos mediante estudios prospectivos y multicéntricos.

### ***FAK Y CTTN y carcinomas de células escamosas***

La inmunoexpresión moderada (++) o intensa (+++) de FAK fue observada en 64 casos (69,6%), frente al 30,4% de los mismos que presentaron tinción débil o ausente. Se trata de un porcentaje similar al 69% publicado por Jiang y cols<sup>195</sup> en 2010 y superior al publicado con anterioridad por nuestro grupo (56,5%)<sup>196</sup>. Esta diferencia con nuestro estudio previo, puede ser atribuida a la calidad de la conservación de las muestras biológicas y a la variación de los anticuerpos empleados.

Diversos estudios han demostrado la existencia de una asociación estadísticamente significativa entre la sobreexpresión de FAK y la existencia de metástasis ganglionales en carcinomas de laringe<sup>130,132</sup> esófago<sup>197</sup>, mama<sup>198</sup>, colon<sup>206, 199</sup> y páncreas<sup>200</sup>. En los cánceres de la cavidad oral, también se ha sugerido el papel de FAK como marcador precoz de metástasis ganglionares<sup>201,201</sup>. Así, en el presente estudio hemos observado que la sobreexpresión de FAK (++/+++) es más frecuente en los paciente con metástasis ganglionares, siendo esta asociación estadísticamente significativa ( $p=0,045$ ). No obstante, al contrario que en nuestra anterior serie<sup>202</sup>, en el presente estudio no hemos encontrado una

---

asociación significativa entre el tamaño tumoral y el aumento de expresión de FAK.

La invasividad del carcinoma oral de células escamosas también se ha asociado con una elevada fosforilación de FAK. Schneider<sup>208</sup> realizó un análisis mediante Western Blot en dos líneas celulares de COCE con capacidad invasora baja y alta, encontrando un aumento en la expresión de FAK en la última. Desde una perspectiva clínica, estos datos se asocian con un mal pronóstico y peor supervivencia de los pacientes.

En los carcinomas de células escamosas de laringe<sup>132</sup> y de esófago<sup>204</sup> se ha objetivado la existencia de una relación significativa entre FAK y el pronóstico. En el estudio anterior de nuestro grupo<sup>202</sup> se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de FAK y la presencia de recurrencias tumorales y peores tiempos de supervivencia. En el presente estudio, no hemos hallado asociación significativa entre la expresión de FAK y la aparición de recidivas tumorales.

La supervivencia fue significativamente menor en los 32 tumores con expresión moderada de FAK ( $p = 0,01$ ). No obstante, los casos con expresión intensa mostraron una mejor supervivencia que los casos con expresión discreta. En consecuencia, observamos una asociación estadísticamente significativa entre ambas variables, pero con una ausencia de tendencia que nos sugiere que debemos interpretar estos resultados con cautela.

Con respecto a CTTN, hemos observado la existencia de sobreexpresión (++/+++ ) en el 58,7% de los casos, porcentaje superior al 45,7% publicado por Yamada y cols<sup>179</sup>. En su estudio Yamada y cols. Encontraron una asociación significativa entre la expresión de CTTN y el

---

tamaño tumoral, el estadio N y el patrón de invasión tumoral. En el presente estudio, de todas las variables clinicopatológicas estudiadas, la intensidad de la inmunexpresión de cortactina, tan solo se asoció significativamente con la aparición de segundos tumores primarios ( $p = 0,02$ ), con un riesgo relativo (RR) de 6,67.

En el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier, la inmunexpresión de cortactina no ha mostrado relación con supervivencia ( $p = 0,66$ ), hallazgo consistente con el de Rodrigo y cols<sup>141</sup>, que en su cohorte sólo encuentran relación entre la expresión de CTTN y supervivencia en la subpoblación de CCE de laringe y no en la subpoblación de faringe.

## PODOPLANINA

A pesar de que la función fisiológica de la podoplanina permanece aún desconocida, se sabe que actúa como un marcador específico de la linfangiogénesis y recientes resultados experimentales han demostrado que esta glicoproteína transmembrana tipo-mucínica participa en vías que facilitan la migración celular colectiva y la invasión tumoral<sup>144,145</sup>. Estos hallazgos sugieren que la podoplanina juega un papel en el crecimiento y reparación de los tejidos, así como en la carcinogénesis y el proceso de transformación maligna<sup>149</sup>. La podoplanina se expresa en aproximadamente el 90% de los COCE<sup>129,149</sup> y en el 37% de pacientes con TOPC<sup>152</sup>. Además, también se ha observado que la podoplanina se expresa fuertemente en algunas lesiones hiperplásicas y displásicas adyacentes a los tumores primarios, lo que indica que la sobreexpresión ocurre en estadios precoces de la tumorigénesis en los CCE<sup>129</sup>.

---

En el presente estudio hemos podido confirmar la observación de Kawaguchi<sup>152</sup> que sugiere que la expresión podoplanina en los TOPC se asocia con un mayor riesgo de transformación maligna. Este autor mostró que el 24,4% de los TOPC que no sufrieron transformación maligna, mostraron expresión de podoplanina, a diferencia del 84,6% de expresión observada en las muestras histológicas de pacientes que sí experimentaron malignización. Además, en un análisis multivariante que incluyó el hábito de fumar y la presencia de displasia epitelial, la expresión podoplanina fue el único predictor independiente significativo del desarrollo del cáncer, con un HR de 8,738. Estos datos apoyan un papel relevante de la podoplanina en estadios precoces de la transformación maligna en las lesiones orales. Se ha considerando que la podoplanina por sí sola podría no ser suficiente para promover la carcinogénesis<sup>152</sup>. En nuestro estudio, 2 (15%) COCE se desarrollaron a partir de las lesiones con expresión débil o moderada de podoplanina. Al igual que en la cohorte previa, también barajamos la posibilidad de que estas lesiones fueran biopsiadas antes de que ocurriera la alteración, o que el cáncer se originase a partir de otras lesiones no visibles clínicamente en el momento de la biopsia y por lo tanto no examinadas. En consonancia con esta idea, hemos encontrado 6 pacientes que muestran una fuerte expresión de podoplanina en el tumor invasivo con débil o moderada expresión de la proteína en el correspondiente TOPC previamente biopsiado.

Además, nuestra observación de que la expresión de podoplanina se mantiene o incluso aumenta en los tumores invasivos apoya aún más el papel de esta proteína tanto en el desarrollo como en la progresión del cáncer oral.

El hecho de que los tumores sólidos del área de la cabeza y el cuello muestren una arquitectura heterogénea en comparación con la mucosa oral sana, ha llevado a generar la hipótesis de que en estos tumores, una subpoblación de células es clonogénica<sup>202, 203</sup>. Para explicar este fenómeno,

---

se ha sugerido que sólo un pequeño subconjunto de células fenotípicamente distinto es responsable de la generación de tumores y que este subconjunto podría ser considerado como las células madre del cáncer o células iniciadoras del tumor (TICs)<sup>204</sup>. Atsumi y cols<sup>196</sup> identifican la podoplanina como un nuevo marcador de TICs en los CCE.

El papel de la podoplanina en los estadios iniciales de la tumorigénesis sigue sin esclarecerse. Las células podoplanina-positivas en el epitelio pueden representar la expansión clonal al alza de las TICs durante la carcinogénesis y los TOPC con tal expansión clonal pueden implicar un mayor riesgo de transformación maligna. Además, podoplanina está involucrada en la remodelación del esqueleto de actina y puede promover la invasión al aumentar la motilidad celular. La interacción de la pequeña cola citoplásmica de podoplanina y actina está mediada por ezrina y moesina, que son fosforilados en presencia de sobreexpresión de podoplanina<sup>149,151</sup>. Específicamente, podoplanina se co-localizada con ezrina, una proteína transmembrana que enlaza con radixina y moesina, a los filamentos de actina, mientras que también facilita la re-localización de ezrina en protuberancias de la membrana plasmática como filopodios, para reducir la expresión de E-cadherina y, en consecuencia, la adhesividad célula-célula<sup>205</sup>, y la promoción de la transición epitelial-mesenquimal debido a activación de RhoA<sup>149</sup>. El aumento de la motilidad celular explica por qué los niveles altos de expresión de podoplanina se asocian con una alta tasa de transformación maligna, debido al hecho de que las células podoplanina-positivas son más capaces de moverse dentro del tejido circundante<sup>158</sup>. Además, la podoplanina induce la migración celular a través de la formación de filopodios por regulación a la baja de las Rho GTPasas<sup>151</sup>, y también parece ser capaz de inducir la transición epitelio-mesenquimal a través de regulación a la baja de la expresión de E-cadherina<sup>150</sup>.



