



Universidad de Oviedo

Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias

Programa de Doctorado en Biomedicina y Oncología Molecular

**“Expresión de factores de pluripotencialidad en
lesiones premalignas y carcinomas de cabeza y cuello y
su valor como factor pronóstico”**

TESIS DOCTORAL

Autor: Daniel Pedregal Mallo

Octubre de 2020



Universidad de Oviedo

Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias

Programa de Doctorado en Biomedicina y Oncología Molecular

TESIS DOCTORAL

**“Expresión de factores de pluripotencialidad en
lesiones premalignas y carcinomas de cabeza y cuello y
su valor como factor pronóstico”**

Autor

Daniel Pedregal Mallo

Directores

Dr. D. Juan Pablo Rodrigo Tapia
Dra. Dña. Juana María García Pedrero

Tutor

Dr. D. César Antonio
Álvarez Marcos



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español: Expresión de factores de pluripotencialidad en lesiones premalignas y carcinomas de cabeza y cuello y su valor como factor pronóstico	Inglés: Expression of pluripotency factors in head and neck premalignant lesions and carcinomas, and their prognostic value
2.- Autor	
Nombre: Daniel Pedregal Mallo	DNI/Pasaporte/NIF
Programa de Doctorado: Biomedicina y Oncología Molecular	
Órgano responsable: IUOPA, Universidad de Oviedo	

RESUMEN (en español)

El cáncer de cabeza y cuello es actualmente la séptima neoplasia maligna más común a nivel mundial. Un número importante de estos tumores se desarrollan a partir de lesiones precursoras, cuyo comportamiento y riesgo de malignización continúa siendo difícilmente predecible con las herramientas clínicas actualmente disponibles. En los últimos años se han venido estudiando diferentes biomarcadores moleculares que permitan clasificar de forma más precisa la posible evolución tanto de las lesiones precursoras de malignidad como de los carcinomas escamosos de cabeza y cuello (CECC).

Hipótesis: La expresión de factores de pluripotencialidad relacionados con las células madre tumorales juega un papel importante en el desarrollo de los CECC, pudiendo ser útil para determinar el riesgo de progresión de lesiones premalignas a cáncer y el pronóstico de los tumores de esta área.

Objetivo: El objetivo global de esta tesis fue evaluar la expresión de los factores de pluripotencialidad NANOG, SOX2 y OCT4 en lesiones premalignas de laringe y en CECC, y establecer posibles correlaciones con las características clínico-patológicas y el pronóstico de los pacientes.

Métodos: Se recogieron de forma retrospectiva muestras de tejido de 100 pacientes con displasias de laringe y 382 con CECC que recibieron tratamiento quirúrgico en el Hospital Universitario Central de Asturias entre 1990 y 2010. Se construyeron matrices tisulares para el análisis inmunohistoquímico de NANOG, SOX2 y OCT4. Para validar los resultados en

CECC, se realizó un análisis computacional del impacto clínico de la expresión de ARNm de NANOG y SOX2, empleando datos disponibles en *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) de una cohorte de 530 pacientes.

Resultados: La expresión de NANOG y SOX2 se detectó de forma frecuente tanto en displasias de laringe como en CECC, mientras que no hallamos expresión de OCT4. En las displasias de laringe, la expresión de NANOG y SOX2 se asoció con un mayor riesgo de progresión a carcinoma. En los CECC, la expresión de NANOG y SOX2 se relacionó con una mejor supervivencia de los pacientes con tumores faríngeos. En el caso de NANOG, se observó un valor pronóstico diferencial dependiendo de la presencia o no de metástasis ganglionares. El análisis computacional con los datos del TCGA confirmó el impacto diferencial de NANOG en el pronóstico de los pacientes, y también de SOX2 en esta cohorte. La combinación de NANOG-SOX2 mostró una mayor capacidad pronóstica que la expresión individual de cada factor, de acuerdo con la relación funcional que existe entre ambos factores.

Conclusiones: La expresión de NANOG y SOX2 ocurre en las etapas iniciales de la carcinogénesis laríngea, emergiendo ambos factores como potentes predictores del riesgo de cáncer en pacientes con lesiones premalignas. Además, nuestros resultados demuestran una relevancia pronóstica diferencial de NANOG y SOX2 en CECC, mostrando correlaciones con un mejor pronóstico de forma específica en pacientes con tumores de localización faríngea que presentan metástasis ganglionares.

RESUMEN (en inglés)

Head and neck cancer is the seventh most common malignancy worldwide. A significant proportion of these tumors arise from precancerous lesions, whose behavior and malignization risk is rather unpredictable despite the current clinical tools. In recent years, novel molecular biomarkers have been intensively studied to improve risk assessment of the precancerous lesions and stratification of head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) patients.

Hypothesis: The expression of pluripotency factors related to Cancer Stem Cells plays a relevant role in HNSCC pathogenesis and tumor formation. Accordingly, these factors

could be useful for the risk assessment of premalignant lesions progression to carcinoma, and as prognostic factors in these tumors.

Objective: The overall goal of this thesis was to evaluate the expression of the pluripotency factors NANOG, SOX2 and OCT4 in laryngeal dysplasias and HNSCC, and to establish possible associations with clinicopathological parameters and their impact on patient prognosis.

Methods: We retrospectively collected surgical tissue specimens from 100 laryngeal dysplasias and 382 HNSCC from patients who underwent surgical treatment at the Hospital Universitario Central de Asturias between 1990 and 2010. Tissue microarrays were constructed to perform immunohistochemical analysis of NANOG, SOX2, and OCT4. In an attempt to confirm our findings, the clinical relevance of NANOG and SOX2 mRNA expression was investigated by analyzing a cohort of 530 HNSCC patients from *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) data.

Results: NANOG and SOX2 expression was frequently detected by immunohistochemistry in laryngeal dysplasias and HNSCC, whereas we did not observe OCT4 expression. NANOG and SOX2 expression was strongly associated with a higher laryngeal cancer risk. In HNSCC, NANOG and SOX2 expression was correlated with a better prognosis in patients with pharyngeal tumors. Specifically, NANOG showed a differential prognostic value depending on the presence or absence of lymph node metastasis. *In silico* analysis of NANOG and SOX2 using the transcriptomic data from the TCGA confirmed that NANOG and SOX2 mRNA expression also differentially influenced patient prognosis depending on the presence of lymph node metastasis. Combined expression of NANOG-SOX2 had a stronger prognostic significance than each factor individually, according to the well-known functional relationship between these two factors.

Conclusions: NANOG and SOX2 expression frequently occurs in early stages of laryngeal carcinogenesis, and both factors emerge as strong predictors of cancer risk in patients with precancerous lesions. Furthermore, our findings uncover a differential prognostic relevance of NANOG and SOX2 expression in HNSCC, thus showing correlations with a better prognosis specifically in patients with pharyngeal tumors and lymph node metastasis.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
EN BIOMEDICINA Y ONCOLOGÍA MOLECULAR**

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar esta Tesis Doctoral quiero plasmar un breve, pero profundo agradecimiento a algunas de las personas sin las cuales no hubiese sido posible este trabajo.

En primer lugar, a mis directores de tesis. Al Prof. Juan Pablo Rodrigo Tapia, por su paciente docencia como médico y como investigador, por su apoyo constante y por su ejemplo tanto profesional como personal. A la Dra. Juan García Pedrero, por su incansable trabajo, sus enseñanzas y el amable espíritu de mejora que transmite al grupo. Quiero también reconocer la labor de todo el personal del laboratorio de ORL – Cáncer de cabeza y cuello del ISPA e IUOPA, sin la cual no sería posible esta tesis, así como tantos otros trabajos.

A todo el Servicio de ORL del Hospital Universitario Central de Asturias, en el que me he formado, por su acogida e inestimable aportación en mi evolución personal y profesional durante estos años. Ha sido un orgullo y un privilegio formar parte de esa escuela y familia. A su jefe, el Prof. José Luis Llorente Pendás, por su amparo, por las oportunidades que me ha dado y por inculcarme la cultura de trabajo para el ejercicio de la Medicina y de la investigación orientadas a la excelencia. A mis tutores, al Prof. César Álvarez Marcos por su infatigable voluntad para enseñar y por su gran apoyo y al Dr. Fernando López por ser un referente en nuestra formación y por toda la ayuda que nos presta.

A mis residentes mayores, por acogerme, guiarme y enseñarme en mis inicios como médico, habiendo sido las “menos mayores” un verdadero modelo a seguir; a mis residentes pequeños, por su ayuda, cariño y comprensión; y a mi “coR”, por todos los buenos momentos de estos años dentro de nuestra peculiar relación.

A mis amigos (Carlos, Pablo, Juan M., Gerardo, Juan V., Jon, Víctor, Fernando, Santiago...), por su lealtad incondicional, acompañando en las victorias, pero, sobre todo, en las derrotas.

En último lugar, y el más importante, a mi familia. A mis abuelos, Carmen y José, y a mis padres, Marigel y Juan Antonio, por ser el pilar fundamental de mi vida y haber estado y seguir estando siempre ahí.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	21
1 INTRODUCCIÓN	25
1.1 LESIONES PREMALIGNAS	27
1.1.1 <i>Epidemiología</i>	27
1.1.2 <i>Etiología</i>	27
1.1.3 <i>Clínica y diagnóstico</i>	28
1.1.3.1 <i>Clasificación macroscópica</i>	28
1.1.3.2 <i>Clasificación histológica</i>	30
1.1.4 <i>Biomarcadores en lesiones premalignas</i>	33
1.1.5 <i>Tratamiento</i>	35
1.1.6 <i>Pronóstico</i>	37
1.2 CARCINOMAS ESCAMOSOS DE CABEZA Y CUELLO	37
1.2.1 <i>Epidemiología</i>	37
1.2.2 <i>Etiología</i>	38
1.2.3 <i>Clínica y diagnóstico</i>	39
1.2.4 <i>Estadificación</i>	40
1.2.5 <i>Tratamiento</i>	41
1.2.6 <i>Pronóstico</i>	42
1.3 CÉLULAS MADRE TUMORALES Y FACTORES DE PLURIPOTENCIALIDAD	43
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	49
2.1 HIPÓTESIS	51
2.2 OBJETIVOS	51
3 MATERIAL Y MÉTODOS	53
3.1 SELECCIÓN DE PACIENTES Y MUESTRAS DE TEJIDO	55
3.1.1 <i>Lesiones premalignas</i>	55
3.1.2 <i>Carcinomas escamosos de cabeza y cuello</i>	55
3.1.3 <i>Aspectos éticos</i>	56
3.2 ELABORACIÓN DE MATRICES TISULARES (<i>TISSUE MICROARRAYS, TMAS</i>)	57
3.3 ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO	57
3.4 DETECCIÓN DEL VPH	60
3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	61
4 RESULTADOS	63
4.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES Y LAS MUESTRAS DE DISPLASIA DE LARINGE	65

4.2	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE NANOG EN DISPLASIAS DE LARINGE.....	65
4.2.1	<i>Características de los pacientes.....</i>	65
4.2.2	<i>Expresión proteica de NANOG en displasias de laringe.....</i>	66
4.2.3	<i>Asociación de la expresión de NANOG con el riesgo de cáncer de laringe.....</i>	68
4.3	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE SOX2 EN DISPLASIAS DE LARINGE	71
4.3.1	<i>Características de los pacientes.....</i>	71
4.3.2	<i>Expresión proteica de SOX2 en displasias de laringe.....</i>	72
4.3.3	<i>Asociación de la expresión de SOX2 con el riesgo de cáncer de laringe.....</i>	73
4.4	ANÁLISIS CONJUNTO DE NANOG Y SOX2 EN DISPLASIAS DE LARINGE.....	76
4.4.1	<i>Características de los pacientes.....</i>	76
4.4.2	<i>Expresión conjunta NANOG-SOX2</i>	76
4.4.3	<i>Asociación de la co-expresión NANOG-SOX2 con el riesgo de cáncer de laringe.....</i>	77
4.5	CARCINOMAS ESCAMOSOS DE CABEZA Y CUELLO	79
4.6	EXPRESIÓN DE NANOG EN CECC	81
4.7	EXPRESIÓN DE SOX2 EN CECC	82
4.8	EXPRESIÓN DE OCT4 EN CECC	84
4.9	ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FACTORES DE PLURIPOTENCIALIDAD CON LA RECIDIVA TUMORAL	84
4.10	ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FACTORES DE PLURIPOTENCIALIDAD CON LA SUPERVIVENCIA	88
4.11	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN COMBINADA Y DIFERENCIAL DE NANOG Y SOX2	95
4.12	ANÁLISIS MULTIVARIANTE EN RELACIÓN CON LA SUPERVIVENCIA	99
4.13	VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS	100
5	DISCUSIÓN.....	103
5.1	FACTORES DE PLURIPOTENCIALIDAD EN LAS ETAPAS INICIALES DE LA TUMORIGÉNESIS	105
5.1.1	<i>Expresión de factores de pluripotencialidad en lesiones premalignas.....</i>	105
5.1.2	<i>Biomarcadores del riesgo de progresión de lesiones premalignas a cáncer</i>	106
5.2	FACTORES DE PLURIPOTENCIALIDAD EN CARCINOMAS ESCAMOSOS DE CABEZA Y CUELLO	110
5.2.1	<i>Relación de los factores de pluripotencialidad con la supervivencia y la recidiva tumoral..</i>	110
5.2.2	<i>Relación de la expresión de factores de pluripotencialidad con las metástasis ganglionares</i> <i>114</i>	
5.2.3	<i>Relación de la expresión de factores de pluripotencialidad con la localización del tumor... 116</i>	
5.2.3.1	Orofaringe e hipofaringe.....	116
5.2.3.2	Laringe	118
	Los marcadores de células madre tumorales más estudiados en CEL han sido la expresión de CD44 y de CD133, y la actividad de ALDH ¹⁷³ . Sin embargo, la influencia de estos marcadores en la progresión del CEL aún plantea diversas incógnitas.....	118
6	CONCLUSIONES	123

7	BIBLIOGRAFÍA	127
8	ANEXO.....	149

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AJCC: *American Joint Committee on Cancer*

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

C-terminal: Carboxi-terminal

CCC: Cáncer de Cabeza y Cuello

CCND1: Ciclina D1

CECC: Carcinoma escamoso de cabeza y cuello

CECO: Carcinoma escamoso de cavidad oral

CEH: Carcinoma escamoso de hipofaringe

CEL: Carcinoma escamoso de laringe

CEO: Carcinoma escamoso de orofaringe

CSC: Célula madre tumoral (*Cancer Stem Cell*)

CTTN: Cortactina

DAB: Diaminobenzidina

DE: Desviación estándar

EEN: Extensión extranodal

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor*)

EIA: Inmunoensayo enzimático / Enzimoimmunoanálisis (*Enzymatic immunoassay*)

FAK: Kinasa de Adhesión Focal (*Focal Adhesion Kinase*)

HMG: Grupo de alta movilidad (*High Mobility Group*)

HR: *Hazard ratio*

HSI: Imagen de alta velocidad (*High Speed Imaging*)

IARC: Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (*International Agency for Research on Cancer*)

IC: Intervalo de confianza

IHQ: Inmunohistoquímica

ISH: Hibridación *in situ* (*In Situ Hybridation*)

KTP: Potasio-Titanil-Fosfato (*Potassium-Titanyl-Phosphate*)

MGMT: Metil Guanina Metil Transferasa

mi-ARN: Micro-ARN

MMP: Metaloproteinasas de matriz celular

N-terminal: Amino-terminal

NBI: Imagen de banda estrecha (*Narrow Band Imaging*)

OMS: Organización Mundial de la Salud

ORL: Otorrinolaringología

PA: Paquetes-Año

PAAF: Punción por Aspiración con Aguja Fina

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PDB: *Protein Data Bank*

PET-TC: Tomografía por Emisión de Positrones (*Positron Emission Tomography*)

PET-TC: Tomografía por Emisión de Positrones-Tomografía Computarizada

QRT: Quimiorradioterapia

QT: Quimioterapia

RCSB: *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics*

RM: Resonancia Magnética

RT-PCR: PCR en tiempo real (*Real Time – PCR*)

RT: Radioterapia

SEE: Supervivencia Específica de Enfermedad

SG: Supervivencia Global.

SLE: Supervivencia Libre de Enfermedad

SRY: Región de determinación sexual del cromosoma Y (*Sex-determining Region Y*)

TC: Tomografía Computarizada

TCGA: *The Cancer Genome Atlas*

TEM: Transición epitelio-mesénquima

TLE: Tiempo libre de enfermedad

TMA: *Tissue MicroArray*

TME: Transición mesénquima-epitelio

UICC: Unión Internacional Contra el Cáncer

VAS: Vía Aero-digestiva Superior

VEB: Virus de Epstein-Barr

VPH: Virus del Papiloma Humano

VPN: Valor Predictivo Negativo

VPP: Valor Predictivo Positivo

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Lesiones premalignas

Las lesiones premalignas de laringe, también denominadas lesiones precursoras de cáncer o lesiones precancerosas, constituyen un espectro de alteraciones que suponen un desafío en la práctica clínica por su potencial transformación maligna. De acuerdo con la clasificación actual de la Organización Mundial de la Salud (OMS), las lesiones precursoras de cáncer en laringe e hipofaringe serían la displasia y el papiloma de células escamosas¹. La displasia es una alteración de la estructura del epitelio laríngeo que se relaciona con un mayor riesgo de carcinoma, siendo su causa más importante el hábito tabáquico. Los papilomas de células escamosas son tumores benignos exofíticos, con centro fibrovascular, cuya causa más común es la infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH).

Los cambios estructurales y citológicos que se producen en lesiones como las displasias son el resultado de un cúmulo de alteraciones genéticas y moleculares, consecuencia de la exposición a los carcinógenos, principalmente del tabaco. Dichas alteraciones se asocian con un aumento de la probabilidad de progresión hacia carcinoma escamoso.

1.1.1 Epidemiología

La incidencia de las displasias es difícil de estimar debido a la variabilidad en la definición clínica que se emplea en los estudios epidemiológicos y la escasez de estos. Las lesiones displásicas se ven habitualmente en adultos, con más frecuencia en varones (ratio de 4,6:1)¹, diferencia que toma mayor relevancia a partir de la sexta década de la vida. Dentro de las leucoplasias diagnosticadas en la clínica, se encuentra displasia en el estudio histológico en menos de la mitad de los casos². La incidencia de lesiones precursoras de cáncer en Estados Unidos se estima en 10,2 y 2,1 casos por cada 100.000 pacientes en hombres y mujeres, respectivamente¹. Las displasias pueden asentar en cualquier zona de la laringe, pero lo hacen con más frecuencia en las cuerdas vocales y de forma unilateral. También pueden encontrarse displasias, con mucha menor frecuencia, en las comisuras, hipofaringe o tráquea³⁻⁵.

1.1.2 Etiología

Los principales factores de riesgo para el desarrollo de lesiones premalignas en la vía aerodigestiva superior (VAS), y más en concreto en la laringe, son el hábito tabáquico, el consumo de alcohol y el reflujo faringo-laríngeo. El tabaco es, con gran diferencia, el agente

causal más importante de este tipo de lesiones, siendo el efecto del alcohol mucho más limitado en la laringe. El riesgo de desarrollar lesiones premalignas se incrementa con la edad de comienzo de consumo de tabaco, la duración del hábito y el tipo de tabaco⁶. Respecto al reflujo faringo-laríngeo, su posible efecto en la tumorigénesis laríngea siempre ha sido controvertido, sobre todo debido a la falta de estudios adecuados, pero continúa considerándose un posible factor de riesgo⁷⁻⁹. La infección por genotipos de alto riesgo del VPH parece tener una importancia menor en el desarrollo de displasias¹⁰⁻¹³, siendo el genotipo implicado con más frecuencia en la tumorigénesis laríngea el VPH 16^{14,15}. La prevalencia global del VPH en lesiones displásicas se sitúa en torno al 12% (tasas del 0 al 38%, según las series)¹⁰⁻¹³.

1.1.3 Clínica y diagnóstico

El síntoma de presentación más frecuente de las displasias laríngeas es la disfonía en grado variable. No obstante, este es un síntoma inespecífico, y el más frecuente en la patología laríngea. Con menor frecuencia pueden presentarse con faringodinia o con tos crónica. La inespecificidad de los síntomas hace necesaria la exploración faringo-laríngea por un otorrinolaringólogo.

1.1.3.1 Clasificación macroscópica

Las displasias se identifican en la clínica por la visualización de leucoplasias (lesiones blancas), eritropasias (lesiones rojas), eritroleucoplasias (lesiones rojas y blancas) o un conjunto de lesiones inespecíficas que se agrupan dentro del concepto de laringitis crónica. Se presentan como manchas de tamaño variable, localizadas o difusas y de morfología aplanada o como lesiones exofíticas y papilares. Tradicionalmente se considera que las lesiones de aspecto blanquecino se deben a la metaplasia de la mucosa, mientras que el aspecto rojizo viene dado por una reacción inflamatoria del corion. Sin embargo, la apariencia macroscópica no mantiene una relación específica con los hallazgos microscópicos, por lo que siempre es precisa la confirmación histológica^{3,16}.

Por este motivo, en los últimos años se han venido desarrollando diferentes técnicas y procedimientos con el objetivo de poder distinguir a nivel macroscópico entre lesiones benignas, lesiones premalignas y carcinomas invasivos de laringe, buscando medios ópticos

que proporcionen datos objetivos para distinguir este tipo de lesiones. Una de las alteraciones debidas a estas lesiones es la de la dinámica laríngea, que produce uno de los síntomas más frecuentes: la disfonía. Esta alteración de la movilidad vocal normal se debe a procesos infiltrativos en estructuras submucosas. La exploración básica de la dinámica laríngea se realiza mediante estroboscopia, permitiendo valorar el movimiento de la onda mucosa, que se encuentra restringido en lesiones infiltrativas. Sin embargo, esta valoración subjetiva no permite distinguir fácilmente y con seguridad lesiones premalignas de pequeños carcinomas, además de ser un método poco reproducible debido a que se basa en la percepción del observador. Esta es una de las razones de que se precise confirmación histológica para el diagnóstico. Sin embargo, una distinción más precisa previa a la obtención de biopsia o la resección completa de la lesión, ambos procedimientos invasivos, permitiría una mejor planificación del tratamiento. Para ello se han diseñado otros métodos basados también en el análisis de la dinámica vocal, como la imagen de alta velocidad (HSI: *High Speed Imaging* en inglés), que permite captar el movimiento de las cuerdas vocales en tiempo real, al capturar 4000 imágenes por segundo, y realizar un análisis cuantitativo sobre el mismo gracias a herramientas informáticas de procesamiento de las imágenes¹⁷. De esta forma, se puede llevar a cabo un estudio cuantitativo y más reproducible que con la estroboscopia, ya que las variaciones en la dinámica de las cuerdas orientan hacia determinados tipos de lesión que por simple visualización pueden ser muy similares. Otros métodos diagnósticos de carácter visual, pero no basados en la dinámica vocal, son la autofluorescencia y la imagen de banda estrecha o NBI (siglas de *Narrow Band Imaging* en inglés). Ambas tienen una elevada sensibilidad y reproducibilidad en la valoración de la extensión superficial de las lesiones laríngeas, pero son también poco específicas y tampoco permiten distinguir fácilmente lesiones precursoras de invasivas. Mediante endoscopia rígida o flexible, la NBI utiliza las propiedades del espectro de la luz para visualizar la red capilar superficial y los vasos subepiteliales. De esta forma, se pueden valorar cambios vasculares típicos en la transformación del tejido normal al neoplásico, así como determinar la extensión en superficie de las lesiones. Según el patrón vascular superficial, las lesiones se clasifican en 6 categorías de menor a mayor probabilidad de ser malignas¹⁸. La combinación de la NBI con la HSI también parece ser una herramienta sensible para la diferenciación de lesiones laríngeas en la consulta, aunque su especificidad es más limitada¹⁹. Por otro lado, la tomografía de coherencia óptica (*Optical Coherence Tomography* en inglés) y la

microscopía confocal láser proporcionan imágenes *in vivo* del tejido por debajo de la superficie mucosa. Algunos autores han defendido que con la tomografía de coherencia óptica se pueden diferenciar lesiones precancerosas de carcinomas invasivos en estadios tempranos ya que permite ver la rotura de la membrana basal, así como la microscopía confocal láser permitiría monitorizar las alteraciones malignas a nivel celular^{20,21}. La tomografía de coherencia óptica también se ha empleado, incorporándola a microscopios quirúrgicos, para la valoración intraoperatoria de las lesiones y la toma de decisiones en el mismo acto quirúrgico, presentando una alta correlación con el diagnóstico histológico posterior²².

1.1.3.2 Clasificación histológica

Se han empleado diferentes sistemas de clasificación para las displasias, con el fin de reflejar los diferentes cambios histológicos que se producen y su relación con el comportamiento biológico, especialmente la progresión a lesiones malignas²³⁻²⁶.

Con el objetivo de armonizar los conceptos de las diferentes clasificaciones con los hallazgos morfológicos y la terminología empleada, la OMS publicó en 2017 un nuevo sistema de clasificación bimodal, con dos grupos pronósticos: de bajo grado (displasias leves) y de alto grado (displasias moderadas y severas/carcinoma *in situ*) (Tabla 1). Si de cara al tratamiento se prefiere un sistema 3 grados, la categoría de displasias de alto grado se puede dividir posteriormente en displasia de alto grado y carcinoma *in situ*²⁴.

Tabla 1. Comparación entre las sucesivas clasificaciones de las displasias laríngeas.

Nivel de maduración anormal (OMS 2005)	OMS 2005	Clasificación SIN ^a	Clasificación de Ljubljana	Clasificación de Ljubljana modificada	OMS 2017
Ausente	Hiperplasia escamosa	Hiperplasia escamosa	Hiperplasia escamosa	SIL ^b de bajo grado	Displasia de bajo grado
1/3 inferior	Displasia leve	SIN-1	Hiperplasia basal/parabasal		
1/3 a 1/2	Displasia moderada	SIN-1 o SIN-2	Hiperplasia atípica	SIL ^b de alto grado	Displasia de alto grado
½ superior a 3/4	Displasia moderada	SIN-2			
Todo el espesor	Displasia severa				
	Carcinoma <i>in situ</i>				

^aSIN: Neoplasia escamosa intraepitelial (*Squamous Intraepitelial Neoplasia*).
^bSIL: Lesión escamosa intraepitelial (*Squamous Intraepitelial Lesion*).

En la Tabla 2 se explican las características morfológicas de cada grado de displasia. Actualmente la OMS no recomienda la realización de estudios moleculares complementarios para la clasificación de las displasias (como p53, p16, Ki-67 y EGFR).

Tabla 2a. Características morfológicas de cada grado de displasia laríngea.

<p>Displasia de bajo grado (incluye la categoría previa de displasia leve).</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bajo potencial de malignización. - Conjunto de cambios morfológicos que abarca desde la hiperplasia de células escamosas hasta el aumento de las células basales y parabasales ocupando como máximo la mitad inferior del epitelio, mientras que la parte superior conserva la maduración normal. 	
<p><u>Criterios histológicos</u></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Preservación de la estratificación: Transición de las células basales o aumento de la capa de células basales/parabasales con orientación perpendicular de la membrana basal y las células espinosas orientadas horizontalmente en la parte superior. - Estrato espinoso: Conjunto de cambios que van desde el incremento del estrato espinoso en todo el espesor hasta cambios en los que las células espinosas sólo se ven en la mitad superior del epitelio. - Estrato basal/parabasal: Conjunto de cambios, desde 2-3 estratos sin cambios hasta el aumento de las células basales y parabasales en la mitad inferior del epitelio.
<p><u>Criterios citológicos</u></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Atipia celular mínima. - Células parabasales: Ligero incremento del citoplasma en comparación con las células basales, núcleo alargado, cromatina uniformemente distribuida, no puentes intercelulares. - Pocas mitosis regulares en o cerca del estrato basal. - Pocas células disqueratósicas observadas.

Tabla 2b. Características morfológicas de cada grado de displasia laríngea (continuación).

<p>Displasia de alto grado (incluye las categorías previas de displasia moderada, severa y carcinoma <i>in situ</i>).</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lesión premaligna. - Conjunto de cambios que incluye células epiteliales inmaduras ocupando, al menos, la mitad del epitelio y, como máximo, todo el espesor del mismo. 	
<p><u>Criterios histológicos</u></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Maduración anormal. - Diferentes grados de estratificación desordenada y polaridad en todo el epitelio (como máximo). - Células epiteliales alteradas ocupando desde la mitad hasta el espesor completo del epitelio. - 2 subtipos: queratinizante (tipo célula escamosa) y no queratinizante (tipo célula basal). - Diferente grado de irregularidad en forma de red (bulbosa, extensión hacia abajo), con una membrana basal intacta. - No alteraciones en el estroma. <p>La pérdida completa de la estratificación y polaridad y/o atipia citológica severa y mitosis atípicas, cumple los requisitos de carcinoma <i>in situ</i> si se utiliza un sistema de 3 grados.</p>
<p><u>Criterios citológicos</u></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Atipia nuclear y celular evidente y fácilmente identificable, incluyendo una marcada variación en tamaño y forma, marcada variación en la intensidad de la tinción, normalmente con hiperchromasia, aumento del número y tamaño del nucléolo. - Incremento de la ratio Núcleo:Citoplasma. - Incremento de las mitosis en o por encima del nivel suprabasal, con o sin formas atípicas. - Células disqueratósicas o apoptóticas frecuentes por todo el epitelio.

La clasificación histológica ha sido el factor pronóstico más importante y una herramienta fundamental para decidir el tratamiento en la práctica clínica, pero presenta dos limitaciones importantes. En primer lugar, el diagnóstico histológico de las lesiones tiene una reproducibilidad menor a la deseable, ya que, tanto interobservador como intraobservador, los niveles de concordancia son bajos²⁷⁻²⁹. Por otro lado, el grado de displasia no predice de forma precisa el comportamiento biológico de estas lesiones^{30,31}.

1.1.4 Biomarcadores en lesiones premalignas

Con el objetivo de mejorar la precisión en el diagnóstico y pronóstico de las lesiones premalignas también se han venido estudiando diferentes parámetros analíticos y

moleculares que puedan ser utilizados como biomarcadores. A pesar de las múltiples líneas de investigación planteadas, hoy en día no existen marcadores diagnósticos y pronósticos con utilidad clínica en la oncología de laringe, como sí existen en tumores de otras áreas, siendo especialmente interesante de cara a su aplicación en la práctica clínica encontrar biomarcadores que permitan predecir el comportamiento de las lesiones premalignas de forma que sean útiles en el seguimiento de estos pacientes.

Considerándose la correlación observada entre la respuesta inflamatoria sistémica y la evolución de diferentes tumores³², se ha postulado un marcador de esta respuesta, la ratio Neutrófilos-Linfocitos, como predictor del riesgo de recurrencia, agresividad tumoral, mal pronóstico y posibilidad de metástasis en diferentes neoplasias. Este marcador se ha estudiado también para su aplicación en la carcinogénesis laríngea y para diferenciar entre lesiones benignas, precursoras y carcinomas, observándose diferencias significativas fundamentalmente en las lesiones precursoras y carcinomas respecto a las lesiones benignas³³.

A nivel molecular, una serie de cambios genéticos dan lugar a la aneuploidía de las células preneoplásicas^{34,35}. Las lesiones displásicas muestran con frecuencia cambios cromosómicos o pérdida de heterocigosidad (las más frecuentes afectan a 9p21, 17p13, 3p26 y 3p14), siendo las alteraciones en 9p21 las que se producen en etapas más tempranas y también las más frecuentes. Esto sugiere que el gen *CDKN2A* tiene un papel relevante en las fases iniciales de la transformación neoplásica. Asimismo, la alteración que probablemente produce la pérdida de heterocigosidad de 17p13 es *TP53*. Otros cambios moleculares encontrados de forma bastante constante en las lesiones premalignas de laringe incluyen la sobreexpresión de Ciclina D1³⁶ y la reactivación de la telomerasa³⁷⁻³⁹. En relación con esto, se han evaluado una variedad de marcadores que podrían ser clínicamente relevantes en la determinación de la evolución de las lesiones. La mayoría de los estudios se han centrado en los marcadores asociados con la proliferación celular, incluyendo las proteínas que participan en el ciclo celular por la alta probabilidad de que en este proceso se produzca algún tipo de alteración (PCNA, Ki67, p53, p16, p21, p27, y ciclina D1). Unos pocos estudios incluyen los marcadores reguladores de la invasión y la adhesión celular [Osteopontina, CD44, quinasa de adhesión focal (FAK), cortactina, podoplanina]⁴⁰. De todos los biomarcadores estudiados tan solo dos han demostrado ser indicadores del riesgo de evolución de lesión premaligna a

carcinoma, con mayor capacidad predictiva que la clasificación histológica, FAK y Cortactina⁴¹. Ambas están involucradas en la alteración de la dinámica del citoesqueleto de actina durante el proceso de invasión del carcinoma escamoso.

Otros potenciales marcadores moleculares son los micro-ARN (mi-ARN). Estas secuencias cortas de nucleótidos regulan la expresión y función génicas reprimiendo de forma específica determinados genes diana a nivel transcripcional y postranscripcional. Los mi-ARN pueden detectarse tanto en tejido tumoral como en plasma (mi-ARN circulante), lo que los convierte en posibles biomarcadores con elevada sensibilidad y especificidad para el diagnóstico, pronóstico y respuesta al tratamiento de diversas enfermedades. De hecho, los mi-ARN circulantes se emplean en diferentes contextos clínicos para la detección temprana de enfermedades, siendo considerados también una potencial diana terapéutica. Uno de estos mi-ARN, miR-21, se ha estudiado como marcador en lesiones premalignas y carcinomas de laringe, habiéndose comprobado que está implicado en la carcinogénesis laríngea, siendo sus niveles significativamente más altos en muestras de tejido y en plasma de pacientes con lesiones precursoras y carcinomas de laringe respecto a controles sanos⁴².

1.1.5 Tratamiento

El manejo de las lesiones premalignas de laringe varía entre centros y profesionales, a pesar de diferentes intentos por establecer guías para el tratamiento óptimo^{30,43,44}. En muchas ocasiones el diagnóstico y el tratamiento van de la mano, ya que con la exéresis completa de la lesión se realiza el diagnóstico histológico. Dada la tendencia a la recurrencia de estas lesiones, el manejo posterior depende en gran medida del análisis anatomopatológico de la biopsia previa.

Manejo conservador

La actitud expectante puede plantearse en determinados pacientes, especialmente en el caso de lesiones asintomáticas en pacientes con un uso profesional de la voz.

Tratamiento quirúrgico

El tratamiento quirúrgico de las displasias se basa en la resección mediante microcirugía laríngea, bien fría o empleando láser CO₂. El uso del láser CO₂ proporciona una mejor hemostasia, así como una mayor precisión y preservación

anatómica⁴⁵. Uno de los posibles inconvenientes de esta técnica quirúrgica es la quemadura de los bordes quirúrgicos, aunque no se han observado diferencias en la cicatrización respecto a controles intervenidos mediante microcirugía laríngea convencional⁴⁶. Existen otras modalidades de láser cuyo uso se ha venido incrementando, como el KTP (*Potassium Titanyl Phosphate*), que ha mostrado resultados equivalentes al láser CO₂ y potencialmente superiores al láser diodo pulsado^{47,48}.

Tratamiento ambulatorio

La introducción de laringoscopios con canales de trabajo flexibles ha permitido el desarrollo de técnicas diagnósticas y terapéuticas que se llevan a cabo en la consulta. Estos procedimientos se consideran seguros y coste-efectivos⁴⁹⁻⁵². No obstante, existen todavía dudas respecto a la utilidad de las biopsias realizadas en consulta dado que algunos estudios han mostrado índices de sensibilidad del 60%⁵³.

Existen láser fotoangiolíticos que permiten la ablación de lesiones premalignas en las cuerdas vocales sin dañar la lámina propia subyacente, consiguiendo tratar la lesión sin alterar la movilidad de las cuerdas vocales y el cierre glótico⁵⁴. También se puede emplear el láser diodo, CO₂ o el KTP para la ablación de lesiones premalignas en la consulta⁴⁷. No obstante, el empleo de técnicas ablativas tiene como inconveniente la falta de muestra para estudio histológico.

Radioterapia

La radioterapia es un tratamiento efectivo de tumores glóticos en estadios iniciales, pero también se emplea en determinados casos de lesiones premalignas de laringe. Algunos autores defienden el tratamiento radioterápico de las lesiones premalignas en pacientes con lesiones múltiples recurrentes, enfermedad extensa, pacientes que continúan fumando, aquellos con alto riesgo anestésico o casos de carcinoma *in situ*⁴⁴.

Terapia fotodinámica

La terapia fotodinámica se emplea en displasias orales y laríngeas. Ha mostrado resultados prometedores para el tratamiento de displasias de laringe y tumores en

estadios tempranos, aunque todavía son necesarios ensayos clínicos aleatorizados que valoren sus efectos a largo plazo^{31,55}.

Quimioprevención

Se ha estudiado el uso de suplementos de folato así como de agentes con efectos sistémicos como el interferón-alfa, el alfa-tocoferol o retinoides, pero aún no hay suficientes evidencias sobre el beneficio de estos tratamientos en el manejo de las lesiones premalignas de laringe^{53,56}.

1.1.6 Pronóstico

Las tasas de recurrencia de las displasias de bajo-moderado grado se sitúan entre el 8% y el 29%, con independencia de que la escisión se lleve a cabo mediante técnica fría o con láser CO₂⁵⁷⁻⁶⁰. La progresión de las lesiones premalignas tratadas mediante escisión quirúrgica a carcinoma invasivo se produce entre el 0% y el 35% de los casos, según las series^{57,58,61}.

1.2 Carcinomas escamosos de cabeza y cuello

El cáncer de cabeza y cuello (CCC) engloba una amplia variedad de tumores que se originan en la cavidad oral, senos y fosas paranasales, faringe y laringe. Más del 90% de estos tumores son de estirpe escamosa (carcinomas escamosos de cabeza y cuello, CECC), desarrollándose a partir de las superficies mucosas de la vía aero-digestiva superior⁶².

1.2.1 Epidemiología

El cáncer de cabeza y cuello supone, en su conjunto, la séptima neoplasia más frecuente a nivel mundial, con 890.000 nuevos casos y 450.000 fallecimientos en 2018⁶³. Según datos de la Agencia Internacional para Investigación en Cáncer (IARC: *International Agency for Research on Cancer*), la incidencia de tumores de cabeza y cuello en España en 2018, estandarizada por edad, fue de 10,7 casos por cada 100.000 habitantes. Los datos siguen mostrando que estos tumores afectan con mucha mayor frecuencia a los hombres, presentando una incidencia en estos de 17,4 casos por 100.000 habitantes frente a 4,5 en mujeres. En el año 2018, se produjeron en España 3850 fallecimientos por cáncer de cabeza y cuello. Entre las diferentes sublocalizaciones de cabeza y cuello, el tumor que se diagnostica con mayor frecuencia es el de labio/cavidad oral (4,2 nuevos casos cada 100.000

habitantes), seguido por el de laringe (2,9/100.000 habitantes). Estas dos localizaciones son también las que presentan una mayor mortalidad, con tasas estandarizadas parejas (1,1 fallecidos cada 100.000 habitantes)⁶⁴.

En regiones con programas eficaces frente al tabaquismo, como Estados Unidos, Australia, Dinamarca y Canadá, la incidencia de tumores de cabeza y cuello relacionados con el hábito tabáquico ha descendido (cavidad oral, laringe e hipofaringe), mientras que la incidencia de carcinomas de orofaringe ha ido en aumento, en relación al incremento de tumores relacionados con la infección por el VPH⁶⁵⁻⁶⁷. Sin embargo, en nuestro medio, donde hay una elevada incidencia de carcinomas de orofaringe, aquellos relacionados con el VPH siguen siendo una clara minoría⁶⁸. Por su parte, en los carcinomas de hipofaringe y laringe la presencia de infección por el VPH es ínfima⁶⁹.

1.2.2 Etiología

El factor de riesgo más importante para el desarrollo de CECC es el hábito tabáquico. El consumo intensivo de alcohol es el otro factor de riesgo clave, atribuyéndosele un efecto sinérgico con el consumo de tabaco sobre todo en los carcinomas faríngeos. Su papel en la carcinogénesis laríngea es más controvertido, aunque parece que sí tiene influencia en el desarrollo de tumores supraglóticos⁷⁰. Otros factores de riesgo que se han relacionado con la aparición de CECC incluyen la infección por el VPH o por el virus de Epstein-Barr (VEB), así como la exposición a tóxicos industriales como níquel, cromo o radio. También se ha valorado la posible influencia de factores dietéticos, habiéndose atribuido un papel protector al consumo de vegetales o lácteos⁷¹. Por otro lado, dietas carentes en vitaminas A y C se han relacionado con un mayor riesgo de cáncer de laringe, mientras que el alto consumo de vitaminas C y E se ha asociado a un menor riesgo⁷². Aunque no se han identificado mutaciones que condicionen un patrón de herencia de tumores de la vía aero-digestiva superior, la exposición a carcinógenos no tiene el mismo efecto en todos los individuos, por lo que se han sugerido posibles susceptibilidades genéticas que predispongan al desarrollo de estos tumores en base a deficiencias en mecanismos de reparación del ADN que estarían condicionadas por mutaciones heredables. De hecho, en familiares de primer grado de pacientes con CCC se ha demostrado un mayor riesgo de sufrir tumores de la VAS⁷². Factores socioeconómicos y geográficos influyen en el agente causante y, por tanto, el pronóstico de los CECC, como sucede con los tumores de orofaringe en los que la causa más

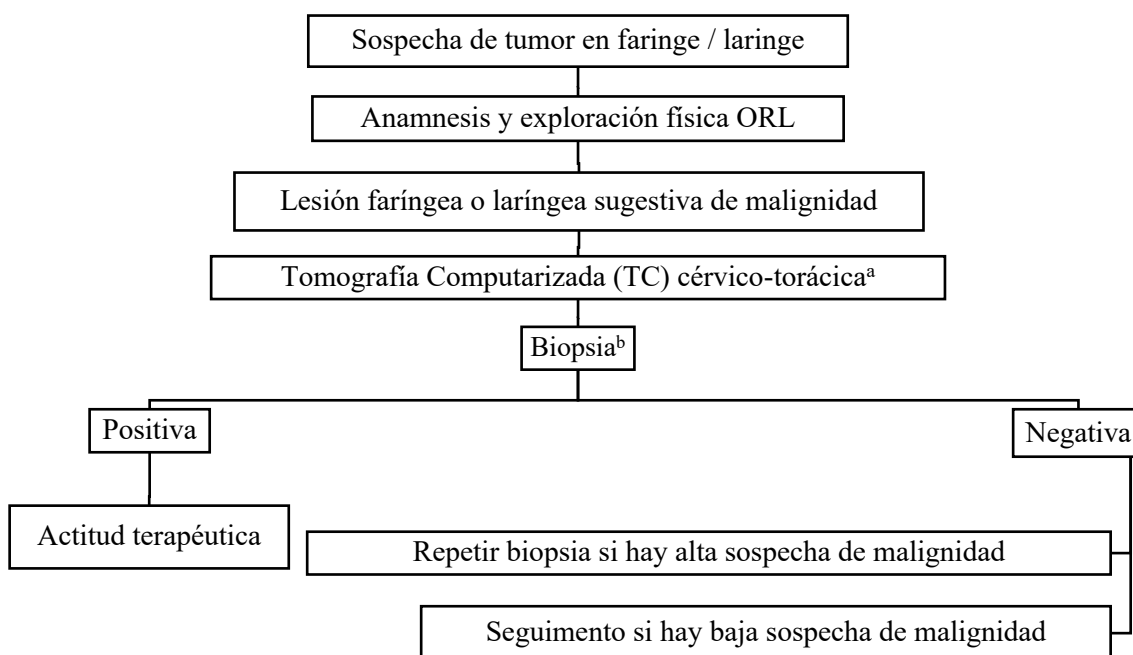
frecuente hoy en día en Estados Unidos o el norte de Europa es la infección por el VPH, mientras que en el norte de España continúa siendo el consumo mantenido de tabaco y alcohol.

1.2.3 Clínica y diagnóstico

La clínica de los tumores de faringe y laringe difiere según la sublocalización en la que se originen. La faringe se divide en tres pisos: nasofaringe, orofaringe e hipofaringe. Los tumores de nasofaringe no suelen dar síntomas en sus estadios iniciales, siendo su forma de presentación clínica más frecuente la aparición de una masa cervical, seguida por sensación de taponamiento o plenitud ótica o hipoacusia, y epistaxis u obstrucción nasal⁷³. La clínica inicial de los tumores de orofaringe puede ser muy sutil y poco específica. El síntoma más común de presentación en estos tumores es el dolor faríngeo, pudiendo asociar otalgia refleja, disfagia o trismus. El cáncer de hipofaringe se suele diagnosticar en estadios avanzados por falta de síntomas en los iniciales. Los síntomas por los que suelen consultar los pacientes son dolor de garganta, sensación de cuerpo extraño faríngeo o disfagia. Hasta un 25% de los pacientes consultan por una masa cervical como primer y único síntoma. En fases avanzadas, los tumores de hipofaringe ocasionan disfagia severa, otalgia refleja, hemoptisis, disfonía e, incluso, disnea. En cuanto a los tumores de laringe, los pacientes con neoplasias que asientan en las cuerdas vocales consultan normalmente por disfonía que suelen percibir como una ronquera persistente en el tiempo. Por norma general, una disfonía mantenida durante más de 2 semanas debería ser valorada por un otorrinolaringólogo de cara a realizar las exploraciones necesarias para descartar la presencia de un tumor. Los tumores supraglóticos suelen diagnosticarse en estadios más avanzados. El síntoma inicial más frecuente es la sensación de cuerpo extraño faringo-laríngeo. Otros síntomas habituales son la odinofagia, disfagia, disnea o la otalgia refleja ipsilateral. En otros casos el paciente consulta por la aparición de una masa cervical debido a la presencia metástasis ganglionares. La disfonía no suele ser el síntoma principal en los tumores supraglóticos, al menos hasta estadios avanzados. Los tumores subglóticos normalmente no dan síntomas hasta alcanzar estadios avanzados de la enfermedad, en los que ocasionan disnea y estridor. Además, en fases avanzadas estos tumores afectan también a las cuerdas vocales o a los nervios recurrentes, produciendo disfonía.

El diagnóstico de los tumores faringo-laríngeos requiere, en primer lugar, de la sospecha clínica ante los síntomas por los que consulta el paciente, ya que estos pueden ser inespecíficos en muchas ocasiones. Es importante realizar una historia clínica detallada y una exploración completa de la vía aero-digestiva superior por un otorrinolaringólogo. Una vez que se encuentra una lesión sugestiva de ser de naturaleza tumoral, debe confirmarse mediante la toma de biopsia para un diagnóstico histológico preciso. Además, debe practicarse una prueba de imagen que permita conocer la extensión de la enfermedad. Una vez confirmado el diagnóstico de tumor maligno de faringe o laringe y conocida su extensión local, locorregional y a distancia, se podrá plantear el tratamiento o tratamientos disponibles para el paciente.

Figura 1. Algoritmo diagnóstico general para tumores de faringe o laringe (adaptado de López y Rodrigo, 2019⁷¹).



^aResonancia Magnética (RM) en casos seleccionados. PET-TC en estadios avanzados.

^bHoy en día la toma de biopsia mediante fibroscopio flexible con canal de trabajo sería la primera opción. Si no está disponible o no es posible su realización, sería necesaria la biopsia mediante microcirugía laríngea.

1.2.4 Estadificación

La estadificación de los CECC suele realizarse empleando el sistema TNM, el más utilizado a nivel mundial. Dicho sistema se basa en el tamaño y/o extensión del tumor primario (T),

la afectación de ganglios linfáticos regionales (N) y la presencia o ausencia de metástasis a distancia (M). Las normas para clasificar los tumores de acuerdo con este sistema son publicadas y actualizadas periódicamente por la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) y la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). En 2016 publicaron la 8ª edición del Manual para la Estadificación del Cáncer, que entró en vigor para su aplicación en la práctica clínica en 2017. Esta actualización incorpora cambios notables que van en sintonía con la evidencia científica actual. En concreto, se distinguen los tumores de orofaringe asociados al VPH (aceptando su relación causal por la expresión de p16) de aquellos sin relación con el VPH. En lo referente a la extensión regional de la enfermedad, se introduce por primera vez la extensión extranodal (EEN) como factor pronóstico.

1.2.5 Tratamiento

El tratamiento curativo de los CECC se basa en dos pilares: la cirugía y la radioterapia. Estas dos modalidades de tratamiento se combinan de diferente forma o se aplican de forma aislada según el estadio del tumor y las características del paciente. La quimioterapia tiene todavía un papel secundario, siendo tratamiento coadyuvante con la radioterapia o terapia aislada con fines paliativos.

La cirugía es el tratamiento primario de elección en la mayoría de los CECC, realizándose la resección del tumor primario y de su extensión regional en el cuello. Dicha resección debe llevarse a cabo con la intención de asegurar que los márgenes estén libres de tumor, lo que se relaciona de forma clara con menores tasas de recidiva local. Además del tratamiento de la enfermedad macroscópica, la planificación quirúrgica tiene en cuenta la posibilidad de enfermedad microscópica oculta (que, según la localización del tumor primario, está presente en un 15-20% de los CECC), de manera que es frecuente la realización de vaciamientos cérvico-ganglionares selectivos profilácticos⁷⁴⁻⁷⁷.

