

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

# UAB

## Universitat Autònoma de Barcelona

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIRUGÍA Y CIENCIAS MORFOLÓGICAS.  
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA.

**ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE LA INMUNOEXPRESIÓN  
DE LA PODOPLANINA EN EL CARCINOMA ESCAMOSO DE  
CABEZA Y CUELLO VIRUS PAPILOMA HUMANO NEGATIVO**

Tesis doctoral

Doctoranda: Natàlia Bejarano Panadés

Tutor: Miquel Quer i Agustí

Director: Julio Rama López

Universitat Autònoma de Barcelona, 2023



## **Agradecimientos**

A los que me habéis acompañado y ayudado en este camino

A mi madre, allá donde esté

A mi padre, un incondicional infatigable

A Encarna y a Rita, por su amor puro

## **Abreviaturas**

AJCC American Joint Committee on Cancer

AKT protein kinase B

BCL2 B-cell CLL/lymphoma 2

CAF cancer-associated fibroblasts

CDK cyclin dependent kinase

CECC carcinoma escamoso de cabeza y cuello

CLEC-2 C-type lectin-like receptor 2

Doc-1 deleted in oral cancer-1

EGFR epidermal growth factor receptor

ERM ezrin/radixin/moesin family of membrane cytoskeleton linker proteins

GLOBOCAN Global Cancer Observatory

IARC International Agency for Research on Cancer

INF interferón

IPN invasión perineural

IRS immunoreactive score

IVL invasión vasculolinfática

LOX enzima lisiloxidasa

MAPK mitogen activated protein kinase

MDM2 mouse double minute 2 homolog

NCI National Cancer Institute

PI3K-AKT-mTOR phosphoinositide 3 kinase-AKT-mammalian target of rapamycin

PLAG platelet aggregation stimulation

RAR-beta receptor de ácido retinoico

Rb retinoblasma

ROCK Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase

RTK tyrosin kinasas

SPSS Statistical Package for the Social Science

TEM transición epitelio-mesénquimal

TF transcription factor

TGF $\alpha$  transforming growth factor alpha

TGF $\beta$  transforming growth factor  $\beta$

TIMP tissue inhibitor of metalloproteinase

TP53 tumor protein p53

UICC Unión internacional contra el cáncer

VEB virus de Epstein-Barr

VEGF vascular endotelial growth factor

VPH virus papiloma humano

WHO World Health Organization

## ÍNDICE

ABSTRACT .....	1
RESUMEN .....	2
1. INTRODUCCIÓN .....	3
1.1. Carcinoma escamoso de cabeza y cuello .....	3
1.1.1. Epidemiología del carcinoma escamoso de cabeza y cuello .....	3
1.1.2. Patofisiología del carcinoma escamoso de cabeza y cuello .....	4
1.1.2.1. Carcinogénesis. Alteraciones genómicas y de la señalización celular. Cancerización del campo .....	4
1.1.2.2. Transición epitelio-mesenquimal .....	9
1.2. Podoplanina .....	10
1.2.1. Definición .....	10
1.2.2. Estructura molecular .....	11
1.2.3. Funciones e interactoma .....	12
1.2.4. Papel de la podoplanina en el cáncer .....	13
1.3. Justificación del estudio .....	16
2. HIPÓTESIS .....	17
3. OBJETIVOS .....	18
3.1. Objetivo principal .....	18
3.2. Objetivos secundarios .....	18
4. MATERIAL Y MÉTODOS .....	19
5. RESULTADOS .....	24
5.1. Características clinicopatológicas .....	24
5.2. Inmunoexpresión de la podoplanina .....	28
5.3. Relación de la expresión de la podoplanina y las características clinicopatológicas .....	28
5.4. Relación entre la recurrencia locorregional, las características clinicopatológicas y la expresión de la podoplanina .....	31
5.5. Análisis de supervivencia .....	32
6. DISCUSIÓN .....	34
7. CONCLUSIÓN .....	48
8. LÍNEAS DE FUTURO .....	49
9. BIBLIOGRAFÍA .....	50
10. ANEXO .....	63

## **ABSTRACT**

Head and neck cancer defines a group of neoplasms originating in the oral cavity, pharynx and larynx. The most frequent histology is squamous cell carcinoma. Podoplanin is implicated in the carcinogenesis of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Podoplanin is a transmembrane mucoprotein that is expressed in the lymphatic endothelium and can be overexpressed in tumor cells and in their stroma. Expression of podoplanin in tumor cells induces platelet aggregation through binding to the platelet receptor CLEC-2. Podoplanin modulates the transduction signals that regulate proliferation, differentiation, migration, invasion, and epitheliomesenchymal transition (EMT), and also tumor cell acquires a pluripotent stem cell profile. All of them are fundamental steps in the malignant progression of HNSCC and in the development of metastases. The expression of podoplanin in the stroma, in the cancer-associated fibroblasts (CAF) and in the immune cells allows the remodeling of the extracellular matrix and the acquisition of a tumor microenvironment with immunosuppressive characteristics. Podoplanin promotes invasion through several patterns: collective invasion, partial EMT, or individual cell. In addition, podoplanin acts as a co-inhibitory molecule for T cells, enabling immune evasion.

This research work examined the expression of podoplanin in human papillomavirus HPV-negative HNSCC and assessed its correlation with clinicopathological features (extracapsular extension, perineural and vascular or lymphatic invasion, state of resection margins) and TNM staging. In addition, it evaluated the prognostic role of podoplanin immunoexpression in the presence of locoregional recurrence and overall survival.

The study design was through a retrospective observational analysis of 70 cases affected by HPV-negative HNSCC treated surgically between 2012 and 2017, with a minimum follow-up of 5 years. The locations were the oral cavity, oropharynx, larynx, and hypopharynx. TNM staging was defined according to the seventh edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC-TNM). Podoplanin expression was analyzed through immunoreactivity score (IRS) and was defined as low-grade immunoexpression (corresponding to an IRS of 0 to 3) and high-grade immunoexpression (corresponding to an IRS>3).

The high degree of podoplanin expression suggested aggressive tumor behavior by presenting a statistically significant association with locoregional recurrence ( $p=0.002$ ), with extracapsular extension ( $p=0.028$ ) and affected resection margins ( $p=0.028$ ). However, no statistically significant differences were found in overall survival with the degree of podoplanin expression.

## **RESUMEN**

El cáncer de cabeza y cuello define un grupo de neoplasias originadas en la cavidad oral, faringe y laringe, siendo la estirpe histológica escamosa la más frecuente. La podoplanina está implicada en la carcinogénesis del carcinoma escamoso de cabeza y cuello (CECC). La podoplanina es una mucoproteína transmembrana expresada en el endotelio linfático y puede sobreexpresarse en las células tumorales y en su estroma. La expresión de la podoplanina en las células tumorales induce la agregación plaquetar a través de la unión con el receptor plaquetar CLEC-2. También modula las señales de transducción que regulan la proliferación, diferenciación, migración, invasión, y la transición epitelio-mesénquimal, y además, permite adquirir a la célula tumoral un perfil pluripotencial de célula madre. Todos ellos, pasos fundamentales en la progresión maligna del CECC y en el desarrollo de las metástasis. La expresión de la podoplanina en el estroma, en los fibroblastos asociados al cáncer (CAF) y en las células inmunes permite la remodelación de la matriz extracelular y adquirir un microambiente tumoral con características inmunosupresivas. La podoplanina promueve la invasión a través de varios patrones: invasión colectiva, TEM parcial o celular individual. Además, la podoplanina actúa como una molécula coinhibitoria de las células T posibilitando la evasión inmune.

Este trabajo de investigación examinó la expresión de la podoplanina en los CECC virus papiloma humano (VPH) VPH negativos y valoró su correlación con los parámetros clínicopatológicos (extensión extracapsular, invasión perineural y vasculolinfática, estado de los márgenes de resección) y estadiaje TNM. Además, evaluó la potencialidad pronóstica de la inmunoexpresión de la podoplanina con la presencia de recidiva locoregional y la supervivencia global.

El diseño del estudio fue mediante un análisis retrospectivo observacional de 70 casos afectos de CECC VPH negativo tratados quirúrgicamente entre el 2012 y 2017, con un seguimiento mínimo de 5 años. Las localizaciones fueron la cavidad oral, orofaringe, laringe e hipofaringe. El estadiaje TNM fue definido acorde a la clasificación de los tumores malignos de la séptima edición de la Unión Internacional Contra el Cáncer. La expresión de la podoplanina se analizó a través de la inmunoreactividad (IRS) y se definió en inmunoexpresión de bajo grado (correspondiente a un IRS de 0 a 3) y de alto grado (correspondiente a un IRS >3).

El grado alto de expresión de la podoplanina sugirió un comportamiento tumoral agresivo al presentar una asociación estadísticamente significativa con la recidiva locoregional ( $p=0,002$ ), con la extensión extracapsular ( $p=0,028$ ) y con los márgenes de resección afectos ( $p=0,028$ ). No obstante, no se objetivaron diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia global con el grado de expresión de la podoplanina.

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1. CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO**

### **1.1.1. Epidemiología del carcinoma escamoso de cabeza y cuello**

La clasificación de los tumores de cabeza y cuello de la World Health Organization (WHO)<sup>1 2</sup> engloba un grupo amplio de neoplasias derivadas del tracto aerodigestivo superior, cavidad oral, faringe, laringe, tráquea, cavidad nasal y senos paranasales, glándulas salivares, oído y hueso temporal, tumores odontogénicos y los derivados del sistema paraganglionar. La variedad de estirpes histopatológicas malignas descritas refleja la complejidad del área de cabeza y cuello, siendo además un conjunto de neoplasias que presentan una gran diversidad genética y morbimortalidad. No obstante, en más de los 90% de los casos corresponden a carcinomas escamosos o alguna de sus variantes (como el linfoepitelioma, carcinoma verrucoso o el carcinoma indiferenciado).

Los carcinomas escamosos de cabeza y cuello (CECC), representan la sexta neoplasia más frecuente, siendo el 4,5% a nivel mundial. La incidencia global es variable según factores demográficos y regiones geográficas, y se ha estimado un aumento de la incidencia a 1,08 millones de casos nuevos por año en el 2030<sup>3</sup>. En la población general de España se estiman 12000 casos nuevos por año, extrapolado a través de datos de Global Cancer Observatory (GLOBOCAN)<sup>4 5</sup>, y el CECC se sitúa en un 5% de todos los cánceres tras el tumor colorrectal, pulmón, mama, próstata, neoplasias hematológicas y vejiga. El CECC es más común en el rango de población entre 50-70 años. La predominancia de los CECC en los hombres respecto a las mujeres se mantiene.

Los principales factores de riesgo descritos del CECC son el tabaquismo y el consumo de bebidas alcohólicas. El hábito tabáquico y el enólico<sup>6</sup> tienen un efecto carcinogénico sinérgico, acumulativo y multiplicativo<sup>7 8</sup>. También la infección por el virus del papiloma humano (VPH), y el virus de Epstein-Barr (VEB) están ligados al CECC.

El reconocimiento del CECC asociado al VPH, como una entidad diferente a los tumores asociados al tabaco y alcohol, supone un cambio trascendental dentro de los CECC, ya que presentan distinta distribución por localización anatómica, diferentes factores de riesgo y dispar pronóstico, con consecuencias y repercusiones tanto en la clínica como en las estrategias de prevención<sup>9</sup>. Así pues, los CECC VPH positivos muestran características epidemiológicas propias, siendo tumores diagnosticados en pacientes más jóvenes<sup>10</sup> (media de edad al diagnóstico de 53 años respecto a los 66 años en los CECC VPH negativos), y dada que la infección por VPH es de transmisión sexual, se asocian con factores relacionados con los hábitos sexuales, edad de inicio de las relaciones, mayor número de actividad sexual orogenital<sup>11</sup>, múltiples parejas, y sexo masculino<sup>12</sup>. El serotipo VPH 16 está implicado en el 90% de los casos CECC VPH

positivos<sup>13</sup>. La asociación más fuerte de la infección con el VPH es con los CECC localizados en orofaringe (sobre todo a nivel de amígdalas palatinas y base de lengua). Clínicamente, los CECC VPH positivos presentan mejor pronóstico<sup>14 15 16 9</sup>, con mayor supervivencia y mejor respuesta al tratamiento respecto a los CECC VPH negativos<sup>17</sup>.

### **1.1.2. Patofisiología del carcinoma escamoso de cabeza y cuello**

#### **1.1.2.1. Carcinogénesis. Alteraciones genómicas y de la señalización celular. Cancerización del campo**

La carcinogénesis se considera un proceso multifactorial<sup>18</sup>. El inicio y progresión del CECC es una serie multietapa compleja, con la acumulación<sup>19</sup> secuencial de modificaciones genéticas y epigenéticas que resultan en una expresión aberrante de las funciones reguladoras de varias de las vías de control del ciclo y señalización celular. La progresión histopatológica<sup>20</sup> desde las lesiones premalignas (displasias) hasta el carcinoma infiltrante supone la acumulación progresiva de diversas alteraciones en los genes<sup>21</sup> que controlan la diferenciación, el crecimiento y la apoptosis celular, que implican la inactivación de los genes supresores como CDKN2A y TP53 (que codifican respectivamente p16INK4a y p53) en etapas tempranas y la inactivación de PTEN en etapas posteriores<sup>22</sup>.

La primera secuenciación del genoma del CECC fue publicada en 2011<sup>19</sup>, y una mayor cohorte de CECC fue estudiada con el análisis realizado por el Cancer Genome Atlas Research Network en 2015<sup>23</sup>. Además de los rasgos comunes del CECC, también se han identificado características específicas en cada tipo, revelando diferencias en los tumores asociados con factores de riesgo como el tabaco, y los relacionados con la infección VPH, siendo divididas las mutaciones génicas según el estatus VPH<sup>24</sup> en CECC VPH negativo y CECC VPH positivo. Estos análisis muestran que el predominante defecto genético identificado en el CECC es la mutación inactivante de la p53. El gen TP53 codifica para la proteína p53, y es el gen más frecuentemente mutado en el CECC<sup>25</sup>. La pérdida en el cromosoma 17p, que ocurre en el 60% de los CECC, inactiva a TP53, un gen supresor tumoral implicado en el control del ciclo celular y la apoptosis. El consumo de tabaco<sup>26</sup> y alcohol se asocia a una mayor frecuencia de mutaciones en TP53 en los pacientes afectados de CECC. Las mutaciones en TP53 han sido asociadas a un descenso en la supervivencia global, mayor tasa de recurrencia locorregional y a un descenso en la respuesta a la pauta de tratamiento<sup>27 28</sup> debido a la resistencia a la radioterapia y a la quimioterapia basada en cisplatino<sup>29</sup>. La desactivación de la p53 se produce en gran parte por la mutación genética en la TP53. La función de la p53 puede ser inactivada por la expresión de la proteína E6 en los CECC VPH positivo (se liga a p53 y se degrada), por la sobreexpresión de MDM2 (también media la degradación del p53) y por la inactivación de CDKN2A (que elimina p14ARF, un regulador negativo de MDM2). La delección 9p21 es una alteración precoz y es responsable de la mutación de CDKN2A<sup>30</sup>. La mutación del CDKN2 es encontrada entre un 9-12% de los CECC. Estas

mutaciones están asociadas a tumores más invasivos y en las lesiones iniciales como la displasia o el carcinoma in situ.

El perfil de mutaciones difiere entre el CECC VPH negativo y el CECC VPH positivo. Los CECC VPH positivo albergan menos mutaciones comparado con los CECC VPH negativo<sup>31</sup>. Las mutaciones de TP53 fueron encontradas casi exclusivamente en los CECC VPH negativo. Se ha descrito que prevalecen las mutaciones activadoras de los genes PIK3CA y son más frecuentes en los CECC VPH positivo, siendo una diana en el desarrollo de estrategias de tratamiento<sup>32</sup>. El CECC VPH negativo presenta un comportamiento más agresivo con peores resultados clínicos y tal como ha quedado reflejado está más asociado a las mutaciones de la p53<sup>27</sup>. En cambio, el CECC VPH positivo presenta un perfil genómico menos complejo. Este mantenimiento en la expresión de la p53 puede relacionarse con la mayor sensibilidad a la radioterapia<sup>33</sup> en los CECC VPH positivo, aunque también se ha relacionado con la función de p16 y el descenso de la ciclina D1<sup>34</sup>. Tanto la inactivación de p16 (producto de CDKN2A) como la sobreexpresión de la ciclina D1 promueven la proliferación celular, asociándose con una menor supervivencia, a un aumento de las recurrencias y a un mayor riesgo de diseminación linfática y hematogena. El locus CDKN2 del cromosoma 9p21 codifica las proteínas p14ARF y p16INK4A, siendo ambas también reguladoras de la función de la p53. La proteína p14 inhibe la MDM2 (inhibidora a su vez de p53). Las alteraciones en la proteína p16 y retinoblastoma (Rb) están descritas más frecuentemente en los CECC VPH positivos. La proteína p16 (su sobreexpresión ha sido consistentemente asociada con los CECC VPH positivos<sup>35</sup> relacionada con la inactivación del Rb por la proteína E7 del VPH) inhibe el complejo de ciclinas que promueven la progresión del ciclo celular a través de la fosforilación del Rb.

Las dos proteínas del VPH más importantes implicadas en la carcinogénesis del CECC son las oncoproteínas virales E6 y E7 a través de las interacciones con el gen supresor tumoral TP53 y Rb<sup>36</sup>. De forma resumida, la expresión de la oncoproteína E6 induce la degradación de la p53, inactivándola y evitando la apoptosis celular. La oncoproteína E7 inactiva el Rb (gen supresor que inhibe la progresión del ciclo celular) alterando el control del ciclo celular entre la fase G1 y S<sup>37</sup>. La degradación de los miembros del Rb por la E7 provoca una sobreexpresión de p16, por lo que la expresión de la p16 es usada como un marcador de la infección por VPH<sup>38 39</sup>. Así, el VPH al integrarse en la célula infectada, replica el genoma del VPH y promueve una inestabilidad genómica<sup>40</sup> que induce a la progresión maligna. Por tanto, la habilidad oncogénica del VPH está atribuida principalmente por las funciones de las oncoproteínas E6 y E7<sup>41 42</sup> que perturban la replicación y la diferenciación celular para facilitar la replicación viral y conseguir una inmortalización celular. La expresión de E6 y E7 también es necesaria para escapar del sistema inmune<sup>43</sup> ya que bloquean los efectos antivirales, antiproliferativos, antiangiogénicos y la actividad inmunoestimuladora del INF.

Los tumores pueden evadir activamente la destrucción inmune, mediante distintas vías, incluyendo la activación de puntos de control o checkpoints que normalmente regulan la respuesta inmune. El receptor de muerte programada, PD-1, está expresado en las

células T activadas y su función es la inmunosupresión. Su ligando PD-L1 se encuentra expresado en las células tumorales. En el CECC de orofaringe asociado a VPH, el tejido tumoral se caracteriza por la infiltración de linfocitos. PD-L1 se encuentra expresado en la superficie del 70% de los CECC asociados a VPH y desempeña un papel tanto en la persistencia de la infección por VPH como en la resistencia y evasión al sistema inmune del huésped durante la progresión tumoral<sup>44</sup>.

La cancerización del campo<sup>21</sup> es definida como la presencia en un área mucosa de células epiteliales con alteraciones genéticas<sup>45</sup> con capacidad de sufrir una expansión clonal, reemplazando gradualmente a la mucosa normal por epitelio malignizado. Entre otras, las alteraciones detectadas son la pérdida en el cromosoma de 9p, 3p y 18q, el descenso en la expresión de citoqueratinas y la modificación en las ciclinas. La acumulación de alteraciones<sup>46</sup>, la inestabilidad genómica tras la exposición a los carcinógenos<sup>26</sup> y la asociación con la mutación de p53 están implicados en el proceso de la tumorigénesis del CECC. El concepto de la cancerización del campo también explica la propensión del CECC a desarrollar recurrencias locales y segundos tumores primarios, tanto sincrónicos como metacrónicos<sup>47</sup>.

En la carcinogénesis del CECC, la alteración en las vías de señalización de la regulación celular causa una acumulación de cambios genéticos que promueven y favorecen la progresión en el desarrollo tumoral, la invasión tumoral y la diseminación metastásica. Las principales alteraciones y vías implicadas en la carcinogénesis del CECC promueven a la célula tumoral un potencial replicativo ilimitado (vías p53, CDKN2A, ciclina D1), una desregulación en la diferenciación celular (vía NOTCH), cambios en los señales de los factores de crecimiento y en la evasión a la apoptosis (vías EGFR, ras, PI3K-PTEN-AKT), la estimulación de la angiogénesis (vía VEGF), permiten la invasión y pérdida de adhesión celular (vías TGF $\beta$ , SMAD y LOX) y la evasión del sistema inmune. La vía de señalización más frecuentemente alterada en el CECC es la vía PI3K-AKT-mTOR<sup>48</sup>.

La mayor parte de las muestras analizadas en el CECC comparten ciertos reordenamientos y alteraciones que afectan a genes que codifican a receptores de factores de crecimiento como el EGFR (epidermal growth factor receptor) y moléculas de señalización implicadas en las vías encargadas de controlar el crecimiento y la proliferación celular. La sobreexpresión del EGFR se produce en un 90% de los CECC<sup>49</sup>, y está asociado a un aumento en la recurrencia local y un empeoramiento en la supervivencia global<sup>50 51</sup>. La EGFR suele identificarse en la displasia de alto grado y en más del 90% de los CECC<sup>52</sup>. El EGFR ha sido usado como diana terapéutica en el CECC, con la introducción de anticuerpos monoclonales como el cetuximab que se unen a la porción extracelular del EGFR bloqueando la unión a sus ligandos<sup>53</sup>. También se han desarrollado inhibidores de la tirosinquinasa, como el afatinib<sup>54</sup>.

Las mutaciones en la PI3KA también han sido detectadas en el CECC<sup>55 56</sup>, y son particularmente comunes en los CECC VPH positivo<sup>57</sup>. Las PI3Ks son una familia de enzimas implicadas en la regulación de procesos biológicos celulares como el crecimiento

celular, proliferación, migración y diferenciación<sup>58</sup>. La función de la PTEN es antagonista a la actividad de PI3K. La pérdida de PTEN descrita en los CECC<sup>59</sup> resulta en una desenfrenada actividad de PI3K conllevando al crecimiento tumoral. Otras vías apoptóticas con un rol importante en el CECC, son la vía de la caspasa CASP8 (codifica para la enzima que inicia la cascada proteolítica de la apoptosis) y la Bcl-2 (un regulador antiapoptótico). Un 70% de los CECC tienen una sobreexpresión de genes que inhiben la apoptosis (Bcl-xL y Bcl-2<sup>60</sup>), lo que evita la muerte celular programada e inmortaliza las células. La sobreexpresión de Bcl2 se ha correlacionado con mejor pronóstico, al presentar una mejor respuesta a quimioterapia, menor índice de recurrencia y mayor supervivencia<sup>61</sup>.

La angiogénesis<sup>62</sup> conforma la aparición de nuevos vasos para aportar oxígeno y nutrientes durante el desarrollo tumoral. Los vasos neoformados en el seno de un tumor tienen membranas basales incompletas y crecen estimulados por distintas moléculas, especialmente del VEGF y otros factores de crecimiento<sup>63</sup>.

La invasión y metástasis engloban una compleja secuencia multietapa de procesos biológicos<sup>64</sup> como son la separación de la célula tumoral del estroma y las células vecinas, la degradación de la matriz celular, seguida de una motilidad direccional específica<sup>65</sup>, la penetración (intravasación) a los vasos sanguíneos o linfáticos y la embolización tumoral, la supervivencia de las células tumorales en la circulación hasta llegar al lugar metastatizado elegido con el favorable suplemento de los apropiados factores de crecimiento, la unión de la célula tumoral al endotelio de los vasos para permitir la extravasación y la proliferación celular e invasión de la nueva localización y angiogénesis. En el proceso de la metástasis está implicada la transición epitelio-mesenquimal (TEM).