---

En más del 80% de COCE, la podoplanina se expresa en las células situadas en los bordes exteriores o frentes invasivos de nidos tumorales<sup>129</sup>, lo que puede sugerir que un factor(s) producido en los tejidos vecinos podría influir en la expresión de podoplanina. De hecho, el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento fibroblástico básico, y el factor de necrosis tumoral han demostrado inducir expresión de podoplanina<sup>150</sup>. Estudios recientes sugieren que el frente de invasión contiene una subpoblación de células madre de cáncer que difieren de la masa tumoral<sup>129,150,152 206</sup>. Vormittag y cols<sup>199</sup> sostienen que la invasión de carcinomas de células escamosas en el área de la cabeza y el cuello no depende de desdiferenciación celular, sino de la adquisición de células tumorales específicas que expresen podoplanina en el frente de invasión tumoral. No obstante, la función biológica de la podoplanina podría variar entre diferentes tipos de cáncer.

Como se ha mencionado con anterioridad, clásicamente la displasia epitelial se ha considerado el “gold standard” para evaluar el riesgo de desarrollar cáncer oral<sup>207</sup>. En nuestra muestra, 43 casos mostraron displasia leve, y 2 de ellos desarrollaron COCE durante el período de seguimiento. Por otro lado, 2 de 8 casos con displasia grave no desarrollaron COCE. En consecuencia, el grado de displasia epitelial no representa un predictor de riesgo inabible y probablemente tampoco fiable<sup>103</sup>. Aunque existe un acuerdo casi general de que la tasa de transformación maligna aumenta con la gravedad de la displasia, algunos autores no han observado una asociación significativa entre displasia epitelial y transformación maligna<sup>98</sup>. Específicamente Holmstrup y cols<sup>98</sup> manifestaron que sólo las leucoplasias no homogéneas y las lesiones con un tamaño superior a 200mm<sup>2</sup> estaban relacionadas con una transformación maligna. Sin embargo, no encontraron asociación estadísticamente significativa entre el resto de variables examinadas

---

(grado de displasia epitelial, localización, consumo de tabaco e intervención quirúrgica) y la transformación maligna. Por lo tanto, los biomarcadores como podoplanina podrían contribuir a aumentar la previsibilidad y fiabilidad en la evaluación del riesgo de cancerización de los TOPC y guiar el tratamiento.

### *Podoplanina y carcinomas orales de células escamosas*

La sobreexpresión de podoplanina ha sido asociada con la diseminación metastásica a los ganglios linfáticos<sup>149, 208</sup>, y con mal pronóstico<sup>129, 150, 199, 209</sup>. Sin embargo, en el presente estudio no hemos encontrado asociación entre la expresión de podoplanina y la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos o la supervivencia.

Aunque la función biológica de la podoplanina no se entiende completamente, la sobreexpresión de esta proteína puede promover la formación de extensiones de células alargadas y el aumento de la adhesión, la migración y la formación de tubos de células endoteliales vasculares<sup>210</sup>. Aunque la angiogénesis en el crecimiento y la diseminación de los tumores sólidos está bien estudiada, se sabe poco sobre el papel de linfangiogénesis en la progresión tumoral, en particular en las metástasis de los ganglios linfáticos<sup>211</sup>, al menos en parte debido a la falta de marcadores específicos de vasos linfáticos. La podoplanina es uno de los genes más altamente expresados en los cultivos de células endoteliales linfáticas humanas<sup>212</sup>. El anticuerpo monoclonal D2-40, reconoce un Mr40.000 O-ligando sialoglicoprotéico expresado en el endotelio linfático, en algunas células germinales neoplásicas y en los gonocitos fetales testiculares, es específico para podoplanina<sup>213</sup>. La linfangiogénesis tumoral se ha identificado recientemente como un parámetro pronóstico para el riesgo de metástasis en los ganglios linfáticos de los carcinomas de

---

la cabeza y el cuello<sup>214</sup>. En nuestro estudio hemos utilizado el anticuerpo D2-40 para evaluar la expresión de podoplanina en los COCE encontrando metástasis ganglionares en el 33% de los pacientes con alta expresión de podoplanina, frente a un 68% en pacientes con baja expresión de la misma (*score* 4 o inferior).

Nakayama y cols.<sup>215</sup> encontraron que los vasos podoplanin-positivos están casi siempre presentes en el margen invasivo del estroma tumoral, pero no en el interior del propio tumor. Además, Margaritescu y cols.<sup>216</sup> mostraron que la linfangiogénesis se produce ya en la lesión premaligna en pacientes con COCE. En el carcinoma colorrectal<sup>217</sup> y en el cáncer de mama<sup>218</sup>, los vasos linfáticos se encuentran casi exclusivamente en el margen invasivo del tumor. En contraste, se observaron vasos linfáticos intratumorales y peritumorales en el cáncer de próstata<sup>219</sup> y los CCE de la cabeza y el cuello y en el cáncer células escamosas de pulmón cuando el tumor expresa podoplanina<sup>220, 221</sup>. Aquellos tumores con expresión focal de podoplanina en la periferia de la masa tumoral mostraron una supervivencia global significativamente mejor que aquellos otros con expresión negativa de podoplanina. Estos resultados están en marcado contraste con las observaciones realizadas por Yuan y cols.<sup>129</sup> en los COCE, pero en consonancia con los datos publicados por Rodrigo y cols.<sup>155</sup> en el carcinoma de células escamosas de laringe.

Los hallazgos sobre una posible asociación entre la linfangiogénesis y el pronóstico no son consistentes<sup>222, 223, 224, 225</sup>. Así, Sousa y cols.<sup>223</sup> observaron una asociación significativa entre la linfangiogénesis y la afectación ganglionar, pero no entre la linfangiogénesis y la supervivencia, mientras que otros estudios encontraron que la linfangiogénesis fue un factor pronóstico de supervivencia<sup>220,222</sup>. También en el carcinoma de células escamosas del cuello uterino<sup>209</sup> y del pulmón<sup>221</sup>, la baja expresión de podoplanina se asoció con metástasis ganglionar y mal pronóstico.

---

Cueni y cols.<sup>226</sup> encontraron, en pacientes con carcinomas de células escamosas, metástasis en los ganglios linfáticos con mayor frecuencia en los tumores con alta expresión de podoplanina, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa. En un estudio reciente sobre el uso de la expresión de podoplanina para identificar pacientes con COCE con metástasis en los ganglios linfáticos, se informó de una sensibilidad del 36% y de una especificidad del 83%<sup>227</sup>, lo que indica que la podoplanina no es un marcador fiable para la práctica diaria, cuando es considerada aisladamente. Además, en el cáncer de cérvix, ni los émbolos de células tumorales en los vasos linfáticos ni las células metastásicas en los ganglios linfáticos expresaron podoplanina, incluso cuando el tumor primario fue podoplanin-positivo<sup>209</sup>. Estos hallazgos sugieren que la función biológica de la podoplanina varía entre los diferentes tipos de cáncer.

En nuestro estudio hemos encontrado expresión de podoplanina en 88 de 92 casos (96%) y expresión alta (*score* > 4) en 32 casos (35%), hallazgo consistente con otros estudios previos que hallaron expresión de podoplanina en el 86% y<sup>228</sup> el 84,1%<sup>229</sup> de las muestras tumorales, pero que contrasta con Huber y cols.<sup>227</sup> que comunican una expresión de podoplanina de sólo el 24%.

En marcado contraste con las publicaciones anteriores<sup>129, 227, 230, 231</sup>, no hemos encontrado una asociación significativa entre la expresión de podoplanina y las metástasis linfáticas en los ganglios cervicales. El 37% de los paciente pN0 presentaron una expresión alta de podoplanina en comparación con el 33% de todos los casos. Una explicación podría ser el hallazgo de una más alta expresión de podoplanina en las primeras etapas de la tumorigénesis.

Hemos observado que los cánceres de la lengua y del suelo de la boca desarrollan, con frecuencia, metástasis en los ganglios linfáticos

---

cervicales y que, la incidencia de las mismas aumenta notablemente cuando el tumor primario muestra una expresión alta de podoplanina.

También encontramos una alta expresión de podoplanina con mayor frecuencia en los cánceres de la lengua y del suelo de la boca, que son generalmente más pequeños (T1 o T2) que los de la encía, el paladar, y el área retromolar. Por otra parte, hemos observado una tendencia a la alta expresión de podoplanina en tumores bien diferenciados. Por último, las metástasis en los ganglios linfáticos del cuello se encontraron con mayor frecuencia en los tumores con expresión alta de podoplanina. Sin embargo, ninguna de estas diferencias alcanzó significación estadística.

