



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina

TESIS DOCTORAL

Definición del pronóstico del carcinoma
epidermoide cutáneo mediante la
combinación de factores clínico-patológicos,
marcadores proteicos y expresión de *miRNAs*

Javier Cañueto Álvarez
2015

DÑA. CONCEPCIÓN ROMÁN CURTO, DOCTORA EN MEDICINA Y CIRUGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y PROFESORA ASOCIADA DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA-DERMATOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y, D. JESÚS PÉREZ LOSADA, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y CIENTÍFICO TITULAR DEL CSIC EN EL INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DEL CÁNCER DE SALAMANCA, INSTITUTO MIXTO UNIVERSIDAD DE SALAMANCA-CSIC.

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo, titulado **“DEFINICIÓN DEL PRONÓSTICO DEL CARCINOMA EPIDERMOIDE CUTÁNEO MEDIANTE LA COMBINACIÓN DE FACTORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS, MARCADORES PROTEICOS Y EXPRESIÓN DE *miRNAs*”**, ha sido realizado bajo nuestra dirección por **D. JAVIER CAÑUETO ÁLVAREZ** para optar al grado de doctor en Medicina.

Habiéndose concluido y reuniendo, a nuestro juicio, los méritos científicos suficientes, autorizamos su presentación a fin de que pueda ser defendida ante el tribunal.

En Salamanca, a veincuatro de marzo de dos mil quince

Fdo. Dra. Dña. Concepción Román Curto

Fdo. Dr. D. Jesús Pérez Losada

La presente tesis doctoral ha sido parcialmente subvencionada por los siguientes proyectos de investigación: **GRS 612/A/11, Q3718001E y SA078A09** de la Junta de Castilla y León y por la **Fundación Eugenio Rodríguez Pascual**.

TESIS DOCTORAL

Definición del pronóstico del carcinoma epidermoide cutáneo mediante la combinación de factores clínico-patológicos, marcadores proteicos y expresión de *miRNAs*

Javier Cañueto Álvarez
2015

A mi madre

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis doctoral no habría sido posible sin el apoyo, los consejos, la ayuda y el ánimo que muchas personas me han mostrado a lo largo de estos años. En primer lugar, este trabajo jamás hubiera visto la luz sin el entusiasmo de sus dos directores. Concha ha sabido mostrarme que un trabajo de tesis doctoral es necesario terminarlo, y más que una directora ha sido una co-autora. Muchas gracias por todas las tardes que hemos pasado viendo biopsias, a veces casi imposibles de interpretar, revisando historias clínicas, haciendo fotos y por ilusionarme con lo que estábamos haciendo juntos. Gracias por haber creído en este proyecto desde el principio y por haberme hecho crecer como dermatólogo, no sólo en lo que me has aportado a lo largo del desarrollo de este trabajo, sino por hacerme partícipe de muchos otros proyectos. Jesús me ha enseñado que lo importante es hacer las cosas bien. Nunca he conocido a una persona tan rigurosa con el trabajo. En realidad, diría que no sólo me ha aportado un montón de cosas a nivel profesional, desde que empezamos a evaluar los resultados de los primeros experimentos en las líneas celulares, sino también como persona. Me ha enseñado que las cosas hay que hacerlas bien, me ha permitido leer con un espíritu mucho más crítico y corregir cosas con un enfoque distinto y mucho más riguroso. Jesús, es un placer trabajar contigo y digo “es” y no ha sido porque seguiré dándote la paliza incansablemente con proyectos futuros.

Esther Cardeñoso, muchas gracias a ti por compartir tantas tardes con Concha y conmigo a lo largo de estos años. En realidad esta tesis debería estar partida en dos y una parte debería corresponderte. Gracias por los ánimos en todo momento y por ser organizada (que falta nos hacía algunas veces). Andrés Castellanos, gracias por enseñarme todo sobre la parte experimental de esta tesis, por tu labor en la parte más precoz del desarrollo del proyecto, por tu paciencia y por enseñarme a razonar científicamente. Aunque muchas cosas me las tuviste que explicar más de una y dos veces, nunca dejaste de hacerlo. Espero que en Barcelona estés disfrutando de una bonita etapa a nivel profesional y personal. Gracias también al resto de los investigadores del laboratorio 7 del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca, Adri –gracias por echarme una mano con mil cosas y por aconsejarme en otras mil-, Mary, Sonia –vuestros consejos también me han sido muy útiles-. Juan Luis García-Hernández, muchísimas gracias por tu ayuda con la ISH de miRNAs y la FISH de EGFR. El proyecto inicial de este trabajo estaba centrado en los miRNAs, así que si no hubiera sido por ti, este trabajo no hubiera sido posible. Es un placer colaborar contigo, aunque a veces no te entiendes ni tú mismo cuando explicas las cosas. Muchas gracias por tu disponibilidad, por las charlas que hemos tenido y tu buen humor. Gracias también Josito por tu ayuda. Estefanía Moyano, muchas gracias por tu ayuda con los tissues, por explicarme la técnica y por ser tan perfeccionista –que bonitos quedaron-. Ojalá puedas seguir echándonos una mano en el futuro. Gracias Rosa por tu ayuda en la obtención de las muestras y por haber hecho este proyecto también un proyecto tuyo. Gracias Guti por tu total disposición para echarnos una mano con las técnicas de inmunohistoquímica y por lo bien que las haces. Ángel Santos-Briz, eres un crack. Muchas gracias por toda la dermatopatología que me has enseñado, por todos los proyectos que has compartido conmigo, por algún que otro gin-tonic y por lo que respecta a este trabajo, gracias por ayudarnos a diseñar los tissues y por dejarnos hacer. Muchas gracias por todas las oportunidades que me has ofrecido desde que empecé. Purificación Galindo-Villardón y Mari Purificación Vicente, gracias por echarme una mano con la estadística, la verdad es que he aprendido un montón, y por no dejar de resolverme las dudas cuándo me surgían. Rogelio González-Sarmiento, muchísimas gracias por todas las oportunidades que me has dado siempre y que me sigues ofreciendo, por haberme iniciado en todo lo relacionado con el laboratorio, por haberme apoyado en todo momento y por seguir haciéndolo. Creo que nunca podré devolverte todo lo que has hecho por mí.

Hay muchas otras personas a las que tengo mucho que agradecer en mi camino hasta aquí. Por una lado, al Servicio de Dermatología del Hospital Universitario de Salamanca. En primer lugar por formarme en la mejor especialidad de todas y haberme hecho crecer también como persona. Iré uno por uno, porque todos han hecho cosas importantes por mí. Javier Bravo (Dr. Brave) empiezo por ti que eres el más viejo, gracias por esas consultas con música en que se hablaba de mucho más que de Derma, por ser buen conversador y por permitirme dar clases en la facultad. Romo, es un placer trabajar contigo y tratarte como persona. Si alguien quiere acabar los quirófanos de la tarde muy pronto que no se ponga con nosotros, pero si quiere aprender, contigo lo hará seguro, por lo menos yo lo sigo haciendo. Ron

(Mónica Roncero) y Susana, sois unas cracks –fomentáis un buen ambiente a vuestro alrededor que es contagioso- y no me olvidaré que con Ron, hice mi primer trabajo (una modesta carta al director) pero me inculcste muchos valores en ese sentido que he intentado aplicar desde entonces. Susana, me encanta trabajar contigo, deberías hacer la tesis aunque eso ya te lo han dicho, tienes un carácter excepcional y te agradezco las oportunidades que me has dado desde que era residente. Marta, gracias por los viajes a Zamora –dónde te conocí cuando acababa de salir del cascarón dermatológico- y también por todo lo que me has enseñado de derma. Manuela, gracias por haber estado al lado cuando era resi –aún conservo el CD quirúrgico- y por ser flexible a la hora de tomar decisiones. Mayte, he de confesar que cuando estaba contigo de resi me imponías, aunque luego eres muy graciosa. Un consejo, tienes que decirle al de la óptica que te ajuste las gafas... Durán, el mejor cirujano dermatólogo que he conocido y un clínico excepcional, gracias por enseñarme incluso de adjunto. Morán, gracias por el refuerzo positivo y el reconocimiento que siempre dabas cuando las cosas se hacían bien. Pablo Unamuno, gracias por haberme transmitido todo tu entusiasmo en el área de las genodermatosis, por haberme dado un montón de oportunidades mientras era residente y por seguir interesándote por la tesis cada vez que me veías o que hablábamos ya desde tu jubilación. Por último Emilia, muchas gracias. En primer lugar por haber confiado en mí para que forme parte de este equipo humano tan excepcional –cada uno con sus singularidades, pero absolutamente enriquecedor-. En segundo lugar por permitirme hacer esta tesis doctoral y dejar toda la infraestructura a mi disposición incluso cuando no estaba aquí trabajando. En tercer lugar por haberme enseñado gran parte de lo que sé como dermatólogo –aún recuerdo mi primera plastia en hacha de R2, que fue contigo, aunque tú no lo recordarás seguramente- y por permitir que me siga desarrollando, compartiendo proyectos conmigo y permitiendo que desarrolle los míos propios. Ojalá pueda seguir trabajando aquí muchos años más.

Además en el servicio quiero agradecer también a los resis que están y ha estado conmigo a lo largo de estos años, especialmente Jose Mir, Rosa Perelló –grandes amigos- y como no, el mismísimo Dr. Mendoza, mi co-R, que es un tío genial. Y las enfermeras, auxiliares y secretarias del Servicio: María Jesús, no te deberían haber permitido jubilarte, ¿quién me lleva ahora las mandarinas a media mañana!?... ahhh sí, Carmen, jajaja (muchas gracias por aguantarme), también a Marta, a Maruchi, a Mai (que también se echa de menos), a Maribel, a Isabel y a Vito. Araceli (gracias por no mandarme a tomar viento cada vez que llaman preguntando por mí y por resolver siempre los problemas que tienen solución). Antes de estar en Salamanca como adjunto, justo a terminar la residencia, inicié un periplo por ciudades de los alrededores. También a ellos quiero agradecerles que haya llegado hasta aquí. Primero a Zamora, porque fue mi primer destino como dermatólogo, gracias Juan Sánchez Estella por confiar en mí por primera vez, Mayte Bordel, Esther Garabito y los otros de los que ya he hablado. En Ávila, Alfonso, gracias por toda la dermatopatología que me enseñaste y gracias también a Pilar Escalonilla, Mari Luz Ramos, Ana González de Arriba y Miriam Corral. En Cáceres, poco estuve la verdad, pero de vez en cuando aun sigo reuniéndome con parte del equipo, gracias Fran y Lucía especialmente y Neri... Y también a esos amigos especiales, que aunque no estén vinculados a la biomedicina, han compartido muchas cosas conmigo, especialmente a Javitrín, Chamu, Miguel y Laura.

Finalmente el mayor agradecimiento de todos, a mi familia. A mi madre, porque ha sido madre y padre. Soy muy consciente del esfuerzo que ha supuesto que haya llegado hasta aquí, nunca podré agradecerle lo suficiente. A mi hermana, gracias por ayudarme siempre en todo, eres la mejor. A mi abuela, que siempre se ha ilusionado con mis logros, y al resto de mi familia, porque siempre me ha apoyado. Gracias a vosotros, Asunción, Gonzalo, Ani y Juan, Nati... Y gracias a todos los que a lo largo de estos años se han cruzado en mi vida y quizás no estén aquí, porque aunque no hayan contribuido directamente en este trabajo, me han ayudado a ser quien soy como persona, que es lo más importante.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1 EPIDEMIOLOGÍA DEL CARCINOMA EPIDERMOIDE CUTÁNEO.....	3
1.1 La epidemia de carcinoma epidermoide cutáneo.....	3
1.2 Factores de riesgo del carcinoma epidermoide cutáneo	4
1.2.1 Radiaciones ultravioleta e ionizantes.....	4
1.2.2 Factores étnicos y raciales	5
1.2.3 Sexo y edad.....	5
1.2.4 Inmunosupresión	5
1.2.5 Carcinógenos químicos.....	6
1.2.6 Cicatrices y procesos infecciosos e inflamatorios crónicos.....	6
1.2.7 Virus.....	6
1.2.8 Enfermedades genéticas.....	6
1.2.9 Antecedentes de CEC previo	6
1.2.10 Antecedentes de queratosis actínicas	7
2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DEL CARCINOMA EPIDERMOIDE CUTÁNEO.....	8
2.1 Carcinoma epidermoide cutáneo intraepidérmico “ <i>in situ</i> ”	8
2.2 Carcinoma epidermoide cutáneo invasor.....	8
2.3 Carcinoma epidermoide metastásico.....	11
3 ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL CARCINOMA EPIDERMOIDE CUTÁNEO.....	12
3.1 Clasificación histológica del carcinoma epidermoide cutáneo.....	12
4 PRONÓSTICO DEL CARCINOMA EPIDERMOIDE CUTÁNEO:.....	16
4.1 Factores pronósticos clínicos del carcinoma epidermoide cutáneo.....	16
4.1.1 Tamaño horizontal del tumor:.....	16
4.1.2 Localización	17
4.1.3 Recurrencia.....	17
4.1.4 Estado inmunitario del paciente.....	18
4.2 Factores pronósticos histológicos del carcinoma epidermoide cutáneo.	18
4.2.1 Espesor tumoral:.....	18
4.2.2 Grado de diferenciación tumoral.....	19
4.2.3 Infiltración perineural.....	19

4.2.4	Invasión linfovascular	21
4.2.5	Escisión incompleta del tumor	21
4.3	Otros factores pronósticos.....	22
4.3.1	Factores clínico-patológicos.....	22
a.	Ulceración.....	22
b.	Patrón de crecimiento del tumor.....	23
c.	Desmoplasia	23
d.	Infiltrado inflamatorio	24
4.3.2	Factores moleculares.....	24
a.	Ki-67.....	24
b.	D2-40	25
c.	EGFR.....	26
4.4	Estadaje del carcinoma epidermoide cutáneo	26
4.5	Mortalidad del carcinoma epidermoide cutáneo	28
5	PATOGENIA DEL CARCINOMA EPIDERMOIDE CUTÁNEO	30
5.1	La teoría en múltiples fases.....	30
5.2	Desde la queratosis actínica al carcinoma epidermoide cutáneo	30
5.2.1	En queratosis actínicas y carcinomas epidermoides cutáneos existe inestabilidad genómica.....	30
5.2.2	P53 se encuentra frecuentemente mutada en el carcinoma epidermoide cutáneo y parece ser el evento más precoz en el desarrollo de este tumor	31
5.2.3	La vía de las MAPK es central en el desarrollo del carcinoma epidermoide cutáneo, se encuentra precozmente alterada y exhibe <i>cross-talk</i> con otras vías importantes de señalización.....	32
5.2.4	EGFR se encuentra activado de manera aberrante en el carcinoma epidermoide cutáneo.....	32
5.2.5	P16 y progresión a carcinoma epidermoide epidermoide cutáneo de las lesiones displásicas no invasoras	34
5.2.6	CXCR4 está involucrado en el desarrollo de metástasis en algunas formas de cáncer y podría estar implicado en la patogenia del CEC.....	35
5.2.7	Célula de origen del carcinoma epidermoide cutáneo.....	36
5.2.8	P63 participa en el mantenimiento del fenotipo <i>stem</i> y en el desarrollo de los queratinocitos y tiene importancia en la patogenia del carcinoma epidermoide cutáneo.	36

5.2.9	CD44 es otro marcador de células stem importante en el carcinoma epidermoide cutáneo.....	37
5.3	Patogenia del carcinoma epidermoide cutáneo.....	38
5.3.1	La transición epitelio-mesénquima.....	40
5.3.2	La activación de la vía AKT.....	41
5.4	Síntesis del desarrollo del carcinoma epidermoide cutáneo según la teoría multistage.....	42
6	MODELOS EXPERIMENTALES DE DESARROLLO DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE CUTÁNEO.....	44
6.1	Modelos animales: El ratón.....	44
6.2	Líneas celulares:.....	45
7	miRNAs.....	47
7.1	Síntesis de miRNAs.....	47
7.2	Mecanismo de acción de los miRNAs.....	48
7.3	MiRNAs y cáncer:.....	49
	<u>HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....</u>	53
1	HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	55
2	OBJETIVOS.....	57
	<u>PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS.....</u>	59
1	ESTUDIO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DE LOS PACIENTES.....	61
1.1	Variables epidemiológicas.....	61
1.2	Variables clínicas.....	61
1.3	Variables evolutivas.....	62
1.4	Descripción de la cohorte de estudio.....	62
1.4.1	Descripción de la muestra de CEC (excluyendo el grupo de enfermedad de Bowen y carcinoma bowenoide).....	64
a.	Variables clínico-epidemiológicas.....	64
b.	Parámetros evolutivos y de seguimiento.....	65

1.4.2	Descripción de la muestra de tumores en la que se realizó la deteminación de los niveles de miRNAs mediante QPCR.....	68
1.4.3	Descripción de la muestra de enfermedad de Bowen y “carcinoma bowenoide”	69
2	MUESTRAS DE TEJIDOS	71
2.1	Análisis histopatológico de los tumores	71
2.1.1	Hematoxilina y Eosina.....	71
2.1.2	Variables histopatológicas analizadas en los tejidos teñidos con hematoxilina-eosina.....	72
2.1.3	Descripción de las variables histopatológicas evaluadas en el grupo de pacientes con CEC.....	74
2.1.4	Descripción de las variables histopatológicas evaluadas en el grupo de CEC en los que se determinaron los miRNA mediante HIS y QPCR.....	81
2.1.5	Descripción de las variables histopatológicas en el grupo de enfermedad de Bowen y carcinoma bowenoide.....	82
2.2	Análisis de la tinción de diversas proteínas en el CEC mediante el empleo de matrices tisulares o <i>tissue-arrays</i>	83
2.2.1	Construcción de las matrices tisulares o <i>tissue-arrays</i>	83
2.2.2	Tinciones de inmunohistoquímica	86
2.2.3	Análisis de las tinciones de inmunohistoquímica	89
2.3	Detección de EGFR mediante FISH.....	90
2.4	Descripción de las variables moleculares evaluadas en el estudio.....	91
2.4.1	Descripción de las variables moleculares evaluadas en el grupo de pacientes con CEC.....	91
2.4.2	Descripción de las proteínas evaluadas en el grupo de CEC en los que los miRNA fueron estudiados por HIS y QPCR.....	108
2.4.3	Descripción de las proteínas evaluadas en el grupo de enfermedad de Bowen y carcinoma bowenoide	109
3	LÍNEAS CELULARES Y ANÁLISIS DE miRNAS.....	113
3.1	Descripción del panel de líneas celulares	113
3.2	Resumen del diseño del estudio de miRNA	115
3.3	Extracción del RNA total de las líneas celulares y muestras de tumores humanos.....	118
3.3.1	Extracción de RNA total incluyendo las subpoblaciones de miRNA	118
3.3.2	Protocolo de extracción de RNA total incluyendo miRNA.....	120

3.3.3	Valoración de la calidad de RNA extraído y determinación de su concentración.....	121
3.4	Selección de miRNA candidatos mediante microarrays de expresión.....	121
3.4.1	Marcaje	122
3.4.2	Hibridación:	125
3.4.3	Análisis bioinformático	126
3.5	Validación de los miRNA candidatos mediante QPCR sobre líneas celulares	127
3.5.1	Síntesis de cDNA	128
3.5.2	Reacción de QPCR	129
3.6	Validación de <i>miRNA-203</i> y <i>miRNA-205</i> candidatos sobre muestras de tumores humanos.....	131
3.6.1	Detección de miRNA en tejidos incluidos en parafina mediante hibridación <i>in situ</i>	131
4	ESTUDIO ESTADÍSTICO Y ANÁLISIS MULTIVARIANTE	134
	<u>RESULTADOS</u>.....	137
1	INTRODUCCIÓN A LOS RESULTADOS DE LA TESIS DOCTORAL	139
2	ANÁLISIS CLÍNICO-PATOLÓGICO DEL CARCINOMA EPIDERMÓIDE CUTÁNEO: .	142
2.1	Relación entre los parámetros clínico-patológicos analizados en el carcinoma epidermoide cutáneo	142
2.1.1	Asociación del grado de diferenciación del CEC con otras variables clínico-patológicas	142
2.1.2	Relación del patrón de crecimiento tumoral con otras viables clínico-patológicas del CEC.	146
2.1.3	Asociación de la desmoplasia con otras características clínico-patológicas del tumor.....	152
2.1.4	Asociación del tamaño tumoral con otras variables clínico-patológicas.....	156
2.1.5	Relación del espesor tumoral con otras variables clínico-patológicas.....	156
2.1.6	Asociación de la presencia de ulceración tumoral con otras características clínico-patológicas	158
2.1.7	Relación de la presencia de Infiltración perineural con otras variables clínico-patológicas	161

2.1.8	Relación de la infiltración linfovascular con otras variables clínico-patológicas del tumor.....	165
2.1.9	Asociación de la presencia de infiltrados inflamatorios en el tumor con otras variables clínico-patológicas.....	168
a.	Infiltrado inflamatorio intratumoral.....	169
b.	Infiltrado inflamatorio peritumoral.....	169
2.1.10	Asociación de la velocidad de crecimiento con otras variables clínico-patológicas.....	173
2.2	Evaluación de los factores pronósticos clínico-patológicos en el CEC	177
2.2.1	Variables clínico-patológicas relacionadas con el desarrollo de eventos de mala evolución clínica.....	177
2.2.2	Variables relacionadas con el desarrollo de recidiva local	180
2.2.3	Variables clínico-patológicas relacionadas con el desarrollo de metástasis ganglionares	185
2.2.4	Variables relacionadas con la progresión del estadio tumoral durante el seguimiento.....	188
2.3	Resumen de las asociaciones clínico-patológicas más relevantes.....	194
2.4	Desarrollo de modelos predictivos a partir de las variables clínico-patológicas.....	197
2.4.1	Predicción de eventos de mala evolución clínica considerados de forma global	197
2.4.2	Predicción de la recidiva local.....	198
2.4.3	Predicción del desarrollo de metástasis ganglionares	200
2.4.4	Predicción de la progresión del estadio de la clasificación TNM durante el seguimiento.....	201
2.4.5	Evaluación de la influencia de los infiltrados inflamatorios sobre el pronóstico en el CEC.....	202
a.	Evaluación de los infiltrados inflamatorios como variables predictoras de eventos de mala evolución clínica considerados de forma global	202
b.	Participación de los infiltrados inflamatorios como variable de predicción del desarrollo de metástasis ganglionares en el CEC.....	203
c.	Evaluación de los infiltrados inflamatorios intratumorales como variables de predicción de la progresión del estadio TNM durante el seguimiento del CEC	204
2.4.6	Evaluación de la capacidad de predicción de eventos de mala evolución clínica por diferentes métodos de estadiaje	206

a.	Predicción de eventos de mala evolución clínica considerados de forma global según la AJCC, el BWH y el espesor con arreglo al trabajo de Brantsch <i>et al.</i>	206
b.	Predicción de la recidiva local según la AJCC, el BWH y el espesor con arreglo al trabajo de Brantsch <i>et al.</i>	207
c.	Predicción de las metástasis ganglionares según la AJCC, el BWH y el espesor con arreglo al trabajo de Brantsch <i>et al.</i>	208
d.	Predicción de la progresión del estadio TNM según la AJCC, el BWH y el espesor con arreglo al trabajo de Brantsch <i>et al.</i>	208
2.5	Evaluación de las variables temporales de la enfermedad a partir de variables clínico-patológicas	209
2.5.1	Variables clínico-patológicas relacionadas con el tiempo hasta el desarrollo de eventos de mala evolución considerados de manera global	210
a.	Inmunosupresión	210
b.	Velocidad de crecimiento.....	210
2.5.2	Variables clínico-patológicas relacionadas con el tiempo hasta la detección de afectación ganglionar	211
a.	Infiltrado inflamatorio intratumoral.....	211
b.	Velocidad de crecimiento.....	212
2.6	Resumen de las asociaciones más relevantes entre las variables clínico-patológicas y el tiempo hasta el desarrollo de eventos	213
2.7	Evaluación de la influencia de variables clínico-patológicas sobre la latencia hasta el desarrollo de eventos de mala evolución clínica	214
3	RELACIÓN ENTRE VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS DEL CEC Y DIFERENTES MARCADORES MOLECULARES RELACIONADOS CON LA DIFERENCIACIÓN CUTÁNEA Y/O CON LA ONCOGÉNESIS	215
3.1	Relación entre diferentes marcadores moleculares en el CEC.....	215
3.1.1	La expresión de E-CADHERINA se relacionó con la expresión de VIMENTINA, P63, CD44 y CXCR4	215
3.1.2	La expresión de VIMENTINA se relacionó con la expresión de E-CADHERINA, P63 y CXCR4.....	216
3.1.3	La expresión de P63 se relacionó con la expresión de E-CADHERINA, VIMENTINA y KI-67.....	218
3.1.4	La expresión de CD44 se relacionó con la expresión de E-CADHERINA, AE1 y EGFR.....	220

3.1.5	La expresión de CXCR4 se relacionó con la expresión de E-CADHERINA, VIMENTINA y AE-1.....	222
3.1.6	La expresión de EGFR se relacionó con la expresión de CD44, AE1, CXCR4 y Ki-67.....	222
a.	Evaluación inmunohistoquímica de EGFR.....	222
b.	Relación entre la expresión de EGFR medida por inmunohistoquímica y la detección de alteraciones genómicas mediante FISH.....	224
3.1.7	La expresión de D2-40 se relacionó con la expresión de VIMENTINA y CXCR4 ..	225
3.1.8	La expresión de AE1 se relacionó con la expresión de CXCR4, EGFR, E-CADHERINA, VIMENTINA y CD44 ..	226
3.1.9	La expresión de KI67 se relacionó con la expresión de VIMENTINA, EGFR y P63	226
3.2	Expresión diferencial de los marcadores moleculares de naturaleza proteica analizados en las zonas diferenciada e indiferenciada de los tumores ..	228
3.3	Resumen de las asociaciones observadas entre las proteínas analizadas en el CEC ...	230
3.4	Marcadores proteicos cuya expresión se relacionó con variables clínico-patológicos del CEC.....	231
3.5	Marcadores proteicos cuya expresión se relacionó con el desarrollo de eventos de mala evolución clínica.....	236
3.6	Resumen de las asociaciones entre la expresión de marcadores moleculares y las características clínico-patológicas de los tumores.....	238
3.7	Evaluación del valor predictivo de los marcadores moleculares sobre diferentes eventos de mala evolución clínica ..	241
3.7.1	Evaluación de la expresión del EGFR como factor predictivo de metástasis ganglionares ..	241
3.7.2	Evaluación de la expresión del EGFR como marcador de predicción de la progresión del estadio TNM.....	242
3.8	Estudio del valor predictivo de la expresión de los marcadores proteicos sobre las variables temporales de la enfermedad ..	243
3.8.1	Identificación de marcadores proteicos cuya expresión se asoció al tiempo de aparición de eventos de mala evolución clínica considerados de forma global ..	243
3.8.2	Marcadores proteicos cuya expresión se asoció a la latencia hasta el desarrollo de metástasis ganglionares.....	244

3.9 Evaluación del valor predictivo de la expresión de los marcadores proteicos, en combinación con otras variables clínico-patológicas, sobre la latencia de eventos de mala evolución clínica.....	245
3.9.1 Predicción de la latencia hasta el desarrollo de eventos de mala evolución clínica considerados de forma global	245
3.9.2 Variables predictoras de la latencia hasta el desarrollo de metástasis ganglionares.....	245
3.9.3 Variables que pronosticaron la latencia hasta el desarrollo de recidiva local	245
4 RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE miRNAs Y OTROS PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS Y MOLECULARES ANALIZADOS	247
4.1 Identificación de miRNA candidatos mediante el empleo de <i>arrays</i> de expresión.....	247
4.2 Validación de la expresión diferencial de miRNAs obtenida por microarrays mediante QPCR en las líneas celulares.....	253
4.3 Análisis de la expresión de miRNA mediante hibridación <i>in situ</i>	255
4.3.1 Nivel de expresión de miRNA determinados por hibridación <i>in situ</i> en tejidos en parafina en nuestra cohorte de CEC.....	255
a. Expresión de miRNA-203 en la cohorte de CEC.....	255
b. Expresión de miR-205 en el CEC.....	256
4.3.2 Análisis comparativo entre del nivel de expresión de miRNA mediante hibridación <i>in situ</i>	258
4.3.3 Relación entre los niveles de expresión de los miRNA y parámetros clínico-patológicos y evolutivos del CEC.....	260
a. Relación de la expresión de <i>miR-205</i> con características clínico-patológicas del CEC.....	260
b. Relación de la expresión de <i>miR-203</i> con características clínico-patológicas del CEC.....	262
4.3.4 Relación entre los niveles de expresión de los miRNA y los parámetros moleculares analizados en el CEC.....	264
a. miRNA-205	264
b. miRNA-203	266
4.4 Evaluación de parámetros temporales de la enfermedad en función de la expresión de los miRNA estudiados.....	270
4.5 Análisis de la expresión de miRNA mediante QPCR en la serie de CEC.....	272

4.5.1	Nivel de expresión de miRNAs en los tumores humanos en que la validación se realizó tanto mediante QPCR como mediante hibridación in situ.....	272
4.5.2	Relación entre los niveles de expresión de miRNA por QPCR en el CEC y las características clínico-patológicas y moleculares de los mismos	273
4.6	Comparación de la evaluación de los niveles de miRNAs en tumores humanos mediante QPCR y mediante hibridación in situ.	276
5	IDENTIFICACIÓN DE CLÚSTERS CON VALOR PRONÓSTICO EN FUNCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MirnaS Y DE PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS.....	277
6	COMPARACIÓN ENTRE EL GRUPO DE CEC CLÁSICO Y EL GRUPO DE ENFERMEDAD DE BOWEN Y CARCINOMA BOWENOIDE	284
6.1	Nivel de expresión de miRNA determinados por hibridación <i>in situ</i> en tejidos en parafina en nuestra cohorte de CB	284
6.2	Relaciones entre el grupo de CEC clásico y el grupo de enfermedad de Bowen y “carcinoma bowenoide”	284
7	RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE ESTE TRABAJO DE TESIS DOCTORAL EN FUNCIÓN DE LOS OBJETIVOS	292
7.1	Resumen de los resultados del OBJETIVO 1: Definición del pronóstico del CEC a partir de características clínico-patológicas (nivel 1)	292
7.1.1	Asociaciones entre distintas características clínico-patológicas	292
7.1.2	Características clínico-patológicas que definen el pronóstico del CEC de forma individual: análisis univariante	294
7.1.3	Características clínico-patológicas que definieron el pronóstico del CEC de forma combinada: Modelos multivariantes.....	295
7.1.4	Evaluación de la utilidad de los sistemas de estadiaje más utilizados en la actualidad en el CEC para definir mejor el pronóstico de la enfermedad.....	296
7.2	Resumen de los resultados del OBJETIVO 2: Identificación de marcadores proteicos (nivel 2) cuya expresión en el tumor primario se relacionó con el pronóstico del CEC	296
7.2.1	Asociaciones entre las proteínas analizadas en el CEC.....	297
7.2.2	Asociación de las proteínas evaluadas en el CEC y características clínico-patológicas del tumor.....	298
7.2.3	Proteínas que definieron el pronóstico del CEC de forma individual: análisis univariante	298
7.2.4	Proteínas que definieron el pronóstico del CEC de manera combinada: Modelos multivariantes.....	298

7.3	Resumen de los resultados del OBJETIVO 3: Análisis del nivel 3 (miRNAs) y relación con factores pronósticos en el CEC	299
7.3.1	Identificación del patrón de expresión diferencial de miRNAs en distintas fases de progresión del CEC en un panel de líneas celulares. Elección de <i>miR-205</i> y <i>miR-203</i> .	299
7.3.2	Relación entre los niveles de expresión de <i>miR-203</i> y <i>miR-205</i> en el tumor primario con características clínico-patológicas.....	300
7.3.3	Relación de la expresión de <i>miR-203</i> y <i>miR-205</i> con la de otros marcadores proteicos analizados en este trabajo.....	300
7.3.4	Pronóstico de CEC relacionado con la expresión de miRNAs: análisis univariante	300
7.3.5	Comparación de la QPCR y la hibridación <i>in situ</i> como técnicas de análisis de la expresión de miRNAs en el CEC	301
7.4	Resumen de los resultados del OBJETIVO 4. Identificación de dústers de pacientes con diferente pronóstico.....	301
7.5	Resumen de los resultados del OBJETIVO 5. Comparación del CEC clásico con el CEC bowenoide/enfermedad de Bowen	301
	<u>DISCUSIÓN</u>.....	303
1	FACTORES PRONÓSTICOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS EN EL CEC.....	306
1.1	Características clínico-patológicas del CEC con valor pronóstico reconocido	306
1.1.1	El tamaño y el espesor tumorales.....	306
a.	El tamaño tumoral.....	306
b.	El espesor tumoral.....	308
1.1.2	El grado de diferenciación.....	309
1.1.3	La infiltración perineural	310
1.1.4	La localización	312
1.1.5	La recidiva local.....	313
1.2	Características clínico-patológicas y epidemiológicas del CEC con valor pronóstico probable.....	315
1.2.1	Desmoplasia	315
1.2.2	Patrón de crecimiento infiltrativo.....	317
1.2.3	La ulceración.....	318

1.2.4	El sexo femenino puede ser un factor de riesgo independiente del desarrollo de recidiva local.....	319
1.2.5	El infiltrado inflamatorio como posible factor pronóstico.....	320
1.3	Evaluación de la capacidad predictiva de mala evolución clínica mediante sistemas de estadiaje diferentes.....	322
1.4	La velocidad de crecimiento y la inmunosupresión están relacionados con la latencia hasta el desarrollo de eventos de mala evolución clínica.....	323
1.4.1	El estado inmunitario del paciente	323
1.4.2	La velocidad de crecimiento se asocia a una menor latencia hasta la progresión ganglionar.....	324
2	FACTORES PRONÓSTICOS MOLECULARES EN EL CARCINOMA EPIDERMÓIDE CUTÁNEO.....	327
2.1	Son necesarios nuevos marcadores moleculares con valor predictivo en el CEC	327
2.2	Los carcinomas epidermoides cutáneos son heterogéneos a nivel histopatológico y molecular	328
2.3	Relación entre la expresión de marcadores moleculares con distintas características clínico-patológicas y evolutivas en el CEC.....	329
2.3.1	La transición epitelio-mesénquima en el CEC	329
2.3.2	Importancia de P63 en el CEC.....	331
2.3.3	Proliferación	332
2.3.4	Marcadores moleculares en CEC agresivos.....	333
2.3.5	EGFR es un factor pronóstico independiente del desarrollo de metástasis ganglionares y de progresión del TNM.....	334
2.3.6	La expresión de D2-40 se relaciona con la latencia hasta el desarrollo de eventos de mala evolución clínica en el CEC	335
3	MIRNA-203 Y MIRNA-205 SE EXPRESAN DE MANERA DIFERENTE EN EL CEC E IDENTIFICAN SUBGRUPOS CON DIFERENTE PRONÓSTICO.....	338
3.1	La expresión de <i>miRNA-203</i> y <i>miRNA-205</i> se asociaron diferentes características clínico-patológicas y evolutivas de la enfermedad	338
3.1.1	<i>miRNA-205</i> y CEC	338
3.1.2	<i>miRNA-203</i> y CEC	340
3.1.3	Expresión y asociaciones exduyentes entre el <i>miR-203</i> y el <i>miR-205</i>	341
3.2	Significado de la expresión de <i>miRNA-203</i> y <i>miRNA-205</i> en el pronóstico del CEC	341

3.3 Comparación de la QPCR y la hibridación in situ como técnicas para evaluar la expresión de miRNAs en muestras humanas de CEC.....	342
4 EL CARCINOMA BOWENOIDE PODRÍA SER UN SUBTIPO DIFERENTE DE CEC....	344
5 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	347
<u>CONCLUSIONES.....</u>	349
REFERENCIAS.....	355
<u>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....</u>	407
Índice de Figuras.....	409
Índice de Tablas.....	416
<u>ANEXOS.....</u>	421
Anexo de Tablas.....	423
Anexo de Figuras.....	448
<u>ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....</u>	457

INTRODUCCIÓN

1 EPIDEMIOLOGÍA DEL CARCINOMA EPIDERMOIDE CUTÁNEO

1.1 La epidemia de carcinoma epidermoide cutáneo

Los tumores cutáneos son el tipo más frecuente de cáncer en humanos (Martinez and Otley, 2001). Alrededor del 97% de los cánceres cutáneos son de origen epitelial, fundamentalmente carcinoma basocelular y carcinoma epidermoide, conocidos genéricamente como cáncer cutáneo no melanoma (CCNM) (Nguyen and Ho, 2002). El carcinoma epidermoide cutáneo (CEC) es el segundo tipo de cáncer de la piel más frecuente, por detrás del carcinoma basocelular (Motley *et al.*, 2002; Preston and Stern, 1992). Su incidencia se ha incrementado dramáticamente (Bennett *et al.*, 2012; Lomas *et al.*, 2012; Rigel, 2014; Weinberg, 2012; Xiang *et al.*, 2014), y se encuentra probablemente infraestimada, debido a la declaración incompleta de estos tumores en los registros de cáncer y a que en un pequeño porcentaje son mortales. Un estudio reciente estima en más de 700000 los casos de CEC diagnosticados cada año en Estados Unidos (Karia *et al.*, 2013a). El riesgo de desarrollar un CEC a lo largo de la vida se ha estimado entre un 7 y un 11% (Miller and Weinstock, 1994). Las tasas de incidencia varían mucho según el área geográfica, siendo más altas en Australia y Nueva Zelanda (Leiter and Garbe, 2008). Por ser una enfermedad de la piel muy frecuente y teniendo en cuenta su incidencia creciente, el CCNM y dentro de él, el CEC, se encuentra entre las formas de cáncer que generan más costes a los sistemas sanitarios (Bentzen *et al.*, 2013; Housman *et al.*, 2003), algo que aún resulta más evidente en pacientes transplantados (Ruegg *et al.*, 2012).