La radioterapia es una opción de tratamiento curativo en tumores en estadios iniciales (T1-T2) de faringe y laringe. También se emplea como tratamiento complementario tras cirugía cuando existen factores pronósticos desfavorables como la presencia de bordes de resección afectados, la existencia de afectación ganglionar en los vaciamientos cérvico-ganglionares N2 o superior (incluyendo la extensión extranodal que, en la actualidad, es por definición N3)⁷¹.

La quimioterapia suele administrarse en regímenes de concomitancia con radioterapia (quimiorradioterapia) para tratar tumores con gran extensión locorregional e, incluso, a distancia. Estos tratamientos no son soportados por todos los pacientes, de forma que es necesario considerar su condición general y posibles comorbilidades antes de plantear esta opción⁷⁸.

Dada la importancia de las funciones de la faringe y la laringe, como la deglución o la fonación, se han desarrollado diferentes formas de tratamiento que permiten preservar dichas funciones. Los tratamientos preservadores de órgano pueden basarse en técnicas de cirugía parcial o en protocolos de quimio y radioterapia⁷⁷⁻⁷⁹.

1.2.6 Pronóstico

Los CECC ocasionan un impacto fundamentalmente a nivel local y regional. A pesar de los avances en el diagnóstico y el tratamiento de estos tumores, su pronóstico apenas ha cambiado en las últimas décadas. Una excepción son los tumores de orofaringe, puesto que se ha producido una mejora en su pronóstico que puede atribuirse al aumento de casos relacionados con el VPH a nivel mundial⁸⁰.

El factor pronóstico más relevante en estos tumores es la afectación ganglionar, siendo un elemento fundamental a la hora de decidir el tratamiento, y la principal causa de mortalidad de los pacientes con CECC es la aparición de recidivas locorregionales. En estos pacientes se ha observado un riesgo de aparición de segundos tumores primarios en la vía aerodigestiva superior, esófago o pulmón del 2 al 4% anual y de entre el 10 y el 20% a lo largo de la vida, con un promedio de un 13% de los pacientes (5% sincrónicos y 9% metacrónicos)⁸¹.

Entre el 10 y el 20% de los pacientes con CECC presentan metástasis a distancia⁸², siendo esta otra importante causa de mortalidad. El 80% de las metástasis a distancia se detectan en los dos primeros años tras el tratamiento⁸³. Para seleccionar de forma más precisa los pacientes que requieren estudios complementarios orientados a la búsqueda de metástasis, se han propuesto distintos criterios: metástasis regional en 3 o más ganglios linfáticos, extensión extraganglionar, metástasis ganglionares en la cadena yugular baja, metástasis ganglionares de más de 6 cm, metástasis ganglionares bilaterales, presencia de segundo tumor primario de cabeza y cuello, recidiva de enfermedad regional o tumor de faringe con

estadio T avanzado. Con estos criterios, la prevalencia de metástasis a distancia sube hasta el 44%⁸⁴.

1.3 Células madre tumorales y factores de pluripotencialidad

Las células madre tumorales son un subgrupo de células tumorales fenotípicamente similares a las células madre embrionarias, con capacidad de auto-renovación y pluripotencia. Estas células participan en la tumorigénesis, diferenciación tumoral, mantenimiento, diseminación y recurrencia de diferentes neoplasias⁸⁵.

Para la identificación de las células madre tumorales se han empleado diferentes marcadores específicos de estas células, que además pueden utilizarse para diseñar terapias dirigidas. Según la función o localización habitual de esas proteínas, los marcadores se pueden clasificar como se resume en la Tabla 3.

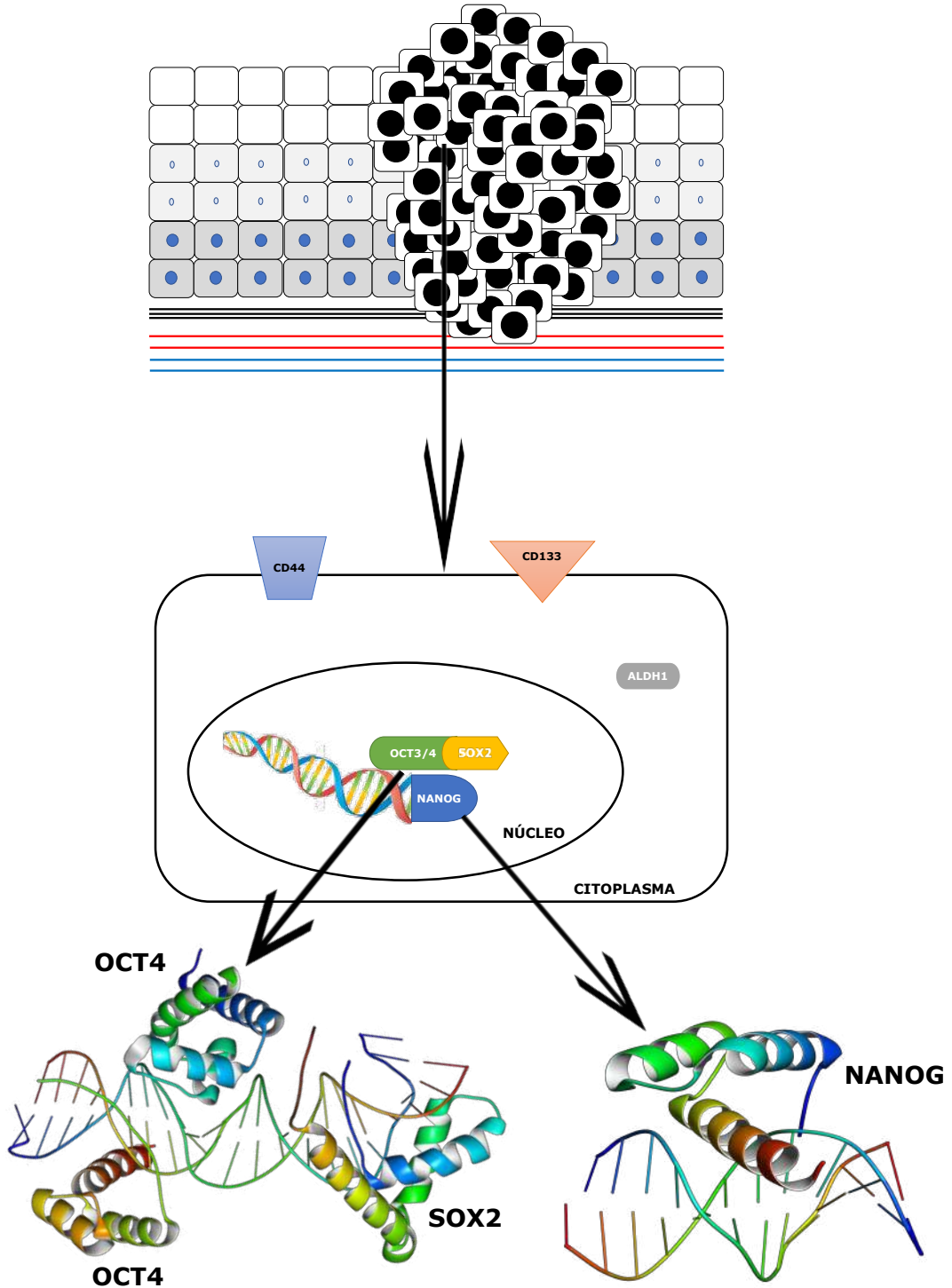
Tabla 3a. Clasificación de los marcadores de células madre tumorales.

	Marcador	Función en tejido normal	Función en cáncer
ANTÍGENOS DE SUPERFICIE CELULAR	CD24	Modulación de la activación de linfocitos B	Estimulación indirecta de la adhesión celular a fibronectina, colágeno (I-IV) y laminina. Expresión relacionada con la proliferación, diseminación, motilidad celular e invasión
	CD44	Interacciones intercelulares, adhesión y migración celular	Adhesión con el ácido hialurónico, participando en la migración celular y el crecimiento y progresión tumoral
	CD90	Interacciones intercelulares y con ligandos en sinapsis	Estimulación de la proliferación, auto-renovación y tumorigénesis
	CD29	Adhesión celular y reconocimiento	Diseminación y desarrollo de las células metastásicas
	CD117	Receptor transmembrana (tipo 3), parte del receptor KIT, tiene como ligando el factor de células madre (SFC). Regulación de la supervivencia y proliferación celular	Proto-oncogén
	CD133	Mantenimiento de las propiedades de las células madres (supresión de la diferenciación)	Iniciación del crecimiento tumoral, preservación de las capacidades de auto-renovación y diferenciación tumoral
	CD166	Unión a CD6 (antígeno de diferenciación de linfocitos T). Adhesión y migración celular.	Participación en procesos de metástasis (aumentada su expresión)
	CD96	Interacción de linfocitos T y NK en fases tardías de la respuesta inmune. Presentación antigénica.	Estimulación de la citotoxicidad de linfocitos NK activados. Su mutación se relaciona con pérdida de adhesión y crecimiento tumoral.
	CD34	Molécula de adhesión implicada en la unión de las células madre a la matriz extracelular de la médula ósea durante la hematopoyesis.	Promoción de la proliferación y bloqueo de la diferenciación de células iniciadoras. Su mutación se asocia con mayor agresividad tumoral.
	CD271	Participación en la regulación de la translocación de GLUT4 a la superficie celular en adipocitos y células de músculo esquelético en respuesta a insulina.	Potenciación de la capacidad de iniciación tumoral y de la invasión tisular alterando la matriz extracelular.
	CD105	Glicoproteína del endotelio vascular. Participa en la regulación de la angiogénesis y en la unión de las células endoteliales a las integrinas y otros receptores.	Como componente del complejo del Factor de Crecimiento Transformante TGF- β , participa en la proliferación celular, diferenciación y migración.
	CD38	Ectoenzima multifuncional. Participa en la adhesión celular, transducción de señales y la señalización mediada por calcio.	Componente de la red de señalización molecular de supervivencia y crecimiento de las células de la leucemia linfática crónica.

Tabla 3b. Clasificación de los marcadores de células madre tumorales (continuación).

INTEGRINAS	Integrina $\alpha 2\beta$	Unión al colágeno.	Participación en la migración celular en el melanoma.
	Integrina $\alpha 6$	Receptor de la laminina en las plaquetas.	Contribución a la capacidad invasiva y progresión de células tumorales.
ENZIMAS	ALDH1	Catalización de la oxidación de los aldehídos.	Proliferación celular, formación de microesferas y migración.
PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE MEMBRANA	ABCG2	Transporte de diferentes moléculas en membranas extra e intracelulares.	Participación en la auto-renovación tumoral. Resistencia a tratamientos evitando la entrada de toxinas. Regulación de la diferenciación de células madre.
	NCAM1	Interacciones intercelulares y con la matriz extracelular durante el desarrollo y diferenciación.	Interacción con el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), promoviendo la progresión tumoral por la señalización de esta vía.
FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN	OCT4 (POU5F1)	Control de la expresión de genes que participan en el desarrollo embrionario.	Participación en la invasión y metástasis de tumores sólidos por la degradación de la matriz celular adyacente.
	NANOG	Participación en la auto-renovación de las células madre embrionarias.	Participación en la regulación de las células madre tumorales. Promoción de la migración e invasión celular en diferentes tumores sólidos. Quimiorresistencia.
	SOX2	Mantenimiento de la auto-renovación y pluripotencialidad de las células madre embrionarias.	Participación en la proliferación, migración e invasión celular en diferentes tumores sólidos. Quimiorresistencia.

Figura 2. Representación esquemática de la localización intracelular de factores de pluripotencialidad (elaboración propia) y estructura tridimensional de OCT4⁸⁶, SOX2⁸⁶ y NANOG⁸⁷ obtenida de la RCSB PDB (rcsb.org)⁸⁸.



OCT4, NANOG y SOX2 son tres factores de transcripción que forman una red de retroalimentación mutua, fundamental para la regulación y mantenimiento de la auto-renovación y del estado de desdiferenciación en las células madre embrionarias^{89,90}. Además, son factores clave para la reprogramación de células diferenciadas a células pluripotentes inducidas^{91,92}.

NANOG (nombre derivado de *Tír na nÓg*: “tierra de la juventud” en la mitología irlandesa) es un factor de transcripción que pertenece al grupo de las homeoproteínas. Las homeoproteínas se definen por poseer un dominio de unión al ADN de 60 aminoácidos (homeodominio), que está codificado por una región de 180 pb que se conoce como *homeobox*. SOX2 pertenece a la familia SOX (*SRY-box*), un grupo de factores de transcripción que forman una superfamilia de genes caracterizados por contener una secuencia homóloga que codifica un dominio de unión al ADN altamente conservado entre las especies eucariotas, la HMG-box (del inglés *High Mobility Group*). OCT4 (del inglés *octamer-binding transcription factor 4*) está codificado por el gen *POU5F1* (dominio POU, clase 5, factor de transcripción 1), y es un factor de transcripción que contiene un homeodominio POU. Se han encontrado más de 300 genes sobre cuyos promotores pueden actuar NANOG, SOX2 y OCT4⁸⁹, conduciendo su pérdida de función a la diferenciación de células pluripotentes, reduciéndose la expresión de genes necesarios para el mantenimiento de la pluripotencialidad.

Como marcadores de células madre tumorales, se ha estudiado su expresión en tumores sólidos, habiéndose encontrado sobreexpresados en carcinomas escamosos⁹³⁻⁹⁵, incluyendo CECC. OCT4 participa en el mantenimiento de la pluripotencia y el estado de indiferenciación de las células madre embrionarias⁹⁶, y su expresión en células tumorales se ha asociado con progresión y mal pronóstico^{94,97}. NANOG también es responsable de mantener la pluripotencialidad de las células madre embrionarias bloqueando la diferenciación⁹⁸. Es una de las dianas de la vía de OCT3/4⁹⁸, y tiene un efecto similar en diferentes neoplasias, habiéndose asociado con tumorigénesis, pérdida de diferenciación, invasión y metástasis⁹⁹⁻¹⁰¹. SOX2 es fundamental para la autorrenovación de las células madre embrionarias y de las células progenitoras neurales¹⁰². El gen que codifica SOX2 se sitúa en brazo largo del cromosoma 3 (3q), donde se encuentran también los genes *TP63* y *PIK3CA*. La ganancia de 3q es una de las alteraciones citogenéticas más frecuentes en carcinomas escamosos. La expresión diferencial de estos genes se ha empleado para intentar

establecer diferentes perfiles moleculares en los CECC que expliquen la diferente evolución y respuesta al tratamiento de estos tumores. La contribución de SOX2 en la progresión de los tumores de cabeza y cuello se ha estudiado con anterioridad, encontrando una asociación entre la expresión de este factor y una peor evolución en cuanto a diferentes variables clínicas como la recurrencia, las metástasis ganglionares y a distancia, así como en la supervivencia global y libre de enfermedad¹⁰³⁻¹⁰⁶.

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

Diferentes estudios han demostrado previamente la expresión de factores de pluripotencialidad en los carcinomas escamosos de cabeza y cuello, entre los que se encuentran NANOG, SOX2 y OCT4. Dicha expresión se ha relacionado con una evolución clínica diferente de los pacientes con estos tumores, pero existen resultados controvertidos entre diferentes trabajos respecto al papel de estos factores en la progresión de la enfermedad y el pronóstico de los pacientes.

Teniendo en cuenta los datos previos relativos al papel de los factores de pluripotencialidad en carcinomas escamosos de cabeza y cuello, se plantea que estos participan en las etapas iniciales de la tumorigénesis estando ya presentes en las lesiones premalignas y teniendo un papel relevante en la progresión a carcinomas invasivos, así como en la evolución de estos.

2.2 Objetivos

El trabajo tiene dos objetivos fundamentales: investigar el papel de NANOG, SOX2 y OCT4 en las etapas iniciales de la tumorigénesis de cabeza y cuello; y estudiar la influencia de dicha expresión en la evolución de tumores de diferentes localizaciones de cabeza y cuello estableciendo su posible significado pronóstico.

De acuerdo con estas premisas, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar la expresión de NANOG, SOX2 y OCT4 en displasias de laringe.
2. Estudiar la relación de la expresión de los factores de pluripotencialidad con la posible progresión de las displasias a carcinomas invasivos de laringe.
3. Analizar la expresión de NANOG, SOX2 y OCT4 en carcinomas escamosos de orofaringe, hipofaringe y laringe.
4. Estudiar la relación entre la expresión de los factores de pluripotencialidad y las características clínico-patológicas y evolución de los pacientes.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Selección de pacientes y muestras de tejido

3.1.1 Lesiones premalignas

Se recogieron de forma retrospectiva muestras de tejido de pacientes con diagnóstico histológico de displasia laríngea, tratados en el Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) entre los años 1996 y 2010. Los pacientes debían cumplir los siguientes criterios para ser incluidos en el estudio:

- Diagnóstico anatomopatológico de displasia laríngea.
- Lesiones en las cuerdas vocales.
- No presentar historia previa de cáncer de cabeza y cuello.
- Haberse realizado una biopsia excisional macroscópicamente completa de la lesión.
- Seguimiento mínimo de 5 años (o hasta que se produjese la progresión a carcinoma).

Los pacientes con diagnóstico de displasia laríngea que desarrollaron cáncer en los seis meses siguientes a dicho diagnóstico fueron excluidos del estudio. Se incluyeron 100 pacientes que cumplieran los criterios establecidos. Los pacientes fueron seguidos cada 2 meses en los seis meses tras el tratamiento, cada tres meses hasta el segundo año, y cada 6 meses en adelante.

Se obtuvieron los bloques de tejido parafinado del Biobanco del Principado de Asturias, incluido en la Red Nacional de Biobancos (PT17/0015/0023), y el diagnóstico histológico de cada lesión fue confirmado por una patóloga experta. Las secciones seleccionadas para el estudio también incluían epitelio sano adyacente, que sirvió como control interno. Las lesiones premalignas se clasificaron en las categorías de displasia de bajo grado y displasia de alto grado, según los criterios de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), 4ª Edición de 2017¹.

3.1.2 Carcinomas escamosos de cabeza y cuello

Se recogieron de forma retrospectiva muestras de tejido tumoral de 382 pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello intervenidos en el Servicio de Otorrinolaringología del HUCA entre 1990 y 2010. Todos los pacientes incluidos fueron sometidos a cirugía como tratamiento primario con intención curativa. 234 pacientes (61%) recibieron posteriormente radioterapia como tratamiento complementario, en base al

cumplimiento de uno o varios de los siguientes criterios: tumores clasificados como T4, pacientes con metástasis ganglionares (N2 o superiores), resección con bordes quirúrgicos próximos (<5mm) o afectados y/o extensión extraganglionar.

Para ser incluidos en el estudio, los pacientes debían cumplir los siguientes criterios:

1. Tumor primario de estirpe escamosa en orofaringe, hipofaringe o laringe.
2. Ausencia de antecedentes de tumores previos de cabeza y cuello.
3. Cirugía con intención curativa como primer tratamiento.
4. Seguimiento mínimo tras la cirugía de 24 meses o hasta la defunción del paciente.

Fueron excluidos aquellos pacientes con metástasis a distancia en el momento del diagnóstico; presencia de otros tumores concurrentes con el de cabeza y cuello; y aquellos con infección por el VPH, quedando finalmente 348 pacientes para estudio.

A partir del registro quirúrgico del Servicio de Otorrinolaringología del HUCA y de las historias clínicas de los pacientes se recogieron los datos relativos a edad al diagnóstico, sexo, hábitos tóxicos, localización del tumor, clasificación TNM y estadificación, tratamiento administrado y seguimiento clínico (incluyendo lo relativo a recidiva de la enfermedad, aparición de segundos tumores primarios y causa de la muerte). El grado de diferenciación se determinó en base a la clasificación de Broders.

3.1.3 Aspectos éticos

Todos los procedimientos realizados se ajustaron a las normas éticas de la Declaración de Helsinki de 1964 y sus posteriores enmiendas o normas éticas comparables. Asimismo, todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Investigación del Principado de Asturias (autorización 70/16 para el proyecto PI16/00280). Dado que se trataba de un estudio retrospectivo, no se consideró necesario el consentimiento de los pacientes para participar en el estudio.

3.2 Elaboración de matrices tisulares (*Tissue MicroArrays, TMAs*)

A partir de las muestras de tejido tumoral de los carcinomas escamosos de orofaringe, hipofaringe y laringe, se construyeron matrices tisulares para el análisis inmunohistoquímico. Al igual que en el caso de las displasias, dichas muestras, fijadas en formol e incluidas en parafina, se obtuvieron del Biobanco del Principado de Asturias. Todas las muestras fueron revisadas por una patóloga que confirmó el diagnóstico histológico y se seleccionaron tres áreas representativas de cada bloque tumoral, de las cuales se obtuvieron cilindros de tejido de 1 mm de diámetro que se transfirieron de forma manual a un bloque con forma de matriz de 9x10 cilindros. Además de 3 núcleos de tejido de cada muestra de tumor, en cada matriz se incluyeron 3 cilindros de epitelio normal (de amígdala, hipofaringe y laringe, de muestras obtenidas en cirugías no oncológicas) para control interno. Tras la elaboración de cada matriz, se tiñó una sección de cada una con hematoxilina-eosina para revisarla mediante microscopía óptica y corroborar el diagnóstico histológico y la representatividad de las muestras incluidas.

3.3 Análisis inmunohistoquímico

Las matrices tisulares se cortaron en secciones de 3 μm y se secaron y montaron en portaobjetos. Las secciones se desparafinizaron con xileno estándar y se hidrataron en diluciones crecientes de alcohol en agua. La recuperación antigénica se llevó a cabo a 95°C durante 20 minutos utilizando la solución comercial Envision Flex Target Retrieval Solution a pH 9,0 en un PT Link de Dako®. A continuación, la tinción se realizó a temperatura ambiente en una estación de trabajo automática (Dako® Autostainer), empleando un anticuerpo para cada uno de los factores estudiados. Para la tinción de NANOG se utilizó un anticuerpo monoclonal (D73G4 XP®) a una dilución 1:200, para SOX2 se empleó un anticuerpo primario policlonal (Merck Millipore #AB5603) a una dilución 1:1000 y para OCT4 un anticuerpo policlonal (Merck Millipore #AB3209) a una dilución 1:200. Para el revelado se empleó el sistema de polímeros de dextrano EnVision Flex Plus de Dako® (Dako Autostainer) y diaminobencidina (DAB) como cromógeno. En último lugar se realizó la contratinción con hematoxilina durante siete minutos y la deshidratación de las

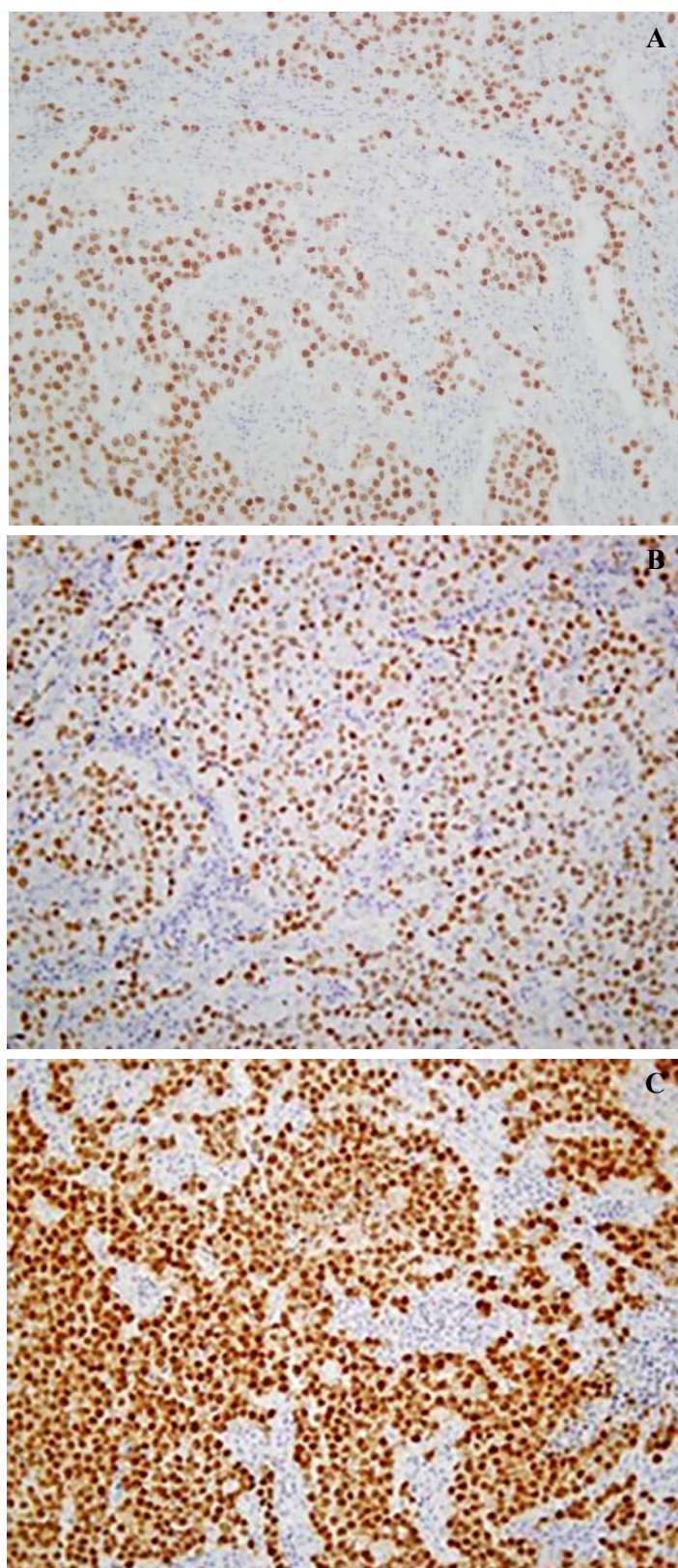
preparaciones mediante diluciones decrecientes de alcohol en agua, antes del montaje con un cubreobjetos.

Se valoró la inmunotinción nuclear y/o citoplasmática, en las zonas de displasia o de tumor, empleando un sistema de puntuación semicuantitativo basado en la ausencia o presencia de tinción, de forma que se consideró la expresión proteica de la siguiente manera:

- Expresión nuclear de NANOG: negativa (0) o positiva (1), considerando como tal cualquier proporción de células neoplásicas con tinción nuclear.
- Expresión citoplasmática de NANOG: dado que la expresión citoplasmática de NANOG mostraba una distribución homogénea en las áreas tumorales, se cuantifico en función de la intensidad de la tinción en negativa (0), débil (1) o intensa (2). En las displasias sólo se consideró la expresión en las áreas displásicas
- Expresión nuclear de SOX2: negativa (0) o positiva (1), estableciéndose el punto de corte para considerar la tinción positiva en la mediana de células con tinción nuclear, resultando en el 10%
- Expresión nuclear de OCT4: negativa (0) o positiva (1).

La evaluación de la tinción se llevó a cabo de forma ciega, sin conocer los datos clínicos, por dos observadores independientes con una elevada concordancia interobservador (>95%). Como control positivo de la tinción con los 3 anticuerpos se emplearon muestras de seminoma (Figura 3).

Figura 3. Tinción inmunohistoquímica para NANOG (A), SOX2 (B) y OCT4 (C) en seminoma. 200x.



3.4 Detección del VPH

La posible presencia del VPH fue valorada en todos los pacientes. Se llevó a cabo análisis inmunohistoquímico de p16, así como detección del ADN de VPH de alto riesgo mediante hibridación *in situ* y genotipado por PCR GP5+/6+, siguiendo los procedimientos ya desarrollados para trabajos previos^{68,69}.

La inmunotinción de p16 se realizó empleando el anticuerpo anti-p16 clon E6H4 (Laboratorios Roche mtm AG, Heidelberg, Alemania) en una estación de trabajo automatizada (Dako Autostainer) con sistema Envision, y diaminobenzidina como cromógeno. La tinción inmunohistoquímica fue valorada por dos observadores independientes, puntuándose como negativa (0), débil a moderada (1+: tinción difusa nuclear y citoplasmática entre el 10 y el 75% de las células) o intensa (2+: tinción difusa nuclear y citoplasmática en más del 75% de las células). Puntuaciones mayores de 1 se consideraron como expresión positiva de p16. En aquellos casos con expresión de p16 se llevó a cabo la detección del ADN de VPH de alto riesgo y genotipado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando los cebadores de consenso GP5+/6+, y posterior genotipado mediante inmunoensayo enzimático (EIA) para la detección de 14 genotipos de VPH de alto riesgo (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68). El genotipado de los casos positivos en el EIA se llevó a cabo por hibridación, empleando la plataforma Luminex. Los casos positivos al realizar la PCR con los cebadores GP5+/6+ fueron sometidos para confirmación adicional a una PCR específica para VPH 16 usando cebadores localizados en el gen E7 (fw: GAGGAGGAGGATGAAATAGATGGT, y re: TTGTACGCACAACCGAAGC). Los experimentos fueron realizados en paralelo, sin adición de muestra para evitar contaminación.

Para confirmar los resultados y evitar la presencia de falsos negativos, se realizó hibridación *in situ* (ISH) empleando sondas de ADN del VPH con iniciadores biotinilados, diseñadas para reaccionar con los genotipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 (Y1443, DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca). Sobre las secciones de tejido (3 µm) de las matrices tisulares se llevó a cabo la desparafinización en xileno estándar, la rehidratación en diluciones crecientes de alcohol en agua, y el secado a temperatura ambiente. Posteriormente dichas secciones fueron tratadas con proteinasa K para hacer accesible el ADN de la muestra a las sondas biotiniladas. A continuación, las matrices se rehidrataron empleando diluciones

decrecientes de alcohol en agua. Finalmente, se añadieron las sondas biotiniladas y la preparación se colocó en un portaobjetos. Las preparaciones, con el ADN diana y las sondas, se desnaturalizaron mediante calentamiento a 92°C durante 5 minutos. Una vez desnaturalizadas, los portaobjetos se colocaron en una cámara húmeda, precalentada a 37°C durante 16 horas, para que pudiese tener lugar la hibridación de las sondas con el ADN diana. Para detectar la sonda hibridada se utilizó el sistema GenPoint Detection System (K0620, Dako), de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el proveedor. La presencia de tinción focal por diaminobenzidina en los núcleos de las células tumorales era indicativa de la presencia de VPH y los resultados fueron evaluados por dos observadores independientes. Se utilizaron muestras de carcinoma de cérvix uterino con infección por el VPH como control positivo.

3.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con la ayuda del paquete estadístico SPSS (*IBM SPSS Statistics for Windows*, Versión 19.0; Armonk, NY: IBM Corp.). Para comparar variables categóricas se aplicaron la prueba de Chi-cuadrado (χ^2) y la prueba exacta de Fisher. Para valorar la asociación lineal de variables discretas se utilizaron los coeficientes de correlación de Pearson y de Spearman. Para los análisis de tiempo hasta la producción del suceso, se emplearon curvas de Kaplan-Meier, evaluando las diferencias entre los tiempos de supervivencia por el método de Log-rank. Para los análisis uni- y multivariantes se emplearon modelos de riesgo proporcional de Cox. Se recogieron los riesgos relativos (Hazard Ratios, HR) con un intervalo de confianza (IC) del 95% y los valores de P . Todos los test fueron bilaterales. Se consideraron estadísticamente significativos valores de $P \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Características de los pacientes y las muestras de displasia de laringe

De acuerdo con los criterios de inclusión previamente mencionados, se recogieron muestras de 100 pacientes con displasia de laringe. Dado que estas lesiones son de pequeño tamaño, queda una muestra de tejido escasa para investigación una vez realizado el estudio anatomopatológico que se precisa en la práctica clínica. Por este motivo, se pudo llevar a cabo el análisis inmunohistoquímico de NANOG, SOX2 y OCT4 en 76 muestras. En otras 8 muestras se pudo realizar inmunotinción sólo para NANOG y en 16 sólo para SOX2.

En las 76 muestras mencionadas, no se observó expresión de OCT4, a pesar de que en los controles previos realizados en seminoma se encontró una inmunotinción adecuada (Figura 3C). Teniendo en cuenta estos datos, se analizó la expresión de factores de pluripotencialidad y su relación con parámetros clínico-patológicos en base a 3 cohortes: 84 displasias en las que se analizó la expresión de NANOG, 92 displasias en las que se analizó la expresión de SOX2 y 76 displasias en las que se realizó un análisis conjunto de NANOG y SOX2.

4.2 Análisis de la expresión de NANOG en displasias de laringe

4.2.1 Características de los pacientes

Se realizó análisis de la expresión proteica de NANOG mediante inmunohistoquímica en 84 displasias de laringe. Todos los pacientes eran varones, con una edad media de 64 años (rango: 36 a 86 años). Todos salvo dos pacientes eran fumadores, 44 (54%) moderados (1-50 paquetes-año) y 36 (44%) fumadores importantes (>50 paquetes-año). El consumo medio de tabaco fue de 54 paquetes-año (rango: 0 a 150). Tras el diagnóstico, todos los pacientes que eran fumadores activos recibieron ayuda para dejar de fumar, a pesar de lo cual 14 de ellos continuaron fumando. De las 84 displasias incluidas en esta cohorte, 14 (17%) se clasificaron en bajo grado y 68 (83%) en alto grado. Durante el seguimiento, 24 de los 82 pacientes (29% de la muestra) desarrollaron un carcinoma invasivo en el mismo sitio de la lesión premaligna previa.

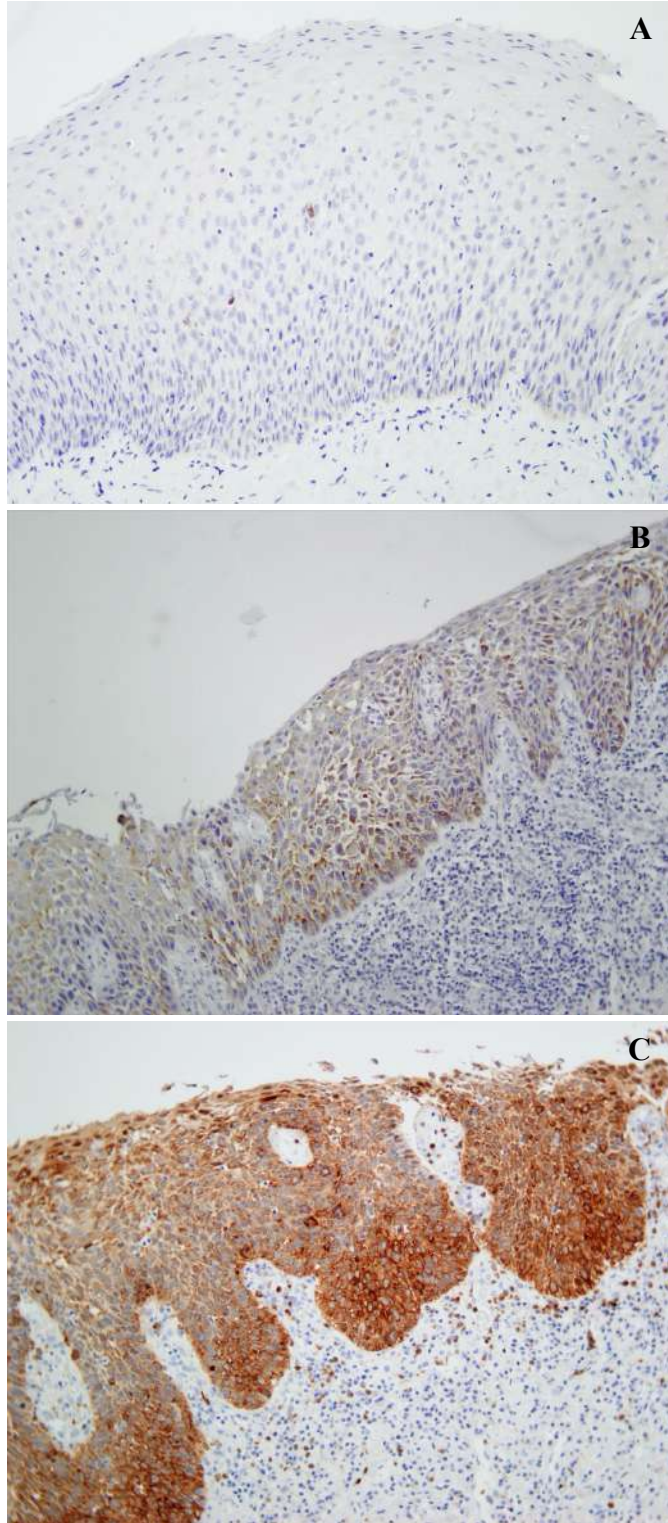
En los pacientes que progresaron, el tiempo medio de progresión a cáncer desde el diagnóstico de displasia fue de 28 meses (rango: 6 a 66 meses). No se hallaron diferencias significativas en cuanto a la edad ($P = 0,703$) entre el grupo de pacientes que desarrolló

cáncer (media de 65 años) y el grupo que no lo presentó (media de 64 años). El consumo acumulado medio de tabaco en los pacientes que desarrollaron un carcinoma laríngeo fue de 59 paquetes-año, en comparación con los 53 paquetes-año de los pacientes que no desarrollaron carcinoma ($P = 0,316$). De forma similar, no se encontró diferencia significativa en el riesgo de cáncer de laringe entre el subgrupo de pacientes que continuaron fumando (14 pacientes) y aquellos que dejaron de fumar ($P = 0,757$).

4.2.2 Expresión proteica de NANOG en displasias de laringe

La expresión de NANOG se detectó en el citoplasma de 49 (60%) de las displasias (puntuaciones de la inmunotinción 1 y 2 según la intensidad de tinción citoplasmática), mientras que la expresión fue insignificante en las células del estroma y en el epitelio normal adyacente. Un 27% (22) de las lesiones mostraron una fuerte expresión de NANOG (puntuación 2) (Figura 4).

Figura 4. Displasia de laringe con tinción negativa (valor 0; **A**), débil (valor 1; **B**) y tinción intensa (valor 2; **C**) para NANOG. 200x.



La expresión de la proteína NANOG no se correlacionaba con la clasificación histopatológica: 9 (64%) de las 14 lesiones con displasia de bajo grado, y 40 (59%) de las 68 lesiones con displasia de alto grado mostraron expresión de NANOG (Chi-cuadrado, $P = 0,930$). Se encontró expresión intensa de NANOG en 4 (29%) de las displasias de bajo grado y en 18 (26%) de las displasias de alto grado (prueba exacta de Fisher, $P = 1,000$; Tabla 4). Se encontró expresión nuclear de NANOG en 7 displasias, que presentaban también patrón citoplasmático: una de ellas con tinción débil y las otras 6 intensa (coeficiente de correlación de Pearson $p = 0,375$; $P = 0,001$).

Tabla 4. Expresión de NANOG en relación con el diagnóstico histopatológico (†prueba exacta de Fisher).

Expresión citoplasmática de NANOG	Clasificación histopatológica (OMS 2017)		Total	Valor de P^{\dagger}
	Displasia de bajo grado	Displasia de alto grado		
Negativa / Débil-moderada (valores 0-1)	10	51	61	1,000
Intensa (valor 2)	4	19	23	
Total	14	70	84	

4.2.3 Asociación de la expresión de NANOG con el riesgo de cáncer de laringe

Durante el seguimiento, 25 (30%) de los 84 pacientes en los que se evaluó la expresión de NANOG desarrollaron un carcinoma invasivo en el mismo sitio de la lesión premaligna previa. No hallamos una asociación estadísticamente significativa en esta cohorte entre el grado histopatológico y el riesgo de progresión a cáncer (Log-rank, $P = 0,467$; Tabla 5 y Figura 5), aunque las displasias de alto grado mostraron un mayor riesgo de cáncer (HR = 1,694, IC 95% 0,475 a 6,042; $P = 0,416$; Tabla 6).

Figura 5. Progresión a carcinoma en función del diagnóstico histopatológico de las displasias.

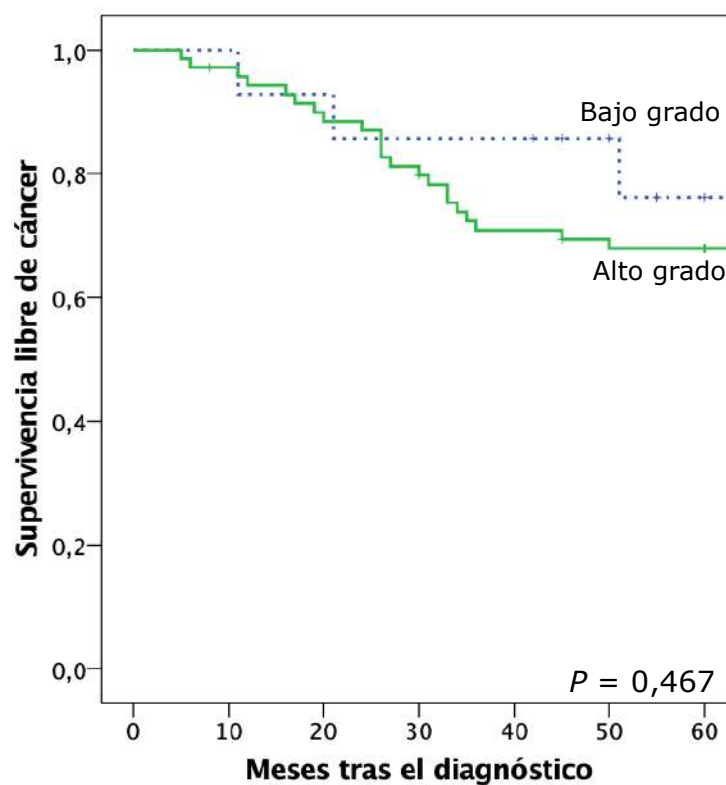
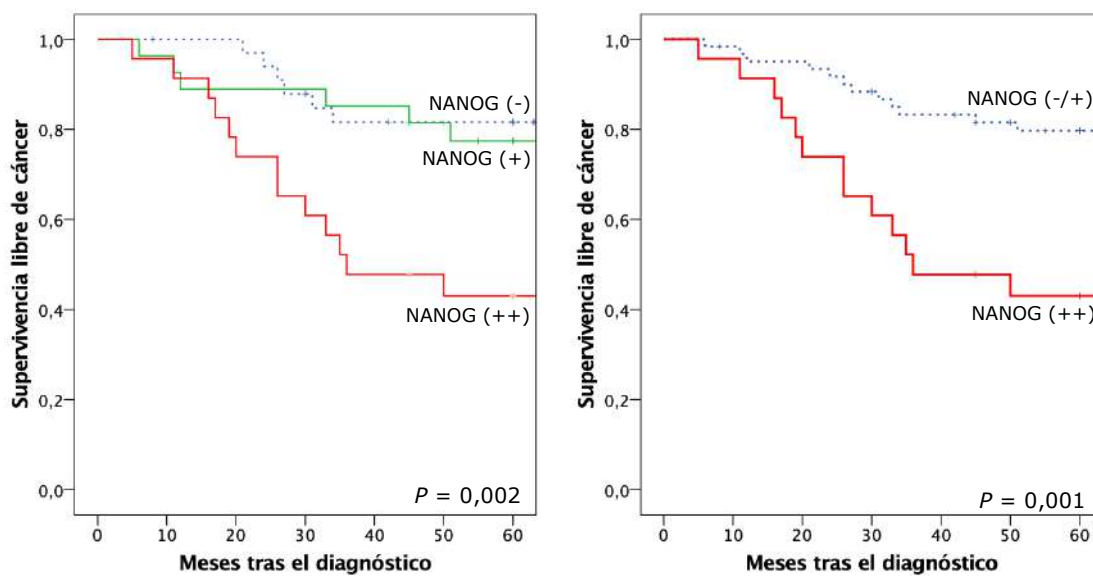


Tabla 5. Evolución de las lesiones premalignas en función del diagnóstico histopatológico y de la expresión proteica de NANOG (†prueba exacta de Fisher, #prueba de Chi-cuadrado).

Variable	Número de casos	Progresión a carcinoma (%)	Valor de P
Diagnóstico histopatológico			
Displasia de bajo grado	14	3 (21)	0,539 [†]
Displasia de alto grado	70	22 (31)	
Puntuaciones de tinción citoplasmática de NANOG			
Negativa (valor 0)	34	6 (18)	0,004 [#]
Débil / moderada (valor 1)	27	6 (22)	
Intensa (valor 2)	23	13 (57)	
Expresión citoplasmática de NANOG			
Negativa a moderada	61	12 (20)	0,002 [†]
Intensa	23	13 (57)	
Expresión nuclear de NANOG			
Negativa	77	21 (27)	0,189 [†]
Positiva	7	4 (57)	

Por el contrario, los distintos niveles de la expresión citoplasmática de NANOG se relacionaban de forma significativa con un riesgo incrementado de progresión a carcinoma laríngeo (Log-rank, $P = 0,002$; Tabla 5 y Figura 6). En vista de estos resultados, la expresión intensa de NANOG a nivel citoplasmático (valor 2) se tomó como punto de corte para los siguientes análisis realizados (Tabla 6, $P = 0,007$; Figura 6, Log-rank, $P = 0,001$). Los pacientes cuyas displasias mostraban una expresión citoplasmática intensa de NANOG presentaban tasas más altas de progresión a carcinoma laríngeo que aquellos con expresión ausente o débil-moderada (valores 0-1) (HR = 1,813; IC 95%: 1,176 – 2,794; $P = 0,007$). A los 5 años del diagnóstico, el 57% de los pacientes con expresión citoplasmática intensa de NANOG desarrollaron un carcinoma de laringe, respecto al 20% de los pacientes con expresión negativa, débil o moderada (prueba exacta de Fisher, $P = 0,002$; Tabla 5). Analizando la expresión nuclear de NANOG también se observaba una tendencia a la asociación con un riesgo aumentado de cáncer de laringe, pero sin alcanzarse significación estadística (prueba exacta de Fisher, $P = 0,189$; Tabla 5).

Figura 6. Progresión de las displasias a carcinoma en función de la expresión citoplasmática de NANOG.



Mediante el análisis univariante según el modelo de Cox observamos que la expresión citoplasmática intensa de NANOG era el único predictor de cáncer de laringe estadísticamente significativo (Tabla 6). La sensibilidad, especificidad, Valor Predictivo

Positivo (VPP) y Valor Predictivo Negativo (VPN) de la expresión citoplasmática de NANOG fueron 50%, 83%, 54% y 80%, respectivamente.

Tabla 6. Estimación del riesgo de progresión a carcinoma de laringe (modelo univariante de Cox).

Variable	Hazard Ratio	IC 95%	Valor de P
Edad (por encima vs por debajo de la media)	0,980	0,424 – 2,268	0,963
Tabaco (por encima vs por debajo de la media)	1,534	0,675 – 3,484	0,307
Grado histológico (alto grado vs bajo grado)	1,694	0,475 – 6,042	0,416
Expresión citoplasmática de NANOG	1,813	1,176 – 2,794	0,007
Expresión nuclear de NANOG	1,599	0,500 – 5,113	0,429

4.3 Análisis de la expresión de SOX2 en displasias de laringe

4.3.1 Características de los pacientes

La expresión proteica de SOX2 se analizó mediante inmunohistoquímica en 92 displasias de laringe. Todos los pacientes eran varones, con una edad media de 65 años (rango: 36 a 86 años). Todos salvo 2 pacientes eran fumadores o exfumadores. El consumo medio de tabaco fue de 50 paquetes-años (rango: 15 a 150 paquetes-año). Aunque tras el diagnóstico a todos los pacientes fumadores se les aconsejó el cese del hábito tabáquico, 14 continuaron fumando. De los 92 pacientes incluidos en el estudio de SOX2, 14 de las displasias (15%) se clasificaron como de bajo grado, y las otras 80 (85%) como displasias de alto grado. Durante el seguimiento, 29 de los pacientes (32%) desarrollaron un carcinoma invasivo en la misma localización de la lesión previa.