Los datos de la asociación de la expresión de podoplanina con la localización tumoral y la diferenciación del tumor son contradictorios. Las diferencias en la expresión de podoplanina señaladas en relación con la localización del tumor podrían deberse indirectamente a las asociaciones con otras variables clínico-patológicas, como el grado de diferenciación, el tamaño del tumor o a las metástasis en los ganglios linfáticos. La asociación entre la expresión de podoplanina y el asentamiento del tumor en la lengua y en el suelo oral podría reflejar mayor frecuencia de tumores T1-T2, una mayor proporción de tumores bien diferenciados y/o de los tumores con metástasis en los ganglios linfáticos del cuello. Por último, los tumores de la lengua y del suelo de la boca también pueden ser vistos como entidades tumorales distintas de otros tipos de cáncer de la cavidad oral.

Hemos encontrado una expresión de podoplanina limitada al frente tumoral invasivo en el 63% de los carcinomas, lo que sugiere que la subpoblación de células invasoras tiene propiedades biológicas distintas de las situadas en el interior del tumor<sup>129,150,199,229</sup>. La expresión de podoplanina tiende a ser mayor en los carcinomas bien diferenciados, que suelen ser menos invasivos que los pobremente diferenciados. Esta

---

aparente contradicción nos lleva a sugerir que la invasión en los COCEs no es impulsada por desdiferenciación celular, sino por la aparición de una población específica de células tumorales con una alta capacidad de auto-renovación (células madre del cáncer, CSC), que normalmente expresan podoplanina<sup>199</sup>. De hecho, la podoplanina ha sido identificada como un marcador de células madre cancerosas en CCE humanos<sup>229</sup>, que según otros estudios comprenden una pequeña población de células cancerosas<sup>232</sup>. Las CSC son más invasivas, muestran una mayor capacidad de regeneración, y presentan más resistencia a la radioterapia y la quimioterapia<sup>233</sup>, por lo que su catalogación es crucial para el control de la enfermedad.

## 7.CONCLUSIONES





## CONCLUSIONES

En el contexto del presente estudio, el análisis de los resultados permite establecer las siguientes conclusiones:

### **En lesiones de la mucosa oral potencialmente cancerizables:**

- 1<sup>a</sup>) La inmunexpresión de las proteínas cortactina (CTTN), quinasa de adhesión focal (FAK) y podoplanina (PDP) se incrementó de forma significativa según el grado de displasia epitelial.
- 2<sup>a</sup>) La inmunexpresión intensa de quinasa de adhesión focal (FAK) o de cortactina (CTTN) se asoció significativamente con progresión a carcinoma oral de células escamosas, en comparación con las lesiones que exhibieron una expresión débil o moderada.
- 3<sup>a</sup>) La coexpresión intensa de quinasa de adhesión focal (FAK) y de cortactina (CTTN) se asoció significativamente con progresión a carcinoma oral de células escamosas en comparación con las lesiones que exhibieron una expresión débil o moderada de una o de ambas proteínas o una expresión intensa de una sola de ellas.
- 4<sup>a</sup>) En el análisis estadístico univariante, tanto el grado de displasia epitelial como la expresión intensa aislada o conjunta de CTTN y/o FAK se asociaron significativamente con progresión malignidad. En el análisis multivariante, tan solo la coexpresión intensa de CTTN y FAK

se asoció significativamente con progresión a malignidad (riesgo = 6,2).

5ª) En el análisis estadístico univariante, tanto el grado de displasia epitelial como la expresión moderada o intensa de PDP se asociaron significativamente con progresión a malignidad. En el análisis multivariante, tan solo la expresión moderada o intensa de PDP se asoció significativamente con progresión a malignidad (riesgo = 8,7).

## **En carcinomas orales de células escamosas:**

- 6<sup>a</sup>) La expresión moderada o intensa de FAK se asoció significativamente con la presencia de metástasis ganglionares cervicales.
- 7<sup>a</sup>) La expresión moderada de FAK se asoció con peor supervivencia.
- 8<sup>a</sup>) La expresión intensa de cortactina se asoció significativamente con la aparición de segundos tumores primarios (riesgo = 6,6).
- 9<sup>a</sup>) La expresión de podoplanina se redujo a medida que se incrementó el grado de anaplasia tumoral.
- 10<sup>a</sup>) En los cánceres localizados en la lengua y en el suelo de la boca, la expresión de podoplanina fue más frecuente e intensa que en las restantes localizaciones estudiadas.
- 11<sup>a</sup>) Las expresiones de cortactina y podoplanina no se asociaron con supervivencia específica.



# 8.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

<sup>1</sup> Bagán Sebastián JV. Carcinoma oral de células escamosas. En: Bagán Sebastián JV, ed. Medicina Bucal. Valencia: Medicina Oral, S.L.; 2008.p. 153-55.

<sup>2</sup> Stewart BW, Kleihues P, eds. World cancer report: IARC press: Lyon, 2003.

<sup>3</sup> Serra Majen L, Ramón Torrel JM. Cáncer oral: Epidemiología y prevención. En: Cuenca Sala E, Manau Navarro C, Serra Majen L, eds. Odontología preventiva y comunitaria. Barcelona: Masson; 2003. p. 173-93.

<sup>4</sup> Nieto A, Ramos AR. Rising trends in oral cancer mortality in Spain, 1975-94. J Oral Pathol Med 2002; 31: 147-52.

<sup>5</sup> Califano J, Westra WH, Meininger G, Corio R, Koch WM, Sidransky D. Genetic progression and clonal relationship of recurrent premalignant head and neck lesions. Clin Cancer Res 2000;6(2):347-52.

<sup>6</sup> Silverman S, Gorsky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation: a follow-up of 257 patients. Cancer 1984;53(3):563-8.

<sup>7</sup> Warnakulasuriya S, Sutherland G, Scully C. Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence. Oral Oncol. 2005;41:244-60.

<sup>8</sup> Wight AJ, Ogden GR. Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer--a review. Oral Oncol. 1998;34:441-7.

<sup>9</sup> Scully C. Oral cancer aetiopathogenesis; past, present and future aspects. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2011;16 :e306-11.

<sup>10</sup> Nagao T, Ikeda N, Warnakulasuriya S, Fukano H, Yuasa H, Yano M, et al. Serum antioxidant micronutrients and the risk of oral leukoplakia among Japanese. Oral Oncol. 2000;36:466-70.

<sup>11</sup> Nieminen MT, Uittamo J, Salaspuro M, Rautemaa R. Acetaldehyde production from ethanol and glucose by non-Candida albicans yeasts in vitro. Oral Oncol. 2009;45:e245-8.

<sup>12</sup> Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001;91:622-35.

<sup>13</sup> Feller L, Wood NH, Khammissa RA, Lemmer J. Human papillomavirus-mediated carcinogenesis and HPV-associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 1: human papillomavirus-mediated carcinogenesis. Head Face Med. 2010;6:14.

- 
- <sup>14</sup> Shillitoe EJ. The role of viruses in squamous cell carcinoma of the oropharyngeal mucosa. *Oral Oncol.* 2009;45:351-5.
- <sup>15</sup> Jeannon JP, Soames JV, Aston V, et al. Molecular markers in dysplasia of the larynx: expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p21, p27 and p53 tumour suppressor gene in predicting cancer risk. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2004;29(6):698-704.
- <sup>16</sup> Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D: Head-and-neck cancer. *N Engl J Med* 2001, 345:1890-1900.
- <sup>17</sup> Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, Morrow M. American Joint Committee on Cancer Staging Manual. 6<sup>th</sup> ed. New York, NY: Springer, 2002.
- <sup>18</sup> Moore SR, Pierce AM, Wilson DF. "Oral cancer" – The terminology dilemma. *Oral Dis* 2000; 6: 191-3.
- <sup>19</sup> Wood NK, Sawyer DR. Cáncer Oral. En: Wood NK, Goaz PW. Diagnósticos diferenciales de las lesiones orales y maxilofaciales. Madrid: Harcourt Brace de España SA; 1998. p. 587-95.
- <sup>20</sup> Stewart BW, Kleihues P, eds. World cancer report: IARC press: Lyon, 2003
- <sup>21</sup> Mignona MD, Fedele S, Lo Russo L. The world cancer report and the burden of oral cancer. *Eur J Cancer Prev* 2004; 13: 139-42.
- <sup>22</sup> Sugeran PB, Savage NW. Current concepts in oral cancer. *Aust Dent J* 1999; 44: 147-56
- <sup>23</sup> Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics 2001. *CA Cancer J Clin* 2001; 51: 16-36.
- <sup>24</sup> Serra Majen L, Ramón Torrel JM. Cáncer oral: Epidemiología y prevención. En: Cuenca Sala E, Manau Navarro C, Serra Majen L, eds. Odontología preventiva y comunitaria. Barcelona: Masson; 2003. p. 173-93.
- <sup>25</sup> Sol Silverman Jr. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes, the trends, the challenge. *JADA* 2001; 132 (supl): 7- 11.
- <sup>26</sup> Martínez-Conde R, Aguirre JM., Burgos J.J., Rivera J.M. Factores clínicos-patológicos en el carcinoma de células escamosas inicial de lengua y suelo de la boca, en Vizcaya. *Med. Oral* 2001; 6-2:87- 93.
- <sup>27</sup> Hwa-Jeong Lee, Han- Young Guo, Sun-Kyung Lee, Byung-Hun Jeon, Chang-Duk Jun, Suk-Keun Lee, Myung-Hee Park, Eun-Cheol Kim. Effects of nicotine on proliferation, cell cycle, and differentiation immortalized and malignant oral keratinocytes. *J Oral Pathol Med* 2005; 34: 436-43.