En la población blanca, el CEC se ha incrementado entre un 2 y un 8% desde 1960 (Green, 1992). Este aumento podría estar relacionado con el incremento de la exposición al sol y a las lámparas artificiales de radiación ultravioleta (UV), las actividades al aire libre y el cambio en la moda de la ropa (Gloster and Brodland, 1996). La incidencia del CCNM aumenta con la proximidad al ecuador y su incidencia creciente se ha atribuido parcialmente al incremento en la dosis de radiación UVB, que alcanza la corteza terrestre debido a la alteración de la capa de ozono (Slaper *et al.*, 1996).

Algunos autores han sugerido que las queratosis actínicas (QA) no se transforman, convierten o progresan hacia el CEC, sino que consisten en la manifestación dínica reconocible más precoz de esta forma de cáncer cutáneo. Si se admite esta hipótesis, dado que las QA son varios miles de veces más frecuentes que el carcinoma basocelular, el CEC sería el cáncer cutáneo con mayor incidencia y el tumor maligno más frecuente en la población humana (Brand and Ackerman, 2000). Parece claro que el CEC es un tumor infravalorado y que, en

algunas áreas del centro y el sur de los Estados Unidos, posiblemente las muertes por esta enfermedad sean comparables a las que se producen por carcinomas orofaríngeos, renales o por melanomas (Weinstock *et al.*, 1991). Los pacientes con antecedentes de un CCNM, tienen un mayor riesgo de desarrollar un segundo CCNM que la población general (Dominguez-Cruz *et al.*, 2013). Además, se ha identificado un mayor riesgo de desarrollar otras formas de cáncer entre los pacientes con antecedentes de CCNM según algunos estudios (Chen *et al.*, 2008; Hug, 2004; Jung *et al.*, 2014; Rosenberg *et al.*, 2004), aunque aún exista cierta controversia en este sentido (Alberg and Fischer, 2014; Grant, 2007).

1.2 Factores de riesgo del carcinoma epidermoide cutáneo

La etiología del CEC es multifactorial y el riesgo de CEC depende de la interacción entre factores externos al organismo y de la respuesta de éste a dichos factores. Entre ellos enumeramos los siguientes:

1.2.1 Radiaciones ultravioleta e ionizantes

La exposición solar crónica parece ser el factor de riesgo más importante para el desarrollo del CEC (Epstein, 1983; Rigel, 2008). En torno al 80% de los casos de CCNM se producen en áreas de piel expuesta al sol, como cara, escote o dorso de las manos (Diepgen and Mahler, 2002). La radiación UVB (de 290-320nm de longitud de onda) es la principal responsable, junto con la radiación UVA (320-400 nm), de un aumento del riesgo de CEC (Molho-Pessach and Lotem, 2007). La radiación UVB se considera que induce tanto la iniciación como la promoción de la carcinogénesis cutánea, mientras que la radiación UVA parece comportarse más como un factor promotor (Molho-Pessach and Lotem, 2007; Rundel, 1983). El papel de la radiación UVA en la carcinogénesis cutánea es importante, dado que entre el 90 y el 99% de la radiación UV que alcanza la tierra pertenece al espectro UVA. La influencia de la radiación UV en el desarrollo del CCNM y del CEC se ha demostrado claramente en el contexto de la exposición ocupacional (Diepgen *et al.*, 2012), así como la utilización de cabinas de bronceado, que se han identificado como un factor de riesgo evitable de melanoma y CCNM, incluido el CEC (Abdulla *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2010; Junkins-Hopkins, 2010; Lever and Lawrence, 1995; Levine *et al.*, 2005; Schulman and Fisher, 2009; Young, 2004) e incluso la exposición no laboral de otro origen, como el deporte al aire libre (Moehrle, 2008).

A pesar de que la radioterapia se han utilizado ampliamente en el tratamiento del CCNM (Alam *et al.*, 2011; Mendenhall *et al.*, 2009), las radiaciones ionizantes también pueden inducir CEC, tanto en su exposición profesional (Yoshinaga *et al.*, 2005), como terapéutica (Lindelof and Eklund, 1986; Ronel *et al.*, 2004). El periodo de latencia puede ser muy

prolongado e inversamente proporcional a la dosis total de radiación recibida (Karagas *et al.*, 2007). Los CEC inducidos por radiaciones ionizantes suelen ser del tipo fusocelular (Karagas *et al.*, 2007).

1.2.2 Factores étnicos y raciales

Los individuos de piel clara tienen mayor riesgo de sufrir CEC (fototipo de Fitzpatrick I y II) y los individuos pelirrojos tienen un riesgo especial (Gallagher *et al.*, 1995). El CCNM es raro en Asia, negros y sudamericanos, sin embargo, la mortalidad entre individuos negros se ha demostrado desproporcionadamente alta en comparación con su incidencia (Weinstock, 1993; Weinstock *et al.*, 1991). Mientras la piel de cabeza y cuello expuesta al sol es la localización más frecuente de CEC en población blanca, las áreas no fotoexpuestas se encuentran más frecuentemente implicadas en negros, sugiriendo que la exposición a la luz solar es un factor etiológico menos relevante en este grupo (Mora and Perniciaro, 1981). Estos pacientes normalmente exhiben CEC en piel previamente dañada por cicatrices crónicas, úlceras, quemaduras...(Mora and Perniciaro, 1981).

1.2.3 Sexo y edad

Teniendo en cuenta el sexo, el CEC es más frecuente en varones y el riesgo se incrementa con la edad (Diepgen and Mahler, 2002).

1.2.4 Inmunosupresión

Junto a lo anterior, la inmunosupresión incrementa el riesgo de CCNM y de CEC. El riesgo es especialmente elevado en pacientes trasplantados de órganos sólidos (Atkar *et al.*, 2013; Clayton and Stasko, 2003; Mitchell, 2010; Muehleisen *et al.*, 2013; Naldi *et al.*, 2000; Tessari and Girolomoni, 2012), en los que además, tienden a ser más agresivos (Lott *et al.*, 2010) y con mayor riesgo de metastatizar (Euvrard *et al.*, 2003; Euvrard *et al.*, 1997; Martinez *et al.*, 2003). Otras formas de inmunosupresión como neoplasias hematológicas (Brewer *et al.*, 2014), infección por VIH (Lobo *et al.*, 1992) y los tratamientos inmunosupresores (Peyrin-Biroulet *et al.*, 2011), aunque de forma más modesta (Ariyaratnam and Subramanian, 2014), también han demostrado incrementar el riesgo de CEC (Hartevelt *et al.*, 1990).

1.2.5 Carcinógenos químicos

La exposición a carcinógenos químicos como el arsénico (Yu *et al.*, 2006), los hidrocarburos, el tabaco en el cáncer de boca y de labio (De Hertog *et al.*, 2001) y los psoralenos (Katz *et al.*, 2002; Lim and Stern, 2005) también puede aumentar el riesgo de desarrollar CEC (Karagas *et al.*, 2007).

1.2.6 Cicatrices y procesos infecciosos e inflamatorios crónicos

Además, varios trastornos cutáneos como las úlceras crónicas, las quemaduras, hidrosadenitis supurativa (Chandramohan *et al.*, 2009; Gordon, 1977; Maclean and Coleman, 2007; Mendonca *et al.*, 1991), lupus discoide (Fatani *et al.*), liquen plano (Casparis *et al.*, 2014; Fitzpatrick *et al.*, 2014), liquen esderoatrófico (Sotillo Gago *et al.*, 1977) y lupus vulgar (Kanitakis *et al.*, 2006; Leocata *et al.*, 2009; Motswaledi and Doman, 2007; Patrascu *et al.*, 2008; Zawirska *et al.*, 2009) predisponen el desarrollo de CEC, con un curso más agresivo (Alam and Ratner, 2001).

1.2.7 Virus

Fundamentalmente, la infección por virus del papiloma humano (VPH) (Andersson *et al.*, 2012; Bernat-Garcia *et al.*, 2014; Drvar *et al.*, 2014; Mackintosh *et al.*, 2009), especialmente en el área genital (Blomberg *et al.*, 2012). Se han implicado sobre todo en la epidermodisplasia verruciforme, los carcinomas anogenitales (verrugosos), los carcinomas periungueales y la enfermedad de Bowen/papulosis bowenoide (Alam and Ratner, 2001).

1.2.8 Enfermedades genéticas

Algunas enfermedades genéticas como el xeroderma pigmentoso, albinismo, epidermodisplasia verruciforme y epidermolisis ampollosa distrófica recesiva, entre otros, predisponen al desarrollo del CEC (Diepgen and Mahler, 2002).

1.2.9 Antecedentes de CEC previo

Una vez que un paciente ha desarrollado un cáncer de piel, tiene un mayor riesgo de desarrollar un nuevo cáncer cutáneo en los años siguientes, siendo especialmente alto durante el primer año (Schreiber *et al.*, 1990). En un estudio de seguimiento, el 52% de los pacientes

desarrollaron otro CCNM durante los 5 años posteriores al diagnóstico de CEC (Frankel *et al.*, 1992).

1.2.10 Antecedentes de queratosis actínicas

Mientras el carcinoma basocelular generalmente aparece *de novo*, es decir, sin lesión previa, el CEC puede aparecer sobre lesiones pre-existentes (QA y enfermedad de Bowen (EB)) (Diepgen and Mahler, 2002). En torno al 5-20% de las QA evolucionan a CEC tras 15 a 25 años de evolución (Marks *et al.*, 1988), habiéndose estimado el riesgo anual de progresión de una única queratosis actínica a CEC entre el 0,075% (Marks *et al.*, 1988) y el 0,53% según un estudio basado en pacientes con historia de múltiples CCNM (Criscione *et al.*, 2009), siendo en individuos que presentaban múltiples QA persistentes durante más de un año el riesgo acumulado de desarrollo de CEC invasor probablemente mayor (Werner *et al.*, 2013). Las tasas de regresión de lesiones individuales de QA se encuentran entre el 15 y el 63% anual, con tasas de recurrencia entre el 15 y el 53% (Werner *et al.*, 2013) y la regresión espontánea de un campo de cancerización completo se produce entre el 0,7 y el 2% de los pacientes (Werner *et al.*, 2013). Todo ello nos permite afirmar que algunos casos de CEC pueden prevenirse a partir del tratamiento de las QA.

2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DEL CARCINOMA EPIDERMÓIDE CUTÁNEO

Desde el punto de vista clínico-patológico los CEC pueden clasificarse en dos grandes grupos: intraepidérmicos e invasivos.

2.1 Carcinoma epidermoide cutáneo intraepidérmico “*in situ*”

Clásicamente, se consideran dos variantes morfológicas distintivas: Enfermedad de Bowen y eritroplasia de Queyrat. La enfermedad de Bowen consiste en un CEC *in situ*, intraepidérmico localizado en la piel y en genitales femeninos (Bowen, 1912; Cox *et al.*, 2007). Clínicamente, se inicia como elementos máculo-papulares, lenticulares, eritemato-parduzcos, que confluyen configurando una placa eritemato-descamativa, con pequeñas zonas queratósicas, de bordes bien definidos y crecimiento centrífugo, de evolución lenta durante años. La enfermedad de Bowen localizada en áreas expuestas al sol es más común y, habitualmente, menos agresiva que aquella que se ubica en áreas no fotoexpuestas (Rigel, 2006). Cuando se localiza en el pene (glande), se presenta como una placa eritematosa, brillante, de bordes bien definidos, y se denomina eritroplasia de Queyrat (Goette, 1976; Graham and Helwig, 1973; Schulze *et al.*, 1984). Motiva frecuentemente prurito y/o dolor y tiene tendencia al sangrado. Tiene mayor tendencia a la progresión hacia un CEC invasivo y a metastatizar.

Sin tratamiento, la enfermedad de Bowen puede evolucionar a un carcinoma epidermoide invasor (3-8% de los casos), especialmente los casos que asientan en el área genital (eritroplasia de Queyrat) (Arlette and Trotter, 2004; Bhawan, 2007). En esta etapa el potencial metastásico puede llegar de un 13% a un 20% (Arlette and Trotter, 2004).

2.2 Carcinoma epidermoide cutáneo invasor

Como ya comentamos, el CEC en la raza blanca se presenta habitualmente en ancianos y en áreas fotoexpuestas con importante daño actínico (Feldman and Fleischer, 2011), mientras en población negra tiende a localizarse en áreas no fotoexpuestas (Mora and Perniciaro, 1981). Asienta generalmente sobre una queratosis actínica y/o coexisten en el mismo área de cancerización, pudiendo hacerlo también sobre zonas de radiodermatitis, úlceras y/o cicatrices crónicas, además de sobre zonas de infección vírica (HPV). A nivel de labios suelen asociarse a queilitis actínica y/o leucoplasia.

Las queratosis actínicas se presentan como placas queratósicas, rasposas al tacto, no infiltradas, localizadas en áreas expuestas al sol en un campo de piel dañado “campo de cancerización” (Feldman and Fleischer, 2011; Malvey, 2014). Suelen tener bordes mal definidos, aunque algunas lesiones pueden estar bien delimitadas, especialmente en formas hipertróficas. Normalmente, exhiben una base discretamente eritematosa y, en general, se palpan mejor que se ven (Alam and Ratner, 2001). Las QA pueden persistir, regresar o evolucionar hacia una forma invasiva de CEC (Chen *et al.*, 2005b; Guenther *et al.*, 1999; Marks *et al.*, 1986). Por lo tanto, los pacientes con este tipo de lesiones deben ser seguidos por el riesgo de desarrollar CEC invasivo.

El crecimiento rápido, la infiltración de la base o la superficie erosiva (especialmente cuando se asocia a dolor), constituyen signos de alarma de transición de una QA a un CEC (Rigel, 2006). En su forma clásica, la mayoría de los CEC se presentan como un nódulo o placa infiltrada, de color de piel normal o eritematoso y superficie verrugosa o hiperqueratósica que es característica de la producción de queratina (Alam and Ratner, 2001). A medida que el tumor progresa, aumentan el tamaño, el espesor y la induración, presentando a la palpación una consistencia firme, cuyos límites se extienden más allá del margen visible, pudiendo estar adherido a planos profundos (Rigel, 2006).

Existen diferentes variantes morfológicas: **i) Cuerno cutáneo**, que constituye la forma más frecuente de comienzo, presenta una base infiltrada y una zona central queratósica que al desprenderse deja una superficie sangrante, papilomatosa. **ii) CEC ulcerado**, se observa como una úlcera crateriforme de borde grueso, duro, eritematovioláceo y base infiltrada. **iii) CEC cupuliforme**, se presenta como una tumoración hemisférica, eritematosa que ocasionalmente se erosiona presentando costra serohemática. **iv) CEC úlcerovegetante**, se manifiesta por lesiones tumorales de gran tamaño, carnosas, friables, que sangran y se sobreinfentan fácilmente y **v) CEC verrugoso**, de bajo grado de malignidad y capacidad invasiva lenta, con sus tres formas clásicas de presentación: a) Carcinoma verrugoso plantar (*carcinoma cuniculatum*), la forma más frecuente, que puede confundirse durante años con una verruga plantar. Se observa en plantas de pies como lesión hiperqueratósica de crecimiento endofítico, que forma criptas profundas, múltiples, llenas de queratina, restos celulares y pus, con aspecto en madriguera. b) Carcinoma verrugoso anogenital (condilomatosis gigante de *Buschke-Lowenstein*), se localiza habitualmente en glande y prepucio de varones no circuncidados. Se manifiesta como proliferaciones tumorales papilomatosas, vegetantes o verrugosas de gran tamaño, con gran tendencia a la recurrencia, sobre todo en la zona perianal. c) Carcinoma verrugoso oral (papilomatosis oral florida), se observa como múltiples lesiones vegetantes o verrugosas, eritematosas o blanco-amarillentas afectando cualquier zona de la mucosa oral. Pueden afectar también a esófago, laringe y cavidad nasal (Rigel, 2006).

El CEC de labio suele aparecer en el labio inferior de varones, se ha considerado más agresivo y con una tasa de metástasis más alta que el que asienta en otras áreas faciales (Dinehart and Pollack, 1989). Normalmente, aparece sobre un área de queilitis actínica, que consiste en una zona mal definida de la semimucosa que aparece seca, queratósica, atrófica e irregularmente hipopigmentada (Cavalcante *et al.*, 2008; Markopoulos *et al.*, 2004). Cuando una queilitis actínica estable empieza a desarrollar eritema, induración y ulceración, debe descartarse la aparición de un CEC sobre ella (LaRiviere and Pickett, 1979; Morselli *et al.*, 2007). Cambios más tardíos inducen dolor, ulceración y crecimiento nodular. La mayoría de los carcinomas epidermoides del labio inferior aparecen sobre la parte central o discretamente lateral del bermellón. Las lesiones que asientan en la comisura oral son especialmente agresivas y, en torno al 20% de las mismas, presentan adenopatías manifiestas al diagnóstico (dos Santos *et al.*, 1996; Frierson and Cooper, 1986; Mohs and Snow, 1985). Cuando un carcinoma epidermoide está ulcerado desde el principio, normalmente es pobremente diferenciado y es más probable que invada estructuras más profundas.

Junto con el labio inferior, la oreja es una localización también considerada de alto riesgo en el CEC y ambas localizaciones se inducen dentro de la séptima edición del estadiaje del CEC de la AJCC (American Joint Comminttee on Cancer) como factores de alto riesgo que pueden modificar el estadio T de un CEC (Sobin *et al.*, 2009). Otras localizaciones que confieren mayor riesgo, reconocidas por las guías de la NCCN (National Comprehensive Cancer Network) son las regiones preauriculares, sienes y nasal (NCCN, 2015).

El carcinoma epidermoide de la cavidad oral es más difícil de reconocer (Effiom *et al.*, 2008; Gorzelnik, 1986; Lawoyin *et al.*, 1997; Oliver *et al.*, 1996; Rich and Radden, 1984; Tylor *et al.*, 1990). Se localiza habitualmente en el suelo de la boca, la parte anterior de la lengua y el vestíbulo de la cavidad oral, especialmente en aquellos pacientes que mastican tabaco, y suelen asentar sobre zonas de leucoplasia (Tercedor *et al.*, 1997). Cuando la leucoplasia es multifocal y/o exhibe un retículo rojizo, denominada entonces eritroleucoplasia, el potencial maligno es más alto. Las características dínicas del CEC de la cavidad oral son similares a aquéllas que exhibe el CEC del labio inferior, aunque la hiperqueratosis está normalmente ausente. Los carcinomas epidermoides de la cavidad oral son más agresivos que los que asientan en la piel y en el labio inferior, con una tasa global de metástasis del 20 al 70% (Montoro *et al.*, 2008; Tralongo *et al.*, 1999). Los factores de riesgo para el desarrollo de un carcinoma epidermoide de la cavidad oral son el tabaco (Bundgaard *et al.*, 1994; Jovanovic *et al.*, 1993), el alcohol (Bundgaard *et al.*, 1994; Jovanovic *et al.*, 1993), las infecciones por HPV (especialmente los tipos 16 y 18) (Feller *et al.*, 2010a, b; Kashima *et al.*, 1990; Miller and White, 1996; Sugiyama *et al.*, 2007; Syrjanen *et al.*, 1988) y el liquen plano oral (Casparis *et al.*, 2014; Lo Muzio *et al.*, 1998; Marder and Deesen, 1982), junto a algunos síndromes hereditarios como el xeroderma pigmentoso (Neville and Day, 2002; Prime *et al.*, 2001).

El carcinoma epidermoide anogenital es especialmente agresivo (Alam and Ratner, 2001). Sus características clínicas incluyen el eritema, la irritación, el picor y el sangrado intermitente. Los tumores de pene suelen aparecer en el glande y suelen asociarse a falta de circuncisión, limpieza deficiente y enfermedades inflamatorias crónicas de la zona como el liquen escleroso (Thami and Kaur, 2003). La papulosis bowenoide puede ser también causa de degeneración a carcinoma epidermoide de la región anogenital (Chapel and Rahbari, 1980). El carcinoma epidermoide escrotal y vulvar se han asociado a la exposición ocupacional a breas y componentes similares. La infección por HPV también juega un papel importante en el carcinoma epidermoide anogenital (Syrjanen, 1984, 1986).

La *úlcer de Marjolin* es un término empleado para describir al carcinoma epidermoide que aparece sobre una cicatriz o sobre un área de inflamación crónica de la piel (Cocchetto *et al.*, 2013; Fleming *et al.*, 1990). El diagnóstico precoz de estas lesiones es fundamental ya que son particularmente agresivas incluso en estadios precoces de la enfermedad (Fleming *et al.*, 1990; Karasoy Yesilada *et al.*, 2013). Debe sospecharse cuando existe una nueva induración, elevación o erosión sobre una cicatriz o sobre una placa inflamatoria crónica estable. Es necesario descartar degeneración maligna en una úlcera crónica que se ha incrementado en tamaño o en espesor (Fleming *et al.*, 1990). El periodo de latencia es de varios años (Karasoy Yesilada *et al.*, 2013); en la piel previamente irradiada, el tiempo de latencia es más corto (Fleming *et al.*, 1990).

Los CECs pueden producir destrucción local amplia y mutilante invadiendo estructuras profundas (músculo, cartílago y hueso) (NCCN, 2015) lo que también les confiere un mayor riesgo de desarrollar metástasis.

2.3 Carcinoma epidermoide metastásico

El carcinoma epidermoide metastásico es un problema médico importante por su mal pronóstico. La tasa de supervivencia para pacientes con metástasis regionales ganglionares de CEC a los 5 años está entre el 22% y el 56%, mientras que para las metástasis a distancia se estima en el 23% (Weinberg *et al.*, 2007). El CEC tiende a exhibir inicialmente diseminación linfática y los pacientes presentan habitualmente adenopatías locoregionales. La mayoría de las metástasis ganglionares aparecen durante los 3 primeros años tras el diagnóstico. El riesgo global de metástasis del CEC es del 2 al 6%. El riesgo puede ser mayor del 47.5% dependiendo de algunos parámetros clínicos (localización, tratamiento previo, tamaño del tumor, inmunodepresión) e histológicos (infiltración perineural, invasión en profundidad y grado bajo de diferenciación). La recurrencia y el tamaño tumoral son considerados por algunos autores los dos factores pronósticos más importantes para el desarrollo de metástasis de CEC (Rowe *et al.*, 1992). En el apartado de factores pronósticos analizaremos algunas cuestiones aquí comentadas de manera más específica.

3 ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL CARCINOMA EPIDERMOIDE CUTÁNEO

El CEC incluye muchos subtipos con comportamientos clínicos diversos, que van desde tumores indolentes a otros mucho más agresivos, con un potencial metastásico significativo (Cassarino *et al.*, 2006a, b). La anatomía patológica del carcinoma epidermoide de piel muestra una proliferación de células epiteliales escamosas eosinófilas, con cambios displásicos. La hiper celularidad, el aumento en la relación entre el núcleo y el citoplasma, la cromatina hiper cromática, los nucléolos prominentes y aumentados, la arquitectura desorganizada y las mitosis atípicas son frecuentes. Se puede producir queratinización extracelular, como globos córneas, o en el interior de las células. En la superficie a veces se aprecian hiperqueratosis y ulceración. En las zonas más profundas del tumor pueden verse islotes o nidos de células tumorales, haces espiculados o células aisladas (siendo esto último típico de la variante en células fusiformes). El estroma que rodea al tumor puede ser desmoplásico. En casi todos los CEC, salvo en aquéllos con menor grado de diferenciación, se pueden ver desmosomas y producción de queratina, lo que contribuye a identificar su origen queratinocítico.

El CEC *in situ* es totalmente intraepidérmico, mientras que las lesiones invasivas atraviesan la membrana basal (Yanofsky *et al.*, 2011). El límite entre algunas formas de queratosis actínica y el carcinoma epidermoide puede ser sutil y para algunos se trata de un cambio progresivo. Las queratosis actínicas (QA) y el CEC *in situ* pueden tener una extensión folicular que puede ser responsable de la recurrencia de la lesión si se realiza una ablación demasiado superficial (Rigel, 2006).

3.1 Clasificación histológica del carcinoma epidermoide cutáneo

Existen varias formas de clasificar el carcinoma epidermoide en función del grado de diferenciación. Una de las más empleadas es la que propuso Johnson en 1992, según la cual existe el CEC bien diferenciado, moderadamente diferenciado y el mal diferenciado (Johnson *et al.*, 1992). Ésta es quizás la más práctica y la que más se utiliza. Según la clasificación de Broders (Broder, 1921), los tumores se dividen en cuatro grados, dependiendo del grado de queratinización, que van desde el grado 1 (con más del 75% de queratinización), hasta el 4 (con menos del 25% de diferenciación). Los grados 2 y 3 corresponden a formas de queratinización intermedia (entre el 50 y el 75% en el grado 2; y entre el 25 y el 50% en el grado 3) (Wright, 2012). Desde el punto de vista clínico, lo más relevante son los dos extremos de diferenciación y queratinización, siendo de peor pronóstico aquéllos de grado más bajo y en los peor diferenciados, con un porcentaje mucho más alto de metástasis (17%), si se compara

con el de los bien diferenciados (0,6%) (Breuninger *et al.*, 1990). No obstante, la mayoría de los CEC metastásicos son bien o moderadamente diferenciados debido a que son mucho más frecuentes que aquéllos mal diferenciados.

Se puede observar infiltrado inflamatorio relacionado con el tumor aunque es controvertida su influencia en el pronóstico del mismo. En los pacientes con leucemia linfática crónica puede encontrarse un infiltrado inflamatorio prominente. Esta inflamación es en un 75% de estirpe B, de naturaleza leucémica, y puede dificultar el diagnóstico del CEC, especialmente en los cortes congelados de la cirugía de Mohs (Mehran *et al.*, 2003). La elastosis solar es un signo objetivo de daño solar crónico que consiste en la degeneración basófila de las fibras de colágeno de la dermis reticular. Éste es un evento que se asocia con frecuencia al CEC (Corbalan-Velez *et al.*, 2010), aunque no parecen exhibir implicaciones pronósticas, ni de otro tipo.

La clasificación de tumores de la OMS reconoce diversas variantes del CEC, según criterios morfológicos (Weedon *et al.*, 2005). A parte del CEC típico, existen los CEC de células fusiformes, adenoescamoso, acantolítico (adenoide, pseudoganglionar) y verrucoso. El **CEC adenoescamoso** es clínicamente indistinguible de un CE típico. Existen pocos datos que indiquen que esta variante de carcinoma epidermoide sea más agresiva que otras formas de este tumor. El CEC adenoescamoso es una variante rara que se encuentra con frecuencia en genitales y que también se ha denominado carcinoma mucoepidermoide. Se trata de un CEC relativamente bien diferenciado que tiene espacios quísticos glandulares que secretan mucina. A diferencia del **CEC acantolítico** que solamente simula estructuras glandulares, éste es realmente glandular y contiene epitelio secretor de mucina. El **CEC fusocelular** es poco frecuente y se suele presentar en pacientes ancianos, afectando a zonas expuestas al sol. En el estudio histológico hay una proliferación densa de células fusiformes con escaso citoplasma eosinófilo y núcleos grandes. Presenta un crecimiento infiltrativo mediante haces, o incluso como células aisladas y los bordes suelen estar mal delimitados. Puede ser difícil de diferenciar histológicamente de otros tumores de células fusiformes como el pseudoxantoma atípico, el leiomioma e incluso el melanoma maligno, teniendo que recurrir al estudio inmunohistoquímico para realizar el diagnóstico diferencial. Así, las células fusiformes del CEC suelen expresar citoqueratinas, aunque a veces pierden la diferenciación y pasan a expresar marcadores no epiteliales y propios de células de estirpe mesenquimal, tales como la vimentina, complicando el diagnóstico. El fibroxantoma atípico expresa vimentina, el leiomioma expresa desmina y el melanoma maligno S-100 y Melan-A. Esta variante de carcinoma epidermoide, debido a su pobre grado de diferenciación y a un mayor grado de transición epitelio-mesenquima, tiene mal pronóstico. El **CE verrucoso** se considera un subtipo de bajo grado de malignidad que como ya se dijo, se encuentra en la cavidad oral y en la piel (plantas y genitales fundamentalmente). Clínicamente, es un tumor de crecimiento lento, aspecto verrucoso y gran tamaño. Histológicamente, la zona superficial presenta hiperqueratosis, papilomatosis, acantosis y paraqueratosis. Los queratinocitos proliferantes

bien diferenciados tienen una apariencia benigna engañosa. Aunque no se pueda ver un componente invasivo, las crestas interpapilares se extienden con profundidad en la dermis, con un patrón expansivo. La identificación del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) en el borde, puede ayudar a distinguir este crecimiento de otros CEC, que se tiñen de forma difusa (Weedon *et al.*, 2005).

Dado el escaso valor pronóstico de la clasificación de tumores de la OMS para el CEC (clasificación que es fundamentalmente morfológica), algunos autores han pretendido desarrollar nuevos modelos de clasificación que ayuden a distinguir las formas de CEC más agresivas, con fines terapéuticos. En este sentido, Cassarino y cols. clasificaron el CEC en función del grado de agresividad y pronóstico. De esta forma, dividieron a los carcinomas epidermoides en 3 grupos de riesgo: bajo (<2%), intermedio (3-10) o alto (>10%) de desarrollar metástasis (Cassarino *et al.*, 2006a, b). Esta clasificación, no obstante es bastante compleja y, en cierto sentido, poco operativa. Tampoco analiza la biología molecular de los distintos tipos de carcinoma epidermoide y se limita a recoger experiencias bibliográficas previas. Según estos autores, el CEC se puede clasificar histológicamente de la siguiente manera: **1.) CEC de bajo riesgo:** a.) CEC que aparece sobre una queratosis actínica; b.) CEC verrugoso; c.) CEC fusocelular de bajo riesgo. **2.) CEC de riesgo intermedio:** a.) CEC acantolítico; b.) CEC tipo linfopitelioma; c.) carcinoma intraepidérmico con fenómeno de Borstz-Jadassohn. **3.) CEC de alto riesgo:** a.) CEC invasor que aparece sobre una enfermedad de Bowen; b.) CEC adenoescamoso; c.) carcinoma epidermoide que aparece sobre quiste tricolemal proliferante o sobre quiste epidérmico; d.) carcinoma epidermoide de novo; e.) carcinoma basoescamoso; f.) carcinoma epidermoide que aparece sobre zona previamente radiada o con un trastorno de inflamación cutánea crónica (Cassarino *et al.*, 2006a, b). Aunque esta clasificación descriptiva es interesante, resulta poco útil a la hora de valorar series de casos de carcinoma epidermoide porque en la mayoría de los estudios no se utiliza para clasificar a estos tumores. En este sentido, hemos utilizado, por ser más operativa, la clasificación de Johnson, comentada con anterioridad, que hace referencia a tres grados de diferenciación del tumor (Johnson *et al.*, 1992) y que es la más empleada en la actualidad.

El queratoacantoma es considerado por algunos una forma de CEC (Belisario, 1965; Brothers *et al.*, 1960; Cohen *et al.*, 1972; Savage and Maize, 2013; Schwartz, 1979). La distinción histológica del queratoacantoma y CE puede resultar compleja en ocasiones (Savage and Maize, 2013). El primero es una proliferación bien delimitada, diferenciada, simétrica de epitelio escamoso. Superficialmente, existe un cráter con forma de copa, lleno de queratina. Existe mínima atipia celular o mitosis. Algunas veces se puede ver un infiltrado neutrofílico o eosinofílico moderado en la dermis adyacente. La presencia de marcaje positivo frente a PCNA en la periferia ayuda a distinguirlo de otras formas de tumor (Li and Lee, 1996; Tsuji, 1997).

De todo lo anterior puede deducirse que los esquemas de clasificación basados en la apariencia clínica e histológica resultan arbitrarios al carecer de una conexión con la etiología,

la patogenia o el pronóstico del CEC. Los basados en el pronóstico resultan más prometedores dada la obvia utilidad potencial, no obstante teniendo en cuenta que las variables pronósticas son normalmente continuas, los puntos de corte suponen también, una cierta arbitrariedad (Weinstock, 1994).