Las moléculas de adhesión también participan en los procesos de diferenciación celular. La progresión del grado de displasia en lesiones premalignas se ha asociado a la pérdida de expresión nuclear de RAR-beta (receptor de ácido retinoico)<sup>66</sup>. El gen doc-1 (deleted in oral cancer-1) o la Cadherin E17 son otras moléculas de adhesión implicadas en el CECC. También adquieren relevancia las enzimas que son imprescindibles para la degradación de la matriz extracelular y, por tanto, en la capacidad de infiltración y metástasis como MMP-2, MMP-9, y MMP-13<sup>67</sup>. Su acción de lisar las colagenasas puede ser inhibida por los TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase), genes que se consideran supresores tumorales por esa inhibición de la capacidad infiltrativa, estando la TIMP-3 frecuentemente inactiva por la hipermetilación del promotor en el CECC<sup>68</sup>. En la pérdida de la adhesión celular y de la capacidad de invasión del CECC están partícipes las vías del TGFβ y SMAD. El gen CSMD1 en el cromosoma 8p<sup>69</sup> está relacionado en el proceso de diseminación y metástasis del CECC. También colaboran la quinasa NTRK2 y su ligando BDNF, y también la vía del TGFβ<sup>70</sup>. En la activación en la migración de las células tumorales está implicada la capacidad metastásica del CECC, y el proceso de transición epitelio-mesenquimal. Por tanto, el TGFβ es un polipéptido multifuncional que interviene en diversos procesos celulares como la proliferación, la diferenciación y en la angiogénesis, y también en la transición epitelio-mesenquimal. El TGFβ actúa como

supresor tumoral en las células epiteliales normales y en el estadio temprano de la progresión tumoral, pero en los CECC avanzados la función inhibitoria del crecimiento se pierde conllevando a la proliferación celular, invasión y metastásis. La pérdida de la señal inhibitoria del TGF $\beta$ <sup>71</sup> también está asociada al desarrollo del CECC causando un aumento de la proliferación celular y promoviendo la transformación de la mucosa aerodigestiva a CECC invasivo. También, es una vía interconectada con el factor nuclear kB<sup>72</sup>, el incremento de este factor promueve la supervivencia celular y la respuesta inmune. La pérdida de función por mutaciones en el TGF $\beta$  y en SMAD2 y 4 ha sido identificada en el CECC. La delección del SMAD4 provoca una inestabilidad genética a través de la activación del TGF $\beta$ 1 y la delección del TGF $\beta$ R2 actúa con la KRAS para la promoción de las metástasis<sup>73</sup>.

Una vez escapadas las células tumorales, el establecimiento de la colonia metastásica es favorecida a través de cambios en el microambiente de los tejidos como la hipoxia. La enzima lisiloxidasa (LOX) regula la maduración de las proteínas de la matriz extracelular, modificando y remodelando el tejido conectivo. La LOX recluta las células CD11b+ que se adhieren al colágeno IV produciendo la metaloproteínasa 2 rompiendo el colágeno e incrementando la invasión y las células metastásicas. El desarrollo de moléculas que inhiban la LOX puede prevenir el reclutamiento de las células CD11b+ y así prevenir el crecimiento metastásico. Además se ha validado el LOX como un biomarcador<sup>74</sup> de las metástasis en el CECC.

El sistema inmune vigila constantemente la aparición de células premalignas y malignas. Los fallos en el sistema inmune de reconocer, rechazar y destruir las células dañadas están implicados en la aparición y desarrollo del tumor. Las células T tienen la función de ser reguladoras negativas del sistema inmune, evitando la activación celular continua y aberrante contra el tejido. Las células cancerígenas son capaces de alterar esta fase de equilibrio y escapar del control inmune evitando este freno. Las células cancerígenas realizan una autoedición inmune<sup>75</sup> y reclutan componentes inmusupresores (como las células T reguladoras, células supresoras y macrófagos) permitiendo el escape del tumor de la vigilancia del sistema inmune, creciendo y diseminándose<sup>76</sup>. Las proteínas que son expresadas en las células T activadas son el CTLA4 (proteína 4 asociada al linfocito citotóxico) y la proteína PD1 (implicada en la muerte celular programada). Por tanto, la célula tumoral puede evadir la vigilancia del sistema inmune alterando la activación y la función de los efectores de la inmunidad celular. Como dianas terapéuticas en el CECC<sup>77</sup> se han desarrollado anticuerpos monoclonales anti-CTLA4 y anti PD1/PD-L1, cursando un papel importante la inmunoterapia en los casos de CECC metastásicos o recurrentes.

### 1.1.2.2. Transición epitelio-mesenquimal

La TEM<sup>78</sup> (transición epitelio-mesenquimal) es el proceso biológico en el que la célula epitelial, a través de múltiples modificaciones bioquímicas y vías de señalización, cambia su fenotipo a célula mesenquimal. Este cambio incluye una pérdida de la polarización celular y de las uniones intercelulares, resultando en una célula con una capacidad superior de motilidad, de migración y de invasión, adquiriendo también una mayor capacidad de producción de los productos de la matriz extracelular y de resistencia a la apoptosis. La TEM está implicada en los procesos de la embriogénesis, en la reparación tisular y, también, en la progresión tumoral y metastásis.

Están descritos tres tipos clásicos de TEM<sup>79</sup>. La TEM tipo I se identificó en la morfogénesis embrionaria temprana y se encontró implicada en varias etapas del desarrollo, como la gastrulación, la formación de la cresta neural y en la morfogénesis del corazón. La TEM tipo II es inducida en respuesta a la inflamación, durante la cicatrización, en la regeneración tisular y en la fibrosis. La TEM tipo III está activada durante el proceso de la carcinogénesis. La TEM implica la disrupción en la interacción celular, permitiendo la motilidad y la difusión al sistema vascular o linfático, la extravasación y la colonización a distancia. Las células cancerosas en el tumor primario activan la TEM para ganar motilidad e invasividad por el cual se diseminan desde su sitio de origen, liberándose a la circulación. También se han detectado en los frentes invasivos de tumores, pequeños agregados de células tumorales que se extienden o se desprenden del tumor y que ingresan al estroma adyacente. Se encontró que esto era concomitante con una reducción de la expresión de E-cadherina, con la pérdida selectiva de la membrana basal y/o con el aumento de la expresión de Vimentina. La TEM también induce otras propiedades, como la adquisición de un fenotipo similar a las células madre, la resistencia a la quimioterapia, y la inmunoevasión de las células cancerosas, dificultando su erradicación.

La complejidad del mecanismo de la TEM también se ejemplifica por el hecho de que las células que se someten a TEM pueden presentar un fenotipo híbrido epitelial-mesenquimatoso, mostrando tanto marcadores epiteliales como mesenquimatosos. Se detectó que las células cancerosas que se someten a TEM no muestran una conversión completa de forma binaria, sino que pasan a través de la TEM en diferentes expresiones. En consecuencia, algunas de estas células pueden expresar marcadores tanto de células epiteliales como mesenquimales, exhibiendo así un estado híbrido epitelial-mesenquimatoso. Recientemente, considerando la TEM como un proceso dinámico se ha introducido el estado intermedio de la TEM<sup>80 81</sup>, conocido como TEM parcial, mixta o híbrida. La TEM parcial se define por la pérdida incompleta de marcadores epiteliales y la ganancia de marcadores mesenquimales. Destacar que las células cancerosas en el estado de TEM parcial muestran características fenotípicas más agresivas que en el estado de TEM completo. La TEM parcial conduce a los comportamientos malignos de las células cancerosas, incluida la invasión, metástasis, la formación de células tumorales circulantes e incluso la resistencia a fármacos<sup>82</sup>. En el proceso de invasión del cáncer,

tanto la migración colectiva de grupos células como la migración individual de células sufren una TEM.

En la inducción de la TEM están implicados la activación de los factores de transcripción supresores con el TFSnail y ZEB y la desregulación de la E-cadherina (proteína presente en las uniones del citoesqueleto del epitelio). La pérdida de E-cadherina produce una disrupción de las uniones intercelulares y una expresión de proteínas mesenquimales tipo N-cadherina o vimentina. En el proceso de tumorigénesis, tras la disrupción de las uniones celulares en la TEM se degradan las membranas basales a través de las metaloproteinasas MT1 y 2-MMP (también incrementadas en los invadópodos) para permitir que la célula tumoral alcance el tejido conectivo y la vascularización. La TEM es regulada por múltiples vías de señales existiendo una cooperación entre distintos factores de transcripción. El más potente inductor es el TGF $\beta$ <sup>83</sup>, siendo otras vías implicadas los receptores tirosinquinasa, NOTCH, Hedgehog, la hipoxia y el mTOR.

Por tanto, la TEM implica la disrupción en la interacción celular, permitiendo la motilidad y la difusión al sistema vascular o linfático, la extravasación y la colonización a distancia. Pero también ha sido establecido en el proceso de cancerinogénesis<sup>84</sup> la invasión colectiva celular en ausencia del fenómeno de la TEM. En ambas vías de invasión y metástasis (vía TEM y vía colectiva TEM independiente) está implicada la podoplanina.

## **1.2. PODOPLANINA**

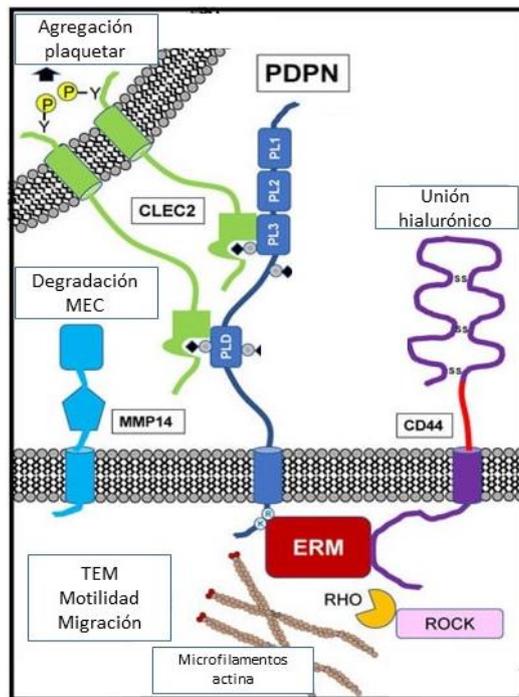
### **1.2.1. Definición**

La podoplanina fue descrita en 1990 por Nose et al.<sup>85</sup> Es una proteína transmembrana que está expresada fisiológicamente en distintos tejidos y tipos celulares y participa en múltiples funciones. Tiene una distribución amplia en el organismo encontrándose en el riñón (podocitos glomerulares, implicados en la homeostasis glomerular), pulmón (células epiteliales alveolares tipo I, esenciales para el intercambio gaseoso), endotelio linfático y tejido linfático periférico, placenta, miometrio, células del plexo coroideo, epitelio ciliar ocular, condrocitos, osteocitos, células mesoteliales, en la capa basal de la epidermis, células gliales, algunos tipos neuronas y en diferentes tipos de fibroblastos. La podoplanina es considerada uno de los marcadores principales del endotelio linfático<sup>86</sup> y linfangiogénesis<sup>87</sup>, ya que la podoplanina se expresa en el endotelio linfático pero no en el endotelio vascular.

Fisiológicamente, la podoplanina participa en la embriogénesis, siendo necesaria para el correcto desarrollo y morfogénesis de riñones, pulmones y sistema cardíaco, y para la formación del sistema linfático. También, está implicada en la respuesta del sistema inmune, y en las funciones de agregación plaquetar y de regeneración tisular.

### 1.2.2. Estructura molecular

La podoplanina es una glicoproteína tipo mucina transmembrana, con un dominio extracelular glicosilado N-terminal (130 aminoácidos aproximadamente), seguido de un único dominio transmembrana y un corto dominio citoplasmático (10 aminoácidos aproximadamente). La estructura básica molecular queda reflejada en la figura 1.



**Figura 1.** Estructura molecular de la podoplanina. PDPN podoplanina, MEC matriz extracelular, TEM transición epiteliomesenquimal, ERM ezrin/radixin/moesin family of membrane cytoskeleton linker proteins, CLEC 2 receptor plaquetar. *Adaptado de Suzuki et al Roles of Podoplanin in Malignant Progression of Tumor. Cells. 2022 Feb 7;11(3):575.*

El dominio extracelular tiene una secuencia repetida en tándem denominada PLAG 1, PLAG 2, PLAG3 y PLAG4 o PLD (PLAG-like domains) (PLAG platelet aggregation stimulation), que permite la interacción de la podoplanina con el receptor plaquetar tipo lectina CLEC-2<sup>88 89 90</sup>, presente en la superficie celular de las plaquetas, células dendríticas o algunos tipos de macrófagos. El dominio extracelular también es el responsable de la interacción de la podoplanina con otras proteínas<sup>91</sup> como con la lectina galectina-8 componente de la matriz extracelular implicada en la regulación de la linfangiogenesis<sup>92</sup>, HSPA9 y CCL21.

El dominio transmembrana está implicado en la asociación de la podoplanina con las balsas lipídicas (“lipid-rafts”), en la inducción de la transición epiteliomesenquimal<sup>93</sup> y en la interacción con la tetrasparina CD9.

El dominio intracelular de la podoplanina, contiene aminoácidos básicos (RK) situados yuxtamembrana siendo lugares de unión con las proteínas ERM (ezrina, radixina y moesina) que modulan la actividad RHO GTPasa y promueven la reorganización de la

actina del citoesqueleto, promoviendo la migración celular, motilidad y la regulación de las células madre<sup>94</sup>. La interacción de la podoplanina con la familia de proteínas de la ERM es esencial para la transición epitelio-mesenchimal<sup>95</sup>, para la adquisición de características migratorias e invasivas, para la respuesta inmune y para la linfangiogénesis. También interactúa con CD44 y con MMP14 responsable de la degradación de la matriz extracelular. Además, este dominio tiene dos residuos serina que son sitios potenciales de fosforilación por la acción de las quinasas PKA y CDK5, que podrían modular la función promigratoria de la podoplanina<sup>96</sup>.

### **1.2.3. Funciones e interactoma**

Las funciones de la podoplanina están mediadas a través de una serie de interacciones con otras proteínas. Este interactoma asociado a la podoplanina explica sus efectos fisiológicos y patológicos.

La interacción de la podoplanina con el receptor de superficie plaquetar CLEC2 induce la agregación y la activación plaquetar, el desarrollo de la vasculatura linfática y la tromboinflamación<sup>97 98</sup>. También interviene en la producción plaquetar de la médula ósea y en la respuesta inmune<sup>88</sup>. Además, participa en la invasión tumoral y en la cascada metastásica. La interacción proteica con la galectina 8 promueve la adhesión y migración de las células endoteliales linfáticas, y la linfangiogénesis inflamatoria. La interacción con HSP9 (Heat shock protein A9)<sup>99</sup> contribuye en la respuesta al estrés y la neurodegeneración<sup>100</sup>.

La unión con CCL21, quimiocina específica del sistema linfático asociada con la respuesta adaptativa del sistema inmune y en el desarrollo de las células T, permite la evasión de las células tumorales de la vigilancia inmune<sup>91</sup>.

La interacción con tetrasparina CD9<sup>101</sup> produce una inhibición y atenuación de la interacción de la podoplanina con CLEC2 bloqueando la agregación plaquetar e inhibe las metástasis estando implicada en la respuesta inmune<sup>102</sup>.

Relevancia adquiere la interacción de la podoplanina con CD44. CD44 es el principal receptor del ácido hialurónico, el mayor componente de la matriz extracelular, siendo encontrado en gran variedad de tejidos y células. La interacción de la podoplanina con CD44 está sobreexpresada en la progresión maligna de los tumores vasculares endoteliales y en los CECC, promoviendo la migración tumoral direccional<sup>103</sup>. Las células del CECC con altos niveles de CD44 adquieren capacidad de autorenovación<sup>104</sup>, y se asocian con los CECC de peor pronóstico y metastásicos<sup>104 105</sup>. Además, la CD44 es un componente de los invadopodios en las células del CECC<sup>106 107</sup>.

La asociación de la podoplanina con las proteínas ERM<sup>108</sup> está implicada en la cardiomorfogénesis, en la linfangiogénesis, en la respuesta inmune y en la transición epitelio-mesenchimal (TEM). Esta asociación es clave en la estabilización del citoesqueleto y para la función celular promigratoria y proinvasiva. La interacción de la

podoplanina con las proteínas ERM y la regulación por la actividad RHoA GTPasa promueve la TEM adquiriendo la célula epitelial propiedades migratorias. Esta interacción es activadora de las vías de señales GTPasa RHoA y ROCK, vías inductoras de la TEM y de la estabilización de los componentes de los invadópodos, que son protusiones celulares con actividad proteolítica usados por las células tumorales para la invasión a través de la membrana basal. Esta interacción incrementa la estabilidad de los invadópodos, y promueve la degradación de la matriz extracelular a través de la modulación de la vía que implica la activación de ROCK<sup>108</sup>. También la interacción con MMP14 promueve la invasión tumoral y metástasis en los CECC de cavidad oral al promover la degradación de la matriz extracelular.<sup>109</sup>

#### **1.2.4. Papel de la podoplanina en el cáncer**

Hanahan and Weinberg<sup>110</sup> establecieron los diversos procesos implicados en la carcinogénesis: la inmortalidad en la replicación, el mantenimiento de las señales de proliferación, el bloqueo de las señales supresoras, la resistencia a la apoptosis, la inducción de angiogénesis, y la activación de la invasión y metástasis. Posteriormente Douglas<sup>111</sup> añade la evasión de la respuesta inmune, la reprogramación del metabolismo energético, la mutación e inestabilidad genómica y la activación de fenómenos inflamatorios, para la creación del microambiente tumoral. En la última revisión<sup>18</sup> se incluyó el desbloqueo de la plasticidad fenotípica, la reprogramación epigenética no mutacional, el microbioma y la presencia de las células senescentes. Procesos comunes de la tumorigénesis a la práctica totalidad de las diferentes estirpes histológicas, estando la podoplanina implicada en varios de los procesos descritos en la carcinogénesis.

La expresión de la podoplanina está descrita en carcinomas escamosos de varias localizaciones (cabeza y cuello, esófago, útero, pulmón), tumores germinales, astrocitomas, glioblastomas, mesoteliomas, tumores ováricos, testiculares y de vejiga, y en el osteosarcoma. En la mayoría de ellos, la expresión de podoplanina se asocia con la progresión maligna, la metástasis y a un peor pronóstico<sup>112</sup>.

En el proceso de la carcinogénesis la inmunoexpresión de la podoplanina es observada tanto en las propias células tumorales, como en el estroma del microambiente tumoral principalmente en los fibroblastos activados (CAF). La expresión de la podoplanina en las células tumorales determina varios efectos en la progresión maligna y en las metástasis<sup>113</sup>. La podoplanina facilita la capacidad de invasión y de migración metastásica<sup>114</sup>. Las metástasis comprenden un proceso complejo y multietapa, etapas que están reguladas a través de múltiples interacciones, entre ellas con la podoplanina. Además, la podoplanina está implicada en la adquisición de las células tumorales de características pluripotenciales y de clonalidad de células madre.

La activación y la agregación de las plaquetas tienen un papel crucial en la progresión metastásica del cáncer<sup>115</sup>. La interacción de la podoplanina con el CLEC-2<sup>97</sup> promueve la activación y la agregación plaquetar siendo un mecanismo de protección de

las células tumorales circulantes, tanto del estrés mecánico sometido en el torrente sanguíneo, como evadiendo el sistema inmune, favoreciendo la supervivencia de las células tumorales en la sangre<sup>116</sup>. La agregación plaquetar tiene significancia en las metástasis hematógenas<sup>117</sup>. Las plaquetas promueven la adhesión de las células tumorales al endotelio vascular y favorecen la embolización microvascular y la extravasación de estas células. Los factores derivados de las plaquetas (PDGF y TGF $\beta$ ) promueven la plasticidad y la supervivencia celular. El PDGF activa la proliferación celular a través de la vía Ras-ERK<sup>118</sup>. El TGF $\beta$  a través de la vía PIK3-AKT promueve la proliferación y la migración de las células tumorales<sup>119</sup>, y es un factor multifuncional que también está implicado en la activación de la TEM celular<sup>120</sup>.

La expresión de la podoplanina facilita la dispersión y migración celular tumoral, y promueve la inducción de la transición epitelio-mesenquimal (TEM). Tal como se ha reflejado, la TEM es el proceso en el que las células epiteliales adquieren características mesenquimales (morfología y arquitectura celular con mayor capacidad migratoria, similar a los fibroblastos, y adquisición de marcadores mesenquimales como N-cadherina y vimentina) perdiendo el fenotipo epitelial (uniones estables intercelulares, polaridad celular apical/basal e interacciones con la membrana basal preservadas) y los marcadores epiteliales (E-cadherina y queratina).

La podoplanina participa en la invasión tumoral y en las metástasis, tanto a través de la vía TEM como por la migración colectiva celular vía TEM independiente. Según la cohesión celular, determinada por mecanismos epigenéticos, transcripcionales y de localización, las características de la matriz extracelular y la motilidad celular serán adquiridas a través de una de las vías<sup>121</sup>. La TEM, proceso en el que las células epiteliales pierden su polaridad y cohesión y adquieren características migratorias de los fibroblastos, es un proceso crítico en la progresión de la malignización. Se ha constatado que la expresión de la podoplanina en las células epiteliales es un inductor de la TEM<sup>108</sup>. La podoplanina impulsa la TEM parcial<sup>122</sup> o la TEM completa a través de la interacción con las proteínas ERM, adquiriendo las células tumorales mayor motilidad, capacidad de migración celular y capacidad invasiva, tumorogénica y metastásica. La sobreexpresión de la podoplanina en los tumores incrementa la migración celular, y al ser también inductor de la TEM, las células adquieren un fenotipo fibroblastoide y un incremento de la motilidad. La expresión de la podoplanina en ciertos tumores, tanto en las células malignas como en el estroma, puede resultar en peor pronóstico dada la capacidad de invasión y metastásica adquirida. La podoplanina se expresa principalmente en el frente de invasión tumoral, y su papel biológico estaría relacionado con la migración colectiva de las células tumorales, lo que implica la pérdida de sus uniones adherentes a las células epiteliales vecinas y su posterior invasión hacia el tejido conectivo subyacente favoreciendo la metástasis. La expresión de la podoplanina en los tumores localizada con E-cadherina puede promover la migración celular colectiva<sup>121</sup>. En los tumores que la expresión de la podoplanina se correlaciona con la pérdida de E-cadherina provoca la migración individual de las células tumorales al debilitar los contactos célula-célula del frente invasivo.

La podoplanina activa la RhoA GTPasa y su quinasa ROCK a través de la interacción con la ezrina y/o moesina. Este incremento de actividad ERM aumenta los niveles activos de RhoA y sus efectores ROCK que fosforilan más proteínas ERM, entrando en un bucle activador en el citoesqueleto promoviendo la formación de filamentos de actino-miosina necesarios para la motilidad celular, lo que conduce a una reorganización del citoesqueleto, a una mayor estimulación de la motilidad y a la inducción de la TEM. En la vía de progresión tumoral no TEM dependiente a través de la migración colectiva celular también está implicada la podoplanina<sup>121</sup>. En esta vía las células mantienen la expresión de las estructuras de adhesión epitelial, pero pueden invadir el tejido a través del incremento en la migración celular a través de cambios en la señalización RhoA, en la organización de las proteínas ERM y de las actinas del citoesqueleto, y la formación de filopodias.

Para la invasión del tejido las células tumorales deben destruir y remodelar la matriz extracelular. La migración de las células tumorales y la degradación de la matriz extracelular se producen a través de la interacción de la podoplanina con CD44<sup>103</sup> y con MMP14<sup>123</sup>. Además, la podoplanina permite adquirir capacidad de célula madre tumoral<sup>124</sup>, que promueve la colonización a distancia y mayor poder de recidiva tumoral al conferir resistencia a los tratamientos. Al presentar una expansión clonal da lugar a un tumor con características más agresivas y de rápido crecimiento. La expresión del CD44 es característica de esta población celular<sup>125</sup>.

La expresión de la podoplanina promueve la maduración y la estabilización de los invadopodios a través de la activación de la vía RhoC-ROCK-LIMK-cofilina que también estimula la degradación de la matriz extracelular<sup>126</sup>.

El microambiente tumoral contiene principalmente la matriz extracelular, fibroblastos, células inmunes (macrófagos, linfocitos T y B) y la vascularización tanto linfática como sanguínea. En el tejido normal los fibroblastos son los responsables de la síntesis de la matriz extracelular. En el estroma tumoral los fibroblastos presentan un perfil activado, y son inductores del crecimiento tumoral y la angiogénesis. Además, las células tumorales del estroma son fuente de citoquinas inflamatorias, como el TGF $\beta$ , IFN $\gamma$  y el TNF $\alpha$ , que a la vez son inductores de la podoplanina. En la carcinogénesis el microambiente tumoral está implicado en la producción de la matriz extracelular, en la activación de los CAF, en la supresión del sistema inmune<sup>127 128</sup> y en la promoción de la angiogénesis. La podoplanina actúa como molécula inhibitoria de las células T limitando la supervivencia de las células CD8+ y CD4+<sup>129</sup> permitiendo a la célula tumoral evadirse del sistema inmune. Varios tumores muestran una marcada presencia de CAF, una forma activada de los fibroblastos presentes en el estroma tumoral que a través de la secreción de determinados factores de crecimiento (PDGF-A y B, FGF2), citoquinas (TGF $\beta$ 1), quimioquinas (CCL2) y enzimas proteolíticas tales como metaloproteinasas e interleuquinas (IL-1A, IL-1B, IL-6, IL-10) provocan una inmunosupresión (con la inhibición también de las células citotóxicas CD4 y 8+), y participan en la angiogénesis, tumorogénesis, y en la remodelación del citoesqueleto. Algunos estudios han demostrado que la presencia de los CAFs se asocia con mayor recurrencia local de la enfermedad y

baja supervivencia<sup>130</sup> ya que tendrían la capacidad de inducir un fenotipo tumoral agresivo.