- <sup>28</sup> Wight AJ, Ogden GR. Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer--a review. *Oral Oncol.* 1998;34:441-7.
- <sup>29</sup> Homann N, Kärkkäinen P, Koivisto T, Jokelainen K, Salaspuro M. Effects of acetaldehyde on cell regeneration and differentiation of the upper gastrointestinal tract mucosa. *J Natl. Cancer Instit* 1997;89:1692-7.
- <sup>30</sup> Homann N, Tillonen J, Rintamäki H, Salaspuro M, Lindqvist C, Meurman JH. Poor dental status increases acetaldehyde production from ethanol in saliva: a possible link to increased oral cancer risk among heavy drinkers. *Oral Oncology* 2001;37:153-8.
- <sup>31</sup> Moreno-López LA, Esparza-Gómez GC, González Navarro A, Cerero-Lapiedra R, González-Hernández MJ, Domínguez-Rojas V. Risk of oral cancer associates with tobacco smog, alcohol consumption and oral hygiene: A case- control study in Madrid, Spain. *Oral Oncol* 2000; 36: 170-4.
- <sup>32</sup> Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000; 82: 709-20.
- <sup>33</sup> Giovannelli L, Campisi G, Lama A, Giambalvo O, Osborn J, Margiotta V, et al. Human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. *J Infect Dis* 2002; 185: 833-6.
- <sup>34</sup> Syrjanen S, Lodi G, von Bultzingslowen I, Aliko A, Arduino P, Campisi G, et al. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Dis.* 2011 Apr;17 Suppl 1:58-72.
- <sup>35</sup> Moreno L.A, Cerero R, Arriola P Esparza G, Brezmes A. Incidencia del cáncer orofaríngeo en la comunidad autónoma de Madrid. *Arch Odontoestom* 1996; 12: 43-9.
- <sup>36</sup> De Stefani E, Deneo-Pellegrini H, Mendilaharsu M, Ronco A. Diet and risk of cáncer of upper aerodigestive tract-I. *Foods.* *Oral Oncol* 1999; 35: 17-21.
- <sup>37</sup> Singh M, Krishanappa R, Bagewadi a, Kelus- kar V. Efficacy of oral lycopene in the treatment of oral leukoplakia. *Oral Oncology* 2004;40:591- 596.
- <sup>38</sup> Lockhart PB, Norris CM, Pulliam C. Dental Factors in the Genesis of Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. *Oral Oncol* 1998; 34: 133-9.
- <sup>39</sup> Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JM. *Oral and Maxillofacial Pathology.* 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2002. p. 295-303.
- <sup>40</sup> Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, van der Waal I. *Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa.* Berlin: Springer-Verlag; 1997.

- 
- <sup>41</sup> Saap JP, Eversole LR, Wysocki GP. Patología oral y maxilofacial contemporánea. 2a ed. Madrid: Mosby; 2005. p. 194.
- <sup>42</sup> Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 6: 759-67.
- <sup>43</sup> Hahn WC, Cptoner CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 1999; 400: 464-8.
- <sup>44</sup> Mao L, El-Naggar AK, Fan YH, et al. Telomerase activity in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent tissues. *Cancer Res* 1996; 56: 5600-4.
- <sup>45</sup> Shpitzer T, Chanjimaoff M, Gal R, Stern Y, Feinmesser R, Segal K. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in early oral tongue cancer. *Arch Otolaryng Head Neck Surg* 1996; 122: 856-8.
- <sup>46</sup> Liotta L. Tumor invasion and metastasis: role of the extracellular matrix. *Cancer Res* 1986; 46: 1-7.
- <sup>47</sup> Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996;56: 2488-2492.
- <sup>48</sup> Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. Expanding fields of genetically altered cells in head and neck squamous carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 2005; 15:113-120.
- <sup>49</sup> Braakhuis BJM, Tabor MP, Leemans R, van der Waal I, Snow GB, Brakenhoff RH. Second primary tumor and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: Molecular techniques provide new insights and definitions. *Head Neck* 2002; 24:198-206.
- <sup>50</sup> Napier S, Speight PM. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *J Oral Pathol Med* 2008; 37: 1-10.
- <sup>51</sup> Braakhuis B, Leemans C, Brakenhoff RH. A genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications. *J Oral Pathol Med* 2004; 33: 17-22.
- <sup>52</sup> Tabor MP, Brakenhoff RH, van Houten VMM, et al. Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: biological and clinical implications. *Clin Cancer res* 2001; 7: 1523- 1532.
- <sup>53</sup> Owens DM, Watt FM. Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours. *Nature Rev Cancer* 2003; 3: 444-51.

- 
- <sup>54</sup> van Houten VMM, Tabor MP, van den Brekel MWM et al. Mutated p53 as a molecular marker for the diagnosis of head and neck cancer, *J Pathol* 2002; 198: 476-86.
- <sup>55</sup> Tan BT, Park CY, Ailles LE, Weissman JL. The cancer Stem cell hypothesis a work in progress. *Lab invest* 2006; 86:1203-1207.
- <sup>56</sup> Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 2006;441:1075-1079.
- <sup>57</sup> Renan MJ. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog* 1993;7:139-146.
- <sup>58</sup> Rodrigo JP, Garcia LA, Ramos S, Lazo PS, Suárez C. EMS1 amplification correlates with poor prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res*. 2000;6:3177-3182.
- <sup>59</sup> Gibcus JH, Menkema L, Mastik MF , et al: Amplicon mapping and expression profiling identify the Fas-associated death domain gene as a new driver in the 11q13.3 amplicon in laryngeal/pharyngeal cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13:6257-6266.
- <sup>60</sup> Luo ML, Shen XM, Zhnag Y, et al. Amplification and overexpression of CTTN (EMS1) contribute to the metastasis of esophageal squamous cell carcinoma by promoting cell migration and anoikis resistance. *Cancer Res* 2006;66:11690-11699.
- <sup>61</sup> Yuan BZ, Zhou X, Zimonjic DB, et al. Amplification and overexpression of the EMS1 Oncogene, a possible prognostic marker, in human hepatocellular carcinoma. *J Mol Diagn* 2003;5 :48-53.
- <sup>62</sup> Clark ES, Brown B, Whigham AS et al. Aggressiveness of HNSCC tumors depend on expression levels of cortactin, a gene in the 11q13 amplicon. *Oncogene* 28:431-444, 2009.
- <sup>63</sup> Gleich LL, Salamone FM. Molecular genetics of head and neck cancer. *Cancer Control* 2002; 9: 369-78.
- <sup>64</sup> Fortin A, Guerry M, Guerry R, Talbot M, Parise O, Schwaab G, et al. Chromosome 11q13 gene amplifications in oral and oropharyngeal carcinomas: no correlation with subclinical lymph node invasion and disease recurrence. *Clin Canc Res* 1997; 3: 609-14.
- <sup>65</sup> Juan Xia, Qianming Chen, Bingqi Li, Xin Zeng. Amplifications of TAOS1 and EMS1 genes in oral carcinogenesis: association with clinicopathological features. *Oral Oncology* 2007;43:508-514.
- <sup>66</sup> Singh B, Gogineni SK, Sacks PG et al (2001) Molecular cyto-genetic characterization of head and neck squamous cell carcinoma and refinement of 3q amplification. *Cancer Res* 61(11):4506–4513.