4 PRONÓSTICO DEL CARCINOMA EPIDERMOIDE CUTÁNEO

La experiencia acumulada en el tratamiento del CEC mediante varios métodos ha permitido conocer mejor el pronóstico de la enfermedad. Los factores que influyen en el potencial metastásico del CEC incluyen factores clínicos e histológicos. Desde el punto de vista clínico, el pronóstico del CEC se encuentra influido por el tamaño horizontal del tumor, la localización, la recurrencia o no del mismo y el estadio inmunitario del paciente (Brantsch *et al.*, 2008; Carter *et al.*, 2013; Clayman *et al.*, 2005; Cherpelis *et al.*, 2002; dos Santos *et al.*, 1996; El-Husseiny *et al.*, 2000; Frierson and Cooper, 1986; Jambusaria-Pahlajani *et al.*, 2013; Jensen *et al.*, 2009; Karia *et al.*, 2013a; Karia *et al.*, 2013b; Moore *et al.*, 2005; Rowe *et al.*, 1992; Schmults *et al.*, 2012, 2013; Vinicius de *et al.*, 2011). Desde el punto de vista histológico, el pronóstico del CEC se encuentra influido por el espesor del tumor, el grado de diferenciación tumoral, la presencia o ausencia de infiltración perineural y linfovascular, y la escisión incompleta del tumor, entre otros (Brantsch *et al.*, 2008; Carter *et al.*, 2013; Clayman *et al.*, 2005; Cherpelis *et al.*, 2002; dos Santos *et al.*, 1996; El-Husseiny *et al.*, 2000; Frierson and Cooper, 1986; Jambusaria-Pahlajani *et al.*, 2013; Jensen *et al.*, 2009; Karia *et al.*, 2013a; Karia *et al.*, 2013b; Moore *et al.*, 2005; Rowe *et al.*, 1992; Schmults *et al.*, 2012, 2013; Vinicius de *et al.*, 2011).

4.1 Factores pronósticos clínicos del carcinoma epidermoide cutáneo

4.1.1 Tamaño horizontal del tumor

El tamaño de la lesión primaria ha sido descrito en múltiples estudios como un factor predictor importante para el desarrollo de metástasis ganglionares (Cherpelis *et al.*, 2002; Kraus *et al.*, 1998; Rowe *et al.*, 1992). Un estudio clásico estableció que los tumores de más de 2 cms de diámetro tienen un riesgo 2 veces superior de dar lugar a recurrencia local (15.2 vs 7.4%) y tres veces mayor de desarrollar metástasis (30 vs 9.1%) que los tumores más pequeños (Rowe *et al.*, 1992). Otros estudios también han destacado la relevancia del tamaño tumoral horizontal en el pronóstico del CEC (Clayman *et al.*, 2005; Cherpelis *et al.*, 2002; Rowe *et al.*, 1992). Así, se ha establecido como punto de corte 2 cm de tamaño horizontal, a partir del cual existe un incremento de riesgo de desarrollo de metástasis ganglionar. Por el contrario, el tamaño tumoral horizontal < 2 cm actuaría como factor protector, de forma que CEC con tamaños inferiores a éste, en un paciente inmunocompetente, harían altamente improbable su diseminación a distancia (Martorell-Calatayud *et al.*, 2013).

4.1.2 Localización

Las áreas que muestran una mayor incidencia de CEC metastásicos son el pabellón auricular y el área no mucosa de los labios (Veness *et al.*, 2006). Otras localizaciones, que se podrían considerar de riesgo intermedio, incluirían el cuero cabelludo (principalmente la sien), el área perineal y genital y las partes acras (manos y pies) (Clayman *et al.*, 2005). Por otra parte, es importante tener en cuenta que las áreas no fotoexpuestas como el periné, la región sacra y las plantas presentan mayor tasa de metástasis que las zonas de fotoexposición crónica (Motley *et al.*, 2002). Según un estudio clásico de factores pronósticos en CEC se estableció que la localización influye en la capacidad de diseminación, en orden creciente: 1.) CEC que deriva de lugares expuestos al sol (excluyendo labio y oreja); 2.) CEC del labio; 3.) CEC de la oreja; 4.) CEC que deriva de zonas no expuestas. 5.) CEC que deriva de áreas previamente radiadas o sometidas a daño térmico, úlceras crónicas, enfermedad de Bowen o procesos inflamatorios crónicos (Rowe *et al.*, 1992). El peor pronóstico de los CEC localizados en labio es controvertido, así en la serie de Brantsch *et al.*, no se demuestra que la localización en el labio inferior incrementa el riesgo de metástasis, lo que les lleva a destacar la relevancia del espesor del tumor como marcador pronóstico (Brantsch *et al.*, 2008). Sin embargo, la 7ª edición del AJCC de estadiaje del CEC incluye las localizaciones de oreja y labio inferior dentro de los factores de mal pronóstico (Metchnikoff *et al.*, 2012).

4.1.3 Recurrencia.

La recurrencia tumoral suele ir asociada a un mal pronóstico en los procesos neoplásicos cutáneos, habiéndose relacionado con un mayor riesgo de metástasis ganglionares en este tumor (Veness *et al.*, 1999). De esta forma, estudios comparativos en CEC recurrente frente a no recurrente, basados en la tasa de metástasis linfática a los 5 años de seguimiento (15% [CEC recurrente] vs 2% [CEC no recurrente]) concluyen que esta variable sea un factor importante de riesgo en el CEC (Huang and Boyce, 2004). Se ha demostrado que la recurrencia se relaciona con el tamaño tumoral, siendo mayor la tasa de recidivas en las tumoraciones de mayores dimensiones (Clayman *et al.*, 2005). Además, los tumores recurrentes presentan con mayor frecuencia invasión perineural (24% vs 10%), invasión linfovascular (17% vs 8%) e invasión del tejido celular subcutáneo (30% vs 10%), comparado con lesiones no recurrentes (Clayman *et al.*, 2005). Por otro lado, la recurrencia se asocia de forma relevante con la extirpación de un CEC con márgenes postquirúrgicos afectos. De esta forma, hasta el 50% de los pacientes con márgenes positivos recurrirá, con el consecuente riesgo incrementado de desarrollo de metástasis (Huang and Boyce, 2004).

4.1.4 Estado inmunitario del paciente

En el caso de los pacientes sometidos a trasplante de órgano sólido (TOS), el CEC aparece con una incidencia 65 veces mayor con respecto a la población general, y representa el CCNM más frecuente (Veness *et al.*, 1999). Las tasas de recurrencia, metástasis locorregional y de supervivencia relacionadas con el CEC difieren según el tipo de trasplante. Así, dentro del grupo de los pacientes sometidos a TOS, el trasplante cardíaco es considerado el de mayor riesgo para el desarrollo de CEC y específicamente de CEC de alto riesgo (CECAR) (Veness *et al.*, 1999). De forma decreciente en riesgo le seguirían el trasplante de pulmón, riñón e hígado. En cuanto a pacientes que presentan un proceso hematológico, aquéllos que tienen mayor tendencia a desarrollar CEC y CECAR son el grupo formado por sujetos con leucemia linfática crónica y linfoma linfocítico de célula pequeña (Mehran *et al.*, 2005). La incidencia acumulada de desarrollar un CEC se incrementa de forma progresiva con la duración de la inmunosupresión (incidencia del 7% tras un año de inmunosupresión, frente a un 45% a los 11 años y un 70% a los 20 años). De la misma forma, hasta un 66% de los pacientes desarrollarán un segundo CEC en los primeros 5 años tras el desarrollo del primer CEC (Euvrard *et al.*, 2006). La tasa de recurrencia del CEC es mayor en pacientes inmunodeprimidos (39% en 5 años de seguimiento) que en inmunocompetentes (15% en 5 años de seguimiento) (Veness *et al.*, 2006), y la tasa de mortalidad en pacientes sometidos a trasplantes alcanza el 5% comparado con una incidencia menor del 1% en pacientes inmunocompetentes (Martinez *et al.*, 2003). Cuando estos datos se analizan en términos de supervivencia, los pacientes trasplantados de órganos con CEC metastásico muestran tasas de supervivencia del 56% a los 3 años de seguimiento, similar a la supervivencia de pacientes con carcinoma epidermoide no cutáneo de cabeza y cuello (Martinez *et al.*, 2003).

4.2 Factores pronósticos histológicos del carcinoma epidermoide cutáneo

4.2.1 Espesor tumoral

Actualmente, se considera al espesor tumoral como el factor predictor independiente de metástasis más importante, de forma que incrementos en el espesor tumoral se asocian con mayor riesgo de metástasis (Brantsch *et al.*, 2008; Motley *et al.*, 2002). El estudio clásico sobre factores pronósticos del CEC de Rowe, demostró que aquéllos tumores de más de 4mm de profundidad (excluyendo la capa córnea) o que se extienden hasta el tejido celular subcutáneo (Clark V), tienen un mayor riesgo de recurrencia (17,2%) y metástasis (47.5%) comparados con los tumores de menor espesor, que exhiben tasas de recurrencia y metástasis del 5.3% y 6.7%, respectivamente (Rowe *et al.*, 1992). Por otro lado, el análisis obtenido a partir de la mayor

serie prospectiva de CEC publicada por Brantsch revela la existencia de 3 grupos de riesgo en función del espesor tumoral: i) **el grupo de bajo riesgo**, sería aquel formado por los pacientes cuyas tumoraciones presentasen un espesor tumoral menor o igual a 2 mm. Esta población presentaría un riesgo prácticamente nulo de desarrollar metástasis a distancia. ii) En segundo lugar, estaría el **grupo de riesgo intermedio**, compuesto por aquellos pacientes con CEC de espesor tumoral de entre 2 y 6 mm. Este subgrupo presentaría una incidencia de desarrollo de diseminación tumoral de un 4% a lo largo los siguientes 5 años de seguimiento. iii) Finalmente, el **grupo de alto riesgo** sería el formado por todo aquel paciente que presente un CEC cuyo espesor tumoral sea igual o superior a 6 mm. Esta población desarrollaría metástasis hasta en un 16% de los casos (Brantsch *et al.*, 2008). En general, se aceptan los 4 mm de espesor como punto de corte más sensible para separar al CEC de bajo riesgo y el CEC de alto riesgo de diseminación sistémica (Martorell-Calatayud *et al.*, 2013). Por otro lado, los CEC con espesor tumoral menor de 2 mm presentan un riesgo prácticamente nulo de desarrollar enfermedad a distancia.

4.2.2 Grado de diferenciación tumoral

El grado de diferenciación tumoral es un hallazgo que en el CEC, y de forma común con el resto de procesos oncológicos, presenta un valor importante en el establecimiento del pronóstico de un proceso neoplásico maligno. En un estudio de 571 pacientes con CEC se observó una diferencia significativa en la tasa de metástasis para tumores pobremente diferenciados frente a otros grados de diferenciación (17% vs 4%) (Rowe *et al.*, 1992). Otro estudio con un elevado número de pacientes apoyó el mayor riesgo de malignización de aquellos CEC pobremente diferenciados frente a tumores moderadamente y bien diferenciados (44% vs 5%)(Cherpelis *et al.*, 2002). El grado pobre de diferenciación tumoral se asocia a su vez con una mayor frecuencia de recurrencias precoces. Por otra parte, si bien la existencia de una mala diferenciación implica un aumento de riesgo de metástasis a distancia (2,9 veces mayor riesgo de metástasis y de muerte, comparado con la forma bien diferenciada), parece que una buena diferenciación tumoral también se puede asociar al desarrollo de enfermedad avanzada (Cherpelis *et al.*, 2002; Jensen *et al.*, 2009). Si analizamos el patrón histopatológico del CEC, se distinguen determinados subtipos histológicos (CEC acantolítico, adenoide y de células aisladas) y son un factor de riesgo adicional a considerar junto al grado de diferenciación tumoral (Cassarino *et al.*, 2006a, b).

4.2.3 Infiltración perineural

Se define como la situación en la que las células del tumor se disponen alrededor de una vaina nerviosa y se diseminan a través del nervio, ya sea hacia la zona superficial o

profunda (García-Serra *et al.*, 2003; Veness *et al.*, 2006). Cuando la invasión es clínica los síntomas pueden ser parestias, parestesias, dolor o disestesias; la invasión histológica se aprecia en el estudio de la muestra una vez extirpada; ambos factores se asocian a una peor evolución. La explicación a este fenómeno es la diseminación del tumor a través de los nervios que se observa de forma parcheada. La invasión perineural se ha relacionado con una menor diferenciación del CEC y mayores tamaños tumorales. Todos los estudios coinciden en que la invasión perineural es un factor de mal pronóstico (Farasat *et al.*, 2011). Los CEC con invasión perineural tienen un riesgo significativo superior de recidiva local, metástasis a distancia y muerte específica asociada a la enfermedad, que los CEC sin invasión perineural (Jambusaria-Pahlajani *et al.*, 2009).

La infiltración perineural ocurre aproximadamente entre el 5 y el 10% de los pacientes con CEC, habitualmente como un hallazgo incidental (Clayman *et al.*, 2005). Sin embargo, la evidencia histológica de afectación perineural (IPN) parece asociada con un incremento significativo en la tasa de recurrencia y de metástasis a distancia (Carter *et al.*, 2013). Este hecho queda reflejado en un estudio realizado en la Clínica MD Anderson, en Texas, donde encontraron un incremento significativo tanto de metástasis regionales (35% vs 15%;), como a distancia (15% vs 3,3%) en pacientes con IPN comparados con aquéllos que no la mostraron (Goepfert *et al.*, 1984). La importancia de la IPN no solo radica en el riesgo de diseminación locorregional, sino también en la morbilidad secundaria a la diseminación perineural por los nervios craneales, habitualmente el nervio facial y el trigeminal (Martorell-Calatayud *et al.*, 2013), y en una peor tasa de supervivencia en un seguimiento a 3 años (64% en CEC con IPN frente a un 91% en CEC sin IPN) (Frierson and Cooper, 1986; García-Serra *et al.*, 2003; McCord *et al.*, 1999). La evaluación del riesgo de una infiltración perineural en el CEC variará en función del grosor de los nervios afectados y de la existencia de manifestaciones clínicas y/o radiológicas. Respecto al tamaño del filete nervioso, la infiltración de nervios de diámetro menor de 0,1 mm se asocia a un riesgo bajo de desarrollo de complicaciones locales o a distancia. Por el contrario, la presencia de filetes nerviosos infiltrados mayores de 0,1 mm, muestran mal pronóstico a corto y medio plazo (muerte específica por CEC en IPN < 0,1 mm = 0%; muerte específica por CEC en IPN > 0,1 mm = 32%)(Ross *et al.*, 2009). Respecto a la evaluación clínica de la IPN ésta puede mostrarse como un hallazgo histológico incidental, sin síntomas acompañantes, o como una forma sintomática. En este último caso se manifestaría como dolor a la palpación, parestesias regionales, dolor agudo intermitente o dolor lancinante. Estudios obtenidos de datos de la universidad de Florida sugieren que los pacientes con IPN asintomática, no visible radiológicamente, presentan un mejor pronóstico comparado con pacientes que se presentan con IPN clínica o radiológicamente positivas (control local a los 5 años del 87% frente a un 55% respectivamente) (García-Serra *et al.*, 2003). Un estudio reciente en el que se analizaron 114 casos de CEC con infiltración perineural a lo largo de 11 años, concluyó que en CECs con infiltración perineural con infiltración de filetes nerviosos pequeños (< 0,1mm de diámetro) quizás tengan un riesgo bajo de mal pronóstico en ausencia de otros factores de riesgo. La infiltración de nervios de mayor tamaño se asocia a un elevado riesgo de

afectación ganglionar y muerte por CEC, pero los autores postulan que esto también puede deberse al valor pronóstico de otros factores de riesgo asociados (Carter *et al.*, 2013).

4.2.4 Invasión linfovascular

La infiltración linfovascular se define como la invasión de los vasos linfáticos y/o sanguíneos por células tumorales del carcinoma epidermoide. Los CEC con invasión linfovascular tienen un mayor riesgo de metástasis regionales. En un estudio se observó que el 40% de los pacientes con metástasis linfáticas tenían invasión linfovascular, frente al 8% de los pacientes sin enfermedad metastásica y que además era un factor predictivo de metástasis en el análisis multivariante (Moore *et al.*, 2005).

Estudios recientes, sugieren que la presencia de infiltración linfovascular pueden incrementar el riesgo de metástasis. Moore y colaboradores definieron la invasión linfovascular como un factor predictor independiente de desarrollo de metástasis ganglionar en un análisis multivariante (Moore *et al.*, 2005). En este estudio, el 40% de los pacientes con metástasis ganglionares presentaba invasión linfovascular en comparación con el 8% de pacientes sin adenopatías (Moore *et al.*, 2005). Otros estudios, sin embargo, ponen en duda su impacto en el pronóstico (Cherpelis *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2009). Las consecuencias del CEC en los vasos linfáticos dérmicos, raramente descrito, es desconocida, pero parece que puede incrementar el riesgo de recurrencia y podría explicar el fenómeno de metástasis en tránsito (Martorell-Calatayud *et al.*, 2013). La invasión vascular produce una diseminación a través de la vía hematogena. Las zonas de metástasis más frecuentes son los pulmones, el hígado, el hueso, el cerebro o la piel (Weinberg *et al.*, 2007). Sin embargo, a diferencia de la invasión perineural, la invasión linfovascular no se considera en la mayoría de los trabajos, y por ello no se incluye en la última clasificación de la AJCC (Farasat *et al.*, 2011).

4.2.5 Escisión incompleta del tumor

Una escisión incompleta de la tumoración y por tanto, la persistencia de enfermedad, supone un factor de mal pronóstico. Hasta en el 50% de los pacientes con márgenes positivos el CEC reaparecerá por persistencia tumoral, con el riesgo subsiguiente incrementado de desarrollo de metástasis (Huang and Boyce, 2004). Ello parece relacionado con un riesgo de progresión tumoral subdínico, que favorecería su diseminación a distancia (de Visscher *et al.*, 2002). La decisión de observación en pacientes con CEC inadecuadamente extirpados, es decir, con un informe histológico que revele afectación de uno o más márgenes de la pieza quirúrgica, debe de ser evaluada con precaución, dada la elevada tasa de enfermedad nodal en las formas recurrentes. De hecho, en diferentes estudios de CEC diseminado a ganglios

linfáticos, entre el 45 y el 51% de los pacientes que desarrollaron metástasis nodales habían presentado recurrencia de la tumoración primaria (Brodland and Zitelli, 1992; Cherpelis *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2005; Rowe *et al.*, 1992). Por lo tanto, todo CEC debe ser intervenido quirúrgicamente hasta alcanzar márgenes libres de enfermedad (Veness, 2007). En caso de que la cirugía no pueda llevarse a cabo, otros tratamientos, principalmente la radioterapia, deberían ser planteados.

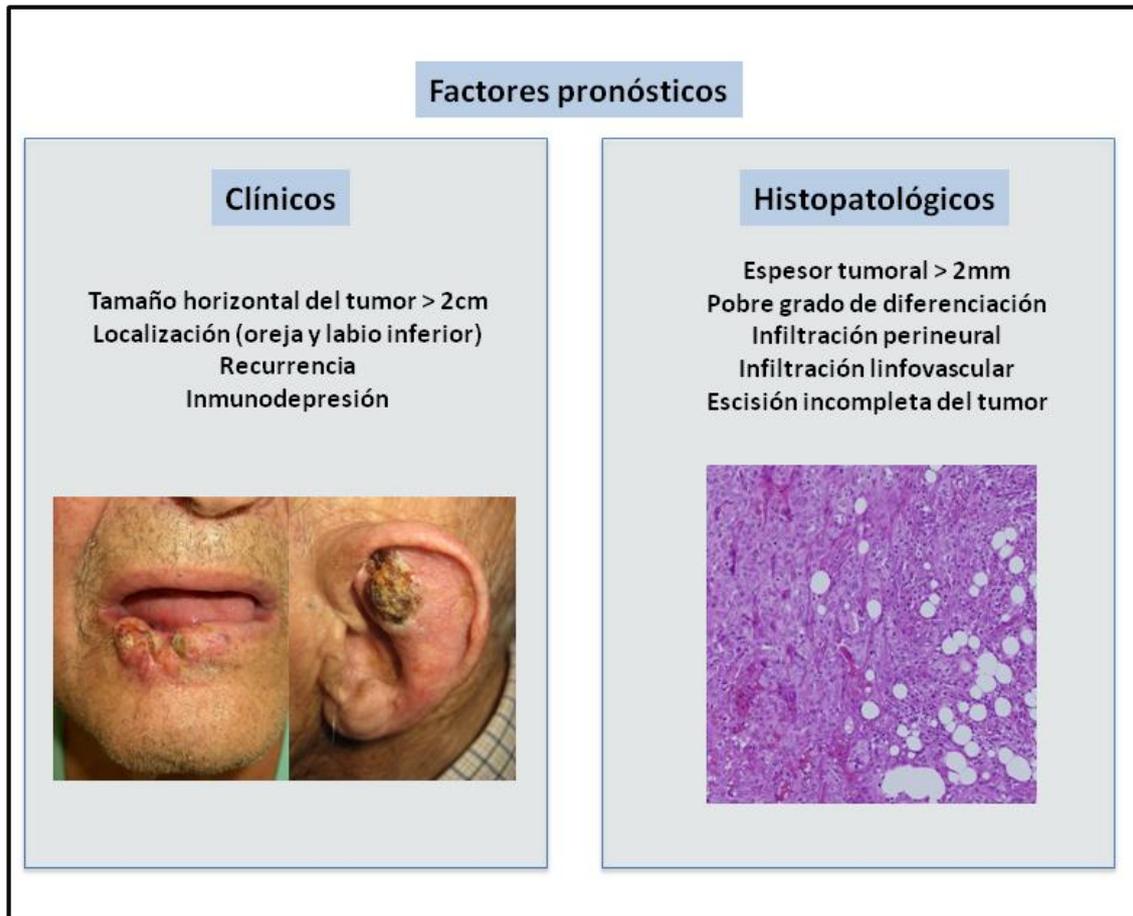


Figura 1: Esquema de los factores de riesgo clínico-patológicos más importantes en el CEC.

4.3 Otros factores pronósticos

4.3.1 Factores clínico-patológicos

a. Ulceración

La ulceración no se ha estudiado extensamente en el CEC, y no se considera un parámetro reconocido de mal pronóstico en este tumor. No obstante, parece que los tumores

ulcerados suelen ser de mayor tamaño que aquéllos que no exhiben ulceración. En un estudio sobre los factores pronósticos histopatológicos en el CEC, se comprobó una caída en el tiempo hasta la recurrencia y hasta el desarrollo de metástasis en los tumores en los que se había demostrado ulceración microscópica (Petter and Haustein, 1998). Desde entonces, la ulceración no ha sido un parámetro evaluado rigurosamente en grandes series de CEC y su valor pronóstico es controvertido.

b. Patrón de crecimiento del tumor

El patrón de crecimiento se ha identificado como un factor pronóstico en el CEC (Frierson and Cooper, 1986; Frierson *et al.*, 1988). El patrón de crecimiento infiltrativo se ha relacionado con agresividad en el CEC. Se ha definido como patrón de crecimiento infiltrativo aquel consistente en cordones de células que disecan los haces de colágeno o de células tumorales individuales que se independizan de la masa tumoral. En general, se demostró una correlación entre patrones de crecimiento infiltrativo y tumores más pobremente diferenciados y con mayor espesor (Frierson and Cooper, 1986). Ese patrón se ha relacionado con mal pronóstico en el carcinoma epidermoide oral (Soland *et al.*, 2008). Se ha demostrado también este mal comportamiento en otras formas de carcinoma epitelial (Frierson and Cooper, 1986). El patrón de crecimiento infiltrativo no se ha incluido entre los factores de riesgo modificadores del estadio T del CEC, en parte por la ausencia de estudios con muestras representativas, debido a la ausencia de información relacionada con este fenómeno en la mayoría de las ocasiones en los informes histopatológicos. En general, el patrón de crecimiento infiltrativo se asocia también a la presencia de desmoplasia en el estroma (Salmon *et al.*, 2011), de modo que ambos fenómenos suelen coincidir.

c. Desmoplasia

Se ha reconocido como factor pronóstico en el CEC la presencia de desmoplasia en el estroma del tumor. Se ha demostrado que la desmoplasia se asocia a carcinomas epidermoides localmente agresivos (Salmon *et al.*, 2011). El CEC desmoplásico se identificó como una variante de mal pronóstico, y presentó 6 veces mayor riesgo de metástasis y 10 veces mayor riesgo de recidiva local, en un estudio prospectivo de 594 pacientes con una mediana de seguimiento de 5,3 años (Breuninger *et al.*, 1997). En un análisis multivariante a partir de una serie de más de 615 tumores se demostró que la desmoplasia era un factor de riesgo independiente para el desarrollo de recidiva local (Brantsch *et al.*, 2008). La desmoplasia es un factor histopatológico de alto riesgo en el CEC que no se ha considerado hasta el momento en el estadiaje de los pacientes (Karia *et al.*, 2013b).

d. Infiltrado inflamatorio

El infiltrado inflamatorio en el carcinoma epidermoide no ha sido estudiado en profundidad, si bien existen trabajos aislados. No parece haberse encontrado demasiada significación pronóstica, aunque algunos estudios parecen indicar lo contrario. Así, se ha demostrado una posible asociación entre el tamaño del tumor, la profundidad de invasión de este y las características fenotípicas del infiltrado inflamatorio peritumoral, predominantemente linfocitario (Meneses *et al.*, 1998). La presencia de mastocitos en el infiltrado inflamatorio se ha relacionado con un mayor desarrollo de angiogénesis en el estroma tumoral y, posiblemente, con el peor pronóstico de carcinoma epidermoide de mucosa oral (Coussens *et al.*, 1999). Un estudio retrospectivo también en carcinomas epidermoides de mucosa oral, encontró una asociación entre el estadio TNM y algunas características histológicas como el grado de queratinización del tumor, el pleomorfismo nuclear y la intensidad del infiltrado inflamatorio peritumoral (Costa Ade *et al.*, 2005). Más recientemente, se ha identificado una asociación entre la predominancia de macrófagos en el infiltrado inflamatorio peritumoral y la angiogénesis, atribuyéndoseles a estas células un papel protumoral y, consecuentemente, una implicación pronóstica (Sica *et al.*, 2006). Otro estudio demostró la importancia de la inmunidad celular en el carcinoma epidermoide de mucosa oral a partir de una predominancia de células T y de macrófagos frente a linfocitos B en el infiltrado inflamatorio, sin diferencias significativas según el grado de diferenciación del tumor, aunque sin demostrarse significación pronóstica en función de las características del infiltrado inflamatorio (Vieira *et al.*, 2008). El infiltrado inflamatorio de eosinófilos sí parece haber demostrado tener cierta significación pronóstica favorable en el carcinoma epidermoide de mucosa oral (Dorta *et al.*, 2002). Finalmente, un estudio reciente parece atribuir un peor pronóstico a la presencia intensa de linfocitos T reguladores intratumorales en comparación con los citotóxicos, tal y como se ha demostrado en otras formas de cáncer (Azzimonti *et al.*, 2014). No obstante, los resultados que arrojan los estudios hasta el momento publicados a este respecto son controvertidos. Además, el diseño de los estudios ha sido muy distinto en cada caso de manera que no existen estudios que hayan validado lo demostrado en trabajos previos.

4.3.2 Factores moleculares

a. Ki-67

El antígeno nuclear Ki-67 es un marcador de proliferación expresado únicamente en fases activas del ciclo celular, no se expresa en células en senescencia o reposo (se expresa en todas las fases del ciclo celular salvo en G0 y G1 temprana) (Healy *et al.*, 1995). Por lo tanto, la cuantificación de su tinción en tejidos en parafina proporciona una estimación adecuada del

índice de proliferación de tumores individuales y de la fracción en crecimiento de una determinada población celular.

La expresión de Ki-67 se correlaciona con la diferenciación, el espesor y la profundidad de invasión de CEC (Mansoor *et al.*, 1996). Niveles de expresión más altos de Ki-67 se han demostrado en carcinoma basocelular recurrente (Healy *et al.*, 1995), carcinoma epidermoide (Shimizu *et al.*, 1999) y enfermedad de Bowen (Baum *et al.*, 1994). Se ha demostrado que la expresión de Ki-67 y de P53 en el frente de invasión del carcinoma epidermoide de mucosa oral se relaciona con el grado de diferenciación histológico del tumor. A pesar del valor pronóstico demostrado por este marcador en diversas formas de cáncer, no parece tener valor pronóstico claro en el CEC en términos de recurrencia y metástasis de los tumores (Kanitakis *et al.*, 1997), ni en carcinoma epidermoide de pene (Stankiewicz *et al.*, 2012). Otros trabajos han demostrado también utilidad pronóstica de la expresión de Ki-67 en el CEC como un marcador que indica que el tumor puede tener un pronóstico más desfavorable (Jensen *et al.*; Petter and Haustein, 1998; Stankiewicz *et al.*, 2012), aunque su valor real sigue siendo controvertido.

b. D2-40

La PODOPLANINA o D2-40 es una sialoglicoproteína de superficie que se detecta por inmunohistoquímica en diversos tipos celulares, incluyendo el endotelio linfático, las células germinales testiculares, las células dendríticas foliculares, las células intersticiales de Cajal, las células mioepiteliales y las células basales de epitelio glandular. Como marcador endotelial, se expresa en el citoplasma de las células del endotelio linfático del tejido sano y de malformaciones linfáticas, pero además su positividad apoya una diferenciación hacia el endotelio linfático de una serie de proliferaciones vasculares de histogénesis controvertida, como el sarcoma de Kaposi, el angioendotelioma papilar intralinfático (PILA) o tumor de Dabska, el hemangioendotelioma epitelioide y el hemangioma de células en tachuela. Se expresa también en las células neoplásicas de la mayoría de los angiosarcomas cutáneos en todas sus variantes clinicopatológicas (el de cara y cuero cabelludo en ancianos, el asociado a linfedema crónico, el secundario a radioterapia y el de células epitelioides) (Fuertes *et al.*, 2013b). Se utiliza también para demostrar la naturaleza linfática de los vasos conteniendo células neoplásicas en su luz en émbolos tumorales, tanto de tumores cutáneos primarios como de metástasis cutáneas. También es útil para diferenciar histopatológicamente neoplasias cutáneas primarias, especialmente adenocarcinomas anexiales, de metástasis cutáneas de adenocarcinomas de vísceras internas, ya que la podoplanina se expresa en las células neoplásicas de los primeros, pero no de los segundos (Liang *et al.*, 2007; Plaza *et al.*, 2010). Por último, estudios recientes han propuesto utilizarlo este marcador junto con otros marcadores endoteliales, como Lyve-1 y CD31, en la predicción de metástasis en el ganglio centinela de melanomas, valorando la invasión intralinfática del tumor primario (Doeden *et al.*, 2009).

En el CEC se ha demostrado que D2-40 marca más intensamente tumores con mayor potencial de desarrollar metástasis linfáticas y peor pronóstico (Toll *et al.*, 2012). En dicho estudio, los autores sugirieron que el patrón infiltrativo y la sobre-expresión de D2-40 podría ser útil a la hora de definir el pronóstico del CEC, a partir de los resultados obtenidos de un análisis multivariante (Toll *et al.*, 2012), factores de que no se tuvieron en cuenta a la hora de definir el estadio tumoral por la AJCC. El patrón de expresión más observado por estos autores consistió en tinción en las áreas periféricas del tumor y demostraron además una correlación entre la sobre-expresión de este marcador en el tumor y la tendencia al desarrollo de patrón de crecimiento tumoral infiltrativo (Toll *et al.*, 2012). No obstante, el valor de D2-40 en el CEC aún está por determinar y se necesitan más estudios para validar los resultados prometedores que han arrojado los hasta ahora publicados.

c. EGFR

La sobreexpresión de EGFR se relaciona con un peor pronóstico en el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (Ang *et al.*, 2002; Maurizi *et al.*, 1996; Mukaida *et al.*, 1991; Niemiec *et al.*, 2004; Ozawa *et al.*, 1989). En el CEC, la sobreexpresión de EGFR parece participar en la adquisición de un fenotipo más agresivo, como se demuestra a partir de algunas series (Maubec *et al.*, 2005; Shimizu *et al.*, 2001). Se ha detectado pérdida de la señal de membrana de EGFR en el carcinoma epidermoide y acumulación citoplásmica del mismo (Groves *et al.*, 1992), lo que puede reflejar mutaciones en EGFR. Hasta el 43% de los carcinomas epidermoides avanzados muestran sobreexpresión de EGFR (Fogarty *et al.*, 2007) y se ha comprobado que la expresión intensa de EGFR se relaciona con un riesgo mayor de metástasis ganglionares en el CEC (Ch'ng *et al.*, 2008). Algunos autores han considerado sobreestimado el valor pronóstico del EGFR en el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (Fischer *et al.*, 2008), y otros han reconocido en estudios recientes una ausencia del valor pronóstico de este marcador en el CEC (Sweeny *et al.*, 2011). En este sentido, parece necesario evaluar el valor de EGFR en el pronóstico del CEC, entre otras cosas porque además puede suponer una ventaja en el tratamiento de algunos pacientes gracias a las nuevas dianas terapéuticas.

4.4 Estadaje del carcinoma epidermoide cutáneo

A partir de la utilización de varios de los factores pronósticos clínicos e histopatológicos se construye un estadaje cuya última edición es la 7th de la AJCC (año 2010). En la Tabla 1 figura la clasificación de los parámetros T, N y M, según la séptima edición de la AJCC, y en la Tabla 2 se recoge el TNM derivado de dicha clasificación (Farasat *et al.*, 2011). El TNM en el CEC ha sido validado en series de pacientes inmunocompetentes e inmunodeprimidos. Sin embargo, la inmensa mayoría de los tumores se clasifican como T2 y,

dentro de ellos, existe un subtipo con un riesgo bajo de desarrollar eventos durante el seguimiento, mientras existe otro grupo con un riesgo mucho más alto.

En un estudio prospectivo, con una serie grande de pacientes (n=653), se le dio prioridad al espesor del tumor como base para establecer el estadio T. Los autores sugirieron que los tumores menores de 2 mm de espesor deberían ser clasificados como T1, los de 2 a 6 mm como T2 y los de más de 6 mm como T3 (Brantsch *et al.*, 2008). Estos autores demostraron que el espesor era capaz de discriminar mejor el riesgo de metástasis que otros factores de riesgo. No obstante, en la clasificación de la AJCC del año 2010, no se siguieron estas recomendaciones y sólo se realizaron cambios muy sutiles sobre la clasificación previa. Más recientemente, un estudio inicial sobre 256 casos sugirió la existencia de 4 factores de riesgo independientes en el pronóstico de pacientes con CEC (el grado pobre de diferenciación, el diámetro tumoral mayor de 2 cm, la presencia de infiltración perineural y la invasión más allá del tejido celular subcutáneo) (Jambusaria-Pahlajani *et al.*, 2009). Estos factores se incorporaron para elaborar un estadiaje alternativo del T. Los autores concluyeron que los tumores sin ninguno de los anteriores factores de riesgo debían considerarse T1; aquéllos con un único factor de riesgo T2a; los tumores que induyeran 2 ó 3 factores de riesgo debían considerarse T2b y la presencia de 4 factores de riesgo y/o la invasión del hueso, T4 (Jambusaria-Pahlajani *et al.*, 2009). Los hallazgos iniciales se validaron posteriormente en una serie de 1818 pacientes, demostrando un valor predictivo mayor que el estadiaje estándar (Karia *et al.*, 2013b). La comparación entre el sistema de estadiaje de la AJCC y el alternativo del Brigham and Women's Hospital aparece en la Tabla 3.