Además, la expresión de la podoplanina puede promover el proceso de las metástasis sin estar asociado al crecimiento tumoral<sup>116</sup>. Las metástasis linfáticas pueden ser causadas por la invasión directa de las células tumorales en los vasos linfáticos preexistentes en la periferia del tumor o a través de la inducción de la linfangiogenesis<sup>131</sup>. Los factores de crecimiento producidos por las células tumorales estimulan el desarrollo y la dilatación de los vasos linfáticos y facilitan la entrada de las células tumorales a través del endotelio linfático. El VEGF-C es uno de los factores de crecimiento y es expresado a través de la unión con su receptor VEGFR-3 (la gran mayoría localizado en los capilares linfáticos) donde se activa el desarrollo de vasos linfáticos tumorales y se facilita el acceso de las células tumorales en los vasos<sup>132</sup>. La presencia del eje VEGF-C y VEGFR-3 está asociado a un incremento en el número de vasos linfáticos pero no con la progresión de las metástasis, donde entra en juego la podoplanina como factor prometastático potenciado la linfangiogenesis<sup>133</sup> tumoral y las metástasis linfáticas. Además, descrito por Carrasco et al, las células tumorales pueden secretar podoplanina al medio extracelular a través de microvesículas y exosomas, promoviendo tanto la angiogenesis como la linfangiogenesis<sup>134</sup>.

### **1.3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

Los resultados en el manejo del CECC a pesar de los avances en biotecnología, conocimiento molecular y genético, en el desarrollo de nuevos tratamientos (químico e inmunoterápicos) y técnicas (tanto quirúrgicas como de radioterapia) no han desencadenado grandes cambios, especialmente en los CECC VPH negativos, tumores con un mayor riesgo de presentar recidivas a nivel locoregional, metástasis a distancia o de desarrollar segundos tumores en el tracto aerodigestivo.

El desarrollo de indicadores pronósticos de la enfermedad y predictivos de la respuesta al tratamiento son de gran valor para la introducción de la terapia de precisión en el CECC.

Actualmente, biomarcadores en el CECC como el p16, el VEB y el PD-L1 son usados en la práctica clínica. Plantear la investigación y la introducción de marcadores de los factores de mal pronóstico e indicativos del comportamiento biológico del CECC VPH negativo permitiría mejorar el manejo de estos pacientes. Lo que justifica el desarrollo de este proyecto de investigación para el estudio de la podoplanina como marcador inmunohistoquímico del CECC VPH negativo.

## **2. HIPÓTESIS**

La expresión elevada de la podoplanina en el CECC VPH negativo implica un comportamiento tumoral agresivo con peor pronóstico.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO PRINCIPAL**

La finalidad de este trabajo es contribuir a desentrañar el significado pronóstico de la expresión de la podoplanina en los CECC VPH negativos.

#### **3.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS**

Como objetivos específicos se enumeran los siguientes:

1. Determinar la inmunoexpresión de la podoplanina en los CECC VPH negativos.
2. Analizar la expresión de la podoplanina en los CECC VPH negativos con la asociación con variables clínicohistopatológicas (extensión extracapsular, invasión perineural, invasión angiolinfática, márgenes de resección quirúrgicos) y estadiaje TNM.
3. Identificar la expresión de la podoplanina en los CECC VPH negativos como factor pronóstico, estudiando la recidiva locorregional y la supervivencia global.

## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

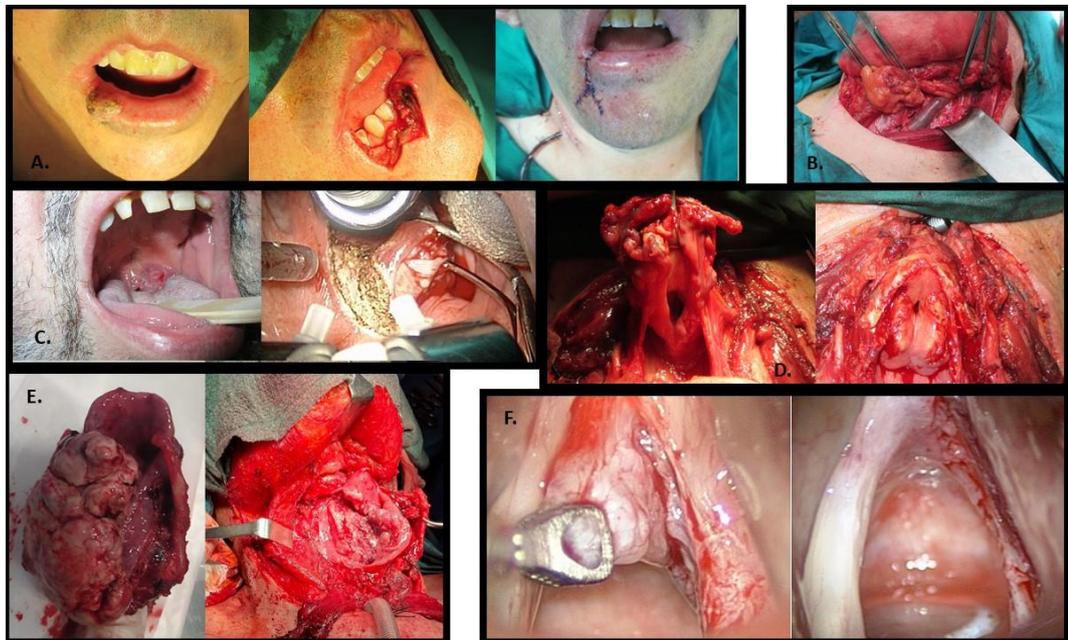
A lo largo del trabajo desarrollado se realiza la generalización del cáncer de cabeza y cuello (CECC) para referirse a los carcinomas epidermoides localizados en la cavidad oral, faringe (oro e hipofaringe, con exclusión de la rinofaringe) y/o laringe.

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación de las Islas Baleares (CEI-IB N° IB 3505/17 PI, se adjunta en el anexo), con los siguientes criterios básicos de inclusión:

- a) pacientes con CECC VPH negativo primario de cavidad oral, orofaringe, hipofaringe y laringe.
- b) sin quimioterapia previa, radioterapia o antecedentes de CECC.
- c) con tratamiento quirúrgico inicial
- d) disponibilidad de suficiente muestra de tejido tumoral y datos patológicos.
- e) mínimo 5 años de seguimiento clínico.
- f) consentimiento informado firmado.

Se pidió el consentimiento informado mediante una hoja informativa para obtener los datos de los pacientes, puesto que el estudio no tenía ninguna intervención.

Se realizó un análisis retrospectivo de 70 pacientes afectados de CECC VPH negativo tratados quirúrgicamente entre el 2012 y 2017 por parte del servicio de Otorrinolaringología y de Cirugía Maxilofacial en el Hospital General Mateu Orfila.



**Figura 2.** Ejemplos de resección quirúrgica en casos de CECC VPH negativo. **A.** Resección de CECC cavidad oral (labio inferior). **B.** Vaciamiento ganglionar funcional cervical izquierdo. **C.** Resección peroral de CECC orofaríngeo (tonsila palatina izquierda). **D.** Laringectomía supraglótica de CECC laríngeo. **E.** Laringofaringectomía total de CECC hipofaríngeo. **F.** Cordectomía tipo III derecha de CECC laríngeo.

El criterio de inclusión de los pacientes afectos de CEEC cuyo abordaje terapéutico fue en primera fase la opción quirúrgica permite obtener el estadiaje de la enfermedad basado en criterios histopatológicos. De la pieza quirúrgica se procedió a la obtención de las muestras tisulares para el análisis del VPH y de la podoplanina.

Se recogieron los datos clínicos que incluían la edad, el sexo, y los hábitos tóxicos de tabaquismo y consumo de alcohol.

La localización y el estadiaje del tumor se definieron según la séptima edición de la clasificación TNM de tumores malignos de la Unión Internacional Contra el Cáncer (7ª edición de la UICC).

El grado de diferenciación histológico del tumor primario se determinó según la clasificación de Broders definido como:

grado 1 G1: carcinoma escamoso bien diferenciado.

grado 2 G2: carcinoma escamoso moderadamente diferenciado

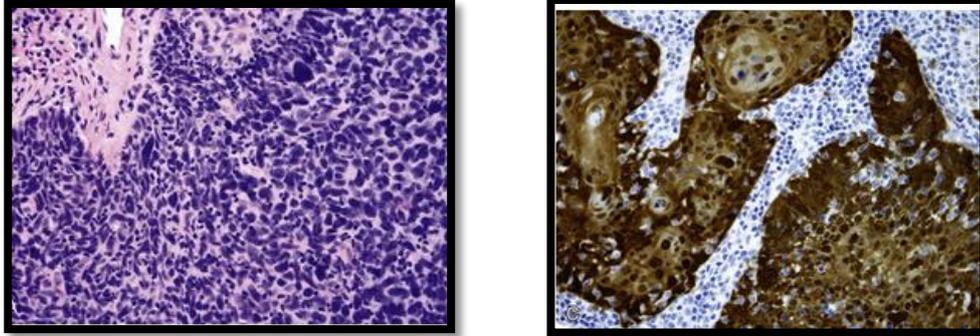
grado 3 G3: carcinoma escamoso pobremente diferenciado.

Se revisó la presencia de invasión linfovascular (IVL) y de invasión perineural (IPN) (presente/ausente), de la extensión extracapsular (ECS) (presente/ausente) y el estado de los márgenes quirúrgicos (R0 libres, no afectos/R1 afectados).

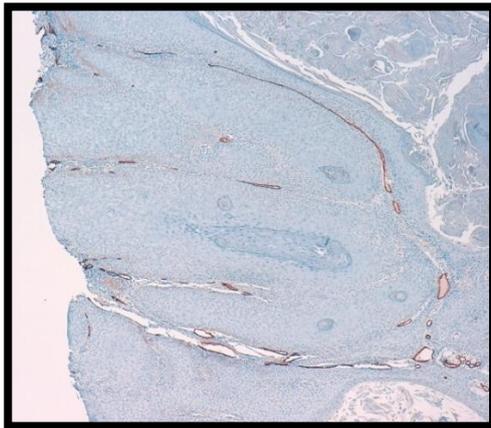
El seguimiento mínimo de los pacientes al final del estudio fue de 5 años, registrando las recidivas locales y regionales (presente/ausente), las metástasis a distancia, la aparición de segundos tumores primarios, las muertes a causa del tumor y las muertes por otras causas.

La supervivencia fue definida como el intervalo desde el tratamiento inicial hasta el fallecimiento. El intervalo de los pacientes que no perecieron fue considerado hasta la última fecha de seguimiento clínico. La recurrencia locoregional englobó el intervalo desde la terapia inicial hasta la aparición de recidiva de la enfermedad. El intervalo de los pacientes que no presentaron recidiva fue hasta la última fecha de seguimiento clínico.

La determinación de los casos VPH negativos en los CECC se realizó a través de la inmunotinción de p16, considerado un marcador subrogado de la carcinogénesis mediada por VPH<sup>135</sup>. Los casos con expresión tumoral de p16 difusa (>75 %), con una intensidad de tinción al menos moderada (+2/3) fueron excluidos del estudio.



**Figura 3.** A. CECC de orofaringe VPH asociado, tinción con hematoxilina y eosina. B. Tinción inmunohistoquímica positiva para p16 del CECC de orofaringe VPH asociado.



**Figura 4.** Expresión selectiva de la podoplanina en el endotelio linfático de CECC VPH negativo de cavidad oral.

Las muestras histológicas del tumor primario se obtuvieron del departamento de Anatomía Patológica, y se procedió a realizar una inmunohistoquímica específica para la podoplanina. La mucoproteína transmembrana podoplanina fue selectivamente expresada en el endotelio linfático y reconocida por el anticuerpo monoclonal D20-40. Los cortes de tejido fueron incubados con el anticuerpo monoclonal antipodoplanina D2-40 durante 32 minutos a 37 °C y el sistema de detección utilizado fue a través de Ultraview. Todo el protocolo fue utilizando el equipo automatizado Benchmark. El diagnóstico histológico se realizó cegado a los datos clínicos.

La inmunoexpresión de la podoplanina se analizó a través de la inmunoreactividad (IRS immunoreactive score). La IRS de la podoplanina se calculó multiplicando la intensidad de la tinción por el porcentaje de células positivas.

La intensidad de la tinción de la podoplanina se calificó en una escala de 0 a 3:

0= ausente

1= débil

2= moderada

3= fuerte.

El porcentaje de células positivas a podoplanina se definió como:

0= 0%

1= menos del 10%

2= 11% a 30%

3= 31% a 50%

4= 51% a 80%

5= más del 80%.

El rango de la IRS de la podoplanina fue definido entre 0 y 15:

0=ausente

1-3=débil

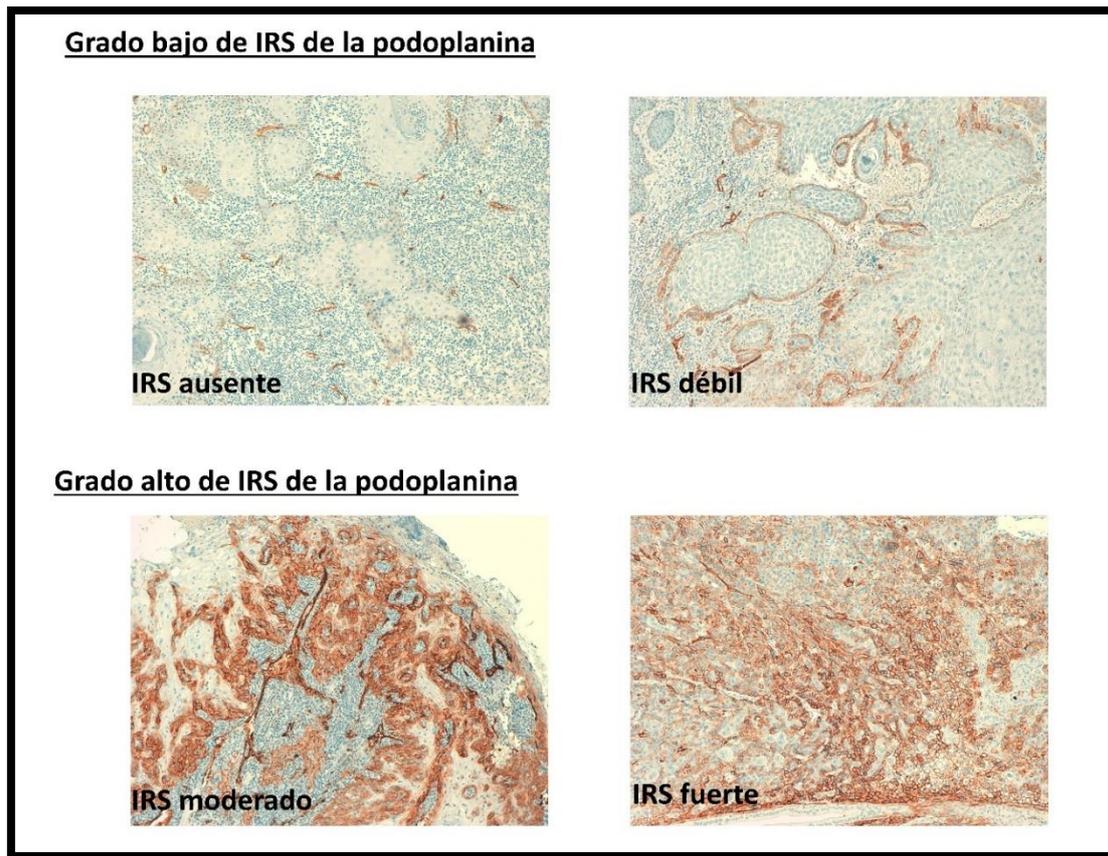
4-7=moderado

8-15=fuerte.

En nuestro estudio, el grado de expresión de la IRS de la podoplanina se dividió en bajo grado y alto grado correspondiente a:

IRS de bajo grado: 0 a 3 (quedando englobados los rangos de IRS ausente y débil)

IRS de alto grado: > 3 (quedando englobados los rangos de IRS moderado y fuerte).



**Figura 5.** Inmunoexpresión de la podoplanina en muestras de CECC VPH negativo. **3A.** Ausencia de expresión de podoplanina, destaca la expresión selectiva del endotelio linfático. **3B** Expresión débil de podoplanina. **3C** Expresión moderada de podoplanina. **3D** Expresión fuerte de podoplanina.

#### Análisis estadístico:

El análisis descriptivo de los participantes y las características clinicopatológicas se realizó utilizando valores medios  $\pm$  desviación estándar y rango para las variables continuas y frecuencias absolutas y porcentajes para las variables categóricas. Las diferencias estadísticas entre los grupos se evaluaron mediante la prueba de Chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher, según corresponda. Se realizó un análisis de regresión logística para obtener la odds ratio (OR) y sus intervalos de confianza del 95% (IC del 95%) para la relación del grado de expresión de la podoplanina con la recurrencia locoregional. Un valor de p inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Para el cálculo del análisis de supervivencia se utilizó el método de Kaplan-Meier con información desde la fecha del tratamiento hasta la fecha de la muerte. Se utilizó el test de long-rank para comparar y analizar las diferencias entre las curvas de supervivencia. Un valor de p inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el Statistical Package for the Social Science (SPSS) versión 25.0 y el software R (R versión 4.0.4), con los datos completamente anonimizados.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS**

Los datos clínicos e histopatológicos son resumidos en las tablas 1 y 2.

La cohorte estudiada comprende un total de 70 pacientes afectados de CECC VPH negativo recopilados en el período determinado entre el 2012 y 2017, con un mínimo de seguimiento clínico de 5 años. La edad media de los pacientes fue de  $67 \pm 12,3$  años. La distribución por sexo fue de 62 hombres (88,6%) y 8 mujeres (11,4%).

Respecto los hábitos tóxicos y estilo de vida, el 75,7% eran fumadores y el 41,4% bebedores.

En cuanto al grado histológico de la diferenciación del carcinoma escamoso a través de la clasificación de Broders, 30 casos fueron bien diferenciados (correspondiente al 42,9%), 34 casos moderadamente diferenciados (48,6%) y 6 pobremente diferenciados (8,6%).

La distribución de la localización del tumor fue en 24 pacientes (34,3%) en la cavidad oral, 6 casos en la orofaringe (8,6%), 34 en laringe (48,6%) y 6 en hipofaringe (8,6%).

La clasificación TNM de los tumores primario de acuerdo con la 7ª edición de la UICC mostró 35 pacientes con T1 (50%), 15 casos con T2 (21,4%), 9 con T3 (12,9%) y 11 casos con T4 (15,7%). Representando el 28,6% tamaños tumorales avanzados (T3 y T4). 54 casos no presentaron metástasis en los ganglios linfáticos regionales (N0), y 16 casos presentaron ganglios linfáticos afectados (N+ que incluyen N1 y N2. N1 metástasis en un ganglio ipsilateral con dimensión igual o menor a 3 cm. N2 metástasis en ganglio ipsilateral mayor a 3cm y menor a 6 cm, o en ganglios múltiples ipsilaterales menores de 6 cm, o bilaterales o contralaterales menores a 6cm). Ningún caso afectado de N3 (metástasis ganglionar mayor a 6 cm).

Respecto al estadiaje, 33 pacientes estaban en estadio I (47,1%) siendo tumores confinados al lugar primario, 12 en estadio II (17,1%), 7 en estadio III (10%) siendo tumores con afectación local y ganglionar regional progresivamente mayor, y 18 casos de tumores avanzados en estadio IV (25,7%).

Los factores de riesgo histopatológicos seleccionados en el estudio fueron los márgenes de resección quirúrgicos afectados, la presencia de extensión extracapsular, y de afectación por invasión linfovascular y perineural.

Los márgenes quirúrgicos afectados fueron descritos como la presencia de carcinoma in situ o carcinoma invasivo en el margen de la resección y se detectaron en 7 casos (10%). Los márgenes no afectados fueron definidos por la distancia del frente tumoral al margen de resección de 5mm o más, y en caso de tumores glóticos fue considerado

adecuado el margen de 1-2 mm. En 63 pacientes (correspondiente al 90% de casos) los márgenes de resección fueron libres.

El proceso de invasión neoplásica de los nervios se observó en 10 casos (14,3%), y en 60 pacientes no presentaron invasión perineural (85,7%). La invasión linfovascular fue presente en 11 pacientes (correspondiente al 15,7%).

La extensión extracapsular o extranodal considerada como la presencia del tumor en los límites de los ganglios linfáticos y extendido a través de la cápsula del ganglio linfático hasta el tejido conectivo adyacente, con o sin reacción estromal asociada, se presentó en 17 pacientes (24,3%), siendo ausente en 53 casos (75,7%).

La recurrencia locorregional descrita como la aparición de enfermedad tumoral en el lugar de origen o bien en los ganglios linfáticos regionales después del tratamiento inicial se desarrolló en 16 casos (22,9%).

CASO	SEXO	EDAD	TABACO	ALCOHOL	GRADO DE DIFERENCIACIÓN	LOCALIZACIÓN	T	N	M	ESTADIAJE	IRS PODOPLANINA	ECS	MARGENES RESECCIÓN	IVL	IPN	RECURRENCIA
1	M	70	sí	sí	G3	cavidad oral	3	2c	0	IVA	moderado	sí	afectos	sí	sí	sí
2	M	72	sí	no	G2	cavidad oral	3	0	0	III	débil	no	libres	no	no	no
3	M	73	no	sí	G1	larínge	3	0	0	III	débil	no	libres	no	no	no
4	M	50	sí	sí	G2	orofarínge	2	0	0	II	débil	no	afectos	sí	no	no
5	M	52	sí	no	G2	cavidad oral	1	0	0	I	moderado	no	libres	no	no	no
6	M	64	sí	sí	G1	cavidad oral	2	0	0	II	débil	no	libres	no	no	sí
7	M	50	sí	no	G1	larínge	2	0	0	II	débil	no	libres	no	no	no
8	M	61	no	no	G1	larínge	1	0	0	I	débil	no	libres	no	no	no
9	M	61	sí	no	G1	larínge	1	0	0	I	ausente	no	libres	no	no	no
10	M	77	sí	no	G1	cavidad oral	1	0	0	I	ausente	no	libres	no	no	no
11	M	57	sí	no	G1	larínge	1	0	0	I	débil	no	libres	no	no	no
12	M	57	no	no	G2	cavidad oral	1	0	0	I	débil	no	libres	no	no	no
13	M	81	sí	no	G1	cavidad oral	1	0	0	I	débil	no	libres	no	no	no
14	M	79	sí	no	G1	larínge	1	0	0	I	ausente	no	libres	no	no	no
15	M	75	sí	no	G2	larínge	4	0	0	IVA	fuerte	no	libres	no	no	sí
16	M	63	sí	sí	G1	cavidad oral	1	0	0	I	débil	no	libres	no	no	no
17	M	67	no	sí	G2	hipofarínge	4	2c	0	IVA	ausente	sí	libres	sí	sí	sí
18	M	83	no	no	G2	cavidad oral	1	0	0	I	débil	no	libres	no	no	no
19	M	51	sí	sí	G2	orofarínge	1	1	0	III	ausente	no	afectos	no	no	no
20	M	50	sí	sí	G2	hipofarínge	3	2c	0	IVA	débil	sí	libres	no	no	sí
21	M	81	sí	no	G2	cavidad oral	1	0	0	I	fuerte	no	libres	no	no	sí
22	M	81	sí	no	G1	cavidad oral	1	0	0	I	débil	no	libres	no	no	no
23	F	80	no	no	G1	larínge	1	0	0	I	débil	no	libres	no	no	no
24	F	57	sí	no	G1	larínge	3	1	0	III	débil	no	libres	no	no	no
25	M	61	sí	sí	G1	cavidad oral	1	0	0	I	ausente	no	libres	no	no	no
26	M	59	sí	sí	G1	larínge	1	0	0	I	débil	no	libres	no	no	ind
27	F	67	no	no	G1	larínge	1	0	0	I	ausente	no	libres	no	no	no
28	M	50	sí	no	G1	larínge	1	0	0	I	fuerte	no	libres	no	no	no
29	M	44	sí	no	G2	hipofarínge	4	1	0	IVA	moderado	sí	afectos	sí	sí	sí
30	M	63	sí	no	G1	cavidad oral	1	0	0	I	moderado	no	afectos	no	no	no
31	M	78	sí	no	G2	cavidad oral	1	0	0	I	débil	no	libres	no	no	no
32	F	93	no	no	G2	orofarínge	4	1	0	IVA	débil	sí	libres	no	no	sí
33	M	61	sí	no	G2	larínge	2	2b	0	IVA	ausente	sí	libres	no	no	no
34	F	82	no	no	G1	cavidad oral	1	0	0	I	moderado	no	libres	no	no	no
35	M	53	sí	sí	G1	hipofarínge	3	2a	0	IVA	débil	sí	libres	no	no	no
36	M	78	sí	sí	G1	larínge	1	0	0	I	débil	no	libres	no	no	no
37	M	81	sí	sí	G2	larínge	2	0	0	II	fuerte	sí	libres	no	no	no
38	M	54	sí	sí	G2	larínge	3	0	0	III	ausente	no	libres	sí	sí	no
39	M	85	no	no	G1	cavidad oral	1	0	0	I	débil	no	libres	no	no	no
40	M	50	sí	no	G2	larínge	2	0	0	II	ausente	no	libres	no	no	no
41	F	61	sí	no	G2	cavidad oral	4	1	0	IVA	fuerte	sí	libres	no	no	sí
42	M	47	sí	no	G2	cavidad oral	2	0	0	II	moderado	sí	afectos	no	sí	sí
43	M	72	sí	no	G3	cavidad oral	2	2b	0	IVA	fuerte	sí	libres	sí	sí	sí
44	F	73	no	no	G1	cavidad oral	1	0	0	I	fuerte	no	libres	no	no	no
45	M	60	sí	sí	G2	larínge	1	0	0	I	fuerte	sí	libres	no	no	sí
46	M	57	sí	no	G1	larínge	1	0	0	I	débil	no	libres	no	no	no
47	M	63	sí	sí	G3	orofarínge	2	0	0	II	moderado	sí	afectos	no	no	sí
48	M	94	no	no	G2	larínge	1	0	0	I	fuerte	no	libres	no	no	ind
49	M	66	sí	sí	G2	larínge	2	0	0	II	débil	no	libres	no	no	sí
50	M	84	sí	sí	G2	larínge	1	0	0	I	débil	no	libres	no	no	no
51	M	78	no	no	G2	cavidad oral	2	0	0	II	moderado	sí	libres	no	no	ind
52	M	62	sí	sí	G3	larínge	2	1	0	III	débil	no	libres	sí	no	sí
53	M	56	sí	no	G2	larínge	2	0	0	II	ausente	sí	libres	sí	sí	no
54	M	56	sí	sí	G2	hipofarínge	4	0	0	IVA	débil	no	libres	no	no	no
55	M	75	sí	sí	G2	orofarínge	4	0	0	IVA	débil	no	libres	no	no	no
56	M	68	sí	sí	G2	orofarínge	4	1	0	IVA	débil	sí	libres	no	no	sí
57	M	70	sí	sí	G3	larínge	3	2c	0	IVA	ausente	sí	libres	sí	sí	no
58	M	65	sí	no	G2	cavidad oral	4	0	0	IVA	débil	no	libres	no	no	no
59	M	62	sí	sí	G1	larínge	1	0	0	I	ausente	no	libres	no	no	no
60	M	40	no	no	G1	cavidad oral	1	0	0	I	débil	no	libres	no	no	no
61	F	82	no	no	G3	cavidad oral	4	0	0	IVA	débil	no	libres	no	sí	no
62	M	60	sí	sí	G2	larínge	3	2c	0	IVA	débil	no	libres	sí	sí	no
63	M	84	sí	no	G1	cavidad oral	1	0	0	I	débil	no	libres	no	no	no
64	M	71	sí	sí	G1	larínge	1	0	0	I	fuerte	no	libres	no	no	no
65	M	84	no	no	G1	cavidad oral	2	1	0	III	débil	no	libres	sí	no	no
66	M	67	no	no	G2	larínge	1	0	0	I	moderado	no	libres	no	no	no
67	M	62	sí	no	G2	larínge	1	0	0	I	moderado	no	libres	no	no	no
68	M	62	sí	sí	G1	larínge	1	0	0	I	moderado	no	libres	no	no	no
69	M	67	sí	sí	G2	hipofarínge	4	0	0	IVA	moderado	no	libres	no	no	no
70	M	74	sí	sí	G2	larínge	2	0	0	II	débil	no	libres	no	no	no