- 
- <sup>67</sup> Slebos RJ, Yi Y, Ely K et al (2006) Gene expression differences associated with human papillomavirus status in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 12(3 Pt 1):701–709.
- <sup>68</sup> Singh B, Stoffel A, Gogineni S et al (2002) Amplification of the 3q26.3 locus is associated with progression to invasive cancer and is a negative prognostic factor in head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Pathol* 161(2):365–371.
- <sup>69</sup> Bockmuhl U, Schluns K, Schmidt S, Matthias S, Petersen I (2002) Chromosomal alterations during metastasis formation of head and neck squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 33(1):29–35.
- <sup>70</sup> García-Pedrero J, García-Carracedo D, Muñoz Pinto C, Herrero A, Rodrigo JP, Suárez C, González Meana MV. Frequent genetic and biochemical alterations of the PI 3-K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2005;114:242-248.
- <sup>71</sup> Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997; 386: 761-3.
- <sup>72</sup> Van der Riet P, Nawroz H, Hruban RH, Corio R, Tokino K, Koch W, Sidransky D. Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. *Cancer Res* 1994;54:1156-1158.
- <sup>73</sup> Merlo A, Herman JG, Mao L et al. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16 / CDKN2 / MTS1 in human cancers. *Nat. Med.* 1995; 1; 686–692.
- <sup>74</sup> Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, Ahrendt S, Eby Y, Sewell D, Nawroz H, Bartek J, Sidransky D. High frequency of p16<sup>CDKN2/MTS-1/INK4A</sup> inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996;56:3630-3633.
- <sup>75</sup> Bongers V, Snow G.B, Van der Waal I, Braakhuis B.J.M. Value of p 53 Expression in Oral Cancer and Adjacent Normal Mucosa in Relation to the Occurrence of Multiple Primary Carcinomas. *Oral Oncol, Eur J Cancer* 1995; 31-B: 392-5.
- <sup>76</sup> Whyte D.A, Broton C.E, Shillitoe E.J. The unexplained survival of cells in oral cancer: what is the role of p53?. *J oral Pathol Med* 2002; 31: 125-33.
- <sup>77</sup> Tandle AT, Sanghavi V, Saranath D. Determination of p53 genotypes in oral cancer patients from India. *British J of Cancer* 2001; 84: 739-42.
- <sup>78</sup> Rodrigo JP, Coto E, González MV, Maldonado M, Suárez C. P53 allelic loss and the outcome of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2001;258:255-258.

- 
- <sup>79</sup> Tan BT, Park CY, Ailles LE, Weissman JL. The cancer Stem cell hypothesis a work in progress. *Lab invest* 2006; 86:1203-1207.
- <sup>80</sup> Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res.*2003; 63; 1727–1730.
- <sup>81</sup> NCCN. Practice Guidelines in Oncology. National Comprehensive Cancer Network, Inc., v.1.2007
- <sup>82</sup> De Vicente, J. C., Rodríguez-Santamarta, T., Rosado, P., Peña, I., & de Villalaín, L. (2012). Survival after free flap reconstruction in patients with advanced oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* :70(2), 453–9.
- <sup>83</sup> Spiro RH, Strong EW, Shah JP. Classification of neck dissections: variations on a new theme. *Am J Surg* 1994;168:415-418
- <sup>84</sup> Weiss MH, Harrison LB, Isaacs RS. Use of decision analysis in planning a management strategy for the stage N0 neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;120:699-702.
- <sup>85</sup> de Vicente JC, Rodríguez-Santamarta T, Peña I, Villalaín L, Fernández-Valle Á, González-García M. Relevance of level IIb neck dissection in oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015 Sep 1;20(5):e547-53.
- <sup>86</sup> Lujan PJ, Flores F, Durán M, Bautista Y. Cáncer de cabeza y cuello. Conceptos actuales en la indicación de la radioterapia. *Gamo* 2004;3
- <sup>87</sup> Pignon JP, Bourhis J, Domenge C et al. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of update individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analyses of Chemotherapy on head and neck Cancer. *Lancet* 2000; 355:949-55.
- <sup>88</sup> Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition in oncology. *Endocr Relat Cancer* 2004; 11: 689-708.
- <sup>89</sup> Beeken SW, Krontiras H, Maddox WA, Peters GE, Soong S, Urist MM. T1 and T2 squamous cell carcinoma of the oral tongue: prognostic factors and the role of elective lymph node dissection. *Head Neck* 1999; 21: 124-30.
- <sup>90</sup> Silverman S Jr. Oral cancer. 4a ed. Hamilton. Ontario: American Cancer Society, 1998.
- <sup>91</sup> Jones AS, Morar P, Phillips DE, Field JK, Husband D, Helliwell TR. Second primary tumors in patients with head and neck cell carcinoma. *Cancer* 1995; 75: 1343-53.

- 
- <sup>92</sup> Warnakulasuriya S JN, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med.* 2007;36:575-80.
- <sup>93</sup> Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral Oncol* 2003 Dec;39(8):770-780.
- <sup>94</sup> Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* 2002 Jul-Aug;52(4):195-215.
- <sup>95</sup> Sapp J, Eversole L, Wysochi G. Trastornos epiteliales En: *Patología Oral y Maxilofacial Contemporánea 2a Edición.* Madrid: Elsevier, Mosby; 2004. p. 164-204.
- <sup>96</sup> van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol* 2009 5;45(4-5):317-323.
- <sup>97</sup> Ho PS, Chen PL, Warnakulasuriya S, Shieh TY, Chen YK, Huang IY. Malignant transformation of oral potentially malignant disorders in males: a retrospective cohort study. *BMC Cancer.* 2009;9:260.
- <sup>98</sup> Holmstrup P, Vedtofte P, Reibel J, Stoltze K. Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. *Oral Oncol.* 2006 May;42(5):461-74.
- <sup>99</sup> Martorell-Calatayud A, Botella-Estrada R, Bagan-Sebastian JV, Sanmartin-Jimenez O, Guillen-Barona C. Oral leukoplakia: clinical, histopathologic, and molecular features and therapeutic approach. *Actas Dermosifiliogr.* 2009 Oct;100(8):669-84.
- <sup>100</sup> Shibuya H, Amagasa T, Seto K, Ishibashi K, Horiuchi J, Suzuki S. Leukoplakia-associated multiple carcinomas in patients with tongue carcinoma. *Cancer.* 1986 Feb 15;57(4):843-6.
- <sup>101</sup> Haya-Fernandez MC, Bagan JV, Murillo-Cortes J, Poveda-Roda R, Calabuig C. The prevalence of oral leukoplakia in 138 patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis.* 2004 Nov;10(6):346-8
- <sup>102</sup> Lodi G, Sardella A, Bez C, Demarosi F, Carrassi A. Interventions for treating oral leukoplakia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006(4):CD001829.
- <sup>103</sup> Holmstrup P, Vedtofte P, Reibel J, Stoltze K. Oral premalignant lesions: is a biopsy reliable? *J Oral Pathol Med.* 2007 May;36(5):262-6.
- <sup>104</sup> Wenig BM. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: precursors and problematic variants. *Mod. Pathol.* 2002;15:229–254.

- 
- <sup>105</sup> Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Pathology & Genetics. Head and Neck Tumours. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon: IARC-press; 2005
- <sup>106</sup> Gale N, Kambic V, Michaels L, Cardesa A, Hellquist H, Zidar N, Poljac M. The Ljubljana classification. *Adv Anat Pathol* 2000; 7:240-251.
- <sup>107</sup> Brenan JA, Mao L, Hruban RH, Boyle JO. Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995;332:429-35.
- <sup>108</sup> Barrera JE, Ai H, Pan Z, Meyers A, Varela-García M. Malignancy detection by molecular cytogenetics in clinically normal mucosa adjacent to head and neck tumors. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;124:847-851.
- <sup>109</sup> Eversole LR. Dysplasia of the upper aerodigestive tract squamous epithelium. *Head Neck Pathol.* 2009 Mar;3(1):63-8.
- <sup>110</sup> Chimenos-Kustner E, Font-Costa I, Lopez-Lopez J. Oral cancer risk and molecular markers. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2004 Nov-Dec;9(5):381-4; 77-80.
- <sup>111</sup> Tsuji T, Sasaki K, Kimura Y, Yamada K, Mori M, Shinozaki F. Measurement of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and its clinical application in oral cancer. *Int J Maxillofac Surg* 1992; 21: 369-72 .
- <sup>112</sup> Yuge T, Nibu K, Kondo K, Shibahara J, Tayama N, Sugawara M. Loss of FHIT expression in squamous cell carcinoma and premalignant lesions of the larynx. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 2005; 114; 127–131.
- <sup>113</sup> Homer JJ, Prentice MG, Cawkwell L, Birchall M, Greenman J, Stafford ND. Angiogenesis and the expression of vascular endothelial growth factors A and C in squamous cell carcinoma of the piriform fossa. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003;129:1110-1114.
- <sup>114</sup> Handsley MM, Edwards DR. Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *Int J Cancer* 2005; 115:849-860.
- <sup>115</sup> Schliephake H. Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer -A review. *J Oral Maxillofac Surg* 2003;32:233-45.
- <sup>116</sup> Rodrigo JP, Domínguez F, Alvarez C, González MV, Herrero A, Suárez C. Clinicopathologic significance of expression of CD44s and CD44v6 isoforms in squamous cell carcinoma of the supraglottic larynx. *Am J Clin Pathol* 2002;118:67-72.
- <sup>117</sup> Ioachim E, Assimakopoulos D, Goussia AC, Peschos D et al. Glycoprotein CD44 expression in benign, premalignant and malignant epithelial lesions of the larynx: an

---

immunohistochemical study including correlation with Rb, p53, Ki-67 and PCNA. *Histol Histopathol*, 1999;14(4):1113-1118.