T	Tx	
	T0	Sin evidencia de tumor primario
	Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
	T1	Tumor <2cm con <2 factores de riesgo
	T2	Tumor > 2cm o de cualquier tamaño con 2 o más factores de riesgo
	T3	Tumor que invade maxilar, mandíbula, órbita del hueso temporal
	T4	Tumor que invade el esqueleto (axial o apendicular), o con invasión perineural de la base del cráneo
	N	Nx
N0		Sin metástasis ganglionares
N1		Metástasis en un único ganglio ipsilateral ≤ 3 cm de diámetro
N2a		Metástasis en un único ganglio ipsilateral > 3 cm, pero < 6 cm de diámetro mayor
N2b		Metástasis en múltiples ganglios ipsilaterales, ninguno de ellos > 6 cm de diámetro mayor
N2c		Metástasis en ganglios linfáticos contralaterales, ninguno de ellos > 6 cm de diámetro mayor
N3		Metástasis ganglionares > 6 cm de diámetro mayor
M	Mx	Metástasis viscerales desconocidas
	M0	Ausencia de metástasis viscerales
	M1	Presencia de metástasis viscerales

Tabla 1: Estadio TNM según la séptima edición de la AJCC.

Estadio	T	N	M
0	Is	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0-N1	M0
	T1-T2	N1	M0
IV	T1-T2-T3	N2	M0
	Cualquier T	N3	M0
	T4	Cualquier N	M0
	Cualquier T	Cualquier N	M1

Tabla 2: Estadiaje según la séptima edición de la AJCC.

Factores de riesgo relacionados con T	
Estadio T -2010 AJCC-	Estadio T -BWH-
Espesor > 2mm	Tamaño > 2 cm
Infiltración perineural	Infiltración perineural
Localización (Oreja/Labio inferior)	Invasión más allá de la grasa
Pobre grado de diferenciación	Pobre grado de diferenciación
<2cm (T1)	0 FR (T1)
>2cm (T2)	1 FR (T2a)
T1+2FR (T2)	2-3 FR (T2b)
	4 FR o invasión hueso (T3)

Tabla 3: Comparación del estadio T del CEC según la séptima edición de la AJCC y la clasificación alternativa del BWH.

4.5 Mortalidad del carcinoma epidermoide cutáneo

La falta de información de los certificados de defunción dificulta los estudios epidemiológicos directos. Se calculó una tasa de mortalidad ajustada por edad en la población de Rhode Island (EEUU) en 1970 de 0.26 por 100.000, pero en la mayoría de los casos no se

disponía de los datos para realizar este cálculo (Weinstock, 1994). En varones las tasas de mortalidad fueron mayores que en mujeres. La relación entre las tasas de mortalidad ajustadas por edad entre varones y mujeres fue de alrededor de 3.9. La mortalidad por CEC es mayor en raza blanca y en personas de edad avanzada. La letalidad es además mayor en los tumores de ciertas localizaciones como el oído, el labio o la región genital (Lewis and Weinstock, 2007; Weinstock, 1993). Mientras el melanoma es el causante del 90% de las muertes por cáncer de piel en pacientes menores de 50 años, en mayores de 85 años, la mayoría de las muertes por cáncer de piel se pueden atribuir al carcinoma epidermoide (Weinstock *et al.*, 1991). Teniendo en cuenta el incremento en la esperanza de vida, es de esperar que el carcinoma epidermoide sea un problema aún mayor en el futuro, en consecuencia con los datos arriba expresados, aunque debemos considerar que la mortalidad debida al CEC parece haber disminuido en los últimos años, en parte debido a un diagnóstico más precoz de este tipo de tumor

En un reciente estudio se ha sugerido un mayor riesgo muerte por otras formas de cáncer en pacientes con antecedentes de CEC (Johannesdottir *et al.*, 2012), aunque estos datos no han sido validados en otros trabajos. Un estudio basado en la población norteamericana estimó entre 3.932 y 8.791 las muertes por CEC en EEUU en el año 2012 (Karia *et al.*, 2013a). Los autores conduyeron que en algunas áreas del centro y sur de los EEUU las muertes por CEC podían ser tan frecuentes como las debidas a carcinomas renales, orofaríngeos o melanoma (Karia *et al.*, 2013a). No obstante, se precisan estudios basados en la población para validar esas estimaciones.

Autor	Diseño	Tamaño de la muestra		Pronóstico (%)	
		Pacientes	Tumores	Riesgo de N+	Riesgo de MEE
(Katz <i>et al.</i> , 1957)	Retrospectivo. Se investigó el riesgo de metástasis en pacientes con el diagnóstico de CEC (1946-1950). Único centro	413	577	2,6	-
(Epstein <i>et al.</i> , 1968)	Retrospectivo multicéntrico (38 centros). Se examinó el pronóstico de pacientes con diagnóstico de CEC (1942-1962) basado en el registro de tumores.	6900	-	2	-
(Chuang <i>et al.</i> , 1990)	Prospectivo poblacional. Investigó el pronóstico de pacientes con el diagnóstico de CEC (1976-1984).	169	174	3,6	-
(Schmults <i>et al.</i> , 2012)	Retrospectivo. Evalúa el pronóstico de pacientes con el diagnóstico de CEC (1999-2009). Único centro.	985	1832	3,7	2,1
			Media	3	2,1

Tabla 4: Tabla que refleja los estudios sobre mortalidad en CEC: N+ (metástasis ganglionares), MEE (muerte específica por CEC)

5 PATOGENIA DEL CARCINOMA EPIDERMÓIDE CUTÁNEO

5.1 La teoría en múltiples fases

El modelo clásico en múltiples fases (*multistage*) de carcinogénesis es útil en el conocimiento de la progresión desde QA a CEC (Balmain and Yuspa, 2014; Fearon and Vogelstein, 1990). De acuerdo con este modelo, mutaciones en un gen, habitualmente supresor tumoral, pueden conducir al desarrollo de una lesión precursora con mayor inestabilidad genómica o con pérdida de control del ciclo celular. Mutaciones adicionales en otros oncogenes y supresores permiten la adquisición de nuevas propiedades neoplásicas, conduciendo al desarrollo de un carcinoma invasor. El número de cambios genéticos requeridos para la transición desde un epitelio normal hasta un carcinoma metastásico se cree que se encuentra entre cuatro y seis (Balmain and Yuspa, 2014; Fearon and Vogelstein, 1990). Sin embargo, modelos de cultivo tridimensionales (3D) de piel humana han permitido comprobar que cambios en tan sólo dos proto-oncogenes podrían ser suficientes para el desarrollo del CEC (Dajee *et al.*, 2003; Lazarov *et al.*, 2002).

5.2 Desde la queratosis actínica al carcinoma epidermoide cutáneo

5.2.1 En queratosis actínicas y carcinomas epidermoides cutáneos existe inestabilidad genómica

Estudios de pérdida de heterocigosidad en las QA han demostrado alteraciones genómicas en diversos *loci* como: 3p, 9p, 9q, 13q, 17p y 17q; lo que sugiere que una sustancial inestabilidad genómica ya es previa al desarrollo de un CEC invasor (Rehman *et al.*, 1996). Sin embargo, los genes y los RNAs no codificantes afectados por estas alteraciones genéticas, aún no se han conectado con los mecanismos que conducen al cáncer. La pérdida de heterocigosidad también se ha observado en el CEC *per se*, en el brazo corto del cromosoma 9, en 13 de 16 tumores primarios (Purdie *et al.*, 2007) y en algunas otras regiones cromosómicas que incluyen 3p, 2q, 8p y 13, así como ganancias alélicas en 2q y 8q (Purdie *et al.*, 2007).

5.2.2 P53 se encuentra frecuentemente mutada en el carcinoma epidermoide cutáneo y parece ser el evento más precoz en el desarrollo de este tumor

Al igual que otros tipos de cáncer, el CEC exhibe un control genómico deteriorado que facilita la adquisición de nuevas mutaciones (Hoeijmakers, 2001). Los mecanismos que conducen a la inestabilidad genómica en los queratinocitos probablemente resulten de la inactivación de *P53* inducida por radiación UVB (Leffell, 2000; Ziegler *et al.*, 1994), ya que en torno al 58% de los CEC presentan patrones de alteraciones genómicas inducidas por radiación UVB, como transiciones CC>TT y C>T (Brash *et al.*, 1991). El papel de la proteína P53 en la carcinogénesis inducida por UVB se ha confirmado en un modelo murino deficiente en el gen de *p53* (*p53*^{-/-}), que exhibe una elevada propensión al desarrollo de lesiones tipo QA y de CEC en respuesta a la radiación UVB (Jiang *et al.*, 1999). Desde las observaciones iniciales de las mutaciones inducidas por radiación UVB en *P53*, otros grupos han confirmado la existencia de mutaciones en este mismo gen en un porcentaje significativo de CEC (Kubo *et al.*, 1994; Nelson *et al.*, 1994; Ziegler *et al.*, 1994).

P53 (locus 17p13) codifica un factor de transcripción conocido como el “guardian del genoma” (Lane, 1992; Levine and Oren, 2009), por sus implicaciones en el mantenimiento de la homeostasis celular, y es el gen más frecuentemente alterado en tumores humanos (Vogelstein *et al.*, 2000). *P53* se expresa constitutivamente en la célula de manera inactiva a bajas concentraciones, pero sus niveles celulares aumentan y adquieren un estado activo ante diferentes situaciones de estrés celular, como los daños directos sobre el DNA, erosión de telómeros, hipoxia y estrés oxidativo (Fuster *et al.*, 2007; Vousden and Lane, 2007). El principal mecanismo a través del que *P53* ejerce su función es como factor de transcripción de genes implicados en parada del ciclo celular, senescencia y apoptosis (Riley *et al.*, 2008). *P53* induce la parada del ciclo celular directamente (el-Deiry *et al.*, 1993) o a través de alguno de sus genes diana (Vogelstein *et al.*, 2000; Zilfou and Lowe, 2009). Además, ante determinadas situaciones de estrés o ante daños que no pueden ser reparados, *P53* puede inducir senescencia celular, a través de la activación de la expresión de PAI-1 (inhibidor de la activación del plasminógeno 1) (Vousden and Prives, 2009).

P53 se encuentra habitualmente mutado en las QA, lo que demuestra que las lesiones displásicas han adquirido mutaciones genéticas iniciales antes de convertirse en un CEC invasor (Leffell, 2000; Ortonne, 2002). Estudios adicionales han demostrado una prevalencia elevada (74%) de mutaciones en *P53* en piel fotoexpuesta, dínicamente normal, frente a piel no fotoexpuesta (5%) (Nakazawa *et al.*, 1994), preparando el escenario para la adquisición de nuevas mutaciones que conduzcan a la carcinogénesis. De acuerdo con estos hallazgos, el 40% de los CEC *in situ* exhiben mutaciones en *P53*, lo que indica que la alteración de *P53* se

produciría previamente a la invasión tumoral (Campbell *et al.*, 1993). En contraste, otros tumores desarrollan mutaciones en P53 como un evento tardío en su desarrollo (Baker *et al.*, 1990). Estudios de inmunohistoquímica de QA, para determinar los niveles de P53, han demostrado resultados variables, pero muchos de ellos muestran un incremento en los niveles de P53 que probablemente se deban a la mayor estabilidad de la proteína P53 mutante (Einspahr *et al.*, 1999). Sin embargo, son necesarios más estudios para intentar conectar mutaciones específicas de P53 encontradas en las QA con las características funcionales de la proteína y su estabilidad.

5.2.3 La vía de las MAPK es central en el desarrollo del carcinoma epidermoide cutáneo, se encuentra precozmente alterada y exhibe *cross-talk* con otras vías importantes de señalización

Se han demostrado mutaciones activadoras y amplificaciones del oncogen *RAS* tanto en la QA como en el CEC (Bizub *et al.*, 1988; Pierceall *et al.*, 1991; Quintanilla *et al.*, 1986). Las moléculas *RAS* son pequeñas proteínas G de unión a GTP, cuyos genes se encuentran más habitualmente mutados en diversos cánceres (Cox and Der, 2011). *RAS* es un activador superior de la vía de las *RAS/RAF/MEK/ERK1/2* quinasas, y mutaciones activadoras en este gen serían capaces de promover el desarrollo del CEC (Khavari, 2006). Las mutaciones características afectan a los codones 12, 13 y 61 de *H-Ras* y parecen exhibir la impronta de la exposición a la radiación UVB (Pierceall *et al.*, 1991). La importancia de la vía de señalización de las MAPK es central y de hecho, aparte de jugar un papel importante en la regulación del ciclo celular, exhibe una interacción o *cross-talk* con otras vías de señalización, algunas de las cuales tienen importancia *per se* en el desarrollo del CEC, entre ellas, la vía del EGFR (Jost *et al.*, 2001), la del CXCR4/CCXCL12, la de la diferenciación de los queratinocitos (Jost *et al.*, 2001) y en la vía de señalización de PTEN (To *et al.*, 2005). Además, las implicaciones de la vía de las MAP kinasas en el desarrollo del CEC se ha visto recientemente corroborada por los hallazgos en pacientes con melanoma tratados con inhibidores de BRAF, en los que por una activación aberrante de la vía se producen secundariamente CEC (Anforth *et al.*, 2013).

5.2.4 EGFR se encuentra activado de manera aberrante en el carcinoma epidermoide cutáneo

La activación aberrante del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) también se observa en el CEC (Toll *et al.*, 2010) y se ha descrito que regularía negativamente a P53 a través de un mecanismo dependiente de c-Jun (Kolev *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2009), lo

que revela otro mecanismo de control de P53 en el CEC y permitiría un *cross-talk* entre las vías de ambas moléculas.

EGFR (locus 7p12) pertenece a la familia de receptores tirosinquinasa ERBB (Gschwind *et al.*, 2004) y consta de cuatro dominios funcionales, entre ellos uno intracelular con actividad tirosina quinasa (Zandi *et al.*, 2007). Los principales ligandos del EGFR son EGF y TGF- α (Uribe and Gonzalez, 2011). EGFR activa rutas de señalización responsables de diferentes funciones celulares como la proliferación, la migración, la evasión de la apoptosis o la angiogénesis (Mitsudomi and Yatabe, 2009; Zhang *et al.*, 2006). Las principales vías de señalización activadas por EGFR son las vías de señalización PI3K/PTEN/AKT y la vía de las MAP quinasas RAS/RAF/MEK/ERK (Chappell *et al.*; Gschwind *et al.*, 2004), que se encuentran frecuentemente alteradas en cáncer, incluido en el CEC (Ratushny *et al.*, 2012). Se han demostrado niveles reducidos de inositol-5'-polifosfato fosfatasa en las QA, lo que podría resultar en un incremento en la activación de la vía de señalización PI3K/AKT (Sekulic *et al.*, 2010).

El gen *EGFR* se encuentra amplificado y/o mutado en un gran número de tumores (Yarden and Pines, 2012). En los queratinocitos produce proliferación celular con un incremento de la celularidad de la epidermis y del grosor epitelial (Cohen, 1965; Jost *et al.*, 2000). Puede inducir el bloqueo de la diferenciación de los queratinocitos en ciertas condiciones experimentales (Jost *et al.*, 2000). Induce la migración de queratinocitos normales y aumenta supervivencia y su resistencia a la apoptosis (Rodeck *et al.*, 1997).

Varias observaciones indican que las anomalías en la expresión del EGFR y/o de sus ligandos son características comunes a diversos procesos hiperproliferativos de la piel y a las neoplasias epiteliales (Serewko *et al.*, 2002). Por ejemplo, en la piel con psoriasis, EGFR se sobreexpresa no sólo en la capa basal del epitelio, sino también en las capas suprabasales (Gottlieb *et al.*, 1988). La sobreexpresión del TGF α (uno de los ligandos de EGFR) induce hiperplasia, hiperqueratosis y el desarrollo de papilomas y de CEC en modelos murinos (Dominey *et al.*, 1993); y la expresión de EGFR es necesaria para el mantenimiento de la población de queratinocitos basales proliferativos en tumores cutáneos en modelos animales (Hansen *et al.*, 2000). En el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello se observa frecuentemente la sobreexpresión de EGFR o de sus ligandos (Derynck *et al.*, 1987; Maurizi *et al.*, 1992), lo que sugiere que esa vía se encontraría constitutivamente activada en estos tumores, y se relacionaría además con un peor pronóstico. También se ha visto sobreexpresado en la mucosa normal adyacente al tumor en pacientes con CE de cabeza y cuello (Ang *et al.*, 2002; Maurizi *et al.*, 1996; Mukaida *et al.*, 1991; Niemiec *et al.*, 2004; Ozawa *et al.*, 1989).

En el CEC, la sobreexpresión de EGFR parece participar en la adquisición de un fenotipo más agresivo, como se demuestra a partir de algunas series (Maubec *et al.*, 2005; Shimizu *et*

al., 2001). Se ha detectado pérdida de la señal de membrana de EGFR en el CEC y la acumulación citoplásmica del mismo (Groves *et al.*, 1992), lo que podría reflejar mutaciones en el gen de *EGFR*. Hasta el 43% de los CEC avanzados muestran sobreexpresión de EGFR (Fogarty *et al.*, 2007). La sobre-expresión de EGFR en el CEC puede reflejar la mutación del receptor con acumulación citoplasmática del mismo o la sobreexpresión del receptor en la membrana de la célula tumoral. Otros mecanismos que justificarían la sobreexpresión de EGFR podrían ser la existencia de proteínas cuya sobreexpresión reduciría la infrarregulación del receptor mediada por ligando, un proceso crítico en la regulación de la intensidad y la duración de la señal de receptores tirosina quinasa, y además parece que EGFR podría activarse por radiación UV (El-Abaseri *et al.*, 2005). La sobreexpresión de EGFR se ha demostrado relevante en el CEC metastásico (Maubec *et al.*, 2005); por ello el EGFR constituye una diana terapéutica prometedora en el CEC metastásico, dada su relevancia en su desarrollo y agresividad y gracias a la existencia actual de moléculas anti-EGFR (Alter *et al.*, 2014; Ganesan *et al.*, 2014; Jarkowski *et al.*, 2014).

5.2.5 P16 y progresión a carcinoma epidermoide epidermoide cutáneo de las lesiones displásicas no invasoras

La pérdida de heterocigosidad de *P16* (un gen supresor de tumores que asienta en el brazo corto del cromosoma 9 (locus 9p21)) parece implicada en la progresión desde queratosis actínica a CEC (Mortier *et al.*, 2002). De hecho, la pérdida de función de P16 se observa más frecuentemente en el CEC que en las QA (Bumworth *et al.*, 2007; Nindl *et al.*, 2007; Pacifico *et al.*, 2008). P16 es una proteína de bajo peso molecular, inhibidor de quinasas dependientes de citidina, producto del gen *TSG p16/INK4* (Serrano, 1997). Induce la fosforilización del producto del gen del retinoblastoma (pRb) que actúa como regulador negativo del ciclo celular (Serrano, 1997). *P16* es un gen supresor tumoral que se encuentra frecuentemente inactivado en tumores humanos, inducido en cáncer cutáneo (Serrano, 1997).

En la piel normal, P16 se expresa sólo en la capa granulosa (Nakamura and Nishioka, 2003). Dicha expresión de P16 protege a las células epidérmicas de la apoptosis en respuesta a la radiación UV (Chazal *et al.*, 2002). P16 puede inducirse experimentalmente en epidermis irradiada con UVB, a las 24, a las 48 y con un pico a las 72-120 horas (Ahmed *et al.*, 1999). Experimentalmente, la radiación UV aislada y/o repetida induce la expresión de P16 (Wang and Becker, 1996).

Dentro del CCNM P16 se ha demostrado su implicación en la patogenia tanto en el CEC como en el BCC. En el CEC, P16 muestra un incremento progresivo de su expresión con la transición desde queratosis actínica a CEC *in situ* e invasor (Hodges and Smoller, 2002). Los análisis mutacionales en el gen de *P16* revelan alteraciones que sugieren la impronta de la

acción de la radiación UV (Armstrong and Kricger, 2001; McGregor *et al.*, 1991; Soufir *et al.*, 1999). Por otra parte, P16 se ha relacionado con la senescencia de los queratinocitos normales y con la patogenia del carcinoma epidemoide y las lesiones premalignas de la mucosa oral (Parkinson, 2010).

5.2.6 CXCR4 está involucrado en el desarrollo de metástasis en algunas formas de cáncer y podría estar implicado en la patogenia del CEC

CXCR4 es un receptor de quimiocinas y como tal, es una proteína con siete dominios transmembrana que interaccionan con citodinas implicadas en la quimiotaxis celular, concretamente en este caso con CXCL12 (Laing and Secombes, 2004). La activación de los receptores de quimiocinas conduce a cambios en el citoesqueleto y a la migración celular dirigida hacia la fuente de quimiocinas (Takabayashi *et al.*, 2009). Las quimiocinas tienen un papel importante en la progresión de un gran número de formas de cáncer, estimulando la proliferación, invasión y metástasis; y atraen las células cancerosas hacia los ganglios linfáticos y hacia órganos como el hígado, el pulmón y la médula ósea, todos los cuales son fuentes primarias de citocinas (Balkwill, 2004; Schimanski *et al.*, 2006).

CXCR4 es el receptor específico de CXCL12 (también conocido como SDF-1 o factor derivado de estroma 1), implicado en la quimiotaxis de linfocitos hacia áreas de inflamación y de células tumorales. Se ha demostrado que la interacción CXCR4/CXCL12 tiene un papel importante en la carcinogénesis, por estar relacionada con la angiogénesis, la invasión y la migración celular en varios carcinomas. Se conoce que CXCR4 influye en el desarrollo de metástasis, regulando la migración de células tumorales que lo expresan, a tejidos que liberan CXCL12, favoreciendo las metástasis órgano-específicas (Muller *et al.*, 2001). Además, la hipoxia activa la expresión del factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1), un factor de transcripción que activa la expresión de CXCR4 en las células tumorales (Staller *et al.*, 2003).

Aunque CXCR4 suele localizarse primariamente en el citoplasma (Delilbasi *et al.*, 2004; Meng *et al.*), se ha demostrado también su expresión homogénea en citoplasma y en el núcleo de células en carcinoma epidemoide de cabeza y cuello (Wang *et al.*, 2005); y se ha postulado que la translocación de CXCR4 al núcleo regularía la expresión de genes implicados en la migración celular y la transición epitelio-mesénquima (Albert *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2005). CXCR4 se expresa en queratinocitos basales y se ha relacionado con procesos inflamatorios, incluido el proceso reparativo de la piel tras una herida. Su papel en el CEC no es bien conocido, pero se ha demostrado su importancia en otras formas de cáncer, incluido en el carcinoma epidemoide de cabeza y cuello (Albert *et al.*, 2012).

5.2.7 Célula de origen del carcinoma epidermoide cutáneo

En el bulbo del folículo piloso y en la capa basal del epitelio interfolicular las células *stem* epidérmicas tienen la capacidad de autorrenovación y de diferenciación, y se han postulado como posibles células de origen del CEC (Kamstrup *et al.*, 2007). No obstante, en un modelo de carcinogénesis química de CEC, el 7,12-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) inició la formación tumoral en la epidermis en ratones tratados con 5-fluoro-uracilo (5FU), que mata activamente células en fase activa del ciclo celular. Estos datos sugieren que los tumores derivan de una subpoblación de células insensibles a 5FU más que de las células epidérmicas proliferativas (Bailleul *et al.*, 1990). Cuando el oncogen *Hras* se expresa en células suprabasales de la epidermis de ratón, bajo el control del promotor de la queratina 10, sólo se desarrollan papilomas benignos (Bailleul *et al.*, 1990). Sin embargo, cuando dicha expresión se produce en la capa basal, bajo el promotor de la queratina 5, se desarrollan CEC en el ratón adulto (Brown *et al.*, 1998). Aún teniendo en cuenta las diferencias entre ratones y humanos, de lo anterior se deduce que son necesarias más investigaciones para determinar las características específicas de la célula a través de la cual se propaga dicho tumor.

5.2.8 P63 participa en el mantenimiento del fenotipo *stem* y en el desarrollo de los queratinocitos y tiene importancia en la patogenia del carcinoma epidermoide cutáneo

Dada la importancia de las células *stem* epidérmicas en el desarrollo del CEC, resulta interesante evaluar la potencial influencia de estos marcadores en el desarrollo del CEC. P63 es una proteína de la familia de P53, que tiene un papel fundamental en el desarrollo de los queratinocitos y en el mantenimiento del fenotipo *stem*. Parece fundamental para regular la diferenciación de las células en la piel normal, expresándose en el núcleo de la capa basal y estratos suprabasales inferiores fundamentalmente (Fuertes *et al.*, 2013a). P63 (locus 3q28) tiene una estructura similar a P53 (Petitjean *et al.*, 2006; Yang and McKeon, 2000). Mediante el uso alternativo de sus dos promotores se generan dos clases de isoformas, TAp63, que es la isoforma larga y completa, y Δ Np63 que es la isoforma corta, carente del dominio de transactivación. Las isoformas TAp63 tienen una homología elevada con P53 y son capaces de transactivar genes diana de P53 (Yang and McKeon, 2000). Por otra parte, las isoformas Δ Np63 promoverían el crecimiento celular y protegerían a las células de la apoptosis, mediante la activación de genes EGFR, JAG1 o Hsp70, y a través de su función dominante negativa al contrarrestar la actividad de la isoforma TAP63 y de P53 (Finlan and Hupp, 2007; Yang and McKeon, 2000). De esta forma, TAp63 actuaría como supresor tumoral y Δ Np63 como un oncogén (Melino, 2011).

P63 regula un elevado número de genes y juega un papel fundamental en el desarrollo epitelial, así como en la regulación del ciclo celular, la respuesta a daños en el DNA, la senescencia, la apoptosis y el desarrollo tumoral (Mills, 2006; Moll and Slade, 2004).

A pesar de la clara influencia que tiene P63 sobre el desarrollo de los queratinocitos en la piel normal, su influencia sobre el desarrollo del CEC es menos conocida. No obstante, se ha demostrado que P63 se expresa con frecuencia en el CEC indiferenciado (fusocelular) (Dotto and Glusac, 2006), que no necesariamente ha perdido las características epiteliales.

5.2.9 CD44 es otro marcador de células stem importante en el carcinoma epidermoide cutáneo

CD44 son un grupo de glicoproteínas transmembrana que se unen a ligandos como el ácido hialurónico (Aruffo *et al.*, 1990), la osteopontina (Weber *et al.*, 1997), el colágeno y la laminina (Goodison *et al.*, 1999) en la matriz extracelular (MEC), mediando la adhesión célula-matriz. Las proteínas CD44 poseen un gran dominio extracelular, una región transmembrana y una cola citoplasmática. El gen *CD44* sufre un procesamiento alternativo y las diferentes isoformas de la proteína exhiben afinidad variable por su ligando, el ácido hialurónico, pudiendo a su vez interactuar con otros ligandos (Goodison *et al.*, 1999). La sobreexpresión de ciertas isoformas de CD44 por las células tumorales se ha asociado con su capacidad para desarrollar metástasis y con un peor pronóstico (Heider *et al.*, 1993; Joensuu *et al.*, 1993; Matsumura and Tarin, 1992). Se pueden detectar formas solubles de CD44 en el suero de pacientes con cáncer y sus niveles se correlacionan con marcadores clínicos de la enfermedad (Ristamaki *et al.*, 1997). El proceso exacto a través del que las células tumorales producen más CD44 soluble no está claro, pero puede estar relacionado con la formación de isoformas no funcionantes, sin la región transmembrana, que serían por tanto segregadas por las células (Heider *et al.*, 1993).

Como molécula de adhesión, CD44 es un receptor de membrana de la metaloproteinasa 9 (MMP-9) (Desai *et al.*, 2009). La tinción inmunohistoquímica de CD44 y MMP-9 se localiza especialmente en el frente de invasión de los tumores, el lugar en que habitualmente se encuentran también las células *stem* (Sterz *et al.*, 2009). CD44 fue, de hecho, el primer marcador de células *stem* que se empleó para reconocer células *stem* en tumores sólidos (Al-Hajj *et al.*, 2003), y se ha demostrado que una subpoblación de células CD44+ presentan propiedades de células *stem* tumorales en el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (Prince *et al.*, 2007). Las células CD44+ exhibieron fuerte positividad para Bmi-1 (también marcador de células *stem*) y presentaron propiedades de autorenovación y diferenciación (Prince *et al.*, 2007). Desde entonces, varios estudios han empleado el marcador CD44 como marcador de identificación de células *stem* tumorales (Chen *et al.*; Chikamatsu *et*

al., 2010; Krishnamurthy *et al.*). Se ha considerado a CD44 como marcador predictivo de recurrencia de cáncer de laringe tras radioterapia (de Jong *et al.*, 2010). Niveles altos de expresión de CD44, de STAT3 fosforilada y de aldehído-deshidrogenasa se han encontrado en carcinoma epidermoide de cabeza y cuello de alto grado (Chen *et al.*, 2010) y también en CEC de cabeza y cuello que recurre, frente al CEC que no recurre (Joshua *et al.*, 2011). Globalmente, estos datos sugirieron una relación entre la expresión de CD44 y la agresividad de los tumores de cabeza y cuello (Zhang *et al.*, 2011). Sin embargo, también hay que tener en cuenta que algunas variantes de CD44 (CD44s y CD44v6) se expresan de manera general en la mayoría de las células de cabeza y cuello, incluyendo las de los carcinomas (Mack and Gires, 2008).

5.3 Patogenia del carcinoma epidermoide cutáneo

Se demostró experimentalmente que la activación aislada de Ras no era por sí sola suficiente para inducir el desarrollo de CEC (Ridky *et al.*, 2010). Era necesario evitar la detención del ciclo celular en G1 inducida por la activación de oncogenes como Ras, en este caso mediante diferentes mecanismos, como la activación del mediador de la progresión del ciclo celular por CDK4 o con la modulación de la actividad de NF- κ B, y así inducir la carcinogénesis en los queratinocitos (Dajee *et al.*, 2003). NF- κ B es importante en la inhibición del crecimiento de los queratinocitos, así el bloqueo de esta vía indujo el desarrollo de CEC en modelos experimentales de ratón (van Hogerlinden *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2005). La hiperproliferación de queratinocitos secundaria al bloqueo de NF- κ B se asoció además a un incremento en los niveles de CDK4 (Zhang *et al.*, 2005). Los tumores desarrollados en estas condiciones fueron similares a los CEC humanos, en los que se demostró una disminución en la expresión de E-CADHERINA y una inducción de factores angiogénicos y de invasión celular (Dajee *et al.*, 2003; Khavari, 2006; Lazarov *et al.*, 2002).

La familia de quinasas SRC, incluyendo FYN, son reguladoras de proliferación, invasión y metástasis, y han demostrado tener un papel importante en el desarrollo del CEC. SRCASM (*SRC-Activating and Signaling Molecule*) es un sustrato y regulador negativo de la familia de quinasas SRC que limita la proliferación de queratinocitos, promueve la diferenciación y regula negativamente EGFR en queratinocitos humanos (Li *et al.*, 2007; Seykora *et al.*, 2002). Se ha demostrado mediante inmunohistoquímica que los niveles de SRCASM se encuentran reducidos en QA y CEC, en comparación con la piel normal adyacente (Boukamp, 2005; Li *et al.*, 2005).

La participación de FYN en la promoción de la carcinogénesis cutánea se confirmó a partir del fenotipo del ratón que sobreexpresa una forma activada de la misma en el estrato basal de la piel, bajo el promotor de la citoqueratina 14 (K14-FynY528F), que desarrolla espontáneamente lesiones similares a las QA y al CEC entre la quinta y octava semana de edad

(Zhao *et al.*, 2009). El análisis de estas lesiones reveló la activación de tres vías de señalización de proto-oncogenes: PDK-1/AKT/mTOR, MEK/ERK y STAT3. La activación de estas vías, junto con la infrarregulación de P53 y NOTCH-1 mediada por FYN, produciría una fuerte señal oncogénica capaz de inducir la formación del CEC incluso en ratones con fondo genético resistente al cáncer (Zhao *et al.*, 2009).

Trabajos recientes han demostrado que la protein kinasa C (PKC) se encuentra infrarregulada en CEC en humanos en comparación con la epidermis normal, lo que sugiere que los niveles reducidos de PKC serían importantes en el desarrollo de neoplasias inducidas por radiación UVB, dado que ésta se altera en respuesta a la radiación UV (Yadav *et al.*, 2010). La regulación de PKC por las vías activadas de Fyn y de EGFR pone de manifiesto la interacción entre estas diferentes vías que conducen al desarrollo del CEC (Denning *et al.*, 1998; Joseloff *et al.*, 2002).

La vía de señalización inducida por NOTCH se ha implicado tanto en el desarrollo de la piel normal como en la patogenia del CEC (Dotto, 2008). NOTCH regula muchos procesos celulares importantes, incluyendo el mantenimiento del fenotipo *stem*, la diferenciación, la proliferación y la apoptosis (Okuyama *et al.*, 2008). Existen cuatro proteínas NOTCH en mamíferos, de las cuales, NOTCH-1 se expresa en todas las capas de la epidermis y NOTCH-2 en su capa basal. NOTCH promueve la diferenciación de los queratinocitos por diversos mecanismos, incluyendo la inducción del inhibidor del ciclo celular P21 y se ha demostrado que reduce la proliferación e incrementa la diferenciación de queratinocitos embrionarios a partir de la activación de PKC (Okuyama *et al.*, 2004). En un panel de CEC humanos, la expresión de NOTCH-1 se observó reducida en relación con la piel normal (Lefort *et al.*, 2007). NOTCH-1 es una diana transcripcional directa de P53 en los queratinocitos humanos (Lefort *et al.*, 2007) y teniendo en cuenta la frecuencia de mutaciones en P53 como un evento precoz en la patogenia del CEC, la regulación negativa de NOTCH-1 podría ser una consecuencia de la alteración de P53 en estas lesiones. NOTCH-1 se encuentra también regulado negativamente por EGFR y FYN, a través de la inhibición de la transcripción de P53, en un mecanismo que también implicaría la activación de C-JUN (Kolev *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2009). Por lo tanto, las consecuencias oncogénicas de la activación de EGFR incluyen la infrarregulación de P53 y NOTCH-1. Actuando como un supresor tumoral en queratinocitos, NOTCH-1 se ha demostrado que reprime las vías de señalización pro-tumorales de WNT y Sonic hedgehog (SHH) (Nicolas *et al.*, 2003; Okuyama *et al.*, 2008). La pérdida de la señalización de NOTCH-1 en queratinocitos humanos y en la piel del ratón daría también lugar a una activación aberrante de beta-catenina, un efector de la vía de WNT, mientras que la expresión de NOTCH-1 en queratinocitos reprimiría la expresión de beta-catenina (Nicolas *et al.*, 2003). La expresión de NOTCH-1 en la epidermis evita la inducción de lesiones tipo CEC y carcinoma basocelular (CBC) en modelos murinos (Nicolas *et al.*, 2003). La deficiencia en la vía de NOTCH-1, a través de las diversas interacciones que establece con otras vías de señalización, entre ellas la de P53 y EGFR, incrementaría el riesgo de desarrollar CEC (Ratushny *et al.*, 2012).