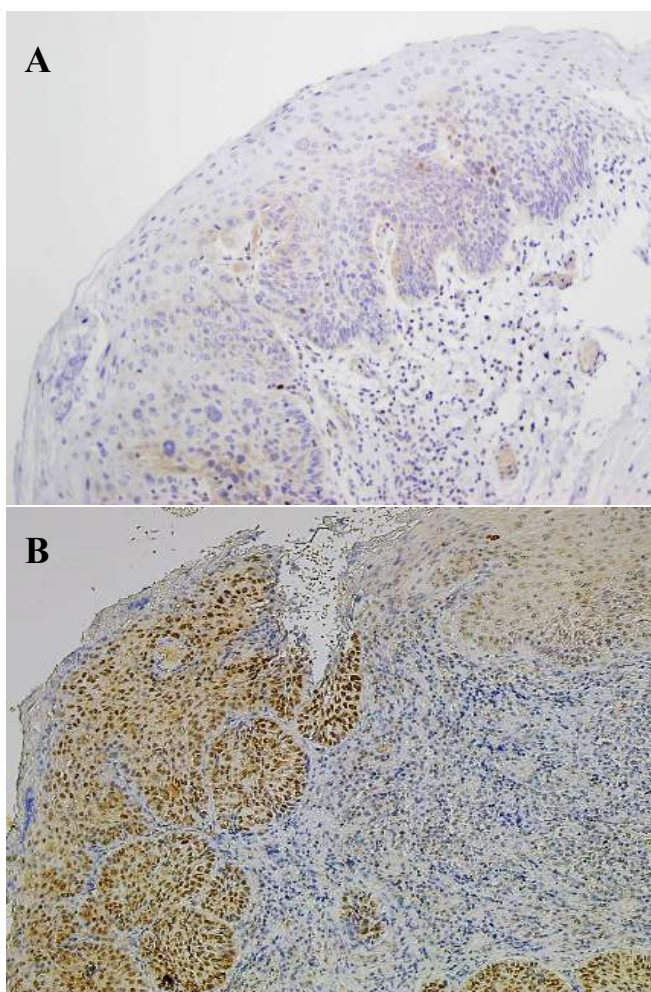
En los pacientes que progresaron, el tiempo medio de progresión a cáncer desde el diagnóstico de displasia fue de 27 meses (rango: 8 a 66 meses). No se encontraron diferencias significativas respecto a la edad ($P = 0,501$) entre los que desarrollaron cáncer y los que no (media de 64 años en ambos grupos). No se observó tampoco diferencia significativa en

función de la cantidad acumulada de tabaco consumido, ya que la media fue de 58 paquetes-año en los pacientes que desarrollaron cáncer y de 53 paquetes-año en los que no ($P = 0,819$). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre el grupo de pacientes que continuaron fumando (14 pacientes) y aquellos que dejaron de fumar ($P = 0,965$).

4.3.2 Expresión proteica de SOX2 en displasias de laringe

Se consideró expresión positiva de SOX2 la presencia de inmunotinción nuclear en más del 10% de las células del área de displasia, detectándose dicha expresión en 38 (41%) de las displasias, mientras que fue clasificada como negativa en las 54 restantes. La expresión de SOX2 fue negativa en células del estroma y en el epitelio sano adyacente (Figura 7).

Figura 7. Muestras de displasia de laringe con tinción negativa (valor 0; **A**) y tinción positiva (valor 1; **B**) para SOX2. 200x.



La expresión de SOX2 se correlacionaba significativamente con displasia de alto grado, de acuerdo con la clasificación histopatológica de la OMS. En concreto, de las 13 lesiones de bajo grado sólo 2 (15%) presentaban expresión de SOX2, mientras que en las displasias de alto grado se encontró expresión positiva en 36 (46%) de las muestras (prueba exacta de Fisher, $P = 0,036$; Tabla 7).

Tabla 7. Expresión de SOX2 en relación con el diagnóstico histopatológico (\dagger prueba exacta de Fisher).

Expresión nuclear de SOX2	Clasificación histopatológica (OMS 2017)		Total	Valor de P^\dagger
	Displasia de bajo grado (%)	Displasia de alto grado (%)		
Negativa (valor 0)	11 (85)	43 (54)	54	0,036
Positiva (valor 1)	2 (15)	36 (46)	38	
Total	13	79	92	

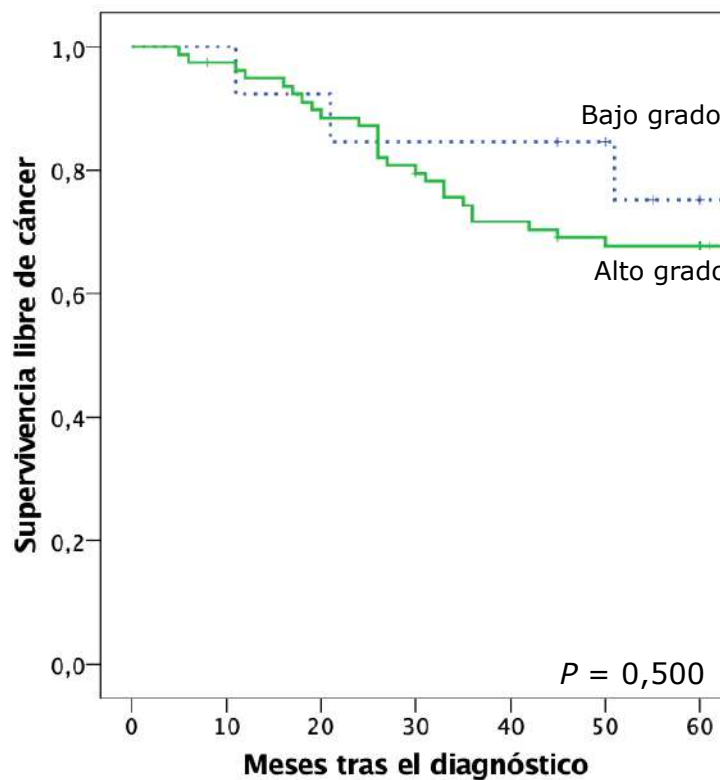
4.3.3 Asociación de la expresión de SOX2 con el riesgo de cáncer de laringe

La expresión de SOX2 en las displasias laríngeas de la cohorte estudiada se correlacionaba con el riesgo de progresión a cáncer de laringe ($P < 0,001$; Tabla 8). Por el contrario, en esta serie tampoco se encontró una correlación estadísticamente significativa entre la clasificación histopatológica y el riesgo de progresión a cáncer ($P = 0,748$; Tabla 8; Log-rank, $P = 0,500$; Figura 8), aunque las displasias de alto grado mostraron un mayor riesgo de progresión a cáncer (HR = 1,023; IC 95% = 0,291 – 3,591; $P = 0,972$; Tabla 9).

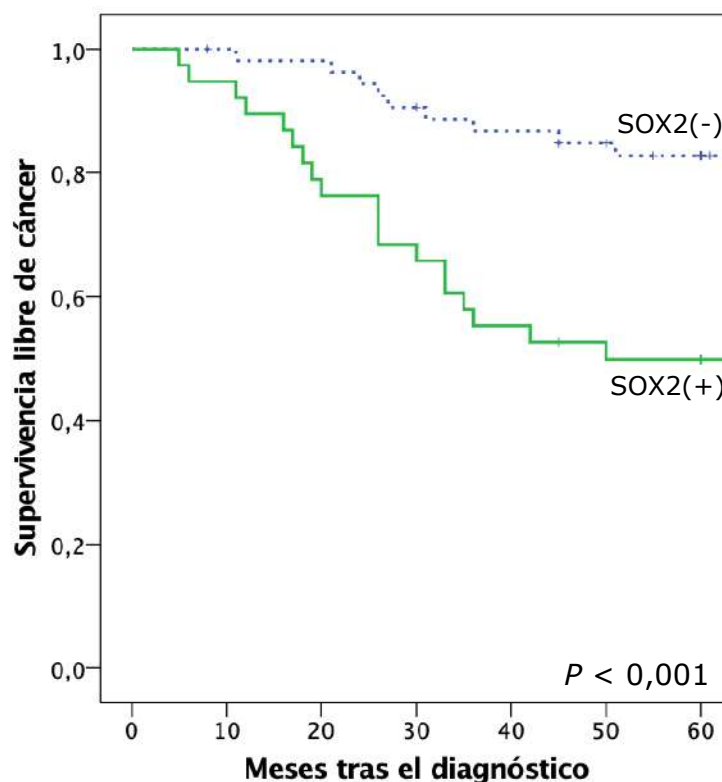
Tabla 8. Evolución de las lesiones premalignas según el diagnóstico histopatológico y la expresión nuclear de SOX2 (\dagger prueba exacta de Fisher).

Variable	Número de casos (%)	Progresión a carcinoma (%)	Valor de P
Diagnóstico histopatológico			
Displasia de bajo grado	13 (14)	3 (23)	0,748 \dagger
Displasia de alto grado	79 (86)	26 (33)	
SOX2 (expresión nuclear)			
Negativa (0)	54 (60)	9 (17)	<0,001 \dagger
Positiva (1)	38 (40)	20 (53)	

Figura 8. Progresión a carcinoma en función del diagnóstico histopatológico.



De forma relevante, se encontró una correlación significativa entre la expresión nuclear de SOX2 en las displasias de laringe y el incremento de riesgo de cáncer de laringe (HR = 4,049; IC 95% = 1,789 – 9,164; $P = 0,001$; Tabla 9). A los 5 años del diagnóstico el 50% de los pacientes con displasias con expresión positiva de SOX2 desarrollaron cáncer de laringe, en comparación con el 17% de los pacientes en los que la expresión era negativa (Log-rank, $P < 0,001$; Figura 9).

Figura 9. Progresión a carcinoma en función de la expresión nuclear de SOX2.

Mediante el análisis univariante según el modelo de Cox observamos que la expresión nuclear de SOX2 era el único predictor de cáncer de laringe estadísticamente significativo (Tabla 9). La sensibilidad, especificidad, Valor Predictivo Positivo (VPP) y Valor Predictivo Negativo (VPN) de la expresión nuclear de SOX2 fueron 69%, 71%, 53% y 83%, respectivamente.

Tabla 9. Estimación del riesgo de progresión a carcinoma de laringe (modelo univariante de Cox).

Variable	Hazard Ratio	IC 95%	Valor de P
Edad (por encima vs por debajo de la media)	1,112	0,509 – 2,429	0,791
Tabaco (por encima vs por debajo de la media)	1,591	0,741 – 3,418	0,234
Grado histológico (alto grado vs bajo grado)	1,023	0,291 – 3,591	0,972
Expresión nuclear de SOX2 (positivo vs negativo)	4,049	1,789 – 9,164	0,001

4.4 Análisis conjunto de NANOG y SOX2 en displasias de laringe

Para valorar el posible efecto conjunto de NANOG y SOX2 en las lesiones premalignas de laringe, realizamos el análisis en la cohorte de 76 pacientes sobre cuyas muestras se pudo realizar la inmunotinción de ambos factores.

4.4.1 Características de los pacientes

Los 76 pacientes incluidos eran varones con una media de edad de 64 años (rango: 36 a 86 años). Todos salvo 2 pacientes eran fumadores o exfumadores, con un consumo medio acumulado de tabaco de 55 paquetes-años (rango: 15 a 150 paquetes-año). De los 76 pacientes, 12 de las displasias (16%) se clasificaron como de bajo grado, y las otras 64 (84%) como displasias de alto grado. Durante el seguimiento, 24 de los pacientes (32%) sufrieron una progresión a carcinoma invasivo en la misma localización de la lesión previa.

En los pacientes que progresaron, el tiempo medio de progresión a cáncer desde el diagnóstico de displasia fue de 25 meses (rango: 5 a 51 meses). No se encontraron diferencias significativas respecto a la edad ($P = 0,620$) entre los que desarrollaron cáncer y los que no, ni en función de la cantidad de tabaco consumido ($P = 0,802$).

4.4.2 Expresión conjunta NANOG-SOX2

Se consideró expresión conjunta de NANOG y SOX2 la presencia de inmunotinción citoplasmática intensa para NANOG y nuclear en más del 10% de las células en la misma displasia para SOX2. La expresión de NANOG y de SOX2 se correlacionaba de forma significativa, encontrándose sólo 2 casos con expresión citoplasmática intensa de NANOG sin expresión nuclear de SOX2 (prueba exacta de Fisher $P < 0,001$; Tabla 10).

Tabla 10. Correlación entre la expresión citoplasmática de NANOG y nuclear de SOX2 en displasias de laringe (†prueba exacta de Fisher).

		Expresión nuclear de SOX2		Valor de P^{\dagger}
		Negativa	Positiva	
Expresión citoplasmática de NANOG	Negativa / Débil-moderada (valores 0-1)	42	12	<0,001
	Intensa (valor 2)	2	20	

La co-expresión NANOG-SOX2 no se correlacionaba de forma significativa con la clasificación histopatológica de las displasias: 34 pacientes (65%) de los 52 incluidos con displasia de alto grado eran dobles negativos (prueba exacta de Fisher, $P = 0,305$; Tabla 11).

Tabla 11. Expresión conjunta NANOG-SOX2 en relación con el diagnóstico histopatológico (\dagger prueba exacta de Fisher).

Expresión conjunta NANOG-SOX2	Clasificación histopatológica (OMS 2017)		Total	Valor de P^\dagger
	Displasia de bajo grado (%)	Displasia de alto grado (%)		
Dobles negativos	8	34	42	0,305
Dobles positivos	2	18	20	
Total	10	52	62	

4.4.3 Asociación de la co-expresión NANOG-SOX2 con el riesgo de cáncer de laringe

La expresión conjunta NANOG-SOX2 se asociaba de forma significativa con un mayor riesgo de cáncer de laringe (Log-rank, $P < 0,001$; Figura 10C). En esta cohorte, el grado histológico tampoco se relacionaba de forma significativa con la progresión de las displasias a carcinomas (HR 1,338; IC 95% = 0,353 – 5,066; $P = 0,669$). En el análisis univariante, la co-expresión NANOG-SOX2 es el único factor predictor de cáncer de laringe estadísticamente significativo, en comparación con la edad, el hábito tabáquico o el grado histológico de las displasias (Tabla 12).

Figura 10. Progresión a carcinoma en función de la expresión citoplasmática de NANOG (A), nuclear de SOX2 (B) y de la co-expresión NANOG-SOX2 (C).

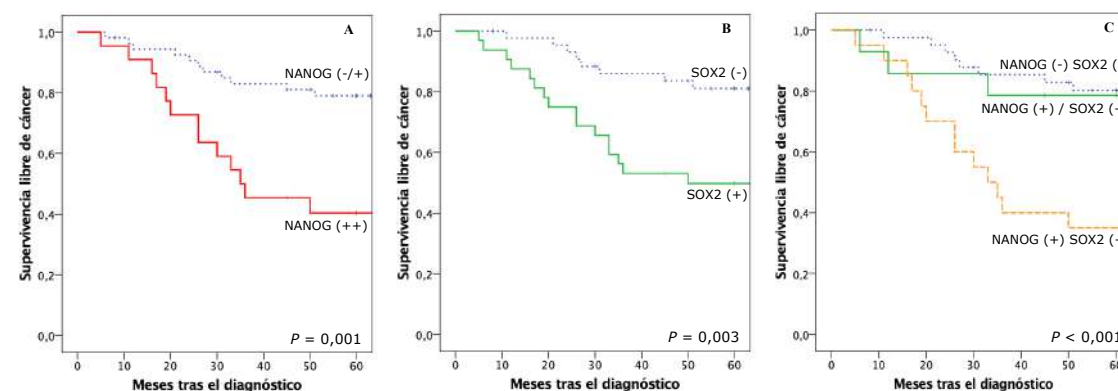


Tabla 12. Estimación del riesgo de progresión a carcinoma de laringe (modelo univariante de Cox).

Variable	Hazard Ratio	IC 95%	Valor de P
Edad (por encima vs por debajo de la media)	0,743	0,281 – 1,967	0,550
Tabaco (por encima vs por debajo de la media)	0,898	0,360 – 2,236	0,816
Grado histológico (alto grado vs bajo grado)	1,338	0,353 – 5,066	0,669
Expresión NANOG-SOX2 (positivo vs negativo)	0,227	0,090 – 0,571	0,002

En el estudio de las propiedades clínicas del análisis inmunohistoquímico de NANOG y SOX2 como predictores de progresión de las displasias a cáncer de laringe, encontramos una sensibilidad, especificidad, VPP y VPN del análisis conjunto NANOG-SOX2 del 62%, 83%, 65% y 81%, respectivamente. En la Tabla 13 se comparan dichos parámetros con los obtenidos en las cohortes previas de estudio de NANOG y SOX2 y en la Tabla 14 se realiza la comparación de los parámetros dentro de la misma cohorte. En ambos casos los valores de cada parámetro para las distintas pruebas no varían significativamente. Se puede ver como la combinación de la expresión de ambos factores aporta la mayor precisión, pero en caso de emplear un solo marcador, SOX2 tiene mayor utilidad clínica al aportar mayor sensibilidad y valor predictivo negativo.

Tabla 13. Comparación de los valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN obtenidos en cada cohorte.

Capacidad clínica	NANOG (84)	SOX2 (92)	NANOG-SOX2 (76)
Sensibilidad	50%	69%	62%
Especificidad	83%	71%	83%
Valor predictivo positivo	54%	53%	65%
Valor predictivo negativo	80%	83%	81%

Tabla 14. Comparación de los valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN obtenidos en la misma cohorte de 76 pacientes.

Capacidad clínica	NANOG (76)	SOX2 (76)	NANOG-SOX2 (76)
Sensibilidad	54%	67%	62%
Especificidad	83%	69%	83%
Valor predictivo positivo	59%	50%	65%
Valor predictivo negativo	80%	82%	81%

4.5 Carcinomas escamosos de cabeza y cuello

Siguiendo los criterios de inclusión previamente establecidos se recogieron muestras de 382 pacientes con CECC, de las cuales se pudo realizar el análisis inmunohistoquímico de la expresión de NANOG, SOX2 y OCT4 en 357 muestras. En 9 de las muestras se detectó la presencia de VPH, excluyéndose dichos casos para evitar posibles sesgos por el diferente comportamiento biológico de los tumores asociados a este virus. Teniendo en cuenta estas premisas, se completó el estudio en una cohorte homogénea de 348 muestras de CECC (229 de orofaringe, 60 de hipofaringe y 59 de laringe). La inmensa mayoría de los pacientes eran varones (336 pacientes, 96,5%), y la edad media de la serie era de 60 años (rango: 36 a 86 años). Cabe destacar que la mayoría de los pacientes de esta serie tenían tumores en estadios avanzados, siendo 310 de estadios III o IV (89% de la muestra). Todos los pacientes fueron tratados mediante cirugía con intención curativa, recibiendo radioterapia complementaria 216 (62%). Los datos de la muestra según las diferentes localizaciones del tumor primario se resumen en la Tabla 15.

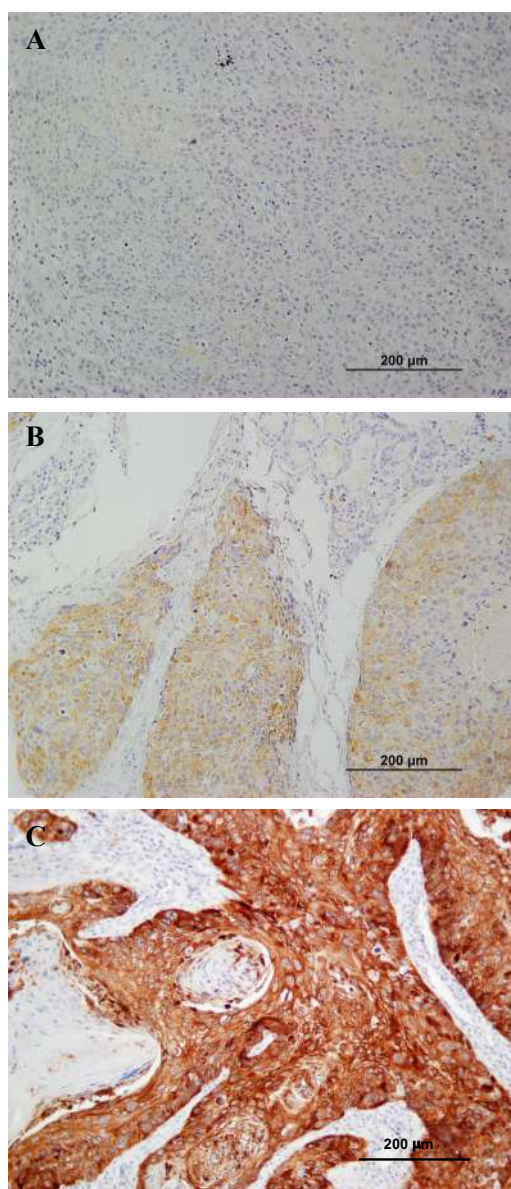
Tabla 15. Características clínico-patológicas de 348 pacientes con CECC.

Características	Orofaringe (%)	Hipofaringe (%)	Laringe (%)
Pacientes	229	60	59
Sexo			
Varón	221 (97)	57 (95)	58 (98)
Mujer	8 (3)	3 (5)	1 (2)
Edad			
Media	58	59	62
Rango	36 – 85	43 – 80	36 – 86
Clasificación T			
T1-T2	70 (31)	18 (30)	18 (31)
T3-T4	159 (69)	42 (70)	41 (69)
Clasificación N			
N0	56 (24)	9 (15)	29 (49)
N+	173 (76)	51 (85)	30 (51)
Estadio tumoral			
I-II	23 (10)	4 (7)	11 (19)
III-IV	206 (90)	56 (93)	48 (81)
Grado histológico			
Bien diferenciado	104 (46)	12 (20)	19 (32)
Moderadamente diferenciado	85 (37)	26 (43)	28 (48)
Pobrementemente diferenciado	39 (17)	22 (37)	12 (20)
Seguimiento (meses)			
Media	34	29	41
Mediana	19	19	37
Rango	1 – 216	1 – 95	1 – 97
Radioterapia complementaria			
No	75 (33)	16 (27)	41 (69)
Sí	154 (67)	44 (73)	18 (31)

4.6 Expresión de NANOG en CECC

De los 348 tumores incluidos en el trabajo, 250 presentaban expresión proteica de NANOG (72%), mostrando un patrón fundamentalmente citoplasmático, pero también expresión nuclear. No se encontró expresión en el epitelio normal adyacente ni en las células del estroma (Figura 11). En relación con los parámetros clínico-patológicos, encontramos expresión de NANOG de forma significativamente más frecuente en los tumores de hipofaringe y en los pacientes con metástasis ganglionares (Tabla 16).

Figura 11. Expresión proteica de NANOG en CECC. Tinción negativa para NANOG, puntuación 0 (A); tinción débil-moderada, puntuación 1 (B); tinción intensa, puntuación 2 (C). 200x.



4.7 Expresión de SOX2 en CECC

La expresión de SOX2 se consideró positiva cuando se encontraba tinción nuclear en más del 10% de las células tumorales. Dicha expresión positiva estaba presente en 105 de las 348 muestras de tumor (30%), siendo negativa en el estroma y tejido sano adyacente (Figura 12). La expresión de SOX2 se asoció de forma significativa con tumores cuya localización primaria era la laringe, no habiendo relación con otros parámetros clínico-patológicos (Tabla 16).

Figura 12. Expresión proteica de SOX2 en CECC. Tinción negativa para SOX2, puntuación 0 (**A**); tinción nuclear positiva, puntuación 1 (**B**). 200x.

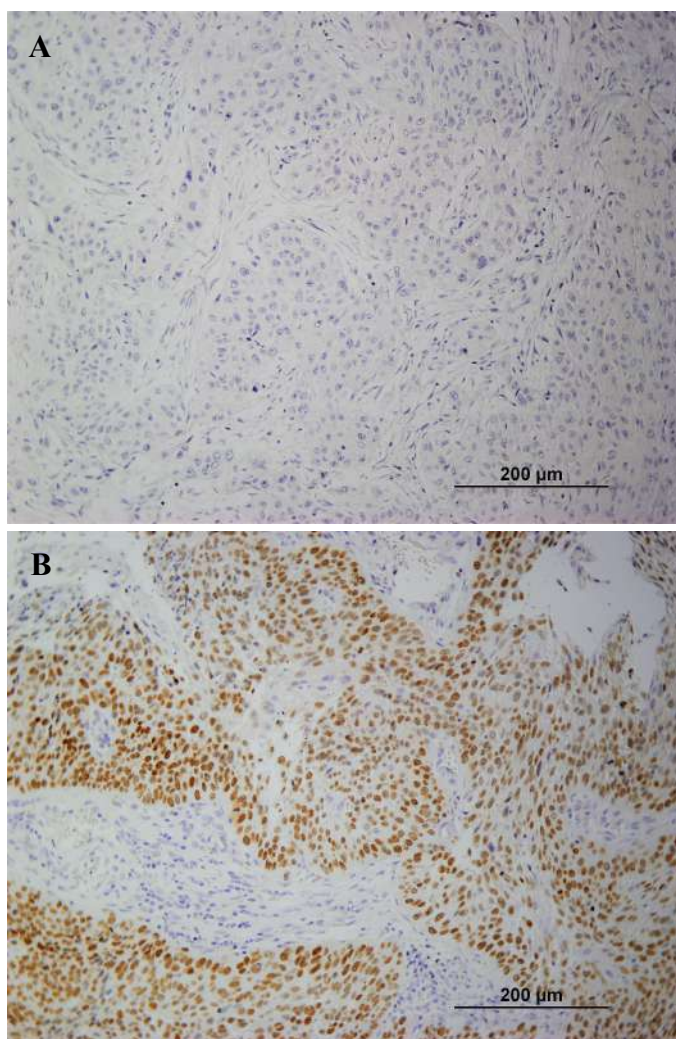


Tabla 16. Relación entre la expresión de NANOG y SOX2 y las características clínico-patológicas.

Característica	No.	Expresión positiva de NANOG (%)	Valor de <i>P</i>	Expresión positiva de SOX2 (%)	Valor de <i>P</i>
Clasificación pT					
T1-T2	106	80 (75)	0,350	36 (34)	0,163
T3	116	78 (67)		39 (34)	
T4	125	92 (74)		30 (24)	
Clasificación pN					
N0	94	56 (60)	0,003	29 (31)	0,896
N1-3	254	194 (76)		76 (30)	
Estadio tumoral					
I-II	38	25 (66)	0,204	12 (32)	0,754
III	59	38 (64)		20 (34)	
IV	251	187 (75)		73 (29)	
Grado histológico					
Bien diferenciado	135	88 (65)	0,084	40 (30)	0,740
Moderadamente diferenciado	139	104 (75)		45 (32)	
Pobremente diferenciado	73	57 (78)		20 (27)	
Localización					
Orofaringe	229	157 (69)	0,019	56 (24)	0,002
Hipofaringe	60	52 (87)		21 (35)	
Laringe	59	41 (69)		28 (47)	
Total de pacientes	348	250 (72)		105 (30)	

4.8 Expresión de OCT4 en CECC

A pesar de que en los controles positivos de seminoma se obtuvo una tinción adecuada de OCT4 (Figura 3C), no encontramos expresión de OCT4 en los tumores incluidos en nuestra cohorte.

4.9 Asociación de la expresión de factores de pluripotencialidad con la recidiva tumoral

En el global de la serie (348 pacientes) no se encontraron diferencias significativas en la supervivencia libre de enfermedad (SLE) en función de la expresión de NANOG o de SOX2, aunque la SLE era mayor en los casos con expresión de NANOG. Tampoco había relación entre la expresión de los factores y la SLE analizando por separado los tumores según la localización del tumor primario en faringe o laringe (Figuras 13 y 14).

Figura13. Supervivencia libre de enfermedad en función de la expresión de NANOG en la serie completa (A), en carcinomas escamosos de faringe (B) y en carcinomas escamosos de laringe (C).

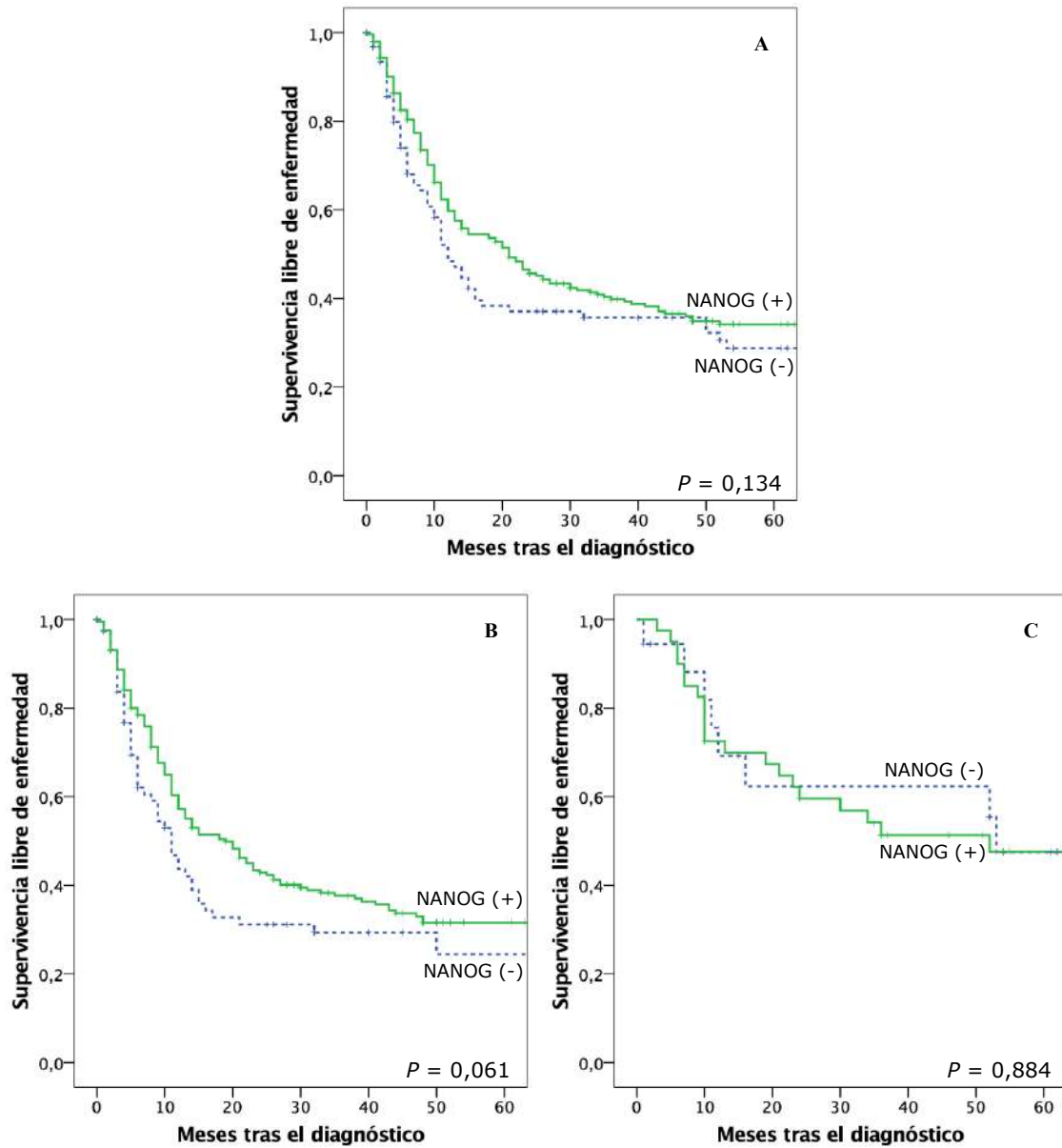
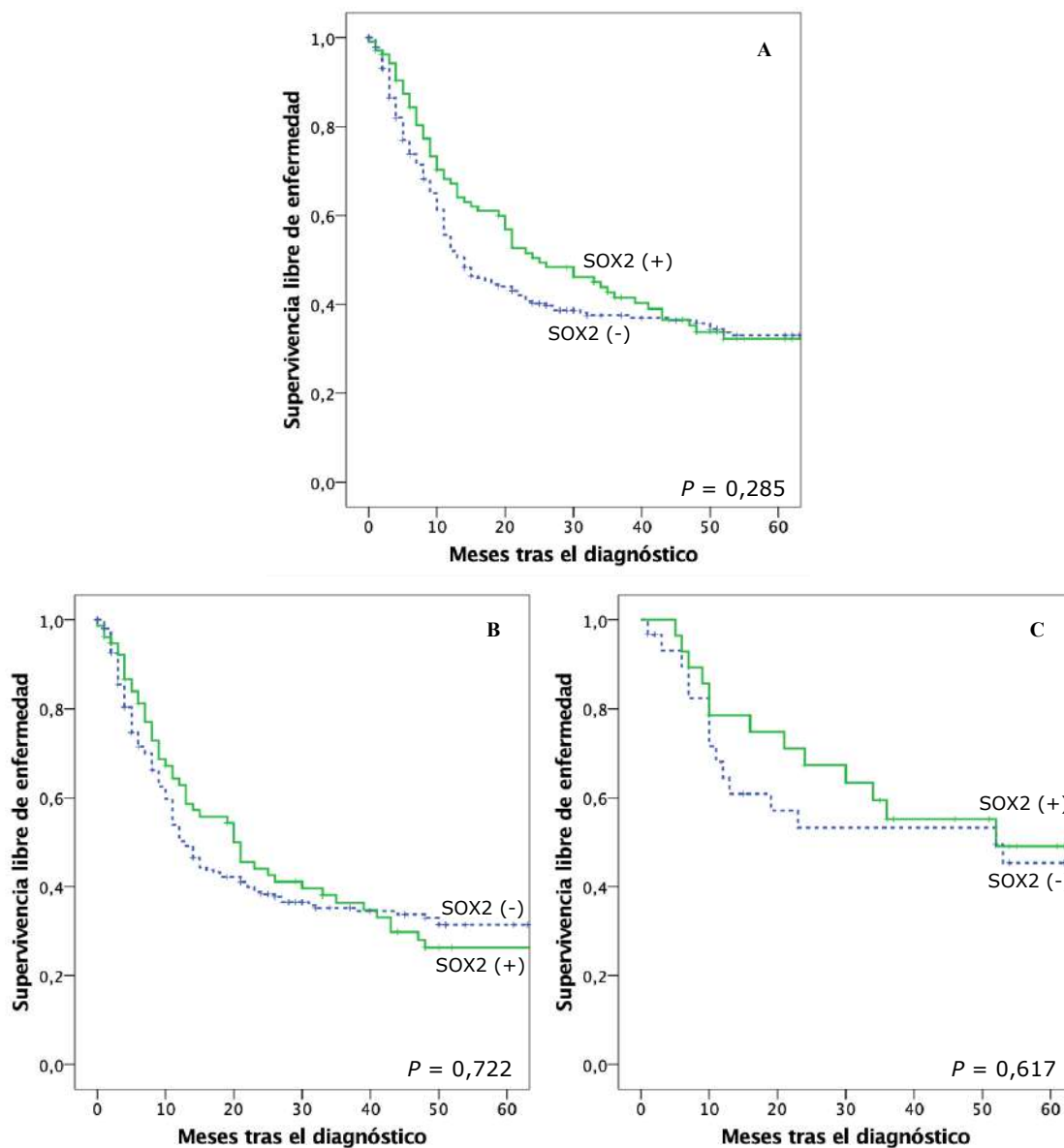


Figura 14. Supervivencia libre de enfermedad en función de la expresión de SOX2 en la serie completa (A), en carcinomas escamosos de faringe (B) y en carcinomas escamosos de laringe (C).



Al estudiar la SLE en los pacientes según la presencia de metástasis ganglionares, se observaba un efecto diferencial de NANOG entre los pacientes sin metástasis ganglionares (N0) y los pacientes con dichas metástasis (N+). En los pacientes N0, la SLE no difería en función de la expresión de NANOG (SLE a los 5 años del 52% en el grupo sin expresión de NANOG vs 55% en el grupo con expresión de NANOG; Log-rank, $P = 0,640$). Por el

contrario, en el grupo de pacientes N+ la expresión de NANOG se relacionaba con menor tasa de recidiva tumoral (SLE a los 5 años del 12% en el grupo sin expresión de NANOG vs 28% en el grupo con expresión de NANOG; Log-rank, $P = 0,005$; Figura 15). Este efecto diferencial no se observaba con la expresión de SOX2 (Figura 16).

Figura 15. Supervivencia libre de enfermedad en función de la expresión de NANOG en pacientes sin metástasis ganglionares (A) y con metástasis ganglionares (B).

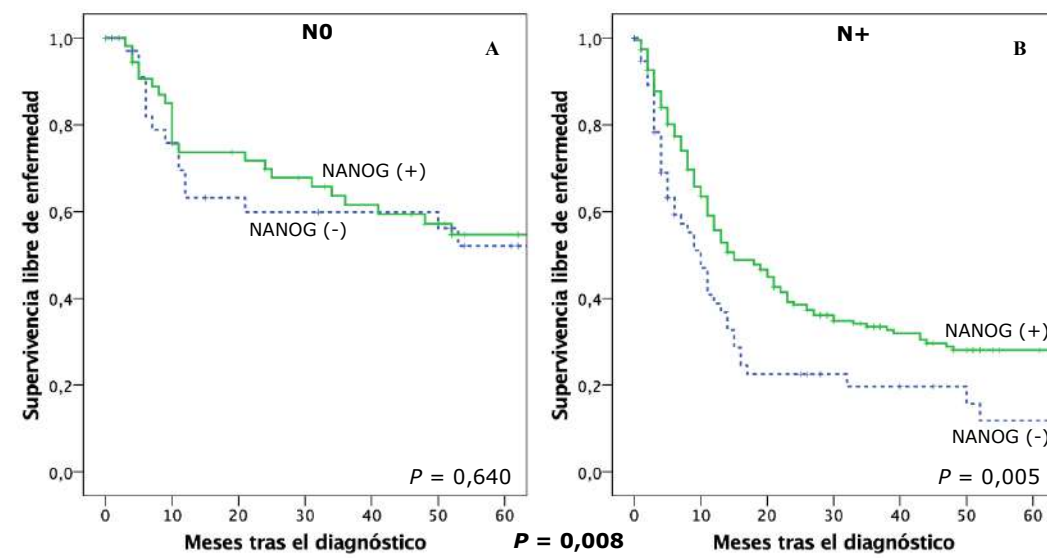
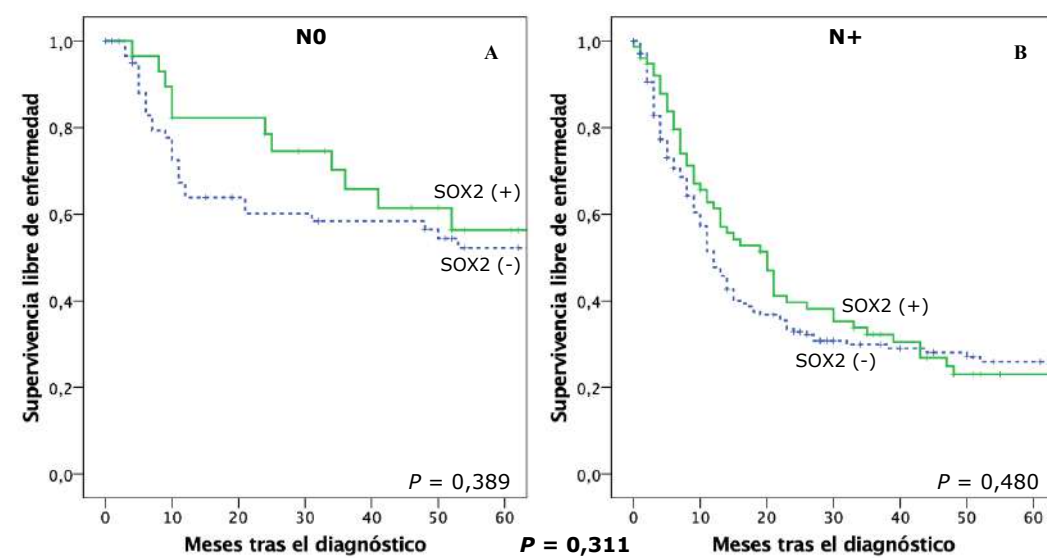


Figura 16. Supervivencia libre de enfermedad en función de la expresión de SOX2 en pacientes sin metástasis ganglionares (A) y con metástasis ganglionares (B).



4.10 Asociación de la expresión de factores de pluripotencialidad con la supervivencia

La expresión de NANOG se correlacionaba de forma positiva con la supervivencia, siendo las diferencias casi significativas con la supervivencia específica de enfermedad (SEE) y significativas con la supervivencia global (SG) ($P = 0,055$ y $P = 0,012$, respectivamente). Los pacientes con expresión positiva de SOX2 también mostraban una mejor SEE y SG, pero sin alcanzarse significación estadística.

Figura 17. Supervivencia global (A) y específica de enfermedad (B) en función de la expresión de NANOG.

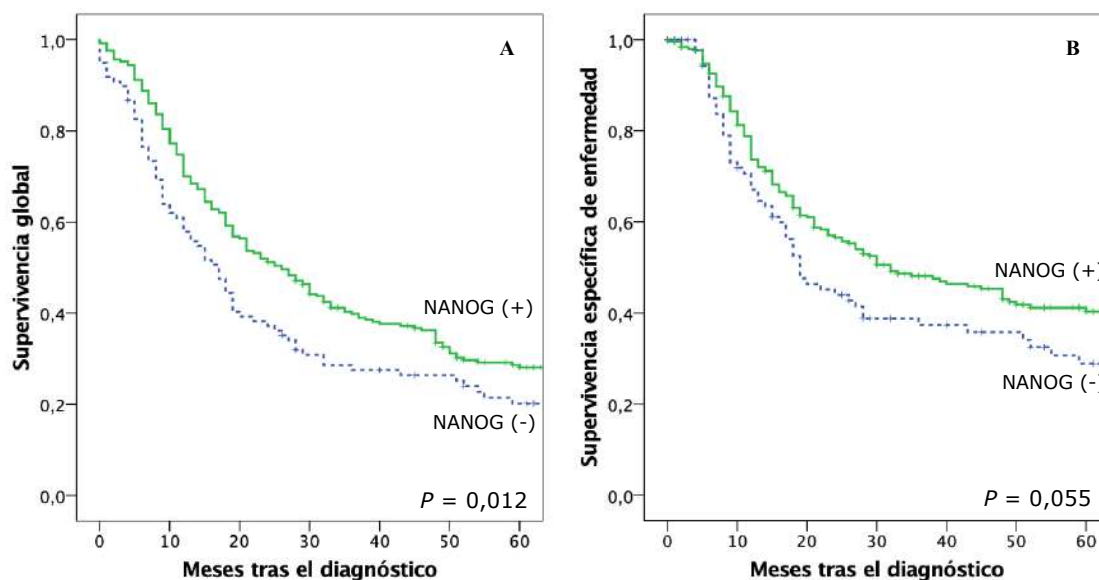
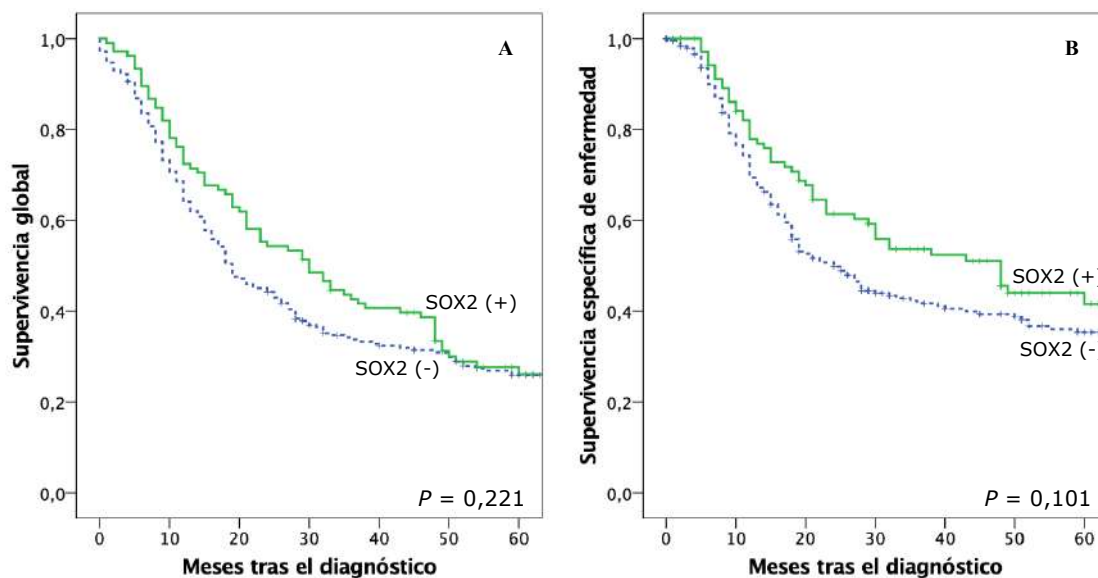


Figura 18. Supervivencia global (A) y específica de enfermedad (B) en función de la expresión de SOX2.



Según la localización del tumor primario, el impacto de la expresión de NANOG o SOX2 en el pronóstico de los pacientes era diferente. En los carcinomas escamosos de orofaringe (CEO) la expresión de NANOG se asociaba de forma significativa con mejor SG y mejor SEE (Figura 19). Sin embargo, no había diferencias en función de la expresión de SOX2. En los carcinomas escamosos de hipofaringe (CEH), el grupo de pacientes con expresión de NANOG también tenía mejor SG (Figura 20). En los CEL no se observaron diferencias en el pronóstico en base a la expresión de NANOG o de SOX2 (Figura 21).

Figura 19. Supervivencia global (A-C) y específica de enfermedad (B-D) en función de la expresión de NANOG (A-B) y de la expresión de SOX2 (C-D) en pacientes con carcinoma escamoso de orofaringe.

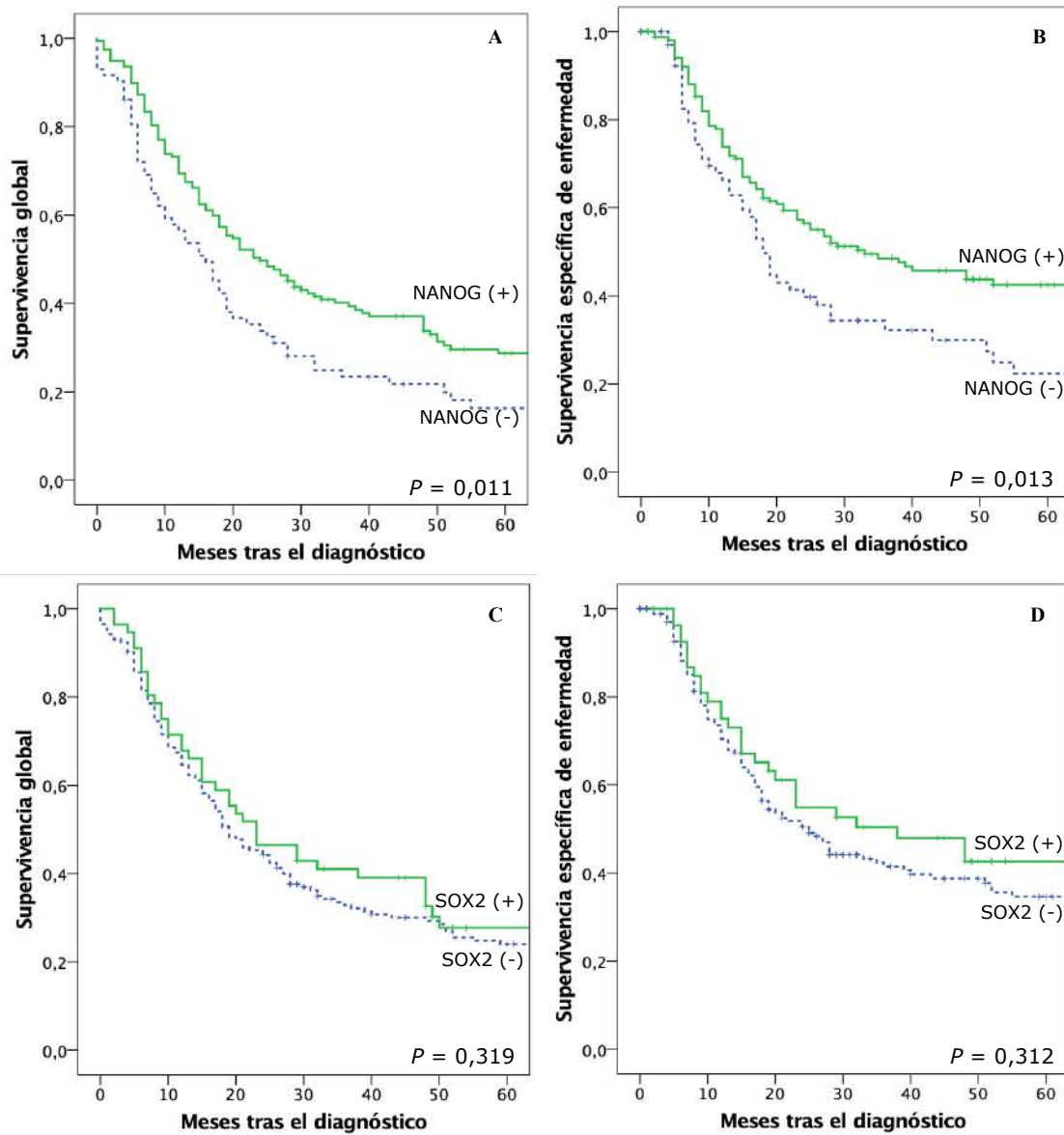


Figura 20. Supervivencia global (A-C) y específica de enfermedad (B-D) en función de la expresión de NANOG (A-B) y de la expresión de SOX2 (C-D) en pacientes con carcinoma escamoso de hipofaringe.