<sup>118</sup> Bankfalvi A, Krabort M, Végh A, Felszeghy E, Piffkó J. Deranged expression of the E-cadherin/  $\beta$ -catenin complex and the epidermal growth factor receptor in the clinical evolution and progression of oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol* 2002; 31: 450-7.

<sup>119</sup> Rosado P, Lequerica-Fernández P, Fernández S, Allonca E, Villallaín L, de Vicente JC. E-cadherin and  $\beta$ -catenin expression in well-differentiated and moderately-differentiated oral squamous cell carcinoma: relations with clinical variables. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2013 Mar;51(2):149-56.

<sup>120</sup> Canel M, Secades P, Rodrigo JP, Cabanillas R, Herrero A, Suárez C, Chiara MD. Overexpression of focal adhesion kinase in head and neck squamous cell carcinoma is independent of FAK gene copy number. *Clin Cancer Res* 2006; 12:3272-3279.

<sup>121</sup> Nie M, Zhong L, Zeng G, Li B. The changes of cytokeratin 19 during carcinogenesis. *Zonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2002;37:187-90.

<sup>122</sup> Schildt EB, Nylander K, Eriksson M, Hardell L, Magnusson A, Roos G. Expression of p53, PCNA, ki-67 and bcl-2 in relation to risk factors in oral cancer -a molecular epidemiological study. *Int J Oncol* 2003;22:861-8.

<sup>123</sup> Bautista AM, Santiago R. Immunolocalization of p53, Glutathione S-transferase pi and CD57 antigens in oral leukoplakia. *Anticancer Res* 2001; 21:379-86.

<sup>124</sup> Canel M, Secades P, Garzón –Arango M et al. Involvement of focal adhesion kinase in celular invasión of head and neck squamous cell carcinomas via regulation of MMP-2 expression. *Br J Cancer* 2008;98:1274-1284.

<sup>125</sup> Van Nimwegen MJ, van de Water B. Focal adhesion kinase: a potential target in cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 2007;73(5):597-609.

<sup>126</sup> Huang Q, Yu GP, McCormick SA et al. Genetic differences detected by comparative genomic hybridization in head and neck squamous cell carcinomas from different tumor sites: construction of oncogenetic trees for tumor progression. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 34: 224-233.

<sup>127</sup> Gabarra-Niecko V, Schaller MD, Dunty JM. FAK regulates biological processes important for the pathogenesis of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2003;22:359-374.

<sup>128</sup> Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D et al. FAK integrates growth factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol* 2000; 2:249-56.

<sup>129</sup> Parsons TJ, Martin KH, Slack JK, Taylor JM, Weed SA. Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene* 2000;19:5606-5613.



- 
- <sup>130</sup> Zhao J, Guan JL. Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2009;28:35–49.
- <sup>131</sup> Gabarra-Niecko V, Schaller MD, Dunty JM. FAK regulates biological processes important for the pathogenesis of cancer. *Cancer Met Rev* 2003;22(4):359–74.
- <sup>132</sup> Rodrigo JP, Dominguez F, Suarez V, Canel M, Secades P, Chiara MD. Focal adhesion kinase and E-cadherin as markers for nodal metastasis in laryngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;133:145–150.
- <sup>133</sup> Ellenbroek SIJ, Collard JG. Rho GTPases: functions and association with cancer. *Clin Exp Metastasis* 2007; 24: 657-672.
- <sup>134</sup> Laura C. Kelley, Sohrab Shahab, Scott A. Weed. Actin cytoskeletal mediators of motility and invasion amplified and overexpressed in head and neck cancer. *Clin Exp Metastasis* 2008;9:154-60.
- <sup>135</sup> Weed SA, Parsons JT. Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly. *Oncogene* 2001;20:6418-6434.
- <sup>136</sup> Van Rossum AG, Moolenaar WH, Schuurin E: Cortactin affects cell migration by regulating intercellular adhesion and cell spreading. *Exp CellRes* 2006;312:1658-1670.
- <sup>137</sup> R.O. Hynes. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 2002; 637-687.
- <sup>138</sup> F.M. Helwani, E.M. Kovacs, S.A. Weed et al. Cortactin is necessary for E-cadherin-mediated contact formation and actin reorganization. *J Cell Biol*, 2004; 164:899-910.
- <sup>139</sup> A.G. van Rossum, J.H. De Graaf, E Schuurin et al. Alternative splicing of the actin binding domain of human cortactin affects cell migration. *J Biol Chem*, 2003; 45:672-679.
- <sup>140</sup> Schuurin E. The involvement of the chromosome 11q13 region in human malignancies: cyclin D1 and EMS1 are two new candidate oncogenes- a review. *Gene* 1995;159:83-96.
- <sup>141</sup> Rodrigo JP1, García-Carracedo D, García LA, Menéndez S, Allonca E, González MV, Fresno MF, Suárez C, García-Pedrero JM. Distinctive clinicopathological associations of amplification of the cortactin gene at 11q13 in head and neck squamous cell carcinomas. *J Pathol.* 2009 Mar;217(4):516-23.
- <sup>142</sup> Hofman P, Butori C, Havet K et al. Prognostic significance of cortactina levels in head and neck squamous cell carcinoma: comparison with epidermal growth factor receptor status. *British Journal of cancer* 2008;2:1-9.

- 
- <sup>143</sup> Gibcus JH, Mastik MF, Menkema L, et al: Cortactin expression predicts poor survival in laryngeal carcinoma. *Br J Cancer* 2008; 98:950-955.
- <sup>144</sup> Ordonez NG. Podoplanin: a novel diagnostic immunohistochemical marker. *Adv Anat Pathol* 2006;13:83-88.
- <sup>145</sup> Schacht V, Dadras SS, Johnson LA et al Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol* 2005; 166:913-921.
- <sup>146</sup> Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H et al. Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol* 1999;154:385-394.
- <sup>147</sup> Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, et al. T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J.* 2003;22:3546–3556.
- <sup>148</sup> Kaneko M, Kato Y, Kitano T, Osawa M (2006) Conservation of a platelet activating domain of Aggrus/Podoplanin as a platelet aggregation- inducing factor. *Gene* 378: 52–57
- <sup>149</sup> Martin Villar E, Scholl FG, Gamallo C et al. Characterization of human PA 2.26 antigen (T1 alpha-2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2005;113:899-910.
- <sup>150</sup> Wicki A, Christofori G. The potential role of Podoplanin in tumor invasion. *British Journal of cancer* 2007;96:1-5.
- <sup>151</sup> Wicki A, Lehenbre F, Wick N et al. Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: Podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer cell* 2006;9:261-272.
- <sup>152</sup> Kawaguchi H, El-Naggar AK, PapadimitrakopouloV et al. Podoplanin: A novel marker for oral cancer risk in patients with oral premalignancy. *J Clin Oncol* 2008;26:354-360.
- <sup>153</sup> Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, Morrow M (2002) American Joint Committee on Cancer staging manual, 6th edn. Springer, New York
- <sup>154</sup> Gale N, Pilch BZ, Sidransky D, El Naggar A, Westra W, Califano J, et al. Epithelial precursor lesions. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. *Pathology and genetics of head and neck tumours*. Lyon: IARC Press-WHO Press; 2005. p. 177–9.