STAT3 pertenece a la familia de factores de transcripción que se encuentran activados a través de vías de tirosina quinasas (entre ellas el EGFR). STAT3 modula una gran variedad de genes implicados en apoptosis, angiogénesis y regulación del ciclo celular, y se ha demostrado en un modelo murino su papel en el desarrollo del CEC (Kim *et al.*, 2009a).

5.3.1 La transición epitelio-mesénquima

La transición epitelio mesénquima (TEM) es un intrincado proceso a través del cual las células epiteliales pierden sus características fenotípicas para adquirir unas características más mesenquimales que favorezcan el proceso invasivo. La TEM es importante en el desarrollo tumoral y del CEC. Se ha demostrado un papel de la vía de señalización TGF-beta en la TEM del carcinoma epidermoide, tanto su hiperactivación, como la desregulación de la misma. Por ejemplo, ratones deficientes en SMAD2 exhibían una mayor propensión al desarrollo de CEC (Hoot *et al.*, 2008). Se demostró además que la pérdida de la expresión de SMAD2 en carcinomas epidermoides humanos se asoció a una reducción en la expresión de E-CADHERINA, niveles más altos de SNAI1 y grado pobre de diferenciación (Hoot *et al.*, 2008). SNAI1 induce TEM por sí mismo, con un incremento en la expresión de VIMENTINA (Nakamura *et al.*, 2010).

Las cadherinas son proteínas transmembrana de cadena única que consisten en un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular, que participan en la adhesión intercelular mediada por calcio (Gheldof and Berx, 2013; Saito *et al.*, 2012). Tienen un papel fundamental en el mantenimiento de la adhesión intercelular en tejidos epiteliales. Los queratinocitos, expresan dos tipos de cadherinas, la P-CADHERINA y la E-CADHERINA (Gheldof and Berx, 2013; Saito *et al.*, 2012). P-CADHERINA se expresan predominantemente en la capa basal del epitelio, mientras que E-CADHERINA lo hace en todas las capas celulares vivas y parece que funcionalmente es la más importante (Sivasankar, 2013). Las propiedades de adhesión de las cadherinas dependen de la asociación con un grupo de proteínas reguladoras citoplasmáticas que se unen al citoesqueleto, las mejor caracterizadas son las ALFA y BETA CATENINAS y las PLACOGLOBINAS (Sivasankar, 2013). La expresión de cadherinas se ha examinado en varios tipos tumorales incluyendo cáncer de mama (Paredes *et al.*, 2012), de colon (Buda and Pignatelli, 2004), de vesícula (Bryan and Tselepis, 2010), de páncreas (Natalwala *et al.*, 2008), de próstata (Giroldi *et al.*, 2000), de hígado (Natalwala *et al.*, 2008) y en carcinomas epidermoides de cavidad oral (Vered *et al.*, 2011a). Al igual que sucede con otras moléculas de adhesión, como las integrinas, la expresión de E-CADHERINA en los tumores es variable. La pérdida de la expresión de E-CADHERINA se observa frecuentemente en carcinomas y se asocia con la presencia de metástasis en el momento del diagnóstico (Zheng *et al.*, 1999). En el carcinoma epidermoide de mucosa oral, la reducción en la expresión de E-CADHERINA se asocia con una menor diferenciación y una mayor capacidad de invasión (Lopes *et al.*, 2009; Mahomed *et al.*, 2007; Tanaka *et al.*, 2003). Existe también una tendencia a

la reducción en la expresión de E-CADHERINA en tumores más pobremente diferenciados (Gould and Gould, 1999; Karatzas *et al.*, 1999). La pérdida de adhesión resultante de la reducida expresión de cadherinas se considera que puede ser un factor de invasión y de metástasis importante (Bremnes *et al.*, 2002; Kinsella *et al.*, 1993; Oka *et al.*, 1993; Salon *et al.*, 2004). No obstante, algunos tumores mantienen la expresión de cadherinas, aunque exhiben una alteración funcional de las mismas, debida a alteraciones con los complejos que forman con la catenina o a mutaciones en las propias cadherinas. (Bracke *et al.*, 1996; De Matos *et al.*, 2007; Mareel *et al.*, 1997; Noe *et al.*, 1999; Ramis-Conde *et al.*, 2008; Syed *et al.*, 2008; Tanaka *et al.*, 2002).

La VIMENTINA está presente prácticamente en todas las células embrionarias y en la mayoría de células adultas, sea cual sea su estirpe, en cultivos celulares. Durante la embriogénesis, este filamento es reemplazado progresivamente por filamentos intermedios específicos para cada línea celular, pero se mantiene en las células mesenquimales. En la piel normal este marcador se expresa en los melanocitos, así como en los fibroblastos, dendrocitos, vasos sanguíneos y linfáticos, músculo liso de la dermis y en los adipocitos de la hipodermis. En oncología la expresión de VIMENTINA se ha demostrado en sarcomas, melanomas, carcinomas fusocelulares, en algunos no fusocelulares (Fuertes *et al.*, 2013a) y en la mayoría de mesoteliomas y gliomas. En dermatopatología resulta útil para demostrar diferenciación mesenquimal o para apoyar el diagnóstico de diferenciación melanocítica en melanomas amelanóticos pobremente diferenciados (Fuertes *et al.*, 2013a). Esta expresión tan ubicua de la VIMENTINA ha determinado que cada vez tenga menos valor diagnóstico por su escasa especificidad.

Se ha postulado la relevancia de la VIMENTINA en el desarrollo de la transición epitelio-mesénquima en algunos casos de carcinoma epidermoide fusocelular (Nakamura *et al.*, 2010); así, modelos animales sugieren que, dentro del espectro de los carcinomas epidermoides, aquel que tiende a un fenotipo más fusocelular pierde la expresión de E-CADHERINA, adquiriendo la de VIMENTINA (Cheng *et al.*, 2012; Nijkamp *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013b). Además, se ha visto que los CECs que expresan VIMENTINA, pierden las queratinas y expresan el factor SNAI1, lo que apoya su relación con la transición epitelio-mesénquima (Nakamura *et al.*, 2010). Los marcadores de transición epitelio-mesénquima se asocian a un mayor riesgo de metástasis ganglionares en el CEC; los marcadores de dicho fenómeno parecen atenuarse en el ganglio linfático invadido (Toll *et al.*, 2013a).

5.3.2 La activación de la vía AKT

Recientemente, se ha demostrado que en el CEC, a la vez que se produce el desarrollo de la transición epitelio-mesénquima, tiene lugar la activación de la vía de AKT (Barrette *et al.*,

2014). AKT promueve la transición epitelio-mesénquima en líneas celulares de carcinomas epidermoides de mucosa y la supresión de AKT inhibe dicha transición (Barrette *et al.*, 2014).

5.4 Síntesis del desarrollo del carcinoma epidermoide cutáneo según la teoría multistage

En el desarrollo del CEC se definen tres fases: iniciación, promoción y progresión. En la piel, el modo más frecuente de iniciación es a través de la radiación UV, sobre todo por la radiación UVB (Streilein *et al.*, 1994). Este proceso da lugar a una mutación genética irreversible. Dicha alteración persiste y es transmitida a la descendencia de la célula iniciada. Una célula iniciada puede ser microscópicamente indistinguible de otras células sanas de su entorno; la iniciación es tan común, que probablemente se produzca varias veces al día en un individuo. En general, parece que las alteraciones en P53 constituyen el fenómeno iniciador más frecuente en el proceso de carcinogénesis del CEC.

La promoción del cáncer es el paso intermedio entre la iniciación y la progresión y puede considerarse como la fase de crecimiento y expansión de una célula iniciada. La probabilidad de que ocurra una segunda mutación aumenta proporcionalmente con el número de células que se dividen. Aunque la promoción de la célula iniciada aumenta la probabilidad de progresión de una lesión maligna, no es fundamental; de hecho, este paso se elude en algunos casos. Un ejemplo dínico de esta fase del proceso de carcinogénesis en el CEC puede ser la queratosis actínica. La radiación UVA es un eficiente factor promotor que puede ser responsable del desarrollo de queratosis actínicas en ciertos pacientes. En este momento del proceso, a las alteraciones en p53 se unirían otras alteraciones genéticas precoces en el desarrollo del CEC, como la alteración de la vía de las MAPK o la pérdida de heterocigosidad en genes supresores de tumores como p16. Teniendo en cuenta la baja incidencia con la que las queratosis actínicas se transforman en un CEC, el siguiente paso en el proceso de carcinogénesis en este contexto, debe de ser un acontecimiento relativamente poco frecuente.

En la fase de progresión, los cambios de la célula se hacen morfológicamente evidentes. Una consecuencia de la progresión es la inestabilidad genética. Por medio de un proceso de selección se producen células más resistentes y agresivas, lo que supone un potencial maligno heterogéneo del tumor. Esto, además, da lugar a un incremento en su crecimiento, capacidad de invasión y anaplasia tumorales, así como a la capacidad del tumor de adaptarse a factores exógenos tales como la quimioterapia o la radioterapia.

A las alteraciones precoces que hemos reconocido anteriormente se sumarían otras alteraciones más tardías en el proceso de carcinogénesis del CEC como alteraciones en

proteínas de adhesión (E-CADHERINA) o en receptores de tirosina quinasa (EGFR). Posteriormente, se sumarían otras alteraciones en algunas células que conferirían una mayor capacidad para metastatizar, como CXCR4. A todo lo anterior se une un progresivo incremento de la inestabilidad genómica y alteraciones genómicas, alguna de las cuales podrán dar lugar a una ventaja evolutiva en el proceso de desarrollo del cáncer (Ratushny *et al.*, 2012).

6 MODELOS EXPERIMENTALES DE DESARROLLO DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE CUTÁNEO

6.1 Modelos animales: El ratón

Aunque se ha escrito mucho acerca de las discrepancias entre la carcinogénesis en ratón y humano, hay una gran similitud genética y biológica entre los procesos de desarrollo tumoral en sistemas humanos y murinos. A pesar de que los ratones son animales pequeños con una alta actividad metabólica y una supervivencia corta, desarrollan tumores en los mismos tejidos y, en la mayoría de los casos, con un curso histopatológico similar a aquel observado en humanos. Los avances en el conocimiento de la genética y de los procesos celulares asociados al desarrollo del cáncer, así como los progresos metodológicos en la manipulación animal, han conducido al desarrollo de modelos animales más específicos. Una de las mayores ventajas de los modelos de ratón para el estudio de la génesis del cáncer es que los agentes utilizados, las modificaciones genéticas y las presiones selectivas empleadas pueden ser manipulados.

El desarrollo del CEC en la piel del ratón, después de la aplicación secuencial de carcinógenos químicos, ha dado información importante sobre el desarrollo del cáncer en múltiples fases. En este modelo, la evolución fenotípica desde un queratinocito normal a un carcinoma epidermoide se asocia con cambios genéticos y epigenéticos reproducibles, que caracterizan cada fase del proceso. Los eventos más tempranos, la iniciación y la promoción, requieren la exposición a carcinógenos químicos. La iniciación es de naturaleza mutagénica y, en general, se debe al daño del DNA debido los agentes inductores del proceso. Los promotores inducen cambios en la homeostasis epidérmica que facilitan un ambiente en el tejido propicio para la expansión clonal de las células iniciadas. La consecuencia de la iniciación y la promoción es la formación de múltiples papilomas, cada uno de los cuales representa un clon distinto de células iniciadas. Los papilomas exhiben algunas alteraciones que los distinguen de los queratinocitos normales (la hiperplasia, la expresión alterada de marcadores queratinocíticos y el bloqueo o retraso de la diferenciación de las células epiteliales epidérmicas). Los papilomas pueden progresar a lesiones tumorales malignas en los modelos de ratón aunque lo hagan con una frecuencia baja (la mayoría de los papilomas no darán lugar a carcinomas durante el tiempo normal de vida del animal). De hecho, la progresión es la fase de la carcinogénesis que más depende del tiempo. Se han descrito cambios significativos en los papilomas, desde el punto de vista genético, es importante la inestabilidad genómica de las células en la fase de promoción de la carcinogénesis. La progresión o malignización se asocia con mutaciones en la p53 y la regulación positiva de la familia de factores de transcripción AP-

1. A raíz del desarrollo de nuevos modelos experimentales para cada una de las fases del carcinoma epidermoide de piel, los mecanismos genéticos y bioquímicos que subyacen en estos tumores comienzan a comprenderse.

Los regimenes químicos más comunes consisten en una inducción en dos pasos que incluyen la administración de una dosis de 7,12-dimetilbenza-antraceno (DMDA), seguida de la aplicación semanal de 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) durante unas 20 semanas. Este tratamiento da lugar al desarrollo de múltiples papilomas, la mayoría de los cuales muestran la misma mutación activadora en el proto-oncogen H-Ras (Bizub *et al.*, 1988; Quintanilla *et al.*, 1986), algunos de los cuales evolucionan a carcinomas espinocelulares 20-40 semanas después de la primera exposición al carcinógeno. En los carcinomas escamosos humanos el propio *H-Ras* puede encontrarse mutado, pero en una frecuencia que, aunque variable, no es tan alta como en estos modelos (Leon *et al.*, 1988). Posiblemente, estas diferencias se deban a la diferencia de carcinógenos entre ratones y humanos a los que las células escamosas están expuestas (Brown *et al.*, 1990).

6.2 Líneas celulares

Se han desarrollado varias líneas celulares en el laboratorio del Dr. Allan Balmain (UCSF, San Francisco), que representan distintas fases morfológicas del desarrollo del CEC. Estas líneas celulares son C50, C5N, NK, MSCP1, P1, PDV, PDVC57, B9, E4, A5, D3, H11, CarB y CarC, entre otras (Figura 2). C50, C5N, NK, MSCP1, P1, PDV, PDVC57, E4y B9 tienen un fenotipo típicamente epitelial (Burns *et al.*, 1991; Diaz-Guerra *et al.*, 1992), sin embargo, A5, D3, H11, CarB y CarC, exhiben una morfología fibroblástica. B9 da lugar a tumores bien diferenciados en el ratón desnudo, mientras A5, D3, H11, CarB y CarC, exhiben un crecimiento metastásico agresivo (Burns *et al.*, 1991). C5N, P1, P6 y B9, y el resto de células escamosas tienen un patrón típico de queratinas y E-CADHERINA, mientras que A5 y el resto del grupo de células fusiformes presenta un citoesqueleto alterado con ausencia de expresión de E-CADHERINA (Stoler *et al.*, 1993), no expresan queratinas, pero sí VIMENTINA (Stoler *et al.*, 1993). Comparadas con las células escamosas muestran una morfología más heterogénea, caracterizada por el aumento en el número de células gigantes. Al inyectarlas en ratones dan lugar a la aparición de tumores cutáneos con gran facilidad (Quintanilla *et al.*, 1986). Las PDVC57 son células más invasivas y segregan más colagenasa IV que la PDV, y también son quimiotácticas. En este sentido, parece haberse comprobado, al menos *in vitro*, una transición epitelio-mesénquima en las células tumorales de los distintos estadios dentro del CEC. En principio, esta transición en las características de las células tumorales según los diferentes estadios del CEC se debe, como hemos visto, a alteraciones genéticas que sucesivamente se van produciendo y que modifican el comportamiento celular haciéndolo más agresivo.

Hasta hace pocos años en biología molecular se defendía que las alteraciones del proteoma se debían a modificaciones genéticas en el DNA, y el mRNA actuaba como mensajero entre el núcleo y la maquinaria de síntesis de la célula. Sin embargo, en los últimos años se ha visto que la regulación de la expresión génica tiene una mayor complejidad y en parte se encuentra controlada por moléculas de RNA no codificantes, los microRNAs.

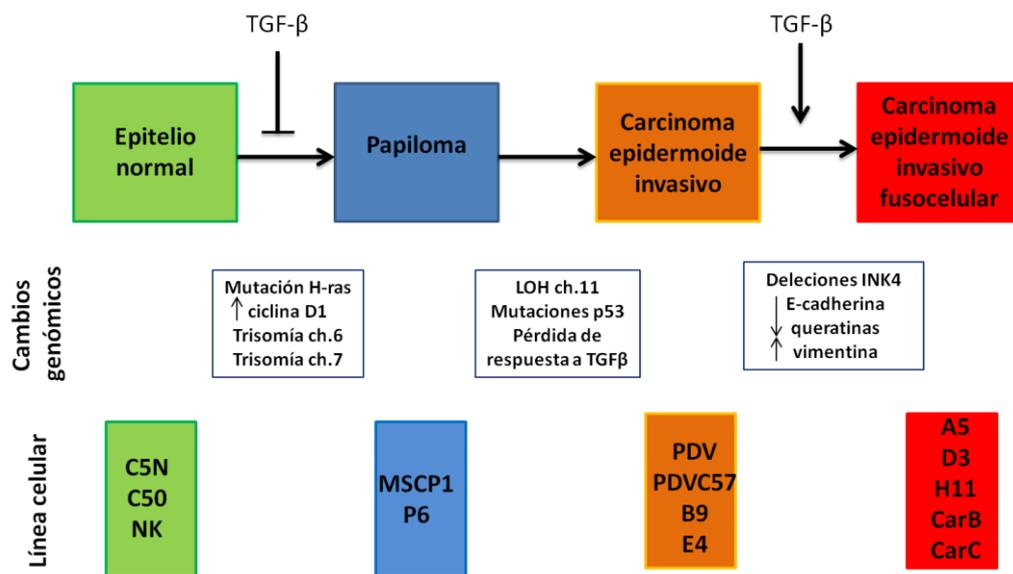


Figura 2: Esquema de las características del panel de líneas celulares del modelo DMBA-TPA de CEC.

7 MIRNAS

Los microRNAs o miRNAs son pequeñas secuencias endógenas de RNA no codificante, de entre 17 y 25 nucleótidos, que regulan post-transcripcionalmente la expresión de mRNA de un elevado número de genes (Iorio and Croce, 2012). Los microRNAs se unen a secuencias complementarias no codificantes localizadas en la región 3'UTR de los mRNAs provocando, generalmente, la disminución o la anulación de la expresión del mRNA (Bartel, 2009; Lee and Dutta, 2009). La mayor parte de los genes que codifican los miRNAs se encuentran en las regiones intrónicas, intergénicas o en orientación antisentido, dentro de las secuencias exónicas de algunos genes (Bartel, 2004). Sin embargo, otros miRNAs se encuentran organizados en clusters (Kim *et al.*, 2009b).

7.1 Síntesis de miRNAs

La síntesis de los microRNAs (Figura 3) comienza con la transcripción de sus genes, habitualmente por la RNA polimerasa II/III y la generación de transcritos primarios, los pri-miRNAs, en el núcleo de la célula. Los pri-miRNAs son transcritos largos con una estructura cerrada, que suelen estar protegidos por una caperuza en el extremo 5' y por una cola poli-A en el extremo 3', y en los que se desarrolla un bucle por correspondencia imperfecta entre pares de bases. Los pri-miRNAs son procesados por el complejo DROSHA/DGCR8 a pre-miRNAs, de aproximadamente 70 nucleótidos. Estos se exportan al citoplasma donde el complejo DICER/TRBP los convierte en dúplex de miRNA de unos 20 nucleótidos formados por la hebra de miRNA madura y la hebra no complementaria, que es degradada (Winter *et al.*, 2009). Dicho dúplex se une a una proteína, ARGONAUTA 2, que forma parte del *RNA-induced silencing complex* o RISC en un lugar específico del 3'UTR de un mRNA diana. Si la correspondencia entre miRNA y mRNA es perfecta, se desarrolla una acción endonucleasa de ARGONAUTA 2 y el mRNA es destruido. La complementariedad imperfecta da lugar un mRNA inestable (Filipowicz *et al.*, 2008).

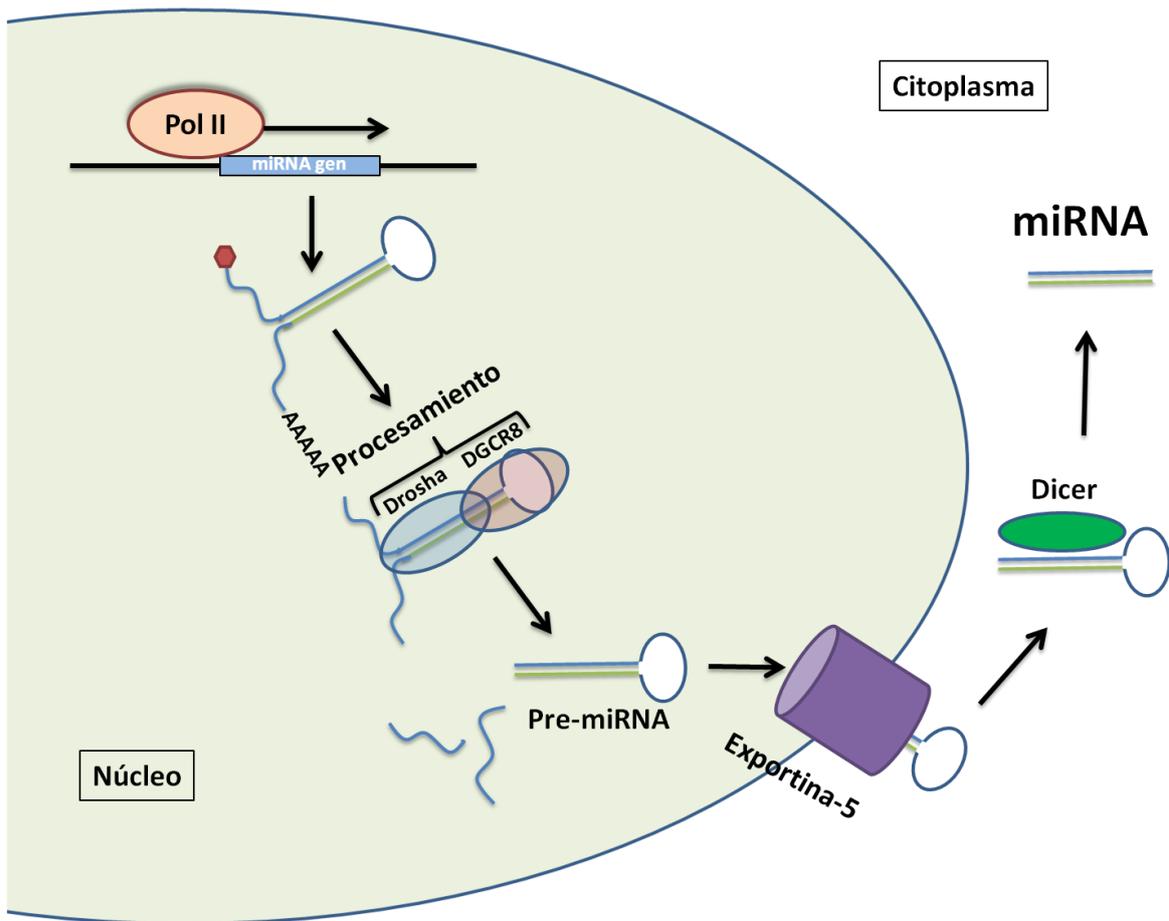


Figura 3: Esquema de la biogénesis de los microRNAs.

7.2 Mecanismo de acción de los miRNAs

Los micro-RNAs actúan como reguladores de la expresión génica por un mecanismo de represión de la traducción o degradación de mRNA, a través de la unión a sitios específicos de la molécula del mismo, ubicados en la región 3'-UTR de los transcritos de transcripción proteica. El grado de complementariedad de la secuencia determina si el mRNA diana es degradado o si su traducción a proteínas es reprimida. Según esto, secuencias completamente complementarias dan lugar a una degradación, mientras que una complementariedad menos estricta da lugar a una represión de la traducción. En algunos estudios, se ha demostrado incluso el papel regulador de la expresión génica de los miRNAs a través de su unión directa al DNA, lo que complica aún más el panorama (Iorio and Croce, 2012).

Cada miRNA tiene un gran número de genes dianas potenciales (Iorio and Croce, 2012). De hecho, en torno al 60% de los miRNAs comparten una o más secuencias que se han conservado en el proceso evolutivo y que pueden potencialmente interaccionar con mRNAs (Iorio and Croce, 2012). Estudios bioinformáticos predicen que la región 3'UTR de un mRNA

puede ser diana de varios microRNAs (Lewis *et al.*, 2005), lo que hace pensar que los miRNAs pueden cooperar entre sí en la regulación de la expresión génica.

7.3 MiRNAs y cáncer

La primera evidencia de las implicaciones de los miRNAs en cáncer en humanos procede de estudios en leucemia linfática crónica, particularmente en un intento para identificar supresores tumorales en el brazo largo del cromosoma 13 (13q14), frecuentemente delecionado en esta enfermedad. Se demostró que esta región contenía dos microRNAs, miR15a y miR16-1 (Calin *et al.*, 2002). Ese trabajo proporcionó la primera evidencia de que los miRNAs podrían estar implicados en la patogenia del cáncer en humanos.

Posteriormente, se han ido demostrando las implicaciones de los miRNAs en otras formas de cáncer (Calin *et al.*, 2004). De hecho, según los estudios hasta ahora desarrollados, las alteraciones en los microRNAs parecen la regla en el cáncer. Estudios de genoma completo muestran que los patrones de expresión de microRNAs permiten la discriminación de diferentes tipos de cáncer de una manera adecuada (Lu *et al.*, 2005; Volinia *et al.*, 2006). Por el contrario, los niveles de mRNA mostraron ser indicadores peores del tejido de origen y tipo de cáncer. Así, las alteraciones de la expresión de miRNAs mostraron ser mejores a la hora de determinar el origen del cáncer cuando éste se diseminaba a múltiples localizaciones, lo que sugiere que los tumores mantienen un patrón específico de expresión de miRNAs (Rosenfeld *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta que el cáncer de origen desconocido se corresponde aproximadamente con el 4% de todos los tumores (Oien and Evans, 2008), el desarrollo continuo miRNAs específicos puede tener gran importancia desde el punto de vista clínico.

Otra cuestión importante en clínica es la necesidad de encontrar biomarcadores precoces en cáncer, fundamental si tenemos en cuenta que el pronóstico y la supervivencia de los pacientes dependen del estadio del tumor en el momento del diagnóstico, estando el diagnóstico precoz habitualmente relacionado con una mayor supervivencia. Los miRNAs han revelado ser candidatos interesantes como nuevos biomarcadores potenciales en el diagnóstico del cáncer. Así, la sobre-expresión del miR-205 y del miR-21 en adenocarcinoma ductal mamario parece preceder a los cambios fenotípicos en el ducto, lo que sugiere la posibilidad de emplearlos para una detección precoz de esta neoplasia (du Rieu *et al.*, 2010).

Además los miRNAs son más estables debido a su pequeño tamaño en comparación con los largos mRNAs, permitiendo la valoración de sus niveles de expresión en tejidos en parafina, lo que puede suponer su uso como nuevos biomarcadores. Ciertamente, los miRNAs pueden ser extraídos de manera eficaz de tejidos congelados, de tejidos en parafina, de muestras de sangre (Mitchell *et al.*, 2008; Schwarzenbach *et al.*) y de distintos fluidos corporales, incluyendo orina (Hanke *et al.*), saliva (Park *et al.*, 2009) y esputo (Roa *et al.*; Xing

et al.; Yu *et al.*, 2011). Además, los niveles de miRNAs circulantes de individuos afectados por diferentes neoplasias parece reflejar el patrón observado en los tejidos tumorales, lo que confiere a los miRNAs un valor añadido en el diagnóstico del cáncer (Lawrie *et al.*, 2007). Más recientemente, el análisis de plasma de pacientes con cáncer de pulmón recogidos entre 1 y 2 años antes del diagnóstico, ha demostrado un patrón de expresión de miRNAs con alto valor predictivo del diagnóstico y pronóstico (Boeri *et al.*, 2011). En definitiva, los miRNAs representan moléculas interesantes en el diagnóstico y pronóstico del cáncer, e incluso abren futuras perspectivas terapéuticas (Croce, 2012; Cho, 2009; Lee and Dutta, 2009; Ng *et al.*, 2009; Sandhu and Garzon, 2011; Schoof *et al.*, 2012).

Los niveles de expresión génica ya han demostrado su eficacia en la clasificación de distintas formas de cáncer, sin embargo, los niveles de expresión de miRNAs son igualmente discriminatorios y pueden ser incluso más informativos ya que los cambios en su expresión pueden arrojar luz sobre las alteraciones genéticas que se producen en varios tipos de cáncer. Así se han establecido relaciones entre la disregulación de ciertos miRNAs y los genes diana a los que estos afectan, desentrañando así algunas redes genéticas implicadas (O'Day and Lal, 2010). Los miRNAs son, por ejemplo, expresados diferencialmente entre los tipos basal y luminal del cáncer de mama (Blenkiron *et al.*, 2007; Sempere *et al.*, 2007) y, específicamente, determinan el estado de los receptores de estrógenos, de progesterona y de HER2/NEU (Iorio *et al.*, 2005; Lowery *et al.*, 2009; Mattie *et al.*, 2006). Algunos de los miRNAs asociados a los subtipos luminal y basal de cáncer de mama reflejan su origen epitelial y mioepitelial, respectivamente. Por ejemplo, la familia *miR-200* se asocia al tipo luminal (Gregory *et al.*, 2008), mientras que el *miR-145* se expresa, de manera preferente, en células mioepiteliales (Sempere *et al.*, 2007). Otros ejemplos que relacionan ciertos subtipos de cáncer con el patrón de expresión de miRNAs se encuentran en el cáncer de ovario (Iorio *et al.*, 2007) y de pulmón (Lebanony *et al.*, 2009), en el que la expresión del *miR-205* es capaz de discriminar correctamente entre carcinoma epidermoide y no epidermoide.

Además del patrón de expresión observado en base a estudios de microarrays, se han desarrollado muchos otros métodos útiles en la detección de miRNAs, como la PCR cuantitativa a tiempo real (RT-QPCR) (Chen *et al.*, 2005a; Raymond *et al.*, 2005), la hibridación *in situ* (Nuovo *et al.*, 2009; Obernosterer *et al.*, 2007; Pena *et al.*, 2009) y otros sistemas de secuenciación de alto rendimiento (Schulte *et al.*, 2010). La PCR cuantitativa en tiempo real es muy sensible y adecuada aunque es un método caro y de bajo rendimiento. La hibridación *in situ*, basada en la detección de miRNAs específicos a partir de la hibridación de una secuencia complementaria a la de interés, es altamente sensible y permite el análisis de células individuales o incluso análisis a un nivel subcelular. Sin embargo, representa un método técnicamente complejo, de bajo rendimiento y semicuantitativo. Otros métodos de alto rendimiento en base a los sistemas de secuenciación de nueva generación han ido permitiendo más recientemente ir conociendo nuevos miRNAs implicados en cáncer. Las evidencias experimentales recogidas hasta la fecha en miRNAs y cáncer son estimulantes y prometedoras,

por ello, parece interesante estudiar el patrón de expresión de miRNAs en el CEC, así como sus relaciones con otros genes relacionados con el desarrollo de este tumor, no sólo por su importancia en dermatología, sino también porque este tumor sirve también como modelo de estudio de carcinomas epidermoides en otros tejidos.

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

1 HIPÓTESIS DE TRABAJO

El CEC es el segundo cáncer más frecuente en humanos. Aunque la mayoría de los casos de CEC exhibe un pronóstico favorable, puede ser localmente agresivo y metastatizar. Además, debido a su elevada incidencia, el CEC presenta costes socio-sanitarios muy altos. Por este motivo, es importante identificar aquellas subpoblaciones de pacientes con CEC que con una mayor probabilidad puedan complicarse con eventos de mala evolución clínica durante el seguimiento.

En este estudio hemos intentado definir el pronóstico del CEC, en el que se encontrarían las complicaciones de la enfermedad –induidas la recidiva local, el desarrollo de metástasis ganglionares, la progresión del estadio de la enfermedad durante el seguimiento o la muerte por CEC- a partir del análisis de factores clínico-patológicos y moleculares. Para ello, hemos considerado 3 niveles diferentes de análisis que, de una forma simplificada, quedan representados en las figuras 4 y 5. En un primer nivel de análisis están las características clínico-epidemiológicas de los pacientes (sexo, edad, antecedentes personales, inmunodepresión, etc) y las histopatológicas (tamaño del tumor, grosor, desmoplasia, infiltración perineural y linfovascular, grado de diferenciación, patrón de crecimiento, etc); lo hemos denominado para simplificar como **nivel clínico-patológico (nivel 1)**. Por otro lado, hemos definido un nivel de expresión de distintos marcadores proteicos en el CEC, elegidos por su interés en la literatura; lo hemos denominado **nivel de marcadores proteicos (nivel 2)**. Y por último, hemos evaluado la expresión diferencial de los miRNAs en distintas fases de la progresión del CEC, para elegir candidatos con importancia en la homeóstasis cutánea, y posteriormente comprobar su utilidad como biomarcadores de la enfermedad; lo hemos denominado **nivel de miRNAs (nivel 3)**. La relación entre los niveles de estudio no es lineal, como queda representado en la Figura 4.

Hemos pretendido mejorar nuestro entendimiento del pronóstico de la enfermedad en tres aspectos globales: **(i)** predecir la aparición de eventos de mala evolución clínica durante el seguimiento de la enfermedad, tanto específicos (como la recidiva local, la metástasis, la muerte por CEC), como de forma general evaluando la posibilidad de que ocurra cualquier evento de mala evolución clínica. Dentro de este aspecto, también hemos estudiado en nuestra población de forma retrospectiva, qué sistema de estadiaje de los utilizados en la actualidad definió mejor el pronóstico de la enfermedad (**objetivos 1, 2 y 3**). **(ii)** Definir clústeres de pacientes con CEC de diferente pronóstico, en función de las asociaciones encontradas a esos múltiples niveles, y que permitan agrupar los pacientes en grupos con un pronóstico determinado (**objetivo-4**); y **(iii)** determinar, si los diferentes niveles de

asociaciones estudiados, se relacionan de forma distinta con diferentes entidades histopatológicas de la enfermedad, con el fin de especificar si se trata de entidades clínicas diferentes dentro del CEC. En concreto, hemos estudiado si esos niveles de interacciones son distintos en el CEC clásico *versus* el CEC bowenoide/enfermedad de Bowen (**objetivo-5**). Para definir lo mejor posible el pronóstico de la enfermedad, hemos sesgado en parte la elección de casos en la cohorte de estudio, e inducido de forma retrospectiva casos de mal pronóstico conocido para así poder precisar mejor los factores de esos diferentes niveles asociados a eventos de mala evolución clínica de la enfermedad.