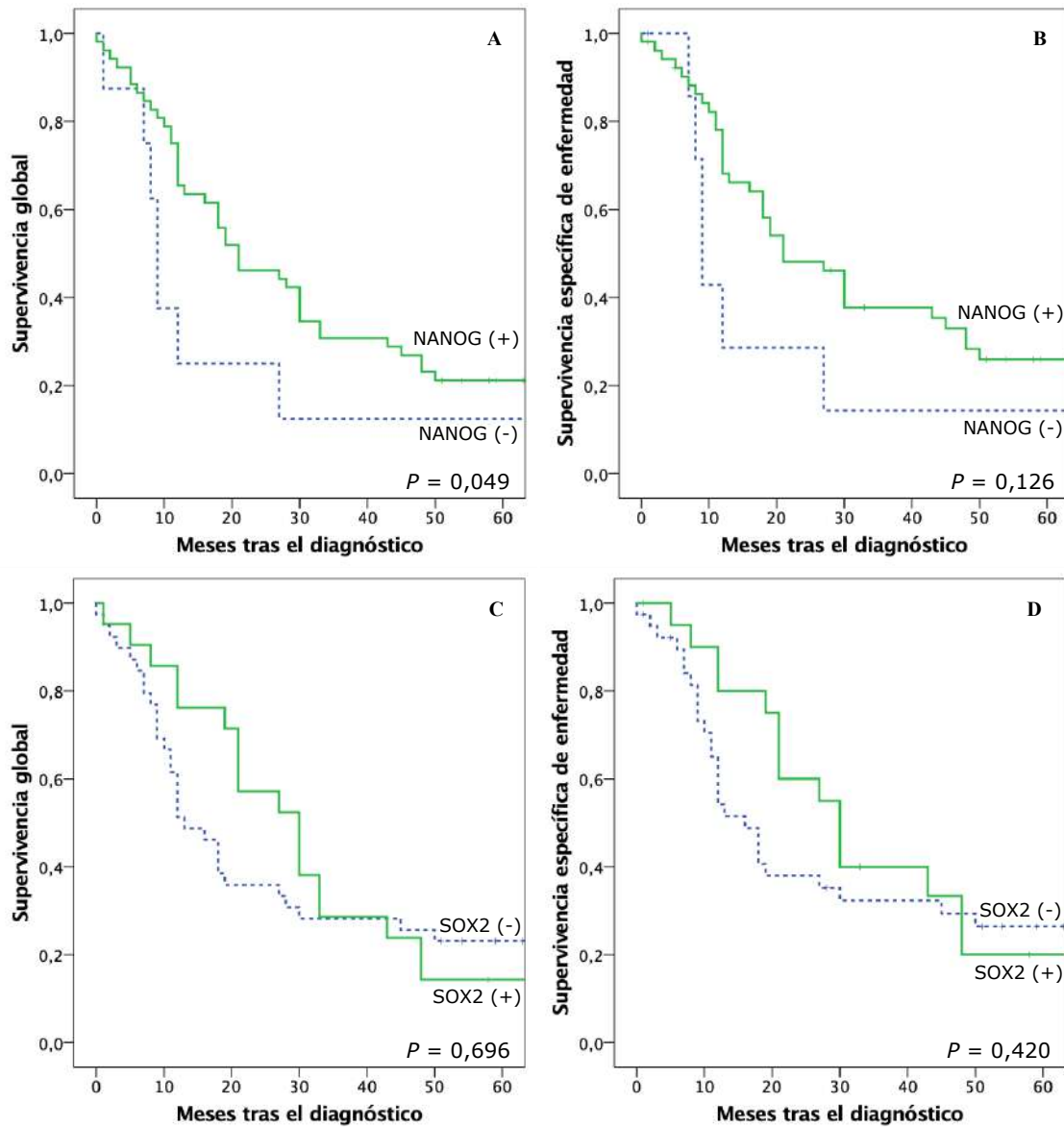
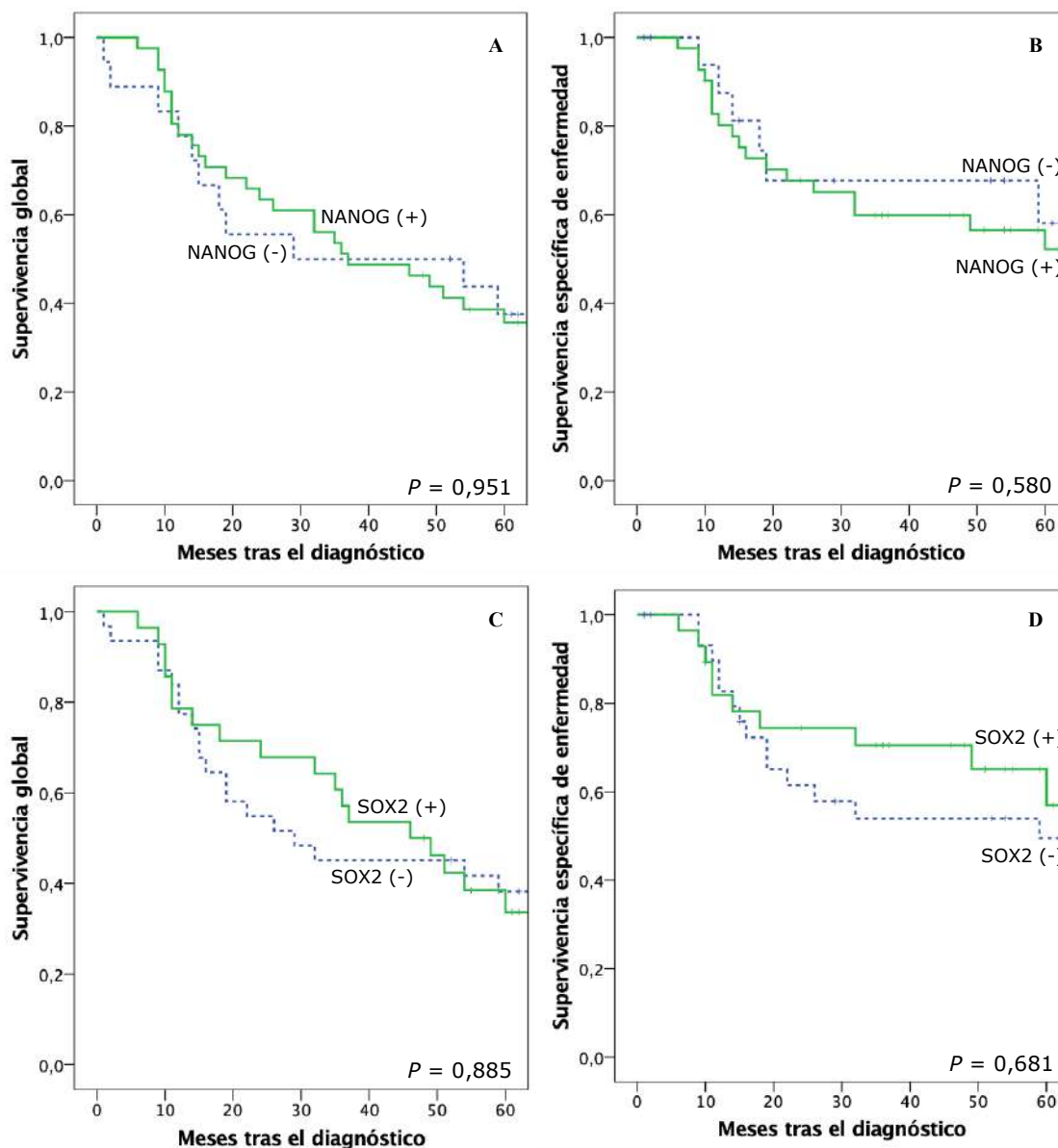


Figura 21. Supervivencia global (A-C) y específica de enfermedad (B-D) en función de la expresión de NANOG (A-B) y de la expresión de SOX2 (C-D) en pacientes con carcinoma escamoso de laringe.



El significado pronóstico de NANOG también variaba sustancialmente en función de la presencia de metástasis ganglionares cervicales (N+). En los pacientes N+, la expresión de NANOG se correlacionaba de forma significativa con una mejor supervivencia (SEE a los 5 años del 32% en los pacientes con expresión de NANOG frente al 11% en los pacientes con expresión negativa; Log-rank, $P = 0,002$). Por el contrario, en los pacientes sin metástasis

ganglionares (N0), la expresión de NANOG no se relacionaba con la SEE ($P = 0,304$). Las diferencias en función de la presencia de metástasis ganglionares se observaron con la expresión de NANOG, pero no al analizar la expresión de SOX2 ($P = 0,218$ y $P = 0,181$ para paciente N0 y N+, respectivamente).

Figura 22. Supervivencia global (A-B) y específica de enfermedad (C-D) en función de la expresión de NANOG en pacientes sin metástasis ganglionares (A-C) y en pacientes con metástasis ganglionares (B-D).

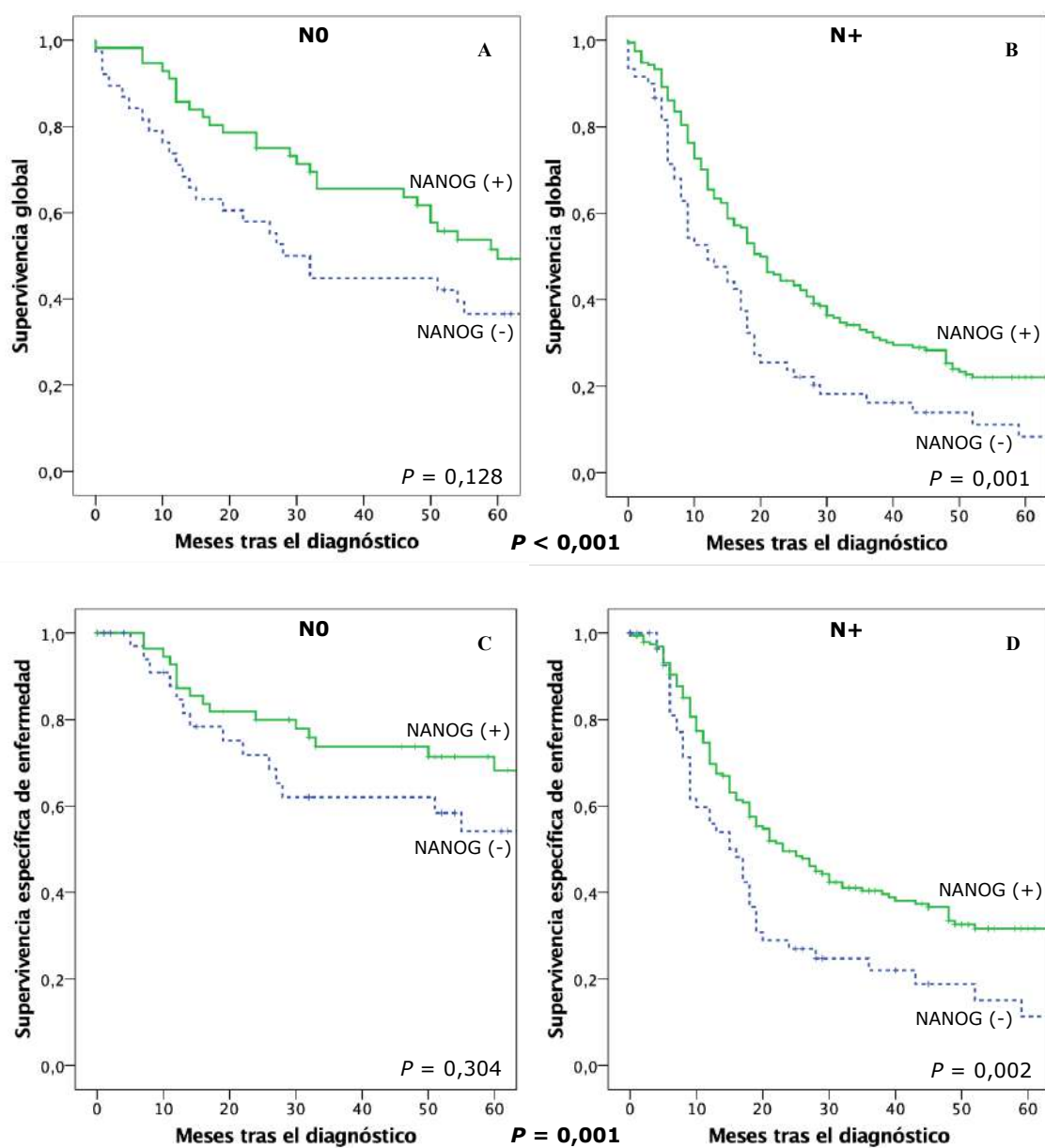
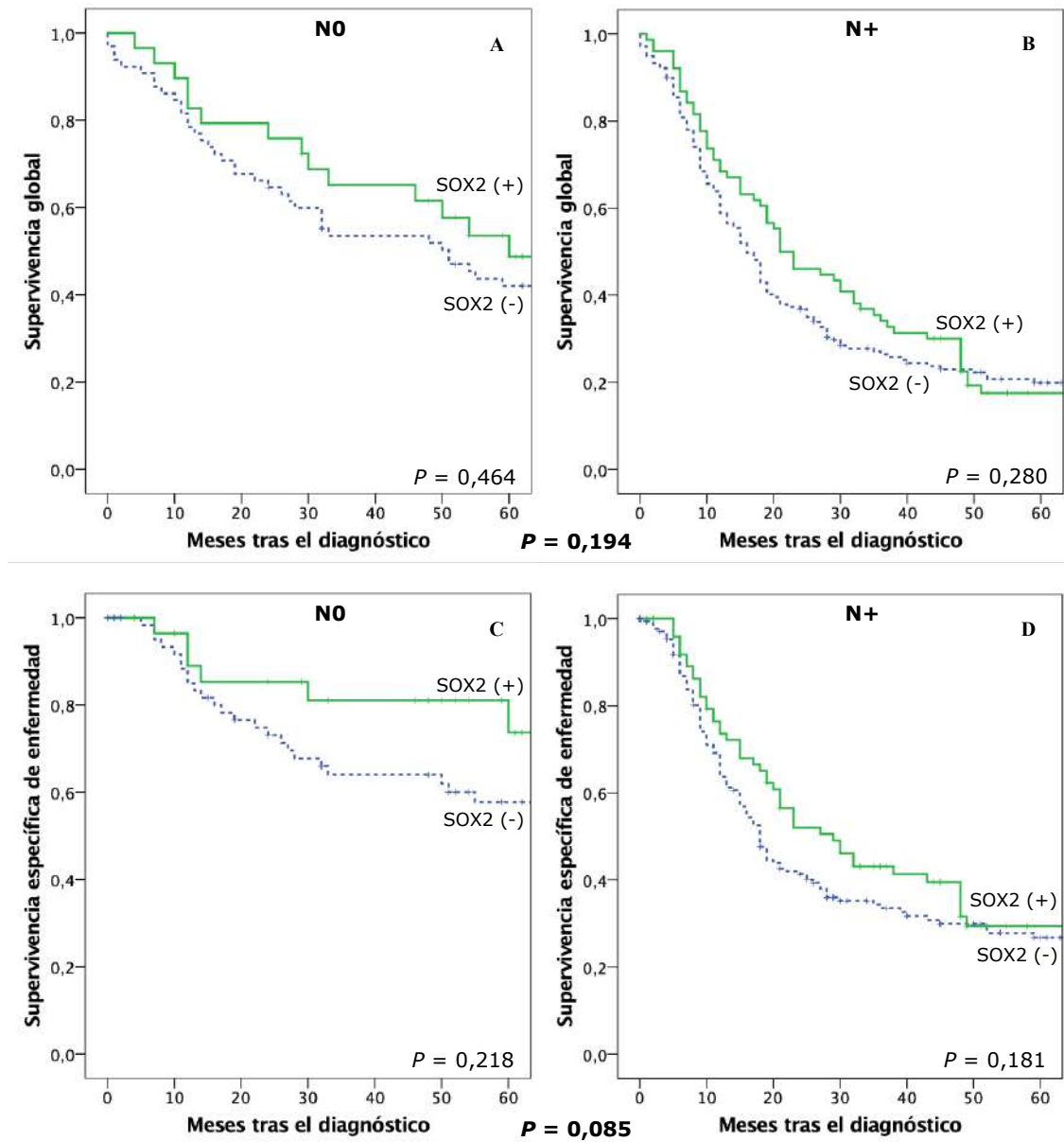


Figura 23. Supervivencia global (A-B) y específica de enfermedad (C-D) en función de la expresión de SOX2 en pacientes sin metástasis ganglionares (A-C) y en pacientes con metástasis ganglionares (B-D).



4.11 Análisis de la expresión combinada y diferencial de NANOG y SOX2

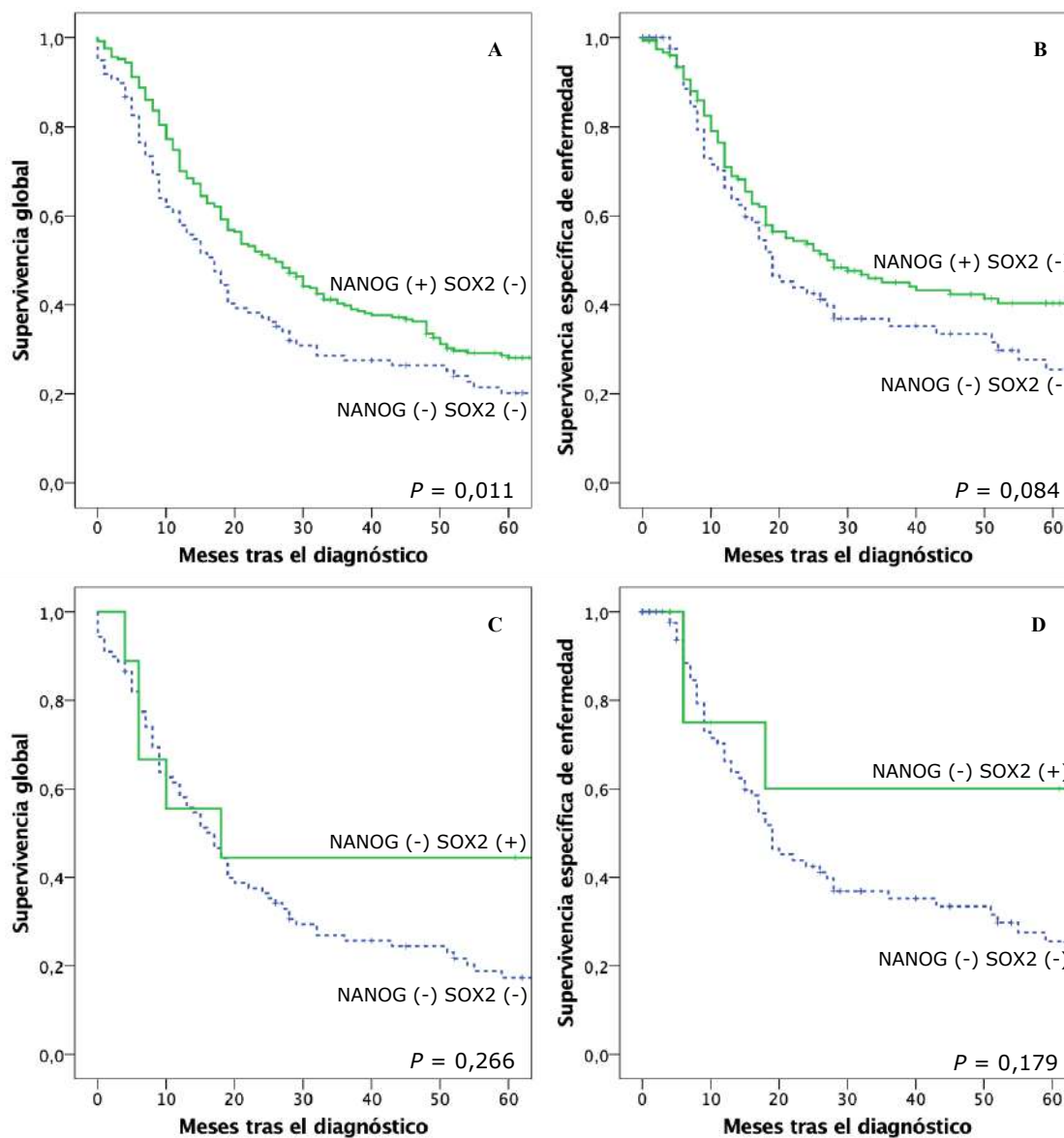
Para valorar la relevancia clínica de la expresión de NANOG y de SOX2 de forma independiente, analizamos el impacto en la supervivencia de los pacientes de la expresión de cada factor con expresión negativa del otro, respecto a los dobles negativos. En nuestra serie, 96 pacientes tenían tumores que expresaban NANOG y SOX2, mientras que en otros 89 casos no se encontraba expresión de ninguno de los factores. En 154 tumores se halló expresión de NANOG sin expresión de SOX2, mientras que sólo en 9 pacientes había expresión de SOX2 siendo negativa la de NANOG (prueba exacta de Fisher, $P < 0,001$; Tabla 17).

Tabla 17. Correlación entre la expresión proteica de NANOG y de SOX2 en CECC (†prueba exacta de Fisher).

	SOX2 negativo	SOX2 positivo	Total	Valor de P^{\dagger}
NANOG negativo	89	9	98	<0,001
NANOG positivo	154	96	250	
Total	243	105	348	

La expresión de NANOG con SOX2 negativo se relacionaba de forma significativa con mejor supervivencia global, pero al analizar la expresión de SOX2 con NANOG negativo las diferencias no alcanzaban significación estadística (Figura 24).

Figura 24. Supervivencia global (A-C) y específica de enfermedad (B-D) en función de la expresión de NANOG en casos SOX2-negativos (A-B) y en función de la expresión de SOX2 en casos NANOG-negativos (C-D).



Al estudiar la expresión combinada de ambos factores, también encontramos diferencias significativas en la supervivencia de los pacientes. La expresión conjunta de NANOG-SOX2 en los tumores se asociaba con mejor supervivencia global y específica de enfermedad (SG a los 5 años 24% vs 17%, Log-rank, $P = 0,015$; SEE a los 5 años 40% vs 26%, Log-rank, $P = 0,019$; Figura 25). En función de la localización del tumor primario, el impacto de la doble

expresión NANOG-SOX2 era similar en los pacientes con tumores de orofaringe e hipofaringe, mientras que los tumores de laringe mostraban un comportamiento clínico diferente, no observándose impacto significativo de la expresión NANOG-SOX2 en la evolución de los pacientes (Tabla 18; Figura 26).

Figura 25. Supervivencia global (A) y específica de enfermedad (B) en función de la co-expresión de NANOG-SOX2.

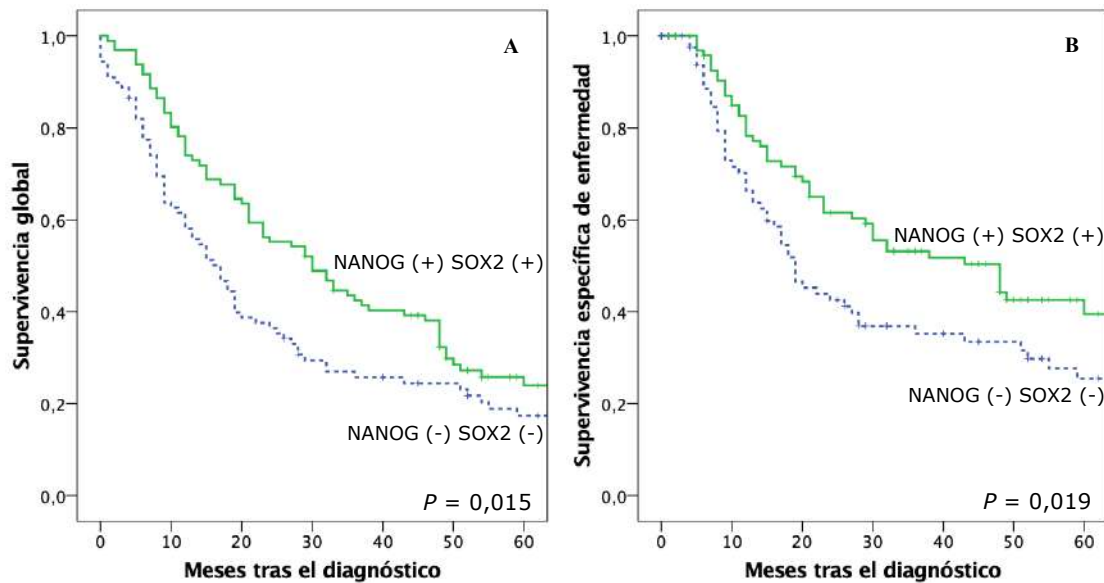


Figura 26. Supervivencia global y específica de enfermedad en función de la co-expresión de NANOG y SOX2 en carcinomas escamosos de orofaringe (A-B), hipofaringe (C-D) y laringe (E-F).

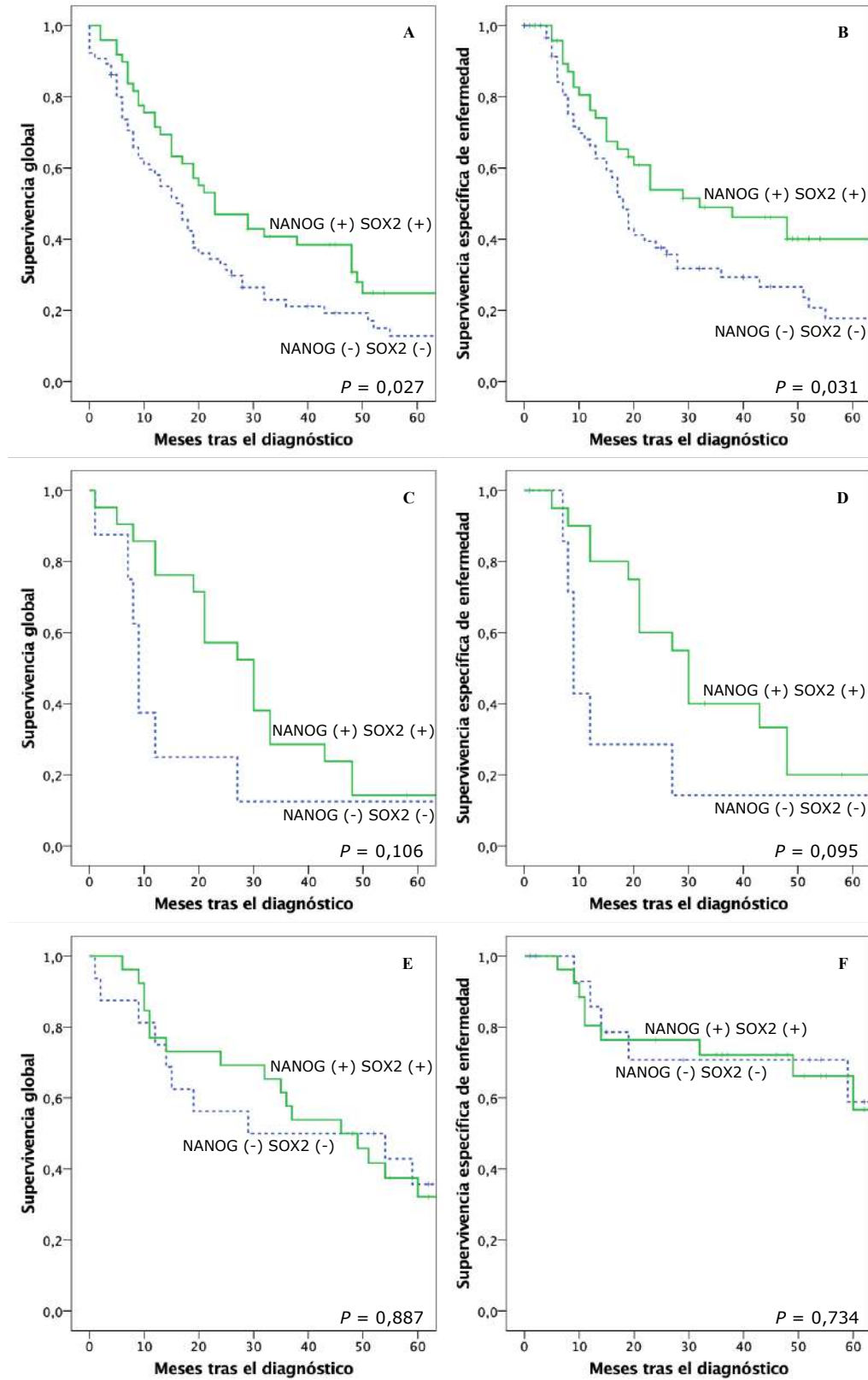


Tabla 18. Correlación entre la expresión de NANOG y SOX2, y la supervivencia a 5 años.

Pacientes	NANOG (+)	NANOG (-)	HR (IC 95%); P	SOX2 (+)	SOX2 (-)	HR (IC 95%); P	Dobles positivos	Dobles negativos	HR (IC 95%); P
Serie completa									
SEE	40%	29%	0,055	42%	35%	0,101	40%	26%	0,019
SG	28%	20%	0,012	26%	26%	0,221	24%	17%	0,015
Carcinomas de orofaringe									
SEE	43%	22%	0,013	43%	35%	0,312	40%	18%	0,031
SG	29%	16%	0,011	28%	24%	0,319	25%	13%	0,027
Carcinomas de hipofaringe									
SEE	26%	14%	0,126	20%	26%	0,420	20%	14%	0,095
SG	21%	13%	0,049	14%	23%	0,696	14%	13%	0,106
Carcinomas de laringe									
SEE	52%	58%	0,580	57%	50%	0,681	57%	59%	0,734
SG	36%	38%	0,951	34%	38%	0,885	32%	36%	0,887

4.12 Análisis multivariante en relación con la supervivencia

En base al análisis multivariante encontramos una influencia significativa en el pronóstico de los pacientes de las clasificaciones T y N, el grado histopatológico y la expresión de NANOG (Tabla 19).

Tabla 19. Estimación del riesgo de progresión de muerte por tumor (modelo multivariante de Cox).

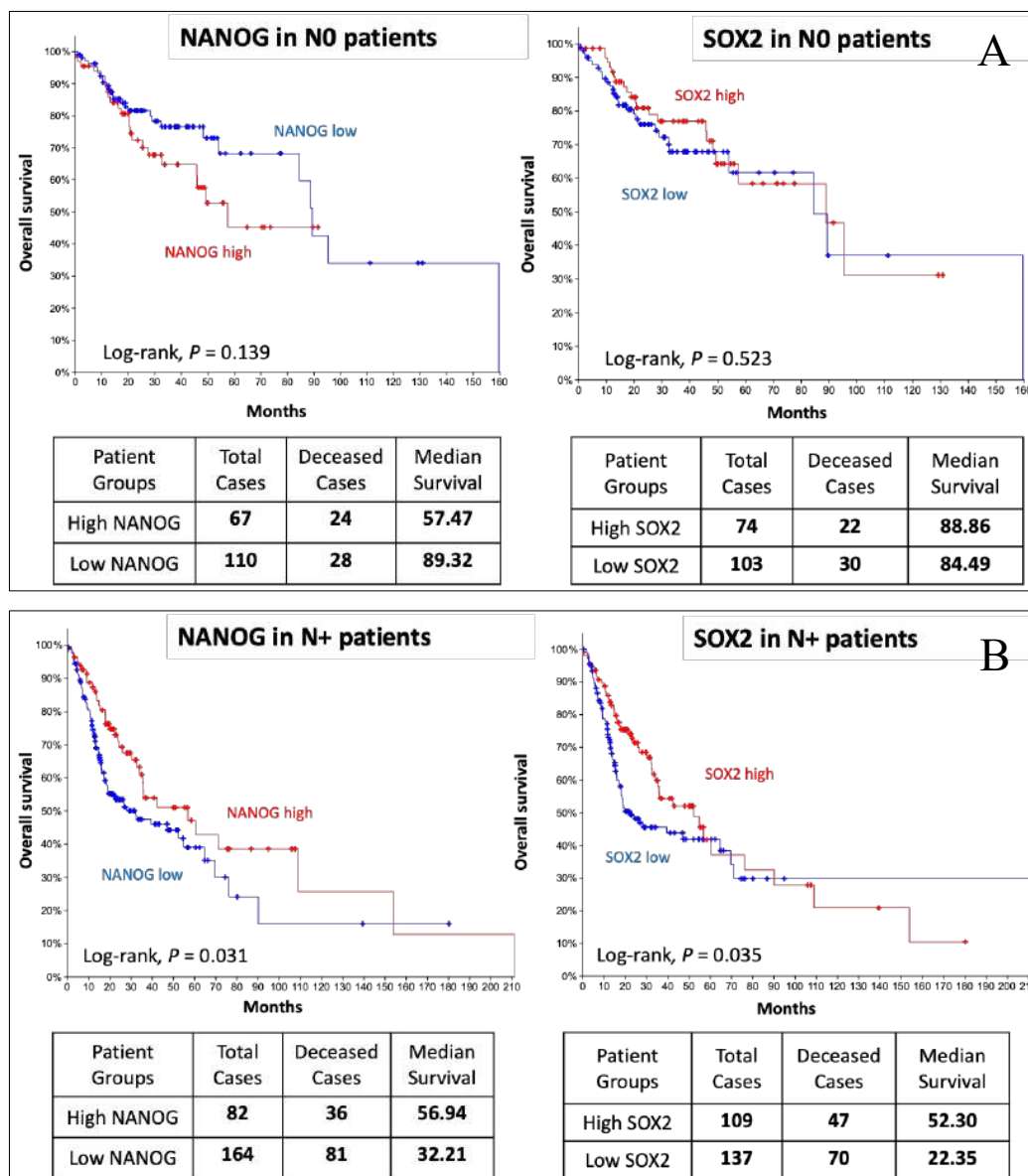
VARIABLES	Hazard Ratio	IC 95%	P
T (3-4/1-2)	1,153	1,033 – 1,288	0,011
N (+/-)	2,619	1,756 – 3,906	0,000
G (3/1-2)	1,494	1,071 – 2,085	0,018
Localización (Far/Lar)	0,695	0,448 – 1,077	0,103
NANOG (+/-)	0,783	0,662 – 0,927	0,004
SOX2 (+/-)	0,961	0,685 – 1,349	0,820

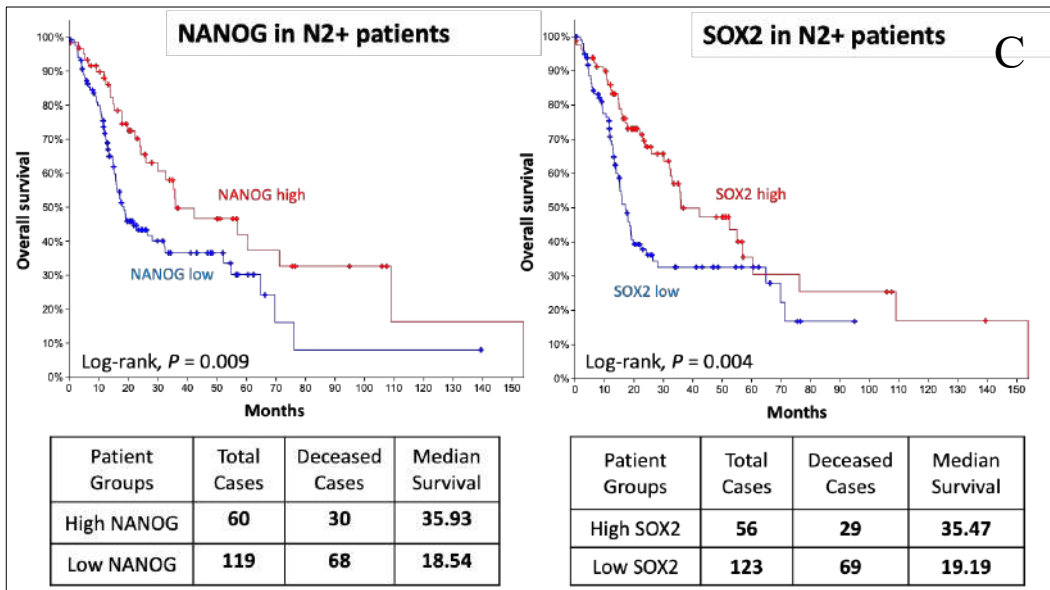
4.13 Validación de los resultados

Para confirmar nuestros resultados, llevamos a cabo un análisis mediante simulación computacional de la relación de la expresión de NANOG y SOX2 con la supervivencia de los pacientes, empleando los datos disponibles en *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). Dicho análisis se realizó sobre una cohorte de 530 pacientes con CECC¹⁰⁷, utilizando la plataforma cBioPortal (<http://cbioportal.org/>)^{108,109}. Los grupos de pacientes se clasificaron según la expresión de ARNm en expresión elevada (por encima de la media) y expresión baja (por debajo de la media). La expresión de ARNm de NANOG y de SOX2 se analizó en 424 pacientes de los que se disponía información sobre el estadio N. Se llevó a cabo un análisis de la correlación entre la expresión del ARNm de NANOG y de SOX2 en pacientes N0 (177) y en pacientes N+ (246) por separado. En los pacientes N+ se observaba una correlación robusta entre la expresión del ARNm de NANOG y de SOX2 (coeficiente de correlación de Spearman 0,21, $P = 0,001$), mientras que dicha correlación no se encontraba en los pacientes N0 (coeficiente de correlación Spearman 0,12, $P = 0,104$). Además, el impacto de la expresión del ARNm de NANOG y SOX2 difería significativamente según el estadio N (Tabla 20). En los pacientes N0, aquellos que tenían expresión elevada del ARNm de NANOG presentaban peores tasas de supervivencia global que aquellos con baja expresión (mediana de tiempo de supervivencia 57,47 frente a 89,32 meses; Log-rank, $P = 0,139$). En dicho grupo de pacientes la expresión del ARNm de SOX2 no tenía impacto en el pronóstico de los pacientes (mediana de tiempo de supervivencia 88,86 meses frente a 84,49 meses; Log-rank, $P = 0,523$). Por el contrario, en el grupo de pacientes N+, aquellos con expresión elevada del ARNm de NANOG tenían mejores tasas de supervivencia global (mediana de tiempo de supervivencia 56,94 frente a 32,22 meses; Log-rank, $P = 0,032$), como se muestra en la Figura 27. En esta cohorte, la expresión del ARNm de SOX2 también se correlacionaba con mejor supervivencia global en los pacientes N+ (mediana de tiempo de supervivencia 52,31 frente a 22,36 meses; Log-rank, $P = 0,036$). La correlación de la expresión del ARNm de NANOG y de SOX2 con mejor supervivencia se hacía más evidente a mayor estadio N (Log-rank, $P = 0,009$ y $P = 0,004$, respectivamente).

Tabla 20. Supervivencia global en función de la expresión de NANOG (ARNm).

Estadio N	Expresión ARNm NANOG	Total de casos	Fallecimientos (%)	Mediana de supervivencia (en meses)	Log-rank P
N0	Elevada	67	24 (36)	57,47	0,139
	Baja	110	28 (25)	89,33	
N+	Elevada	82	36 (44)	56,94	0,032
	Baja	164	81 (49)	32,22	

Figura 27. Supervivencia global en función de la expresión de NANOG y de SOX2 (ARNm) en diferentes subconjuntos de pacientes: **A**, pacientes sin metástasis ganglionares (n= 177); **B**, pacientes con metástasis ganglionares (N+, n=246); C, pacientes con afectación ganglionar N2 o superior (N2+, n=179).



5 DISCUSIÓN

5.1 Factores de pluripotencialidad en las etapas iniciales de la tumorigénesis

5.1.1 Expresión de factores de pluripotencialidad en lesiones premalignas

Como sucede en otros tumores epiteliales, la carcinogénesis laríngea parece evolucionar en un proceso de varias etapas que incluyen cambios a nivel molecular provocados por la exposición a carcinógenos, resultando en lesiones premalignas y carcinomas invasivos^{110,111}. Aunque se considera que las lesiones con características displásicas tienen un mayor riesgo de cáncer¹¹², algunos cánceres se desarrollan a partir de lesiones sin cambios displásicos. Por tanto, son necesarios más marcadores objetivos y fiables para identificar de forma más precisa lesiones de alto riesgo, más allá de los criterios clínicos e histopatológicos actuales³, lo que sin duda ayudaría a elegir la opción terapéutica más apropiada en la práctica clínica.

El papel de los factores de pluripotencialidad en los tumores sólidos se ha estudiado ampliamente. La capacidad oncogénica de NANOG viene investigándose desde hace años, habiéndose demostrado su participación en el proceso mediante la regulación de otros factores. En carcinomas de estirpe epidermoide se demostró la expresión aberrante de NANOG, incluyendo dentro de estos carcinomas los de cabeza y cuello¹¹³. *Xie y cols.*¹¹⁴ analizaron la regulación postranscripcional de NANOG y su capacidad de promover la tumorigénesis a través de *Bmi1*. Por su parte, *Palla y cols.*¹¹⁵ demostraron que NANOG induce la expresión de marcadores de pluripotencialidad y la transición epitelio-mesénquima en papilomas cutáneos de ratón. De esta forma, participaría en la conversión maligna de los papilomas.

Por los resultados de estudios previos parece que el papel oncogénico de NANOG depende del estado del supresor tumoral p53. En modelos murinos, la alteración del gen de NANOG no es suficiente para el desarrollo de tumores malignos, siendo necesaria también la supresión de función de p53 para la formación de carcinomas cutáneos¹¹⁶. Aunque NANOG participa en las etapas iniciales de diferentes tumores, como los cutáneos, alterando los sistemas de reparación del ADN, por si mismo no sería capaz de conducir a la progresión hacia un tumor invasivo mientras sigan activos otros mecanismos de supresión tumoral como p53¹¹⁷.

El papel de SOX2 en los tumores de cabeza y cuello también ha sido estudiado en los últimos años, habiéndose constatado su expresión en carcinomas de laringe¹⁰³. En diversos trabajos se ha relacionado la expresión de SOX2 en tumores de cabeza y cuello con la evolución de la enfermedad. Mientras que varios de ellos han encontrado una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de SOX2 y una menor supervivencia global y libre de enfermedad^{104–106}, otros lo han relacionado con un mejor pronóstico en carcinomas de hipofaringe, aunque sin obtener una relación estadísticamente significativa¹¹⁸. También se ha visto un papel relevante de SOX2 como factor pronóstico de respuesta a tratamiento, relacionándose con una mayor respuesta del tumor a la radioterapia¹¹⁹. En lo referente a su papel en el inicio del proceso oncogénico, *Kokalj Vokač y cols.*¹²⁰ encontraron que la amplificación de los genes de SOX2 y hTERT era habitual en estadios tempranos de CEEO y se podía relacionar con diferente pronóstico. El grupo de *Qiao*¹²¹ estudió mediante IHQ la expresión de OCT4 y SOX2 en lesiones premalignas y carcinomas de cavidad oral en rata y en humano. En 20 lesiones precursoras de malignidad de pacientes (12 leucoplaquias y 8 líquenes planos orales) encontraron expresión de ambos factores, siendo el patrón más habitual la co-expresión (12 casos). Encontraron también expresión nuclear de OCT4 y SOX2 en el epitelio adyacente a los CEEO. Sin embargo, hasta la fecha no se había estudiado la presencia de SOX2 en lesiones premalignas de laringe.

5.1.2 Biomarcadores del riesgo de progresión de lesiones premalignas a cáncer

Dado que las lesiones premalignas se asocian con un mayor riesgo de progresión a cáncer, es interesante conocer el papel de los factores de pluripotencialidad en esa progresión para alcanzar un mejor conocimiento del proceso oncogénico y para valorar su posible papel como biomarcadores predictores de desarrollo de un carcinoma de laringe. En los últimos años se han venido estudiando diferentes biomarcadores moleculares que permitan predecir de forma más precisa el comportamiento de las lesiones precursoras de malignidad en la laringe. Los más estudiados han sido proteínas relacionadas con la proliferación y el control del ciclo celular (PCNA, Ki67, p53, p16, p21 y ciclina D1). En menor medida también se ha investigado el papel de moléculas implicadas en la adhesión celular e invasión [Osteopontina, CD44, kinasa de adhesión focal (FAK) o Cortactina (CTTN)], u otras moléculas como la Podoplanina o Kv3.⁴⁰ Entre ellos, la FAK y la CTTN son los que han mostrado una asociación más robusta con la progresión a cáncer de laringe. CTTN (11q13)

y FAK (8q24) se expresan de forma aberrante en las etapas iniciales de la tumorigénesis laríngea y los pacientes cuyas displasias presentan expresión de uno de estos factores tienen una mayor incidencia de CEL⁴¹.

*Rodrigo y cols.*¹²² encontraron que la Podoplanina, una glicoproteína regulada al alza en diferentes carcinomas escamosos, se expresaba más allá de la capa basal del epitelio en displasias de laringe, relacionándose esta expresión con mayor riesgo de progresión a carcinoma de laringe. La expresión de Podoplanina se encontraba en estadios iniciales de CEL, perdiéndose en estadios más avanzados y no relacionándose con la capacidad de invasión de estos tumores. La amplificación del gen *ANO1* en displasias de laringe ha mostrado también relación con un mayor riesgo de progresión a cáncer¹²³.

Nuestros resultados ponen de manifiesto que tanto la expresión de NANOG como la de SOX2 se asocian significativamente con el riesgo de progresión a carcinoma. Es más, esta asociación es más robusta y muestra un poder predictivo superior a la clasificación histológica, la cual sigue siendo hoy en día el *gold standard* en la práctica clínica. Posteriormente se ha corroborado el valor de la expresión de NANOG y SOX2 también en las lesiones premalignas de cavidad oral como factores predictores del riesgo de progresión hacia carcinoma invasivo^{124,125}.

La sensibilidad de la expresión citoplasmática de NANOG para detectar los pacientes que desarrollarán cáncer de laringe no es elevada en nuestra serie, pues sólo alcanza el 50%, pero sí presenta una especificidad alta, del 83%, así como un alto valor predictivo negativo (VPN), por lo que sería útil para determinar qué pacientes tienen una baja probabilidad de progresar hacia cáncer de laringe. A pesar de la localización primaria de NANOG en el núcleo, en nuestra cohorte la tinción de NANOG es de predominio citoplasmático, siendo además la expresión clínicamente más relevante. Estos hallazgos van en consonancia con la expresión aberrante citoplasmática de NANOG en células tumorales encontrada previamente por otros grupos, como los de *Piazolla*¹¹³ y *Lee*¹¹⁰.

La expresión de SOX2 también se encontraba en una proporción significativa de las displasias de laringe incluidas en nuestro estudio, relacionándose además con un mayor grado histopatológico según los criterios de la OMS¹. Con el estudio de un amplio número de pacientes con lesiones premalignas de laringe, demostramos que la expresión de SOX2

se detecta de forma temprana en las displasias laríngeas, pero no en el epitelio normal adyacente. En nuestra serie, SOX2 muestra niveles superiores de sensibilidad como prueba de predicción de cáncer de laringe (69%), pero, como sucedía con NANOG, no puede considerarse una sensibilidad elevada ya que está por debajo del 80%. La expresión de SOX2 tiene además una especificidad más baja (71%), aunque mantiene un VPN por encima del 80%.

Observando nuestros resultados en el estudio por separado de NANOG y SOX2 en displasias de laringe, ambos factores emergen como parámetros clínica y biológicamente relevantes en las etapas iniciales de la tumorigénesis laríngea, contribuyendo a la transformación maligna y al desarrollo del cáncer de laringe. Con el análisis conjunto de la expresión de ambos factores en los mismos pacientes, encontramos una asociación significativa entre la expresión nuclear de SOX2 y citoplasmática de NANOG. De 22 casos con expresión citoplasmática intensa de NANOG, sólo en 2 encontramos ausencia de expresión nuclear de SOX2. Por tanto, en más del 90% de los casos de displasia de laringe con expresión de NANOG (considerando la expresión intensa) podremos asumir que se está expresando también SOX2. De hecho, cuando analizamos las tasas de progresión a carcinoma a lo largo del tiempo en función de la expresión de cada factor, obtenemos resultados prácticamente idénticos a los comentados previamente, con una asociación significativa y robusta de la expresión con la progresión a cáncer, pero el análisis de la expresión conjunta muestra una evolución que se asemeja más a la observada en el estudio de NANOG por separado (Figura 10). Respecto a los parámetros clínicos de la evaluación de expresión NANOG-SOX2, nuestros resultados muestran que el análisis conjunto aporta cierto incremento en la sensibilidad y el VPP de la prueba, pero continúan siendo niveles que no pueden calificarse como altos (sensibilidad del 62% y VPP del 65%). En cuanto a la especificidad y VPN, los resultados son equivalentes a los obtenidos con el análisis inmunohistoquímico exclusivo de NANOG.

Dado que el análisis inmunohistoquímico de NANOG y SOX2 es relativamente sencillo y de fácil interpretación, parece razonable recomendar que esta prueba molecular se incluya como marcador complementario para la valoración del riesgo de cáncer de lesiones premalignas de laringe y para la toma de decisiones clínicas. En base a los resultados observados en el análisis conjunto y buscando una optimización de pruebas diagnósticas en

la práctica clínica, podría realizarse únicamente el estudio de expresión de NANOG por IHQ, ya que sus atributos como prueba clínica son superponibles al análisis conjunto, dejando el estudio de SOX2 para aquellos casos dudosos, como los que muestran una expresión citoplasmática débil-moderada de NANOG. Otra opción sería hacer un cribado de las displasias con en análisis de SOX2, ya que es la prueba con mayor sensibilidad, dejando el análisis de NANOG para aquellos casos con ausencia de expresión de SOX2.

Además de observar la expresión de NANOG y SOX2 como parámetros clínicamente relevantes, su expresión en las etapas iniciales de la tumorigénesis laríngea parece contribuir a la transformación maligna y al desarrollo del cáncer de laringe. Por este motivo, tienen un papel potencial como dianas terapéuticas para prevenir el desarrollo de tumores de laringe en pacientes que ya presentan lesiones precursoras de malignidad.