- 
- <sup>155</sup> Rodrigo JP, García-Carracedo D, González MV, Mancebo G, Fresno MF, García Pedrero J. Podoplanin expression in the development and progression of laryngeal squamous cell carcinomas. *Mol Cancer* 2010;9:48.
- <sup>156</sup> Mehanna HM, Rattay T, Smith J, McConkey CC. Treatment and follow-up of oral dysplasia - a systematic review and meta-analysis. *Head Neck* 2009 Dec;31(12):1600-1609.
- <sup>157</sup> Warnakulasuriya S, Kovacevic T, Madden P, Coupland VH, Sperandio M, Odell E, et al. Factors predicting malignant transformation in oral potentially malignant disorders among patients accrued over a 10-year period in South East England. *J Oral Pathol Med* 2011 Jul 18.
- <sup>158</sup> Kreppel M, Kreppel B, Drebber U, Wedemayer I, Rothamel D, Zöller JE, et al. Podoplanin expression in oral leukoplakia: prognostic value and clinicopathological implications. *Oral Dis* 2012;18(7):692–9.
- <sup>159</sup> Brouns ER, Baart JA, Bloemena E, Karagozoglu H, van der Waal I. The relevance of uniform reporting in oral leukoplakia: definition, certainty factor and staging based on experience with 275 patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013 Jan 1;18(1):e19-26.
- <sup>160</sup> Napier SS, Cowan CG, Gregg TA, Stevenson M, Lamey PJ, Toner PG. Potentially malignant oral lesions in Northern Ireland: size (extent) matters. *Oral Dis* 2003 May;9(3):129-137.
- <sup>161</sup> Lumerman H, Freedman P, Kerpel S. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995 Mar;79(3):321-329.
- <sup>162</sup> Liu W, Bao ZX, Shi LJ, Tang GY, Zhou ZT. Malignant transformation of oral epithelial dysplasia: clinicopathological risk factors and outcome analysis in a retrospective cohort of 138 cases. *Histopathology* 2011 Oct;59(4):733-740.
- <sup>163</sup> Shiu MN, Chen TH, Chang SH, Hahn LJ. Risk factors for leukoplakia and malignant transformation to oral carcinoma: a leukoplakia cohort in Taiwan. *Br J Cancer* 2000 Jun;82(11):1871-1874.
- <sup>164</sup> Baric JM, Alman JE, Feldman RS, Chauncey HH. Influence of cigarette, pipe, and cigar smoking, removable partial dentures, and age on oral leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1982 Oct;54(4):424-429.
- <sup>165</sup> Roed-Petersen B. Effect on oral leukoplakia of reducing or ceasing tobacco smoking. *Acta Derm Venereol* 1982;62(2):164-167.
- <sup>166</sup> Silverman S Jr, Gorsky M. Epidemiologic and demographic update in oral cancer. California and national data- 1973-1985. *J Am Dent Assoc* 1990; 495-9.

- 
- <sup>167</sup> Maserejian NN, Joshipura KJ, Rosner BA, Giovannucci E, Zavras AI. Prospective study of alcohol consumption and risk of oral premalignant lesions in men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006 Apr;15(4):774- 781.
- <sup>168</sup> Ho PS, Chen PL, Warnakulasuriya S, Shieh TY, Chen YK, Huang IY. Malignant transformation of oral potentially malignant disorders in males: a retrospective cohort study. *BMC Cancer* 2009 Jul 30;9:260- 2407-9-260.
- <sup>169</sup> Whitehurst JO, Droulias CA. Surgical management of cáncer of the tongue. *Surg Clin North Am* 1974; 54: 759-65.
- <sup>170</sup> Decroix Y, Ghossein NA. Experience of the Curie Institute in treatment of cáncer of the mobile tongue. II. Management of neck nodes. *cáncer* 1981, 47: 503-8.
- <sup>171</sup> Lindberg R. Distribution of cervical lymph node metastases from squamous cell carcinoma of the upper respiratory and digestive tracts. *Cancer* 1972; 29: 1446-9.
- <sup>172</sup> Woolgar JA, Scott J. Prediction of cervical lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue/floor of mouth. *Head Neck* 1995; 17: 463-72.
- <sup>173</sup> Sutton DN, Brown JS, Rogers SN, Vaughan ED, Woolgar JA. The prognostic implications of the surgical margin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003; 32: 30-4.
- <sup>174</sup> Partridge M, Li SR, Pateromichelakis S, Francis R, Phillips E, Huang XH, et al. Detection of minimal residual cancer to investigate why oral tumors recur despite seemingly adequate treatment. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2718-25.
- <sup>175</sup> Xia J, Chen Q, Li B, Zeng X. Amplifications of TAOS1 and EMS1 genes in oral carcinogenesis: association with clinicopathological features. *Oral Oncol* 2007;43(5):508–14.
- <sup>176</sup> Croucher DR, Rickwood D, Tactacan CM, Musgrove EA, Daly RJ. Cortactin modulates RhoA activation and expression of Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors to promote cell cycle progression in 11q13 amplified head and neck squamous cell carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 2010;30(21):5057–70.
- <sup>177</sup> Yang Z, Bagheri-Yarmand R, Wang RA, Adam L, Papadimitrakopoulou VV, Clayman GL, et al. The epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) suppresses c-Src and Pak1 pathways and invasiveness of human cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004;10(2):658–67.
- <sup>178</sup> Hsu NY, Yeh KT, Chiang I, Pai LY, Chen CY, Ho HC. Cortactin overexpression in the esophageal squamous cell carcinomas and its involvement in the carcinogenesis. *Dis Esophagus* 2008;21(5):402–8.

- 
- <sup>179</sup> Yamada S, Yanamoto S, Kawasaki G, Mizuno A, Nemoto TK. Overexpression of cortactin increases invasion potential in oral squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2010;16(4):523–31.
- <sup>180</sup> Lynch DK, Winata SC, Lyons RJ, Hughes WE, Lehrbach GM, Wasinger V, et al. A cortactin-CD2-associated protein (CD2AP) complex provides a novel link between epidermal growth factor receptor endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 2003;278(24):21805–13.
- <sup>181</sup> Timpson P, Lynch DK, Schramek D, Walker F, Daly RJ. Cortactin overexpression inhibits ligand-induced down-regulation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 2005;65(8):3273–80.
- <sup>182</sup> Rosthschild BL, Shim AH, Ammer Ag; et al: Cortactin overexpression regulates actin-related protein 2/3complex activity, motility, and invasion in carcinomas with chromosome 11q13 amplification. *Cancer Res* 2006;66:8017-8025.
- <sup>183</sup> Yamaguchi H, Condeelis J:Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:642-652.
- <sup>184</sup> Hill A, McFarlane S, Mulligan K, et al: Cortactin underpins CD44-Promoted invasion and adhesion of breast cancer cells to bone marrow endothelial cells. *Oncogene* 2006;25:6079-6091.
- <sup>185</sup> Timpson p, Wilson As, Lehrbach GM, et al: Aberrant expression of cortactin in head and neck squamous cell carcinoma cells is associated with enhanced cell proliferation and resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib. *Cancer Res* 2007;67:9304-9314.
- <sup>186</sup> Meredith SD, Levine PA, Burns JA, et al: Chromosome 11q13 amplification in head neck squamous cell carcinoma. Association with poor prognosis. *Arch OtolaryngolHead Neck Surg* 121:790-794,1995.
- <sup>187</sup> Muller D,Millon R, Velten M, et al: Amplification of 11q13DNA markers in head and nek squamous cell carcinomas: correlation with clinical outcome. *Eur J Cancer* 33:2203-2210, 1997.
- <sup>188</sup> Xia J, Lv N, Hong Y, Li C, Tao X, Chen X, et al. Increased expression of focal adhesion kinase correlates with cellular proliferation and apoptosis during 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. *J Oral Pathol Med* 2009;38(6):524–9.
- <sup>189</sup> McLean GW, Carragher NO, Avizienyte E, Evans J, Brunton VG, Frame MC. The role of focal-adhesion kinase in cancer – a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer* 2005;5(7):505–15.
- <sup>190</sup> Summy JM, Gallick GE. Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2003 Dec;22(4):337-58. Review.

- 
- <sup>191</sup> Summy JM, Gallick GE: Treatment for advanced tumors: SRC reclaims center stage. *Clin Cancer Res* 12:1398–1401, 2006.
- <sup>192</sup> Green TP, Fennell M, Whittaker R, et al: Pre-clinical anticancer activity of the potent, oral Src inhibitor AZD0530. *Mol Oncol* 3:248-261, 2009.
- <sup>193</sup> Ammer AG, Kelley LC, Hayes KE, et al: Saracatinib impairs head and neck squamous cell carcinoma invasion by disrupting invadopodia function. *J Cancer Sci Ther* 1:52-61, 2009.
- <sup>194</sup> Kopetz S, Shah AN, Gallick GE: Src continues aging: current and future clinical directions. *Clin Cancer Res* 13:7232–7236, 2007.
- <sup>195</sup> Jiang H, Liu L, Ye J, Liu H, Xing S, Wu Y. Focal adhesion kinase serves as a marker of cervical lymph node metastasis and is a potential therapeutic target in tongue cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010 Sep;136(9):1295-302
- <sup>196</sup> de Vicente JC1, Rosado P, Lequerica-Fernández P, Allonca E, Villallaín L, Hernández-Vallejo G. Focal adhesion kinase overexpression: correlation with lymph node metastasis and shorter survival in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2013 Jun;35(6):826-30. doi: 10.1002/hed.23038. Epub 2012 Jul 17.
- <sup>197</sup> Miyazaki T, Kato H, Nakajima M, et al. Fak overexpression is correlated with tumour invasiveness and lymph node metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2003;89:140–145.
- <sup>198</sup> Cance WG, Harris JE, Iacocca MV, Roche E, Yang X, Chang J, Simkins S, Xu L. Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clin Cancer Res*. 2000 Jun;6(6):2417-23
- <sup>199</sup> Theocharis SE, Kouraklis GP, Kakisis JD, Kanelli HG, Apostolakou FE, Karatzas GM, Koutselinis AS. Focal adhesion kinase expression is not a prognostic predictor in colon adenocarcinoma patients. *Eur J Surg Oncol*. 2003 Sep;29(7):571-4.
- <sup>200</sup> Furuyama K, Doi R, Mori T, et al. Clinical significance of focal adhesion kinase in resectable pancreatic cancer. *World J Surg* 2006;30:219–226.
- <sup>201</sup> Schneider GB1, Kurago Z, Zaharias R, Gruman LM, Schaller MD, Hendrix MJ. Elevated focal adhesion kinase expression facilitates oral tumor cell invasion. *Cancer*. 2002 Dec 15;95(12):2508-15.
- <sup>202</sup> l-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 2004;23(43):7274–82.