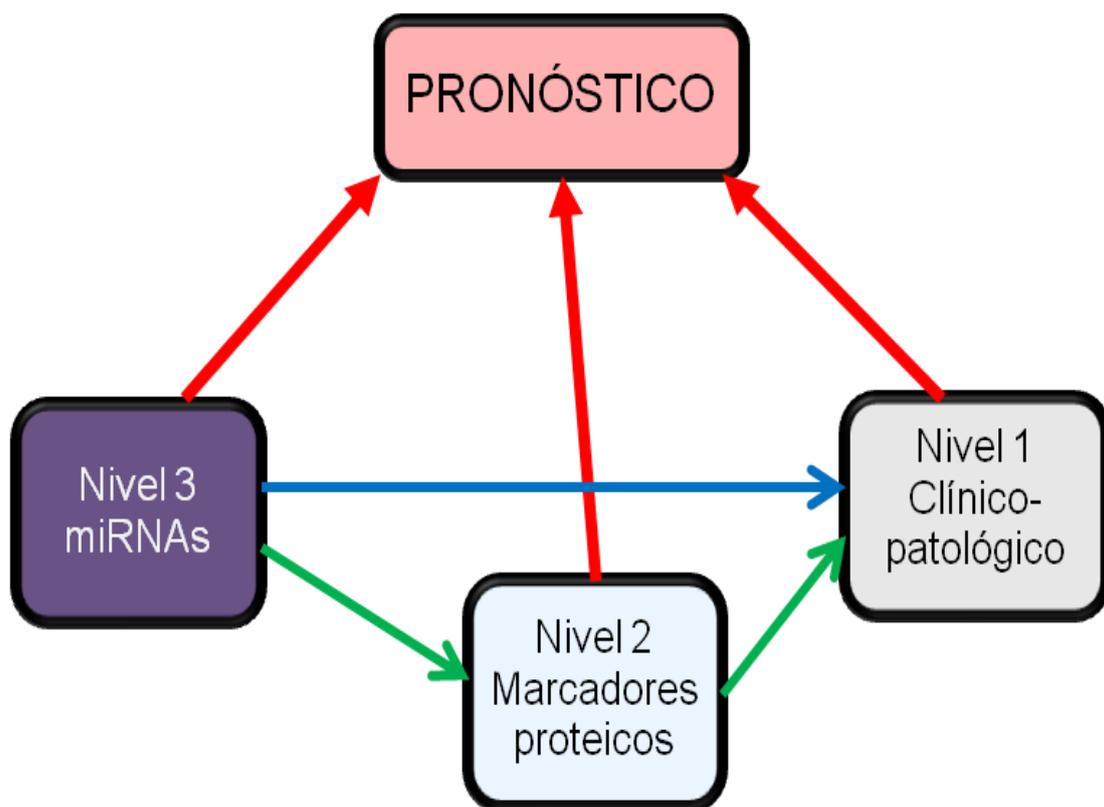


Figura 4: La relación entre los niveles definidos no es lineal, sino que hay múltiples asociaciones *intra-nivel* (no representadas) y entre niveles no necesariamente contiguos. Uno de nuestros objetivos globales ha sido definir mejor esas asociaciones *intra* e *inter-niveles* con el propósito último de perfilar mejor el pronóstico de la enfermedad. Hemos de resaltar que la asociación estadística no necesariamente implica relación causal o patogénica (aunque no se descarta, y la presencia de asociación estadística es una buena justificación para buscar esa asociación causal), y que nuestro propósito inicial fue que esas asociaciones pudieran servir como marcadores de la evolución de la enfermedad o de diferentes características de la misma.

2 OBJETIVOS

El objetivo global de esta tesis doctoral es definir mejor el pronóstico del CEC. Para ello, hemos establecido los siguientes objetivos específicos (Figura 5).

Objetivo 1. Definir el pronóstico del CEC en función de las asociaciones del nivel clínico-patológico (nivel 1). Para ello:

1.1-Evaluamos las asociaciones entre distintas características clínico-patológicas de dicho nivel y su capacidad para definir el pronóstico de forma individual y en combinación, mediante modelos de análisis multivariante.

1.2- Estudiamos en la muestra de CEC de forma retrospectiva qué sistema de estadiaje de los utilizados en la actualidad definió mejor el pronóstico de la enfermedad.

Objetivo 2. Definir el pronóstico del CEC en función de las asociaciones del nivel de marcadores proteicos (nivel 2), solos o en combinación con características clínico-patológicas del CEC. Para ello:

2.1- Analizamos las asociaciones entre distintos marcadores proteicos (nivel 2) y su capacidad para definir características clínico-patológicas (nivel 1).

2.2- Definimos el pronóstico del CEC (eventos de mala evolución clínica durante el seguimiento), como hemos indicado en la propuesta de este objetivo 2.

Objetivo 3. Definir el pronóstico del CEC en función de los miRNAs identificados (nivel 3), solos o en combinación con características clínico-patológicas del CEC (nivel 1) y/o factores proteicos (nivel 2). Para ello:

3.1. Identificamos el patrón de expresión diferencial de miRNAs en distintas fases de progresión del CEC en un panel de líneas celulares. Y elegimos alguno de los miRNAs obtenidos, para llevar a cabo los estudios posteriores, basándonos en su interés en la homeóstasis de la piel y sus implicaciones en cáncer. Así se eligieron el *miR-205* y el *miR-203*.

3.2-Identificamos las asociaciones entre los miRNAs elegidos (nivel 3) y distintos marcadores proteicos (nivel 2), y su capacidad para definir características clínico-patológicas (nivel 1) de forma individual y en combinación.

3.3- Evaluamos las dos técnicas de análisis de miRNAs empleadas en tumores humanos (QPCR e hibridación *in situ*) y comparamos su eficacia a la hora de contribuir a definir el pronóstico del CEC.

Objetivo-4. Identificar clústeres de pacientes con CEC de diferente pronóstico, en función de las asociaciones encontradas en los distintos niveles estudiados.

Objetivo-5. Determinar, si los diferentes niveles de asociaciones estudiados, se relacionan entre sí de forma distinta en diferentes formas histopatológicas de CEC. En este trabajo, nos hemos centrado en estudiar si esos niveles de interacciones son distintos en el CEC clásico *versus* el CEC bowenoide/enfermedad de Bowen, para intentar definir si pueden ser entidades nosológicas diferentes.

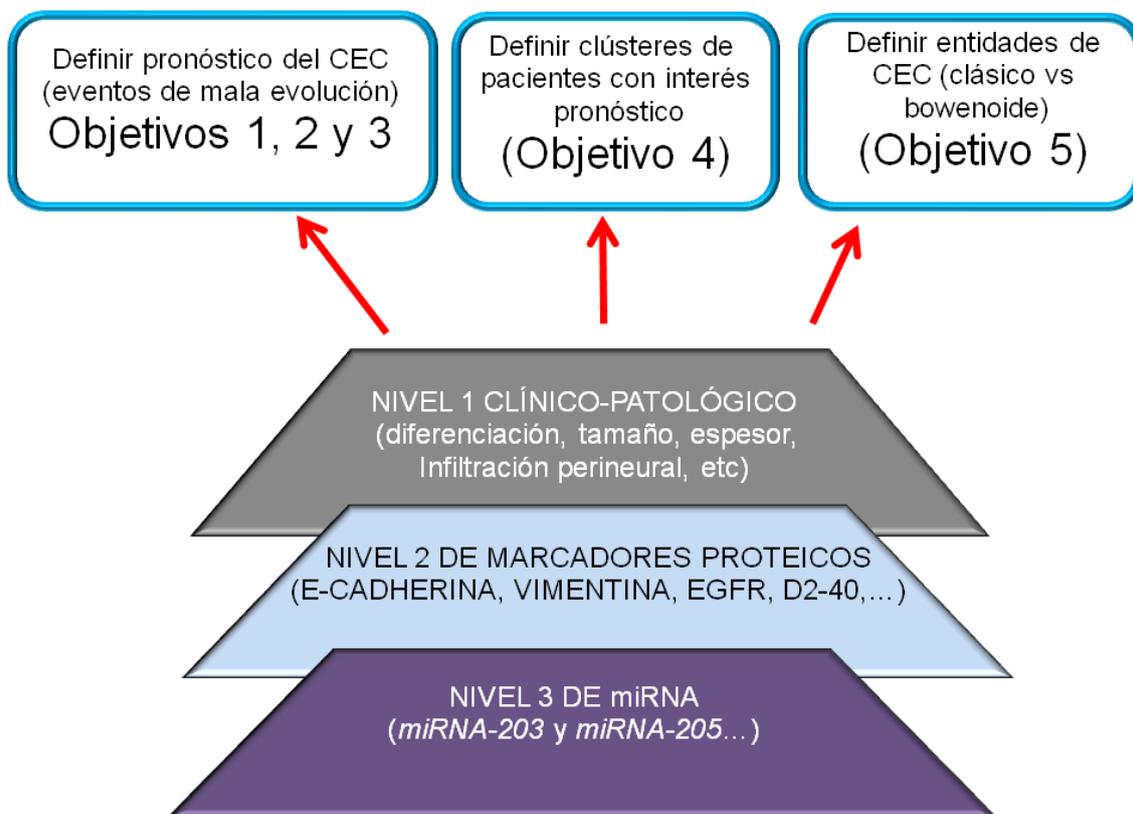


Figura 5: Relación entre los objetivos planteados

**PACIENTES,
MATERIAL Y MÉTODOS**

1 ESTUDIO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DE LOS PACIENTES

Para llevar a cabo este estudio, se revisaron las historias clínicas de 105 pacientes con CEC y se elaboró una base de datos clínico-epidemiológica en la que se incluyeron las siguientes variables que se describen a continuación.

1.1 Variables epidemiológicas

Entre las variables epidemiológicas se incluyeron:

1.) Edad en años; **2.) Sexo:** varón/mujer; **3.) Exposición solar crónica** (sí/no): Se consideró que el paciente había sufrido exposición solar crónica si refería antecedentes personales de trabajo al aire libre y/o desarrollaba habitualmente actividades en el exterior. **4.) Antecedentes personales de queratosis actínicas (QA)** (sí/no); **6.) de cáncer cutáneo no melanoma (CCNM)** (sí/no); **5.) de CEC** (sí/no); **6.) de otros tipos de cáncer** (sí/no); **7.) Inmunosupresión** (sí/no): Se consideró que el paciente estaba inmunodeprimido si estaba recibiendo quimioterapia, si estaba tomando fármacos inmunosupresores para el tratamiento de algún tipo de cáncer y/o enfermedad crónica o si tenía un tumor sólido de órganos internos.

1.2 Variables clínicas

Dentro de las variables clínicas se consideraron:

1.) Área de piel fotoexpuesta (sí/no): Se consideraron como áreas de piel fotoexpuestas la piel de cabeza y cuello, el escote y el dorso de las manos; **2.) Localización del tumor:** (i) Cabeza y cuello de alto riesgo (oreja, región preauricular, labio, localización palpebral, localización nasal y sien), (ii) Cabeza y cuello de bajo riesgo (frente, mejilla y cuero cabelludo), (iii) Tronco y miembros; **3.) Tratamiento previo del CEC** (sí/no): Se consideró que un tumor había sido previamente tratado si en la historia clínica de dermatología constaba la utilización de algún tratamiento con éxito o no para tratar el CEC en la localización en que posteriormente el tumor fue extirpado. En este contexto, los tratamientos que se consideraron fueron crioterapia, electrodesecación, imiquimod al 5% en crema y cirugía convencional; **4.) Extirpación completa del tumor primario** (sí/no): Se consideró que el tumor estaba completamente extirpado si en el informe de dermato-patología figuró el comentario “bordes quirúrgicos libres”. La extirpación completa del tumor se comprobó posteriormente al realizar la evaluación histopatológica. **5.) Tratamiento coadyuvante con radioterapia** (sí/no). **6.)**

Velocidad de crecimiento: se consideró en mm/mes teniendo en cuenta el tamaño del tumor primario y el inicio de la advertencia de la lesión por parte del paciente.

1.3 Variables evolutivas

Se consideraron las siguientes variables evolutivas:

1.) Recidiva local (sí/no): se consideró que un tumor hubo recidivado si, tras un informe inicial histopatológico con bordes quirúrgicos libres, el paciente desarrolló un CEC en la misma localización en que se hubo extirpado el CEC primario (sobre la cicatriz o en relación con ella) después de dos meses de la cirugía. **2.) Progresión ganglionar:** se consideró si el paciente desarrolló metástasis ganglionares durante el seguimiento. **3.) Progresión a distancia:** Se consideró cuando el paciente hubo desarrollado metástasis en órganos a distancia durante el seguimiento; **4.) Muerte por CEC:** se reconoció como tal cuando el paciente murió por causa atribuible al CEC, ya fuera por disfunción multiorgánica secundaria a la infiltración tumoral, sepsis en el contexto del CEC, etc...); **5.) Desarrollo de algún evento cualquiera de mala evolución** (sí/no): Se consideró si el paciente desarrolló algún evento de mala evolución durante el seguimiento de la enfermedad; en concreto uno o más de los siguientes: recidiva local, progresión ganglionar, progresión a distancia o muerte por CEC. **6.) Tiempo hasta el desarrollo de algún evento de mala evolución** (en meses); **7.) Tiempo hasta la recidiva local** (en meses); **8.) Tiempo hasta la progresión ganglionar** (en meses). **8.) Tiempo hasta la diseminación a órganos internos** (en meses). **9.) Tiempo hasta el exitus por CEC** (en meses).

1.4 Descripción de la cohorte de estudio

A continuación describimos la distribución de las variables anteriores en la cohorte de estudio. Describiremos (i) la cohorte de estudio global; (ii) dentro de la anterior la sub-cohorte de CEC clásico una vez extraído el “grupo de enfermedad de Bowen y carcinoma bowenoide”, (iii) dentro de la anterior la sub-cohorte en que se llevó a cabo un estudio de miRNAs por hibridación in situ y QPCR y (iv) la subcohorte del grupo de “enfermedad de Bowen y carcinoma bowenoide”.

En este trabajo, partimos de una serie de 118 casos de CEC diagnosticados en el mismo número de individuos. De forma resumida, la distribución por sexos se repartió aproximadamente igual entre hombres y mujeres (62 hombres y 56 mujeres). Los pacientes tuvieron una edad entre 47 y 105 años, más de la mitad de ellos (53,3%) se encontraron entre 76 y 91 años. En la mayoría de los casos se demostraron antecedentes de exposición solar crónica (97,3%) y de QA (79,3%). En más de la mitad de los casos (51%) se demostró el

antecedente de CCNM y en el 44,5% existió el antecedente de CEC. En 12 pacientes hubo inmunosupresión y en 23 de ellos antecedentes de otros tipos de cáncer.

En relación con la localización del tumor, la mejilla y la frente fueron las localizaciones más frecuentes, pero por la gran cantidad de categorías en esta variable, que son meramente descriptivas pero sin utilidad pronóstica, la variable se reclassificó –tal y como hemos comentado más arriba- en cabeza y cuello de alto riesgo, cabeza y cuello de bajo riesgo, y tronco y miembros (esta última localización se incluyó para agrupar en una categoría única de tamaño suficiente una serie de localizaciones del CEC en que el tamaño individual de cada muestra fue pequeño, más que por motivos de implicación pronóstica previamente demostrada en la literatura). De hecho, somos conscientes del pronóstico intermedio que se confieren a las lesiones localizadas en manos y pies y del bajo riesgo de las localizadas en el tronco.

En la séptima edición de TNM de la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) para el CEC, las localizaciones de alto riesgo son la oreja y la mucosa del labio. Estas localizaciones pueden modificar el estadio tumoral de T1 a T2, cuando en un tumor T1 de estas localizaciones se asocia al menos a otro factor de los considerados de alto riesgo en el CEC. En este sentido, en nuestra muestra hubo 9 pacientes en los que el tumor se asentó en la oreja y 13 en los que el tumor se localizó en el labio. Por tanto, en total fueron 22 los casos que se localizaron en áreas de alto riesgo. Además, también consideramos de alto riesgo la localización preauricular (por su alto riesgo de infiltración hacia la glándula parótida), la nariz y la sien, por ser éstas localizaciones en que se ha demostrado un comportamiento más agresivo del CEC, según las guías de la *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN).

En relación con el diagnóstico, 110 casos correspondieron a CEC invasor y el resto (8 casos) a CEC intraepitelial (enfermedad de Bowen). Durante el proceso de análisis de los resultados se comprobó que un subgrupo de CEC invasores presentó rasgos parecidos a los de la enfermedad de Bowen desde el punto de vista histopatológico e inmunohistoquímico. Además, en esos casos se observaron restos de enfermedad de Bowen en el epitelio adyacente al tumor invasor. A partir de ese momento este grupo de CEC invasores, que fueron clasificados como CEC bowenoides (CB), se unieron en el análisis a los casos de enfermedad de Bowen y se sacaron del grupo de los CEC clásicos, con el fin de profundizar en la posibilidad de que ambos procesos fueran fases evolutivas distintas de una misma entidad. Después de esta reclasificación, la muestra se repartió en 20 casos de enfermedad de Bowen y carcinoma bowenoide (12 casos de carcinoma invasor y 8 de enfermedad de Bowen) y 98 casos de CEC típico, que fueron tanto analizados por separado como comparados entre sí. A continuación, se detallan las características de las muestras de CEC y de CB analizadas en nuestro estudio. El tiempo de seguimiento de los pacientes de la cohorte fue entre 48 y 96 meses, con una mediana de seguimiento de 70 meses.

1.4.1 Descripción de la muestra de CEC (excluyendo el grupo de enfermedad de Bowen y carcinoma bowenoide)

La descripción de la muestra de los CEC, de este estudio, una vez excluido el grupo “bowenoide”, se resume en la Tabla 5.

a. Variables clínico-epidemiológicas

El grupo de CEC estuvo constituido por 98 CECs procedentes del mismo número de pacientes; 51 casos fueron en varones y 47 en mujeres. La edad media fue de 83,65 años ($\pm 10,18$). El intervalo modal de edad fue de 76-91 años (50 casos), en el que la distribución por sexos fue similar, siendo mayor la frecuencia en varones para edades más tempranas y de mujeres para edades más tardías. En cuanto a la localización, 46 tumores asentaron en áreas de cabeza y cuello de alto riesgo, 38 en cabeza y cuello de bajo riesgo, y 14 tumores en tronco y miembros.

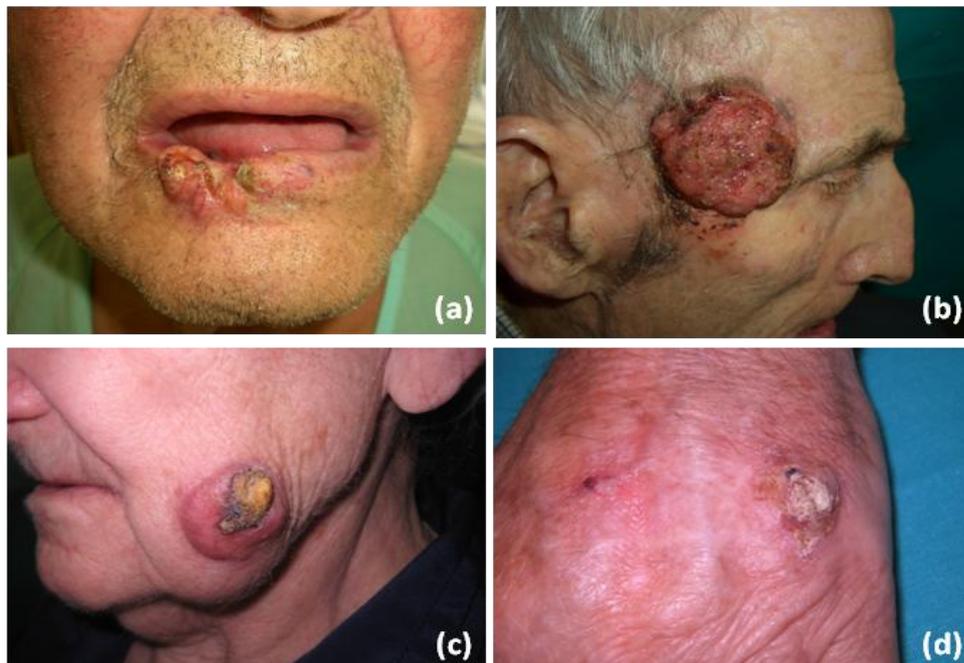


Figura 6: Imágenes clínicas de CEC en diversas localizaciones. (a) CEC asentando en labio inferior; (b) CEC en región temporal izquierda; (c) CEC zona mandibular; (d) CEC en dorso de mano izquierda.

Se registraron **antecedentes de queratosis actínicas** en 74 casos (75,5 %), **de cáncer cutáneo no melanoma** en 50 casos (51%) y **de CEC** específicamente en 45 casos (45,9%). Hubo antecedentes **de otros tumores** en 17 pacientes (17,3%) y **de inmunosupresión** en 12 casos (12,2%). La **velocidad de crecimiento** se calculó a través de un cociente que relacionaba el tamaño horizontal del tumor y el tiempo hasta el diagnóstico y, por lo tanto, fue determinada en mm/mes. La media de velocidad de crecimiento en la serie fue de 4,36 mm/mes (DS = 3,88). Arbitrariamente, transformamos la variable continua en una dicotómica con el punto de corte en 5 mm/mes. En 29 casos la velocidad de crecimiento fue mayor de 5 mm/mes, y en 61 casos, menor de 5 mm/mes, en los 90 casos en los que se pudo calcular este dato. El tiempo hasta el diagnóstico fue menor de 2 meses en 11 CECs y mayor en 87 casos.



Figura 7: CEC en zonas de piel fotoexpuesta con intenso daño actínico. Nótese la presencia de queratosis actínicas () que asientan en el área de cancerización.*

b. Parámetros evolutivos y de seguimiento

En 18 pacientes se había **tratado el tumor previamente** a la intervención quirúrgica (6 casos con crioterapia, 1 con Imiquimod, 5 con cirugía y 4 con otros métodos). El tumor se extirpó completamente en 80 casos y los **bordes quirúrgicos** no se encontraron libres de tumor en 16, (n=96). De estos últimos, 7 de ellos presentaron recurrencia del tumor y 13 pacientes recibieron **tratamiento complementario con radioterapia**. Este último grupo fue de alto riesgo y, de ellos, 7 desarrollaron algún evento de mala evolución durante el seguimiento.

Veintiún pacientes desarrollaron algún **evento de mala evolución durante el seguimiento** (21,4 %) que consistieron en: recidiva local/recurrencia del tumor primario en 12 pacientes (12,2%), metástasis ganglionares en 13 pacientes (13,3%), metástasis en órganos en 2 pacientes (2,04 %), (uno de ellos con metástasis pulmonares y el otro con metástasis en múltiples órganos, entre ellos también en pulmón) y muerte por CEC, 5 pacientes (5,1%).

Algunos pacientes presentaron más de un evento de mala evolución clínica diferente, por lo que la suma de eventos de mala evolución evaluados fue mayor que la de los pacientes que los desarrollaron. En cuanto al **estadio evolutivo al diagnóstico**, 35 pacientes se encontraban en **estadio I** (35,71%) y 63 pacientes en estadio II (64,3%) (Figura 8). El **estadio T**, con arreglo a la clasificación del *Brigham and Women's Hospital*, fue T1 en 35 casos (35,7%), T2a en 40 tumores (40,8%) y T2b en 23 casos (23,5%). El periodo de seguimiento fue entre 36 y 96 meses (mediana de seguimiento de 70 meses). Al final de periodo de seguimiento, 34 pacientes se encontraban en estadio I, 50 pacientes en estadio II, 10 pacientes en estadio III y 4 pacientes en estadio IV. En 13 pacientes hubo **progresión de su estadio tumoral durante el seguimiento** (Figura 8). De ellos, 5 pacientes murieron como consecuencia del CEC, aunque 30 pacientes fueron *exitus* durante el seguimiento (25 de ellos por causas distintas del CEC).

VARIABLES		N	Porcentaje	
Clínico-epidemiológicas	Edad	83,65 (DS 10,18)		
	Sexo	51V/47M		
	Historia de QA	74	75,5	
	Historia de CCNM	50	51	
	Historia de CEC	45	45,9	
	Historia de ESC	90	91,8	
	Inmunosupresión	12	12,24	
	Tiempo hasta el diagnóstico	< 2 meses	11	11,22
		> 2 meses	87	88,78
	Localización	CC alto riesgo	46	46,9
CC bajo riesgo		38	38,8	
Tronco y MM		14	14,3	
Evolutivas	Eventos de mal pronóstico totales	21	21,4	
	Recidiva local	12	12,2	
	Progresión ganglionar	13	13,3	
	Progresión a distancia	2	2	
	Progresión del TNM	13	13,3	
	Muerte por CEC	5	5,1	

Tabla 5: Resumen de características clínico-epidemiológicas y evolutivas de la serie de carcinoma epidermoide cutáneo: V (varón), M (mujer) QA (queratosis actínica), ESC (exposición solar crónica), CCNM (cáncer cutáneo no melanoma), CEC (carcinoma epidermoide cutáneo), CC (cabeza y cuello), MM (miembros) DS (desviación estándar).

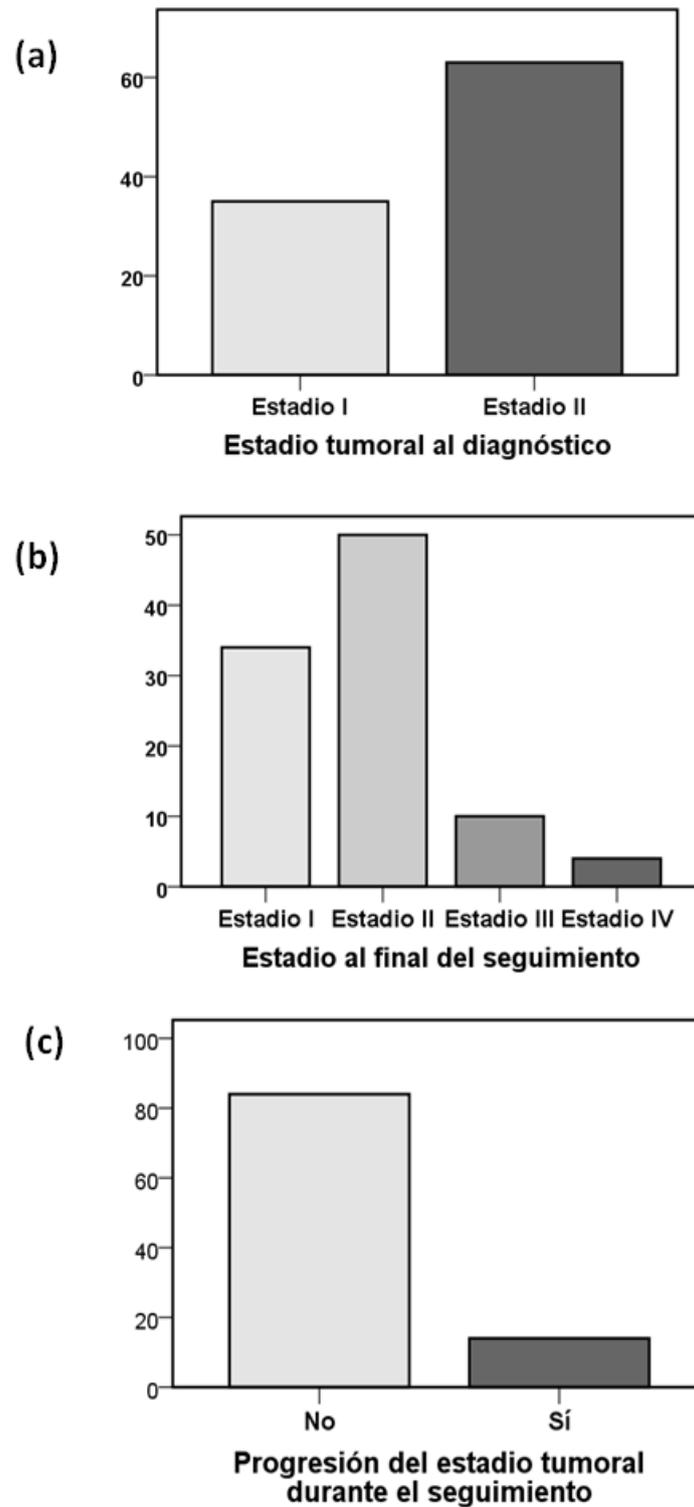


Figura 8: Distribución del estadio TNM en los pacientes al diagnóstico (a), al final del seguimiento (b), y de los pacientes que desarrollaron progresión del TNM durante su evolución (c).

1.4.2 Descripción de la muestra de tumores en la que se realizó la determinación de los niveles de miRNAs mediante QPCR

En la serie descrita en el apartado anterior se evaluaron una serie de miRNAs (miRNAs) mediante hibridación *in situ* (ISH). Una parte de esos tumores fueron coleccionados prospectivamente y en ellos se procedió a la validación de los miRNAs no sólo mediante hibridación *in situ* (ISH), sino también mediante QPCR. Las características clínico-epidemiológicas y evolutivas de esta muestra se resumen en la Tabla 6. que, como veremos, fue representativa del resto de la muestra principal, aunque más pequeña y con un menor número de eventos de mala evolución clínica.

VARIABLES		N	Porcentaje
Clínico-epidemiológicas	Edad (media / DS)	84,34 (8,95)	
	Sexo	26V/21M	55,3V/44,7M
	Historia de QA	42	89,4
	Historia de CCNM	24	51,1
	Historia de CEC	24	51,1
	Historia de ESC	44	93,6
	Inmunosupresión	4	8,5
	Localización	CC alto riesgo	22
	CC bajo riesgo	18	38,3
	Tronco y MM	7	14,9
Evolutivas	Eventos de mal pronóstico totales	4	8,5
	Recidiva local	3	6,4
	Progresión ganglionar	3	6,4
	Progresión a distancia	1	2,1
	Progresión del TNM	3	6,4
	Muerte por CEC	1	2,1

Tabla 6: Resumen de características clínico-epidemiológicas y evolutivas: V (varón), M (mujer), QA (queratosis actínica), ESC (exposición solar crónica), CCNM (cáncer cutáneo no melanoma), CEC (carcinoma epidermoide cutáneo), CC (cabeza y cuello), MM (miembros) DS (desviación estándar).

1.4.3 Descripción de la muestra de enfermedad de Bowen y “carcinoma bowenoide”

Para intentar valorar si el grupo constituido por los casos de enfermedad de Bowen y de “carcinoma bowenoide” formaban una entidad común, inicialmente, se realizó una descripción de la muestra (Tabla 7). De forma global, comprobamos que los tumores en este grupo presentaron características similares en términos clínico-patológicos, biológicos y moleculares, como expondremos en la sección de resultados; y, por lo tanto, tuvo sentido valorar si, efectivamente, era diferente al grupo de CEC típico. Pasamos a continuación a describir sus características.

El grupo (N=20 casos) constaba de 8 casos de enfermedad de Bowen y 12 de carcinoma epidermoide invasivo, con rasgos citológicos de enfermedad de Bowen, y enfermedad de Bowen asociada al margen del tumor en el epitelio (“carcinoma bowenoide”). La muestra se distribuyó igualmente entre hombres y mujeres, con una media de edad de 85,45 años. Los rasgos clínico-epidemiológicos y evolutivos de la muestra aparecen en la Tabla 7.

En el 70% de los casos (N=14) el tumor primario no había recibido ningún tratamiento previo a la extirpación. Ésta fue completa en 17 casos y alguno de los márgenes se encontró afectado en 3 casos. Ninguno de los casos desarrolló recidiva local, ni progresión ganglionar o a distancia, y ninguno de los pacientes falleció en esta cohorte como consecuencia del CEC (aunque 4 pacientes fallecieron durante el seguimiento debido a comorbilidades relacionadas con su ancianidad).

	Variables	N	Porcentaje	
Clínico-epidemiológicas	Edad	media 85,45	rango (65-105)	
	Historia de ESC	18	90	
	Historia de QA	16	80	
	Historia de CCNM	14	70	
	Historia de CEC	8	40	
	Otros cánceres	4	20	
	Inmunosupresion	4	20	
	Localización	CC alto riesgo	10	50
		CC bajo riesgo	7	35
		Tronco y MM	3	15
	Tamaño	media 16,55	rango(9-40)	
	Espesor	<2 mm	14	70
>2 mm		6	30	
Velocidad de crecimiento	< 5 mm /mes	20	100	
	> 5 mm / mes	0		
Evolutivas	Eventos globales de mala evolución	0	0	

Tabla 7: Descripción de la muestra de casos de enfermedad de Bowen y "carcinomas bowenoides" de nuestra cohorte: ESC (exposición solar crónica), QA (queratosis actínica), CCNM (cáncer cutáneo no melanoma), CEC (carcinoma epidermoide cutáneo), CC (cabeza y cuello), MM (miembros).

2 MUESTRAS DE TEJIDOS

Se seleccionaron de manera prospectiva y consecutiva en una serie de pacientes con CEC; y de manera retrospectiva en un grupo de pacientes previamente diagnosticados del mismo, con evolución clínica conocida. De aquellos tumores que se habían inducido en el estudio de manera prospectiva, se almacenó una parte de la muestra a -80° C. De dichas muestras se extrajo el RNA total, incluyendo los miRNA, y realizó la cuantificación mediante QPCR de la expresión de los miRNA candidatos seleccionados, *miRNA-203* y *miRNA-205* (tal y como queda explicado más arriba). Todos los tumores obtenidos se analizaron histopatológicamente mediante tinciones convencionales de hematoxilina-eosina y diversas tinciones de inmunohistoquímica. Se realizó asimismo hibridación *in situ* para *miRNA-203* y *miRNA-205* en tejidos en parafina de los tumores.

2.1 Análisis histopatológico de los tumores

2.1.1 Hematoxilina y Eosina

El proceso de tinción con hematoxilina y eosina consta de cuatro pasos: fijación, inclusión, corte y tinción. **1.) Fijación:** cuando el tejido se extrae de un organismo vivo, éste sufre procesos de degradación por autólisis y putrefacción. Con el fin de preservar las características morfológicas y moleculares del tejido para su posterior estudio, éste se fija con un solvente orgánico (habitualmente el formaldehído al 4%). **2.) Inclusión:** una vez fijado el tejido, éste debe procesarse para su tinción y posterior observación; en general deben realizarse cortes muy finos de 5-10 micrómetros de espesor y para ello previamente éste debe endurecerse. Por ello, el segundo paso es la inclusión en parafina, que es una resina sólida a temperatura ambiente y líquida en el rango entre 50% y 70%, dependiendo de sus características. Previamente a su inclusión en parafina, el tejido se deshidrata pasándolo por una serie de alcoholes a concentraciones crecientes y, por último, xilol. **3.) Corte:** Una vez que el tejido ha sido fijado en formol e incluido en parafina, éste se corta con un micrótopo, que permite hacer cortes de pocas micras de espesor. **4.) Tinción:** La tinción se realiza tras desparafinar el tejido con xilol e hidratarlo pasándolo por una serie de alcoholes de concentraciones decrecientes y al final agua destilada. La tinción consiste en pasar el corte de tejido colocado sobre un portaobjetos por una solución de eosina, seguido de un lavado y un paso por hematoxilina. Posteriormente, se lava para deshidratar la muestra con mezclas de alcoholes y de xilol, y se monta con medio de montaje y un cubreobjetos.