M: masculino, F: femenino, G1 bien diferenciado, G2 moderadamente diferenciado, G3 pobremente diferenciado, T: tamaño tumor primario, N: metástasis ganglionares, M: metástasis a distancia, ECS extensión extracapsular, IRS inmunoreactive score, IVL invasión vasculolinfática, IPN invasión perineural

Tabla 1. Datos clinicohistopatológicos (1)

Características		n (%)
<b>Edad (mean±sd)</b>		67,1 ± 12,3
<b>Sexo</b>	Masculino	62 (88,6)
	Femenino	8 (11,4)
<b>Tabaquismo</b>	No	17 (24,3)
	Sí	53 (75,7)
<b>Alcohol</b>	No	41 (58,6)
	Sí	29 (41,4)
<b>Grado de diferenciación</b>	G1	30 (42,9)
	G2	34 (48,6)
	G3	6 (8,6)
<b>Localización</b>	Oral	24 (34,3)
	Orofaringe	6 (8,6)
	Laringe	34 (48,6)
	Hipofaringe	6 (8,6)
<b>TNM</b>	T1+T2	50 (71,4)
	T3+T4	20 (28,6)
	T1	35 (50)
	T2	15 (21,4)
	T3	9 (12,9)
	T4	11 (15,71)
	N0	54 (77,2)
	N+	16 (22,8)
<b>Estadaje</b>	I	33 (47,1)
	II	12 (17,1)
	III	7 (10,0)
	IV	18 (25,7)
<b>Recurrencia locoregiona</b>	No	51 (72,9)
	Sí	16 (22,9)
	No determinada	3 (4,3)
<b>Extensión extracapsular</b>	No	53 (75,7)
	Sí	17 (24,3)
<b>Márgenes resección</b>	No afectos	63 (90,0)
	Afectos	7 (10,0)
<b>Invasión perineural</b>	No	60 (85,7)
	Sí	10 (14,3)
<b>Invasión angiolinfática</b>	No	59 (84,3)
	Sí	11 (15,7)

Tabla 2. Datos clinicohistopatológicos (2)

## **5.2. INMUNOEXPRESIÓN DE LA PODOPLANINA**

La expresión de la podoplanina en los casos de CECC VPH negativo del estudio se muestra resumida en las tablas 3 y 4.

La inmunexpresión de la IRS de la podoplanina se consideró ausente en 13 casos (18,6%), débil en 35 pacientes (50%), de rango moderado en 12 (17,1%) y fuerte en 10 casos (14,3%).

Los grados de expresión definidos en el proyecto de la IRS de la podoplanina fue de 48 casos con IRS de bajo grado (68,6%) e IRS de alto grado en 22 (31,4%).

<b>IRS Podoplanina</b>	
<b>Ausente</b>	<b>Presente</b>
13 (18,5%)	57 (81,5%)
	<b>Débil</b> 35 (50%)
	<b>Moderado</b> 12 (17,1%)
	<b>Fuerte</b> 10 (14,2%)

**Tabla 3.** Inmunexpresión de la podoplanina

<b>Grado IRS de podoplanina</b>	
<b>Bajo grado</b>	<b>Alto grado</b>
48 (68,6%)	22 (31,4%)

**Tabla 4.** Grado de la inmunexpresión IRS de la podoplanina

## **5.3. RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PODOPLANINA Y LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICOPATOLÓGICAS**

La relación entre los grados de expresión de la podoplanina y las características clínicohistopatológicas del CECC VPH negativo se encuentra resumida en la tabla 5.

Respecto a los hábitos tóxicos, el grado alto de expresión de la podoplanina no presentó asociación estadísticamente significativa con el consumo de tabaco y alcohol.

En cuanto a los grados de diferenciación del CECC, se detectó una IRS de grado alto en 6 tumores bien diferenciados (20%), 13 en moderadamente diferenciados (38,2%) y en 3 casos pobremente diferenciados (50%).

Desglosando la localización del CECC, el grado alto de expresión de la podoplanina fue descrito en 9 casos de cavidad oral, en 1 caso de orofaringe, en 10 casos de laringe y en 2 de hipofaringe.

Considerando el tamaño tumoral, de los 50 casos en estadios iniciales T1 y T2 presentaron un alto grado de expresión IRS de la podoplanina en un 34%. En cambio, en los tumores avanzados T3 y T4 se detectó en el 25% de los casos.

En un 25% de pacientes con afectación ganglionar (N+) se detectó un grado alto de expresión de la IRS de la podoplanina, siendo en un 33% en los casos sin afectación ganglionar regional (N0).

El grado de inmunoexpresión elevado de la podoplanina fue mostrado en el 27,3% de los casos con invasión vasculolinfática y en el 40% de casos con invasión perineural presente.

El grado de diferenciación del carcinoma ( $p=0,148$ ), la localización tumoral ( $p=0,846$ ), el tamaño tumoral ( $p=0,464$ ), la afectación ganglionar ( $p=0,528$ ) y la invasión perineural ( $p=0,714$ ) y vasculolinfática ( $p=1$ ) no presentaron asociación estadísticamente significativa con el grado de expresión de la podoplanina.

En el 71,4% de los casos con márgenes de resección afectados se detectó un grado elevado de la IRS de la podoplanina, expresándose en un 27% en los casos con márgenes de resección libres, con una  $p$  de 0,028.

Se expresó en grado alto la IRS de la podoplanina los casos con extensión extracapsular en un 52,9% (9 casos) y en un 24,5% (13 casos) sin presencia de extensión extracapsular, presentando una  $p$  de 0,028.

El 62,5% de pacientes afectados de recurrencia locoregional del CECC VPH negativo presentaron un alto grado de expresión de la IRS de la podoplanina, siendo del 21,6% en los casos sin recurrencia. La  $p$  determinada fue del 0,002.

Por tanto, el grado alto de expresión IRS de la podoplanina se asoció significativamente con la presencia de recurrencia locorregional ( $p=0,002$ ), con la extensión extracapsular ( $p=0,028$ ) y con los márgenes de resección positivos ( $p=0,028$ ).

		<b>Grado de IRS de la podoplanina</b>		
		Bajo	Alto	p-valor
<b>Tabaquismo</b>				0,837
	No	12 (70,6%)	5 (29,4%)	
	Sí	36 (67,9%)	17 (32,1%)	
<b>Alcohol</b>				0,269
	No	26 (63,4%)	15 (36,6%)	
	Sí	22 (75,9%)	7 (24,1%)	
<b>Grado de diferenciación</b>				0,148
	G1	24 (80,0%)	6 (20,0%)	
	G2	21 (61,8%)	13 (38,2%)	
	G3	3 (50,0%)	3 (50,0%)	
<b>Localización</b>				0,846
	Oral	15 (62,5%)	9 (37,5%)	
	Orofaringe	5 (83,3%)	1 (16,7%)	
	Laringe	24 (70,6%)	10 (29,4%)	
	Hipofaringe	4 (66,7%)	2 (33,3%)	
<b>T</b>				0,464
	T1+T2	33 (66,0%)	17 (34,0%)	
	T3+T4	15 (75,0%)	5 (25,0%)	
<b>N</b>				0,528
	N0	36 (66,7%)	18 (33,3%)	
	N1+N2	12 (75,0%)	4 (25,0%)	
<b>Márgenes resección</b>				<b>0,028</b>
	No afectos	46 (73,0%)	17 (27,0%)	
	Afectos	2 (28,6%)	5 (71,4%)	
<b>Invasión perineural</b>				0,714
	No	42 (70,0%)	18 (30,0%)	
	Sí	6 (60,0%)	4 (40,0%)	
<b>Invasión angiolinfática</b>				1,000
	No	40 (67,8%)	19 (32,2%)	
	Sí	8 (72,7%)	3 (27,3%)	
<b>Extensión extracapsular</b>				<b>0,028</b>
	No	40 (75,5%)	13 (24,5%)	
	Sí	8 (47,1%)	9 (52,9%)	
<b>Recurrencia locoregional</b>				<b>0,002</b>
	No	40 (78,4%)	11 (21,6%)	
	Sí	6 (37,5%)	10 (62,5%)	

**Tabla 5.** Relación del grado de expresión IRS de la podoplanina y las características clinicopatológicas

#### **5.4. RELACIÓN ENTRE LA RECURRENCIA LOCOREGIONAL, LAS CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS Y LA EXPRESIÓN DE LA PODOPLANINA**

Los resultados del análisis de regresión logística binaria se muestran en la tabla 6 y revelaron que, después de ajustar por tabaco y alcohol, el grado alto de expresión de la IRS de la podoplanina (OR: 5,40; IC 95%: 1,14-25,86; p=0,034) y la presencia de extensión extracapsular (OR: 14,18; IC 95%: 3,20-62,72; p<0,001) mostraron una asociación estadísticamente significativa con la recurrencia locoregional.

El análisis multivariante se realizó con parámetros que fueron significativos en el análisis univariante para determinar si en la recurrencia locoregional el efecto del grado de expresión de la podoplanina y de la extensión extracapsular dependía de otros factores de riesgo.

No reveló significancia estadística la relación entre la recurrencia locoregional y el grado de diferenciación tumoral, el estadio T y N, la localización, los márgenes de resección afectos ni la invasión perineural o vasculolinfática.

		Recurrencia locoregional		Univariate			Multivariate* <sup>1</sup>		
		No	Sí	OR	(IC95%)	p-valor	OR	(IC95%)	p-valor
<b>Grado expresión IRS pdpn</b>	Bajo IRS	40 (87,0%)	6 (13,0%)	1			1		
	Alto IRS	11 (52,4%)	10 (47,6%)	6,06	(1,80 - 20,37)	0,004	5,40	(1,14 - 25,68)	<b>0,034</b>
<b>Grado de diferenciación</b>	G1	28 (93,3%)	2 (6,7%)	1					
	G2	21 (67,7%)	10 (32,3%)	6,67	(1,32 - 33,69)	0,022			
	G3	2 (33,3%)	4 (66,7%)	28,00	(3,03 - 258,42)	0,003			
<b>Localización</b>	Oral	18 (75,0%)	6 (25,0%)	1					
	Orofaringe	3 (60,0%)	2 (40,0%)	2,00	(0,27 - 14,98)	0,500			
	Laringe	27 (84,4%)	5 (15,6%)	0,56	(0,15 - 2,10)	0,386			
	Hipofaringe	3 (50,0%)	3 (50,0%)	3,00	(0,47 - 19,04)	0,244			
<b>T</b>	T1+T2	39 (81,3%)	9 (18,8%)	1					
	T3+T4	12 (63,2%)	7 (36,8%)	2,53	(0,78 - 8,23)	0,124			
<b>N</b>	N0	44 (84,6%)	8 (15,4%)	1					
	N1+N2	7 (46,7%)	8 (53,3%)	6,29	(1,78 - 22,24)	0,004			
<b>Márgenes resección</b>	No afectos	48 (80,0%)	12 (20,0%)	1					
	Afectos	3 (42,9%)	4 (57,1%)	5,33	(1,05 - 27,09)	0,043			
<b>Invasión perineural</b>	No	46 (80,7%)	11 (19,3%)	1					
	Sí	5 (50,0%)	5 (50,0%)	4,18	(1,03 - 17,01)	0,046			
<b>Invasión angiolímfática</b>	No	45 (80,4%)	11 (19,6%)	1					
	Sí	6 (54,5%)	5 (45,5%)	3,41	(0,88 - 13,25)	0,077			
<b>Extensión extracapsular</b>	No	46 (90,2%)	5 (9,8%)	1			1		
	Sí	5 (31,3%)	11 (68,8%)	20,24	(4,97 - 82,35)	<0,001	14,18	(3,20 - 62,72)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Tabaquismo</b>	No	13 (86,7%)	2 (13,3%)	1			1		
	Sí	38 (73,1%)	14 (26,9%)	2,39	(0,48 - 11,98)	0,288	1,39	(0,18 - 10,64)	0,750
<b>Alcohol</b>	No	32 (82,1%)	7 (17,9%)	1			1		
	Sí	19 (67,9%)	9 (32,1%)	2,17	(0,69 - 6,77)	0,184	2,37	(0,48 - 11,60)	0,288

\*<sup>1</sup> ajustado por tabaco, alcohol

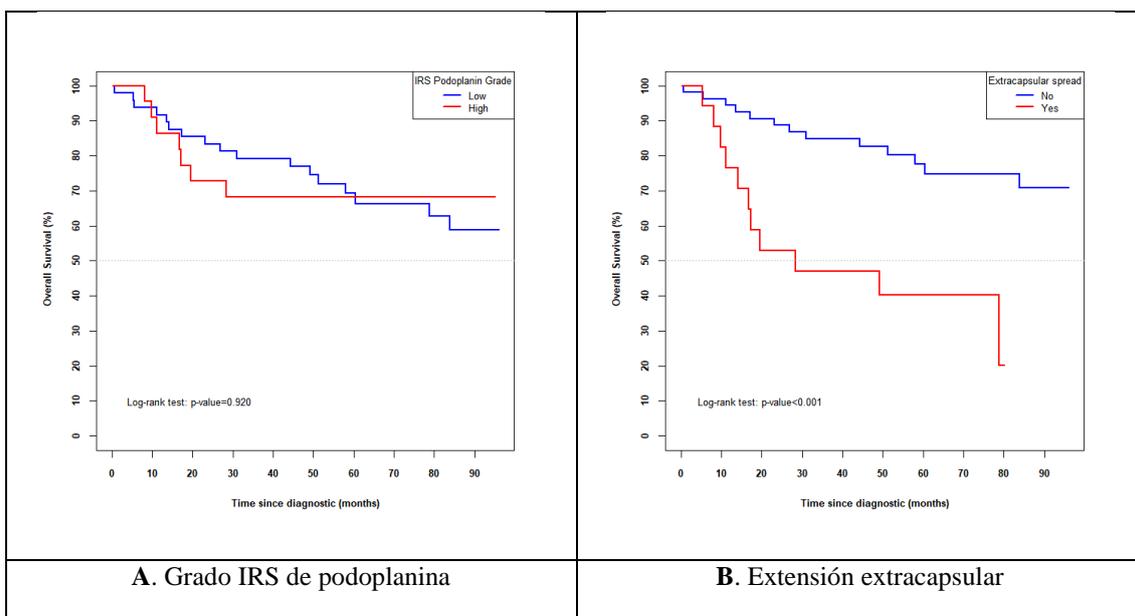
**Tabla 6.** Relación entre la recurrencia locoregional, las características clínicopatológicas y la inmunoexpresión de la podoplanina.

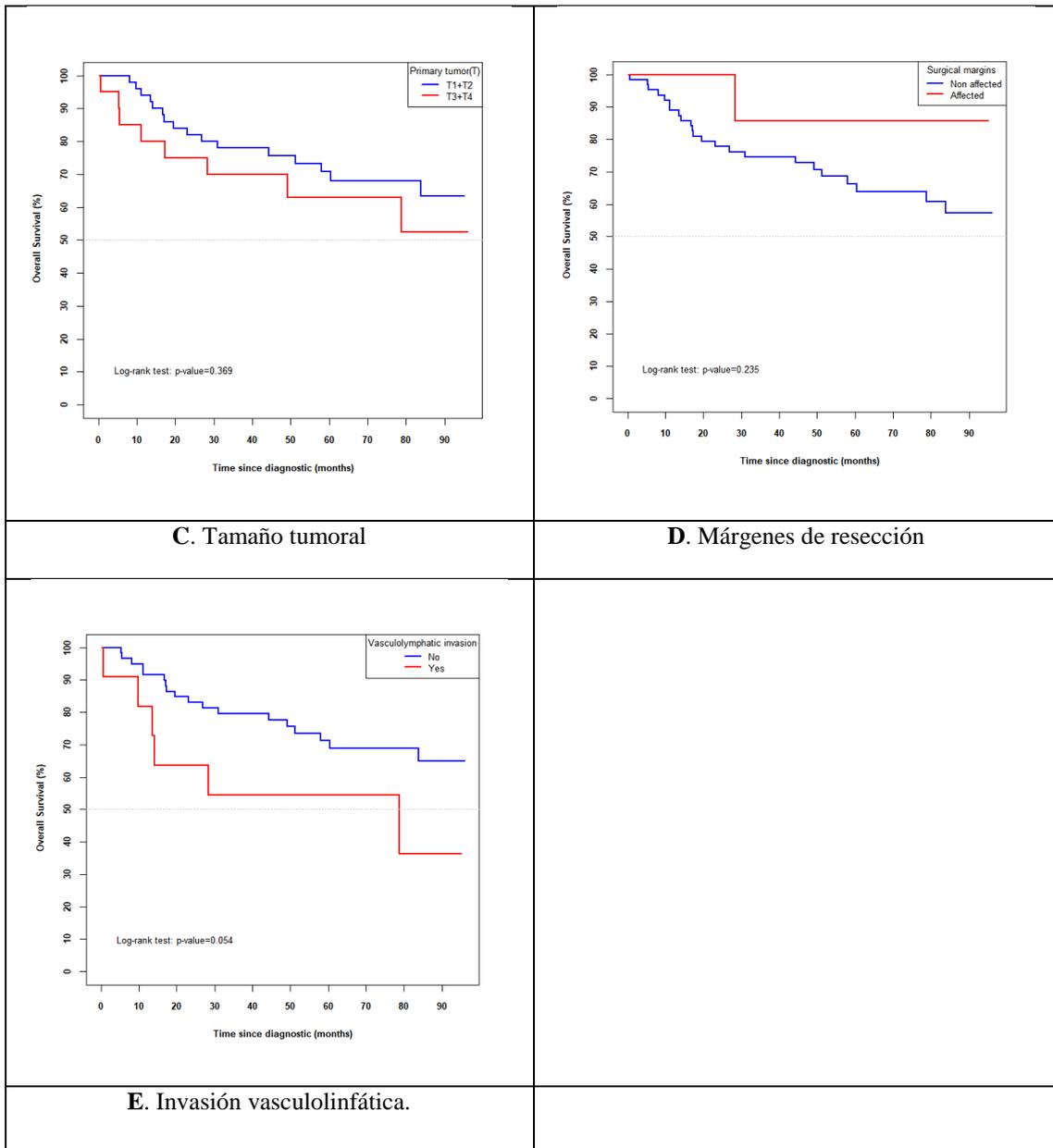
## 5.5. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

La figura 6 muestra la representación de las curvas de supervivencia.

No hubo diferencias estadísticamente significativas en relación con la supervivencia según el grado de inmunoexpresión de la IRS de la podoplanina ( $p=0,920$ ), con el tamaño T ( $p=0,369$ ), ni con los márgenes quirúrgicos afectados ( $p=0,235$ ). A pesar de una marcada tendencia a una menor supervivencia con la presencia de la IVL no reflejó una diferencia significativa ( $p=0,054$ ).

En cuanto a la supervivencia relacionada con la ECS, hubo diferencia estadísticamente significativa, en la que los pacientes sin ECS tuvieron una mejor tasa de supervivencia ( $p<0,001$ ). Para los pacientes con presencia de ECS, la mediana de supervivencia global fue de 28,4 meses. A los 5 años, las tasas de supervivencia global correspondientes fueron del 77,6 % (IC del 95 %, de 62,9 a 87,0) en los casos sin ECS y del 40,31 % en los afectados de ECS (IC del 95 %, de 17,7 a 62,2) respectivamente.





**Figura 6.** Curvas de supervivencia estratificadas según **A.** Extensión extracapsular. **B.** Expresión de los grados de IRS de la podoplanina **C.** Tamaño T. **D.** Márgenes de resección. **E.** Invasión vasculolinfática

## **6. DISCUSIÓN**

Los biomarcadores son definidos<sup>136</sup> acorde al NCI (National Cancer Institute) como una molécula biológica encontrada en sangre, o bien en otros líquidos o tejidos corporales que es signo de un proceso (normal o anormal), una afección o una enfermedad. Los biomarcadores son clasificados como diagnósticos, pronósticos (valorando la evolución de la enfermedad independientemente del tratamiento aplicado) o predictivos (valorando la respuesta a un tratamiento específico). El biomarcador ideal debe poseer una alta especificidad, sensibilidad y altos valores predictivos, y debe ser aplicable a la decisión clínica aportando información útil con un coste económico adecuado.

El pronóstico del CECC está ligado al estadio de la enfermedad en el momento del diagnóstico. El estadiaje del CECC es evaluado a través de la clasificación TNM<sup>137</sup> determinado por la extensión del tumor, la presencia de ganglios linfáticos afectados y las metástasis a distancia. No obstante, el TNM presenta un insuficiente valor pronóstico incluso entre pacientes con idéntica estadificación.

Actualmente, el manejo y tratamiento del CECC están basados principalmente en los aspectos clínicos, donde destaca el sistema de clasificación TNM y se complementa con la información histopatológica específica del tumor. El tratamiento del CECC ha presentado avances tanto en las técnicas quirúrgicas, como en nuevos agentes quimioterápicos, en el campo de la radioterapia, la introducción de la inmunoterapia e innovaciones en el manejo multidisciplinario, consiguiendo mejoras en el control locoregional y en la calidad de vida del paciente afecto.