Conociendo el papel de NANOG y de SOX2 en las fases más tempranas de la tumorigénesis, no sólo sería importante su estudio para la valoración de lesiones premalignas, sino también para profundizar en la vertiente molecular del concepto de campo de cancerización relacionado con los CECC. Se considera que los CECC surgen a partir de áreas de mucosa de la VAS sobre las que asientan clones celulares que sufren un cúmulo de alteraciones genéticas que dan lugar a un fenotipo invasivo. Este concepto va ligado al de campo de cancerización en CECC, que fue introducido por *Slaughter* en 1953, refiriéndose a los CECO¹²⁶. El campo de cancerización hace referencia a áreas extensas de la VAS cuya mucosa ha estado expuesta de manera prolongada a carcinógenos como el tabaco o el alcohol. Esa exposición prolongada da lugar a amplias zonas de tejido con alteraciones genéticas, pudiendo desarrollarse de forma multifocal carcinomas. Esta sería una explicación para las recidivas, persistencias tumorales y la aparición de segundos tumores primarios en la VAS⁸¹, siendo posible la participación de factores de pluripotencialidad como NANOG o SOX2 en este proceso.

5.2 Factores de pluripotencialidad en carcinomas escamosos de cabeza y cuello

Las células madre tumorales (CSC por las siglas del inglés *Cancer Stem Cells*) suponen en torno a un 10% del total celular en tumores sólidos. En CECC se ha demostrado que las células madre tumorales, identificadas con marcadores como CD44, son las únicas capaces de dar lugar a tumores diferenciados, según estudios en modelos murinos inmunosuprimidos¹²⁷. En base a estos hallazgos, las CSC serían las que tendrían una capacidad tumorigénica dentro del heterogéneo grupo de células que componen el tumor.

El estudio de las CSC y los factores de pluripotencialidad en CECC permitiría conocer mejor el proceso oncogénico y entender la diferente evolución entre distintos tumores. Además, serviría para incorporar a la práctica clínica nuevos marcadores que permitan establecer grupos de pacientes con un pronóstico más preciso, aplicando mejores estrategias terapéuticas.

En el estudio de las células madre tumorales, *Chen y cols.*^{128,129} observaron que factores de pluripotencialidad como OCT3/4, SOX2 y NANOG estaban regulados al alza en células tumorales con capacidad de formar tumoresferas (una característica de las células pluripotenciales) a partir de CECC. Además, OCT4 estaba regulado al alza en células de CECC ALDH1+. Por tanto, NANOG, SOX2 y OCT4 serían factores útiles para identificar la presencia de CSC en CECC, siendo interesante conocer qué papel juegan en la evolución de la enfermedad. En nuestro trabajo demostramos que tanto NANOG como SOX2 se expresan en una proporción significativa de tumores primarios de orofaringe, hipofaringe y laringe. Por el contrario, no encontramos expresión proteica de OCT4 en estos tumores, como sucedía con las displasias de laringe, a pesar de utilizar un anticuerpo frente a una amplia variedad de epítomos y obtener una buena tinción en los controles de seminoma.

5.2.1 Relación de los factores de pluripotencialidad con la supervivencia y la recidiva tumoral

A pesar de la gran cantidad de trabajos que se han realizado sobre los factores de pluripotencialidad en CECC, su papel en la evolución de la enfermedad y el pronóstico de los pacientes continúa sin establecerse de forma precisa.

SOX2 y OCT4 regulan la expresión de diversos genes, entre ellos NANOG, formando un heterodímero que se une a su promotor. Aunque en nuestra cohorte no encontramos expresión de OCT4, sí hallamos una correlación positiva entre la expresión de SOX2 y la de NANOG, de forma que prácticamente todos los casos con expresión de SOX2 mostraban también expresión de NANOG. No obstante, en 156 de las muestras tumorales había expresión de NANOG sin expresión de SOX2, por lo que debe haber otros factores implicados en la regulación de la expresión de NANOG.

Varios autores han encontrado una relación entre la expresión de NANOG, SOX2 y OCT4 con peor pronóstico. *Chiou y cols.*¹³⁰ relacionaron la expresión de NANOG y OCT4 con mayor grado histológico y peor pronóstico en CECO. NANOG y SOX2 participan también en la transición epitelio-mesénquima (TEM), relacionándose de esta manera con un fenotipo invasivo y peor pronóstico. De hecho, la expresión de NANOG tiene una relación inversa con la expresión de E-cadherina y directa con la de N-cadherina. La expresión de SOX2 se relaciona de forma directa con la de N-cadherina, pero no con la de E-cadherina¹³¹.

Por su parte, NANOG también se sobreexpresa en tumores de diferentes localizaciones de cabeza y cuello, como la cavidad oral¹³⁰. Su sobreexpresión se ha correlacionado con características tumorales adversas, entre ellas peor diferenciación tumoral y quimiorresistencia¹³², y se ha asociado con peor pronóstico en CECO¹¹⁰. En varios trabajos previos la expresión de NANOG se ha relacionado con el pronóstico de los pacientes con CECC, aunque son estudios heterogéneos en sus criterios de inclusión y en la metodología empleada. *Zhao y cols.*¹³³ realizaron un meta-análisis sobre 33 estudios acerca del valor pronóstico de NANOG en tumores sólidos. La expresión elevada de NANOG se relacionaba de forma significativa con peor supervivencia global de los pacientes, incluyendo los tumores de cabeza y cuello (HR = 2,29; IC 95% 1,75 – 3,02, $P < 0,001$).

Por el contrario, la expresión de NANOG en nuestra serie se asocia con mejor pronóstico, aunque sólo en tumores faríngeos. En estos pacientes, el valor pronóstico de NANOG es significativo en los pacientes con metástasis ganglionares. Las diferencias en la inclusión de tumores de diferentes localizaciones, estadios de la enfermedad y modalidades de tratamiento podría explicar la disparidad de resultados entre los diferentes trabajos.

En el caso de SOX2, su expresión se ha asociado con diferentes procesos tumorales como la proliferación celular, migración, invasión, anti-apoptosis y quimiorresistencia^{134,135}. Sin

embargo, su impacto en la evolución de los tumores malignos continúa siendo controvertido. Los grupos de *Schröck*¹⁰², *Kokalj Vokač*¹²⁰ y *Du*¹⁰⁶ encontraron asociación entre la expresión de SOX2 y peor pronóstico, mientras que otros trabajos correlacionan la expresión de SOX2 con mejor pronóstico. *Züllig y cols.*¹³⁶ observaron que en pacientes con carcinoma de cavidad oral, la expresión de SOX2 era mayor en pacientes sin metástasis ganglionares. *Baumeister y cols.*¹³⁷ relacionaron la expresión de SOX2 con mejor evolución clínica en pacientes con tumores de cavidad oral, orofaringe, hipofaringe y laringe tratados con quimiorradioterapia. También los grupos de *Chung*¹¹⁹ y de *Bochen*¹³⁸ observaron un mejor pronóstico en pacientes con CECC y niveles elevados de expresión de SOX2. En nuestra cohorte, la expresión de SOX2 se relaciona con mejor pronóstico, pero en el estudio de las diferentes localizaciones, los carcinomas escamosos de laringe tienen un comportamiento completamente diferente. No obstante, en ningún caso las diferencias alcanzan significación estadística. En carcinomas escamosos de otras localizaciones, como el esófago, también se ha encontrado un mejor pronóstico en los pacientes cuyos tumores expresaban SOX2¹³⁹. En base a las interacciones de SOX2 con diferentes factores, *Hussenet y cols.*¹⁴⁰ han sugerido una posible función pleiotrópica en carcinomas de células escamosas de otras localizaciones. En función de la unión con diferentes cofactores se promovería o reprimiría la expresión de otros factores, dando lugar a resultados clínicos distintos.

Con el objetivo de conocer mejor el impacto de los factores de pluripotencialidad en la evolución de los CECC, analizamos la expresión combinada y por separado de NANOG y SOX2. Observamos que los pacientes con expresión de ambas proteínas (NANOG-SOX2) presentaban un mejor pronóstico. La doble expresión NANOG-SOX2 como factor de riesgo integrado podría utilizarse en biopsias preoperatorias y ser útil como factor pronóstico adicional. Su valoración en conjunto con otros parámetros clínicos, como los márgenes de resección o la extensión extracapsular, podría servir para identificar pacientes de alto riesgo en los que sea necesario intensificar el tratamiento. Al analizar la supervivencia en función de la expresión de cada factor sin expresión del otro, la expresión de NANOG con ausencia de expresión de SOX2 se asociaba de forma significativa con una mejor supervivencia global. Teniendo en cuenta que sólo en 9 de 98 pacientes (9%) se observaba expresión de SOX2 sin expresión de NANOG, las diferencias en términos de supervivencia en función de SOX2, cuando no se expresa NANOG, no son significativas.

OCT4 también se ha relacionado con procesos tumorigénicos, como la transformación maligna, invasión y metástasis en tumores de cabeza y cuello, como los CECO^{129,141}. *Ma y cols.*¹⁴² encontraron una correlación significativa entre la expresión de AGR2 y la de OCT4, NANOG y SOX2 en tumores de cavidad oral, estando la expresión de AGR2 relacionada con mayor estadio T y con la presencia de metástasis ganglionares. El grupo de *Chiou*¹³⁰ observó que los pacientes con expresión de NANOG y OCT4 tenían peor pronóstico que aquellos con expresión sólo de NANOG u OCT4. El grupo de *Fan*¹⁴³ encontró peor pronóstico en pacientes con expresión de OCT4 y NANOG.

Como se comentaba previamente, en nuestra cohorte no encontramos expresión de OCT4. El gen de OCT4 humano puede generar tres transcritos (OCT4A, OCT4B y OCT4B1) así como cuatro isoformas de la proteína (OCT4A, OCT4B-190, OCT4B-265, y OCTB-164) en base a procesos de *splicing* alternativo e inicio alternativo de la traducción. OCT4A es el responsable de la pluripotencialidad de las células madre embrionarias, mientras que OCT4B no es capaz de mantener estas propiedades¹⁴⁴. Las propiedades diferentes de las distintas isoformas de OCT4 podría ser una causa importante de las controversias sobre el papel de OCT4 en diferentes tumores.

Gran parte de la importancia que se le han dado en los últimos años a los factores de pluripotencialidad y a las células madre tumorales ha sido por su papel potencial en las recidivas tumorales. Por un lado, estarían implicadas en la resistencia a tratamientos (sobre todo a diferentes modalidades de quimioterapia), y por otro las CSC serían las células capaces de dar lugar al desarrollo de un nuevo tumor.

En el estudio de los factores de pluripotencialidad en CECC, varios grupos han encontrado relación entre su expresión y la aparición de recidivas. *De Jong y cols.*¹⁴⁵ observaron una relación entre los niveles de CD44 y las recidivas locales de CEL en estadios tempranos tratados con radioterapia. *Linge y cols.*¹⁴⁶ también encontraron relación entre la expresión de CD44 y el control locorregional de tumores de cavidad oral, orofaringe e hipofaringe negativos para el VPH. En su estudio, los pacientes tratados con cirugía y ausencia de expresión de CD44 mostraban mejores tasas de control locorregional que aquellos con expresión de CD44.

En nuestra serie ni la expresión de NANOG ni la de SOX2 se relacionaba con la supervivencia libre de enfermedad en el conjunto de pacientes incluidos en la serie. Al

analizar por separado los tumores de faringe y de laringe, tampoco se observa una relación entre la expresión de los factores de pluripotencialidad y la recidiva tumoral. Sin embargo, al estudiar el impacto de NANOG y de SOX2 en función de la presencia de metástasis ganglionares, el grupo de pacientes que las presentaba (N+) mostraban una evolución diferente en base a la expresión de NANOG, no así en función de la expresión de SOX2. En los pacientes N+ la expresión de NANOG en el tumor primario se relacionaba con menor tasa de recidiva de la enfermedad. Esta relación puede ser una de las razones por la que, como se ha comentado previamente, los pacientes con expresión de NANOG mostrasen mejores tasas de supervivencia en pacientes N+, ya que la recidiva locorregional es una de las principales causas de mortalidad en pacientes con CECC.

5.2.2 Relación de la expresión de factores de pluripotencialidad con las metástasis ganglionares

El papel de las células madre tumorales en la invasión y metástasis es considerado fundamental ya que son las células capaces de iniciar el desarrollo tumoral en localizaciones distantes al tumor primario. Entre los fenómenos de invasión y metástasis, se han atribuido a las gemaciones tumorales (*tumor budding*) propiedades de CSC¹⁴⁷. El grupo de Luo¹⁴⁸ encontró expresión elevada de ALDH1 en las células de gemación tumoral, proponiendo que esas células tendrían las capacidades de invasión y metástasis de las CSC. Marangon Junior y cols.¹⁴⁹ observaron una mayor expresión de ALDH1 en la zona de gemación de CECCO respecto a otras áreas del tumor. También se ha relacionado la sobreexpresión de CD44 con la gemación en CECCO¹⁵⁰.

Varias moléculas han sido valoradas como posibles marcadores de metástasis ganglionares, entre ellas algunas están relacionadas con proliferación (Ciclina D1), con adhesión celular (E-caherina, CD44, Ep-CAM), con proteólisis (MMPs, Catepsina-D, TIMPs, colágeno tipo IV), con migración celular (TEM) o con angiogénesis (VEGF, MVD)¹⁵¹. Existen otros biomarcadores que también se han relacionado con las metástasis ganglionares, como la Caspasa 3¹⁵². En tumores de estirpe escamosa, se ha demostrado que FAK y LLT1 son factores de riesgo de metástasis ganglionares en carcinomas escamosos cutáneos^{153,154}. En CECC, la amplificación de la región 11q13 se ha relacionado con la presencia de metástasis ganglionares y peor pronóstico en CEH¹⁵⁵. También la expresión de E-cadherina y CD44v6 se relacionaba con metástasis ganglionares y peor pronóstico en CEL¹⁵⁶. Además, la

expresión conjunta de FAK y E-Cadherina sería predictor independiente de metástasis ganglionares en CEL¹⁵⁷.

Entre los factores de pluripotencialidad estudiados en CECC, *Michifuri y cols.*¹⁵⁸ asociaron por primera vez la expresión de ALDH1 con metástasis ganglionares en CECO. En su estudio analizaron también la expresión de SOX2, definiendo un patrón de tinción periférica y un patrón difuso. Este último patrón de expresión de SOX2 también se relacionaba de forma significativa con la presencia de metástasis ganglionares. Además, encontraron expresión de ALDH1 en las metástasis ganglionares con mayor frecuencia que en los tumores primarios. Posteriormente, *Huang y cols.*¹⁵⁹ analizaron la expresión de ALDH1, CD44, OCT4 y SOX2 en 66 carcinomas escamosos de lengua, sin encontrar relación de la expresión de estos factores con la presencia de metástasis ganglionares. *Mannelli y cols.*¹⁶⁰ estudiaron el papel de CD44 en la TEM y las metástasis ganglionares. También encontraron relación entre la expresión de CD133 y las metástasis ganglionares, aunque analizaron un pequeño número de pacientes (29 pacientes de los cuales expresaban CD133 sólo 3, que presentaban metástasis ganglionares). Ante el bajo número de tumores que presentan expresión de CD133, *Yu y Cirillo*¹⁶¹ plantean que sólo esté presente en determinadas metástasis ganglionares.

*Habu y cols.*⁹⁴ demostraron que el papel de OCT3/4 y/o NANOG en el tumor primario era un predictor de alto riesgo de metástasis ganglionares. En el meta-análisis de *Zhao*¹³³, la expresión de NANOG se relacionaba con las metástasis ganglionares (OR = 2,59; IC 95% 1,50 – 4,47, $P = 0,001$), así como con peor diferenciación histológica y estadios TNM más avanzados.

SOX2 participa en la pluripotencialidad de las células tumorales, y su expresión se ha asociado con la de CD44 y ALDH1, los cuales se han correlacionado con la presencia de metástasis en carcinomas escamosos de cavidad oral¹²⁰. *Qiao y cols.*¹²¹ estudiaron la expresión de OCT4 y SOX2 en 116 pacientes con CECO. Encontraron co-expresión de ambos factores en los tumores primarios en mayor proporción (33%) que la ausencia/baja expresión (9%). En los 46 casos con metástasis ganglionares, SOX2 se expresaba en todos los tumores primarios (en solitario o junto con OCT4). Sin embargo, en las metástasis ganglionares el patrón de expresión cambiaba: en tumores con patrón de co-expresión OCT4-SOX2 las metástasis ganglionares no mostraban expresión de estos factores.

En nuestra serie, la expresión de NANOG es más frecuente en los tumores con metástasis ganglionares (N+), mientras que no se observa una relación entre la expresión de SOX2 y la presencia de afectación ganglionar. Como vimos, la expresión de NANOG se asocia a mejor supervivencia en el conjunto de los pacientes incluidos. Pero al analizar el impacto de la expresión de NANOG en el grupo de pacientes sin metástasis ganglionares (N0) y en el grupo de pacientes con ellas (N+), se observa un efecto diferencial. Es en el grupo de pacientes N+ aquel en el que la expresión de NANOG se relaciona con mejor pronóstico, mientras que en los pacientes N0 las diferencias en base a la expresión de NANOG no son estadísticamente significativas, aunque el grupo con expresión positiva también tiene mejores tasas de supervivencia. Por el contrario, este papel diferencial no lo observamos con la expresión de SOX2. Con el análisis computacional de la expresión del ARNm de NANOG en 424 pacientes con CECC a partir de los datos del TCGA, encontramos que la expresión elevada se relacionaba con peor pronóstico en los pacientes N0. Sin embargo, en los pacientes N+ la expresión elevada de NANOG se correlacionaba de forma significativa con mejor supervivencia global, validando los resultados de nuestro trabajo. En esta cohorte, se observan unos resultados análogos en base a la expresión de SOX2, con diferencias significativas entre los pacientes N0 y los pacientes N+. Además, en esta cohorte la relación entre NANOG o SOX2 y mejor supervivencia es más robusta a medida que aumenta el estadio N, lo que refuerza el hallazgo realizado en nuestro trabajo.

5.2.3 Relación de la expresión de factores de pluripotencialidad con la localización del tumor

Se han publicado múltiples trabajos sobre las células madre tumorales y la expresión de factores de pluripotencialidad en CECC, pero un gran número de ellos estudian únicamente tumores de cavidad oral. En nuestro trabajo incluimos carcinomas escamosos de orofaringe, hipofaringe y laringe. En ninguna de las localizaciones encontramos expresión de OCT4. La expresión de NANOG se encontraba de forma más frecuente en los tumores de hipofaringe y la de SOX2 en los de laringe. Por otro lado, el impacto de la expresión de NANOG y la co-expresión NANOG-SOX2 difieren entre los carcinomas de faringe y los de laringe.

5.2.3.1 Orofaringe e hipofaringe

Diversos trabajos han estudiado las alteraciones moleculares que presentan los carcinomas escamosos de orofaringe e hipofaringe. En los tumores de orofaringe ha adquirido gran

importancia su relación con el VPH, dado el diferente comportamiento biológico que muestran los tumores relacionados con este virus. En algunos países como Estados Unidos, las tasas de CEO relacionados con el VPH superan el 70%⁶³, mientras que en regiones como el norte de España no alcanzan el 10%⁶⁸. Por otra parte, se ha demostrado integración del VPH en tasas marcadamente inferiores en los CEH, pero algunas series publicadas lo sitúan hasta en un 29% de estos tumores¹⁵⁵. La integración del VPH en estos tumores se asocia con cambios en la expresión de proteínas del ciclo celular como p16, EGFR o survivina¹¹¹. La sobreexpresión de EGFR se estableció como un biomarcador pronóstico independiente que se correlaciona con peor pronóstico y estadio tumoral avanzado^{162,163}. En CEO también se ha observado sobreexpresión de ligandos de EGFR, asociándose con peor pronóstico¹⁶⁴. Sin embargo, los tumores VPH+/p16+ tienen una expresión descendida de EGFR, presentando mejores SLE y SG¹⁶⁵. Además, los CEO VPH negativos muestran niveles elevados de Ciclina D1 (CCND1), lo que se asocia con peor pronóstico^{166,167}. Por su parte, en los CEH se encuentra con frecuencia amplificación de la región 11q13 y pérdida de heterocigosidad del locus de *p53*, así como otras alteraciones menos frecuentes como la amplificación de los oncogenes *MYC* y *ERBB1* o la pérdida de heterocigosidad de *NAT2*¹⁵⁵. La amplificación de genes como *MYC*, *ERBB* o los del amplicon de 11q13 (*CCND1*, *FGF3*, *FGF4* y *EMSI*) se han relacionado con localización de CECC en hipofaringe¹⁶⁸⁻¹⁷⁰. Dada la clara influencia en el pronóstico del VPH y la baja frecuencia en los tumores de nuestra serie, fueron descartados aquellos en los que se demostró la integración del ADN del virus, para evitar posibles sesgos en el análisis de la influencia de los factores de pluripotencialidad en estos tumores.

En lo relativo a factores de pluripotencialidad, la expresión de CD44 en carcinomas escamosos de cavidad oral y de orofaringe se ha relacionado con peor pronóstico. *Kokko y cols.*¹⁷¹ analizaron el papel de las CSC en CECC realizando un estudio de la expresión de CD44 por IHQ, incluyendo carcinomas de cavidad oral, orofaringe, hipofaringe y laringe. En base a sus resultados, la expresión intensa de CD44 se relacionaba con peor supervivencia. Al realizar el análisis por localización del tumor, agruparon 37 tumores de oro e hipofaringe, en los cuales la expresión intensa de CD44 se relacionaba de forma significativa con menor supervivencia. *De Moraes y cols.*¹⁷² estudiaron la expresión de varios marcadores de células madre tumorales mediante IHQ en carcinomas escamosos de cavidad oral y orofaringe (ALDH1, CD24, CD44, CD133 y CD29). La expresión negativa de ALDH1 se asociaba con los tumores que asentaban en cavidad oral, pero no encontraron

otras relaciones significativas entre la expresión del resto de factores y la localización del tumor. La expresión de CD44 se asociaba con peor supervivencia, pero sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas.

Los CEH son los tumores de peor pronóstico en cuanto a las localizaciones estudiadas en este trabajo. A pesar de su proximidad anatómica con la laringe, los tumores que se originan en esta área presentan un comportamiento mucho más agresivo. *Ge y cols.*¹¹⁸ estudiaron la relación entre la expresión de OCT4 y SOX2, las características clínico-patológicas y el pronóstico de 85 pacientes con CEH, analizando dicha expresión mediante IHQ. Según sus resultados, OCT4 era un factor predictivo de mejor supervivencia global y se relacionaba con el control loco-regional de la enfermedad. SOX2 no se correlacionaba de forma independiente con la supervivencia global, la supervivencia libre de enfermedad ni el control loco-regional. Sin embargo, al analizar la expresión conjunta de OCT4 y SOX2, los autores encontraron que los pacientes dobles positivos tenían mejor pronóstico. Nuestros resultados también muestran un papel limitado de SOX2 como factor predictivo independiente en la evolución de los pacientes, pero su análisis conjunto, en nuestro caso con NANOG, sí constituye un factor pronóstico de relevancia clínica significativa en tumores de oro e hipofaringe. *González-Márquez y cols.*¹⁰³ también encontraron mayores tasas de supervivencia global y libre de enfermedad en los pacientes con CEH que expresaban SOX2, pero la diferencia con aquellos en que la expresión era negativa no era significativa.

5.2.3.2 Laringe

Los marcadores de células madre tumorales más estudiados en CEL han sido la expresión de CD44 y de CD133, y la actividad de ALDH¹⁷³. Sin embargo, la influencia de estos marcadores en la progresión del CEL aún plantea diversas incógnitas.

La expresión intensa de CD44 se ha relacionado con peor pronóstico¹⁷¹. El grupo de *Suer*¹⁷⁴ estudió la presencia de células madre tumorales en piezas de resección de laringectomía, utilizando como marcador CD133. En esas células analizaron la expresión de diferentes factores de pluripotencialidad por RT-PCR cuantitativa, encontrando dicha expresión elevada para SOX2, OCT y KLF4, así como de ABCG2 y CXCR4, lo que relacionan con quimiorresistencia en este tipo tumoral.

*Wei y cols.*¹⁷⁵ estudiaron la capacidad de CSC de carcinoma de laringe humano de formar clones *in vitro*, su capacidad de invasión y la resistencia a tratamientos, seleccionando dichas

células mediante citometría de flujo utilizando como marcador CD133. Estas células presentaban resistencia a paclitaxel e índices bajos de reducción de la proliferación en respuesta a la radioterapia. Además, presentaban capacidades de migración e invasión significativamente mayores respecto a las células que no expresaban CD133. Estas células también presentaban potenciadas sus propiedades antiapoptóticas y de auto-renovación, mediante la activación de las vías Hedgehog, Wnt y Bmi-I.

*González-Márquez y cols.*¹⁰³ estudiaron el papel de SOX2 en 67 CEL, sin encontrar diferencias significativas en supervivencia global y libre de enfermedad entre los que expresaban SOX2 y los que presentaban expresión negativa.

En nuestro trabajo, el comportamiento de los CEL difiere de forma relevante respecto al de los carcinomas faríngeos. Mientras que en los tumores de faringe incluidos la expresión de NANOG y SOX2 se relaciona con mejor pronóstico de los pacientes, dicha tendencia no se observa en los tumores de laringe. Estos resultados están en consonancia con trabajos previos sobre biomarcadores en CECC. *Hermida-Prado y cols.*¹⁷⁶ analizaron el impacto de la expresión de SRC, un proto-oncogén implicado en diferentes vías tumorigénicas, en el pronóstico de pacientes con CECC. Sus resultados muestran una diferencia clara en el impacto clínico de la expresión de la forma activa de SRC en la supervivencia según la localización del tumor. La expresión de la forma activa de SRC se relaciona de forma significativa con menores tasas de supervivencia específica de enfermedad en los tumores laríngeos, mientras que en los faríngeos no muestra esa capacidad predictiva. En el mismo sentido, sus resultados también muestran que la expresión de la forma fosforilada, p-SRC (Tyr419), y dos de sus sustratos, FAK y ASAP1, se relacionan de forma específica con peor pronóstico en tumores de laringe. *Rodrigo y cols.*¹⁷⁷ analizaron la amplificación de los genes de la cortactina (*CTTN*) y de la ciclina D1 (*CCND1*), ambos situados en la región 11q13. La amplificación de *CTTN* se encontraba con más frecuencia en tumores faríngeos, que tienen en principio un peor pronóstico. Sin embargo, la amplificación de *CTTN* tenía un mayor impacto en el pronóstico y supervivencia de los pacientes con tumores laríngeos. Posteriormente estudiaron la amplificación de estos genes junto con el de la Anoctamina-1 (*ANO1*), también localizado en 11q13, y su relación con la infección del VPH. La amplificación de estos genes estaba presente de forma significativa en los tumores no relacionados con el VPH, asociándose con peor pronóstico. En concreto, la expresión proteica de ANO1 se relaciona con mejor SEE en CEO en comparación con tumores de

hipofaringe y laringe¹²³. En el mismo sentido, los trabajos de *Rodrigo y cols.*^{156,178} mostraban que la expresión disminuida de las moléculas de membrana E-cadherina y CD44v6 se correlacionaba con metástasis ganglionares en tumores de laringe, pero no en los de faringe. La expresión disminuida de E-cadherina, CD44v6 y CD44s en tumores de laringe se relacionaba con peor pronóstico, mientras que los resultados no mostraban esta tendencia en los de faringe. Todos estos trabajos confirman que es un hecho frecuente que diversas alteraciones moleculares tengan diferentes implicaciones pronósticas según la localización tumoral, lo cual obliga a tener en cuenta esta circunstancia cuando se hacen estudios sobre posibles biomarcadores pronósticos.

6 CONCLUSIONES

En base a los resultados previamente presentados en este trabajo, podemos establecer las siguientes conclusiones:

1. NANOG y SOX2 se expresan en las etapas iniciales de la carcinogénesis laríngea teniendo un papel relevante en la transformación maligna de lesiones precursoras. Dicha expresión es específica de las lesiones premalignas, ya que no está presente en el epitelio normal adyacente.
2. NANOG y SOX2 tienen un papel potencial como marcadores del riesgo de progresión de las lesiones premalignas de laringe a carcinomas invasivos.
3. NANOG y SOX2 se expresan con frecuencia en carcinomas escamosos de cabeza y cuello. NANOG se expresa con más frecuencia en los carcinomas escamosos de hipofaringe y SOX2 en los de laringe.
4. NANOG se expresa con mayor frecuencia en pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello que presentan metástasis ganglionares.
5. Los casos con expresión de NANOG tienen una menor probabilidad de recidiva tumoral y mayor supervivencia, pero en el análisis estratificado se observa que esta asociación sólo ocurre en los pacientes con metástasis ganglionares y en los que tienen localización faríngea (orofaringe-hipofaringe).
6. La co-expresión de NANOG y SOX2 en carcinomas escamosos de cabeza y cuello tiene mayor capacidad pronóstica de la supervivencia de los pacientes que ambos marcadores aisladamente, siendo también esta asociación con mejor pronóstico específica para los tumores de localización faríngea (orofaringe-hipofaringe).

7 BIBLIOGRAFÍA

1. El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, editores. WHO classification of head and neck tumours. 4th edition. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017. 347 p. (World Health Organization classification of tumours).
2. Isenberg JS, Crozier DL, Dailey SH. Institutional and comprehensive review of laryngeal leukoplakia. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* enero de 2008;117(1):74-9.
3. Gale N, Zidar N, Poljak M, Cardesa A. Current views and perspectives on classification of squamous intraepithelial lesions of the head and neck. *Head Neck Pathol.* marzo de 2014;8(1):16-23.
4. Junker K. Pathology of tracheal tumors. *Thorac Surg Clin.* febrero de 2014;24(1):7-11.
5. Tanaka S, Morita Y, Fujita T, Yokozaki H, Obata D, Fujiwara S, et al. Clinicopathological characteristics of abnormal micro-lesions at the oro-hypopharynx detected by a magnifying narrow band imaging system. *Dig Endosc.* marzo de 2012;24(2):100-9.
6. Sadri M, McMahon J, Parker A. Laryngeal dysplasia: aetiology and molecular biology. *J Laryngol Otol.* marzo de 2006;120(3):170-7.
7. Sereg-Bahar M, Jerin A, Hocevar-Boltezar I. Higher levels of total pepsin and bile acids in the saliva as a possible risk factor for early laryngeal cancer. *Radiol Oncol.* marzo de 2015;49(1):59-64.
8. Qadeer MA, Colabianchi N, Strome M, Vaezi MF. Gastroesophageal reflux and laryngeal cancer: causation or association? A critical review. *Am J Otolaryngol.* abril de 2006;27(2):119-28.
9. Lewin JS, Gillenwater AM, Garrett JD, Bishop-Leone JK, Nguyen DD, Callender DL, et al. Characterization of laryngopharyngeal reflux in patients with premalignant or early carcinomas of the larynx. *Cancer.* 15 de febrero de 2003;97(4):1010-4.
10. Duray A, Descamps G, Arafa M, Decaestecker C, Remmelink M, Sirtaine N, et al. High incidence of high-risk HPV in benign and malignant lesions of the larynx. *Int J Oncol.* julio de 2011;39(1):51-9.

11. Gallo A, Degener AM, Pagliuca G, Pierangeli A, Bizzoni F, Greco A, et al. Detection of human papillomavirus and adenovirus in benign and malignant lesions of the larynx. *Otolaryngol Head Neck Surg.* agosto de 2009;141(2):276-81.
12. Mooren JJ, Gültekin SE, Straetmans JMJA, Haesevoets A, Peutz-Kootstra CJ, Huebbers CU, et al. P16(INK4A) immunostaining is a strong indicator for high-risk-HPV-associated oropharyngeal carcinomas and dysplasias, but is unreliable to predict low-risk-HPV-infection in head and neck papillomas and laryngeal dysplasias. *Int J Cancer.* 1 de mayo de 2014;134(9):2108-17.
13. Pagliuca G, Martellucci S, Degener AM, Pierangeli A, Greco A, Fusconi M, et al. Role of Human Papillomavirus in the Pathogenesis of Laryngeal Dysplasia. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014;150(6):1018-23.
14. Halec G, Holzinger D, Schmitt M, Flechtenmacher C, Dyckhoff G, Lloveras B, et al. Biological evidence for a causal role of HPV16 in a small fraction of laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 9 de julio de 2013;109(1):172-83.
15. Lewis JS, Ukpo OC, Ma X-J, Flanagan JJ, Luo Y, Thorstad WL, et al. Transcriptionally-active high-risk human papillomavirus is rare in oral cavity and laryngeal/hypopharyngeal squamous cell carcinomas--a tissue microarray study utilizing E6/E7 mRNA in situ hybridization. *Histopathology.* mayo de 2012;60(6):982-91.
16. Boy SC. Leukoplakia and erythroplakia of the oral mucosa--a brief overview. *SADJ.* noviembre de 2012;67(10):558-60.
17. Unger J, Lohscheller J, Reiter M, Eder K, Betz CS, Schuster M. A noninvasive procedure for early-stage discrimination of malignant and precancerous vocal fold lesions based on laryngeal dynamics analysis. *Cancer Res.* 1 de enero de 2015;75(1):31-9.
18. Ni X-G, Zhu J-Q, Zhang Q-Q, Zhang B-G, Wang G-Q. Diagnosis of vocal cord leukoplakia: The role of a novel narrow band imaging endoscopic classification. *Laryngoscope.* 2019;129(2):429-34.
19. Volgger V, Felicio A, Lohscheller J, Enghard AS, Al-Muzaini H, Betz CS, et al. Evaluation of the combined use of narrow band imaging and high-speed imaging to discriminate laryngeal lesions. *Lasers Surg Med.* 2017;49(6):609-18.

20. Burns JA. Optical coherence tomography: imaging the larynx. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* diciembre de 2012;20(6):477-81.
21. Volgger V, Conderman C, Betz CS. Confocal laser endomicroscopy in head and neck cancer: steps forward? *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* abril de 2013;21(2):164-70.
22. Englhard AS, Betz T, Volgger V, Lankenau E, Ledderose GJ, Stepp H, et al. Intraoperative assessment of laryngeal pathologies with optical coherence tomography integrated into a surgical microscope. *Lasers Surg Med.* 2017;49(5):490-7.
23. Fleskens S, Slootweg P. Grading systems in head and neck dysplasia: their prognostic value, weaknesses and utility. *Head Neck Oncol.* 11 de mayo de 2009;1:11.
24. Gale N, Blagus R, El-Mofty SK, Helliwell T, Prasad ML, Sandison A, et al. Evaluation of a new grading system for laryngeal squamous intraepithelial lesions--a proposed unified classification. *Histopathology.* octubre de 2014;65(4):456-64.
25. Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol.* noviembre de 2006;42(10):987-93.
26. Weller MD, Nankivell PC, McConkey C, Paleri V, Mehanna HM. The risk and interval to malignancy of patients with laryngeal dysplasia; a systematic review of case series and meta-analysis. *Clin Otolaryngol.* octubre de 2010;35(5):364-72.
27. Fleskens SAJHM, Bergshoeff VE, Voogd AC, van Velthuysen M-LF, Bot FJ, Speel E-JM, et al. Interobserver variability of laryngeal mucosal premalignant lesions: a histopathological evaluation. *Mod Pathol.* julio de 2011;24(7):892-8.
28. McLaren KM, Burnett RA, Goodlad JR, Howatson SR, Lang S, Lee FD, et al. Consistency of histopathological reporting of laryngeal dysplasia. The Scottish Pathology Consistency Group. *Histopathology.* noviembre de 2000;37(5):460-3.
29. Sarioglu S, Cakalagaoglu F, Elagoz S, Han U, Ersoy U, Etit D, et al. Inter-observer agreement in laryngeal pre-neoplastic lesions. *Head Neck Pathol.* diciembre de 2010;4(4):276-80.
30. Mehanna H, Paleri V, Robson A, Wight R, Helliwell T. Consensus statement by

otorhinolaryngologists and pathologists on the diagnosis and management of laryngeal dysplasia. *Clin Otolaryngol.* junio de 2010;35(3):170-6.

31. Sadri M, McMahon J, Parker A. Management of laryngeal dysplasia: a review. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* septiembre de 2006;263(9):843-52.

32. Roxburgh CSD, McMillan DC. Role of systemic inflammatory response in predicting survival in patients with primary operable cancer. *Future Oncol.* enero de 2010;6(1):149-63.

33. Kum RO, Ozcan M, Baklaci D, Kum NY, Yilmaz YF, Gungor V, et al. Elevated neutrophil-to-lymphocyte ratio in squamous cell carcinoma of larynx compared to benign and precancerous laryngeal lesions. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(17):7351-5.

34. Sanz-Ortega J, Valor C, Saez MC, Ortega L, Sierra E, Poch J, et al. 3p21, 5q21, 9p21 and 17p13 allelic deletions accumulate in the dysplastic spectrum of laryngeal carcinogenesis and precede malignant transformation. *Histol Histopathol.* 2003;18(4):1053-7.

35. Yoo WJ, Cho SH, Lee YS, Park GS, Kim MS, Kim BK, et al. Loss of heterozygosity on chromosomes 3p,8p,9p and 17p in the progression of squamous cell carcinoma of the larynx. *J Korean Med Sci.* junio de 2004;19(3):345-51.

36. Papadimitrakopoulou V, Izzo JG, Liu DD, Myers J, Ceron TL, Lewin J, et al. Cyclin D1 and cancer development in laryngeal premalignancy patients. *Cancer Prev Res (Phila).* enero de 2009;2(1):14-21.

37. Liu Y, Dong X, Tian C, Liu H. Human telomerase RNA component (hTERC) gene amplification detected by FISH in precancerous lesions and carcinoma of the larynx. *Diagn Pathol.* 30 de marzo de 2012;7:34.

38. Luzar B, Poljak M, Gale N. Telomerase catalytic subunit in laryngeal carcinogenesis-an immunohistochemical study. *Mod Pathol.* marzo de 2005;18(3):406-11.

39. Luzar B, Poljak M, Marin IJ, Gale N. Telomerase reactivation is an early event in laryngeal carcinogenesis. *Mod Pathol.* septiembre de 2003;16(9):841-8.

40. Rodrigo JP, García-Pedrero JM, Suárez C, Takes RP, Thompson LDR, Slootweg PJ,

et al. Biomarkers predicting malignant progression of laryngeal epithelial precursor lesions: a systematic review. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* abril de 2012;269(4):1073-83.

41. Villaronga MÁ, Hermida-Prado F, Granda-Díaz R, Menéndez ST, Álvarez-Teijeiro S, Quer M, et al. Immunohistochemical Expression of Cortactin and Focal Adhesion Kinase Predicts Recurrence Risk and Laryngeal Cancer Risk Beyond Histologic Grading. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2018;27(7):805-13.

42. Wei L, Mao M, Liu H. Droplet digital PCR and qRT-PCR to detect circulating miR-21 in laryngeal squamous cell carcinoma and pre-malignant laryngeal lesions. *Acta Otolaryngol.* septiembre de 2016;136(9):923-32.

43. Karatayli-Ozgursoy S, Pacheco-Lopez P, Hillel AT, Best SR, Bishop JA, Akst LM. Laryngeal dysplasia, demographics, and treatment: a single-institution, 20-year review. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* abril de 2015;141(4):313-8.

44. Cosway B, Paleri V. Laryngeal dysplasia: an evidence-based flowchart to guide management and follow up. *J Laryngol Otol.* junio de 2015;129(6):598-9.

45. Chen M, Chen J, Cheng L, Wu H. Recurrence of vocal fold leukoplakia after carbon dioxide laser therapy. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* septiembre de 2017;274(9):3429-35.

46. Zhang Y, Liang G, Sun N, Guan L, Meng Y, Zhao X, et al. Comparison of CO2 laser and conventional laryngomicrosurgery treatments of polyp and leukoplakia of the vocal fold. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(10):18265-74.

47. Xie X, Young J, Kost K, McGregor M. KTP 532 nm laser for laryngeal lesions. a systematic review. *J Voice.* marzo de 2013;27(2):245-9.

48. Zeitels SM, Akst LM, Burns JA, Hillman RE, Broadhurst MS, Anderson RR. Office-based 532-nm pulsed KTP laser treatment of glottal papillomatosis and dysplasia. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* septiembre de 2006;115(9):679-85.

49. Lippert D, Hoffman MR, Dang P, McCulloch TM, Hartig GK, Dailey SH. In-office biopsy of upper airway lesions: safety, tolerance, and effect on time to treatment. *Laryngoscope.* abril de 2015;125(4):919-23.

50. Wellenstein DJ, Schutte HW, Takes RP, Honings J, Marres HAM, Burns JA, et al.

Office-Based Procedures for the Diagnosis and Treatment of Laryngeal Pathology. *J Voice*. julio de 2018;32(4):502-13.

51. Cohen JT, Safadi A, Fliss DM, Gil Z, Horowitz G. Reliability of a transnasal flexible fiberoptic in-office laryngeal biopsy. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. abril de 2013;139(4):341-5.

52. Rosen CA, Amin MR, Sulica L, Simpson CB, Merati AL, Courey MS, et al. Advances in office-based diagnosis and treatment in laryngology. *Laryngoscope*. noviembre de 2009;119 Suppl 2:S185-212.

53. Ali SA, Smith JD, Hogikyan ND. The White Lesion, Hyperkeratosis, and Dysplasia. *Otolaryngologic Clinics of North America*. agosto de 2019;52(4):703-12.

54. Kishimoto Y, Suzuki R, Kawai Y, Hiwatashi N, Kitamura M, Tateya I, et al. Photocoagulation therapy for laryngeal dysplasia using angiolytic lasers. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. mayo de 2016;273(5):1221-5.

55. Rigual NR, Thankappan K, Cooper M, Sullivan MA, Dougherty T, Popat SR, et al. Photodynamic therapy for head and neck dysplasia and cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. agosto de 2009;135(8):784-8.

56. Mesolella M, Iengo M, Testa D, Ricciardiello F, Iorio B. Chemoprevention using folic acid for dysplastic lesions of the larynx. *Mol Clin Oncol*. noviembre de 2017;7(5):843-6.

57. Leirens J, Vidts G, Schmelzer B, della Faille D, Katz S, Van Cauwenberge P. Premalignant lesions of the vocal cords. A retrospective study of 62 cases treated with CO2 laser. *Acta Otolaryngol*. noviembre de 1997;117(6):903-8.

58. Dispenza F, De Stefano A, Marchese D, Martines F, Dispenza C. Management of laryngeal precancerous lesions. *Auris Nasus Larynx*. junio de 2012;39(3):280-3.

59. Panwar A, Lindau R, Wieland A. Management of premalignant lesions of the larynx. *Expert Rev Anticancer Ther*. septiembre de 2013;13(9):1045-51.

60. Mannelli G, Cecconi L, Gallo O. Laryngeal preneoplastic lesions and cancer: challenging diagnosis. Qualitative literature review and meta-analysis. *Critical Reviews in*

Oncology/Hematology. octubre de 2016;106:64-90.

61. Ahn A, Wang L, Slaughter JC, Nguyen AM, Ossoff RH, Francis DO. Serial full-thickness excision of dysplastic vocal fold leukoplakia: Diagnostic or therapeutic? *Laryngoscope*. abril de 2016;126(4):923-7.
62. Vigneswaran N, Williams MD. Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. mayo de 2014;26(2):123-41.
63. Chow LQM. Head and Neck Cancer. *N Engl J Med*. 02 de 2020;382(1):60-72.
64. World Health Organization W. World Health Organization. Global Health Observatory. Ginebra: World Health Organization; 2018. [Internet]. [citado 2 de febrero de 2020]. Disponible en: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2018&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=5&group_cancer=1&include_nmssc=1&include_nmssc_other=1&projection=natural-earth&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&rotate=%255B10%252C0%255D
65. Mifsud M, Eskander A, Irish J, Gullane P, Gilbert R, Brown D, et al. Evolving trends in head and neck cancer epidemiology: Ontario, Canada 1993-2010. *Head Neck*. 2017;39(9):1770-8.
66. Louie KS, Mehanna H, Sasieni P. Trends in head and neck cancers in England from 1995 to 2011 and projections up to 2025. *Oral Oncol*. abril de 2015;51(4):341-8.
67. Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, Curado MP, Ferlay J, Franceschi S, et al. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol*. 20 de diciembre de 2013;31(36):4550-9.
68. Rodrigo JP, Heideman DAM, García-Pedrero JM, Fresno MF, Brakenhoff RH, Díaz Molina JP, et al. Time trends in the prevalence of HPV in oropharyngeal squamous cell carcinomas in northern Spain (1990-2009): HPV Incidence in Oropharynx Cancer. *Int J Cancer*. 15 de enero de 2014;134(2):487-92.
69. Rodrigo JP, Hermsen MA, Fresno MF, Brakenhoff RH, García-Velasco F, Snijders

- PJF, et al. Prevalence of human papillomavirus in laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas in northern Spain. *Cancer Epidemiology*. febrero de 2015;39(1):37-41.
70. López Álvarez F, Rodrigo JP. Cancer of the Larynx: Diagnosis and Treatment. En: Reference Module in Biomedical Sciences [Internet]. Elsevier; 2018 [citado 20 de enero de 2020]. p. B9780128012383654000. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128012383653187>
71. Rovirosa Casino A, Guedea Edo F, Vargas Rugeles M. Tratamiento con radioterapia de los tumores de hipofaringe y laringe. En: Tratado de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello. 2.^a ed. Madrid: Panamericana; 2009. p. 3529-38.
72. Quer M, López Vila M. Características clínicas de los tumores de la laringe. En: Tratado de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello. 2.^a ed. Madrid: Panamericana; 2009. p. 3515-27.
73. Anniko M. Características clínicas de los tumores rinofaríngeos. En: Tratado de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello. 2.^a. Madrid: Panamericana; 2009. p. 3299-305.
74. Lefebvre JL. Surgery for Laryngopharyngeal SCC in the Era of Organ Preservation. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. diciembre de 2009;2(4):159-63.
75. Rades D, Schroeder U, Bajrovic A, Schild SE. Radiochemotherapy versus surgery plus radio(chemo)therapy for stage T3/T4 larynx and hypopharynx cancer - results of a matched-pair analysis. *Eur J Cancer*. diciembre de 2011;47(18):2729-34.
76. Rodrigo JP, López F, Llorente JL, Álvarez-Marcos C, Suárez C. [Results of total laryngectomy as treatment for locally advanced laryngeal cancer in the organ-preservation era]. *Acta Otorrinolaringol Esp*. junio de 2015;66(3):132-8.
77. García-Cabo Herrero P, Fernández-Vañes L, López Álvarez F, Álvarez Marcos C, Llorente JL, Rodrigo JP. Results of total laryngectomy as treatment for locally advanced hypopharyngeal cancer. *Acta Otorrinolaringol Esp*. diciembre de 2017;68(6):328-35.
78. Harris BN, Biron VL, Donald P, Farwell DG, Luu QC, Bewley AF, et al. Primary Surgery vs Chemoradiation Treatment of Advanced-Stage Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. julio de 2015;141(7):636-40.

79. American Society of Clinical Oncology, Pfister DG, Laurie SA, Weinstein GS, Mendenhall WM, Adelstein DJ, et al. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline for the use of larynx-preservation strategies in the treatment of laryngeal cancer. *J Clin Oncol*. 1 de agosto de 2006;24(22):3693-704.
80. Coca-Pelaz A, Rodrigo JP, Suárez C. Clinicopathologic analysis and predictive factors for distant metastases in patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck*. junio de 2012;34(6):771-5.
81. Coca-Pelaz A, Rodrigo JP, Suárez C, Nixon IJ, Mäkitie A, Sanabria A, et al. The risk of second primary tumors in head and neck cancer: A systematic review. *Head Neck*. marzo de 2020;42(3):456-66.
82. Spector JG, Sessions DG, Haughey BH, Chao KS, Simpson J, El Mofty S, et al. Delayed regional metastases, distant metastases, and second primary malignancies in squamous cell carcinomas of the larynx and hypopharynx. *Laryngoscope*. junio de 2001;111(6):1079-87.
83. Merino OR, Lindberg RD, Fletcher GH. An analysis of distant metastases from squamous cell carcinoma of the upper respiratory and digestive tracts. *Cancer*. julio de 1977;40(1):145-51.
84. de Bree R, Senft A, Coca-Pelaz A, Kowalski L, Lopez F, Mendenhall W, et al. Detection of Distant Metastases in Head and Neck Cancer: Changing Landscape. *Adv Ther*. febrero de 2018;35(2):161-72.
85. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL, et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*. 1 de octubre de 2006;66(19):9339-44.
86. Reményi A, Lins K, Nissen LJ, Reinbold R, Schöler HR, Wilmanns M. Crystal structure of a POU/HMG/DNA ternary complex suggests differential assembly of Oct4 and Sox2 on two enhancers. *Genes Dev*. 15 de agosto de 2003;17(16):2048-59.
87. Hayashi Y, Caboni L, Das D, Yumoto F, Clayton T, Deller MC, et al. Structure-based discovery of NANOG variant with enhanced properties to promote self-renewal and reprogramming of pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 14 de abril de

2015;112(15):4666-71.

88. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 1 de enero de 2000;28(1):235-42.
89. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, et al. Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell.* septiembre de 2005;122(6):947-56.
90. Chan YS, Yang L, Ng H-H. Transcriptional regulatory networks in embryonic stem cells. *Prog Drug Res.* 2011;67:239-52.
91. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature.* 19 de julio de 2007;448(7151):313-7.
92. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* 21 de diciembre de 2007;318(5858):1917-20.
93. Fu T-Y, Hsieh I-C, Cheng J-T, Tsai M-H, Hou Y-Y, Lee J-H, et al. Association of OCT4, SOX2, and NANOG expression with oral squamous cell carcinoma progression. *J Oral Pathol Med.* febrero de 2016;45(2):89-95.
94. Habu N, Imanishi Y, Kameyama K, Shimoda M, Tokumaru Y, Sakamoto K, et al. Expression of Oct3/4 and Nanog in the head and neck squamous carcinoma cells and its clinical implications for delayed neck metastasis in stage I/II oral tongue squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* diciembre de 2015;15(1):730.
95. Li X, Wang J, Xu Z, Ahmad A, Li E, Wang Y, et al. Expression of Sox2 and Oct4 and Their Clinical Significance in Human Non-Small-Cell Lung Cancer. *IJMS.* 21 de junio de 2012;13(6):7663-75.
96. Kashyap V, Rezende NC, Scotland KB, Shaffer SM, Persson JL, Gudas LJ, et al. Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs. *Stem Cells Dev.* septiembre de 2009;18(7):1093-108.

97. Destro Rodrigues MFS, Sedassari BT, Esteves CM, de Andrade NP, Altemani A, de Sousa SCOM, et al. Embryonic stem cells markers Oct4 and Nanog correlate with perineural invasion in human salivary gland mucoepidermoid carcinoma. *J Oral Pathol Med.* febrero de 2017;46(2):112-20.
98. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell.* 30 de mayo de 2003;113(5):643-55.
99. Major AG, Pitty LP, Farah CS. Cancer Stem Cell Markers in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Stem Cells International.* 2013;2013:1-13.
100. Satpute PS, Hazarey V, Ahmed R, Yadav L. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma: a review. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(10):5579-87.
101. Abelev GI, Lazarevich NL. Control of differentiation in progression of epithelial tumors. *Adv Cancer Res.* 2006;95:61-113.
102. Schröck A, Bode M, Göke FJM, Bareiss PM, Schairer R, Wang H, et al. Expression and role of the embryonic protein SOX2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis.* 1 de julio de 2014;35(7):1636-42.
103. González-Márquez R, Llorente JL, Rodrigo JP, García-Pedrero JM, Álvarez-Marcos C, Suárez C, et al. SOX2 expression in hypopharyngeal, laryngeal, and sinonasal squamous cell carcinoma. *Human Pathology.* abril de 2014;45(4):851-7.
104. Dai W, Tan X, Sun C, Zhou Q. High expression of SOX2 is associated with poor prognosis in patients with salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Int J Mol Sci.* 13 de mayo de 2014;15(5):8393-406.
105. Tang X, Shen X, Li L, Zhang Y, Chen G. SOX2 overexpression correlates with poor prognosis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx.* octubre de 2013;40(5):481-6.
106. Du L, Yang Y, Xiao X, Wang C, Zhang X, Wang L, et al. Sox2 nuclear expression is closely associated with poor prognosis in patients with histologically node-negative oral tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* agosto de 2011;47(8):709-13.

107. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*. enero de 2015;517(7536):576-82.
108. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov*. mayo de 2012;2(5):401-4.
109. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*. 2 de abril de 2013;6(269):p11.
110. Lee H-J, Kang Y-H, Lee J-S, Byun J-H, Kim U-K, Jang S-J, et al. Positive expression of NANOG, mutant p53, and CD44 is directly associated with clinicopathological features and poor prognosis of oral squamous cell carcinoma. *BMC Oral Health*. 1 de diciembre de 2015;15(1):153.
111. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res*. 1 de junio de 1996;56(11):2488-92.
112. Haddad RI, Shin DM. Recent advances in head and neck cancer. *N Engl J Med*. 11 de septiembre de 2008;359(11):1143-54.
113. Piazzolla D, Palla AR, Pantoja C, Cañamero M, de Castro IP, Ortega S, et al. Lineage-restricted function of the pluripotency factor NANOG in stratified epithelia. *Nat Commun*. septiembre de 2014;5(1):4226.
114. Xie X, Piao L, Cavey GS, Old M, Teknos TN, Mapp AK, et al. Phosphorylation of Nanog is essential to regulate Bmi1 and promote tumorigenesis. *Oncogene*. 17 de abril de 2014;33(16):2040-52.
115. Palla AR, Piazzolla D, Alcazar N, Cañamero M, Graña O, Gómez-López G, et al. The pluripotency factor NANOG promotes the formation of squamous cell carcinomas. *Sci Rep*. septiembre de 2015;5(1):10205.
116. Abel EL, Angel JM, Kiguchi K, DiGiovanni J. Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: fundamentals and applications. *Nat Protoc*. 2009;4(9):1350-62.

117. Kim J, Liu Y, Qiu M, Xu Y. Pluripotency factor Nanog is tumorigenic by deregulating DNA damage response in somatic cells. *Oncogene*. 10 de marzo de 2016;35(10):1334-40.
118. Ge N, Lin H-X, Xiao X-S, Guo L, Xu H-M, Wang X, et al. Prognostic significance of Oct4 and Sox2 expression in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *J Transl Med*. 12 de octubre de 2010;8:94.
119. Chung JH, Jung HR, Jung AR, Lee YC, Kong M, Lee J-S, et al. SOX2 activation predicts prognosis in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Sci Rep*. diciembre de 2018;8(1):1677.
120. Kokalj Vokač N, Čizmarević B, Zagorac A, Zagradišnik B, Lanišnik B. An evaluation of SOX2 and hTERT gene amplifications as screening markers in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Mol Cytogenet*. 10 de enero de 2014;7:5.
121. Qiao B, He B, Cai J, Yang W. The expression profile of Oct4 and Sox2 in the carcinogenesis of oral mucosa. :10.
122. 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*. 2 de marzo de 2010;9:48.
123. Rodrigo JP, Menéndez ST, Hermida-Prado F, Álvarez-Teijeiro S, Villaronga MÁ, Alonso-Durán L, et al. Clinical significance of Anoctamin-1 gene at 11q13 in the development and progression of head and neck squamous cell carcinomas. *Sci Rep*. 26 de octubre de 2015;5:15698.
124. de Vicente JC, Rodríguez-Santamarta T, Rodrigo JP, Allonca E, Vallina A, Singhania A, et al. The Emerging Role of NANOG as an Early Cancer Risk Biomarker in Patients with Oral Potentially Malignant Disorders. *JCM*. 3 de septiembre de 2019;8(9):1376.
125. de Vicente JC, Donate-Pérez Del Molino P, Rodrigo JP, Allonca E, Hermida-Prado F, Granda-Díaz R, et al. SOX2 Expression Is an Independent Predictor of Oral Cancer Progression. *J Clin Med*. 21 de octubre de 2019;8(10).
126. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified

squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer*. septiembre de 1953;6(5):963-8.

127. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 16 de enero de 2007;104(3):973-8.

128. Chen C, Wei Y, Hummel M, Hoffmann TK, Gross M, Kaufmann AM, et al. Evidence for epithelial-mesenchymal transition in cancer stem cells of head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS ONE*. 27 de enero de 2011;6(1):e16466.

129. Chen Y-C, Chang C-J, Hsu H-S, Chen Y-W, Tai L-K, Tseng L-M, et al. Inhibition of tumorigenicity and enhancement of radiochemosensitivity in head and neck squamous cell cancer-derived ALDH1-positive cells by knockdown of Bmi-1. *Oral Oncol*. marzo de 2010;46(3):158-65.

130. Chiou S-H, Yu C-C, Huang C-Y, Lin S-C, Liu C-J, Tsai T-H, et al. Positive Correlations of Oct-4 and Nanog in Oral Cancer Stem-Like Cells and High-Grade Oral Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 1 de julio de 2008;14(13):4085-95.

131. Luo W, Li S, Peng B, Ye Y, Deng X, Yao K. Embryonic Stem Cells Markers SOX2, OCT4 and Nanog Expression and Their Correlations with Epithelial-Mesenchymal Transition in Nasopharyngeal Carcinoma. Aziz SA, editor. *PLoS ONE*. 12 de febrero de 2013;8(2):e56324.

132. Tsai L-L, Yu C-C, Chang Y-C, Yu C-H, Chou M-Y. Markedly increased Oct4 and Nanog expression correlates with cisplatin resistance in oral squamous cell carcinoma: Stemness markers and chemo-resistance. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. septiembre de 2011;40(8):621-8.

133. Zhao L, Liu J, Chen S, Fang C, Zhang X, Luo Z. Prognostic significance of NANOG expression in solid tumors: a meta-analysis. *OTT*. septiembre de 2018;Volume 11:5515-26.

134. Liu K, Lin B, Zhao M, Yang X, Chen M, Gao A, et al. The multiple roles for Sox2 in stem cell maintenance and tumorigenesis. *Cellular Signalling*. mayo de 2013;25(5):1264-71.

135. Chou M-Y, Hu F-W, Yu C-H, Yu C-C. Sox2 expression involvement in the

oncogenicity and radiochemoresistance of oral cancer stem cells. *Oral Oncology*. enero de 2015;51(1):31-9.

136. Züllig L, Roessle M, Weber C, Graf N, Haerle SK, Jochum W, et al. High sex determining region Y-box 2 expression is a negative predictor of occult lymph node metastasis in early squamous cell carcinomas of the oral cavity. *European Journal of Cancer*. 1 de mayo de 2013;49(8):1915-22.

137. Baumeister P, Hollmann A, Kitz J, Afthonidou A, Simon F, Shakhtour J, et al. High Expression of EpCAM and Sox2 is a Positive Prognosticator of Clinical Outcome for Head and Neck Carcinoma. *Sci Rep*. diciembre de 2018;8(1):14582.

138. Bochen F, Adisurya H, Wemmert S, Lerner C, Greiner M, Zimmermann R, et al. Effect of 3q oncogenes *SEC62* and *SOX2* on lymphatic metastasis and clinical outcome of head and neck squamous cell carcinomas. *Oncotarget* [Internet]. 17 de enero de 2017 [citado 18 de noviembre de 2019];8(3). Disponible en: <http://www.oncotarget.com/fulltext/13986>

139. Maehara R, Fujikura K, Takeuchi K, Akita M, Abe-Suzuki S, Karbanová J, et al. SOX2-silenced squamous cell carcinoma: a highly malignant form of esophageal cancer with SOX2 promoter hypermethylation. *Mod Pathol*. 2018;31(1):83-92.

140. Hussenet T, du Manoir S. SOX2 in squamous cell carcinoma: Amplifying a pleiotropic oncogene along carcinogenesis. *Cell Cycle*. 15 de abril de 2010;9(8):1480-6.

141. Zhang P, Zhang Y, Mao L, Zhang Z, Chen W. Side population in oral squamous cell carcinoma possesses tumor stem cell phenotypes. *Cancer Letters*. mayo de 2009;277(2):227-34.

142. Ma S-R, Wang W-M, Huang C-F, Zhang W-F, Sun Z-J. Anterior gradient protein 2 expression in high grade head and neck squamous cell carcinoma correlated with cancer stem cell and epithelial mesenchymal transition. *Oncotarget*. 20 de abril de 2015;6(11):8807-21.

143. Fan Z, Li M, Chen X, Wang J, Liang X, Wang H, et al. Prognostic Value of Cancer Stem Cell Markers in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: a Meta-analysis. *Scientific Reports*. 21 de febrero de 2017;7:43008.

144. Wang X, Dai J. Isoforms of *OCT4* Contribute to the Confusing Diversity in Stem

Cell Biology. Stem Cells. mayo de 2010;28(5):885-93.

145. de Jong MC, Pramana J, van der Wal JE, Lacko M, Peutz-Kootstra CJ, de Jong JM, et al. CD44 expression predicts local recurrence after radiotherapy in larynx cancer. Clin Cancer Res. 1 de noviembre de 2010;16(21):5329-38.

146. Linge A, Löck S, Gudziol V, Nowak A, Lohaus F, von Neubeck C, et al. Low Cancer Stem Cell Marker Expression and Low Hypoxia Identify Good Prognosis Subgroups in HPV(-) HNSCC after Postoperative Radiochemotherapy: A Multicenter Study of the DKTK-ROG. Clin Cancer Res. 01 de 2016;22(11):2639-49.

147. Mäkitie AA, Almangush A, Rodrigo JP, Ferlito A, Leivo I. Hallmarks of cancer: Tumor budding as a sign of invasion and metastasis in head and neck cancer. Head Neck. 2019;41(10):3712-8.

148. Luo W-R, Gao F, Li S-Y, Yao K-T. Tumour budding and the expression of cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1 in nasopharyngeal carcinoma. Histopathology. diciembre de 2012;61(6):1072-81.

149. Marangon Junior H, Leão PLR, Melo VVM, Caixeta ÂB, Souza PEA, de Aguiar MCF, et al. Cell proliferation is associated with intensity of tumor budding in oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. febrero de 2018;47(2):128-35.

150. Boxberg M, Götz C, Haidari S, Dorfner C, Jesinghaus M, Drecoll E, et al. Immunohistochemical expression of CD44 in oral squamous cell carcinoma in relation to histomorphological parameters and clinicopathological factors. Histopathology. octubre de 2018;73(4):559-72.

151. Rodrigo JP, Suárez C, Ferlito A, Devaney KO, Petruzzelli GJ, Rinaldo A. Potential molecular prognostic markers for lymph node metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. Acta Otolaryngol. enero de 2003;123(1):100-5.

152. Moreno-Galindo C, Hermsen M, García-Pedrero JM, Fresno MF, Suárez C, Rodrigo JP. p27 and BCL2 expression predicts response to chemotherapy in head and neck squamous cell carcinomas. Oral Oncol. febrero de 2014;50(2):128-34.

153. Munguía-Calzada P, Fernández-Vega I, Martínez-Cambor P, Díaz-Coto S, García-Pedrero JM, Vivanco B, et al. Correlation of focal adhesion kinase expression with nodal

metastasis in patients with head and neck cutaneous squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2019;41(5):1290-6.

154. Santos-Juanes J, Fernández-Vega I, Lorenzo-Herrero S, Sordo-Bahamonde C, Martínez-Cambor P, García-Pedrero JM, et al. Lectin-like transcript 1 (LLT1) expression is associated with nodal metastasis in patients with head and neck cutaneous squamous cell carcinoma. *Arch Dermatol Res*. julio de 2019;311(5):369-76.

155. Rodrigo JP, González MV, Lazo PS, Ramos S, Coto E, Alvarez I, et al. Genetic alterations in squamous cell carcinomas of the hypopharynx with correlations to clinicopathological features. *Oral Oncol*. junio de 2002;38(4):357-63.

156. Rodrigo JP, Dominguez F, Alvarez C, Herrero A, Suarez C. Expression of E-cadherin, CD44s, and CD44v6 in laryngeal and pharyngeal carcinomas. *Am J Otolaryngol*. diciembre de 2003;24(6):384-9.

157. Rodrigo JP, Dominguez F, Suárez 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*. febrero de 2007;133(2):145-50.

158. Michifuri Y, Hirohashi Y, Torigoe T, Miyazaki A, Kobayashi J, Sasaki T, et al. High expression of ALDH1 and SOX2 diffuse staining pattern of oral squamous cell carcinomas correlates to lymph node metastasis. *Pathol Int*. octubre de 2012;62(10):684-9.

159. Huang C-F, Xu X-R, Wu T-F, Sun Z-J, Zhang W-F. Correlation of ALDH1, CD44, OCT4 and SOX2 in tongue squamous cell carcinoma and their association with disease progression and prognosis. *J Oral Pathol Med*. agosto de 2014;43(7):492-8.

160. Mannelli G, Magnelli L, Deganello A, Busoni M, Meccariello G, Parrinello G, et al. Detection of putative stem cell markers, CD44/CD133, in primary and lymph node metastases in head and neck squamous cell carcinomas. A preliminary immunohistochemical and in vitro study. *Clin Otolaryngol*. agosto de 2015;40(4):312-20.

161. Yu SS, Cirillo N. The molecular markers of cancer stem cells in head and neck tumors. *J Cell Physiol*. enero de 2020;235(1):65-73.

162. Preuss SF, Weinell A, Molitor M, Semrau R, Stenner M, Drebber U, et al. Survivin and epidermal growth factor receptor expression in surgically treated oropharyngeal

squamous cell carcinoma. *Head Neck*. octubre de 2008;30(10):1318-24.

163. Reuter CWM, Morgan MA, Eckardt A. Targeting EGF-receptor-signalling in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer*. 12 de febrero de 2007;96(3):408-16.

164. Werkmeister R, Brandt B, Joos U. Clinical relevance of erbB-1 and -2 oncogenes in oral carcinomas. *Oral Oncol*. enero de 2000;36(1):100-5.

165. Reimers N, Kasper HU, Weissenborn SJ, Stützer H, Preuss SF, Hoffmann TK, et al. Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. *Int J Cancer*. 15 de abril de 2007;120(8):1731-8.

166. Hafkamp HC, Mooren JJ, Claessen SMH, Klingenberg B, Voogd AC, Bot FJ, et al. P21 Cip1/WAF1 expression is strongly associated with HPV-positive tonsillar carcinoma and a favorable prognosis. *Mod Pathol*. mayo de 2009;22(5):686-98.

167. Li Y, Nichols MA, Shay JW, Xiong Y. Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. *Cancer Res*. 1 de diciembre de 1994;54(23):6078-82.

168. Rodrigo JP, Suárez C, González MV, Lazo PS, Ramos S, Coto E, et al. Variability of genetic alterations in different sites of head and neck cancer. *Laryngoscope*. julio de 2001;111(7):1297-301.

169. Rodrigo JP, Lazo PS, Ramos S, Alvarez I, Suárez C. MYC amplification in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. mayo de 1996;122(5):504-7.

170. Rodrigo JP, Ramos S, Lazo PS, Alvarez I, Suárez C. Amplification of ERBB oncogenes in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Eur J Cancer*. octubre de 1996;32A(11):2004-10.

171. Kokko L-L, Hurme S, Maula S-M, Alanen K, Grénman R, Kinnunen I, et al. Significance of site-specific prognosis of cancer stem cell marker CD44 in head and neck squamous-cell carcinoma. *Oral Oncol*. junio de 2011;47(6):510-6.

172. de Moraes FPP, Lourenço SV, Ianez RCF, de Sousa EA, Silva MM da C, Damascena

- AS, et al. Expression of stem cell markers in oral cavity and oropharynx squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* enero de 2017;123(1):113-22.
173. Greco A, Rizzo MI, De Virgilio A, Gallo A, Fusconi M, Pagliuca G, et al. Cancer stem cells in laryngeal cancer: what we know. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* noviembre de 2016;273(11):3487-95.
174. Suer I, Karatas OF, Yuceturk B, Yilmaz M, Guven G, Buge O, et al. Characterization of stem-like cells directly isolated from freshly resected laryngeal squamous cell carcinoma specimens. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2014;9(4):347-53.
175. Wei X, Wang J, He J, Ma B, Chen J. Biological characteristics of CD133(+) cancer stem cells derived from human laryngeal carcinoma cell line. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7(9):2453-62.
176. Hermida-Prado F, Granda-Díaz R, Del-Río-Ibisate N, Villaronga MÁ, Allonca E, Garmendia I, et al. The Differential Impact of SRC Expression on the Prognosis of Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel).* 25 de octubre de 2019;11(11).
177. Rodrigo JP, García-Carracedo D, García LA, Menéndez S, Allonca E, González MV, et al. Distinctive clinicopathological associations of amplification of the cortactin gene at 11q13 in head and neck squamous cell carcinomas. *J Pathol.* marzo de 2009;217(4):516-23.
178. 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.* julio de 2002;118(1):67-72.

8 ANEXO

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN A Novel Role For Nanog As An Early Cancer Risk Marker In Patients With Laryngeal Precancerous Lesions

Received: 25 May 2017
Accepted: 29 August 2017
Published online: 11 September 2017

Juan P. Rodrigo¹, M. Ángeles Villaronga¹, Sofía T. Menéndez¹, Francisco Hermida-Prado¹, Miquel Quer², Isabel Vilaseca³, Eva Allonca², Daniel Pedregal Mallo³, Aurora Astudillo⁴ & Juana M. García-Pedrero¹

NANOG is a master regulator of embryonic stem cell pluripotency, found to be frequently aberrantly expressed in a variety of cancers, including laryngeal carcinomas. This study investigates for the first time the role of NANOG expression in early stages of laryngeal tumorigenesis and its potential utility as cancer risk marker. NANOG protein expression was evaluated by immunohistochemistry using two large independent cohorts of patients with laryngeal precancerous lesions, and correlated with clinicopathological parameters and laryngeal cancer risk. NANOG expression was detected by immunohistochemistry in 49 (60%) of 82 laryngeal dysplasias, whereas expression was negligible in patient-matched normal epithelia. Strong NANOG expression was found in 22 (27%) lesions and was established as cut-off point, showing the most robust association with laryngeal cancer risk ($P = 0.003$) superior to the histological classification ($P = 0.320$) the current gold standard in the clinical practice. Similar trends were obtained using a multicenter validation cohort of 86 patients with laryngeal dysplasia. Our findings uncover a novel role for NANOG expression in laryngeal tumorigenesis, and its unprecedented application as biomarker for cancer risk assessment.

NANOG is a key transcription factor critical for the acquisition and maintenance of both embryonic and induced pluripotency^{1,2}. In addition to its critical role during embryogenesis^{3,4}, it has been recently demonstrated that NANOG exerts a lineage-restricted mitogenic function in stratified epithelia in adult tissues⁵. Inducible ubiquitous overexpression of NANOG in mice selectively caused hyperplasia in stratified epithelia, as well as increased proliferation and aneuploidy. In addition, NANOG overexpression in mouse skin epithelia was found to favour malignant transformation of skin papillomas induced by chemical carcinogenesis, thus providing an *in vivo* evidence for the oncogenic role of NANOG in squamous cell carcinomas⁶. Furthermore, NANOG has been found frequently aberrantly expressed in a variety of human cancers, including head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC)^{6,7}. NANOG expression in cancer has been associated with chemoresistance^{8,9}, epithelial to mesenchymal transition (EMT)⁶ and poor clinical outcome^{7,10–12}.

Nevertheless, the role of NANOG in the early stages of HNSCC tumorigenesis and its possible implication in malignant transformation and acquisition of an invasive phenotype remains to be determined.

This prompted us to investigate NANOG protein expression in laryngeal tumorigenesis using a large series of 82 laryngeal precancerous lesions to establish correlations with clinicopathological parameters and the risk of progression to invasive carcinoma. This work unveils the clinical utility of NANOG expression as cancer risk marker in patients with laryngeal dysplasias, showing superior predictive power to histology. These results were further confirmed using an independent multicenter cohort of 86 patients with laryngeal premalignancies.

Results

NANOG protein expression in the early stages of laryngeal tumorigenesis. Immunohistochemical analysis of NANOG protein expression was performed on a set of 82 laryngeal dysplasias. Positive NANOG

¹Department of Otolaryngology, Hospital Universitario Central de Asturias and Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias, Oviedo, CIBERONC, Spain. ²Department of Otolaryngology, Hospital Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain. ³Department of Otolaryngology, Hospital Clínic, Barcelona, Spain. ⁴Department of Pathology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain. Juan P. Rodrigo and M. Ángeles Villaronga contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.P.R. (email: juanpablo.rodrigo@sespa.es) or J.M.G.-P. (email: juanagp.finba@gmail.com)

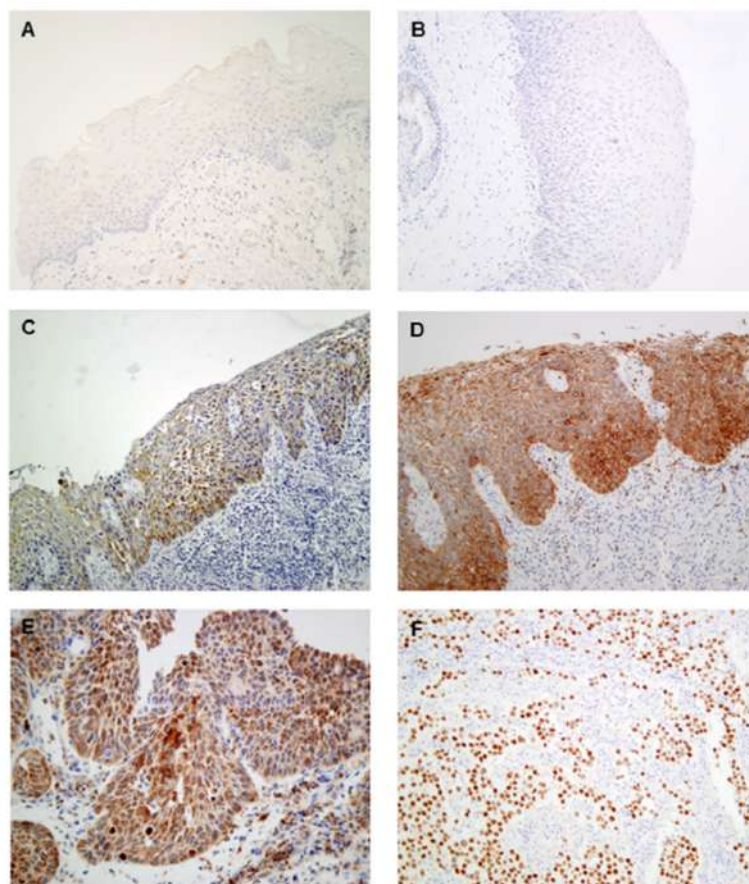


Figure 1. Immunohistochemical analysis of NANOG expression in laryngeal dysplasias. Normal adjacent epithelia showed negative staining (A). Representative examples of low-grade dysplasias showing negative NANOG staining, score 0 (B) and cytoplasmic NANOG staining score 1 (C), a high-grade dysplasia with cytoplasmic NANOG staining score 2 (D), and a high-grade dysplasia with nuclear NANOG staining (E). Human seminoma was used as positive control, showing strong nuclear NANOG staining (F). Original magnification $\times 200$ (E $\times 400$).

expression was detected in the cytoplasm in 49 (60%) dysplasias (scored as 1 and 2), whereas expression was negligible in both stromal cells and normal adjacent epithelia (Fig. 1). Twenty-two (27%) lesions showed strong NANOG expression (score 2).

Cytoplasmic NANOG protein expression did not correlate with the histopathological classification: 9 (64%) of the 14 lesions with low-grade dysplasia, and 40 (59%) of the 68 lesions with high-grade dysplasia exhibited cytoplasmic NANOG protein expression (Chi-square $P = 0.930$). Strong NANOG expression was found in 4 (29%) low-grade dysplasias, and 18 (26%) high-grade dysplasias (Fisher's exact $P = 1.000$). In addition, nuclear NANOG expression was detected in 7 dysplasias that also showed cytoplasmic expression: one case with weak and 6 cases with strong cytoplasmic expression ($P = 0.001$, Pearson $\rho = 0.375$).

Associations with laryngeal cancer risk. During the follow-up period, 24 (29%) of 82 patients developed an invasive carcinoma at the same site of the previous premalignant lesion. The mean time to cancer diagnosis in the cases that progressed was 28 months (range 6 to 66 months). No significant differences attributable to age

Characteristic	No. of cases (%)	Progression to carcinoma (%)	P
Histopathological diagnosis			
Low-grade dysplasia	14(17)	3(21)	0.748 ^a
High-grade dysplasia	68(83)	21(31)	
Cytoplasmic NANOG protein scores			
Negative (score 0)	33(40)	6(18)	0.009 ^a
Weak/Moderate (score 1)	27(33)	6(22)	
Strong (score 2)	22(27)	12(55)	
Cytoplasmic NANOG protein expression			
Negative to Moderate	60(73)	12(20)	0.005 ^a
Strong (score 2)	22(27)	12(55)	
Nuclear NANOG protein expression			
Negative	75(91)	20(27)	0.186 ^a
Positive	7(9)	4(57)	

Table 1. Evolution of the premalignant lesions in relation to histopathological diagnosis and NANOG protein expression. ^aChi-square and [†]Fisher's exact tests.

Characteristic	P	Hazard Ratio	95% CI
-Age (above vs below the mean)	0.652	1.203	0.539 to 2.686
-Smoking (above vs below the mean)	0.41	1.4	0.629 to 3.119
-Histology (High-grade vs low-grade dysplasia)	0.499	1.517	0.452 to 5.089
-Cytoplasmic NANOG expression (Score 2 vs 0-1)	0.003	1.826	1.222 to 2.728
-Nuclear NANOG expression	0.063	2.773	0.945 to 8.134

Table 2. Univariate Cox Proportional Hazards Model to Estimate Laryngeal Cancer Risk in the exploratory cohort.

were observed ($P = 0.703$) between the group of patients who developed cancer (mean, 65 years) and those who did not (mean, 64 years). The mean tobacco consumption for patients who developed an invasive carcinoma was 58.6 packs-year, compared to 52.7 packs-year for those who did not develop cancer ($P = 0.316$). Similarly, no significant differences in laryngeal cancer risk were observed between the subgroup of patients who continued smoking (14 patients) and those who ceased smoking ($P = 0.757$).

There was no statistically significant correlation in this cohort between the histopathological grade and the risk of progression to laryngeal cancer ($P = 0.748$; Table 1), although high-grade dysplasias showed a higher cancer risk (HR = 1.517, 95% CI 0.452 to 5.089; $P = 0.499$; Table 2).

Interestingly, we found that cytoplasmic NANOG protein scores significantly correlated with an increased laryngeal cancer risk (Table 1, and Fig. 2A, log-rank $P = 0.007$). Therefore, strong cytoplasmic NANOG expression (score 2) was used as a cut-off point in our subsequent analyses (Table 2, $P = 0.003$, and Fig. 2B, log-rank $P = 0.002$). Patients carrying strong cytoplasmic NANOG-expressing lesions (score 2) experienced a significantly higher progression to laryngeal cancer than those with absent to moderate (scores 0-1) expression (HR = 1.826; 95%CI, 1.222-2.728; $P = 0.003$). At 5 years after the patients were diagnosed, 55% of the patients with strong cytoplasmic NANOG expression developed laryngeal cancer compared with 20% of the patients with negative to moderate NANOG expression (Fisher's exact test, $P = 0.005$; Table 1). Nuclear NANOG expression also tended to associate with increased laryngeal cancer risk (Fisher's exact test, $P = 0.186$; Table 1).

Univariate Cox analysis showed that strong cytoplasmic NANOG expression was the only significant predictor of laryngeal cancer risk (Table 2). The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) of cytoplasmic NANOG expression were 50%, 83%, 54%, and 80%, respectively.

Multicenter validation of NANOG as cancer risk marker. To further confirm these results, immunohistochemical analysis of NANOG expression was also carried out in an independent series of 86 laryngeal premalignancies from two different collaborating institutions in Barcelona, Spain (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and Hospital Clinic). Cytoplasmic NANOG expression (scored as 1 and 2) was detected in 23 (27%) laryngeal dysplasias, and 7 (8%) lesions showed strong cytoplasmic NANOG expression. Nuclear NANOG expression was detected in nine of the cases with cytoplasmic expression; in 5 cases with weak and in 4 cases with strong cytoplasmic expression ($P < 0.001$, Pearson $\rho = 0.6$).

The proportion of cases with strong cytoplasmic expression was considerably lower than that observed in our exploratory series of laryngeal dysplasias from the Hospital Universitario Central de Asturias. However, noteworthy the proportion of patients who developed an invasive carcinoma in the validation series was also notably low. Thus, during the follow-up period 10 (12%) patients developed an invasive carcinoma at the same biopsy site. More importantly, the results obtained in the validation cohort confirmed the relationship of NANOG expression

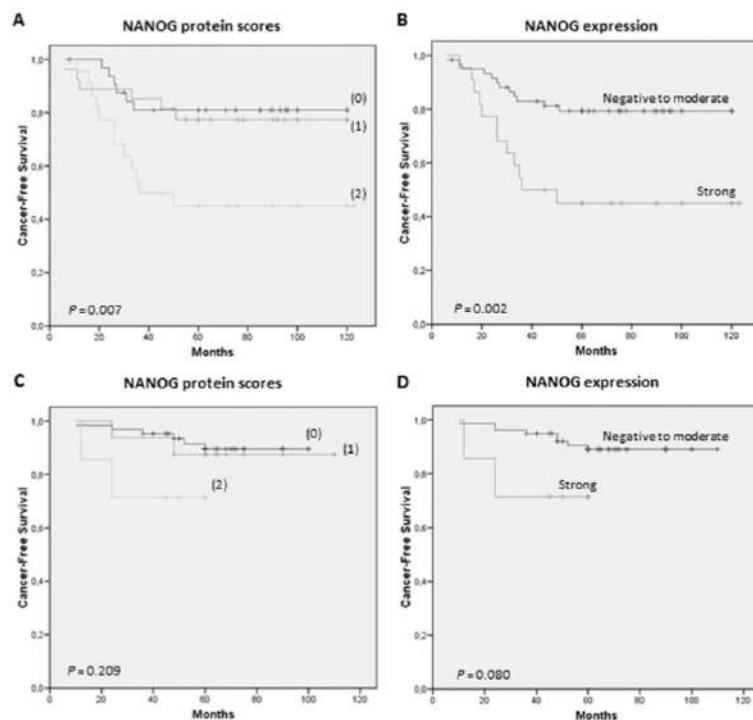


Figure 2. Kaplan-Meier cancer-free survival curves in the exploratory series of 82 patients with laryngeal dysplasias categorized by NANOG protein scores (A) or NANOG protein expression dichotomized as strong (score 2) versus negative to moderate expression (scores 0–1) (B). Kaplan-Meier cancer-free survival curves in the validation series of 86 patients with laryngeal dysplasias categorized by NANOG protein scores (C) or NANOG protein expression dichotomized as strong (score 2) versus negative to moderate expression (scores 0–1) (D). *P* values were estimated using the log-rank test.

with laryngeal cancer risk (Fig. 2C,D). Similarly, strong cytoplasmic NANOG expression showed the most robust association with laryngeal cancer risk, although the differences did not reach statistical significance, probably due to the small proportion of cases that progressed to cancer (log-rank $P = 0.080$; Fig. 2D), whereas histology was not a significant predictor of cancer development (log-rank $P = 0.274$). Nuclear NANOG expression was not associated with laryngeal cancer risk in this cohort ($P = 0.59$).

Also in this cohort, univariate Cox analysis showed that strong cytoplasmic NANOG expression was the better predictor of laryngeal cancer risk (Table 3). The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) of cytoplasmic NANOG expression were 20%, 93%, 29%, and 90%, respectively.

Discussion

We recently reported that NANOG is frequently aberrantly expressed in squamous cell carcinomas, including HNSCC⁵. In addition, evidence was also provided to support that NANOG plays an active role *in vivo*, promoting malignant conversion of skin papillomas into carcinomas in transgenic mice⁶. To further and significantly extend these data, this study investigates for the first time NANOG expression in early stages of laryngeal tumorigenesis to uncover its role in malignant transformation and potential clinical application as cancer risk marker.

Using two large independent cohorts of patients with laryngeal precancerous lesions, we consistently demonstrate that NANOG is frequently abnormally expressed in laryngeal dysplasias but not in normal adjacent epithelia. More importantly, strong cytoplasmic NANOG protein expression (score 2) significantly correlated with higher cancer incidence in both patient cohorts. It is also worth noting that strong cytoplasmic NANOG expression showed the most robust association with laryngeal cancer risk and superior predictive power than the histological classification, which remains the current gold standard in the clinical practice. Although the sensitivity

Characteristic	P	Hazard Ratio	95% CI
-Age (above vs below the mean)	0.826	1.149	0.332 to 3.973
-Smoking (above vs below the mean)	0.246	2.177	0.584 to 8.113
-Histology (High-grade vs low-grade dysplasia)	0.286	0.502	0.142 to 1.779
-Cytoplasmic NANOG expression (Score 2 vs 0-1)	0.1	1.906	0.876 to 4.148
-Nuclear NANOG expression	0.475	0.042	0.000 to 256.12

Table 3. Univariate Cox Proportional Hazards Model to Estimate Laryngeal Cancer Risk in the validation cohort.

of cytoplasmic NANOG expression to detect patients who will develop laryngeal cancer was not high (50% and 20% in the exploratory and the validation cohort, respectively), it consistently showed to be highly specific in the two independent cohorts analysed (83% and 93% in the exploratory and validation cohorts, respectively). Hence, this biomarker test is characterised by high negative predictive values and could therefore be helpful to identify patients at low probability of progression to laryngeal cancer. Consequently, clinical assessment of NANOG staining could be useful for ruling out the disease.

Regarding the differences in progression risk between the two patient cohorts, the higher laryngeal cancer risk observed in our patient series from Asturias may be attributed to demographic differences, since Asturias is the region with the highest laryngeal cancer incidence in Spain and also one of the highest in the world¹³. Consistent with this notion, the proportion of patients carrying lesions with strong NANOG expression was also higher in the exploratory cohort from Asturias, probably underlying that this population harbours more genetic and molecular alterations due to higher carcinogen exposure (as reflected by the higher tobacco consumption rates), which would ultimately provide an additional advantage for tumour formation.

Like other epithelial cancers, laryngeal carcinogenesis appears to evolve through a multistep process that involves biomolecular changes caused by carcinogen exposure, ensuing premalignant lesions and consequent invasive carcinoma^{14,15}. Although lesions with dysplastic features are thought to be at a higher cancer risk¹⁶, some cancers develop from lesions lacking dysplastic changes. Additional objective and reliable markers are therefore needed to identify more accurately high-risk lesions beyond current clinical and histopathological criteria¹⁷, which will undoubtedly help the clinicians to choose the most adequate therapeutic option. Since immunohistochemical analysis of NANOG is relatively simple and easy to interpret, it seems reasonable to recommend this molecular test to be included as complementary marker for cancer risk assessment and decision-making. Nevertheless, routine implementation will require further confirmation of these results in large prospective studies.

Therefore, cytoplasmic NANOG expression emerges as a clinically and biologically relevant feature in early stages of laryngeal tumourigenesis that contributes to malignant transformation and laryngeal cancer development. Aberrant NANOG expression appears to be a distinctive characteristic in human squamous cell carcinomas⁵, it has been associated to chemoresistance and poor disease outcome in various cancers^{7-13,18}, and according to the herein presented data, it also plays a prominent role in early stages of tumourigenesis and malignant transformation. NANOG immunostaining is usually detected in the nuclei of pluripotent cells, as shown in our seminoma control. Nuclear NANOG expression was also detected in laryngeal dysplasias; however, cytoplasmic NANOG expression was the most predominantly found and clinically relevant.

Our findings are in good agreement with previous reports that showed NANOG expression in the cytoplasm of tumour cells, associated with poor prognosis^{5,11}. Thus, cytoplasmic NANOG expression has been frequently detected in HNSCC tissue specimens⁵. Cytoplasmic NANOG expression has also been frequently detected in high-grade OSCC¹¹. In addition, patients with strong NANOG expression exhibited significantly lower overall survival rates than those with weak or negative NANOG expression, suggesting that OSCCs with high cytoplasmic NANOG expression may possess aggressive characteristics, and ultimately poor prognosis¹¹. In nasopharyngeal carcinomas, cytoplasmic NANOG was particularly evident at the invasive edge of tumours compared to low cytoplasmic NANOG expression in the non-cancerous epithelium, and showed clinical relevance associated to poor prognosis¹⁹. Similarly, cytoplasmic NANOG-positive stromal cells promoted human cervical cancer progression, with mesenchymal stem cells (MSCs) being one type of cytoplasmic NANOG-positive cells in cervical cancer stroma that participate in the progression of cervical cancer both *in vitro* and *in vivo*²⁰.

The oncogenic role of NANOG involves transcriptional induction of an EMT program and stem cell features^{6,18}, leading to sustained unlimited growth, increased cell migration and acquisition of invasive phenotype. Hence, these data reflect that NANOG may represent a promising therapeutic target in the prevention and treatment of epithelial cancers.

Together our findings uncover a novel role for NANOG expression in laryngeal tumourigenesis, and its unprecedented clinical application as biomarker for cancer risk assessment in patients with precancerous lesions.

Methods

Patients and tissue specimens. Surgical tissue specimens from patients who were diagnosed of laryngeal dysplasia at the Hospital Universitario Central de Asturias between 1996 and 2010 were retrospectively collected, in accordance to approved institutional review board guidelines. All experimental protocols were approved by the Institutional Ethics Committee of the Hospital Universitario Central de Asturias and by the Regional CEIC from Principado de Asturias (approval number: 81/2013 for the project PI13/00259). Informed consent was obtained from all patients. Patients must meet the following criteria to be included in the study: *i*) pathological diagnosis

of laryngeal dysplasia; *ii*) with lesions of the vocal folds *iii*) no previous history of head and neck cancer; *iv*) complete excisional biopsy of the lesion; *v*) a minimum follow-up of five years (or until progression to malignancy occurred); and *vi*) patients with a diagnosis of laryngeal dysplasia who developed cancer within the next six months were excluded from the study. Eighty-two consecutive patients who met these criteria were included in this study. All the patients were treated with macroscopically complete excisional biopsy of the lesion, either with CO₂ laser or with cold instruments. Microscopically surgical margins were not assessed. No other treatments were administered. Patients were followed up every two months in the first six months after completing the treatment, every three months until the second year, and every six months thereafter.

Representative tissue sections from the original biopsy material were obtained from archival, paraffin embedded blocks and the histological diagnosis and epithelial dysplasia grade was confirmed in all the cases by an experienced pathologist (A.A.). The sections selected for study also contained normal epithelia as internal controls. After review, the premalignant lesions were classified into the categories of low-grade dysplasia (14 cases, 17%), and high-grade dysplasia (68 cases, 83%) following the WHO classification 4th Edition²¹.

All patients were men, with a mean age of 64 years (range 36–86 years). All but two patients were smokers, 44 (54%) moderate (1–50 pack-year) and 36 (44%) heavy (>50 pack-year) smokers. The mean tobacco consumption was 54 pack-year (range 0–150). After the diagnosis, all the patients who were active smokers received smoking cessation advice; however, 14 of them continued smoking.

In addition, an independent cohort of 86 patients with a diagnosis of laryngeal dysplasia was used as a validation series. This series included consecutive patients treated at two collaborating institutions in Barcelona (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and Hospital Clinic) between 1996 and 2010, who met the same inclusion criteria above-described for the exploratory series. Surgical tissue specimens were retrospectively collected, with the approval of their institutional review boards and in accordance to ethical and legal protection guidelines. The histological diagnosis and epithelial dysplasia grade was verified in all the cases by the same pathologist at our institution (A.A.), and after review, the premalignant lesions were classified into low-grade (22 cases, 26%), and high-grade dysplasia (64 cases, 74%) according to the WHO classification 4th Edition¹⁹.

All but seven patients were men, with a mean age of 62 years (range 30–87 years). All but nine patients were smokers, 47 (55%) moderate (1–50 pack-year) and 30 (35%) heavy (>50 pack-year) smokers. The mean tobacco consumption was 42 pack-year (range 0–120).

Immunohistochemistry. The formalin-fixed, paraffin-embedded tissues were cut into 3- μ m sections and dried on Flex IHC microscope slides (Dako). The sections were deparaffinized with standard xylene and hydrated through graded alcohols into water. Antigen retrieval was performed using Envision Flex Target Retrieval solution, high pH (Dako). Staining was done at room temperature on an automatic staining workstation (Dako Autostainer Plus) with Nanog (D73G4) XP[®] Rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling technology, Inc.) at 1:200 dilution using the Dako EnVision Flex + Visualization System (Dako Autostainer). Counterstaining with haematoxylin was the final step.

A semiquantitative scoring system based on staining intensity was applied, as previously reported⁵. Immunostaining of the dysplastic areas was scored blinded to clinical data by two independent observers as negative (absence of staining, score 0), weak to moderate (some cytoplasmic staining in dysplastic areas, score 1), and strong protein expression (intense and homogeneous cytoplasmic staining in dysplastic areas, score 2), with a high level of inter-observer concordance (>95%). As in some cases nuclear staining was observed, the cases were also scored as positive/negative based on the presence of nuclear staining in dysplastic areas. Human seminoma was used as positive control, showing strong nuclear NANOG staining.

Statistical analysis. χ^2 and Fisher's exact tests were used for comparison between categorical variables. For time-to-event analysis, Kaplan-Meier curves were plotted. Differences between survival times were analysed by the log-rank method. Cox proportional hazards models were utilized for univariate analysis. The hazard ratios (HR) with 95% confidence interval (CI) and P values were reported. All tests were two-sided. p values of ≤ 0.05 were considered statistically significant.

References

- Chambers, I. *et al.* Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* **450**, 1230–1234 (2007).
- Mitsui, K. *et al.* The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* **113**, 631–642 (2003).
- Loh, Y. H. *et al.* The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat. Genet.* **38**, 431–440 (2006).
- Wang, J. *et al.* A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* **444**, 364–368 (2006).
- Piazzolla, D. *et al.* Lineage-restricted function of the pluripotency factor NANOG in stratified epithelia. *Nat. Commun.* **5**, 4226. doi:<https://doi.org/10.1038/ncomms5226> (2014).
- Palla, A. R. *et al.* The pluripotency factor NANOG promotes the formation of squamous cell carcinomas. *Sci. Rep.* **5**, 10205. doi:<https://doi.org/10.1038/srep10205> (2015).
- Santali-Ruiz, L. E. *et al.* Emerging role of nanog in tumorigenesis and cancer stem cells. *Int. J. Cancer* **135**, 2741–2748 (2014).
- Bourguignon, L. Y. *et al.* Stem cell marker (Nanog) and Stat-3 signaling promote MicroRNA-21 expression and chemoresistance in hyaluronan/CD44-activated head and neck squamous cell carcinoma cells. *Oncogene* **31**, 149–160 (2012).
- Bourguignon, L. Y. *et al.* Hyaluronan-CD44v3 interaction with Oct4-Sox2-Nanog promotes miR-302 expression leading to self-renewal, clonal formation, and cisplatin resistance in cancer stem cells from head and neck squamous cell carcinoma. *J. Biol. Chem.* **287**, 32800–32824 (2012).
- Chang, T. S. *et al.* Activation of IL6/IGF1R confers poor prognosis of HBV-related hepatocellular carcinoma through induction of OCT4/NANOG expression. *Clin. Cancer Res.* **21**, 201–210 (2015).
- Lee, H. J. *et al.* Positive expression of NANOG, mutant p53, and CD44 is directly associated with clinicopathological features and poor prognosis of oral squamous cell carcinoma. *BMC Oral Health* **15**, 153 (2015).

12. Park, E. *et al.* Prognostic significance of stem cell-related marker expression and its correlation with histologic subtypes in lung adenocarcinoma. *Oncotarget* **7**, 42502–42512 (2016).
13. Ferlay, J. *et al.* GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 07/07/2016.
14. Califano, J. *et al.* Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res.* **56**, 2488–2492 (1996).
15. Haddad, R. I. & Shin, D. M. Recent advances in head and neck cancer. *N. Engl. J. Med.* **359**, 1143–1154 (2008).
16. Gale, N. *et al.* Current review on squamous intraepithelial lesions of the larynx. *Histopathol.* **54**, 639–656 (2009).
17. Forastiere, A. *et al.* Head-and-neck cancer. *N. Engl. J. Med.* **345**, 1890–1900 (2001).
18. Liu, S. *et al.* NANOG regulates epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance through activation of the STAT3 pathway in epithelial ovarian cancer. *Tumour Biol.* **37**, 9671–9680 (2016).
19. Luo, W. *et al.* Embryonic stem cells markers SOX2, OCT4 and Nanog expression and their correlations with epithelial-mesenchymal transition in nasopharyngeal carcinoma. *PLoS One* **8**, e56324 (2013).
20. Gu, T. T., Liu, S. Y. & Zheng, P. S. Cytoplasmic NANOG-positive stromal cells promote human cervical cancer progression. *Am J Pathol.* **181**, 652–661 (2012).
21. WHO Classification of Head and Neck Tumours. WHO/IARC Classification of Tumours, 4th Edition, Vol. 9. (eds El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Sliotweg PJ) (2017).

Acknowledgements

We thank the samples and technical assistance kindly provided by the Principado de Asturias BioBank (PT13/0010/0046), financed jointly by Servicio de Salud del Principado de Asturias, Instituto de Salud Carlos III and Fundación Bancaria Cajastur and integrated in the Spanish National Biobanks Network, the IIB Sant Pau-Fundació Puigvert Biobank and the Biobanc-Hospital Clinic-IDIBAPS. This study was supported by grants from the Plan Nacional de I + D + I 2013–2016 ISCIII (CP13/00013 and PI13/00259 to J.M.G.-P. and CD13/00157 to M.A.V.), RD12/0036/0015 of Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC), PI16/00280 and CIBERONC (CB16/12/00390) Spain, and the FEDER Funding Program from the European Union. S.T.M. was the recipient of a fellowship from FICYT (BP08-007) and Obra Social Cajastur-IUOPA, and F.H.-P. recipient of a fellowship from PCTI- Asturias (GRUPIN14-003).

Author Contributions

J.P.R. and J.M.G.P. conceived experiments, analysed data, carried out statistical analysis and were involved in writing the manuscript; M.A.V. conceived/carried out experiments and analysed data; S.T.M., F.H.P., E.A. and D.P.M. carried out experiments; M.Q. and I.V. provided HNSCC specimens and clinical data; A.A. performed the histological analysis. All authors approved the final version of the manuscript.