2.1.2 Variables histopatológicas analizadas en los tejidos teñidos con hematoxilina-eosina

Se llevó a cabo una doble evaluación de todas las muestras tumorales estudiadas con técnicas convencionales. En el análisis histopatológico se evaluaron las siguientes variables:

1.) Diagnóstico: Se consideraron los diagnósticos de (i) CEC, cuando el tumor invadía la dermis tras rebasar la membrana basal; (ii) enfermedad de Bowen (EB), cuando existía displasia epitelial que afectaba a todo el grosor del epitelio con preservación de la membrana basal y (iii) carcinoma epidermoide bowenoide (CB), aquel que derivaba de una enfermedad de Bowen, que se demostraba además en el epitelio adyacente al tumor, y que tenía características histopatológicas de crecimiento expansivo, con células de gran tamaño, con escasa diferenciación queratósica y, en ocasiones, con acantolisis. Se excluyeron los queratoacantomas; **2.) Elastosis actínica:** (sí / no): se consideró que existía elastosis actínica cuando se comprobó la existencia de fibras elastóticas o degeneración basófila del colágeno en la dermis reticular adyacente al tumor. Se excluyó la dermis papilar para dicho propósito; **3.) Queratosis actínica asociada:** (sí / no): se consideró que existía queratosis actínica asociada al tumor si en las proximidades del mismo, dentro de la preparación histopatológica, se demostraban células displásicas en el epitelio en un área en la que éstas no rebasaban la membrana basal; **4.) Ulceración:** (sí / no): se identificó cuando en alguno de los cortes de la preparación histopatológica existía pérdida de continuidad en el epitelio no debida al procesamiento de la muestra; **5.) Espesor:** (mm). Se determinó considerando el mayor espesor detectado en los cortes histopatológicos teñidos con hematoxilina-eosina, desde la capa granulosa hasta la célula tumoral detectada más profundamente en los CEC invasores. En los CEC *in situ* (enfermedad de Bowen) se consideró que el espesor de la lesión era cero, por no haber rebasado la membrana basal. El espesor se determinó con el programa informático *OV100 software (Olympus™)*. **6.) Tamaño (diámetro del tumor)** (en mm): el tamaño horizontal del tumor también se determinó con el soporte informático *OV100 software (Olympus™)*; **7.) Grado de diferenciación:** se distinguió entre bueno, moderado y pobre o indiferenciado. En la determinación del grado de diferenciación tumoral se siguió la clasificación propuesta por Johnson para el CEC (Johnson *et al.*, 1992), que es actualmente la más utilizada para determinar el grado de diferenciación tumoral y ha sido además validada por diversos estudios (Brantsch *et al.*, 2008; Clayman *et al.*, 2005; Jambusaria-Pahlajani *et al.*; Karia *et al.*, 2013a). Este sistema de clasificación diferencia entre: (i) CEC bien diferenciados, si tienen un fenotipo celular epitelial, con desmosomas evidentes y diferenciación queratósica en más del 75% del tumor; (ii) mal diferenciados, aquéllos en los que se demuestra mala diferenciación, sin diferenciación queratósica clara, con morfología celular más fusiforme y sin uniones desmosómicas en más del 75% del tumor; y (iii) los casos intermedios, se clasifican como moderadamente diferenciados, a medio camino entre los dos anteriores. **8.) Patrón de crecimiento:** se diferenció entre patrones de crecimiento infiltrativo, expansivo y mixto. Se

consideró que el patrón de crecimiento fue: (i) infiltrativo, si el tumor exhibía la presencia de pequeños nidos, cordones de células o células aisladas en la periferia del tumor; (ii) expansivo, cuando el tumor presentaba un crecimiento compacto en masa, sin células disgregadas en el frente de invasión y (iii) mixto, cuando el tumor presentaba un patrón de crecimiento predominantemente expansivo, pero en alguna zona tendía al desarrollo del patrón infiltrativo; **9.) Infiltración perineural (IPN):** (sí / no): se consideró su presencia si existía depósito de células tumorales en torno al perineuro o dentro del propio nervio. En los casos dudosos, se realizaron tinciones con inmunohistoquímica frente a S100 y/o queratinas para identificar adecuadamente tanto las células tumorales como las estructuras nerviosas; **10.) Infiltración linfovascular (ILV):** (sí / no): se consideró cuando se demostraron células tumorales en el interior de los vasos capilares o linfáticos en la pieza quirúrgica. La tinción con D2-40 permitió además comprobar el contorno de los vasos linfáticos y, por lo tanto, demostrar de manera más fiable la existencia de células tumorales en el interior de los mismos; **11.) Desmoplasia:** (sí / no): se evaluó el estroma tumoral y se recogió si éste exhibía engrosamiento de los haces de colágeno en el 30% del tumor o más (Brantsch *et al.*, 2008).

12.) Infiltrado inflamatorio peritumoral (IIP): (se diferenció entre nulo, escaso, moderado e intenso, según los siguientes criterios: (i) Se consideró IIP escaso, cuando existía un infiltrado inflamatorio salpicado en la periferia del tumor, difícil de apreciar a pequeño aumento; (ii) moderado, si existía un infiltrado discontinuo, pero no únicamente salpicado, apreciable a pequeño aumento ; (iii) intenso, cuando existía un infiltrado inflamatorio continuo en torno al tumor, con áreas de inflamación más compacta en algunas zonas. Se evaluó a un aumento de 100x; **13.) Celularidad predominante del IIP:** se clasificó el infiltrado en predominantemente linfocitario, linfocitocitario, plasmocitario y neutrofílico, según la subpoblación predominante. También se determinó la presencia de eosinófilos. En aquellos casos en los que en la celularidad del infiltrado no predominaba ningún tipo celular, se clasificaron como mixtos; **14.) Infiltrado inflamatorio intratumoral (IIIT):** también se diferenció entre nulo, escaso, moderado e intenso, según los siguientes criterios: (i) IIIT escaso, si se demostraban células salpicadas en el seno del parénquima del tumor; (ii) moderado, si las células se distribuían de manera difusa pero formando grupos en algunos casos; (iii) intenso, cuando las células formaban nódulos inflamatorios en el seno del parénquima tumoral. Se evaluó a un aumento de 200x; **15.) Celularidad predominante del IIIT:** Se clasificó el infiltrado en predominantemente linfocitario, linfocitocitario, plasmocitario y neutrofílico. También se buscó la presencia de eosinófilos. Aquellos casos en los que no predominaba ningún tipo celular se clasificaron como mixtos.

2.1.3 Descripción de las variables histopatológicas evaluadas en el grupo de pacientes con CEC

El resumen de la descripción de las variables histopatológicas en esta muestra aparece en la Tabla 9. Hemos considerado el tamaño tumoral como variable histopatológica porque, debido a la falta de datos fiables al respecto en las historias clínicas, éste fue medido sobre las preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina. Dado que las muestras reducen su tamaño cuando se fijan para su posterior procesado, es posible que el tamaño real de los tumores fuera discretamente superior. En resumen, el **tamaño** tumoral osciló entre 5 y 70 mm de diámetro, con una media de 19,27 mm. Por otra parte, el **espesor** varió entre 1 y 25 mm (considerando los CEC invasores, con ruptura de la membrana basal) con una media de 7,15 mm.

En lo referente al **grado de diferenciación**, la mitad de los tumores fueron moderadamente diferenciados en concreto 49/98, bien diferenciados 30/98 (30,6%) y pobremente diferenciados 19/98 (19,4%) (Figura 9). Respecto al **patrón de crecimiento**, más de la mitad de los tumores exhibieron un patrón de crecimiento infiltrativo (54/98), algo más de la cuarta parte tuvieron un patrón de crecimiento expansivo (26/98) y 18 casos (18,4%) presentaron un patrón de crecimiento mixto (Figura 10). En las Figuras 11-13 se representan ejemplos de imágenes panorámicas de CEC con patrón de crecimiento expansivo, mixto (predominantemente expansivo con área de crecimiento infiltrativo) e infiltrativo.

Se demostró la presencia de **elastosis solar** en la histopatología de 95 de los tumores (96,9%) y de **queratosis actínica asociada al tumor** en 70 casos (71,4%). Por lo tanto, en general, los tumores estuvieron asentados en áreas de piel que habían sufrido exposición solar crónica. Un 22,4% de los tumores exhibieron **infiltración perineural** (23/98) y un 7,1% **infiltración linfovascular** (7/98). La **desmoplasia** se encontró en un 19,38% de los casos (19/98). En la Figura 13, que representa una imagen panorámica de un CEC con patrón de crecimiento infiltrativo, es posible identificar desmoplasia (especialmente en 13(b)). En la misma Figura 13, se observan también imágenes de infiltración perineural (13 (c) y 13 (d))

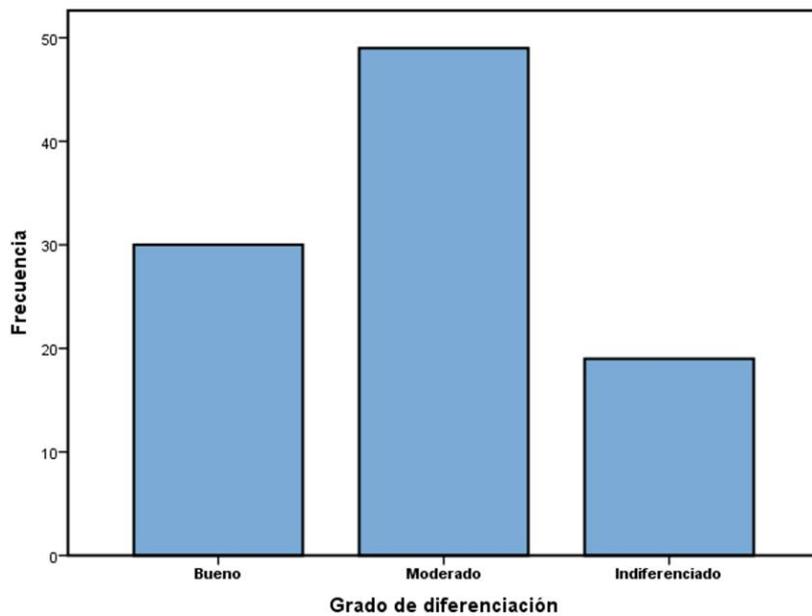
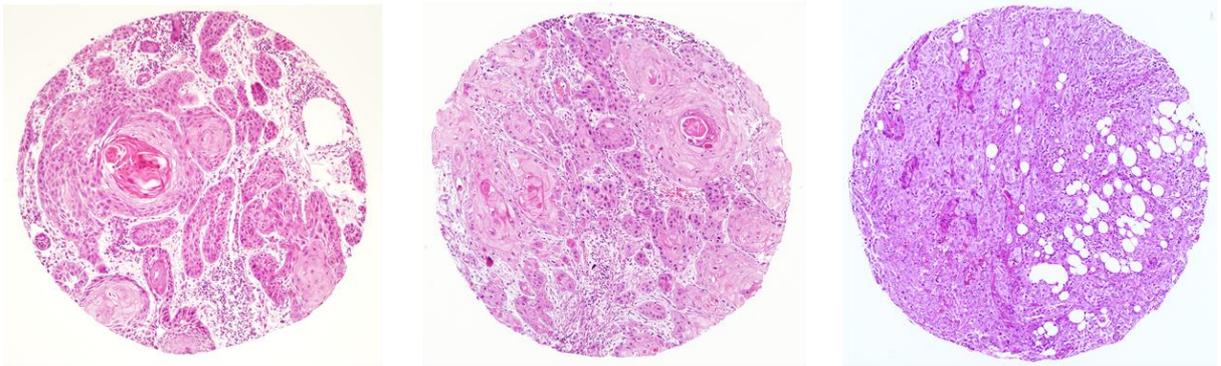


Figura 9: Grado de diferenciación del CEC. (a) En la parte superior de la imagen se muestran ejemplos representativos de tumores con grado bueno de diferenciación (izquierda), moderado (centro) y pobre (derecha). **(b)** Distribución del grado de diferenciación de los CECs de nuestro estudio.

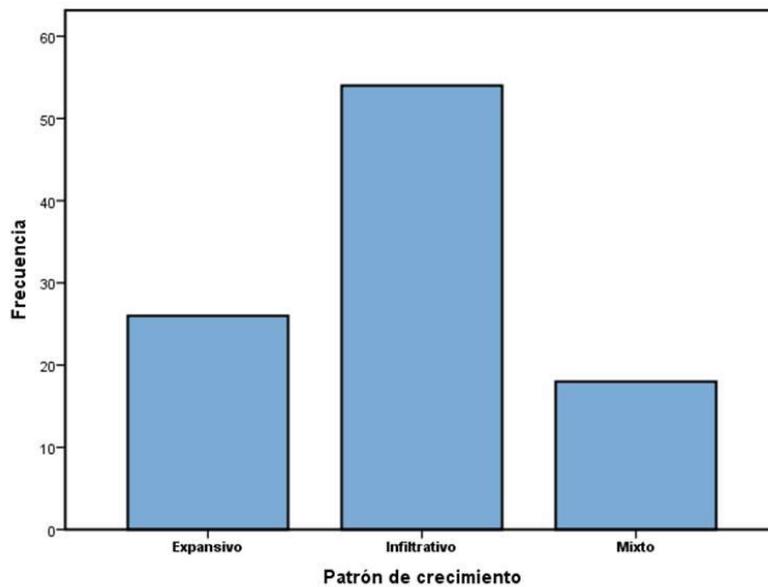
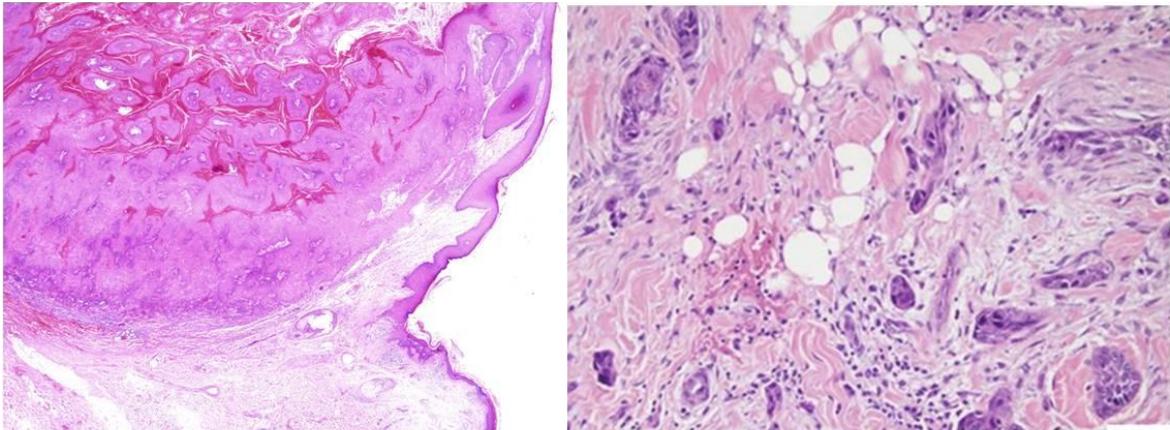


Figura 10: Patrón de crecimiento en los CEC. (a) Arriba a la izquierda, ejemplo representativo de un tumor con patrón de crecimiento expansivo, con intensa queratinización y, arriba a la derecha, ejemplo representativo de un tumor con patrón de crecimiento infiltrativo, en el que se ven los cordones de células que se van infiltrando hasta capas más profundas de la piel. Nótese, en la imagen de la derecha cómo existen fibras de colágeno más gruesas (desmoplasia). (b) Distribución del patrón de crecimiento de los CEC.

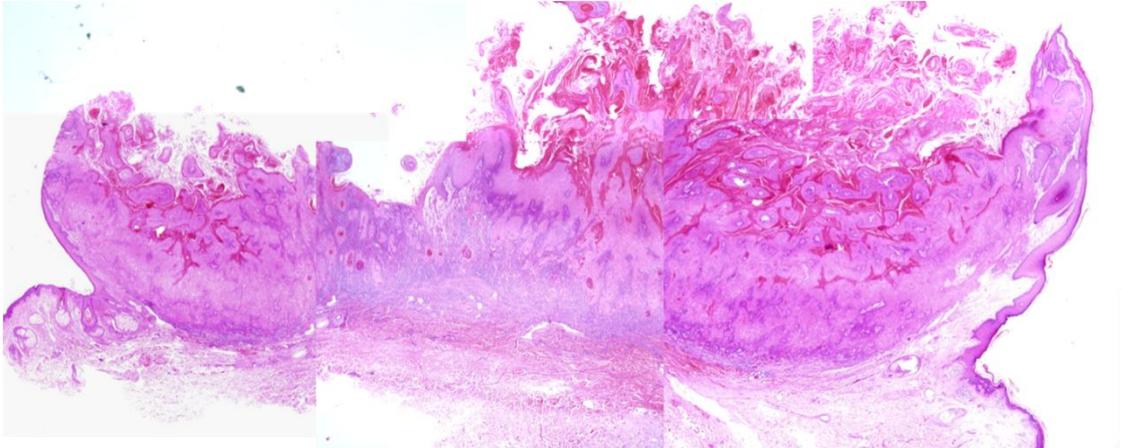


Figura 11: CEC bien diferenciado con patrón de crecimiento expansivo (20x).

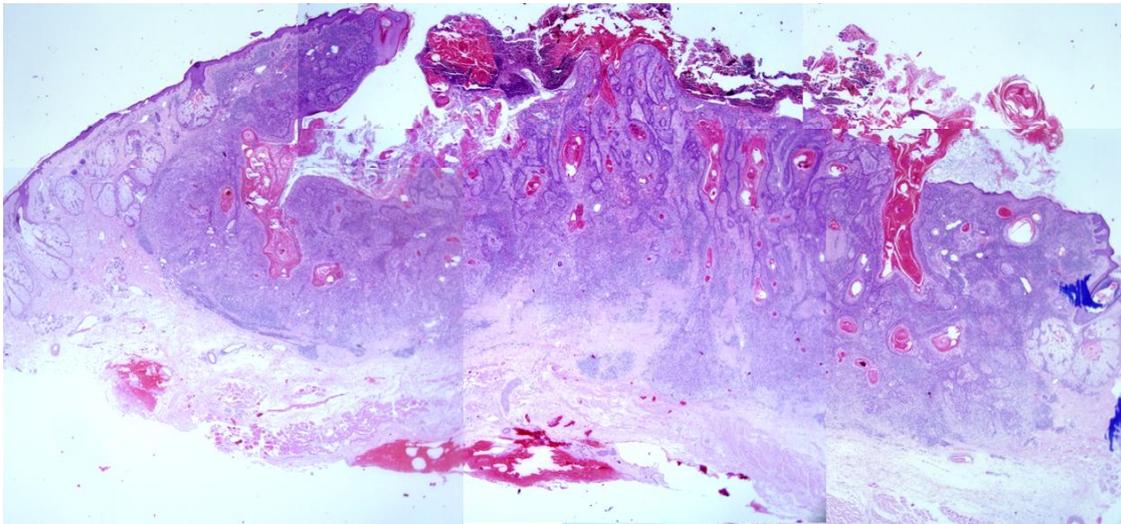


Figura 12: Imagen panorámica de un tumor moderadamente diferenciado con patrón de crecimiento mixto. A la izquierda de la imagen se observa un componente expansivo del tumor, mientras que a la derecha existen cordones de células que tienden a infiltrar en profundidad (20 X). El tumor, exhibe una evidente queratinización, pero existen en él áreas profundas infiltrativas indiferenciadas.

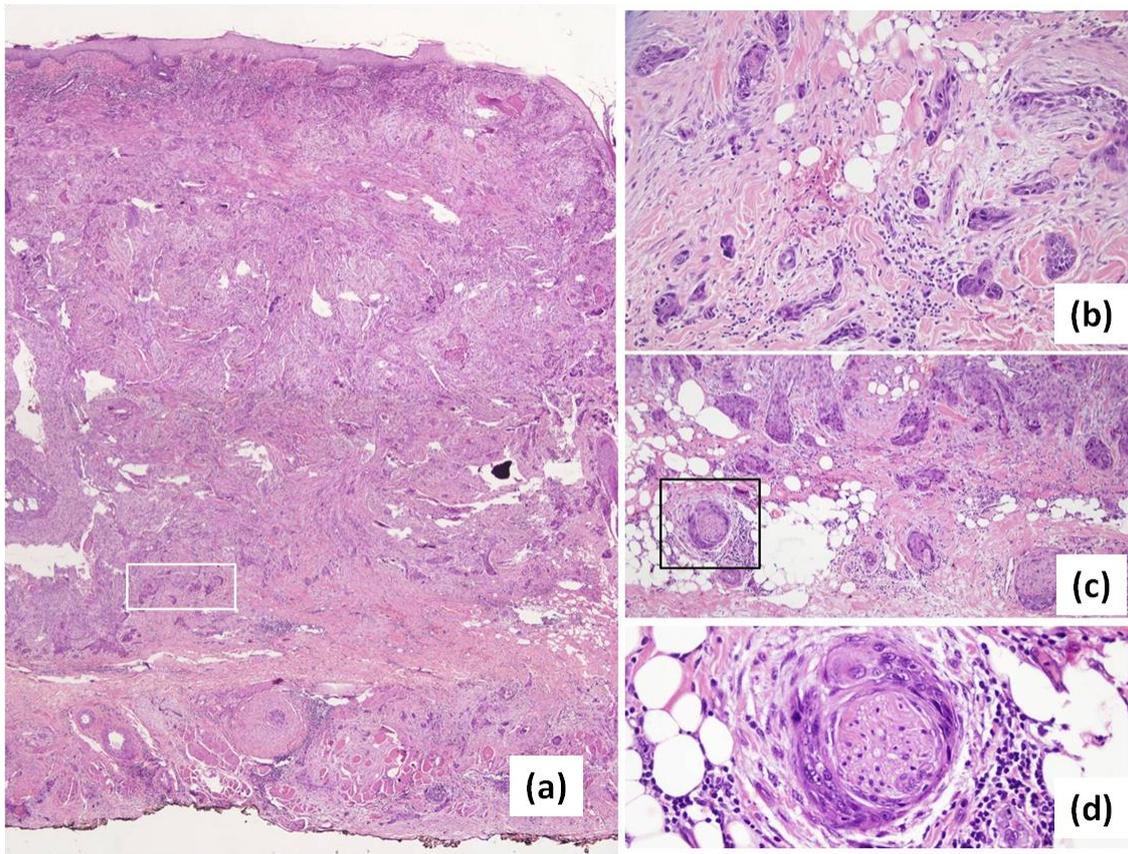


Figura 13: CEC pobremente diferenciado y con patrón de crecimiento infiltrativo: (a) imagen panorámica del tumor sin diferenciación queratósica; (b) presencia de engrosamiento de los haces de colágeno, desmoplasia; (c, d) infiltración perineural. El área con infiltración perineural se señala con un rectángulo de color blanco en la imagen panorámica.

La mayoría de los tumores de nuestra serie presentaron un **infiltrado inflamatorio peritumoral** moderado (33/98) o intenso (42/98). Curiosamente, se invirtió la tendencia en el **infiltrado inflamatorio intratumoral**, que fue más frecuentemente nulo (46/98) o escaso (31/98). La distribución de frecuencias para la intensidad de los infiltrados inflamatorios figura en la Tabla 8, (Figura 14). Este fenómeno se ha estudiado poco en el cáncer cutáneo, en general y, particularmente, en el CEC. Se conoce, no obstante, su influencia potencial en la patogénesis del cáncer (Arwert *et al.*, 2010; Azzimonti *et al.*, 2014) y, por este motivo, decidimos analizarlo en nuestra serie de tumores. Además, también se analizó la celularidad predominante del infiltrado inflamatorio en cada caso (excluyendo, obviamente, los casos en los que la intensidad del infiltrado inflamatorio fue nula). Tanto en el infiltrado inflamatorio peritumoral como en el intratumoral, la celularidad predominante fue linfohistiocitaria en la mayoría de los casos, seguido por las células plasmáticas.

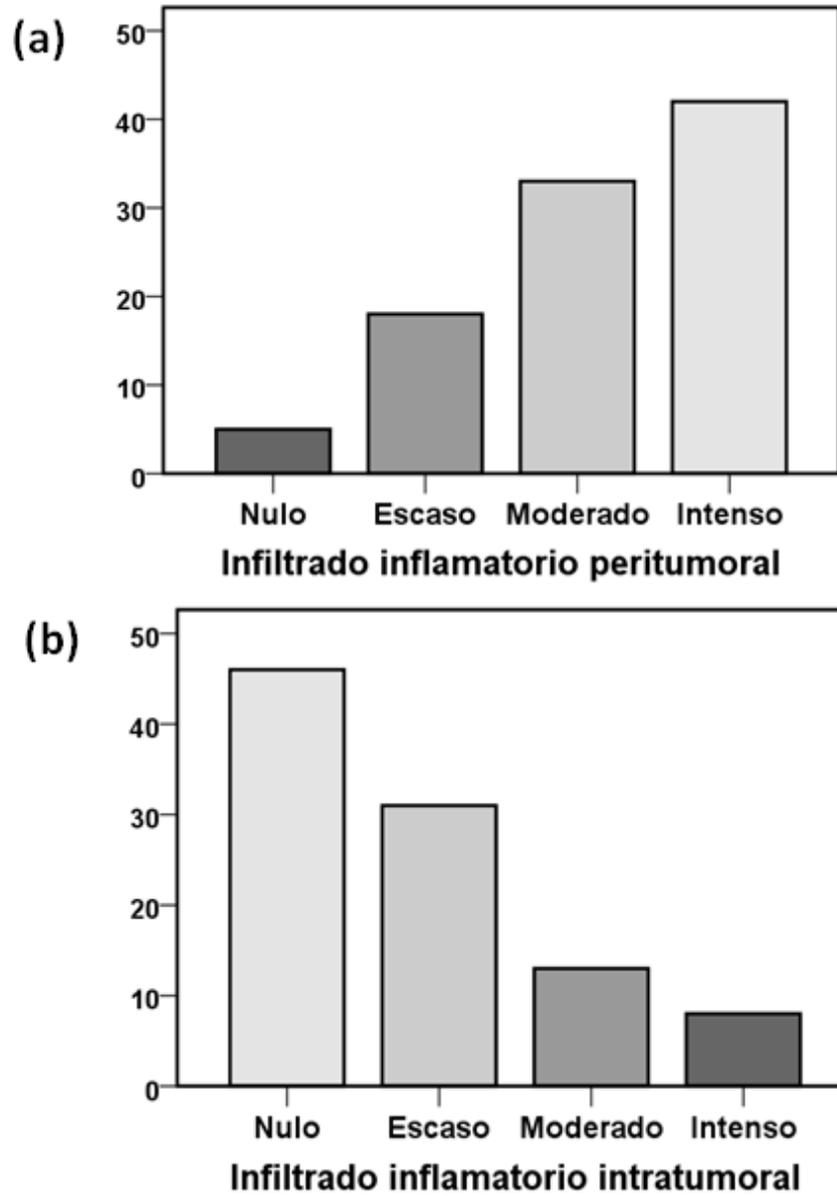


Figura 14: Distribución de las frecuencias de intensidad del infiltrado inflamatorio (a) peritumoral y (b) intratumoral, en nuestra cohorte de estudio.

	Infiltrado inflamatorio peritumoral		Infiltrado inflamatorio intratumoral	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Linfocitos	52	55,9	28	54,9
Células Plasmáticas	22	23,7	10	19,6
Infiltrado Mixto	19	20,4	12	23,5
Eosinófilos	0	0	1	2,0
	93	100,0	51	100,0

Tabla 8: Distribución de frecuencias de la celularidad predominante en los infiltrados inflamatorios peritumoral e intratumoral.

La presencia variable de **ulceración** indicó si el tumor tenía o no solución de continuidad en el momento del diagnóstico. Según esto, el 48,3% de los tumores presentaron ulceración en ese momento, el 29,2% no estuvieron ulcerados, y en el resto de los casos este dato no constaba. En la Figura 15 se representan ejemplos de CEC ulcerados clínicamente.



Figura 15: CEC ulcerados: (a) sien derecha; (b) cuero cabelludo; (c) región preauricular. Estos tumores exhibieron además clínicamente una velocidad de crecimiento rápida (mayor de 5 mm / mes).

VARIABLES		N	Porcentaje	
Histopatológicas	Espesor (media /desviación estándar)	7,15 (DS 4,39)		
	Tamaño (media /desviación estándar)	19,27(DS 9,55)		
	Grado de diferenciación	Bueno	30	30,6
		Moderado	49	50
		Pobre	19	19,4
	Patrón de crecimiento	Expansivo	26	26,5
		Mixto	18	20,4
		Infiltrativo	54	53,1
	Infiltración perineural		23	23,5
	Invasión linfovascular		7	7,1
	Desmoplasia		19	19,4
	Elastosis solar		95	96,9
	QA asociada a tumor		70	71,4
	Infiltrado inflamatorio peritumoral	Nulo	5	5,1
		Escaso	18	18,4
		Moderado	33	33,7
Intenso		42	42,9	
Infiltrado inflamatorio intratumoral	Nulo	46	46,9	
	Escaso	31	31,6	
	Moderado	13	13,3	
	Intenso	8	8,2	

Tabla 9: Resumen de características histopatológicas de la serie de carcinoma epidermoide cutáneo: V (varón), M (mujer) QA (queratosis actínica), ESC (exposición solar crónica), CCNM (cáncer cutáneo no melanoma), CEC (carcinoma epidermoide cutáneo), CC (cabeza y cuello), MM (miembros), DS (desviación estándar).

2.1.4 Descripción de las variables histopatológicas evaluadas en el grupo de CEC en los que se determinaron los miRNA mediante HIS y QPCR

La descripción de las variables histopatológicas evaluadas en la serie de CEC en los que la determinación de la expresión de los miRNA se realizó tanto con HIS como con QPCR aparece en la Tabla 10.

VARIABLES		N	Porcentaje	
Histopatológicas	Espesor (media/DS)		6,07 (3,95)	
	Tamaño (media/DS)		18,09 (7,06)	
	Grado de diferenciación	Bueno	20	42,6
		Moderado	21	44,7
		Pobre	6	12,8
	Patrón de crecimiento	Expansivo	13	27,7
		Mixto	16	38,3
		Infiltrativo	18	34
	Infiltración perineural		7	14,9
	Invasión linfovascular		1	2,1
	Desmoplasia		7	14,9
	Ulceración		18	38,3
	Elastosis solar		46	97,8
	QA asociada a tumor		27	57,4
	Infiltrado inflamatorio peritumoral	No intenso	24	51,1
Intenso		23	48,9	
Infiltrado inflamatorio intratumoral	No intenso	46	97,9	
	Intenso	1	2,1	

Tabla 10: Variables histopatológicas de la muestra de CEC en los que la validación de la expresión de miRNAs se realizó por QPCR y por ISH: DS (desviación estándar), QA (queratosis actínica).

2.1.5 Descripción de las variables histopatológicas en el grupo de enfermedad de Bowen y carcinoma bowenoide

En los casos en los que el espesor del tumor fue medible (se excluyó enfermedad de Bowen) el 50% tuvieron un espesor mayor de 2 mm, y el 50% restante de menos de 2 mm (siendo de 10 mm el mayor espesor registrado en la serie). Todos los casos exhibieron un grado pobre de diferenciación y un patrón de crecimiento expansivo.

Por otra parte, la celularidad predominante del infiltrado inflamatorio peritumoral consistió en linfocitos y células plasmáticas. En relación con el infiltrado inflamatorio intratumoral, la celularidad fue predominantemente linfocitaria en todos los casos, salvo en uno en que predominaron los neutrófilos (probablemente en relación con la sobreinfección bacteriana secundaria a la ulceración que exhibían).

2.2 Análisis de la tinción de diversas proteínas en el CEC mediante el empleo de matrices tisulares o *tissue-arrays*

De cada uno de los 118 tumores se seleccionaron 3 áreas de 1 mm de diámetro cada una en los bloques de parafina, que fueron empleadas para la construcción de matrices tisulares o *tissue-arrays* en el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario de Salamanca. Las zonas seleccionadas de cada tumor se intentó que incluyeran el frente de invasión tumoral y áreas diferenciadas e indiferenciadas del tumor, si existían ambas, a fin de reconstruir la arquitectura representativa del mismo; para que los datos obtenidos pudieran representar todas las características del tumor, incluyendo su heterogeneidad. Para la elección de las zonas, de las que posteriormente se obtuvieron los cilindros de tejido, se emplearon las preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina. Sobre los *tissue-arrays* se llevaron a cabo distintas técnicas de inmunohistoquímica para determinar el patrón y la intensidad de tinción de distintos marcadores proteicos con el fin de evaluar la expresión de E-CADHERINA, VIMENTINA, CITOQUERATINA AE1, P63 y CD44, el índice de proliferación (Ki67), supresores tumorales (P16 y P53), receptores de crecimiento epidérmico (EGFR), quimiocinas (CXCR4) y marcador del endotelio linfático (PODOPLANINA o D2-40). Además, se determinó la expresión de *miRNA-203* y *miRNA-205* mediante hibridación *in situ*; así como los cambios genómicos del gen *EGFR* mediante FISH.

2.2.1 Construcción de las matrices tisulares o *tissue-arrays*

a.) Preparación de bloques de *tissue-array* o TMA. Se construyó un nuevo bloque de parafina para cada una de las matrices tisulares. Los bloques de parafina se construyeron fundiendo la parafina a 55-58°C y vertiéndola en un molde metálico. Se colocó a continuación un recipiente de plástico (*cassette*) sobre el bloque de parafina hasta que se produjo el enfriamiento de la misma y se pudo retirar el molde metálico. Se empleó el micrótopo para eliminar las irregularidades del bloque, asegurándonos de que éste estaba libre de huecos, resultantes de la formación de burbujas durante su preparación.

b.) Diseño del *tissue-array*. Se seleccionaron, como hemos comentado, los lugares de los bloques de los que extraer el *punch*, para lo que se evaluaron las zonas en las preparaciones de hematoxilina-eosina, y se señalaron en los bloques de parafina las áreas de interés con un círculo (3 para cada tumor). Se planificó, a continuación, el diseño de las matrices tisulares (ver esquemas) antes de comenzar a introducir las muestras de tejido en los bloques de parafina. Después, se procedió a la realización de las matrices tisulares. Las

muestras de tejido que se incluyeron fueron de 1 mm de espesor y el espacio entre los círculos de los *punchs* fue de 2 mm.

c.) Alineamiento de los *punchs*. Antes de realizar el primer *array* tisular se efectuó el alineamiento de las agujas del *tissue arrayer* para que los cilindros de tejido que se fueran colocando se encontrara también alineado (éstas agujas son elementos metálicos huecos que sirven para la realización de los agujeros en el bloque de parafina y para la obtención de los cilindros de tejido, que se incluirán posteriormente en el nuevo bloque con todos los cilindros).

d.) Construcción del *array* Se colocó el bloque blanco de parafina sobre el soporte y se ajustó para mantenerlo fijo sobre dicho soporte. A continuación, se procedió a la inclusión de los cilindros de tejido. En cada caso se realizó inicialmente un orificio en el bloque de parafina con la aguja de menor diámetro (Figura 16), seguido de la extracción del cilindro de tejido del bloque original con la aguja de mayor grosor (Figura 17). Posteriormente, se introdujo el cilindro sobre el bloque de parafina del *tissue array* (Figura 18). Este proceso se repitió con cada una de las regiones de interés que previamente se habían seleccionado de los bloques de parafina originales, a partir del análisis de las preparaciones de hematoxilina-eosina de los tumores.