A pesar de ello, la supervivencia global en el CECC no ha mejorado significativamente a lo largo de las décadas. La tasa de supervivencia de 5 años aumentó del 55% durante el período 1992–1996 al 66% en el período 2002–2006 analizando en todos los grupos de edad y sitios anatómicos dentro del registro SEER<sup>138</sup>. El análisis observó una mejor supervivencia en todos los grupos de edad, excepto en pacientes mayores (> 75 años) y en todos los sitios anatómicos excepto en el CECC de laringe, donde la supervivencia estaba estancada. Esta modificación con una modesta tendencia en la mejoría de la supervivencia en el CECC estuvo relacionada con la aparición del CECC asociado a la infección por VPH, siendo una población con mejor pronóstico que los CECC VPH negativos<sup>139</sup>.

El conocimiento de la carcinogénesis y la biología molecular del CECC permite el desarrollo de nuevas estrategias y dianas terapéuticas. Así pues, la investigación de marcadores predictivos que puedan predecir la evolución, la respuesta a las pautas de tratamiento y marcadores pronósticos de la enfermedad, permitiría realizar un tratamiento individualizado y dirigido con alta especificidad y menor toxicidad para los pacientes afectados de CECC. Si bien los parámetros clínicos facilitan las decisiones terapéuticas y la estimación del pronóstico, conocer los mecanismos biológicos y moleculares que

acompañan la progresión de la neoplasia es relevante para identificar nuevas dianas para desarrollar tratamientos de precisión que mejoren el curso y la evolución de la enfermedad.

La secuenciación genómica<sup>140</sup> ha permitido una mayor comprensión en la patogénesis molecular del CECC catalogando las alteraciones genéticas implicadas, y también se ha diferenciado los CECC según el estatus del VPH. Así, los CECC VPH positivo y VPH negativo representan entidades clínicopatológica y molecularmente distintas<sup>141</sup>, presentando los CECC VPH positivo una mayor supervivencia global<sup>142</sup>, menor tasa de recurrencia y mayor respuesta a la quimiorradioterapia. En los CECC VPH negativo, un 80% presentan anomalías en la función del TP53, y en un 20% se han asociado mutaciones inactivantes del CDKN2A. En cambio, en los CECC VPH positivos se han asociado a mutaciones activadoras del PIK3CA. Existen descritas alteraciones genéticas comunes en los CECC (VPH positivos y negativos), presentándose en un tercio de los CECC mutaciones en los genes que controlan la diferenciación escamosa (NOTCH1, IRF6, TP63) y en un 10% aproximadamente presentan anomalías en el CASP8, que está implicado en la señalización de la vía extrínseca de la apoptosis. Queda reflejado que la gran variedad de alteraciones moleculares y genéticas es capaz de influir en el comportamiento, evolución y pronóstico del tumor.

En el CECC las alteraciones en el genoma confirmadas son en TP53, HER-2, CDKN2A, PIK3CA, PTEN, HRAS and NOTCH1. NOTCH1 es un gen oncosupresor y es la segunda mutación más frecuentemente presentada en el CECC, con una frecuencia del 15-19%. También en el CECC el gen HRAS está mutado aproximadamente en un 4–8% de los pacientes. En los CECC VPH negativos sin mutaciones en p53 o en caspase-8 con alteraciones en el número de copias del ADN provocan una gran inestabilidad genética. La vía de señalización de PI3K/AKT/mTOR está activa en más del 90% de los CECC como resultado de la activación del EGFR (47%), mutaciones en la subunidad  $\alpha$  de PIK3CA (8.6%), amplificaciones de PIK3CA (14.2%), sobreexpresión de PI3K (7.2%) y mutaciones de PTEN (10–15%). La presencia de alteraciones en esta vía de señalización está asociada a un peor pronóstico y resistencia a la quimiorradioterapia.

Tanto el conocimiento de la biología molecular del CECC, como la identificación de biomarcadores, permitirían detectar los CECC de mayor riesgo (que presentan mayor índice de recurrencias locoregionales, aparición de nuevos tumores primarios o metástasis a distancia) y ajustar el tratamiento más adecuado. No existen biomarcadores inmunohistoquímicos en el CECC análogos al receptor de estrógenos HER2 en los cánceres de mama o a la oncoproteína CD117/cKit de los cánceres gastrointestinales. Dada la heterogeneidad del CECC, el riesgo de recurrencia, el crecimiento y progresión, y la variedad de subsitios anatómicos donde se presenta, es crítica la detección precoz antes del desarrollo de metástasis (tanto regionales como a distancia) siendo necesarios estudios que permitan la identificación de biomarcadores con valor pronóstico y predictivo del CECC que permitan mejorar el manejo clínico.

Dadas las diferencias entre los tumores VPH asociados y no asociados, tanto a nivel de la expresión genética, mutaciones y perfil inmune, como en la localización anatómica, los factores de riesgo asociados y el pronóstico, refleja la necesidad de investigar e incidir sobre biomarcadores útiles en el CECC VPH negativo, grupo de peor pronóstico en los CECC, propósito de este trabajo.

Este proyecto estudió el valor inmunohistoquímico de la expresión de la podoplanina con los parámetros clínicopatológicos y su relevancia pronóstica en el CECC VPH negativo. Los resultados revelaron un grado alto de expresión de la IRS de la podoplanina en los casos de recidiva locorregional (62,5%), en los casos con diseminación extracapsular (52,9%) y en los casos con márgenes de resección quirúrgicos afectados (71,4%). Denotando que la inmunoexpresión en grado alto de la IRS de la podoplanina se asoció significativamente con la recurrencia locorregional ( $p=0,002$ ), con la extensión extracapsular ( $p=0,028$ ) y con los márgenes de resección quirúrgicos positivos ( $p=0,028$ ).

No pudimos demostrar una asociación estadísticamente significativa entre el grado de expresión de la podoplanina en relación con la localización y tamaño del tumor, el estado de afectación ganglionar ni con el grado de diferenciación histológico.

Nuestro proyecto no reflejó una asociación estadísticamente significativa entre el grado de diferenciación tumoral y el grado de inmunoexpresión de la podoplanina. En cambio, en estudios publicados, se establece que la expresión de la podoplanina está incrementada según el grado de diferenciación del CECC. El estudio de Prasad et al<sup>143</sup> asoció los niveles de expresión de la podoplanina con los diferentes grados de diferenciación en el CECC de cavidad oral. Una expresión más fuerte de la podoplanina se asoció con los grados histopatológicos pobremente diferenciados. Estos resultados pueden explicarse por el hecho de que la podoplanina juega un papel esencial en la reorganización del citoesqueleto, que es necesaria para aumentar la movilidad celular y es generalmente mayor en las células tumorales indiferenciadas.

La diseminación metastásica demanda un fenotipo invasivo de las células neoplásicas. La podoplanina remodela el citoesqueleto de actina de las células tumorales y puede promover la invasión celular incrementando su movilidad celular modificando las uniones de las fibras de estrés y participando en la concomitante formación de filopodias. La podoplanina tiene múltiples vías efectoras que incluyen la influencia del ensamblaje de los microtúbulos y de las fibras de actina mediado por la vía RhoA y ROCK, vías que conducen a la reorganización de las fibras de estrés<sup>121</sup>. Tratamientos enfocados en la inhibición de la vía RhoA podrían reducir la movilidad de las células tumorales. Las fibras de estrés están compuestas por una disposición de filamentos de actina que están unidos por  $\alpha$ -actinina. Estos filamentos de actina están presentes en las adhesiones focales y son vitales para la señalización intercelular. La motilidad de las células puede presentarse como célula individual, que implica una gran disociación celular con la pérdida de cohesión y aumento de la movilidad, y es considerada el peor patrón de invasión según la clasificación propuesta por Bryne<sup>144</sup>, o en forma de migración celular colectiva<sup>145</sup>, con distintos patrones de invasividad (frentes celulares, cordones

infiltrantes, grupos de células infiltrantes). La expresión de la podoplanina puede dar objetividad a esta invasividad del tumor al cuantificar la motilidad independientemente del patrón invasivo. En ausencia de la TEM la podoplanina también induce la migración celular colectiva<sup>112 146</sup>, lo que enfatiza aún más el papel de la expresión de la podoplanina en el frente tumoral del CECC, conferiendo propiedades proinvasivas y promigratorias.

En contraste, el estudio de De Vicente et al<sup>147</sup> encontraron una correlación inversa entre la expresión de la podoplanina y el grado histológico en los CECC de cavidad oral. La proporción de podoplanina y la IRS presentaron una asociación estadísticamente significativa ( $p=0,03$  y  $p=0,01$  respectivamente) con el grado de diferenciación siendo del 43% en bien diferenciados, 38% de los moderadamente diferenciados y 19% de los casos pobremente diferenciados. Destaca que la expresión de la podoplanina tiende a ser mayor en los casos bien diferenciados, que usualmente son menos invasivos que los pobremente diferenciados. Sugirieron que la desdiferenciación no se correlacionaba con la propiedad invasiva del carcinoma y que la podoplanina promueve la invasividad de las células tumorales incrementando la formación de filopodios<sup>106</sup> y con el desarrollo de una población celular tumoral específica, las células madre cancerígenas, que son células iniciadoras de tumores y más invasivas que al expandirse clonalmente dan lugar a un tumor de forma más rápida, y con mayor predisposición a las recidivas, con mayor capacidad regenerativa y con más resistencia a la quimio y radioterapia. Es importante conocer la función biológica de las moléculas cuya expresión es característica de esta población celular, como es el caso de CD44 y de la podoplanina<sup>125</sup> para, así, poder entender mejor la biología de estos tumores, conseguir realizar un diagnóstico precoz, e identificar nuevas dianas terapéuticas para el CECC.

Por tanto, puede considerarse que la expresión de la podoplanina es un determinante en el perfil de la motilidad e invasividad de las células tumorales en el CECC independientemente del grado de diferenciación. La podoplanina podría ser útil como biomarcador en la identificación de la población de células tumorales con alta propensión a la invasión, proceso clave en el desarrollo de las metástasis<sup>147</sup>.

Los resultados de nuestro estudio no presentaron diferencias significativas entre el grado de expresión de la podoplanina y las diferentes localizaciones anatómicas del CECC. La mayoría de los estudios publicados que evalúan la expresión inmunohistoquímica de la podoplanina y su relación con variables clinicopatológicas se han realizado en el CCE de cavidad oral, donde una mayor expresión de la podoplanina se asoció a una baja supervivencia y a un peor pronóstico<sup>148 149 150</sup>.

En la tumorigénesis, la expresión de la podoplanina en las lesiones premalignas del CECC de cavidad oral y la laringe está asociado a un mayor grado de displasia y a un mayor riesgo de transformación maligna<sup>151 152</sup>. La expresión de la podoplanina fue mayor en el CECC oral que en las lesiones premalignas, que a su vez presentan una mayor expresión en los casos con displasia severa<sup>153</sup>, por lo que la podoplanina se perfila como un posible biomarcador de la carcinogénesis y del desarrollo neoplásico en etapas tempranas del CECC de cavidad oral. El análisis de más de 300 lesiones orales

pre malignas agrupadas de varios estudios retrospectivos<sup>151 152 154 155</sup> indicó que más del 46% de las lesiones con expresión notable de la podoplanina progresaron a carcinoma siendo en menos del 14% en las lesiones sin esta expresión. La probabilidad de formación neoplásica de las lesiones histológicamente benignas está aumentada con la expresión de la podoplanina y los datos del estudio de Kawaguchi reflejaron que más del 80% de las leucoplasias orales que expresan niveles elevados de podoplanina se convirtieron en carcinoma<sup>154</sup>.

En el estudio de Rodrigo et al<sup>156</sup> la expresión de podoplanina aumentó en las primeras etapas de la tumorigénesis laríngea y estuvo asociado con un mayor riesgo de desarrollar CECC de laringe. Los pacientes con lesiones con alta expresión de la podoplanina tuvieron una mayor incidencia de cáncer de laringe que aquellos con expresión negativa alcanzando el límite estadístico de significancia (51% versus 30%,  $p=0,071$ ). No obstante, la expresión de la podoplanina en los CECC de laringe disminuyó durante la progresión del tumor. La alta expresión de podoplanina se correlacionó inversamente con la clasificación T ( $p=0,033$ ), estadio de la enfermedad ( $p=0,006$ ) y el grado patológico ( $p=0,04$ ). Hubo una tendencia, aunque no significativa, hacia la reducción de la supervivencia específica de la enfermedad para pacientes con niveles bajos de podoplanina ( $p=0,31$ ) y el patrón de expresión difusa ( $p=0,08$ ). Tomados en conjunto, estos datos apoyan un papel para la expresión de la podoplanina en el inicio del desarrollo de los CECC de laringe pero no en cambio en su progresión.

En otras localizaciones del CECC esta asociación es variable, mientras que se ha observado una relación similar entre la expresión tumoral de la podoplanina con la baja supervivencia y el fenotipo infiltrante en el CCE de esófago<sup>157</sup>, en el CECC de orofaringe no se pudo demostrar esta asociación<sup>158</sup>. Estas diferencias pueden explicarse porque existen diferentes factores de riesgo y mecanismos moleculares específicos para cada carcinoma.

En estudios publicados, se encontraron resultados dispares con respecto a la metástasis en los ganglios linfáticos y la expresión de la podoplanina. En nuestro proyecto no pudimos demostrar una relación estadísticamente significativa entre el grado de inmunoexpresión de la podoplanina y el estado de afectación ganglionar.

La mayoría de los estudios informaron de una mayor expresión de la podoplanina en los casos con afectación ganglionar positiva en el CECC de cavidad oral<sup>149 159 160 161 162 163</sup>. Huber et al estudiaron la expresión de la podoplanina en pacientes afectados de CECC de cavidad oral y de orofaringe, demostrando que la podoplanina fue un predictor significativo de la metástasis ganglionar, también reflejado en el estudio de Hamada et al<sup>235</sup> en el CECC de cavidad oral. En cambio, en el estudio de Voelker et al<sup>164</sup> no reflejó una relación entre la expresión de la podoplanina y la presencia de metástasis ganglionares en los CECC de laringe e hipofaringe.

Estudios publicados relacionaron una correlación significativa entre la alta expresión de la podoplanina y la progresión de la metástasis en los ganglios linfáticos y el mal pronóstico en los tumores del tracto aerodigestivo superior<sup>149</sup>, como el trabajo de

Chuang et al.<sup>173</sup> que mostraron una relación significativa entre la expresión de la podoplanina y las metástasis en los ganglios linfáticos en el carcinoma de esófago.

La presencia de la IVL y de la IPN tiene implicación pronóstica en el CECC. En nuestro proyecto la asociación entre el grado de expresión elevado de la IRS de la podoplanina no fue estadísticamente significativa con la invasión vasculolinfática y perineural, igualmente mostrado en otros estudios<sup>165</sup>. De acuerdo con el estudio de Vicente et al.<sup>147</sup>, la presencia de márgenes quirúrgicos afectados fue un predictor independiente de la supervivencia.

Mostramos que el grado alto de expresión de la IRS de la podoplanina fue un factor independiente asociado con la recurrencia locorregional (OR: 5,40; IC 95%: 1,14-25,86;  $p=0,034$ ). No obstante, en nuestro estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia global con la alta expresión de la IRS de la podoplanina.

Las publicaciones existentes sobre el papel pronóstico de la expresión de la podoplanina en el CECC presentaron resultados controvertidos. Estos hallazgos sugieren que la función biológica de la podoplanina puede variar según el subtipo de CECC.

La mayoría de los estudios han sugerido una relación negativa entre la expresión de la podoplanina en las células tumorales y los resultados del tratamiento. Vormittag et al.<sup>166</sup> evaluaron 63 casos de CECC tratados con radio o quimioradioterapia. En el análisis multivariante, la alta expresión de la podoplanina se asoció con una peor supervivencia global ( $p = 0,044$ ). La podoplanina fue identificada como un marcador de transformación maligna y de mal pronóstico en el CECC de cavidad oral<sup>148</sup>, asociado a progresión maligna con mayor mortalidad. En 2001, Kreppel et al.<sup>159</sup> presentaron los datos de 63 pacientes con CECC de cavidad oral. Las tasas de supervivencia global a los 5 años fueron del 93% en pacientes con baja expresión de la podoplanina y del 15% en pacientes con alta expresión de la podoplanina ( $p<0,001$ ). En el estudio de Bartuli et al.<sup>167</sup> de 20 pacientes afectados de CECC de cavidad oral, los niveles altos de expresión de la podoplanina se asociaron con una mayor tasa de metástasis en los ganglios linfáticos ( $p<0,001$ ). Además, los pacientes con metástasis en los ganglios linfáticos y con una alta expresión de la podoplanina tuvieron una supervivencia libre de enfermedad significativamente peor que los demás pacientes ( $p=0,004$ ). Seki et al.<sup>168</sup> presentaron una serie de 78 pacientes con CECC de cavidad oral, los casos con alta expresión de la podoplanina también se asociaron con un mal pronóstico en este estudio. Además, se ha informado de un impacto pronóstico negativo de la expresión de la podoplanina en las células tumorales para otros tipos de carcinoma escamoso. Krepel et al.<sup>169</sup> investigaron a 63 pacientes sin tratamiento previo con carcinoma escamoso cutáneo de la región de cabeza y cuello. La podoplanina se expresó en 40 casos. Las tasas de supervivencia global a los 5 años fueron del 91% en pacientes con un tumor que no expresa podoplanina y del 0% en pacientes con tumor expresor de podoplanina ( $p<0,001$ ). Chao et al.<sup>170</sup> presentaron una serie de 113 pacientes con carcinoma escamoso de esófago. En el análisis multivariante, la alta expresión de la podoplanina fue un predictor negativo independiente

para la supervivencia global ( $p < 0,001$ ). Igualmente, en la publicación de una serie de 45 pacientes con carcinoma escamoso esofágico<sup>171</sup> la supervivencia libre de enfermedad fue más pobre en los pacientes con alta expresión de la podoplanina (27% frente a 54%, con  $p < 0,001$ ).

En el estudio de Voelker et al<sup>164</sup>, se analizó el potencial pronóstico de la podoplanina en el CECC de laringe e hipofaringe. En la valoración de 119 casos a través de análisis multivariante, mostró que la expresión alta de la podoplanina en las células tumorales se asoció con un empeoramiento significativo del pronóstico. La podoplanina se ha considerado un biomarcador de la progresión tumoral en los CECC de cavidad oral<sup>172</sup>.

En cambio, otros estudios publicados no encontraron una relación clara entre la expresión de la podoplanina en las células tumorales y el pronóstico de la supervivencia de los pacientes, como en nuestro proyecto de investigación. Chuang et al.<sup>173</sup> no observaron una asociación directa entre la expresión alta de la podoplanina y la supervivencia global en una serie de 59 pacientes afectados de carcinoma escamoso esofágico. Dos Santos et al.<sup>174</sup> declararon que la podoplanina no era un factor pronóstico significativo en 42 pacientes valorados con CECC bien diferenciado de cavidad oral. Hallazgos similares fueron reportados en otra serie de 35 pacientes con CECC de la cavidad oral<sup>175</sup>, y en el estudio de De Vicente et al<sup>147</sup>.

La podoplanina participa en la invasión celular del CECC por el incremento de la movilidad de las células tumorales<sup>176 177 113</sup>, y lo realiza tanto por la vía TEM dependiente como por la migración celular colectiva vía independiente de la TEM. En los CECC se ha detectado la expresión de la podoplanina en la parte invasiva del tumor. En el estudio de Wakisaka<sup>178</sup>, se ha hallado que los CECC VPH positivo tienen un fenotipo asociado a la TEM, a pesar de ello estos tumores no expresan la podoplanina al contrario que los CECC VPH negativo que sí expresan podoplanina. El mecanismo propuesto en los CECC VPH positivo implicado es por la sobreexpresión del miR363, que también regula la expresión de la podoplanina. La sobreexpresión de la podoplanina en el CECC ha sido correlacionada con un empeoramiento en el pronóstico y una mayor incidencia en las metástasis linfáticas<sup>150 179</sup>, sobretodo en CECC localizados a nivel de cavidad oral<sup>180</sup>, y con una menor respuesta al tratamiento quimioradioterápico<sup>166 159</sup>.

La transición epiteliomesenquimal (TEM) participa en las metástasis del CECC. Los cambios en los niveles de E-cadherina y vimentina están asociados con el incremento de las metástasis en el CECC<sup>181</sup>, así como la coexpresión de los factores de transcripción TWIST, SNAIL y HIF  $\alpha$ <sup>182</sup>. La TEM, además, permite a la célula tumoral adquirir características de célula madre<sup>183</sup>. La TEM es un proceso dinámico y su reversibilidad es necesaria para el establecimiento de la metástasis<sup>184</sup>. Durante la metástasis, tras la extravasación de los vasos sanguíneos y la formación de un foco secundario, las células que han sufrido una TEM deben experimentar el proceso inverso, es decir, una transición mesénquima-epitelial (TME), ya que se ha observado que, por regla general, las metástasis de los carcinomas conservan el fenotipo epitelial del tumor primario del

CECC. Este proceso parece ser importante para que las micrometástasis puedan crecer y desarrollar un tumor secundario<sup>185</sup>.

Además, las células tumorales pueden adquirir una TEM parcial. La TEM parcial es un predictor independiente de la metástasis en el CECC, del grado tumoral y de un peor pronóstico, siendo la expresión de la podoplanina necesaria para la TEM parcial. La migración celular permuta según el grado de diferenciación del carcinoma escamoso. En general, los CECC bien diferenciados presentan una migración celular colectiva y actúan como una unidad funcional activando las metaloproteasas que degradan la matriz extracelular. En cambio, en los CECC moderadamente o pobremente diferenciados puede presentarse una migración individual tipo mesenquimática a través de una TEM parcial. Esta migración depende de las adhesiones celulares de las fibras de estrés que a través de contracciones de actina y miosina permiten infiltrarse a través de la matriz extracelular sin la degradación por parte de las metaloproteasas<sup>186</sup>. Independientemente del mecanismo de migración, las células tumorales del CECC utilizan los invadopodios para poder traspasar la membrana basal y su tejido conjuntivo adyacente, las células endoteliales vasculares y linfáticas y la matriz extracelular para completar la migración de la metástasis<sup>187</sup>. Para la estabilización de estos invadopodios es fundamental la interacción de la podoplanina con el CD44.

Nuestros resultados son consistentes con los datos obtenidos en estudios previos<sup>188</sup> y metaanálisis<sup>189</sup> publicados sobre la importancia de la diseminación extracapsular en el CECC, representado un predictor de la recurrencia regional y de las metástasis a distancia, siendo un factor clave en la supervivencia de los pacientes afectados de CECC.

Reflejamos en el estudio que la presencia de la diseminación extracapsular se asoció de forma estadísticamente significativa con la recurrencia locorregional (OR: 14,18; IC95%: 3,20-62,72;  $p < 0,001$ ) y con una supervivencia global disminuida (siendo del 40,31% en los casos con ECS).

La presencia de la ECS es un factor pronóstico negativo para la supervivencia en el CECC<sup>190</sup> y es un criterio para una selección de pacientes de alto riesgo que se beneficiaran de quimiorradioterapia adyuvante.

La ECS de los ganglios linfáticos se define cuando las células tumorales se extienden a través de la cápsula nodal en el tejido adiposo periganglionar y es indicativo de un fenotipo agresivo para múltiples cánceres, incluido el CECC<sup>191</sup>. Los métodos para clasificar la ECS están basados en la evaluación histológica<sup>192</sup> y se ha caracterizado la ECS para determinar su importancia pronóstica, correlacionando los datos histopatológicos y clínicos.

Múltiples estudios demuestran que la ECS tiene un impacto pronóstico significativo asociando una menor supervivencia global, con una mayor recurrencia local y presencia de metástasis. La importancia pronóstica de la ECS ha sido extensamente estudiada en el CECC, Hirabayashi et al. demostraron que la supervivencia a los 5 años para pacientes con CECC de laringe con ECS que se sometieron a cirugía cervical radical

fue del 17% en comparación con el 76% en pacientes sin ECS<sup>193</sup>. Se subraya la importancia específica en el CECC por el hecho de que la ECS está incorporada en la clasificación ganglionar de la 8ª edición de la UICC<sup>194</sup>.

Para el CECC, la presencia de metástasis ganglionares sigue siendo un factor predictivo relevante para la recurrencia regional y la supervivencia, disminuyendo la tasa de supervivencia en aproximadamente un 50%. La presencia de la ECS tiene un impacto negativo significativo adicional. El primer estudio clave de Myers et al en 2001 destacó el impacto de la ECS en el CECC de cavidad oral (lengua) tratado mediante resección quirúrgica en 266 pacientes. La ECS resultó ser el predictor más significativo de la recurrencia regional y del desarrollo de metástasis a distancia que comportaron una disminución de la supervivencia global<sup>195</sup>. El estudio de Shaw et al. con 561 casos de CECC de cavidad oral mostró que la ECS de los ganglios linfáticos cervicales fue el marcador predictivo negativo con una supervivencia global a los cinco años de sólo el 24%. Además, demostraron que la ECS estaba asociada con una duplicación de la recurrencia local y de las metástasis a distancia, y de una recaída regional triplicada incluso con márgenes quirúrgicos libres<sup>196</sup>. Suoglu et al. demostraron que la ECS contralateral se asociaba con el aumento del estadio N y del número total de ganglios positivos<sup>197</sup>. Una revisión sistemática con el metanálisis de Mermod et al.<sup>189</sup> evaluó el papel de la ECS en el CECC, identificando que la extensión de la ECS estaba significativamente asociada con el mal pronóstico, y no reportó asociación entre el tamaño de los ganglios linfáticos y la presencia de la ECS. La ECS puede ser una característica frecuente en casos clínicamente con ganglios negativos y puede ser más común en ganglios linfáticos más pequeños de lo que generalmente se aprecia<sup>198</sup>. En el estudio realizado por Volkert et al. donde se analizaron 245 casos de CECC de cavidad oral, la extensión de la diseminación extracapsular jugó un papel fundamental en la supervivencia general y específica de la enfermedad cuando se extendía más allá de 1,7 mm de la cápsula ganglionar. La supervivencia específica de la enfermedad fue significativamente más baja en comparación con pacientes sin ECS<sup>199</sup>.