Additional Information

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017



Article

The Novel Role of SOX2 as an Early Predictor of Cancer Risk in Patients with Laryngeal Precancerous Lesions

Rocío Granda-Díaz ^{1,2,†}, Sofía T. Menéndez ^{1,2,†}, Daniel Pedregal Mallo ¹ , Francisco Hermida-Prado ¹ , René Rodríguez ^{1,2} , Laura Suárez-Fernández ¹, Aitana Vallina ³, Mario Sánchez-Canteli ¹, Aida Rodríguez ¹, M. Soledad Fernández-García ³, Juan P. Rodrigo ^{1,2,*} and Juana M. García-Pedrero ^{1,2,*}

¹ Department of Otolaryngology, Hospital Universitario Central de Asturias and Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias, University of Oviedo, Avda. Roma, 33011 Oviedo, Spain; rociagd281@gmail.com (R.G.-D.); sofiaatrados@gmail.com (S.T.M.); pedregal.dm@gmail.com (D.P.M.); franjhermida@gmail.com (F.H.-P.); renerg.finba@gmail.com (R.R.); laura_quillo@hotmail.com (L.S.-F.); mariosanchezcanteli@gmail.com (M.S.-C.); aidarp.finba@gmail.com (A.R.)

² Ciber de Cáncer, CIBERONC, Av. Monforte de Lemos, 3-5, 28029 Madrid, Spain

³ Department of Pathology, Hospital Universitario Central de Asturias, Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias, University of Oviedo, Avda. Roma, 33011 Oviedo, Spain; alaicla@hotmail.es (A.V.); solefghdr@hotmail.com (M.S.F.-G.)

* Correspondence: jprodrigo@uniovi.es (J.P.R.); juanagp.finba@gmail.com (J.M.G.-P.)

† These authors contributed equally to this work.

Received: 18 January 2019; Accepted: 22 February 2019; Published: 1 March 2019



Abstract: The SOX2 gene located at 3q26 is frequently amplified and overexpressed in multiple cancers, including head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). The tumor-promoting activity and involvement of SOX2 in tumor progression has been extensively demonstrated, thereby emerging as a promising therapeutic target. However, the role of SOX2 in early stages of tumorigenesis and its possible contribution to malignant transformation remain unexplored. This study investigates for the first time SOX2 protein expression by immunohistochemistry and gene amplification by real-time PCR using a large series of 94 laryngeal precancerous lesions. Correlations with the histopathological classification and the risk of progression to invasive carcinoma were established. Nuclear SOX2 expression was frequently detected in 38 (40%) laryngeal dysplasias, whereas stromal cells and normal adjacent epithelia showed negative expression. SOX2 gene amplification was detected in 18 (33%) of 55 laryngeal dysplasias. Univariate Cox analysis showed that SOX2 gene amplification ($p = 0.046$) and protein expression ($p < 0.001$) but not histological grading ($p = 0.432$) were significantly associated with laryngeal cancer risk. In multivariate stepwise analysis including age, tobacco, histology, SOX2 gene amplification and SOX2 expression, SOX2 expression (HR = 3.531, 95% CI 1.144 to 10.904; $p = 0.028$) was the only significant independent predictor of laryngeal cancer development. These findings underscore the relevant role of SOX2 in early tumorigenesis and a novel clinical application of SOX2 expression as independent predictor of laryngeal cancer risk in patients with precancerous lesions beyond current WHO histological grading. Therefore, targeting SOX2 could lead to effective strategies for both cancer prevention and treatment.

Keywords: cancer risk assessment; larynx; dysplasia; SOX2; immunohistochemistry; gene amplification

1. Introduction

The sex-determining region Y (SRY)-related high-mobility-group (HMG)-box family of transcription factors member SOX2 (Sex-determining region Y-box 2) plays a critical role during embryonic

development and organogenesis, thereby showing a very restricted, and precisely regulated, spatial-temporal expression pattern [1,2]. Similar to other pluripotency-associated transcription factors such as NANOG (Nanog Homeobox) and OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4, also known as POU5F1), SOX2 has been implicated in sustaining stemness of embryonic stem cells, reprogramming of adult somatic cells to a pluripotent stem cell state and also in multiple tumorigenic processes [3–10].

Amplification of the chromosomal region 3q26-27 is one of the most recurrent genetic alterations in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) and other carcinomas, which has been associated with tumor progression and poor patient prognosis [11,12]. SOX2 located at 3q26 has emerged as a candidate tumor driver gene within this locus [7,13–15]. SOX2 amplification and overexpression has been implicated in many tumor types, but mostly in squamous carcinomas of various localizations (lung, esophagus, head and neck) [13–19].

The role of SOX2 in HNSCC progression and its impact on prognosis and disease outcome has been subject of intense investigation [7,11,20–23]. However, the role of SOX2 in the early stages of HNSCC tumorigenesis and its possible contribution to malignant transformation and acquisition of an invasive phenotype remains unexplored.

This study investigates for the first time SOX2 protein expression and gene amplification in the early stages of HNSCC tumorigenesis using a large series of 94 laryngeal precancerous lesions. Correlations with the risk of progression to invasive carcinoma and with the histopathological classification (current gold standard) were established. Our findings uncover the clinical application of SOX2 expression as an independent predictor of laryngeal cancer risk in patients with laryngeal precancerous lesions, showing superior predictive value to the current World Health Organization (WHO) histological classification.

2. Materials and Method

2.1. Patients and Tissue Specimens

Surgical tissue specimens from patients who were diagnosed of laryngeal dysplasia at the Hospital Universitario Central de Asturias between 1996 and 2010 were retrospectively collected, in accordance with approved institutional review board guidelines. All experimental procedures were conducted in accordance to the Declaration of Helsinki and approved by Institutional Ethics Committee of the Hospital Universitario Central de Asturias, and by the Regional CEIC from Principado de Asturias (date of approval: 18 July 2013; approval number: 81/2013) for the project PI13/00259. Informed consent was obtained from all patients. Patients must meet the following criteria to be included in the study: (i) pathological diagnosis of laryngeal dysplasia; (ii) with lesions of the vocal folds (iii) no previous history of head and neck cancer; (iv) complete excisional biopsy of the lesion; (v) a minimum follow-up of five years (or until progression to malignancy occurred); and (vi) patients with a diagnosis of laryngeal dysplasia who developed cancer within the next six months were excluded from the study. A total of 94 patients who met these criteria were included in this study. All the patients were treated with macroscopically complete excisional biopsy of the lesion, either with CO₂ laser or with cold instruments. Microscopically surgical margins were not assessed. No other treatments were administered. Follow up with the patients occurred every two months in the first six months after completing the treatment, every three months until the second year, and every six months thereafter.

Representative tissue sections from the original biopsy material were obtained from archival, paraffin embedded blocks and the histological diagnosis and epithelial dysplasia grade was confirmed in all the cases by an experienced pathologist (MSFG). The sections selected for study also contained normal epithelia as internal controls. The premalignant lesions were classified into the categories of low-grade and high-grade dysplasia following the WHO classification (4th Edition) [24].

2.2. Gene Amplification Analysis

The protocol for DNA extraction from paraffin-embedded tissue sections has been described elsewhere [25]. DNA extracted from normal mucosa obtained from non-oncologic patients was used as calibrator sample. Gene amplification was evaluated by real-time PCR (Q-PCR) in an ABI PRISM 7500 Sequence detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using Power SYBR Green PCR Master Mix and oligonucleotides with the following sequences: for the *SOX2* gene, Fw, 5'-CTCCGGGACATGATCAGC-3' and Rv, 5'-CTGGGACATGTGAAGTCTGC-3'; and for the reference gene *COL7A1* (located at 3p21), Fw, 5'-ACCCAGTACCGCATCATGTG-3' and Rv, 5'-TCAGGCTGGAACCTCAGTGTGT-3'. Samples were analyzed in triplicates and template-free blanks were also included.

The relative gene copy number for *SOX2* was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Calibration curves for the reference gene (*COL7A1*) and the target gene (*SOX2*) showed parallel slopes and comparable amplification efficiency across the linear range (1.5–25 ng) (Supplementary Figure S1). The $\Delta\Delta C_T$ represents the difference between ΔC_T of dysplasia - ΔC_T of normal mucosa, with ΔC_T being the average C_T for the target gene (*SOX2*) minus the average C_T for the reference gene (*COL7A1*). The optimal cut-off value for *SOX2* amplification was identified via a receiver operating characteristic (ROC) curve analysis, using progression to cancer as an end point, and patients were categorized into positive *SOX2* amplification (≥ 1.75) and negative amplification (< 1.75) (Supplementary Figure S2A).

2.3. Immunohistochemistry

The formalin-fixed, paraffin-embedded tissues were cut into 3- μ m sections and dried on Flex IHC microscope slides (Dako, Glostrup, Denmark). The sections were deparaffinized with standard xylene and hydrated through graded alcohols into water. Antigen retrieval was performed using Envision Flex Target Retrieval solution, high pH (Dako). Staining was done at room temperature on an automatic staining workstation (Dako Autostainer Plus, Dako, Glostrup, Denmark) with Anti-SOX2 rabbit polyclonal antibody (Merck Millipore # AB5603) at 1:1000 dilution using the Dako EnVision Flex + Visualization System (Dako Autostainer). Counterstaining with hematoxylin was the final step.

SOX2 staining was evaluated as the percentage of cells with nuclear staining in the dysplastic epithelium. The optimal cut-off value for *SOX2* staining calculated by ROC analysis using progression to cancer as end-point was 12.5% (Supplementary Figure S2B). Scores were classified as negative or positive staining on the basis of values below or above the cut-off value of 12.5%.

2.4. Statistical Analysis

χ^2 and Fisher's exact tests were used for comparison between categorical variables. For time-to-event analysis, Kaplan-Meier curves were plotted. Differences between survival times were analyzed by the log-rank method. Cox proportional hazards models were utilized for univariate and multivariate analyses. The hazard ratios (HR) with 95% confidence interval (CI) and *p* values were reported. All tests were two-sided. *p* values of ≤ 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Patient Characteristics

All patients were men, with a mean age of 65 years (range 36–86 years). All but two patients were active or old smokers. The mean tobacco consumption was 50 packs-year (range 15–150 packs-year). After the diagnosis, all the patients that were active smokers received smoking cessation advice; however, 14 of them continued smoking. Of the 94 patients included in the study, 14 (15%) lesions were classified as low-grade dysplasia, and 80 (85%) as high-grade dysplasia. During the follow-up period, 29 (31%) of 94 patients developed an invasive carcinoma at the biopsy site.

The mean time to cancer diagnosis in the cases that progressed was 27 months (range 8 to 66 months). No significant differences attributable to age were observed ($p = 0.501$) between the

patients who developed cancer (mean, 64 years) and those who did not (mean, 64 years). The mean tobacco consumption for patients who developed an invasive carcinoma was 58 packs per year, compared to 53 packs per year for those who did not develop cancer ($p = 0.819$).

3.2. SOX2 Protein Expression in Laryngeal Precancerous Lesions

SOX2 protein expression was evaluated by immunohistochemistry in 94 laryngeal dysplasias. Nuclear SOX2 expression was detected in 38 (40%) dysplasias, whereas stromal cells and normal adjacent epithelia showed negative expression (Figure 1).

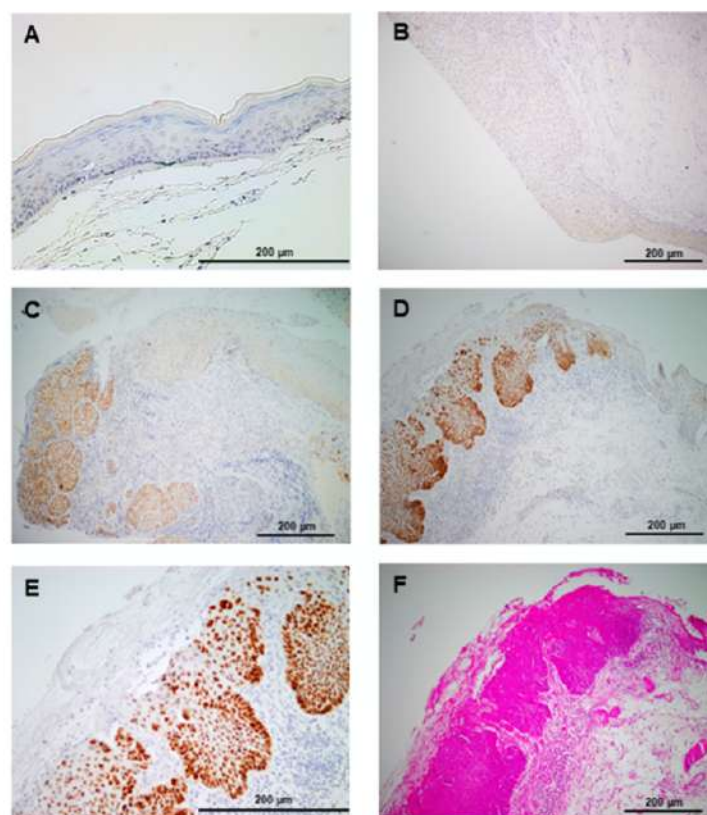


Figure 1. Immunohistochemical analysis of SOX2 (Sex-determining region Y-box 2) expression in laryngeal precancerous lesions. Normal adjacent epithelia showed negative staining (A). Representative examples of laryngeal dysplasias showing negative (B), and positive nuclear SOX2 staining (C,D), compared to the negative expression in normal-adjacent epithelia (right side). (E) Higher magnification from D. (F) H&E staining from D.

SOX2 protein expression significantly correlated with the histopathological classification: 2 (14%) of the 14 low-grade dysplasias, and 36 (45%) of the 80 high-grade dysplasias exhibited SOX2-positive expression (Fisher's exact test $p = 0.039$).

3.3. SOX2 Gene Amplification during Laryngeal Tumorigenesis

SOX2 gene amplification was assessed by real-time PCR on a set of 55 laryngeal dysplasias, using DNA extracted from the same paraffin tissue blocks. SOX2 gene amplification was detected in 18 (33%) of 55 laryngeal dysplasias, with relative copy numbers ranging from 2-fold to 9-fold (Figure 2A). SOX2 gene amplification increased with the severity of the lesions: 1 (17%) of the 6 low-grade dysplasias and 17 (35%) of the 49 high-grade dysplasias showed SOX2 gene amplification, although the differences did not reach statistical differences (Fisher's exact test $p = 0.651$).

When analyzing the correlation between SOX2 gene amplification and protein expression, we found that gene amplification only partially lead to SOX2 protein expression (Figure 2B). Thus, even though 22 out of 55 dysplasias were negative for both SOX2 expression and gene amplification, 15 amplification-negative lesions also showed positive SOX2 expression, indicating that additional mechanisms should contribute to the frequent SOX2 expression detected in laryngeal tumorigenesis.

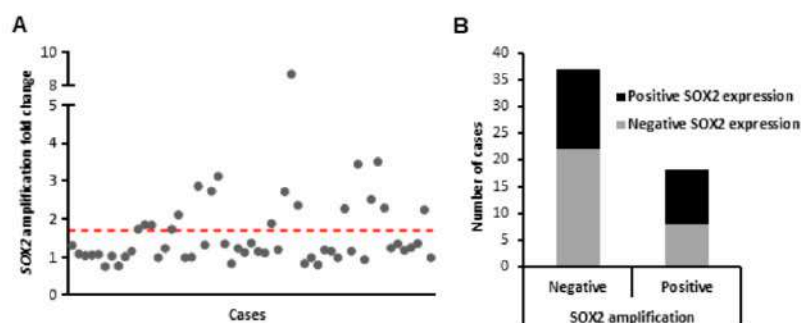


Figure 2. Analysis of SOX2 gene amplification in laryngeal precancerous lesions. SOX2 gene copy number was evaluated by Q-PCR in 55 cases. (A) Data are represented as fold-change in the precancerous lesion relative to the normal mucosa. Red dotted line indicates the threshold established to define positive cases (1.75). (B) Correlations between SOX2 gene amplification and protein expression determined by immunohistochemistry.

3.4. Associations with Laryngeal Cancer Risk

There was no statistically significant correlation in this cohort between the WHO histopathological grade and the risk of progression to laryngeal cancer ($p = 0.538$; Table 1; log-rank $p = 0.426$, Figure 3A), although high-grade dysplasias showed a higher cancer risk (HR = 1.615, 95% CI 0.489 to 5.336; $p = 0.432$; Table 1). Even the previous histological classification based in the dysplasia grading (mild, moderate vs. severe dysplasia) did not predict significantly cancer risk (log-rank $p = 0.438$, Figure 3B).

In marked contrast, we found that SOX2 gene amplification significantly correlated with an increased laryngeal cancer risk (log-rank $p = 0.038$; Figure 3C). Furthermore, SOX2 protein expression showed the most robust association with laryngeal cancer risk (log-rank $p < 0.001$; Figure 3D). Five years after the patients were diagnosed, 20 (53%) of the 38 patients with SOX2-positive expression developed laryngeal cancer, whereas only 9 (16%) of the 56 patients with SOX2-negative expression progressed to invasive carcinoma ($p < 0.001$; Table 1).

Univariate Cox analysis showed that SOX2 gene amplification and protein expression but not histological grading were significantly associated with laryngeal cancer risk (Table 2). In multivariate stepwise analysis including age, tobacco, histology, SOX2 gene amplification, and SOX2 expression, SOX2 expression (HR = 3.531, 95% CI 1.144 to 10.904; $p = 0.028$) was the only significant independent predictor of laryngeal cancer development.

Table 1. Evolution of the premalignant lesions in relation to histopathological diagnosis, SOX2 gene amplification, and protein expression.

Characteristic	No of Cases (%)	Progression to Carcinoma (%)	<i>p</i> [†]
Histopathological diagnosis			
Low-grade dysplasia	14 (15)	3 (21)	0.538
High-grade dysplasia	80 (85)	26 (32)	
SOX2 gene amplification			
Negative	37 (67)	11 (30)	0.081
Positive	18 (33)	10 (56)	
SOX2 protein expression			
Negative	56 (60)	9 (16)	<0.001
Positive (>10% stained nuclei)	38 (40)	20 (53)	

[†] Fisher's exact test.

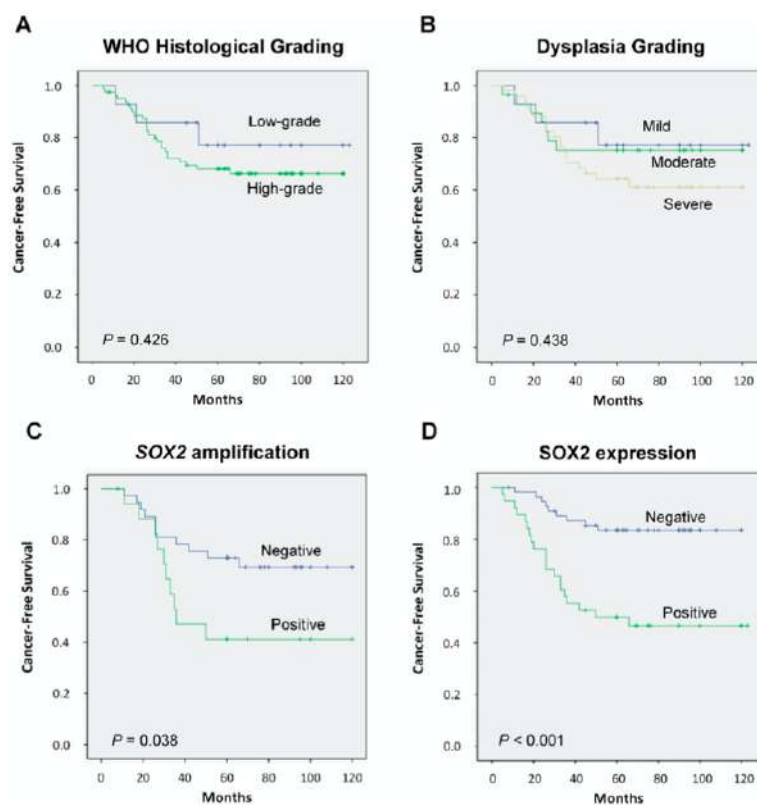


Figure 3. Kaplan-Meier cancer-free survival curves in the cohort of 94 patients with laryngeal dysplasias categorized by WHO (World Health Organization) histological grading (A), dysplasia grading (B) SOX2 gene amplification (C) or SOX2 protein expression (D). *p* values were estimated using the log-rank test.

Table 2. Univariate Cox Proportional Hazards Model to Estimate Laryngeal Cancer Risk.

Characteristic	<i>p</i>	Hazard Ratio	95% CI
Age (above vs. below the mean)	0.554	1.254	0.593–2.653
Smoking (above vs. below the mean)	0.618	1.210	0.572–2.558
Histology (high-grade vs. low-grade dysplasia)	0.432	1.615	0.489–5.336
SOX2 amplification (positive vs. negative)	0.046	2.410	1.017–5.710
SOX2 expression (positive vs. negative)	<0.001	4.130	1.878–9.086

4. Discussion

There is mounting evidence demonstrating the role of SOX2 in tumorigenesis, and its contribution to tumor progression has been extensively documented in multiple cancers [7–10,19–23]. Accordingly, SOX2 has emerged as a candidate driver gene responsible for the 3q26-associated tumor aggressiveness [11–18]. In HNSCC, SOX2 expression has been found to induce cancer stem cell (CSC)-like properties, including increased self-renewal, tumorigenic potential and chemoresistance [26–29]. Accordingly, various studies using large cohorts of HNSCC samples have demonstrated that SOX2 expression significantly correlated with tumor recurrence and poor prognosis [20,28,29]. Although it has also been reported that low expression of SOX2 was associated with reduced survival and poor clinical outcome [30,31].

This study further and significantly extends these data investigating for the first time SOX2 protein expression and gene amplification in early stages of laryngeal tumorigenesis to ascertain its role in malignant transformation. Our findings demonstrate that SOX2 protein expression and gene amplification are frequent events in laryngeal tumorigenesis and, more importantly, both emerge as clinically and biologically relevant features in laryngeal cancer development. Even though SOX2 protein expression and SOX2 amplification were found to increase in high-grade dysplasias, SOX2 protein expression and gene amplification but not histological grading were significantly associated with progression to laryngeal cancer. In particular, patients carrying SOX2-expressing dysplastic lesions exhibited a significantly higher cancer incidence than those with negative expression. In other tumor types, it has been reported that SOX2 antagonizes signals promoting differentiation to maintain stemness in CSC subpopulations [32,33]. On this basis, we could speculate that the increased cancer risk in patients harboring SOX2-expressing lesions may reflect the presence of a larger proportion of cells presenting cancer stem-like properties. Supporting this hypothesis, the expression of other CSC markers such as NANOG or Podoplanin has also been found to increase in precancerous lesions and to associate with a higher risk of malignization [34–36]. Podoplanin was identified as a marker of tumor-initiating cells in squamous cell carcinomas [37]. Tumorigenicity and capability of recapitulating human squamous cell carcinomas are by definition properties of CSCs. Thus, it has been interpreted that premalignant lesions with podoplanin expression expanding beyond the basal cell layer may represent truly early neoplastic lesions, enriched in CSC and indeed lesions with such clonal expansion carry a higher risk of progression to invasive cancer.

Furthermore, this study uncovers SOX2 expression as a robust independent predictor of laryngeal cancer risk beyond histological evaluation. Histopathological diagnosis of squamous intraepithelial lesions remains the gold standard in clinical practice for cancer risk assessment and decision-making [38]. Quite remarkably, the new and recently established WHO classification as well as the previous dysplasia grading failed to show a significant role in assessing laryngeal cancer risk in this cohort. This emphasizes the still limited value of histological grading to predict outcome, which is certainly affected by inter- and intra-observer variability [39]. Additional objective and reliable markers are therefore needed to improve patient stratification and to more accurately identify those carrying lesions at higher risk of progression who will require the most intense treatment and follow-up [40]. Our results clearly demonstrate that SOX2 protein analysis may provide valuable additional information beyond histological features. Hence, immunohistochemical evaluation of SOX2 is proposed to be incorporated into the clinical practice as a complementary and relatively simple

molecular test for cancer risk assessment and decision-making. Nevertheless, routine implementation of SOX2 expression as biomarker will require confirmation in large prospective studies, while also extending analysis to other subsites in the head and neck area.

The present study also revealed important temporal and mechanistic information regarding the early occurrence and frequency of SOX2 expression and gene amplification in laryngeal tumorigenesis. Thus, while both alterations are frequently detected at early stages of tumorigenesis and their frequency increased with the grade of dysplasia, SOX2 gene amplification occurred at a lower frequency and did not perfectly match with protein expression, indicating that additional mechanisms must be contributing to SOX2 expression, such as transcriptional or posttranscriptional regulatory mechanisms. In line with this, it has been demonstrated that various transcription factors frequently altered in HNSCC, such as OCT4, YAP1 (Yes-Associated Protein 1) or the hypoxic factor HIF1 α may induce the expression of SOX2 at mRNA level [41,42]. On the other hand, it has also been reported that amplification of *PIK3CA* and other genes mapping at 3q26 do not necessarily lead to increased expression, indicating that further epigenetic events could be involved in the transcriptional control [43]. Hence, this may explain some cases harboring SOX2-positive amplification that showed negative SOX2 protein expression. These results are in agreement with the TCGA data obtained from 279 HNSCC patients [44] using the platform cBioPortal for Cancer Genomics (<http://cbioportal.org/>) [45] (Supplementary Figure S3). It has been extensively demonstrated (both experimentally and in silico) that 3q26 amplicon harbors numerous genes found to be frequently and concomitantly co-amplified and overexpressed in multiple cancers [46,47]. Various genes have been highlighted as highly significant oncogenic drivers for HNSCC survival [46], including the four known driver genes *PIK3CA*, *PRKCI*, *SOX2* and *TP63*. *In silico* analysis of TCGA HNSCC data included in Supplementary Figure S4 further illustrates that co-amplification of these four genes occurs frequently in HNSCC, thus showing that 3q26 amplification in HNSCC is not restricted to the *SOX2* gene. In addition, cytogenetic analyses demonstrated that 3q26 amplification is an early event in HNSCC tumorigenesis, and *PIK3CA* amplification and expression has been detected in dysplasias and associated with progression to invasive carcinoma [43].

5. Conclusions

This study provides the first evidence demonstrating the clinical relevance of SOX2 expression and gene amplification in early stages of laryngeal tumorigenesis. Our findings also uncover the clinical application of SOX2 expression as an independent predictor of laryngeal cancer risk in patients with precancerous lesions beyond current WHO histological grading. Hence, targeting SOX2 expression/function may potentially lead to the development of effective molecular-targeted therapies for both cancer prevention and treatment. Further investigation is therefore encouraged.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/11/3/286/s1>, Figure S1: Standard curve showing the Log₁₀ DNA amount, in ng per μ L, plotted against threshold cycle (Ct) for different dilutions of genomic DNA in PCR-grade water by real-time PCR (A). The table shows the efficiency of amplification for each primer pair, calculated using the slope of the corresponding standard curve (B), Figure S2: Determination of the optimal cut-off values for SOX2 amplification and SOX2 expression by receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. ROC curves for SOX2 amplification (A) and SOX2 expression (B) (as percentage of positive nuclei). The optimal cut-off values calculated were 1.75 for SOX2 amplification and 12.5% for SOX2 expression. The area under de curve (AUC), with 95%CI, the p values, and the sensitivity and specificity calculated for each optimal cut-off are shown, Figure S3: Analysis of SOX2 gene amplification and mRNA expression from the TCGA cohort of 279 HNSCC patients [44] using cBioPortal [45]. Schematic representation (A) showing the number of cases with gene amplification and/or mRNA upregulation or no alteration. Correlations between SOX2 expression and gene amplification in this cohort (B), Figure S4: Gene amplification analysis of SOX2 and other driver genes (*PIK3CA*, *PRKCI* and *TP63*) mapping at 3q26 amplicon using the TCGA cohort of 279 HNSCC patients [44] and the platform cBioPortal [45]. Oncoprint illustrates frequent co-amplification of all these genes.

Author Contributions: Conceptualization, J.P.R. and J.M.G.-P.; Data curation, S.T.M. and J.M.G.-P.; Formal analysis, S.T.M., R.R., J.P.R. and J.M.G.-P.; Funding acquisition, J.P.R. and J.M.G.-P.; Investigation, R.G.-D., S.T.M., D.P.M., M.S.-C., A.R. and M.S.F.-G.; Methodology, R.G.-D., S.T.M., L.S.-F. and A.V.; Resources, A.V. and M.S.F.-G.; Supervision, J.M.G.-P.; Validation, F.H.-P.; Visualization, R.G.-D., R.R., J.P.R. and J.M.G.-P.; Writing—original draft, J.M.G.-P.; Writing—review & editing, R.G.-D., S.T.M., R.R. and J.P.R.

Funding: This study was supported by grants from the Plan Nacional de I+D+I 2013–2016 ISCIII PI13/00259, PI16/00280, CIBERONC (CB16/12/00390), and MINECO/FEDER (SAF2016-75286-R), Fundación Merck Salud (17-CC-008), the Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), PCTI-Asturias (GRUPIN14-003), Fundación Bancaria Caja de Ahorros de Asturias-IUOPA and the FEDER Funding Program from the European Union. STM (Sara Borrell Program - CD16/00103) and RR (Miguel Servet II Program - CPII6/00049) were recipients of fellowships from ISCIII.

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

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

References

- Graham, V.; Khudyakov, J.; Ellis, P.; Pevny, L. SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* **2003**, *39*, 749–765. [[CrossRef](#)]
- Kiernan, A.E.; Pelling, A.L.; Leung, K.K.; Tang, A.S.; Bell, D.M.; Tease, C.; Lovell-Badge, R.; Steel, K.P.; Cheah, K.S. Sox2 is required for sensory organ development in the mammalian inner ear. *Nature* **2005**, *434*, 1031–1035. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Boyer, L.A.; Lee, T.I.; Cole, M.F.; Johnstone, S.E.; Levine, S.S.; Zucker, J.P.; Guenther, M.G.; Kumar, R.M.; Murray, H.L.; Jenner, R.G.; et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **2005**, *122*, 947–956. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wang, J.; Rao, S.; Chu, J.; Shen, X.; Levasseur, D.N.; Theunissen, T.W.; Orkin, S.H. A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* **2006**, *444*, 364–368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **2007**, *131*, 861–872. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Avilion, A.A.; Nicolis, S.K.; Pevny, L.H.; Perez, L.; Vivian, N.; Lovell-Badge, R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Gene Dev.* **2003**, *17*, 126–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Weina, K.; Utikal, J. SOX2 and cancer: Current research and its implications in the clinic. *Clin. Transl. Med.* **2014**, *3*, 19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Maurizi, G.; Verma, N.; Gadi, A.; Marsukhani, A.; Basilico, C. Sox2 is required for tumor development and cancer cell proliferation in osteosarcoma. *Oncogene* **2018**, *37*, 4626–4632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zhu, F.; Qian, W.; Zhang, H.; Liang, Y.; Wu, M.; Zhang, Y.; Zhang, X.; Gao, Q.; Li, Y. SOX2 Is a Marker for Stem-like Tumor Cells in Bladder Cancer. *Stem Cell Rep.* **2017**, *9*, 429–437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Santini, R.; Pietrobono, S.; Pandolfi, S.; Montagnani, V.; D’Amico, M.; Penachioni, J.Y.; Vinci, M.C.; Borgognoni, L.; Stecca, B. SOX2 regulates self-renewal and tumorigenicity of human melanoma-initiating cells. *Oncogene* **2014**, *33*, 4697–4708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Singh, B.; Stoffel, A.; Goginemi, S.; Poluri, A.; Pfister, D.G.; Shaha, A.R.; Pathak, A.; Bosl, G.; Cordon-Cardo, C.; Shah, J.P.; et al. Amplification of the 3q26.3 locus is associated with progression to invasive cancer and is a negative prognostic factor in head and neck squamous cell carcinomas. *Am. J. Pathol.* **2002**, *161*, 365–371. [[CrossRef](#)]
- Heselmeyer, K.; Macville, M.; Schröck, E.; Blegen, H.; Hellström, A.C.; Shah, K.; Ried, T. Advanced-stage cervical carcinomas are defined by a recurrent pattern of chromosomal aberrations revealing high genetic instability and a consistent gain of chromosome arm 3q. *Genes Chromosome Cancer* **1997**, *19*, 233–240. [[CrossRef](#)]
- Gen, Y.; Yasui, K.; Zen, Y.; Zen, K.; Dohi, O.; Endo, M.; Tsuji, K.; Wakabayashi, N.; Itoh, Y.; Naito, Y.; et al. SOX2 identified as a target gene for the amplification at 3q26 that is frequently detected in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* **2010**, *202*, 82–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Husenet, T.; Dali, S.; Exinger, J.; Monga, B.; Jost, B.; Dembelé, D.; Martinet, N.; Thibault, C.; Huelsken, J.; Brambilla, E.; et al. SOX2 is an oncogene activated by recurrent 3q26.3 amplifications in human lung squamous cell carcinomas. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e8960. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Bass, A.J.; Watanabe, H.; Mermel, C.H.; Yu, S.; Perner, S.; Verhaak, R.G.; Kim, S.Y.; Wardwell, L.; Tamayo, P.; Gat-Viks, L.; et al. SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nat. Genet.* **2009**, *41*, 1238–1242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Husenet, T.; du Manoir, S. SOX2 in squamous cell carcinoma: Amplifying a pleiotropic oncogene along carcinogenesis. *Cell Cycle* **2010**, *9*, 1480–1486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Maier, S.; Wilbertz, T.; Braun, M.; Scheble, V.; Reischl, M.; Mikut, R.; Menon, R.; Nikolov, P.; Petersen, K.; Beschoner, C.; et al. SOX2 amplification is a common event in squamous cell carcinomas of different organ sites. *Hum. Pathol.* **2011**, *42*, 1078–1088. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Rudin, C.M.; Durinck, S.; Stawiski, E.W.; Poirier, J.T.; Modrusan, Z.; Shames, D.S.; Bergbower, E.A.; Guan, Y.; Shin, J.; Guillory, J.; et al. Comprehensive genomic analysis identifies SOX2 as a frequently amplified gene in small-cell lung cancer. *Nat. Genet.* **2012**, *44*, 1111–1116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Rodríguez-Pinilla, S.M.; Sarrío, D.; Moreno-Bueno, G.; Rodríguez-Gil, Y.; Martínez, M.A.; Hernández, L.; Hardisson, D.; Reis-Filho, J.S.; Palacios, J. Sox2: A possible driver of the basal-like phenotype in sporadic breast cancer. *Mod. Pathol.* **2007**, *20*, 474–481. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Wang, Q.; He, W.; Lu, C.; Wang, Z.; Wang, J.; Gierksky, K.E.; Nesland, J.M.; Suo, Z. Oct3/4 and Sox2 are significantly associated with an unfavorable clinical outcome in human esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* **2009**, *29*, 1233–1241. [[PubMed](#)]
21. Neumann, J.; Bahr, F.; Horst, D.; Kriegl, L.; Engel, J.; Luque, R.M.; Gerhard, M.; Kirchner, T.; Jung, A. SOX2 expression correlates with lymph-node metastases and distant spread in right-sided colon cancer. *BMC Cancer* **2011**, *11*, 518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Zhang, J.; Chang, D.Y.; Mercado-Urbe, I.; Liu, J. Sex-determining region Y-box 2 expression predicts poor prognosis in human ovarian carcinoma. *Hum. Pathol.* **2012**, *43*, 1405–1412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Lundberg, I.V.; Löfgren Burström, A.; Edin, S.; Eklöf, V.; Öberg, Å.; Stenling, R.; Palmqvist, R.; Wikberg, M.L. SOX2 expression is regulated by BRAF and contributes to poor patient prognosis in colorectal cancer. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e101957. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. WHO Classification of Head and Neck Tumours. *WHO/IARC Classification of Tumours*, 4th ed.; El-Naggar, A.K., Chan, J.K.C., Grandis, J.R., Takata, T., Slootweg, P.J., Eds.; IARC: Lyon, France, 2017; Volume 9, ISBN 978-92-832-2438-9.
25. Rodrigo, J.P.; Álvarez-Alija, G.; Menéndez, S.T.; Mancebo, G.; Allonca, E.; García-Carracedo, D.; Fresno, M.F.; Suárez, C.; García-Pedrero, J.M. Cortactin and focal adhesion kinase as predictors of cancer risk in patients with laryngeal premalignancy. *Cancer Prev. Res.* **2011**, *4*, 1333–1341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Bourguignon, L.Y.; Wong, G.; Earle, C.; Chen, L. Hyaluronan-CD44v3 interaction with Oct4-Sox2-Nanog promotes miR-302 expression leading to self-renewal, clonal formation, and cisplatin resistance in cancer stem cells from head and neck squamous cell carcinoma. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 32800–32824. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Keysar, S.B.; Le, P.N.; Miller, B.; Jackson, B.C.; Eagles, J.R.; Nieto, C.; Kim, J.; Tang, B.; Glogowska, M.J.; Morton, J.J.; et al. Regulation of head and neck squamous cancer stem cells by PI3K and SOX2. *J. Nat. Cancer Inst.* **2016**, *109*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Lee, S.H.; Oh, S.Y.; Do, S.I.; Lee, H.J.; Kang, H.J.; Rho, Y.S.; Bae, W.J.; Lim, Y.C.; et al. SOX2 regulates self-renewal and tumorigenicity of stem-like cells of head and neck squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer* **2014**, *111*, 2122–2130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Schröck, A.; Bode, M.; Göke, F.J.; Bareiss, F.M.; Schairer, R.; Wang, H.; Weichert, W.; Franzen, A.; Kirsten, R.; van Bremen, T.; et al. Expression and role of the embryonic protein SOX2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* **2014**, *35*, 1636–1642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Bochen, F.; Adisurya, H.; Wemmert, S.; Lerner, C.; Greiner, M.; Zimmermann, R.; Hasenfus, A.; Wagner, M.; Smola, S.; Pfuhl, T.; et al. Effect of 3q oncogenes SEC62 and SOX2 on lymphatic metastasis and clinical outcome of head and neck squamous cell carcinomas. *Oncotarget* **2017**, *8*, 4922–4934. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

31. Bayo, P.; Jou, A.; Stenzinger, A.; Shao, C.; Gross, M.; Jensen, A.; Grabe, N.; Mende, C.H.; Rados, P.V.; Debus, J.; et al. Loss of SOX2 expression induces cell motility via vimentin up-regulation and is an unfavorable risk factor for survival of head and neck squamous cell carcinoma. *Mol. Oncol.* **2015**, *9*, 1704–1719. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Basu-Roy, U.; Seo, E.; Ramanathapuram, L.; Rapp, T.B.; Perry, J.A.; Orkin, S.H.; Mansukhani, A.; Basilico, C. Sox2 maintains self renewal of tumor-initiating cells in osteosarcomas. *Oncogene* **2012**, *31*, 2270–2282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Basu-Roy, U.; Bayin, N.S.; Rattanakorn, K.; Han, E.; Placantonakis, D.G.; Mansukhani, A.; Basilico, C. Sox2 antagonizes the Hippo pathway to maintain stemness in cancer cells. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kawaguchi, H.; El-Naggar, A.K.; Papadimitrakopoulou, V.; Ren, H.; Fan, Y.H.; Feng, L.; Lee, J.J.; Kim, E.; Hong, W.K.; Lippman, S.M.; et al. Podoplanin: A novel marker for oral cancer risk in patients with oral premalignancy. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 354–360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Rodrigo, J.P.; García-Carracedo, D.; González, M.V.; Mancebo, G.; Fresno, M.F.; García-Pedrero, J. Podoplanin expression in the development and progression of laryngeal squamous cell carcinomas. *Mol. Cancer* **2010**, *9*, 48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Rodrigo, J.P.; Villaronga, M.Á.; Menéndez, S.T.; Hermida-Prado, F.; Quer, M.; Vilaseca, I.; Allonca, E.; Pedregal Mallo, D.; Astudillo, A.; García-Pedrero, J.M. A Novel Role for Nanog As An Early Cancer Risk Marker In Patients With Laryngeal Precancerous Lesions. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 11110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Atsumi, N.; Ishii, G.; Kojima, M.; Sanada, M.; Fujii, S.; Ochiai, A. Podoplanin, a novel marker of tumor-initiating cells in human squamous cell carcinoma A431. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *373*, 36–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Gale, N.; Michaels, L.; Luzar, B.; Poljak, M.; Zidar, N.; Fischinger, J.; Cardesa, A. Current review on squamous intraepithelial lesions of the larynx. *Histopathology* **2009**, *54*, 639–656. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Nankivell, P.; Weller, M.; McConkey, C.; Paleri, V.; Mehanna, H. Biomarkers in laryngeal dysplasia: A systematic review. *Head Neck* **2011**, *33*, 1170–1176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Rodrigo, J.P.; García-Pedrero, J.M.; Suárez, C.; Takes, R.P.; Thompson, L.D.; Slootweg, P.J.; Woolgar, J.A.; Westra, W.H.; Brakenhoff, R.H.; Rinaldo, A.; et al. Biomarkers predicting malignant progression of laryngeal epithelial precursor lesions: A systematic review. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **2012**, *269*, 1073–1083. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Bora-Singhal, N.; Nguyen, J.; Schaal, C.; Perumal, D.; Singh, S.; Coppola, D.; Chellappan, S. YAP1 Regulates OCT4 Activity and SOX2 Expression to Facilitate Self-Renewal and Vascular Mimicry of Stem-Like Cells. *Stem Cells* **2015**, *33*, 1705–1718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Bae, K.M.; Dai, Y.; Vieweg, J.; Siemann, D.W. Hypoxia regulates SOX2 expression to promote prostate cancer cell invasion and sphere formation. *Am. J. Cancer Res.* **2016**, *6*, 1078–1088. [[PubMed](#)]
43. Woenckhaus, J.; Steger, K.; Werner, E.; Fenic, I.; Gamedinger, U.; Dreyer, T.; Stahl, U. Genomic gain of PIK3CA and increased expression of p110alpha are associated with progression of dysplasia into invasive squamous cell carcinoma. *J. Pathol.* **2002**, *198*, 335–342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* **2015**, *517*, 576–582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Cerami, E.; Gao, J.; Dogrusoz, U.; Gross, B.E.; Sumer, S.O.; Aksoy, B.A.; Jacobsen, A.; Byrne, C.J.; Heuer, M.L.; Larsson, E.; et al. The cBio cancer genomics portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* **2012**, *2*, 401–404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Davidson, M.A.; Shanks, E.J. 3q26-29 Amplification in head and neck squamous cell carcinoma: A review of established and prospective oncogenes. *FEBS J.* **2017**, *284*, 2705–2731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Fields, A.P.; Justilien, V.; Murray, N.R. The chromosome 3q26 OncCassette: A multigenic driver of human cancer. *Adv. Biol. Regul.* **2016**, *60*, 47–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]





Article

Prognostic Significance of the Pluripotency Factors NANOG, SOX2, and OCT4 in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas

Daniel Pedregal-Mallo ^{1,2,3}, Francisco Hermida-Prado ^{2,3,†}, Rocío Granda-Díaz ^{2,3,4,†}, Irene Montoro-Jiménez ^{2,3}, Eva Allonca ^{2,3,4}, Esperanza Pozo-Agundo ^{2,3}, Mónica Álvarez-Fernández ^{2,3}, César Álvarez-Marcos ^{1,2,3}, Juana M. García-Pedrero ^{2,3,4,*} and Juan Pablo Rodrigo ^{1,2,3,4,*}

¹ Department of Otolaryngology, Hospital Universitario Central de Asturias, 33011 Oviedo, Spain; pedregal.dm@gmail.com (D.P.-M.); caalvarez@uniovi.es (C.Á.-M.)

² Department of Head and Neck Cancer, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), 33011 Oviedo, Spain; franjhermida@gmail.com (F.H.-P.); rociagd281@gmail.com (R.G.-D.); imj21897@gmail.com (I.M.-J.); ynkcl@hotmail.com (E.A.); espe6196@hotmail.com (E.P.-A.); maf.finba@gmail.com (M.Á.-F.)

³ Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), Universidad de Oviedo, 33006 Oviedo, Spain

⁴ Ciber de Cáncer (CIBERONC), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain

* Correspondence: juanagp.finba@gmail.com (J.M.G.-P.); jprodrigo@uniovi.es (J.P.R.)

† These authors contributed equally to this work.

Received: 23 April 2020; Accepted: 2 July 2020; Published: 4 July 2020



Abstract: Cancer stem cells (CSCs) play major roles in tumor initiation, progression, and resistance to cancer therapy. Several CSC markers have been studied in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC), including the pluripotency factors NANOG, SOX2, and OCT4; however, their clinical significance is still unclear. NANOG, SOX2, and OCT4 expression was evaluated by immunohistochemistry in 348 surgically-treated HNSCC, and correlated with clinicopathological parameters and patient outcomes. mRNA expression was further analyzed in 530 *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) HNSCC. NANOG protein expression was detected in 250 (72%) cases, more frequently in patients with lymph node metastasis ($p = 0.003$), and was an independent predictor of better survival in multivariate analysis. While OCT4 expression was undetectable, SOX2 expression was observed in 105 (30%) cases, and strongly correlated with NANOG expression. Combined expression of both proteins showed the highest survival rates, and double-negative cases the worst survival. Strikingly, the impact of NANOG and SOX2 on outcome varied depending on tumor site and lymph node infiltration, specifically showing prognostic significance in pharyngeal tumors. Correlation between NANOG and SOX2 at mRNA and protein was specifically observed in node positive (N+) patients, and consistently correlated with better survival rates. According to our findings, NANOG protein expression is frequent in HNSCC, thereby emerging as an independent predictor of better prognosis in pharyngeal tumors. Moreover, this study uncovers a differential impact of NANOG and SOX2 expression on HNSCC prognosis, depending on tumor site and lymph node infiltration, which could facilitate high-risk patient stratification.

Keywords: head and neck squamous cell carcinoma; NANOG; SOX2; OCT4; prognosis; lymph node metastasis

1. Introduction

Head and neck cancer is the seventh most common cancer worldwide, with an incidence of more than 890,000 new cases annually, and a mortality of 450,000 deaths each year [1]. More than 90% are head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC), arising in the mucosal surfaces of the upper aerodigestive tract. The main risk factors for the development of HNSCC include tobacco smoking and excessive alcohol consumption, which show a synergistic effect [2]. Other factors, such as genetic background, viral infection by human papillomavirus (HPV), diet, geographic, and socioeconomic factors have also been related to HNSCC. Despite the continuous advances in treatment options, the survival of HNSCC patients has barely improved [1,2]. One of the major reasons and challenges for clinical management is the development of treatment resistance that ultimately leads to disease control failure. This has been attributed to the persistence of highly resistant cancer stem cell (CSC) subpopulations.

Many evidences indicate that tumors are complex heterogeneous structures with very distinct cell subpopulations composing the tumor mass, including a subset of pluripotent cells known as CSCs. These cells exhibit properties usually associated with embryonic stem cells, and it has been demonstrated that CSCs contribute to tumorigenesis, tumor differentiation, maintenance, spread, and recurrence [3]. Consequently, the presence of CSC subpopulations with self-renewal capacity and multipotency properties could also have an important impact on the prognosis of HNSCC patients.

The pluripotency factors NANOG, SOX2, and OCT4 have been reported as CSC markers and key regulators in HNSCC and other cancers [4–12]. These transcription factors are able to maintain the self-renewal capacity in embryonic stem cells. Their combined overexpression has been used to identify CSC populations in squamous cell carcinomas [13–15]. OCT4 plays an important role in maintaining pluripotency and undifferentiated status in embryonic stem cells [16] and has been associated with tumor progression and poor prognosis in HNSCC [14,17]. NANOG is a downstream target of OCT3/4 [18], and, similarly to that factor, has been correlated with tumorigenesis, loss of differentiation, invasion, and metastasis [14,17]. SOX2 is a transcription factor belonging to the SOX family, essential for self-renewal in stem cells and neural progenitor cells [19]. SOX2 takes part in cancer stemness and its expression has been associated with CD44 and ALDH1 expression and correlated with oral squamous cell carcinoma (OSCC) metastasis [20].

Patients who suffer from HNSCC experiment with very different clinical outcomes in spite of standardized treatments, so a better knowledge of molecular profiles and their impact on patients' prognosis is needed. To this purpose, the present study investigates the role of pluripotency factors NANOG, SOX2, and OCT4 in a large homogeneous cohort of 348 HNSCC patients to ascertain their potential impact on patient prognosis and disease outcome.

2. Patients and Methods

2.1. Patients and Tissue Specimens

We retrospectively collected surgical tissue specimens from HNSCC patients who underwent resection of their tumors at the Hospital Universitario Central de Asturias between 1990 and 2010, in accordance with approved institutional review board guidelines. All experimental procedures were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Ethics Committee of the Hospital Universitario Central de Asturias and by the Regional CEIC from Principado de Asturias (date of approval 5 May 2016; approval number: 70/16) for the PI16/00280 project. The formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples and data from donors included in this study were provided by the Principado de Asturias BioBank (PT17/0015/0023), integrated in the Spanish National Biobanks Network, and they were processed following standard operating procedures with the appropriate approval of the Ethical and Scientific Committees. A large unbiased homogenous cohort of surgically-treated HNSCC patients was selected for study according to the following criteria: (a) having a single primary surgically-treated tumor in the oropharynx, hypopharynx, or larynx; (b)

confirmed microscopically clear surgical margins; (c) no treatments prior to surgery; (d) HPV-negative tumors; (e) a minimum follow up of five years.