- 
- <sup>203</sup> Atsumi N, Ishii G, Kojima M, Sanada M, Fujii S, Ochiai A. Podoplanin, a novel marker of tumor-initiating cells in human squamous cell carcinoma A431. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;373(1):36–41.
- <sup>204</sup> Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 1977;197(4302):461–3.
- <sup>205</sup> Martín-Villar E, Scholl FG, Gamallo C, Yurrita MM, Muñoz-Guerra M, Cruces J, et al. Characterization of human PA2.26 antigen (T1alpha-2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2005;113(6):899–910.
- <sup>206</sup> Vormittag L, Thurnher D, Geleff S, Pammer J, Heiduschka G, Brunner M, et al. Co-expression of Bmi-1 and podoplanin predicts overall survival in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck treated with radio(chemo)therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009;73(3):913–8.
- <sup>207</sup> Shi P, Liu W, Zhou ZT, He QB, Jiang WW. Podoplanin and ABCG2: malignant transformation risk markers for oral lichen planus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19(3):844–9.
- <sup>208</sup> Kunita A, Kashima TG, Morishita Y, Fukayama M, Kato Y, Tsuruo T, et al. The platelet aggregation-inducing factor aggrus/podoplanin promotes pulmonary metastasis. *Am J Pathol* 2007;170(4):1337–47.
- <sup>209</sup> Dumoff KL, Chu CS, Harris EE, Holtz D, Xu X, Zhang PJ, Acs G (2006) Low podoplanin expression in pretreatment biopsy material predicts poor prognosis in advanced-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated by primary radiation. *Mod Pathol* 19: 708–716
- <sup>210</sup> Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, Hirakawa S, Feng D, Harvey N, Williams M, Dvorak AM, Dvorak HF, Oliver G, Detmar M (2003) T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J* 22:3546–3556
- <sup>211</sup> Sleeman JP, Krishnan J, Kirkin V, Baumann P (2001) Markers for the lymphatic endothelium: in search of the holy grail? *Microsc Res Tech* 55:61–69
- <sup>212</sup> Hirakawa S, Hong YK, Harvey N, Schacht V, Matsuda K, Libermann T, Detmar M (2003) Identification of vascular lineage-specific genes by transcriptional profiling of isolated blood vascular and lymphatic endothelial cells. *Am J Pathol* 162:575–586
- <sup>213</sup> Funayama A, Cheng J, Maruyama S, Yamazaki M, Kobayashi T, Syafriadi M, Kundu S, Shingaki S, Saito C, Saku T (2011) Enhanced expression of podoplanin in oral carcinomas in situ and squamous cell carcinomas. *Pathobiology* 78:171–180

- 
- <sup>214</sup> Maula SM, Luukka M, Grénman R, Jackson D, Jalkanen S, Ristamäki R (2003) Intratumoral lymphatics are essential for the metastatic spread and prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck region. *Cancer Res* 63:1920–1926
- <sup>215</sup> Nakayama Y, Matsumoto K, Nagato M, Inoue Y, Katsuki T, Minagawa N, Shibao K, Tsurudome Y, Hirata K, Higure A, Sako T, Nagata N (2007) Significance of lymphangiogenesis as assessed by immunohistochemistry for podoplanin in patients with esophageal carcinoma. *Anticancer Res* 27:619–625
- <sup>216</sup> Margaritescu C, Raica M, Pirici D, Simionescu C, Mogoanta L, Stinga AC, Stinga AS, Ribatti D (2010) Podoplanin expression in tumor-free resection margins of oral squamous cell carcinomas: an immunohistochemical and fractal analysis study. *Histol Histopathol* 25:701–711
- <sup>217</sup> Liang P, Hong JW, Ubukata H, Liu HR, Watanabe Y, Katano M, Motohashi G, Kasuga T, Nakada I, Tabuchi T (2006) Increased density and diameter of lymphatic microvessels correlate with lymph node metastasis in early stage invasive colorectal carcinoma. *Virchows Arch* 448:570–575
- <sup>218</sup> Schoppmann SF, Bayer G, Aumayr K, Taucher S, Geleff S, Rudas M, Kubista E, Hausmaninger H, Samonigg H, Gnant M, Jakesz R, Horvat R, Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group (2004) Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer. *Ann Surg* 240:306–312
- <sup>219</sup> Roma AA, Magi-Galluzzi C, Kral MA, Jin TT, Klein EA, Zhou M (2006) Peritumoral lymphatic invasion is associated with regional lymph node metastases in prostate adenocarcinoma. *Mod Pathol* 19:392–398
- <sup>220</sup> Kyzas PA, Geleff S, Batistatou A, Agnantis NJ, Stefanou D (2005) Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol* 206:170–177
- <sup>221</sup> Shimada Y, Ishii G, Nagai K, Atsumi N, Fujii S, Yamada A, Yamane Y, Hishida T, Nishimura M, Yoshida J, Ikeda N, Ochiai A (2009) Expression of podoplanin, CD44, and p63 in squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Sci* 100:2054–2059
- <sup>222</sup> Zhao D, Pan J, Li XQ, Wang XY, Tang C, Xuan M (2008) Intratumoral lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma and its clinicopathological significance. *J Oral Pathol Med* 37:616–625
- <sup>223</sup> de Sousa SF, Gleber-Netto FO, de Oliveira-Neto HH, Batista AC, Nogueira Guimarães Abreu MH, de Aguiar MC (2012) Lymphangiogenesis and podoplanin expression in oral squamous cell carcinoma and the associated lymph nodes. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 20:588–594







# ANEXO 1

## ARTÍCULOS PUBLICADOS:

- de Vicente JC, Rodrigo JP, Rodríguez-Santamarta T, Lequerica-Fernández P, Allonca E, García-Pedrero JM. **Cortactin and focal adhesion kinase as predictors of cancer risk in patients with premalignant oral epithelial lesions**. Oral Oncol. 2012 Jul;48(7):641-6.
- de Vicente JC, Rodrigo JP, Rodríguez-Santamarta T, Lequerica-Fernández P, Allonca E, García-Pedrero JM. **Podoplanin expression in oral leukoplakia: Tumorigenic role**. Oral Oncol. 2013 Jun; 49(6): 598-603.
- de Vicente JC, Santamarta TR, Rodrigo JP, García-Pedrero JM, Allonca E, Blanco-Lorenzo V. **Expression of podoplanin in the invasion front of oral squamous cell carcinoma is not prognostic for survival**. Virchows Arch. 2015 May;466(5):549-58.

## COMUNICACIONES PRESENTADAS EN CONGRESOS:

- **Expresión de la podoplanina en las leucoplasias orales: un marcador de progresión tumoral.**  
Rodríguez-Santamarta T; de Vicente JC; Rodrigo JP; Lequerica- Fernández P; Allonca E; García-Pedrero JM  
22 CONGRESO NACIONAL DE CIRUGÍA ORAL Y MAXILOFACIAL.  
Córdoba. 5 -7 Junio de 2013.  
Premio a la mejor comunicación presentada en el Transcurso del congreso
- **Papel de la podoplanina como marcador pronóstico en el cáncer epidermoide de la cavidad oral.**  
Tania Rodríguez Santamarta; Juana María García Pedrero; Juan Pablo Rodrigo, Verónica Blanco Lorenzo; Lucas de Villalaín; Álvaro Fernandez-del Valle; Juan Carlos de Vicente  
III CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CABEZA Y CUELLO.  
Oviedo 27y 28 de Noviembre de 2014

- **Asociación de quinasa de adhesión focal, cortactina y podoplanina como marcadores de evolución y pronóstico en lesiones potencialmente malignizables y en carcinoma epidermoide de la cavidad oral.**

Rodríguez Santamarta, T;García- Pedrero JM; Rodrigo JP; Allonca E;  
Lequerica P; deVicente JC

23 CONGRESO NACIONAL DE CIRUGÍA ORAL Y MAXILOFACIAL  
Oviedo. 4-6 de Junio de 2015