Estudios publicados apoyan la idea de que el alcance del crecimiento de la ECS debe ser considerado como un determinante clave similar al crecimiento del tumor primario<sup>200</sup>. El número de metástasis en los ganglios linfáticos es un factor predictor significativo independiente de la ECS ( $p < 0.05$ ; OR: 11.6)<sup>201</sup> Liu et al. analizaron en los casos afectos de CECC de laringe con metástasis ganglionares cervicales ipsilaterales que el nivel de la ECS puede aumentar proporcionalmente a la carga de los ganglios linfáticos (presencia de ECS del 8,6% con un ganglio positivo, del 33,3% con dos ganglios positivos, y del 66,7% con tres o más ganglios cervicales afectos)<sup>202</sup>. En la práctica clínica habitual, el número de ganglios linfáticos afectos solo se puede determinar después del procedimiento quirúrgico debido a la escasa sensibilidad de las modalidades de imagen actuales<sup>203</sup>. Como resultado, la caracterización molecular de la ECS es vital para proporcionar biomarcadores para identificar el fenotipo agresivo del CECC en una etapa temprana.

Los métodos basados en el análisis del tejido obtenido de una biopsia tumoral diagnóstica para predecir la ECS y el fenotipo agresivo podrían conllevar un importante impacto clínico en el tratamiento y manejo de los pacientes afectados de CECC.

La mayoría de los estudios que han examinado la expresión de proteínas en los casos de ECS en el CECC usando métodos de inmunohistoquímica se han realizado en relativamente pequeñas cohortes de pacientes. En el CECC se han encontrado asociaciones clave con la expresión de proteínas con la ECS con la NO sintasa inducible (iNOS)<sup>204</sup>, la matriz metaloproteínasa 12 (MMP-12)<sup>205</sup>, la podoplanina (PDPN)<sup>165</sup>, la proteína tipo Speck asociada a la apoptosis (ASC)<sup>206</sup>, inhibidor del activador del plasminógeno-1 (SERPINE1) y actina de músculo liso  $\alpha$  (SMA)<sup>207</sup>, fibronectina oncofetal glicoproteína<sup>208</sup>, receptor de ensamblaje mitocondrial (MasR)<sup>209</sup>, quinasa 1 similar al receptor de activina (ACVRL1)<sup>210</sup>, y la expresión de mioferlina (MYOF)<sup>211</sup>. Cabe destacar que Kumar et al. describieron que la expresión de MYOF predice de forma independiente un mal resultado clínico en pacientes con CECC de orofaringe y esa expresión es inversamente relacionada con el estado del VPH<sup>211</sup>.

Estudios a través de biomarcadores séricos en el CECC como Tai et al. relataron que la elevación de los niveles de proteína c reactiva (PCR) (5,0 mg/L) se correlacionó significativamente con la ECS en el CECC de cavidad oral, abogando por que la PCR sérica preoperatoria se use como un marcador pronóstico<sup>212</sup>.

La identificación histológica de la ECS precedió a la era molecular, y actualmente se ha identificado una variedad de asociaciones moleculares con la ECS a través de la investigación con las nuevas tecnologías disponibles, como estrategias de secuenciación, genómica, transcriptómica y de la epigenética, que deben utilizarse para proporcionar una información amplia para caracterizar e identificar biomarcadores asociados con un fenotipo agresivo del CECC que sean pronósticos, predictivos e independientes de la histopatología.

El análisis molecular del subconjunto de pacientes que presentan ECS ha revelado una multitud de biomarcadores potenciales asociados con este fenotipo agresivo, contribuyendo en un futuro para mejorar la práctica clínica en el manejo de los pacientes afectados de CECC. La investigación de estos biomarcadores moleculares asociados con la ECS en el CECC permitiría enfoques terapéuticos más específicos, efectivos y potencialmente personalizados con el objetivo final de reducir la recurrencia de la enfermedad y mejorar la tasa de supervivencia.

Se han desarrollado investigaciones sobre la identificación de potenciales biomarcadores mediante la secuenciación de ARN de las muestras tumorales de CECC. El análisis de expresión de ARN en el CECC de cavidad oral (lengua) reveló un perfil molecular que contenía BMP2, CTTN, EEF1A1, MMP9 y la expresión genética de EGFR se asociaron significativamente con la ECS<sup>213</sup>. La publicación de Wang et al<sup>214</sup> identificó el perfil de expresión de 11 genes (GGH, MTFR1, CDKN3, PSRC1, SMIM3, CA9, IRX4, CPA3, ZSCAN16, CBX7 y ZFP3) y se asoció con el estado de ECS y los pacientes que expresaron este perfil tuvieron una supervivencia general significativamente peor. El

extenso estudio realizado por The Cancer Genome Atlas (TCGA) evaluó a 279 pacientes con CECC identificando una firma de 11 genes (PAGE4, SMTNL1, VTN, CA5A, C1orf43, KRTAP19-1, LEP, HRH4, PAGE5, SEZ6L, CREB3) asociado con la ECS y con la disminución de la supervivencia general<sup>140</sup>. Un nuevo análisis de estos datos por otro estudio identificó que la expresión del gen HSP90AA1 también fue asociado con la ECS y tuvo resultados generales a largo plazo significativamente más pobres con tasas de supervivencia libre de enfermedad menores<sup>215</sup>. Liao et al. realizaron una secuenciación utilizando un panel de genes específicos en 345 casos de CECC de cavidad oral donde 201 presentaban ECS. El panel incluyó 10 genes (6 oncogenes y 4 genes supresores de tumores); HRAS, BRAF, FGFR3, SMAD4, KIT, PTEN, NOTCH1, AKT1, CTNNB1 y PTPN11. Entre los pacientes positivos para ECS, 46 muestras con un panel de secuencia positiva tuvieron tanto un resultado libre de enfermedad significativamente peor, como de supervivencia global y de supervivencia específica de la enfermedad<sup>216</sup>. Respecto a la asociación de la ECS con las mutaciones en el TP53, se ha reflejado en el estudio de Lapke et al<sup>217</sup> en una cohorte de 345 pacientes con CECC de cavidad oral, las mutaciones missense en el dominio de unión del ADN TP53 se asociaron con una disminución específica de la supervivencia en comparación con TP53 de tipo wild. Después de considerar otros factores clinicopatológicos, estas mutaciones missense se asociaron con la ECS, los autores sugirieron que el análisis de las mutaciones del TP53 podrían mejorar la estratificación pronóstica del CECC de cavidad oral. Relacionado con el TP53, otro estudio evaluó los polimorfismos de MDM2 (un inhibidor de TP53) y las mutaciones somáticas de TP53 en una cohorte de CECC de cavidad oral demostrando una asociación con la presencia de ECS, describiendo una interacción entre MDM2 SNP 309 y p53 con respecto a comportamientos tumorales (incluyendo la diferenciación tumoral, la diseminación extracapsular de los ganglios linfáticos y supervivencia libre de enfermedad)<sup>218</sup>. Peng et al<sup>219</sup> identificaron a través de 112 casos de CECC de cavidad oral que la amplificación de ADN recurrente en la región 8q22.2 a 8q24.3 estuvo asociado con la ECS. Otro estudio reveló que las aberraciones del número de copias de EGFR estaban significativamente asociadas con la ECS<sup>220</sup>.

Dentro de los estudios epigenéticos en el CECC, destaca el realizado por Jithesh et al. En una cohorte de 44 casos de CECC de orofaringe perfiló el metiloma de ADN. Los niveles diferenciales de metilación identificados en varios genes estableció el concepto de metilación concordante o fenotipo metilador de isla CpG (CIMP) mostrando una asociación de peor pronóstico con el CIMP alto en el CECC<sup>221</sup>.

En relación con la ECS y la expresión de la podoplanina, Mermod et al. propusieron que la expresión de la podoplanina en el área intratumoral y en el ganglio metastásico fue un factor independiente asociado con la extensión extranodal en los CECC de de cavidad oral<sup>165</sup>.

Las células de CECC con altos niveles de CD44 adquieren capacidad de autorenovación, adquiriendo características de células madre, y se asocian con CECC de peor pronóstico y metastásicos. Señalar que el CD44 ha sido identificado también como un componente de los invadopodios en las células del CECC<sup>104 105 106</sup>.

En cuanto a la podoplanina como biomarcador de la migración de las células tumorales en el CECC, los hallazgos sugieren una asociación significativa entre la extensión extracapsular y la actividad de la podoplanina, especialmente en el frente invasivo. Además, se considera que la presencia marcada de podoplanina estromal en la extensión extracapsular representa la reacción desmoplásica alrededor del borde infiltrante periganglionar en el nódulo metastásico<sup>222</sup>. Esto tiene el significado de enfatizar la importancia del microambiente en el borde infiltrante del tumor donde ocurre la extensión extracapsular. Dado que la extensión extracapsular es una característica agresiva representativa de varios tipos de cáncer, incluido el CECC, se han realizado estudios para identificar y predecirla. Sin embargo, no hay consenso sobre los factores relacionados con el tumor primario, y persiste la controversia del propio diagnóstico de la extensión extracapsular<sup>223</sup>. A falta de una evidente manifestación clínica, salvo hallazgos radiológicos que puedan facilitar un diagnóstico preoperatorio definitivo de extensión extracapsular, se han explorado mecanismos moleculares y biomarcadores que pueden inducir la extensión extracapsular<sup>223</sup> subdividiendo todo el grupo de extensión extracapsular más allá de la cápsula ganglionar metastásica de 2 mm<sup>224</sup>.

Por tanto, la verificación de la relación entre el grado de expresión de la podoplanina y la extensión extracapsular podrían aportar subcategorías para establecer nuevas implicaciones clínicas en el CECC. En nuestro estudio el grado alto de inmunoexpresión de la podoplanina se asoció significativamente con la extensión extracapsular ( $p=0,028$ ) en el CECC VPH negativo.

Además, el microambiente tumoral ha reflejado su potencial para afectar el comportamiento de las células cancerosas, y la importancia de los biomarcadores relacionados con el microambiente tumoral está aumentando<sup>225</sup>. Los fibroblastos asociados al cáncer (CAF), cuya proliferación y secreción de factores de crecimiento son anormalmente elevadas debido al tumor, son las principales células constituyentes del microambiente tumoral<sup>226</sup>. La expresión de la podoplanina en los CAF se propuso recientemente como un nuevo biomarcador y se ha identificado en varias neoplasias malignas, incluidos los cánceres de mama y pulmón, y hay evidencia de la participación del microambiente tumoral en el desarrollo de la extensión extracapsular en el microambiente nodal de los CECC de cavidad oral<sup>225</sup>. Los CAF están involucrados en la progresión tumoral en cánceres que incluyen el CECC, a través de la linfangiogénesis y la TEM, similar al principal mecanismo de acción de la podoplanina.

Estudios recientes<sup>227</sup> han demostrado que las células tumorales del CECC de cavidad oral inducen la diferenciación de los CAF a través de la producción y liberación de TGF- $\beta$  y, a su vez, de los CAF a través de la secreción del mismo factor, que induce tanto la diferenciación de nuevos CAF como la expresión de la podoplanina en las células tumorales<sup>228</sup>. Los estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que los CAF inducen la expresión de la podoplanina en las líneas celulares de CECC orales cuya activación está asociada con la formación de invadopodios y con la degradación de la matriz extracelular mediante la activación de la proteína de unión al ARNm del factor II de crecimiento similar a la insulina-3 (IMP-3), provocando que las células tumorales adquieran un

fenotipo invasivo con capacidad migratoria, favoreciendo la TEM y la metástasis<sup>106</sup>, lo que indica una potencial diana terapéutica de interés para desarrollar novedosos estudios experimentales e histopatológicos que busquen esclarecer esta relación en diferentes formas del CECC. Existe evidencia de que las células tumorales del CECC de cavidad oral tienen la capacidad de inducir la diferenciación de los CAF y que estos a su vez inducirían la expresión de la podoplanina en las células tumorales a través de la secreción de TGF- $\beta$ , favoreciendo la TEM y la invasividad del carcinoma. Esto indica que la relación entre los CAF y la expresión tumoral de la podoplanina podría desempeñar un papel importante en la progresión del CECC. La podoplanina se localiza, generalmente, en el frente invasivo y también presenta expresión en células del estroma, principalmente en los CAF, sin embargo, el valor pronóstico de su presencia es controvertido, estando en algunos casos asociado a una supervivencia más corta y un peor pronóstico, y, en otros, a un pronóstico favorable<sup>91</sup>.

La activación de la vía de señalización celular de RAS–MAPK, PI3K–AKT–mTOR<sup>229</sup> y STAT3<sup>230</sup>, también a través de la interacción con la podoplanina, permite a la célula tumoral evadir la muerte celular programada (anoikis) al desprenderse de la unión a la membrana basal. Otro mecanismo descrito para evitar esta muerte celular es a través de factores derivados de los CAF del microambiente tumoral. Estos CAF presentan sobreexpresión de la podoplanina<sup>231</sup>.

Sin embargo, aún no se han establecido todos los mecanismos moleculares regulados por los CAF en el contexto del CECC. En el microambiente tumoral del CECC existe una marcada presencia de CAF, que participan en procesos que promueven la progresión tumoral, como la linfangiogénesis, la angiogénesis, la modulación del sistema inmunitario, y promueven la proliferación y migración de células tumorales, clínicamente relacionado con una baja supervivencia y mal pronóstico. La presencia de los CAF puede evaluarse mediante la identificación de varios antígenos, aunque se ha demostrado que la proteína  $\alpha$ -SMA es uno de los marcadores más utilizados para distinguir este tipo de células de los fibroblastos normales y otras células del estroma. Entre los posibles mecanismos implicados en la interacción entre el microambiente tumoral y el CECC, se ha establecido que los CAF inducirían la expresión de proteínas que favorecen la TEM de las células tumorales como la podoplanina<sup>232</sup>.

Las limitaciones de este proyecto de investigación fueron el análisis retrospectivo, el limitado tamaño muestral, la heterogeneidad de los casos y ser un estudio realizado en un único centro. Se excluyeron los pacientes con CECC previo, y los pacientes con CECC tratados en primera línea con radioterapia o quimioradioterapia, o bien con antecedentes de tratamiento con quimioterapia o radioterapia para reducir la mala interpretación. Se minimizó el error técnico por mala calidad en la preparación histológica por el análisis realizado de las muestras obtenidas de los pacientes tratados quirúrgicamente y no de muestras obtenidas a través de una biopsia diagnóstica. La cuantificación de la expresión de podoplanina se basó en la valoración subjetiva con el sesgo de interpretación intrínseco. En este estudio, el análisis de la expresión de podoplanina se realizó según un protocolo previamente publicado<sup>233</sup> y con la IRS, analizando el número de células

expresando podoplanina y la intensidad de la tinción. La no uniformidad de los diferentes estudios publicados del rango de la IRS de la podoplanina refleja incongruencia entre los resultados al considerar la podoplanina como biomarcador pronóstico de los CECC.<sup>234 235</sup>

La muestra relativamente limitada de este trabajo justifica una validación de estos resultados en un estudio prospectivo más amplio e inclusive multicéntrico para evaluar la utilidad clínica de la podoplanina como biomarcador inmunohistoquímico del CECC VPH negativo y para analizar el impacto de la inmunoexpresión de la podoplanina en la supervivencia global de los pacientes afectados de CECC.

## **7. CONCLUSIÓN**

1.- El grado alto de expresión de la IRS de la podoplanina se asocia de forma independiente y de forma estadísticamente significativa con la recurrencia locoregional en el CECC VPH negativo.

2.- Respecto a las características histopatológicas, el grado alto de inmunoexpresión de la IRS de la podoplanina se asoció significativamente con la presencia de la extensión extracapsular y con los márgenes de resección quirúrgicos afectados. Pero no presentaron asociación estadísticamente significativa con la invasión angiolinfática ni perineural, ni con el grado de diferenciación del CECC VPH negativo.

3.- El grado alto de expresión de la IRS de la podoplanina no se relacionó significativamente con la supervivencia global en los CECC VPH negativos.

4.- El grado alto de la expresión de la IRS de la podoplanina en los CECC VPH negativos sugiere un comportamiento tumoral agresivo. La podoplanina puede perfilarse como un biomarcador inmunohistoquímico pronóstico en los CECC VPH negativos.

## **8. LÍNEAS DE FUTURO**

Remarcar que las opciones de prevención primaria del CECC no deben minusvalorarse, dado que los mayores factores de riesgo en la tumorigénesis del CECC son el tabaco, el alcohol y la infección por el VPH. Los esfuerzos para disminuir el consumo del tabaco y alcohol, y la vacunación contra el VPH podrían reducir en el futuro los casos de CECC.

Valorar la aplicabilidad de evaluar la inmunoexpresión de la podoplanina en la práctica clínica habitual mediante la aprobación tanto del comité ético de investigación como del comité multidisciplinar de cabeza y cuello de nuestra institución, para permitir un análisis prospectivo e inclusive múlticéntrico con una mayor cohorte estudiando la relevancia de la podoplanina como biomarcador inmunohistoquímico pronóstico en el CECC VPH negativo.

Dentro del estudio molecular y de las funciones de la podoplanina, diversas líneas de investigación están en desarrollo para determinar la relación entre los patrones de invasión de las células tumorales y las proteínas de unión de la podoplanina, y también para esclarecer la adquisición y el mantenimiento de las características de célula madre que obtienen las células tumorales.

Identificar la significancia clinicopatológica de la sobreexpresión de la podoplanina en el CECC permitirá determinar su papel como biomarcador pronóstico.

Además, están en desarrollo estrategias terapéuticas para los tumores con sobreexpresión de la podoplanina como los anticuerpos monoclonales antipodoplanina, mAb NZ1 que neutraliza la relación entre la podoplanina y el CLEC-2. También destacar la investigación del rol de la podoplanina en el desarrollo de la inmunoterapia mediada por células T (CAR-T).

Señalar la investigación de terapias basadas en la detección de mutaciones presentes en el CECC como el tipifarnib en los casos de CECC recurrentes o metastásicos con mutaciones en el HRAS, el uso de PI3K inhibidores en los casos con CECC con mutaciones en el NOTCH1, fármacos inhibidores de la vía PI3k/AKT/mTOR (buparlisib y alpelisib), o bien marcadores de exclusión de inmunoterapia en pacientes con alta expresión de INF $\gamma$ . La identificación a través de la NGS (next generation sequencing) de las alteraciones moleculares presentes en el CECC amplía las expectativas de futuro para el desarrollo de nuevas pautas de tratamiento en el CECC.

## **9. BIBLIOGRAFÍA**

- 1 WHO Classification of Tumours Editorial Board. Head and neck tumours. 5th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2022.
- 2 El-Naggar AK, Chan JK, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ. WHO Classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: IARC Press; 2017.
- 3 Ferlay J et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* 144, 1941–1953, doi:10.1002/ijc.31937 (2019). [PubMed: 30350310]
- 4 Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA A Cancer J Clin*. 2021;71(3):209–49. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- 5 Ferlay, J.; Ervik, M.; Lam, F.; Colombet, M.; Mery, L.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Soerjomataram, I.; Bray, F. Global Cancer Observatory: Cancer Today; International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 2020.
- 6 Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the international head and neck cancer epidemiology consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18(2 (February)):541–50
- 7 Talamini R et al. Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study. *Cancer Causes Control* 13, 957–964, doi: 10.1023/a:1021944123914 (2002).
- 8 Hasibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Cjen C, Curado M et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the international Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Am J Epidemiol* 2013; 178:679
- 9 Gillison ML, Chaturvedi AK, Anderson WF, Fakhry C. Epidemiology of human papillomavirus positive head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2015; 33(29):3235-42.
- 10 Windon MJ et al. Increasing prevalence of human papillomavirus-positive oropharyngeal cancers among older adults. *Cancer* 124, 2993–2999, doi:10.1002/cncr.31385 (2018). [PubMed:29710393]
- 11 Rettig E, Kiess AP, Fakhry C. The role of sexual behavior in head and neck cancer: implications for prevention and therapy. *Expert Rev Anticancer Ther* 2015; 15:35–49
- 12 Kreimer AR, Pierce Campbell CM, Lin HY, et al. Incidence and clearance of oral human papillomavirus infection in men: the HIM cohort study. *Lancet* 2013; 382(9895):877–87.
- 13 zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2:342–50
- 14 Chaturvedi AK. Epidemiology and clinical aspects of HPV in head and neck cancers. *Head Neck Pathol* 2012;6 Suppl 1: S16-24
- 15 Goodman MT, Saraiya M, Thompson TD, et al. Human papillomavirus genotype and oropharynx cancer survival in the United States of America. *Eu J Cancer Oxf Engl* 1990 2015; 51(18):2759-67
- 16 Marur S, D’Souza G, Westra WH et al HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol* 2010 11:781–789
- 17 Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, NguyenTân PF, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2010;363(1):24–35. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0912217>.
- 18 Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022 Jan;12(1):31-46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059. PMID: 35022204.