Information on HPV status was available for all the patients. HPV detection was performed using p16 immunohistochemistry, high-risk HPV DNA detection by in situ hybridization, and genotyping by GP5+/6+-PCR, as previously reported [21,22].

For mRNA analysis, surgical tissue specimens from 15 patients with HNSCC who underwent surgical treatment at the Hospital Universitario Central de Asturias were prospectively collected, following institutional review board guidelines. Patient-matched normal mucosa was also collected. Biopsies were sharply excised, placed in sterile tubes, and stored in RNA later at -80°C . Primary keratinocytes from non-oncologic patients without exposure to tobacco carcinogens were used as controls.

2.2. Tissue Microarray (TMA) Construction and Immunohistochemistry

Three morphologically representative areas (1 mm cylinders) were selected from each individual tumor paraffin block for the construction of tissue microarrays (TMAs) as described previously [21], containing a total of 348 HNSCC (229 oropharyngeal, 60 hypopharyngeal, and 59 laryngeal carcinomas). In addition, each TMA included three cores of normal epithelium (tonsillar, pharyngeal, and laryngeal mucosa obtained from non-oncologic patients) as an internal negative control.

The TMAs were cut into $3\ \mu\text{m}$ sections and dried on Flex IHC microscope slides (Dako, Glostrup, Denmark). The sections were deparaffinized with standard xylene and hydrated through graded alcohols into water. Antigen retrieval was performed using Envision Flex Target Retrieval solution, high pH (Dako). Staining was done at room temperature on an automatic staining workstation (Dako Autostainer Plus, Dako, Glostrup, Denmark) using NANOG (D73G4) XP[®] rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling Technology, Inc. #4903S, Leiden, The Netherlands) at 1:200 dilution, anti-SOX2 rabbit polyclonal antibody (Merck Millipore #AB5603) at 1:1000 dilution, and anti-OCT4 antibody (Abcam, Cambridge, UK #ab19857) at 1:2000 dilution. Immunodetection was carried out with the Dako EnVision Flex + Visualization System (Dako Autostainer, Dako, Glostrup, Denmark), using diaminobenzidine as chromogen. Counterstaining with hematoxylin was the final step.

A sample of testicular seminoma (a tumor known to express OCT4, NANOG, and SOX2) was used as positive control.

For NANOG expression, a semiquantitative scoring system based on staining intensity was applied, as previously established [23], and divided into three categories: negative (absence of staining, score 0), weak to moderate (some cytoplasmic staining in tumor areas, score 1), and strong protein expression (intense and homogeneous cytoplasmic staining in tumor areas, score 2), with an interobserver concordance higher than 95%. For statistical purposes, NANOG staining was dichotomized as negative (score 0) versus positive (scores 1–2). SOX2 and OCT4 staining was evaluated as the percentage of tumor cells with nuclear staining. SOX2 staining scores were classified as negative or positive expression on the basis of values below or above the cut-off value of 10%.

2.3. RNA Extraction and Real-Time RT-PCR

Total RNA was extracted from fresh-frozen tissue samples and normal keratinocytes using TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), and cDNA was synthesized with the Superscript II RT-PCR System (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), according to manufacturer's protocols.

Gene expression was analyzed by real-time PCR using SYBR Green Master Mix protocol (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Reactions were run in triplicates using the specific primers detailed in Table S2, and the ribosomal coding gene RPL19 was used as endogenous control. Relative mRNA expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method and the data were expressed as the fold change in NANOG1

or SOX2 levels in the tumor sample (or matched normal epithelium) normalized to L19 levels and relative to the primary keratinocytes used as controls.

2.4. Statistical Analysis

χ^2 and Fisher's exact tests were used for comparison between categorical variables. For time-to-event analysis, Kaplan–Meier curves were plotted. Differences between survival times were analyzed by the log-rank method. Cox proportional hazards models were utilized for univariate and multivariate analyses. The hazard ratios (HR) with 95% confidence interval (CI) and *p* values were reported. All tests were two-sided. *p* values of ≤ 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Patient Characteristics

Three hundred forty-eight HNSCC patients were enrolled in this study, following the above-described inclusion criteria. Only 12 patients were women, and the mean age was 59 years (range 36 to 86 years). Most patients were habitual tobacco smokers, 196 moderate (1–50 pack-years) and 147 heavy (>50 pack-years); 321 patients were alcohol drinkers. The distribution by location was 229 oropharyngeal, 60 hypopharyngeal, and 59 laryngeal tumors. The tumors were classified according to the TNM classification system (7th edition, International Union Against Cancer): 17 tumors were classified as stage I, 21 stage II, 59 stage III, and 251 stage IV. The series included 135 well-, 139 moderately and 73 poorly differentiated tumors, determined according to the degree of differentiation of the tumor (Broder's classification). Two hundred sixteen (62%) of 348 patients received postoperative radiotherapy. The main clinicopathological features by site are shown in Table S1.

3.2. NANOG, SOX2, and OCT4 Protein Expression in HNSCC Tissue Specimens

Strong nuclear staining was detected in human seminoma, which was used as a positive control for these three proteins (Figure 1A–C). Two hundred fifty (72%) out of 348 tumors exhibited positive NANOG expression (scores 1–2) (Figure 1D–L), showing a predominantly cytoplasmic pattern, but also some nuclear staining, whereas NANOG expression was negligible in both normal epithelium and stromal cells. In addition, positive nuclear SOX2 expression in >10% of tumor cells was detected in 105 (30%) tumor samples (Figure 1M–R). None of the tumor samples showed OCT4 expression.

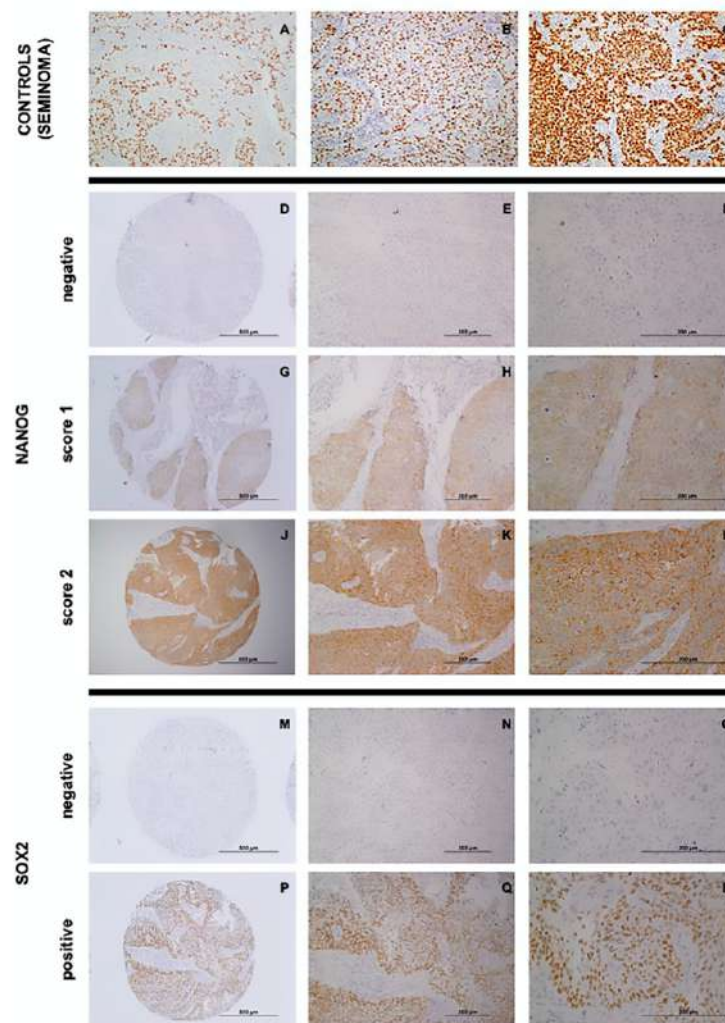


Figure 1. Immunohistochemical analysis of NANOG, SOX2, and OCT4 expression in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). (A–C) Positive controls of human seminoma samples for NANOG (A), SOX2 (B), and OCT4 (C) expression. Representative examples of HNSCC showing negative NANOG staining, score 0 (D 100 \times , E 200 \times , F 400 \times); cytoplasmic NANOG staining, score 1 (G 100 \times , H 200 \times , I 400 \times); and cytoplasmic NANOG staining, score 2 (J 100 \times , K 200 \times , L 400 \times). HNSCC samples showing negative nuclear SOX2 staining (M 100 \times , N 200 \times , O 400 \times), and positive nuclear SOX2 staining (P 100 \times Q 200 \times , R 400 \times).

There was a strong positive correlation between NANOG and SOX2 expression: 96 (91%) of the 105 SOX2-positive cases showed positive NANOG expression (Spearman coefficient 0.286, $p < 0.001$).

3.3. Associations with Clinicopathological Parameters

The relationships between NANOG and SOX2 expression and the clinicopathological parameters are shown in Table 1. Positive NANOG expression was significantly associated with node positive (N+) tumors ($p = 0.003$) and hypopharyngeal tumors ($p = 0.019$), and was also more frequent in poorly differentiated ($p = 0.084$) and advanced stage ($p = 0.204$) tumors. In contrast, positive SOX2 expression was significantly more frequent in laryngeal tumors ($p = 0.002$). No other significant associations between SOX2 expression and clinical characteristics were observed.

Table 1. Correlations between NANOG and SOX2 expression and clinicopathological characteristics.

Characteristic	No.	NANOG-Positive Expression (%)	<i>p</i> Value	SOX2-Positive Expression (%)	<i>p</i> Value
pT classification					
T1–T2	106	80 (75)	0.350	36 (34)	0.163
T3	116	78 (67)		39 (34)	
T4	125	92 (74)		30 (24)	
pN classification					
N0	94	56 (60)	0.003	29 (31)	0.896
N1–3	254	194 (76)		76 (30)	
Disease stage					
I–II	38	25 (66)	0.204	12 (32)	0.754
III	59	38 (64)		20 (34)	
IV	251	187 (75)		73 (29)	
Pathological grade					
Well-differentiated	135	88 (65)	0.084	40 (30)	0.740
Moderately differentiated	139	104 (75)		45 (32)	
Poorly differentiated	73	57 (78)		20 (27)	
Site					
Oropharynx	229	157 (69)	0.019	56 (24)	0.002
Hypopharynx	60	52 (87)		21 (35)	
Larynx	59	41 (69)		28 (47)	
Total cases	348	250 (72)		105 (30)	

3.4. Impact on Patient Prognosis

Patients harboring positive NANOG expression exhibited significantly higher disease-specific survival (DSS) and overall survival (OS) rates (log-rank, $p = 0.055$ and $p = 0.012$, respectively; Figure 2A,B). Similarly, patients with positive SOX2 expression also showed higher DSS and OS rates; however, these differences did not reach statistical significance (Figure 2C,D).

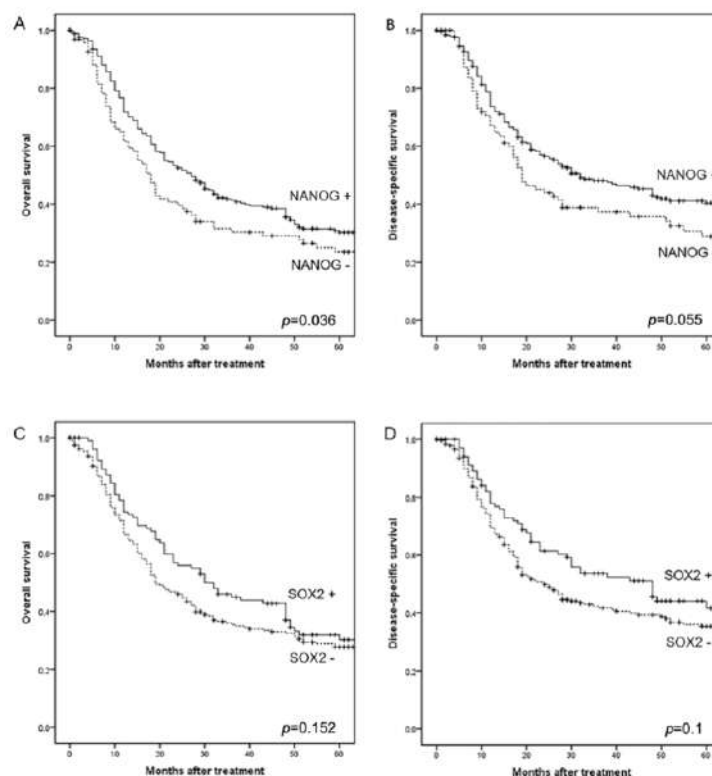


Figure 2. Kaplan-Meier overall and disease-specific survival curves in the whole series categorized by NANOG (A,B) and SOX2 expression (C,D).

On multivariate analysis, the variables with significant influence on DSS were T and N classification, histopathological grade, and NANOG expression (Table 2).

Table 2. Multivariate survival analysis (Cox regression).

Variables	HR	95% CI	<i>p</i>
T (3–4/1–2)	1.153	1.033–1.288	0.011
N (+/–)	2.619	1.756–3.906	0.000
G (3/1–2)	1.494	1.071–2.085	0.018
Location (pharynx/larynx)	0.695	0.448–1.077	0.103
NANOG (+/–)	0.783	0.662–0.927	0.004
SOX2 (+/–)	0.961	0.685–1.349	0.820

Given the relationship between NANOG and SOX2 expression and function, the impact of NANOG and SOX2 on patient prognosis was studied separately, as was the combination of both factors (Figure S1). Patients with NANOG and/or SOX2 expression had better survival rates than patients

harboring double-negative expression (five-year DSS 41% vs. 26%; log-rank, $p = 0.019$). Among the subset of patients with SOX2-negative expression, those harboring NANOG-positive expression showed better overall survival rates (five-year OS 31% vs. 17%; log-rank, $p = 0.011$). On the other hand, patients with NANOG-negative expression did not show differences in survival rates based on SOX2 immunostaining (five-year OS 44% vs. 17%; log-rank, $p = 0.266$), not surprisingly, considering that only nine NANOG-negative patients had positive SOX2 expression (Figure S1).

We also found important differences in the prognostic significance of NANOG and SOX2 expression, depending on the tumor site. Table 3 summarizes the mean DSS and OS for patients categorized by individual and combined expression of NANOG and SOX2 in the total cohort of 348 HNSCC patients, or the subgroups of oropharyngeal tumors ($n = 229$), hypopharyngeal tumors ($n = 60$), and laryngeal tumors ($n = 59$). While either NANOG expression or double-positive expression of NANOG and SOX2 were significantly correlated with improved survival rates in patients harboring pharyngeal tumors, none of these factors showed any impact on the clinical outcome of patients with laryngeal tumors.

Table 3. Correlation between NANOG and SOX2 expression, and 5-year survival rates.

Patients	NANOG-Positive Expression	NANOG-Negative Expression	p	SOX2-Positive Expression	SOX2-Negative Expression	p	Double-Positive Expression	Double-Negative Expression	p
Whole tumor series									
DSS	40%	29%	0.055	42%	35%	0.101	40%	26%	0.019
OS	28%	20%	0.012	26%	26%	0.221	24%	17%	0.015
Oropharyngeal tumors									
DSS	43%	22%	0.013	43%	35%	0.312	40%	18%	0.031
OS	29%	16%	0.011	28%	24%	0.319	25%	13%	0.027
Hypopharyngeal tumors									
DSS	26%	14%	0.126	20%	26%	0.420	20%	14%	0.095
OS	21%	13%	0.049	14%	23%	0.696	14%	13%	0.106
Laryngeal tumors									
DSS	52%	58%	0.580	57%	50%	0.681	57%	59%	0.734
OS	36%	38%	0.951	34%	38%	0.885	32%	36%	0.887

Noteworthy, the prognostic significance of NANOG expression was influenced by the presence of cervical lymph node metastasis (Figure 3). In N+ patients, NANOG expression was significantly correlated with a better disease-specific survival (five-year DSS was 32% in NANOG-positive vs. 11% in NANOG-negative cases; log-rank, $p = 0.002$), and also a better overall survival (log-rank, $p = 0.005$). In marked contrast, in the N0 subgroup of patients, NANOG expression was not associated with DSS (log-rank, $p = 0.304$) nor OS (log-rank, $p = 0.239$). Moreover, the association between NANOG and SOX2 expression was also dependent on pN classification. Thus, a strong correlation was specifically observed in N+ patients (Spearman coefficient 0.308, $p < 0.001$), but not in N0 patients (Spearman coefficient 0.029, $p = 0.831$). The impact of SOX2 expression on patient prognosis also varied with pN classification, although the differences in DSS and OS did not reach statistical significance (Figure S2).

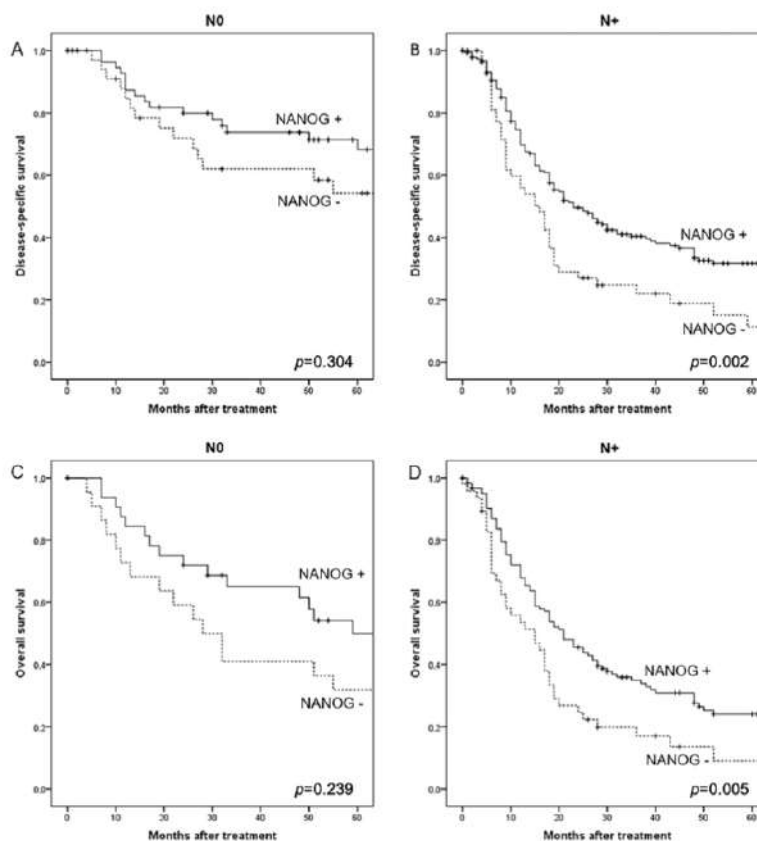


Figure 3. Kaplan–Meier disease-specific survival curves categorized by NANOG expression in N0 (A) and N+ patients (B), and overall survival curves categorized by NANOG expression in N0 (C) and N+ patients (D).

3.5. In Silico Analysis of NANOG and SOX2 mRNA Expression Using The Cancer Genome Atlas Data

In an attempt to further confirm and validate our findings, the clinical relevance of NANOG and SOX2 mRNA expression was investigated by analyzing a cohort of 530 HNSCC patients from *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) [24] using the platform cBioPortal (<http://cbioportal.org/>) [25]. Correlations with pN classification were assessed in a subset of 424 HNSCC patients with available data on lymph node stage. Patients were categorized by NANOG and SOX2 mRNA expression (high expression versus low expression) according to the pN classification. First, the correlation between NANOG and SOX2 mRNA expression was assessed separately in N0 ($n = 177$) and N+ patients ($n = 246$) (Figure S3). Concordantly with our protein data, a strong correlation between the mRNA levels of NANOG and SOX2 was specifically observed in N+ patients from the TCGA HNSCC cohort (Spearman coefficient 0.21, $p = 0.001$), but not in the N0 patients (Spearman coefficient 0.12, $p = 0.104$). Furthermore, NANOG and SOX2 mRNA expression differentially influenced patient prognosis depending on pN classification. Thus, high mRNA levels of NANOG and SOX2 were found to significantly associate

with improved survival rates in N+ patients (log-rank, $p = 0.032$ and $p = 0.036$, respectively) (Figure S4), and more strongly observed in N2+ patients (log-rank, $p = 0.009$ and $p = 0.004$, respectively) (Figure S5). By contrast, in the N0 subgroup, patients with high NANOG mRNA levels experienced a worse, although not significant, survival than those with low NANOG expression (median OS 57.47 months vs. 89.32 months; log-rank, $p = 0.139$), whereas SOX2 mRNA levels had no major impact on outcome (median OS 88.86 months vs. 84.49 months; log-rank, $p = 0.523$) (Figure S4).

As an extension of these data, NANOG and SOX2 mRNA expression was also analyzed by real-time RT-PCR in a prospective series of 15 fresh-frozen HNSCC tissue specimens and patient-matched normal epithelia. NANOG and SOX2 levels were found to frequently and significantly increase in the tumors compared to patient-matched normal epithelia and primary keratinocytes (used as non-oncologic control without exposure to tobacco carcinogens) (Figure S6). Thus, NANOG mRNA levels in the tumors ranged between 0.23- and 65.59-fold (mean 12.08), whereas in the corresponding normal counterparts they ranged between 0.20- and 27.84-fold (mean 4.35) ($p = 0.06$; Student's *t*-test). SOX2 mRNA levels were also higher in the tumors ranging between 61.87- and 636.4-fold (mean 276.6), whereas the matched normal epithelia ranged between 0.86- and 399.9-fold (mean 78.05) ($p = 0.005$; Student's *t*-test). Interestingly, histologically normal mucosa from various patients (33.3%, 5/15 cases) also exhibited increased expression of NANOG and SOX2, showing comparable mRNA levels in both the tumor sample and the patient-matched normal tissue. These molecular alterations could be related to the cancerization field due to exposure of the entire epithelial mucosa to tobacco carcinogens.

4. Discussion

The role of CSCs in head and neck tumors has been widely investigated during the last years. Several CSC markers have been described in HNSCC, such as CD44, BMI-1, CD133, ALDH1, also including the pluripotency factors NANOG, OCT4, and SOX2 [6,7,26]. However, the roles of OCT4, NANOG, and SOX2 in HNSCC prognosis is still unclear, as varying results have been reported by several groups. This prompted us to jointly investigate the significance of NANOG, SOX2, and OCT4 expression in a large unbiased cohort of HNSCC patients, and their possible influence on the clinical outcome. To this purpose, a large homogeneous series of 348 surgically-treated HPV-negative HNSCC patients was selected for study.

We have recently demonstrated that expression of NANOG and SOX2 plays a relevant role in early stages of laryngeal tumorigenesis. The expression of both proteins was found to increase in patients with precancerous lesions and, more importantly, strongly predicted the risk of progression to invasive carcinoma [23,27]. In addition, both factors have been involved in the epithelial to mesenchymal transition. NANOG expression has been inversely correlated with E-cadherin expression and positively with N-cadherin expression. High SOX2 expression has also been related with high expression of N-cadherin, but not E-cadherin expression [28]. Altogether, these results encourage us to investigate the role of NANOG and SOX2 expression in late stages of HNSCC progression and disease outcome.

Through a cooperative interaction, SOX2 and OCT4 drive pluripotent-specific expression of different genes. OCT4 and SOX2 form a heterodimer and bind to NANOG promoter in embryonic stem cells, which is crucial for NANOG gene transcription. In relation to this, a strong positive correlation between SOX2 and NANOG expression was found at both mRNA and protein levels using two large independent cohorts of HNSCC patients. Nevertheless, even though mRNA expression levels were similar (35% high NANOG and 43% high SOX2), positive NANOG protein expression was, however, detected at a much higher frequency (70%) than SOX2 expression (30%). In fact, 156 patients with positive NANOG expression concomitantly showed negative SOX2 expression in our cohort. Mechanistically, this finding reflects the partial contribution of SOX2 as a regulator of NANOG protein expression in HNSCC, and points to additional post-transcriptional mechanisms as further responsible for the high percentage of NANOG-positive cases observed. Similarly, differences in expression regulation and prognostic significance between NANOG and SOX2 have also been revealed in lung tumors, thus reinforcing its complexity and heterogeneity. In lung adenocarcinomas,

expression of SOX2 but not NANOG was detected in approximately 50% of stage I tumors [29], whereas another study reported NANOG expression without SOX2 [30], hence suggesting a SOX2-independent regulatory mechanism of NANOG expression in these tumors. In lung squamous cell carcinoma, a good correlation between NANOG and SOX2 expression was observed; however, there was no clear correlation with survival outcome [30]. Contrasting to this, NANOG has been associated with good prognosis [31], and SOX2 was found to be an independent factor of good prognosis [32]. Notably, the mRNA expression levels of both NANOG and SOX2 were found to be downregulated in subpopulations of cancer stem cells isolated from lung cancer tissue specimens [33].

On the other hand, the analysis of NANOG and SOX2 mRNA expression in a prospective series of HNSCC samples and patient-matched normal epithelia further revealed that NANOG and SOX2 levels were consistently found to increase in tumors compared to the matched normal mucosa. However, strikingly, a subset of HNSCC patients (33.3%) harbored high expression of NANOG and SOX2 in histologically normal mucosa with comparable levels to the matched tumor. This finding reflects the early occurrence of altered NANOG and SOX2 expression in head and neck carcinogenesis, also frequently detected in precancerous lesions [23,27,34], plausibly triggered by continuous exposure of the epithelial mucosa to tobacco-related carcinogens. In line with this, it has been demonstrated that nicotine plays a critical role in the development of tobacco-induced cancers by increasing the expression of various CSC markers NANOG, OCT4, CD44, and BMI-1 and regulating CSC properties and tumorigenic potential in HNSCC models *in vitro* and *in vivo* [35]. It has also been recently reported that NANOG expression significantly correlates with smoking and alcohol drinking habits in OSCC patients [34]. Similarly, nicotine and e-cigarette extracts have been found to regulate SOX2 expression and stemness through a nicotinic acetylcholine receptor (nAChR)-YAP1-E2F1 signaling axis [36]. Together, these data uncover a relationship between stemness by means of important CSC regulators, such as NANOG and SOX2, and classical chemical carcinogens in HNSCC and other tobacco-related cancers.

NANOG has been found overexpressed in different cancer types, including OSCC [4] and laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) [23]. Functionally, NANOG overexpression has been implicated in tumor transformation, tumorigenicity, metastasis, and is also correlated with poor differentiation status and chemoresistance [37]. Moreover, NANOG expression has also been associated with a better or worse prognosis in different cancers, including OSCC [34,38]. In a meta-analysis about the prognostic significance of NANOG that included nine studies on HNSCC, NANOG expression was associated with lower survival rates [39]. Contrasting with this, NANOG expression was associated with a better prognosis in our cohort and was an independent predictor in multivariate analysis. Our study also uncovered striking differences in the prognostic impact of NANOG expression, depending on the tumor site and lymph node infiltration. Thus, NANOG expression, and to a lesser extent SOX2, specifically predicted good prognosis in patients with pharyngeal but not laryngeal tumors. In addition, the impact of NANOG expression was greater in patients with lymph node metastasis than in node-negative patients, as was consistently demonstrated at both mRNA and protein levels using two large independent HNSCC cohorts. Therefore, since the clinical relevance of NANOG expression is influenced by some clinicopathological characteristics, differences in tumor localization and N classification of the patients included could explain the discrepancies between reported studies.

SOX2 expression has also been implicated in different biological processes that regulate tumor progression, such as cell proliferation, migration, invasion, tumorigenesis, antiapoptosis, and chemoresistance [40,41]. Despite multiple studies published so far exploring the role of SOX2 in cancer, its impact on disease outcome remains controversial. High expression of SOX2 has been associated with a poor prognosis in some studies [8,9,42]. However, other groups have reported that high expression of SOX2 is associated with absence of lymph node metastasis and a better prognosis in patients with OSCC [43], and also with improved clinical outcome in HNSCC patients treated with chemoradiotherapy [44]. Similarly, Chung et al. and Bochen et al. found a positive association between high SOX2 expression and HNSCC patient prognosis [45,46]. In our series, SOX2 expression

was associated with a better DSS, although not significant. A possible pleiotropic function of SOX2 in squamous cell carcinomas from other locations has been suggested, based on differential interactions with other important factors that could cooperatively contribute to the development and progression of these tumors [47]. The binding to different cofactors and enhancement or repression of other factors could result in opposed clinical outcomes, thereby explaining the apparently contradictory results.

Given the strong relationship between NANOG and SOX2 expression and function, as a further step, we analyzed the combined effect of NANOG and SOX2 expression as an integrated risk factor. We observed that patients with positive expression of both proteins exhibited the best prognosis, while the subgroup of double-negative patients clearly showed the worst prognosis. The integrated risk score could be assessed from preoperative biopsies and serve as an additional prognostic parameter. Together with other clinical parameters such as resection margins and extracapsular extension, it could help to improve patient stratification and the identification of high-risk subgroups for treatment intensification.

OCT4 has also been related to various oncogenic processes [5], such as tumor transformation, tumorigenicity, invasion, and metastasis in OSCC [15]. OCT4 expression has been widely used to identify CSC subpopulations in several carcinomas, in conjunction with other CSC markers [20,48,49]. High expression of OCT4 and NANOG has been associated with a lower OS in HNSCC patients [50]. Other publications have found a worse prognosis in patients with high expression of both NANOG and OCT4 than those with high expression of NANOG or OCT4 alone [4]. However, OCT4 expression was not detected in any of the HNSCC samples in our cohort despite the fact that strong positive nuclear staining was indeed observed in a seminoma sample used as a positive control. These varying findings could be the result of different antibodies employed for immunostaining, targeting different epitopes or different specificity for OCT4 protein isoforms. OCT4A is responsible for the pluripotency properties of embryonic stem cells, but OCT4B cannot sustain these properties [51]. Different properties and/or OCT4 isoforms could be the main cause of confusion and controversies on the role of OCT4 in the different cancer types. Noteworthy, the same OCT4 antibody herein used has been proven to successfully detect OCT4 expression in sarcoma samples by immunohistochemistry, and although OCT4 expression was strongly correlated with SOX2 expression, unlike the former, the latter was the most prevalent, and was the only one found to be clinically relevant in these tumors [52].

5. Conclusions

Our results show that NANOG protein expression is frequent in HNSCC and emerges as an independent predictor of better clinical outcome, specifically in pharyngeal but not laryngeal tumors. SOX2 expression, although less frequent, was strongly correlated with NANOG expression. Combined expression of both proteins had a stronger prognostic significance, probably suggesting a cooperative functional role between both proteins. Striking differences were uncovered regarding the clinical impact of NANOG and SOX2 expression on patient outcome, with distinct prognostic relevance depending on tumor site and lymph node infiltration. These novel findings could facilitate patient management and high-risk stratification, and also provide a plausible explanation to reconcile contradictory published data about the prognostic significance of these factors.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/7/1794/s1>, Table S1: Clinicopathological characteristics of the studied cohort of 348 HNSCC patients, Table S2: Primers used for real-time RT-PCR, Figure S1: Kaplan–Meier survival curves based on independent and combined expression of NANOG and SOX2, Figure S2: Kaplan–Meier overall survival curves categorized by SOX2 expression in the subgroups N0, N+, and N2+, Figure S3: Correlation between NANOG and SOX2 mRNA expression in a cohort of 530 HNSCC patients from *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), Figure S4: Prognostic implications of NANOG and SOX2 mRNA expression in a subset of 424 HNSCC patients with lymph node stage data from the TCGA HNSCC cohort, Figure S5: Prognostic implications of NANOG and SOX2 mRNA expression in the subset of 179 N2+ patients from the TCGA HNSCC cohort, Figure S6: Analysis of NANOG and SOX2 mRNA levels by real-time RT-PCR in 15 fresh HNSCC tumor samples and patient-matched normal epithelia.

Author Contributions: Conceptualization, J.M.G.-P. and J.P.R.; Data curation, F.H.-P., J.M.G.-P. and J.P.R.; Formal analysis, D.P.-M., F.H.-P., J.M.G.-P. and J.P.R.; Funding acquisition, J.M.G.-P. and J.P.R.; Investigation, D.P.-M., R.G.-D., I.M.-J., E.P.-A., and M.Á.-F.; Methodology, R.G.-D., E.A.; Resources, C.Á.-M. and J.P.R.; Supervision, J.M.G.-P.; Validation, F.H.-P.; Visualization, D.P.-M., F.H.-P., J.M.G.-P. and J.P.R.; Writing—original draft, D.P.-M.; Writing—review & editing, F.H.-P., M.Á.-F., J.M.G.-P. and J.P.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by grants from the Plan Nacional de I+D+I 2013–2016 ISCIII (PI16/00280 and PI19/00560) to JMGP, CIBERONC (CB16/12/00390 to JPR), the Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Ayudas a Grupos PCTI Principado de Asturias (IDI2018/155 to JPR), Fundación Bancaria Caja de Ahorros de Asturias-IUOPA, and the FEDER Funding Program from the European Union.

Acknowledgments: We thank the Principado de Asturias BioBank (PI13/0010/0046) for kindly providing their samples and technical assistance, financed jointly by Servicio de Salud del Principado de Asturias, Instituto de Salud Carlos III, and Fundación Bancaria Cajastur, and integrated in the Spanish National Biobanks Network. We also thank Juan Pérez Ortega for his excellent administrative support.

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

References

1. Chow, L.Q.M. Head and Neck Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 60–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Morse, D.E.; Psoter, W.J.; Cleveland, D.; Cohen, D.; Mohit-Tabatabai, M.; Kosis, D.L.; Eisenberg, E. Smoking and drinking in relation to oral cancer and oral epithelial dysplasia. *Cancer Causes Control* **2007**, *18*, 919–929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Clarke, M.F.; Dick, J.E.; Dirks, P.B.; Eaves, C.J.; Jamieson, C.H.M.; Jones, D.L.; Visvader, J.; Weissman, I.L.; Wahl, G.M. Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 9339–9344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Chiou, S.-H.; Yu, C.-C.; Huang, C.-Y.; Lin, S.-C.; Liu, C.-J.; Tsai, T.-H.; Chou, S.-H.; Chien, C.-S.; Ku, H.-H.; Lo, J.-F. Positive Correlations of Oct-4 and Nanog in Oral Cancer Stem-Like Cells and High-Grade Oral Squamous Cell Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 4085–4095. [[CrossRef](#)]
5. Major, A.G.; Pitty, L.P.; Farah, C.S. Cancer Stem Cell Markers in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Stem Cells Int.* **2013**, *2013*, 1–13. [[CrossRef](#)]
6. Satpute, P.S.; Hazarey, V.; Ahmed, R.; Yadav, L. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma: A review. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2013**, *14*, 5579–5587. [[CrossRef](#)]
7. Patel, S.; Shah, K.A.; Shah, M.J.; Kothari, K.C.; Rawal, R.M. Cancer stem cells and stemness markers in oral squamous cell carcinomas. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2014**, *15*, 8549–8556. [[CrossRef](#)]
8. Schröck, A.; Bode, M.; Göke, F.J.M.; Bareiss, P.M.; Schairer, R.; Wang, H.; Weichert, W.; Franzen, A.; Kirsten, R.; van Bremen, T.; et al. Expression and role of the embryonic protein SOX2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* **2014**, *35*, 1636–1642. [[CrossRef](#)]
9. Kokalj Vokač, N.; Čizmarević, B.; Zagorac, A.; Zagradišnik, B.; Lanišnik, B. An evaluation of SOX2 and hTERT gene amplifications as screening markers in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Mol. Cytogenet.* **2014**, *7*, 5. [[CrossRef](#)]
10. González-Márquez, R.; Llorente, J.L.; Rodrigo, J.P.; García-Pedrero, J.M.; Álvarez-Marcos, C.; Suárez, C.; Hermsen, M.A. SOX2 expression in hypopharyngeal, laryngeal, and sinonasal squamous cell carcinoma. *Hum. Pathol.* **2014**, *45*, 851–857. [[CrossRef](#)]
11. Baillie, R.; Tan, S.T.; Itinteang, T. Cancer Stem Cells in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma: A Review. *Front. Oncol.* **2017**, *7*, 112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Curtarelli, R.B.; Gonçalves, J.M.; dos Santos, L.G.P.; Savi, M.G.; Nör, J.E.; Mezzomo, L.A.M.; Rodríguez Cordeiro, M.M. Expression of Cancer Stem Cell Biomarkers in Human Head and Neck Carcinomas: A Systematic Review. *Stem Cell Rev. Rep.* **2018**, *14*, 769–784. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Li, X.; Wang, J.; Xu, Z.; Ahmad, A.; Li, E.; Wang, Y.; Qin, S.; Wang, Q. Expression of Sox2 and Oct4 and Their Clinical Significance in Human Non-Small-Cell Lung Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 7663–7675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Habu, N.; Imanishi, Y.; Kameyama, K.; Shimoda, M.; Tokumaru, Y.; Sakamoto, K.; Fujii, R.; Shigetomi, S.; Otsuka, K.; Sato, Y.; et al. Expression of Oct3/4 and Nanog in the head and neck squamous carcinoma cells and its clinical implications for delayed neck metastasis in stage I/II oral tongue squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* **2015**, *15*, 730. [[CrossRef](#)]
15. Fu, T.-Y.; Hsieh, I.-C.; Cheng, J.-T.; Tsai, M.-H.; Hou, Y.-Y.; Lee, J.-H.; Liou, H.-H.; Huang, S.-F.; Chen, H.-C.; Yen, L.-M.; et al. Association of OCT4, SOX2, and NANOG expression with oral squamous cell carcinoma progression. *J. Oral Pathol. Med.* **2016**, *45*, 89–95. [[CrossRef](#)]
16. Kashyap, V.; Rezende, N.C.; Scotland, K.B.; Shaffer, S.M.; Persson, J.L.; Gudas, L.J.; Mongan, N.P. Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs. *Stem Cells Dev.* **2009**, *18*, 1093–1108. [[CrossRef](#)]
17. Destro Rodrigues, M.F.S.; Sedassari, B.T.; Esteves, C.M.; de Andrade, N.P.; Altemani, A.; De Sousa, S.C.O.M.; Nunes, F.D. Embryonic stem cells markers Oct4 and Nanog correlate with perineural invasion in human salivary gland mucoepidermoid carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* **2017**, *46*, 112–120. [[CrossRef](#)]
18. Chambers, I.; Colby, D.; Robertson, M.; Nichols, J.; Lee, S.; Tweedie, S.; Smith, A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **2003**, *113*, 643–655. [[CrossRef](#)]
19. Adachi, K.; Suemori, H.; Yasuda, S.-Y.; Nakatsuji, N.; Kawase, E. Role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* **2010**, *15*, 455–470. [[CrossRef](#)]
20. Huang, C.-F.; Xu, X.-R.; Wu, T.-F.; Sun, Z.-J.; Zhang, W.-F. Correlation of ALDH1, CD44, OCT4 and SOX2 in tongue squamous cell carcinoma and their association with disease progression and prognosis. *J. Oral Pathol. Med.* **2014**, *43*, 492–498. [[CrossRef](#)]
21. Rodrigo, J.P.; Heideman, D.A.M.; García-Pedrero, J.M.; Fresno, M.F.; Brakenhoff, R.H.; Díaz Molina, J.P.; Snijders, P.J.F.; Hermsen, M.A. Time trends in the prevalence of HPV in oropharyngeal squamous cell carcinomas in northern Spain (1990–2009): HPV Incidence in Oropharynx Cancer. *Int. J. Cancer* **2014**, *134*, 487–492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Rodrigo, J.P.; Hermsen, M.A.; Fresno, M.F.; Brakenhoff, R.H.; García-Velasco, F.; Snijders, P.J.F.; Heideman, D.A.M.; García-Pedrero, J.M. Prevalence of human papillomavirus in laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas in northern Spain. *Cancer Epidemiol.* **2015**, *39*, 37–41. [[CrossRef](#)]
23. Rodrigo, J.P.; Villaronga, M.Á.; Menéndez, S.T.; Hermida-Prado, F.; Quer, M.; Vilaseca, I.; Allonca, E.; Mallo, D.P.; Astudillo, A.; García-Pedrero, J.M. A Novel Role For Nanog As An Early Cancer Risk Marker In Patients With Laryngeal Precancerous Lesions. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* **2015**, *517*, 576–582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Cerami, E.; Gao, J.; Dogrusoz, U.; Gross, B.E.; Sumer, S.O.; Aksoy, B.A.; Jacobsen, A.; Byrne, C.J.; Heuer, M.L.; Larsson, E.; et al. The cBio cancer genomics portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* **2012**, *2*, 401–404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Qian, X.; Ma, C.; Nie, X.; Lu, J.; Lenarz, M.; Kaufmann, A.M.; Albers, A.E. Biology and immunology of cancer stem (like) cells in head and neck cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2015**, *95*, 337–345. [[CrossRef](#)]
27. Granda-Díaz, R.; Menéndez, S.T.; Pedregal Mallo, D.; Hermida-Prado, F.; Rodríguez, R.; Suárez-Fernández, L.; Vallina, A.; Sánchez-Canteli, M.; Rodríguez, A.; Fernández-García, M.S.; et al. The Novel Role of SOX2 as an Early Predictor of Cancer Risk in Patients with Laryngeal Precancerous Lesions. *Cancers* **2019**, *11*, 286. [[CrossRef](#)]
28. Luo, W.; Li, S.; Peng, B.; Ye, Y.; Deng, X.; Yao, K. Embryonic Stem Cells Markers SOX2, OCT4 and Nanog Expression and Their Correlations with Epithelial-Mesenchymal Transition in Nasopharyngeal Carcinoma. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e56324. [[CrossRef](#)]
29. Sholl, L.M.; Barletta, J.A.; Yeap, B.Y.; Chirieac, L.R.; Hornick, J.L. Sox2 protein expression is an independent poor prognostic indicator in stage I lung adenocarcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* **2010**, *34*, 1193–1198. [[CrossRef](#)]
30. Park, E.; Park, S.Y.; Sun, P.L.; Jin, Y.; Kim, J.E.; Jheon, S.; Kim, K.; Lee, C.T.; Kim, H.; Chung, J.H. Prognostic significance of stem cell-related marker expression and its correlation with histologic subtypes in lung adenocarcinoma. *Oncotarget* **2016**, *7*, 42502–42512. [[CrossRef](#)]
31. Koh, Y.W.; Han, J.H.; Haam, S.; Jung, J. ALDH1 expression correlates with an epithelial-like phenotype and favorable prognosis in lung adenocarcinoma: A study based on immunohistochemistry and mRNA expression data. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2019**, *145*, 1427–1436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

32. Ying, J.; Shi, C.; Li, C.S.; Hu, L.P.; Zhang, W.D. Expression and significance of SOX2 in non-small cell lung carcinoma. *Oncol. Lett.* **2016**, *12*, 3195–3198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Masciale, V.; Grisendi, G.; Banchelli, F.; D'Amico, R.; Maiorana, A.; Sighinolfi, P.; Stefani, A.; Morandi, U.; Dominici, M.; Aramini, B. Isolation and Identification of Cancer Stem-Like Cells in Adenocarcinoma and Squamous Cell Carcinoma of the Lung: A Pilot Study. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 1394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. De Vicente, J.C.; Rodríguez-Santamarta, T.; Rodrigo, J.P.; Allonca, E.; Vallina, A.; Singhanía, A.; Donate-Pérez del Molino, P.; García-Pedrero, J.M. The Emerging Role of NANOG as an Early Cancer Risk Biomarker in Patients with Oral Potentially Malignant Disorders. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 1376. [[CrossRef](#)]
35. Yu, M.A.; Kiang, A.; Wang-Rodriguez, J.; Rahimy, E.; Haas, M.; Yu, V.; Ellies, L.G.; Chen, J.; Fan, J.B.; Brumund, K.T.; et al. Nicotine promotes acquisition of stem cell and epithelial-to-mesenchymal properties in head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e51967. [[CrossRef](#)]
36. Schaal, C.M.; Bora-Singhal, N.; Kumar, D.M.; Chellappan, S.P. Regulation of Sox2 and stemness by nicotine and electronic-cigarettes in non-small cell lung cancer. *Mol. Cancer* **2018**, *17*, 149. [[CrossRef](#)]
37. Tsai, L.-L.; Yu, C.-C.; Chang, Y.-C.; Yu, C.-H.; Chou, M.-Y. Markedly increased Oct4 and Nanog expression correlates with cisplatin resistance in oral squamous cell carcinoma: Stemness markers and chemo-resistance. *J. Oral Pathol. Med.* **2011**, *40*, 621–628. [[CrossRef](#)]
38. Lee, H.-J.; Kang, Y.-H.; Lee, J.-S.; Byun, J.-H.; Kim, U.-K.; Jang, S.-J.; Rho, G.-J.; Park, B.-W. Positive expression of NANOG, mutant p53, and CD44 is directly associated with clinicopathological features and poor prognosis of oral squamous cell carcinoma. *BMC Oral Health* **2015**, *15*, 153. [[CrossRef](#)]
39. Zhao, L.; Liu, J.; Chen, S.; Fang, C.; Zhang, X.; Luo, Z. Prognostic significance of NANOG expression in solid tumors: A meta-analysis. *Oncotargets Ther.* **2018**, *11*, 5515–5526. [[CrossRef](#)]
40. Liu, K.; Lin, B.; Zhao, M.; Yang, X.; Chen, M.; Gao, A.; Liu, F.; Que, J.; Lan, X. The multiple roles for Sox2 in stem cell maintenance and tumorigenesis. *Cell. Signal.* **2013**, *25*, 1264–1271. [[CrossRef](#)]
41. Chou, M.-Y.; Hu, F.-W.; Yu, C.-H.; Yu, C.-C. Sox2 expression involvement in the oncogenicity and radiochemoresistance of oral cancer stem cells. *Oral Oncol.* **2015**, *51*, 31–39. [[CrossRef](#)]
42. Du, L.; Yang, Y.; Xiao, X.; Wang, C.; Zhang, X.; Wang, L.; Zhang, X.; Li, W.; Zheng, G.; Wang, S.; et al. Sox2 nuclear expression is closely associated with poor prognosis in patients with histologically node-negative oral tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* **2011**, *47*, 709–713. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Züllig, L.; Roessle, M.; Weber, C.; Graf, N.; Haerle, S.K.; Jochum, W.; Stoeckli, S.J.; Moch, H.; Huber, G.F. High sex determining region Y-box 2 expression is a negative predictor of occult lymph node metastasis in early squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Eur. J. Cancer* **2013**, *49*, 1915–1922. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Baumeister, P.; Hollmann, A.; Kitz, J.; Afthonidou, A.; Simon, F.; Shakhtour, J.; Mack, B.; Kranz, G.; Libl, D.; Leu, M.; et al. High Expression of EpCAM and Sox2 is a Positive Prognosticator of Clinical Outcome for Head and Neck Carcinoma. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 14582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Chung, J.H.; Jung, H.R.; Jung, A.R.; Lee, Y.C.; Kong, M.; Lee, J.-S.; Eun, Y.-G. SOX2 activation predicts prognosis in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1677. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Bochen, F.; Adisurya, H.; Wemmert, S.; Lerner, C.; Greiner, M.; Zimmermann, R.; Hasenfus, A.; Wagner, M.; Smola, S.; Pfuhl, T.; et al. Effect of 3q oncogenes *SEC62* and *SOX2* on lymphatic metastasis and clinical outcome of head and neck squamous cell carcinomas. *Oncotarget* **2017**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Hussenet, T.; Du Manoir, S. SOX2 in squamous cell carcinoma: Amplifying a pleiotropic oncogene along carcinogenesis. *Cell Cycle* **2010**, *9*, 1480–1486. [[CrossRef](#)]
48. Chen, Y.-C.; Chang, C.-J.; Hsu, H.-S.; Chen, Y.-W.; Tai, L.-K.; Tseng, L.-M.; Chiou, G.-Y.; Chang, S.-C.; Kao, S.-Y.; Chiou, S.-H.; et al. Inhibition of tumorigenicity and enhancement of radiochemosensitivity in head and neck squamous cell cancer-derived ALDH1-positive cells by knockdown of Bmi-1. *Oral Oncol.* **2010**, *46*, 158–165. [[CrossRef](#)]
49. Zhang, P.; Zhang, Y.; Mao, L.; Zhang, Z.; Chen, W. Side population in oral squamous cell carcinoma possesses tumor stem cell phenotypes. *Cancer Lett.* **2009**, *277*, 227–234. [[CrossRef](#)]
50. Fan, Z.; Li, M.; Chen, X.; Wang, J.; Liang, X.; Wang, H.; Wang, Z.; Cheng, B.; Xia, J. Prognostic Value of Cancer Stem Cell Markers in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Meta-analysis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 43008. [[CrossRef](#)]

51. Wang, X.; Dai, J. Isoforms of OCT4 Contribute to the Confusing Diversity in Stem Cell Biology. *Stem Cells* **2010**, *28*, 885–893. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Menendez, S.T.; Rey, V.; Martinez-Cruzado, L.; Gonzalez, M.V.; Morales-Molina, A.; Santos, L.; Blanco, V.; Alvarez, C.; Estupiñan, O.; Allonca, E.; et al. SOX2 Expression and Transcriptional Activity Identifies a Subpopulation of Cancer Stem Cells in Sarcoma with Prognostic Implications. *Cancers* **2020**, *12*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).