- 19 Stransky N, Egloff AM, Tward AD, et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* 2011; 333:1157.
- 20 Athanassios Argiris, Michalis V Karamouzis, David Raben, Robert L Ferris. Head and neck cancer. *Lancet* 2008; 371: 1695–709
- 21 Califano J, van der Riet P, Westra W, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996; 56:2488
- 22 Loyo M, Li M, Bettegowda C, et al. Lessons learned from next-generation sequencing in head and neck cancer. *Head Neck* 2013; 35:454.
- 23 Hayes N, et al. The Cancer Genome Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*. 2015 Jan 29;517(7536):576-82
- 24 Lechner M, Frampton GM, Fenton T, et al. Targeted next-generation sequencing of head and neck squamous cell carcinoma identifies novel genetic alterations in HPV+ and HPV-tumors. *Genome medicine*. 2013; 5(5):49
- 25 Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011; 1(1):9–22.
- 26 Brennan J, Boyle J, Koch W, et al. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995; 332:712.
- 27 Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, et al. TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *The New England journal of medicine*. Dec 20; 2007 357(25):2552–2561
- 28 Skinner HD, Sandulache VC, Ow TJ, et al. TP53 disruptive mutations lead to head and neck cancer treatment failure through inhibition of radiation-induced senescence. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. Jan 1; 2012 18(1):290–300.
- 29 Ohnishi K, Ota I, Takahashi A, et al. Transfection of mutant p53 gene depresses X-ray- or CDDP- induced apoptosis in a human squamous cell carcinoma of the head and neck. *Apoptosis* 2002; 7 (4):367–72.
- 30 Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. *N Engl J Med* 2001; 345:1890
- 31 Sun W, Califano J. Sequencing the head and neck cancer genome- Impact on therapy. *Ann N Y Acad Sci* 2014; 1333: 33–42.
- 32 Tinhofer I, Budach V, Saki M et al. Targeted next-generation sequencing of locally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck reveals druggable targets for improving adjuvant chemoradiation. *Eur J Cancer* 2016; 57:78–86.
- 33 Kimple RJ, Smith MA, Blitzer GC et al. Enhanced radiation sensitivity in HPV-positive head and neck cancer. *Cancer* 2013; Res 73:4791–4800
- 34 Jirawatnotai S, Hu Y, Livingston DM et al. Proteomic identification of a direct role for cyclin D1 in DNA damage repair. *Cancer Res* 2012; 72:4289–429
- 35 Begum S, Gillison ML, Ansari-Lari MA, Shah K, Westra WH. Detection of human papillomavirus in cervical lymph nodes: a highly effective strategy for localizing site of tumor origin. *Clin Cancer Res*. Dec 15; 2003 9(17):6469–6475
- 36 Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:960
- 37 Rautava J, Syrjanen S. Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. *Head Neck Pathol* 2012; 6(suppl 1): S3–S15
- 38 Lewis JS Jr, Thorstad WL, Chernock RD et al. p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: an entity with a favorable prognosis regardless of tumor HPV status. *Am J Surg Pathol* 2016; 34:1088–1096

- 39 Taberna M et al. Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer. *Ann Oncol* 2017 28, 2386–2398, doi:10.1093/annonc/mdx304. [PubMed: 28633362]
- 40 Duensing S, Munger K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer Res* 2002; 62(23):7075–82.
- 41 Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 2010;10(8):550–60.
- 42 Deng Z, Hasegawa M, Kiyuna A, et al. Viral load, physical status, and E6/E7 mRNA expression of human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2013; 35(6):800–8.
- 43 Kanodia S, Fahey LM, Kast WM. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Targets* 2007; 7:79–89
- 44 Lyford-Pike S, Peng S, Young G, et al. Evidence for a role of the PD-1: PDL1 pathway in immune residence of HPV associated head and neck squamous carcinoma. *Cancer Res* 2013; 73:1733
- 45 Braakhuis, B. J. M., Tabor, M. P., Kummer, J. A., Leemans, C. R. & Brakenhoff, R. H. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res.* 2003 63, 1727–1730.
- 46 Roesch-Ely, M. et al. Proteomic analysis reveals successive aberrations in protein expression from healthy mucosa to invasive head and neck cancer. *Oncogene* 2007 26, 54–64.
- 47 Leon X et al. Risk of onset of second neoplasms and successive neoplasms in patients with a head and neck index tumour. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2020 71, 9–15, doi:10.1016/j.otorri.2018.11.003.
- 48 Wang Z, Valera JC, Zhao X, Chen Q & Gutkind JS mTOR co-targeting strategies for head and neck cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2017 36, 491–502, doi:10.1007/s10555-017-9688-7. [PubMed: 28822012]
- 49 Kalyankrishna S, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology.* Jun 10; 2006 24(17):2666–2672
- 50 Chung CH, Ely K, McGavran L, et al. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology.* Sep 1; 2006 24(25):4170–4176
- 51 Zhu X et al. Prognostic role of epidermal growth factor receptor in head and neck cancer: a meta-analysis. *J Surg Oncol* 2013 108, 387–397, doi:10.1002/jso.23406. [PubMed: 24038070]
- 52 Temam S, Kawaguchi H, El-Naggar AK, et al. Epidermal growth factor receptor copy number alterations correlate with poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:2164.
- 53 Egloff AM, Grandis J. Epidermal growth factor receptor-targeted molecular therapeutics for head and neck squamous cell carcinoma. *Expert Opin Ther Targets.* 2006; 10: 639-647.
- 54 Machiels JP, Haddad RI, Fayette J, Licitra LF, Tahara M, Vermorken JB, Clement PM, Gauler T, Cupissol D, Grau JJ, Guigay J, Caponigro F, de Castro Jr G, de Souza Viana L, Keilholz U, Del Campo JM, Cong XJ, Ehrnrooth E, Cohen EE, LUX-H&N 1 investigators. Afatinib versus methotrexate as second-line treatment in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck progressing on or after platinum-based therapy (LUX-Head & Neck 1): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2015; 16: 583–94.
- 55 Lui VW, Hedberg ML, Li H, et al. Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. *Cancer discovery.* Jul; 2013 3(7):761–769
- 56 Morris LG, Taylor BS, Bivona TG, et al. Genomic dissection of the epidermal growth factor receptor (EGFR)/PI3K pathway reveals frequent deletion of the EGFR phosphatase PTPRS in head and neck cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108:19024-19029.
- 57 Seiwert TY, Keck MK, Zuo Z, et al. Genomic profiling of a clinically annotated cohort of locoregionally advanced head and neck cancers (HNC) treated with definitive chemoradiotherapy. *J Clin Oncol.* 2012; 30 (suppl; abstr 5517).

- 58 Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9:550-562.
- 59 Holsinger FC, Piha-Paul SA, Janku F, et al. Biomarker-directed therapy of squamous carcinomas of the head and neck: targeting PI3K/PTEN/mTOR pathway. *J Clin Oncol*. Epub 2013 Jan 28.
- 60 Wilson GD, Grover R, Richman PI, et al. Bcl-2 expression correlates with favourable outcome in head and neck cancer treated by accelerated radiotherapy. *Anticancer Res* 1996; 16:2403.
- 61 Trask DK, Wolf GT, Bradford CR, et al. Expression of Bcl-2 family proteins in advanced laryngeal squamous cell carcinoma: correlation with response to chemotherapy and organ preservation. *Laryngoscope* 2002; 112:638.
- 62 Kerbel, R.S. Tumor angiogenesis. *N. Engl. J. Med* 2008 358, 2039–2049.
- 63 Kyzas, P. A., Cunha, I. W. & Ioannidis, J. P. A. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Clin.Cancer Res*. 11, 1434–1440 (2005).
- 64 Pantel, K. & Brakenhoff, R. H. Dissecting the metastatic cascade. *Nature Rev. Cancer* 2004 4, 448–456.
- 65 Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JF, Harrington K, Sahai E. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9: 1392–400.
- 66 Xu XC, Ro JY, Lee JS, et al. Differential expression of nuclear retinoid receptors in normal, premalignant, and malignant head and neck tissues. *Cancer Res* 1994; 54:3580.
- 67 de Vicente JC, Lequerica-Fernández P, López-Arranz JS, et al. Expression of matrix metalloproteinase-9 in high-grade salivary gland carcinomas is associated with their metastatic potential. *Laryngoscope* 2008; 118:247.
- 68 Vihinen P, Ala-aho R, Kähäri VM. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2005; 5:203.
- 69 Sun, P. C. et al. Transcript map of the 8p23 putative tumor suppressor region. *Genomics* 2001 75, 17–25.
- 70 Han G, et al. Distinct mechanisms of TGF-beta1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis during skin carcinogenesis. *J Clin Invest*. 2005; 115 (7):1714–1723.
- 71 Qiu, W., Schonleben, F., Li, X. & Su, G. H. Disruption of transforming growth factor  $\beta$ -Smad signaling pathway in head and neck squamous cell carcinoma as evidenced by mutations of SMAD2 and SMAD4. *Cancer Lett*. 2007 245, 163–170.
- 72 Cohen, J. et al. Attenuated transforming growth factor  $\beta$  signaling promotes nuclear factor- $\kappa$ B activation in head and neck cancer. *Cancer Res*. 2009 69, 3415–3424.
- 73 Lu SL, Herrington H, Reh D, et al. Loss of transforming growth factor beta type II receptor promotes metastatic head and-neck squamous cell carcinoma. *Genes Dev* 2006; 20(10):1331–42.
- 74 Le QT, Harris J, Magliocco AM, Kong CS, Diaz R, Shin B, Cao H, Trotti A, Erler JT, Chung CH, Dicker A, Pajak TF, Giaccia AJ, Ang KK. Validation of lysyl oxidase as a prognostic marker for metastasis and survival in head and neck squamous cell carcinoma: Radiation Therapy Oncology Group trial 90–03. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 4281–6.
- 75 Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011; 331: 1565–70.
- 76 Couzin-Frankel J. Cancer immunotherapy. *Science*. 2013; 342: 1432–3.
- 77 Seiwert TY, Haddad RI, Gupta S, Mehra R, Tahara M, Berger R, Lee S-H, Burtness B, Le DT, Heath K, Blum A, Dolled-Filhart M, Emancipator K, Pathiraja K, Cheng JD, Chow LQ. Antitumor activity and safety of pembrolizumab in patients (pts) with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN): preliminary results from KEYNOTE-012 expansion cohort. *J Clin Oncol*. 2015; 33(suppl): abstr LBA6008.

- 78 Nieto, M.A., Cano, A., 2012. The epithelial-mesenchymal transition under control: global programs to regulate epithelial plasticity. *Semin. Cancer Biol.* 22 (5e6), 361-368.
- 79 Kalluri, R., Weinberg, R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 2009 119 (6), 1420e1428.
- 80 Pastushenko I, Brisebarre A, Sifrim A, Fioramonti M, Revenco T, Boumahdi S, et al. Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature* 2018;556:463e8.
- 81 Pastushenko I, Blanpain C. EMT transition states during tumor progression and metastasis. *Trends Cell Biol* 2019; 29:212e26.
- 82 Puram SV, Tirosh I, Parkh AS, Patel AP, Yizhak K, Gillespie S, et al. Single-cell transcriptomic analysis of primary and metastatic tumor ecosystems in head and neck cancer. *Cell* 2017;171:1611e24
- 83 Massague, J. TGFbeta in Cancer. 2008 *Cell* 134 (2), 215-230.
- 84 Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(5):362–74.
- 85 Nose, K., Saito, H., Kuroki, T., Isolation of a gene sequence induced later by tumorpromoting 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in mouse osteoblastic cells (MC3T3-E1) and expressed constitutively in ras-transformed cells. *Cell Growth Differ.* 1990 1 (11), 511-518
- 86 Ordóñez NG. Podoplanin: a novel diagnostic immunohistochemical marker. *Adv Anat Pathol.* 2006; 13 (2):83–8.
- 87 Astarita, J.L., Cremasco, V., Fu, J., Darnell, M.C., Peck, J.R., Nieves-Bonilla, J.M., Song, K., Kondo, Y., Woodruff, M.C., Gogineni, A., Onder, L., Ludewig, B., Weimer, R.M., Carroll, M.C., Mooney, D.J., Xia, L., Turley, S.J. The CLEC-2-podoplanin axis controls the contractility of fibroblastic reticular cells and lymph node microarchitecture. *Nat. Immunol.* 2015 16 (1), 75-84.
- 88 Suzuki-Inoue, K. Essential in vivo roles of the platelet activation receptor CLEC-2 in tumour metastasis, lymphangiogenesis and thrombus formation. *J. Biochem.* 2011 150, 127–132. <https://doi.org/10.1093/jb/mvr079>
- 89 Sekiguchi, T.; Takemoto, A.; Takagi, S.; Takatori, K.; Sato, S.; Takami, M.; Fujita, N. Targeting a novel domain in podoplanin for inhibiting platelet-mediated tumor metastasis. *Oncotarget* 2016, 7, 3934–3946.
- 90 Kaneko, M.K.; Kato, Y.; Kameyama, A.; Ito, H.; Kuno, A.; Hirabayashi, J.; Kubota, T.; Amano, K.; Chiba, Y.; Hasegawa, Y.; et al. Functional glycosylation of human podoplanin: Glycan structure of platelet aggregation-inducing factor. *FEBS Lett.* 2007, 581, 331–336.
- 91 Quintanilla M, Montero-Montero L, Renart J, Martín-Villar E. Podoplanin in Inflammation and Cancer. *Int J Mol Sci.* 2019 Feb 6;20(3):707. doi: 10.3390/ijms20030707..
- 92 Cueni, L.N., Detmar, M. Galectin-8 interacts with podoplanin and modulates lymphatic endothelial cell functions. *Exp. Cell Res.* 2009 315, 1715–1723. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.02.021>
- 93 Fernández-Muñoz, B., Yurrita, M.M., Martín-Villar, E., Carrasco-Ramírez, P., Megías, D., Renart, J., Quintanilla, M. The transmembrane domain of podoplanin is required for its association with lipid rafts and the induction of epithelial-mesenchymal transition. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2011 43, 886–896. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.02.010>
- 94 Zhang, Z.; Liu, M.; Zheng, Y. Role of Rho GTPases in stem cell regulation. *Biochem. Soc. Trans.* 2021, 49, 2941–2955.
- 95 Astarita, J.L.; Acton, S.E.; Turley, S.J. Podoplanin: Emerging functions in development, the immune system, and cancer. *Front.Immunol.* 2012, 3, 283.
- 96 Krishnan, H., Retzbach, E.P., Ramirez, M.I., Liu, T., Li, H., Miller, W.T., Goldberg, G.S., PKA and CDK5 can phosphorylate specific serines on the intracellular domain of podoplanin (PDPN) to inhibit cell motility. *Exp. Cell Res.* 2015 335, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.04.019>

- 97 Kato, Y.; Kaneko, M.K.; Kunita, A.; Ito, H.; Kameyama, A.; Ogasawara, S.; Matsuura, N.; Hasegawa, Y.; Suzuki-Inoue, K.; Inoue, O.; et al. Molecular analysis of the pathophysiological binding of the platelet aggregation-inducing factor podoplanin to the C-type lectin-like receptor CLEC-2. *Cancer Sci.* 2008, 99, 54–61
- 98 Meng, D.; Luo, M.; Liu, B. The Role of CLEC-2 and Its Ligands in Thromboinflammation. *Front. Immunol.* 2021, 12, 688643
- 99 Tsuneki, M., Maruyama, S., Yamazaki, M., Xu, B., Essa, A., Abé, T., Babkair, H., Cheng, J., Yamamoto, T., Saku, T. Extracellular heat shock protein A9 is a novel interaction partner of podoplanin in oral squamous cell carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013 434, 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.03.057>
- 100 Flachbartová, Z., Kovacech, B.. Mortalin - a multipotent chaperone regulating cellular processes ranging from viral infection to neurodegeneration. *Acta Virol.* 2013 57, 3–15.
- 101 Nakazawa, Y., Sato, S., Naito, M., Kato, Y., Mishima, K., Arai, H., Tsuruo, T., Fujita, N.. Tetraspanin family member CD9 inhibits Aggrus/podoplanin-induced platelet aggregation and suppresses pulmonary metastasis. *Blood* 112, 2008 1730–1739. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-11-124693>
- 102 Winde, C.M. de, Makris, S., Millward, L., Benjamin, A.C., Cazzagon, G., Martinez, V.G., Acton, S.E.. Podoplanin function is switched by partner proteins on fibroblastic reticular cells. *bioRxiv* 2019 793141. <https://doi.org/10.1101/793141>
- 103 Martín-Villar, E., Fernández-Munoz, B., Parsons, M., Yurrita, M.M., Megias, D., Perez- Gomez, E., Jones, G.E., Quintanilla, M. Podoplanin associates with CD44 to promote directional cell migration. *Mol. Biol. Cell* 2010 21 (24), 4387e4399.
- 104 Faber A et al. CD44 as a stem cell marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2011 26, 321–326, doi:10.3892/or.2011.1322. [PubMed: 21617876]
- 105 Yu SS & Cirillo N The molecular markers of cancer stem cells in head and neck tumors. *J Cell Physiol* 2020 235, 65–73, doi: 10.1002/jcp.28963
- 106 Hwang, Y.S., Xianglan, Z., Park, K.-K., Chung, W.-Y. Functional invadopodia formation through stabilization of the PDPN transcript by IMP-3 and cancer-stromal crosstalk for PDPN expression. *Carcinogenesis* 2012 33, 2135–2146. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs258>
- 107 Martín-Villar, E., Borda-d'Agua, B., Carrasco-Ramírez, P., Renart, J., Parsons, M., Quintanilla, M., Jones, G.E.. Podoplanin mediates ECM degradation by squamous carcinoma cells through control of invadopodia stability. *Oncogene* 2015 34, 4531–4544. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.388>
- 108 Martín-Villar E, Megías D, Castel S, Yurrita MM, Vilaró S, Quintanilla M. Podoplanin binds ERM proteins to activate RhoA and promote epithelial–mesenchymal transition. *J Cell Sci.* 2006; 119 (Pt 21):4541–53.
- 109 Li, Y.-Y., Zhou, C.-X., Gao, Y. Podoplanin promotes the invasion of oral squamous cell carcinoma in coordination with MT1-MMP and Rho GTPases. *Am J Cancer Res* 2015 5, 514–529.
- 110 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011 Mar 4; 144(5):646-74
- 111 Douglas Hanahan, Robert A. Weinberg: Hallmarks of Cancer: The Next Generation *Cell* 2011; 144, 646-674.
- 112 Renart, J., Carrasco-Ramírez, P., Fernández-Muñoz, B., Martín-Villar, E., Montero, L., Yurrita, M.M., Quintanilla, M. New insights into the role of podoplanin in epithelial-mesenchymal transition. *Int Rev Cell Mol Biol* 2015 317, 185–239. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.01.009>
- 113 Raica M, Cimpean AM, Ribatti D. The role of podoplanin in tumor progression and metastasis. *Anticancer Res.* 2008;28(5B):2997-3006
- 114 Takemoto, A.; Miyata, K.; Fujita, N. Platelet-activating factor podoplanin: From discovery to drug development. *Cancer Metastasis Rev.* 2017, 36, 225–234.

- 115 Gay LJ, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11(2):123–34.
- 116 Kunita, A., Kashima, T.G., Morishita, Y., Fukayama, M., Kato, Y., Tsuruo, T., Fujita, N. The platelet aggregation-inducing factor aggrus/podoplanin promotes pulmonary metastasis. *Am. J. Pathol*. 2007 170, 1337–1347. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060790>
- 117 Fujita, N.; Takagi, S. The impact of Aggrus/podoplanin on platelet aggregation and tumour metastasis. *J. Biochem*. 2012, 152,407–413
- 118 Lambert, A.W.;Weinberg, R.A. Linking EMT programmes to normal and neoplastic epithelial stem cells. *Nat. Rev. Cancer* 2021,21, 325–338
- 119 Suzuki-Inoue, K., Osada, M., Ozaki, Y. Physiologic and pathophysiologic roles of interaction between C-type lectin-like receptor 2 and podoplanin: partners from in utero to adulthood. *J. Thromb. Haemost*. 2017 15, 219–229. <https://doi.org/10.1111/jth.13590>
- 120 David, C.J.; Massagué, J. Contextual determinants of TGF $\beta$  action in development, immunity and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2018, 19, 419–435.
- 121 Wicki A, Lehembre F, Wick N, Hantusch B, Kerjaschki D, Christofori G. Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell*. 2006 Apr;9(4):261-72. doi: 10.1016/j.ccr.2006.03.010. PMID: 16616332
- 122 Pal A, Barrett TF, Paolini R, Parikh A, Puram SV. Partial EMT in head and neck cancer biology: a spectrum instead of a switch. *Oncogene*. 2021 Aug;40(32):5049-5065. doi: 10.1038/s41388-021-01868-5. Epub 2021 Jul 8. PMID: 34239045; PMCID: PMC8934590
- 123 Asif, P.J.; Longobardi, C.; Hahne, M.; Medema, J.P. The Role of Cancer-Associated Fibroblasts in Cancer Invasion and Metastasis. *Cancers* 2021, 13, 4720.
- 124 Wilson, M.M.;Weinberg, R.A.; Lees, J.A.; Guen, V.J. Emerging Mechanisms by which EMT Programs Control Stemness. *Trends Cancer* 2020, 6, 775–780.
- 125 Prince, M.E., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G.T., Kaplan, M.J., Dalerba, P., Weissman, I.L., Clarke, M.F., Ailles, L.E.. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 2007 104, 973–978. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610117104>
- 126 Martín-Villar, E.; Borda-d’Agua, B.; Carrasco-Ramirez, P.; Renart, J.; Parsons, M.; Quintanilla, M.; Jones, G.E. Podoplanin mediates ECM degradation by squamous carcinoma cells through control of invadopodia stability. *Oncogene* 2015, 34, 4531–4544.
- 127 Fridman, W.H.; Pagès, F.; Sautès-Fridman, C.; Galon, J. The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* 2012, 12, 298–306.
- 128 Suzuki, J.; Aokage, K.; Neri, S.; Sakai, T.; Hashimoto, H.; Su, Y.; Yamazaki, S.; Nakamura, H.; Tane, K.; Miyoshi, T.; et al. Relationship between podoplanin-expressing cancer-associated fibroblasts and the immune microenvironment of early lung squamous cell carcinoma. *Lung Cancer* 2021, 153, 1–10.
- 129 Peters, A.; Burkett, P.R.; Sobel, R.A.; Buckley, C.D.; Watson, S.P.; Bettelli, E.; Kuchroo, V.K. Podoplanin negatively regulates CD4+effector T cell responses. *J. Clin. Investig*. 2015, 125, 129–140.
- 130 Suzuki, H.; Onimaru, M.; Koga, T.; Takeshita, M.; Yano, T.; Maehara, Y.; Nakamura, S.; Sueishi, K. High podoplanin expression incancer cells predicts lower incidence of nodal metastasis in patients with lung squamous cell carcinoma. *Pathol. Res. Pr*. 2011, 207,111–115.
- 131 Tammela T and Alitalo K: Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell* 2010 140: 460-476.
- 132 Botting SK, Fouad H, Elwell K, Rampy BA, Salama SA, Freeman DH and Diaz-Arrastia CR: Prognostic significance of peritumoral lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor receptor 3 in invasive squamous cell cervical cancer. *Transl Oncol* 2010 3: 170-175

- 133 Cueni LN, Hegyi I, Shin JW, Albinger-Hegyí A, Gruber S, Kunstfeld R, Moch H and Detmar M: Tumor lymphangiogenesis and metastasis to lymph nodes induced by cancer cell expression of podoplanin. *Am J Pathol* 2010 177: 1004-1016.
- 134 Carrasco-Ramírez, P., Greening, D.W., Andrés, G., Gopal, S.K., Martín-Villar, E., Renart, J., Simpson, R.J., Quintanilla, M. Podoplanin is a component of extracellular vesicles that reprograms cell-derived exosomal proteins and modulates lymphatic vessel formation. *Oncotarget* 2016 7, 16070–16089. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7445>
- 135 Bussu F, Ragin C, Boscolo-Rizzo P, Rizzo D, Gallus R, Delogu G, et al. HPV as a marker for molecular characterization in head and neck oncology: looking for a standardization of clinical use and of detection method(s) in clinical practice. *Head Neck*. 2019;41(4):1104–11. <https://doi.org/10.1002/hed.25591>.
- 136 National Cancer Institute. NCI Dictionary of Cancer Terms 2014 online <http://www.cancer.gov/dictionary>
- 137 Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A (eds): *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th edition. Springer, New York, NY, 2009.
- 138 Pulte D & Brenner H Changes in survival in head and neck cancers in the late 20th and early 21st century: a period analysis. *Oncologist* 2010 15, 994–1001, doi:10.1634/theoncologist.2009-0289. [PubMed: 20798198]
- 139 Chaturvedi AK et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol* 2011 29, 4294–4301, doi:10.1200/JCO.2011.36.4596 [PubMed:21969503]
- 140 Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*. 2015; 517:576–82
- 141 Ang KK, Harris J, Wheeler R, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. Jul 1; 2010 363(1):24–35
- 142 Fakhry C, Westra WH, Li S, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst*. Feb 20; 2008 100(4):261–269
- 143 Prasad B, Kashyap B, Babu GS, et al. Expression of podoplanin in different grades of oral squamous cell carcinoma. *Ann Med Health Sci Res*. 2015;5(4):299-304. <https://doi.org/10.4103/2141-9248.160181>
- 144 Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjørheim Å. Malignancy grading of the Deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *The Journal of Pathology* 1992 Apr 1; 166(4):375-381
- 145 Cirligeriu L, Cimpean AM, Raica M, Doros CI. Dual role of podoplanin in oral cancer development. *In Vivo*. 2014 May 1;28(3):341-7.
- 146 Dang Q, Liu J, Li J, Sun Y. Podoplanin: a novel regulator of tumor invasion and metastasis. *Medical Oncology*. 2014 Sep 1; 31(9):1-6.
- 147 de Vicente JC, Santamarta TR, Rodrigo JP, García-Pedrero JM, Allonca E, Blanco-Lorenzo V. Expression of podoplanin in the invasion front of oral squamous cell carcinoma is not prognostic for survival. *Virchows Archiv*. 2015 May 1; 466(5):549-58
- 148 Retzbach EP, Sheehan SA, Nevel EM, et al. Podoplanin emerges as a functionally relevant oral cancer biomarker and therapeutic target. *Oral Oncol*. 2018; 78:126–136.
- 149 Kreppel M, Scheer M, Drebber U, Ritter L, Zoller JE. Impact of podoplanin expression in oral squamous cell carcinoma: clinical and histopathologic correlations. *Virchows Arch*. 2010;456(5):473–482.
- 150 Yuan P, Temam S, El-Naggar A, et al. Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome. *Cancer*. 2006;107(3):563–569.
- 151 Habiba U, Kitamura T, Yanagawa-Matsuda A, Higashino F, Hida K, Totsuka Y, Shindoh M. HuR and podoplanin expression is associated with a high risk of malignant transformation in patients with oral preneoplastic lesions. *Oncology Letters*. 2016;12:3199-207

- 152 de Vicente JC, Rodrigo JP, Rodriguez-Santamarta T, Lequerica Fernandez P, Allonca E, Garcia-Pedrero JM. Podoplanin expression in oral leukoplakia: tumorigenic role. *Oral Oncology*. 2013;49:598-603
- 153 D'Souza B, Nayak R, Kotrashetti VS. Immunohistochemical Expression of Podoplanin in Clinical Variants of Oral Leukoplakia and Its Correlation With Epithelial Dysplasia. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2018;26(2):132-139
- 154 Kawaguchi H, El-Naggar AK, Papadimitrakopoulou V, Ren H, Fan YH, Feng L, et al. Podoplanin: a novel marker for oral cancer risk in patients with oral premalignancy. *J Clin Oncol: Off J Am Soc Clin Oncol* 2008;26:354-60.
- 155 Kreppel M, Kreppel B, Drebbler U, Wedemayer I, Rothamel D, Zoller JE, et al. Podoplanin expression in oral leukoplakia: prognostic value and clinicopathological implications. *Oral Dis* 2012;18:692-9.
- 156 Rodrigo et al.: Podoplanin expression in the development and progression of laryngeal squamous cell carcinomas. *Molecular Cancer* 2010 9:48
- 157 Tanaka M, Kijima H, Shimada H, Makuuchi H, Ozawa S, Inokuchi S. Expression of podoplanin and vimentin is correlated with prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep*. 2015;12(3):4029-4036.
- 158 Kim HY, Rha KS, Shim GA, et al. Podoplanin is involved in the prognosis of head and neck squamous cell carcinoma through interaction with VEGF-C. *Oncol Rep*. 2015;34(2):833-842
- 159 Kreppel M, Drebbler U, Wedemeyer I, et al. Podoplanin expression predicts prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma treated with neoadjuvant radiochemotherapy. *Oral Oncol* 2011;47(9):873-878.
- 160 Arimoto S, Hasegawa T, Takeda D, et al. Lymphangiogenesis and Lymph Node Metastasis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res* 2018;38(11):6157-6162.
- 161 Assao A, Nonogaki S, Lauris JRP, et al. Podoplanin, ezrin, and Rho-A proteins may have joint participation in tumor invasion of lip cancer. *Clin Oral Investig* 2017;21(5):1647-1657.
- 162 Hwang YS, Ahn SY, Moon S, et al. Insulin-like growth factor-II mRNA binding protein-3 and podoplanin expression are associated with bone invasion and prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Arch Oral Biol* 2016;69:25-32
- 163 Martin-Villar E, Megias D, Castel S, Yurrita MM, Vilaro S, Quintanilla M. Podoplanin binds ERM proteins to activate RhoA and promote epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci* 2006;119(Pt 21):4541-4553
- 164 Voelker HU, Hintermeier I, Strehl A, Scheich M. Prognostic Potential of the Expression of Podoplanin (D2-40) Within Cells of Squamous Cell Carcinoma of the Larynx and Hypopharynx. *World J Oncol*. 2020 Apr;11(2):65-71. doi: 10.14740/wjon1259. Epub 2020 Mar 29. PMID: 32284774; PMCID: PMC7141162.
- 165 Mermod M, Bongiovanni M, Petrova TV, Dubikovskaya EA, Simon C, Tolstonog G, Monnier Y. Correlation between podoplanin expression and extracapsular spread in squamous cell carcinoma of the oral cavity using subjective immunoreactivity scores and semiquantitative image analysis. *Head Neck*. 2017;39(1):98-108. [DOI:10.1002/hed.24537]
- 166 Vormittag L, Thurnher D, Geleff S et al Co-expression of Bmi-1 and podoplanin predicts overall survival in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck treated with radio(chemo)therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009 73:913-918
- 167 Bartuli FN, Luciani F, Caddeo F et al Podoplanin in the development and progression of oral cavity cancer: a preliminary study. *Oral Implantol* 2012 April 5:33-41
- 168 Seki S, Fujiwara M, Matsuura M, Fujita S, Ikeda H, Umeda M, Asahina I, Ikeda T. Prognostic value of podoplanin expression in oral squamous cell carcinoma--a regression model auxiliary to UICC classification. *Pathol Oncol Res*. 2014 Jul;20(3):521-8. doi: 10.1007/s12253-013-9723-0. Epub 2013 Nov 28. PMID: 24281769.
- 169 Kreppel M, Krakowezki A, Kreppel B et al Podoplanin expression in cutaneous head and neck squamous cell carcinoma--prognostic value and clinicopathologic implications. *J Surg Oncol* 2013 107:376-383

- 170 Chao YK, Chuang WY, Yeh CJ et al Prognostic significance of high podoplanin expression after chemoradiotherapy in esophageal squamous cell carcinoma patients. *J Surg Oncol* 2012 105:183–188
- 171 Tong L, Yuan S, Feng F, Zhang H. Role of podoplanin expression in esophageal squamous cell carcinoma: a retrospective study. *Dis Esophagus*. 2012 Jan;25(1):72-80. doi: 10.1111/j.1442-2050.2011.01211.x. Epub 2011 Sep 2. PMID: 21895849.
- 172 Rivera C, Oliveira AK, Pereira RA, De Rossi T, Paes Leme A. Prognostic biomarkers in oral squamous cell carcinoma: A systematic review. *Oral Oncology*. 2017;72:38-47
- 173 Chuang WY, Yeh CJ, Wu YC et al Tumor cell expression of podoplanin correlates with nodal metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Histol Histopathol* 2009 24:1021–10
- 174 dos Santos Almeida A, Oliveira, Pereira MC et al Podoplanin and VEGF-C immunoeexpression in oral squamous cell carcinomas: prognostic significance. *Anticancer Res* 2013 33:3969–3976
- 175 Dunkel J, Vaittinen S, Grenman R, Kinnunen I, Irjala H Prognostic markers in stage I oral cavity squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 2013 123:2435–2441
- 176 Atsumi N, Ishii G, Kojima M, Sanada M, Fujii S, Ochiai A. Podoplanin, a novel marker of tumor-initiating cells in human squamous cell carcinoma A431. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 373 (1):36–41
- 177 Martín-Villar E, Scholl FG, Gamallo C, Yurrita MM, Muñoz- Guerra M, Cruces J, et al. Characterization of human PA2.26 antigen (T1a-2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer*. 2005; 113 (6): 899–910.
- 178 Wakisaka N, Yoshida S, Kondo S, Kita M, Sawada-Kitamura S, Endo K, Tsuji A, Nakanish Y, Muroso S, Yoshizaki T. Induction of epithelial-mesenchymal transition and loss of podoplanin expression are associated with progression of lymph node metastases in human papillomavirus-related oropharyngeal carcinoma. *Histopathology*. 2015 May;66(6):771-80. doi: 10.1111/his.12496. Epub 2014 Nov 10. PMID: 25039283.
- 179 Foschini MP, Leonardi E, Eusebi LH, et al. Podoplanin and E-cadherin expression in preoperative incisional biopsies of oral squamous cell carcinoma is related to lymph node metastases. *Int J Surg Pathol* 2013; 21:133-141.
- 180 Watanabe S, Kato M, Kotani I, Ryoke K and Hayashi K: Lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor expression in squamous cell carcinomas of lip and oral cavity: A clinicopathological analysis with immunohistochemistry using antibodies to D2-40, VEGF-C and VEGF-D. *Yonago Acta Med* 2013 56: 29-37.
- 181 Nijkamp MM et al. Expression of E-cadherin and vimentin correlates with metastasis formation in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Radiother Oncol* 2011 99, 344–348, doi:10.1016/j.radonc.2011.05.066 [PubMed: 21684617]
- 182 Yang MH et al. Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. *Nat Cell Biol* 2008 10, 295–305, doi:10.1038/ncb1691 [PubMed: 18297062]
- 183 Zhang Z, Filho MS & Nor JE The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral Oncol* 2012 48, 1–9, doi:10.1016/j.oraloncology.2011.10.004. [PubMed: 22070916]
- 184 Williams ED, Gao D, Redfern A & Thompson EW Controversies around epithelial-mesenchymal plasticity in cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* 2019 19, 716–732, doi:10.1038/s41568-019-0213-x . [PubMed: 31666716]
- 185 Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., Nieto, M.A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009 139, 871–890. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>
- 186 Titus, M.A., Goodson, H.V. An evolutionary perspective on cell migration: Digging for the roots of amoeboid motility. *J. Cell Biol.* 2017 216, 1509–1511. <https://doi.org/10.1083/jcb.201704112>
- 187 Lohmer, L.L., Kelley, L.C., Hagedorn, E.J., Sherwood, D.R. Invadopodia and basement membrane invasion in vivo. *Cell Adh Migr* 2014 8, 246–255. <https://doi.org/10.4161/cam.28406>

- 188 Majercakova K, Valero C, López M, et al. Postoperative staging of the neck dissection using extracapsular spread and lymph node ratio as prognostic factors in HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol.* 2018;77:37-42. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2017.12.010>
- 189 Mermod M, Tolstonog G, Simon C, et al. Extracapsular spread in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol.* 2016;62:60-71. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2016.10.003>
- 190 Dünne AA, Müller HH, Eisele DW, et al. Meta-analysis of the prognostic significance of perinodal spread in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) patients. *Eur J Cancer* 2006;42:1863–8 <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2006.01.062>
- 191 Woolgar JARS. Diagnosing and staging oral cancer: controversies, potential pitfalls and refining histopathological protocols. *Ital J Maxillofac Surg* 2011;22:5e7.
- 192 Woolgar JARS, Lowe D, Brown JS, Vaughan ED Cervical lymph node metastasis in oral cancer: the importance of even microscopic extracapsular spread. *Oral Oncol* 2003;39:130e7.
- 193 Hirabayashi H, Koshii K, Uno K, et al. Extracapsular spread of squamous cell carcinoma in neck lymph nodes: prognostic factor of laryngeal cancer. *Laryngoscope* 1991;101:502e6. <https://doi.org/10.1288/00005537-199105000-00010>
- 194 Almagush A, Makitie AA, Triantafyllou A, et al. Staging and grading of oral squamous cell carcinoma: an update. *Oral Oncol* 2020;107. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2020.104799>. 104799. 2020/05/24.
- 195 Myers JN, Greenberg JS, Mo V, et al. Extracapsular spread. A significant predictor of treatment failure in patients with squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer* 2001;92:3030e6. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(20011215\)92:12<3030::aid-cnrc10148>3.0.co;2-p](https://doi.org/10.1002/1097-0142(20011215)92:12<3030::aid-cnrc10148>3.0.co;2-p). 2001/12/26.
- 196 Shaw RJ, Lowe D, Woolgar JA, et al. Extracapsular spread in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2010;32:714e22. <https://doi.org/10.1002/hed.21244>. 2009/10/15.
- 197 Suoglu Y, Erdamar B, Katircioglu OS, et al. Extracapsular spread in ipsilateral neck and contralateral neck metastases in laryngeal cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002;111:447e54. <https://doi.org/10.1177/000348940211100510>.
- 198 Sutton P, Salaric I, Granic M, et al. Prognostic significance of extracapsular spread of lymph node metastasis from oral squamous cell carcinoma in the clinically negative neck. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2017;46:669e75. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2017.02.1277>
- 199 Wreesmann VB, Katabi N, Palmer FL, et al. Influence of extracapsular nodal spread extent on prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2016;38(Suppl 1):E1192e9. <https://doi.org/10.1002/hed.24190>
- 200 Lewis Jr JS, Carpenter DH, Thorstad WL, et al. Extracapsular extension is a poor predictor of disease recurrence in surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Mod Pathol* 2011;24:1413e20. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.105>.
- 201 Imre K, Pinar E, Oncel S, et al. Predictors of extracapsular spread in lymph node metastasis. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol* 2008;265:337e9. <https://doi.org/10.1007/s00405-007-0464-0>.
- 202 Liu B, Guan C, Ji WY, et al. Extracapsular spread in ipsilateral neck metastasis: an important prognostic factor in laryngeal cancer. *Chin Med Sci J* 2006;21:86e9.
- 203 Noor A, Mintz J, Patel S, et al. Predictive value of computed tomography in identifying extracapsular spread of cervical lymph node metastases in p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Med Imaging Radiat Oncol* 2019;63:500e9. <https://doi.org/10.1111/1754-9485.12888>. 2019/04/12.
- 204 Brennan PA, Dennis S, Poller D, et al. Inducible nitric oxide synthase: correlation with extracapsular spread and enhancement of tumor cell invasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2008;30:208e14. <https://doi.org/10.1002/hed.20675>.

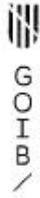
- 205 Kim JM, Kim HJ, Koo BS, et al. Expression of matrix metalloproteinase-12 is correlated with extracapsular spread of tumor from nodes with metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol* 2013;270:1137e42. <https://doi.org/10.1007/s00405-012-2161-x>.
- 206 Wu CS, Chang KP, OuYang CN, et al. ASC contributes to metastasis of oral cavity squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2016;7:50074e85. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10317>.
- 207 Dhanda J, Triantafyllou A, Liloglou T, et al. SERPINE1 and SMA expression at the invasive front predict extracapsular spread and survival in oral squamous cell carcinoma. *Br J Canc* 2014;111:2114e21. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.500>. 2014/10/01.
- 208 Lyons AJ, Bateman AC, Spedding A, et al. Oncofetal fibronectin and oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2001;39:471e7. <https://doi.org/10.1054/bjom.2001.0702>.
- 209 Su YY, Chen CH, Chien CY, et al. Mitochondrial assembly receptor expression is an independent prognosticator for patients with oral tongue squamous cell carcinoma. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst JRAAS* 2017;18. <https://doi.org/10.1177/1470320317717904>. 1470320317717904.
- 210 Chien CY, Chuang HC, Chen CH, et al. The expression of activin receptor-like kinase 1 among patients with head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2013;148:965e73. <https://doi.org/10.1177/0194599813479556>.
- 211 Kumar B, Brown NV, Swanson BJ, et al. High expression of myoferlin is associated with poor outcome in oropharyngeal squamous cell carcinoma patients and is inversely associated with HPV-status. *Oncotarget* 2016;7:18665e77. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7625>
- 212 Tai SF, Chien HT, Young CK, et al. Roles of preoperative C-reactive protein are more relevant in buccal cancer than other subsites. *World J Surg Oncol* 2017;15:47. <https://doi.org/10.1186/s12957-017-1116-5>.
- 213 Zhou X, Temam S, Oh M, et al. Global expression-based classification of lymph node metastasis and extracapsular spread of oral tongue squamous cell carcinoma. *Neoplasia* 2006;8:925e32. <https://doi.org/10.1593/neo.06430>.
- 214 Wang W, Lim WK, Leong HS, et al. An eleven gene molecular signature for extra-capsular spread in oral squamous cell carcinoma serves as a prognosticator of outcome in patients without nodal metastases. *Oral Oncol* 2015;51:355e62. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.12.012>.
- 215 Elzakra N, Cui L, Liu T, et al. Mass spectrometric analysis of SOX11-binding proteins in head and neck cancer cells demonstrates the interaction of SOX11 and HSP90alpha. *J Proteome Res* 2017;16:3961e8. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00247>
- 216 Liao CT, Chen SJ, Lee LY, et al. An ultra-deep targeted sequencing gene panel improves the prognostic stratification of patients with advanced oral cavity squamous cell carcinoma. *Medicine (Baltim)* 2016;95:e2751. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002751>.
- 217 Lapke N, Lu YJ, Liao CT, et al. Missense mutations in the TP53 DNA-binding domain predict outcomes in patients with advanced oral cavity squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2016. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9925>.
- 218 Huang SF, Chen IH, Liao CT, et al. Combined effects of MDM2 SNP 309 and p53 mutation on oral squamous cell carcinomas associated with areca quid chewing. *Oral Oncol* 2009;45:16e22. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.03.006>. 2008/05/20. DOI: S1368-8375(08)00091-2 [pii].
- 219 Peng CH, Liao CT, Peng SC, et al. A novel molecular signature identified by systems genetics approach predicts prognosis in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One* 2011;6:e23452. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023452>.
- 220 Michikawa C, Uzawa N, Sato H, et al. Epidermal growth factor receptor gene copy number aberration at the primary tumour is significantly associated with extracapsular spread in oral cancer. *Br J Canc* 2011;104:850e5. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.22>.
- 221 Jithesh PV, Risk JM, Schache AG, et al. The epigenetic landscape of oral squamous cell carcinoma. *Br J Canc* 2013;108:370e9. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.568>. 2013/01/05.

- 222 Kitano, H. et al. Podoplanin expression in cancerous stroma induces lymphangiogenesis and predicts lymphatic spread and patient survival. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2010 134, 1520–1527. <https://doi.org/10.1043/2009-0114-OA.1>.
- 223 Bhattacharya, P. & Mukherjee, R. Lymph node extracapsular extension as a marker of aggressive phenotype: Classification, prognosis and associated molecular biomarkers. *Eur. J. Surg. Oncol* 2021. 47, 721–731. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2020.09.005>.
- 224 Bullock, M. J. et al. Data set for the reporting of nodal excisions and neck dissection specimens for head and neck tumors: Explanations and recommendations of the guidelines from the international collaboration on cancer reporting. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2019 143, 452–462. <https://doi.org/10.5858/arpa.2018-0421-SA>.
- 225 Pilborough, A. E., Lambert, D. W. & Khurram, S. A. Extranodal extension in oral cancer: A role for the nodal microenvironment? *J. Oral. Pathol. Med.* 2019 48, 863–870. <https://doi.org/10.1111/jop.12870>
- 226 Pula, B., Witkiewicz, W., Dziegiel, P. & Podhorska-Okolow, M. Significance of podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts: A comprehensive review. *Int. J. Oncol.* 2013 42, 1849–1857. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.1887>.
- 227 Ramos-Vega V, Venegas Rojas B, Donoso Torres W. Immunohistochemical analysis of cancer-associated fibroblasts and podoplanin in head and neck cancer. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2020 Mar 1;25 (2):e268-e276. doi:10.4317/medoral.23335. PMID: 31967978; PMCID: PMC7103444.
- 228 Li YY, Zhou CX, Gao Y. Interaction between oral squamous cell carcinoma cells and fibroblasts through TGF- $\beta$ 1 mediated by podoplanin. *Experimental Cell Research.* 2018; 369:43–53.
- 229 Zeng Q et al. Hepatocyte growth factor inhibits anoikis in head and neck squamous cell carcinoma cells by activation of ERK and Akt signaling independent of NF $\kappa$ B. *J Biol Chem* 2002 277, 25203–25208, doi:10.1074/jbc.M201598200. [PubMed: 11994287]
- 230 Neiva KG et al. Cross talk initiated by endothelial cells enhances migration and inhibits anoikis of squamous cell carcinoma cells through STAT3/Akt/ERK signaling. *Neoplasia* 2009 11, 583–593, doi:10.1593/neo.09266. [PubMed: 19484147]
- 231 Peltanova B, Raudenska M & Masarik M Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. *Mol Cancer* 2019 18, 63, doi:10.1186/s12943-019-0983-5
- 232 Erez, N., Truitt, M., Olson, P., Arron, S.T., Hanahan, D. Cancer-Associated fibroblasts are activated in incipient neoplasia to orchestrate tumor-promoting inflammation in an NF- $\kappa$ B-dependent manner. *Cancer Cell* 2010 17 (2), 135-147.
- 233 Nakashima Y, Yoshinaga K, Kitao H et al. Podoplanin is expressed at the invasive front of esophageal squamous cell carcinomas and is involved in collective cell invasion. *Cancer Sci* 2013; 104:1718-1725. <https://doi.org/10.1111/cas.12286>
- 234 Sgaramella N, Lindell Jonsson E, Boldrup L, Califano L, Coates PJ, Tartaro G, Lo Muzio L, Fähræus R, Colella G, Dell'AversanaOrabona G, Loljung L. High expression of podoplanin in squamous cell carcinoma of the tongue occurs predominantly in patients  $\leq$  40 years but does not correlate with tumour spread. *J PatholClin Res.* 2016;2(1):3-8. [DOI:10.1002/cjp2.28]
- 235 Hamada M, Ebihara Y, Nagata K, Yano M, Kogashiwa Y, Nakahira M, Sugawara M, Nagatsuka H, Yasuda M. Podoplanin is an efficient predictor of neck lymph node metastasis in tongue squamous cell carcinoma with low tumor budding grade. *Oncol. Lett.* 2020;19 (4):2602-8. [DOI:10.3892/ol.2020.11358]

## 10. ANEXO

Documento de aprobación del Comité Ético de Investigación de las Islas Baleares CEI-IB Nº IB 3505/17PI.

 <p>G CONSELLERIA O SALUT I DIRECCIÓ GENERAL B ACREREDITACIÓ DOCÈNCIA / I RECERCA SALUT</p>	 <p>comité d'ètica de la investigació</p> <p>ILLES BALEARS</p>																																
<p><b>INFORME DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE LAS ISLAS BALEARES</b></p>																																	
<p>Gemma Melero Quiñonero, Secretaria Técnica del Comité de Ética de la Investigación de las Islas Baleares,</p>																																	
<p>CERTIFICO:</p>																																	
<p>Que este Comité, en la sesión celebrada el día 27 de septiembre (nº 08/17), evaluó los aspectos metodológicos, éticos y legales del estudio nº IB 3505/17 PI, denominado <b>BIOMARCADORES PRONOSTICO EN EL CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEZA Y CUELLO. ESTUDIO DE EXPRESION DE PODOPLANINA Y VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO</b> de la investigadora principal Dra. Natalia Bejarano Panades del servicio de Otorrinolaringología del Hospital General Mateu Orfila, y se acordó solicitar aclaraciones.</p>																																	
<p>Que en la sesión del día 25 de octubre (nº 09/17) se evaluó nuevamente el estudio.</p>																																	
<p>Que se acuerda emitir INFORME FAVORABLE para la realización de este estudio.</p>																																	
<p>Que el CEI-IB, tanto en su composición como en los PNT, cumple con las normas de Buena Práctica Clínica.</p>																																	
<p>Que, a la fecha de aprobación de este estudio, la composición del CEI-IB era la siguiente:</p>																																	
<p>Presidente: Secretaria: Vocales:</p>	<table border="0"> <tr> <td>Joan Bargay Lleonat</td> <td>Hematología</td> </tr> <tr> <td>Gemma Melero Quiñonero</td> <td>Farmacología</td> </tr> <tr> <td>Alberto Alonso Fernández</td> <td>Neumología</td> </tr> <tr> <td>Joan María Benejam Gual</td> <td>Urología</td> </tr> <tr> <td>Miquel Bennasar Veny</td> <td>Enfermería</td> </tr> <tr> <td>Francisco Campoamor Landín</td> <td>Farmacología clínica</td> </tr> <tr> <td>Esther Cardo Jalón</td> <td>Neurología pediátrica</td> </tr> <tr> <td>Isabel Cuat Sintes</td> <td>Psicopedagogía</td> </tr> <tr> <td>Andrés De la Peña Fernández</td> <td>Medicina interna</td> </tr> <tr> <td>Fernando Do Pazo Oujbiña</td> <td>Farmacología</td> </tr> <tr> <td>Susana Esteban Valdés</td> <td>Biología</td> </tr> <tr> <td>Magdalena Esteva Cantó</td> <td>Medicina preventiva y salud pública</td> </tr> <tr> <td>Miquel Fiol Sala</td> <td>Medicina intensiva</td> </tr> <tr> <td>José Fuster Salvá</td> <td>Oncología médica</td> </tr> <tr> <td>Francisca Mas Busquets</td> <td>Derecho</td> </tr> <tr> <td>Laura Monserrat Calbó</td> <td>Derecho</td> </tr> </table>	Joan Bargay Lleonat	Hematología	Gemma Melero Quiñonero	Farmacología	Alberto Alonso Fernández	Neumología	Joan María Benejam Gual	Urología	Miquel Bennasar Veny	Enfermería	Francisco Campoamor Landín	Farmacología clínica	Esther Cardo Jalón	Neurología pediátrica	Isabel Cuat Sintes	Psicopedagogía	Andrés De la Peña Fernández	Medicina interna	Fernando Do Pazo Oujbiña	Farmacología	Susana Esteban Valdés	Biología	Magdalena Esteva Cantó	Medicina preventiva y salud pública	Miquel Fiol Sala	Medicina intensiva	José Fuster Salvá	Oncología médica	Francisca Mas Busquets	Derecho	Laura Monserrat Calbó	Derecho
Joan Bargay Lleonat	Hematología																																
Gemma Melero Quiñonero	Farmacología																																
Alberto Alonso Fernández	Neumología																																
Joan María Benejam Gual	Urología																																
Miquel Bennasar Veny	Enfermería																																
Francisco Campoamor Landín	Farmacología clínica																																
Esther Cardo Jalón	Neurología pediátrica																																
Isabel Cuat Sintes	Psicopedagogía																																
Andrés De la Peña Fernández	Medicina interna																																
Fernando Do Pazo Oujbiña	Farmacología																																
Susana Esteban Valdés	Biología																																
Magdalena Esteva Cantó	Medicina preventiva y salud pública																																
Miquel Fiol Sala	Medicina intensiva																																
José Fuster Salvá	Oncología médica																																
Francisca Mas Busquets	Derecho																																
Laura Monserrat Calbó	Derecho																																
<p>C. de Jesús, 38 A 07010 Palma Tel. 971 17 73 78 ceic_ib@caib.es ceisalut.caib.es</p>																																	



Antònia Obrador Hevia  
Jaume Orfila Timoner  
Carmen Pata Iglesias  
José Ignacio Ramírez Manent  
Pere Riutord Sbert  
Llorenç Socias Crespi  
Cristina Villena Portella

Biologia  
Medicina interna  
Farmacia  
Medicina familiar y comunitaria  
Estomatologia  
Medicina intensiva  
Biologia

Palma, 13 de noviembre de 2017



C. de Jesús, 38 A  
07010 Palma  
Tel. 971 17 73 78  
ceic\_ib@caib.es  
ceisalut.caib.es