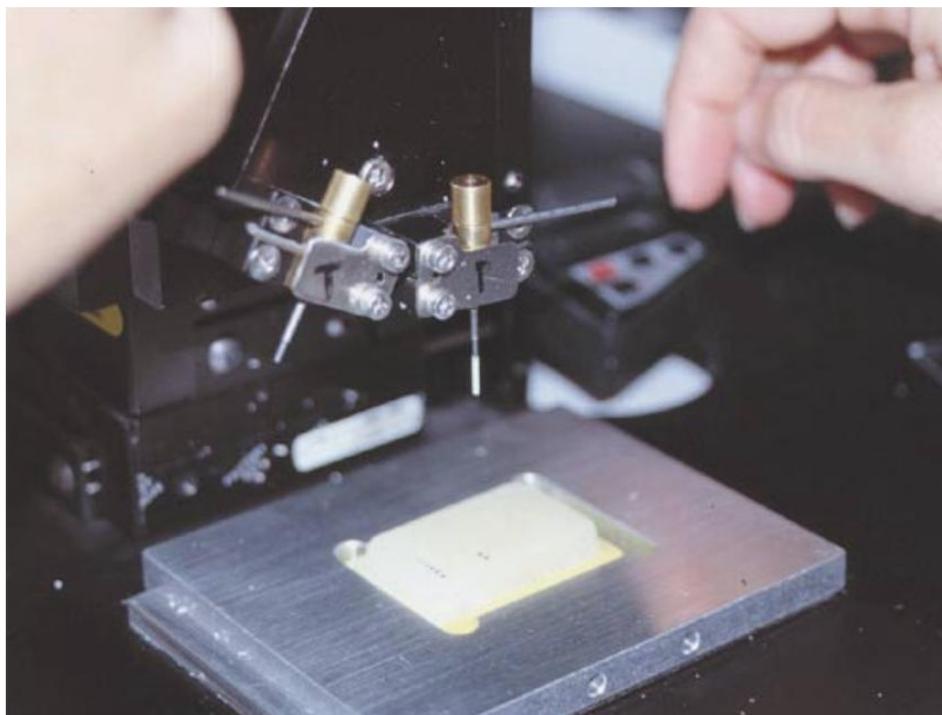


Figura 16: Con una aguja de calibre fino se extrae un molde de parafina del bloque receptor. Empleamos coordenadas específicas medidas con precisión micrométrica.



Figura 17: Se toma una “biopsia” de la zona marcada en el bloque donante con una aguja de centro hueco y de mayor grosor que la anterior.

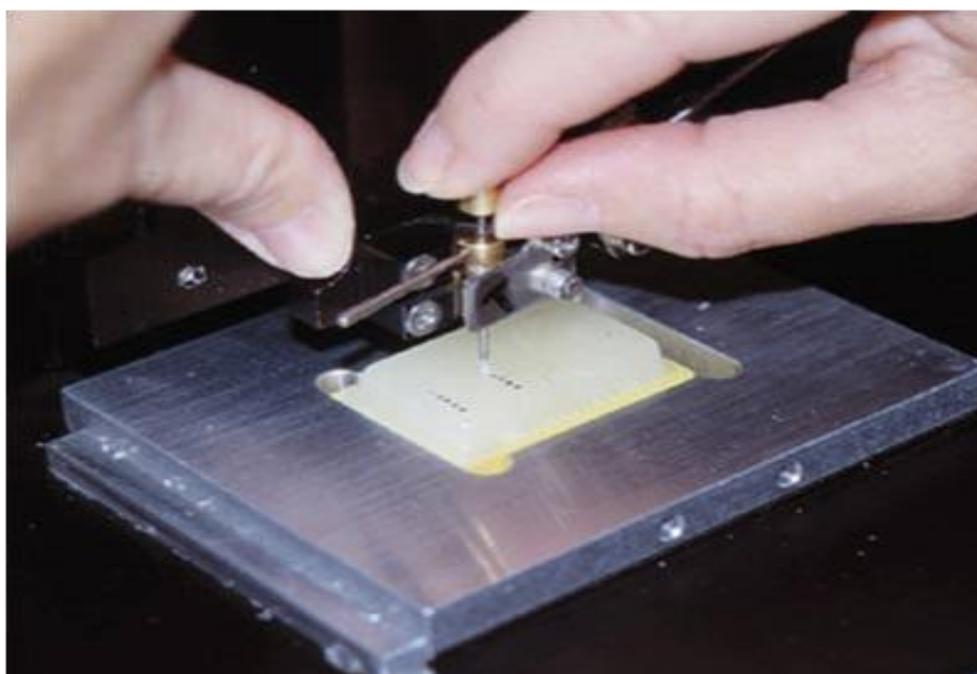


Figura 18: Introducción del cilindro tomado del bloque tumoral en el hueco que hemos dejado en el bloque donante. El cilindro se empuja con un émbolo situado en el interior de la aguja.

e.) Corte de los bloques de parafina. Antes de realizar los cortes de parafina para la posterior tinción se presionó la superficie del tissue array (Figura 19) alisó la superficie del bloque de parafina con el micrótopo. Previamente, se mantuvo el bloque en un baño de 37°C durante 10-15 minutos, lo que templó la parafina y favorece la adherencia de los cilindros de tejido al bloque. Después se aplicó presión sobre la superficie del bloque con un portaobjetos, lo que es importante porque el nivelado del bloque maximiza el número de secciones que contendrán muestra de tejido. Se dejó, posteriormente, que el bloque se enfriara a temperatura ambiente y, una vez extraído del soporte, se procedió a igualar la superficie del bloque con un micrótopo. Posteriormente, se realizaron los cortes sobre el nuevo bloque de parafina y se colocaron en un portaobjetos previamente a la realización de las tinciones.



Figura 19: Presión con un portaobjetos cada cilindro inducido con el fin de dejarlos todos a la misma altura. Así evitamos perder los primeros cortes.

2.2.2 Tinciones de inmunohistoquímica

En todas las muestras de CEC realizamos tinciones inmunohistoquímicas para estudiar la expresión de varias proteínas a fin de relacionarlas con distintas variables clínico-patológicas del CEC, incluidas Ki-67 (MIB-1), E-CADHERINA, VIMENTINA, AE1, CD44, P63, P53, P16, CXCR4, CD44, D2-40 y EGFR. Todas las proteínas, salvo Ki-67, se analizaron en la zona más diferenciada y en la más indiferenciada de los tumores. Esta última, se evaluó globalmente en todo el

tumor, para indicar el índice de proliferación del tumor completo. Asimismo, en el EGFR se valoró su patrón de tinción aberrante o no aberrante, que hace referencia a la presencia de tinción exclusivamente en la membrana celular (no aberrante) y/o en el citoplasma de la célula (aberrante) (Uribe and Gonzalez, 2011).

El método de inmunohistoquímica utilizó en todos los casos anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano, que desdobra el agua oxigenada y produce agua y radicales libres que oxidan un sustrato incoloro, la diaminobenzidina, que entonces adquiere un color pardo. Tras un desparafinado inicial de 24 horas, los cortes se pasan al robot Leica BOND-III para el desparafinado y el desenmascaramiento antigénico con buffer citrato, compuesto por un 40% de una solución A (ácido cítrico 0,1 M e hidróxido sódico 1 M) y un 60% de una solución B, con ácido clorhídrico al 0,1 %. Después se bloquearon las peroxidasas endógenas mediante peróxido de hidrógeno al 30% en metanol, seguido de un lavado con PBS. A continuación, se incubaron todas las muestras mediante los anticuerpos primarios correspondientes frente a: Ki-67 (MIB-1), E-CADHERINA, VIMENTINA, AE1-AE3, P53, P16, P63, CXCR4, CD44, D2-40 y EGFR (Tabla 11).

Posteriormente, se procedió al lavado y revelado con el sistema *Novolink Polymer System*: Se añadió un anticuerpo secundario, que va dirigido frente a la región constante del anticuerpo primario, y conjugado con peroxidasa de rábano picante. El anticuerpo secundario se diluyó con suero del animal de origen (ratón o conejo en nuestro estudio) al 10% en solución salina tamponada con buffer TRIS y se añadió el cromógeno (diaminobenzidina). Por último, se efectuó una contratinción con hematoxilina durante 9. El proceso anteriormente descrito fue el indicado por el fabricante del procesador y fue similar para todos los anticuerpos primarios utilizados.

ANTICUERPO	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL	CLON
KI-67	1:100	Master Diagnóstica	SP6
E-CADHERINA	1:50	Master Diagnóstica	EP700Y
VIMENTINA	1:400	Master Diagnóstica	V9
AE-1	1:50	Master Diagnóstica	AE1
P53	1:100	Leica	D0-7
P63	Prediluida según casa comercial	Biocare	BC4A4
P16	Prediluida según casa comercial	Roche	JC8
CXCR4	1:100	Santa Cruz Biotechnology Inc.	G-19
CD44	1:50	Leica	VFF-327v3
D2-40	Prediluida según casa comercial	Leica	D2-40
EGFR	Prediluida según casa comercial	Dako	HER1

Tabla 11: Anticuerpos utilizados en la inmunohistoquímica, con su dilución, casa comercial y clon.

2.2.3 Análisis de las tinciones de inmunohistoquímica

Se realizó un análisis semicuantitativo de la expresión de las distintas moléculas estudiadas. Se determinaron los porcentajes de células positivas, la intensidad de tinción y la localización de la tinción en las diferentes áreas (zona diferenciada, indiferenciada y frente de invasión de los tumores). Se determinó la intensidad de tinción y se consideró (i) negativa (-), si no existía tinción o ésta estuvo presente en menos del 5 % de las células; (ii) positiva (+), si la tinción afectó a un porcentaje de células entre el 5 % y el 25 %; (iii) positiva (++), si la tinción fue positiva entre el 50 % y el 75 % de las células; y (iv) positiva (+++), si la tinción afectó a más del 75% de las células.

Estas medidas se analizaron de manera independiente en las zonas más diferenciadas y más indiferenciadas de los tumores, obteniéndose finalmente un índice tumoral global. Si en el análisis de la tinción con hematoxilina-eosina, el tumor estaba completamente bien diferenciado en toda su extensión y, por tanto, no existía ningún “punch” en el TMA con grado pobre de diferenciación, la intensidad de tinción correspondiente a la zona indiferenciada se consideró “no aplicable”; y viceversa, cuando un tumor fue mal diferenciado en toda su extensión y, por tanto, no existía ninguna sección en el TMA con buena diferenciación, la valoración de su intensidad de tinción correspondiente a la zona diferenciada se consideró “no aplicable”. Cuando hubo pérdida de algún cilindro, los datos para ese cilindro se anotaron como “no aplicables”, y el valor global del tumor se construyó con la media de los valores disponibles. Para evaluar la intensidad de tinción global del tumor, se empleó un índice que consistió en la media ponderada de la intensidad de tinción demostrada en cada una de las zonas del mismo. Éste se obtuvo de multiplicar el tanto por uno de células tumorales con una intensidad de inmunotinción negativa por 0, más el tanto por uno de células cancerosas con una intensidad de inmunotinción positiva de una, dos o tres cruces por 1, por 2 y por 3, respectivamente, como se describe en la fórmula: **Score = 0 (º/1 células “-“) + (º/1 células “+”) + 2(º/1 células “++”) + 3(º/1 células “+++”)**. Cuando los índices fueron discordantes entre los observadores, el caso se sometió a discusión de consenso. Para cada muestra se recogió también la localización de la tinción (núcleo, citoplasma o membrana). En el EGFR se recogió si su patrón de tinción era normal (tinción de membrana) o aberrante (citoplásmica) (Uribe and Gonzalez, 2011). En la cuantificación del marcaje frente a Ki-67, se determinó el porcentaje de células teñidas.

Posteriormente, para llevar a cabo el estudio de otras asociaciones, se redasificó la intensidad de tinción, para transformarla en una variable dicotómica, según los estudios. Así se consideró: (i) en negativa (-), cuando menos del 25 % de las células presentaron tinción, y positiva (+), cuando más del 25 % de las células la presentaron; (ii) en otros estudios, se consideró también más del 75 % y menos del 75 % de células positivas, cuando comparamos

expresión intensa frente a no intensa; y (iii) nula, cuando hubo menos del 5 % de células positivas al marcador frente a no nula cuando más del 5 % la expresaba.

2.3 Detección de EGFR mediante FISH

Para la detección de EGFR mediante FISH, se obtuvieron secciones seriadas de 4 μm que contenían zonas representativas de cada tumor. El número de copias de EGFR por célula se determinó mediante el software *LSI EGFR SpectrumOrange/CEP 7 Spectrum Green probe* (Vysis; Abbott Laboratories, Downers Grove, IL). El protocolo de detección fue como sigue: las secciones de tejido embebidas en parafina de 4 μm de grosor fueron desparafinadas, deshidratadas y secadas al aire. Las muestras se colocaron en EDTA 2 mM (pH 9) durante 15 minutos. Tras el enfriamiento, las muestras fueron transferidas a una jarra de Coplin que contenía un buffer con 40 ml de NaCl al 0,9% y 160 mg de pepsina (Sigma) (pH 1.5), precalentado a 37° C. Tras la incubación durante 15 minutos, las secciones fueron deshidratadas en alcohol y fijadas en metanol: ácido acético en una proporción de 3:1, durante 10 minutos. Las muestras se incubaron en una cámara de hibridación *Hybrite* (Vysis) durante 12 minutos a 72° C, seguido de 15-20 horas a 37° C. Tras la hibridación, se procedió al lavado en soluciones estándar de citrato salino. Los núcleos fueron contrateñidos con 4',6-diamino-2-fenilindol DAPI (*Vector*). Las imágenes se tomaron con un microscopio de epifluorescencia *Olympus BX60* acoplado a una cámara digital CCD y fueron evaluadas con el software *Cytovision* (*Applied Imaging*). Fueron analizadas, por muestra unas 200 células tumorales no superpuestas. Las muestras se clasificaron en 2 grupos: (i) FISH-negativas, aquellas sin cambios genómicos o con menos de 4 copias del gen *EGFR* en más del 40 % de las células; y (ii) FISH-positivas, aquellas con una alta proporción de polisomías traducidas en a) más de 4 copias del gen en más del 40 % de las células o b) amplificaciones genómicas, definidas por una ratio de gen/cromosoma, por célula, mayor de 2 ó mayor de 15, en más del 10 % de las células analizadas. En la Figura 20 se representa un esquema de la hibridación in situ de fluorescencia (FISH) para EGFR.

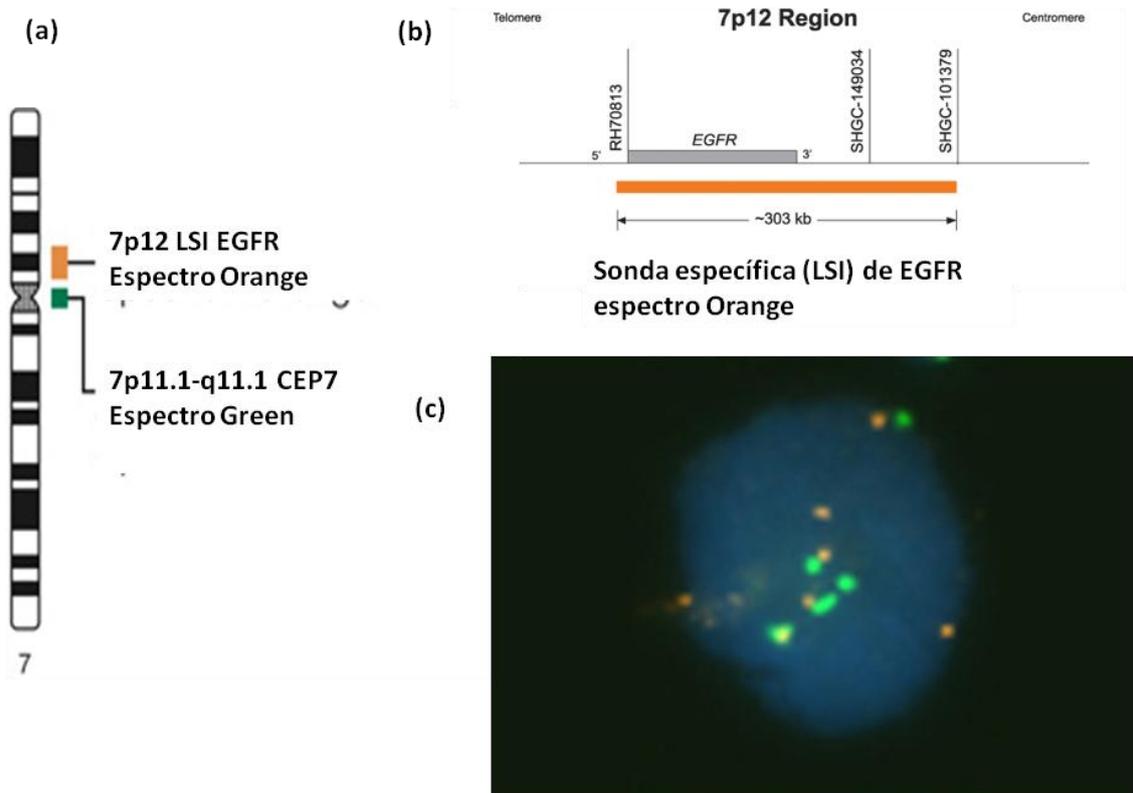


Figura 20: Esquema que representa la hibridación in situ de fluorescencia (FISH) para EGFR: (a) Esquema del cromosoma 7 con las posiciones de la sonda específica para EGFR (7p12) con marcaje naranja (espectro orange), y del centrómero (CEP7) con marcaje verde (espectro Green); (b) esquema de la zonas específicas de EGFR reconocidas por la sonda; (c) Célula anormal hibridada con las sondas específicas frente a EGFR espectro Orange / CEP7 espectro Green (Vysis). La célula contiene múltiples señales del gen EGFR (naranja) y del centrómero del cromosoma 7 (verde).

2.4 Descripción de las variables moleculares evaluadas en el estudio

2.4.1 Descripción de las variables moleculares evaluadas en el grupo de pacientes con CEC

La **intensidad de expresión** de cada una de los marcadores analizados se evaluó globalmente en el tumor y en las zonas diferenciadas e indiferenciadas de cada uno de los tumores, para intentar valorar de manera más fiable la heterogeneidad tumoral. En los tumores bien diferenciados sólo se consideró la zona diferenciada del tumor, por cuánto ésta representó más del 75% de la superficie tumoral observada, y se asumió que estos tumores carecían de zona indiferenciada; de forma análoga, en los pobremente diferenciados, y dado

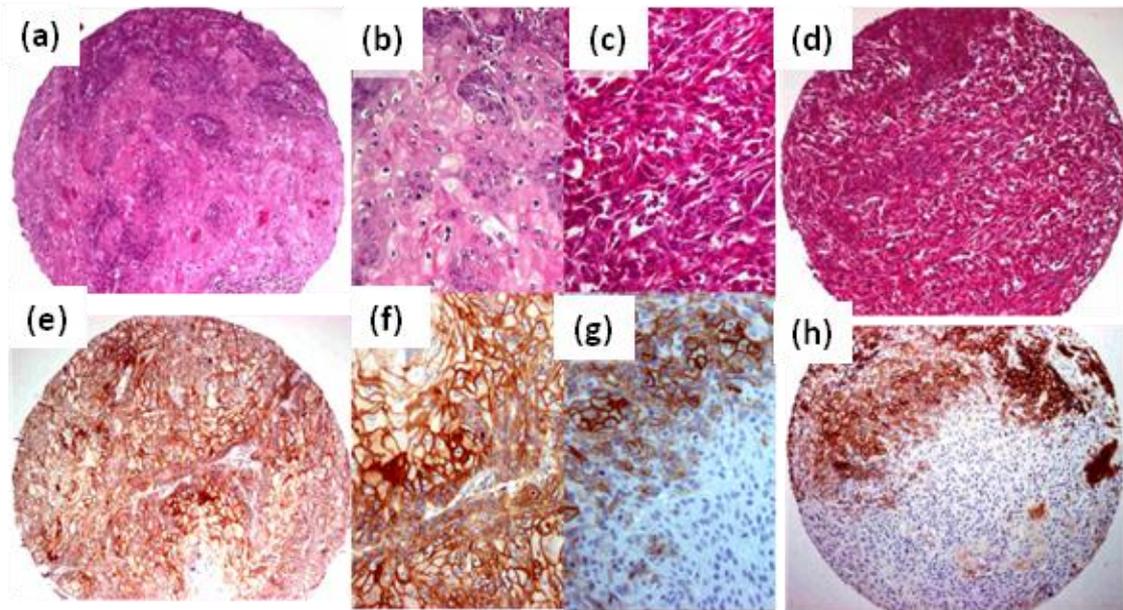
que en ellos la zona indiferenciada representaba al menos el 75% de la superficie tumoral, no se consideró la intensidad de expresión en la zona diferenciada del tumor por asumirse que esos tumores carecían de zona diferenciada. Por su parte, en los moderadamente diferenciados, se consideró la intensidad de expresión tanto en las partes más diferenciadas del tumor (zona diferenciada), como en las menos diferenciadas (zona indiferenciada).

Respecto a la **gradación de la intensidad de expresión**, ésta se consideró como nula, escasa, moderada o intensa según estuviese ausente, afectara a menos del 25% de las células tumorales, afectara entre el 25 y el 75% de las células tumorales o a más del 75% de las mismas, respectivamente. Para establecer las comparaciones, las variables se transformaron en dicotómicas, según el estudio y que ya hemos explicado y comentaremos en su caso; pero a efectos descriptivos conservamos la gradación original. Debido a que la evaluación de estas tinciones se realizó a partir de matrices tisulares o “tissue-arrays” y a que únicamente cuando la tinción había salido correctamente en todas las áreas de cada tumor se consideraron los valores observados, existen algunos valores perdidos que son diferentes para cada estudio

E-CADHERINA

La E-CADHERINA se expresó habitualmente de manera moderada o intensa en nuestra serie de CECs, de modo que la expresión nula fue poco frecuente (Figura 21). Como cabría esperar, no hubo ausencia de expresión de E-CADHERINA en las zonas diferenciadas de los tumores, mientras en las zonas indiferenciadas E-CADHERINA no se expresó en el 14% de los casos, siendo nula su expresión fundamentalmente en las zonas indiferenciadas con células de morfología fusiforme (Tabla 13). Hemos evaluado la expresión de membrana de E-CADHERINA, aunque algunos autores también han considerado la expresión nuclear de este marcador en el CEC (Toll *et al.*, 2013b).

Panel (1)



Panel (2)

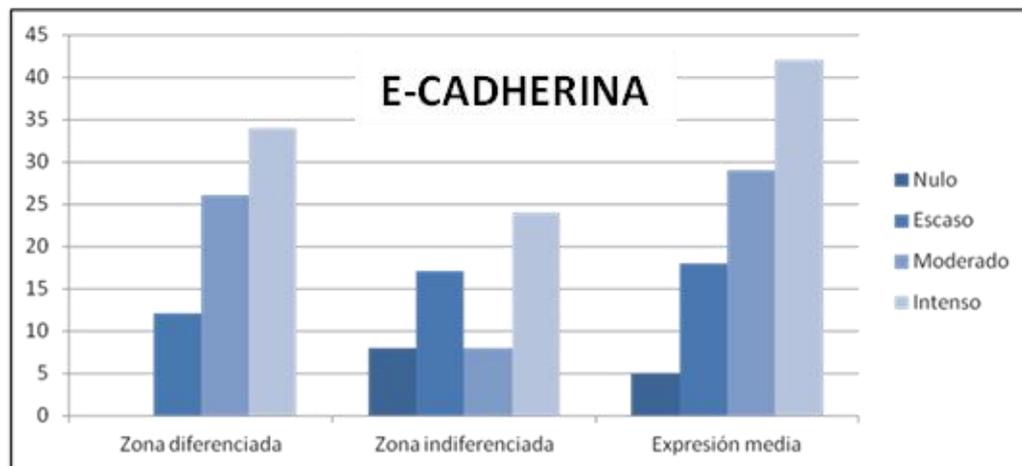


Figura 21: Expresión de E-CADHERINA en nuestra cohorte de pacientes. En el panel (1) tumor bien diferenciado en H&E (a) (100X), (b) (400X) y pobremente diferenciado en H&E (c) (100X), (d) (400X). Inmunohistoquímica frente a E-CADHERINA en el tumor bien diferenciado (100x) (e), (f) (400X) con expresión intensa, y en el pobremente diferenciado (g) (100x) y (h) (400X) con expresión escasa en la zona superior (células de morfología epitelial) y nula en la zona indiferenciada con células fusiformes. (Panel (2) Distribución de frecuencias de la intensidad de tinción de E-CADHERINA en nuestra cohorte de CEC.

VIMENTINA

La VIMENTINA, como cabría esperar, se comportó de manera opuesta a la E-CADHERINA en cuanto a su intensidad de expresión (Toll *et al.*, 2013b). Así, la mayoría de los tumores no expresaron VIMENTINA, que se acercó al 90% de los casos en la zona diferenciada (sólo 8 tumores expresaron VIMENTINA en la zona diferenciada con intensidad escasa), 4 tumores tuvieron expresión intensa y 5 moderada en la zona indiferenciada y estuvo ausente en torno al 75% de los casos, cuando se tuvieron en cuenta todas las áreas del tumor (23 tumores expresaron VIMENTINA con algún grado de intensidad en la zona indiferenciada) (Tabla 13, Figura 22).

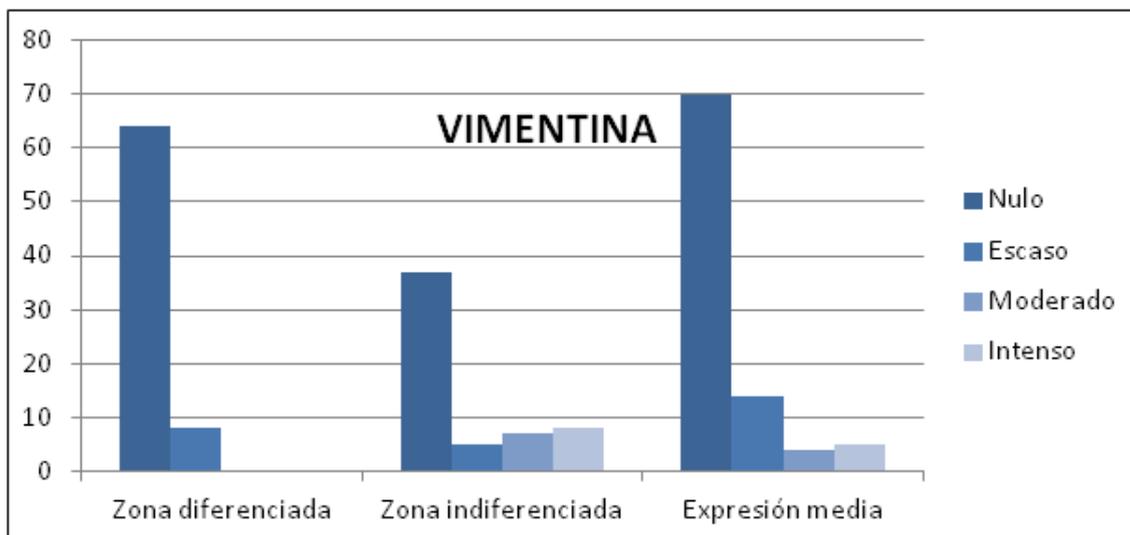


Figura 22: Distribución de frecuencias de la intensidad de tinción de VIMENTINA en nuestra cohorte de CEC en función de la diferenciación tumoral.

P63

P63 es un marcador de célula *stem* del epitelio cutáneo (Leonard *et al.*, 2011) y se ha implicado en algunas formas de cáncer (Graziano and De Laurenzi, 2011), actuando habitualmente como supresor tumoral, pero también como oncogén (Mills, 2006). P63 se expresó con cierto grado de intensidad en todos los casos, siendo más frecuente la expresión escasa en la zona diferenciada de los tumores y más frecuente la expresión intensa en la zona

indiferenciada. Globalmente, la expresión de P63 se presentó más frecuentemente con un grado de expresión moderado (Tabla 13, Figura 23).

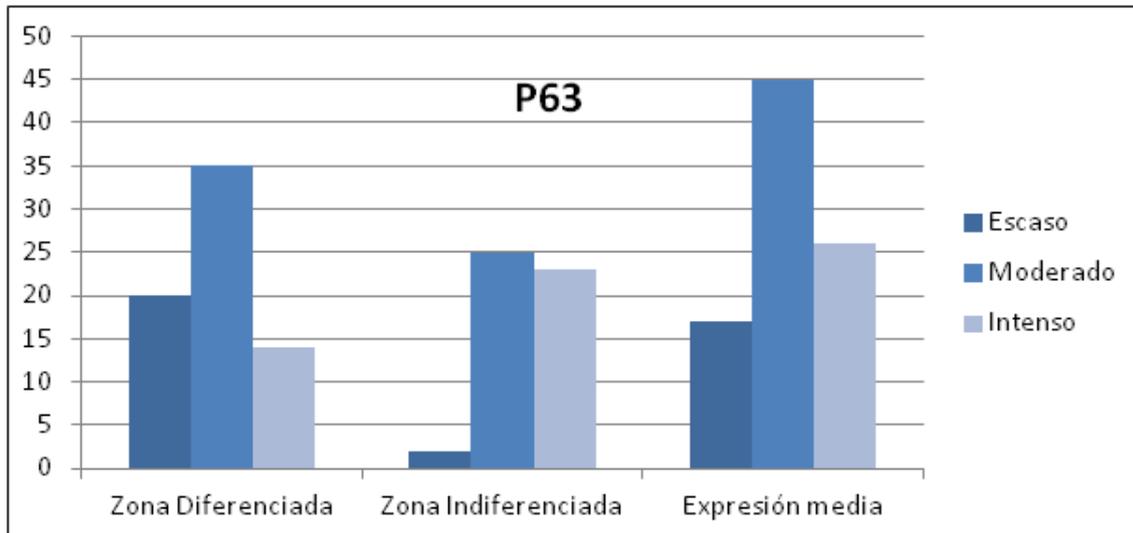
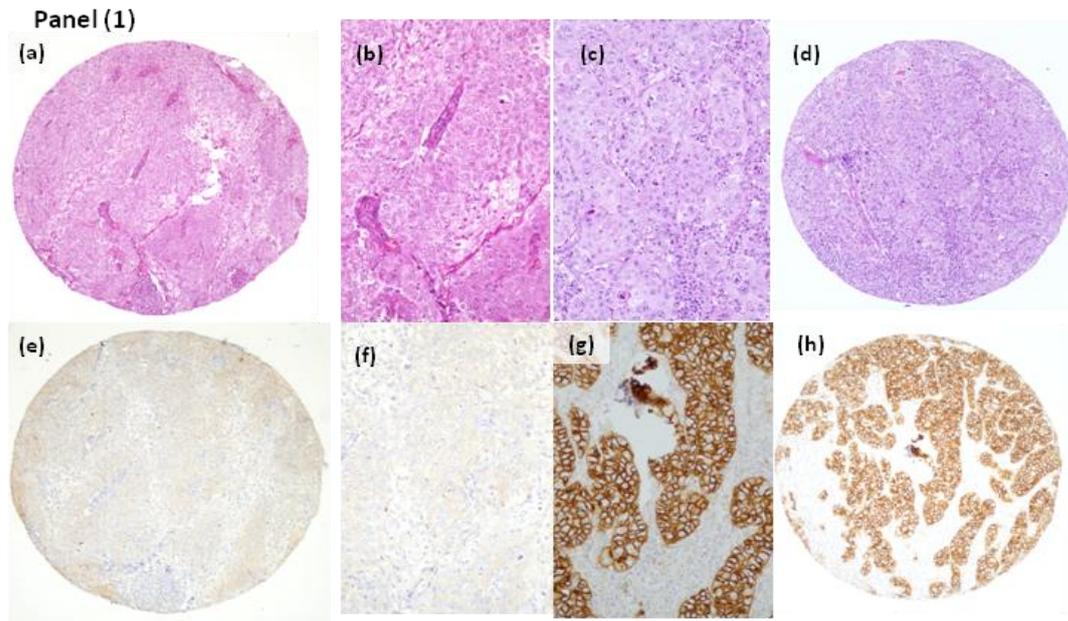


Figura 23: Distribución de frecuencias de la intensidad de expresión de P63 en los CEC de nuestra cohorte según las zonas de diferenciación tumoral.

RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPITELIAL

El receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR) se expresó, con cierto grado de intensidad, en la mayoría de los casos de CEC de la serie. En la mayoría de los tumores EGFR se expresó de manera moderada o intensa, y fue muy poco frecuente la expresión nula o escasa (Tabla 13, Figura 24). Con la idea de que la variable estuviera mejor balanceada en las comparaciones, y teniendo en cuenta que la expresión intensa de EGFR ha demostrado tener importancia pronóstica en el CEC (Ch'ng *et al.*, 2008), la variable se reclasificó en dicotómica como expresión intensa frente a no intensa (ésta última indujo los casos con expresión nula, escasa o moderada).



Panel (2)

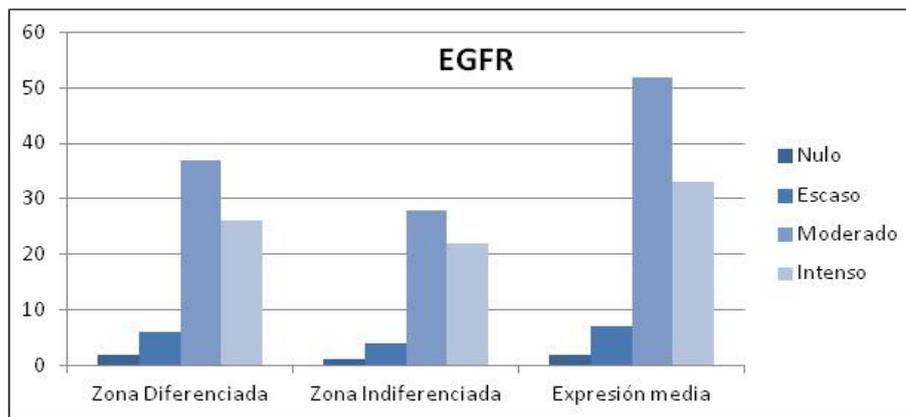
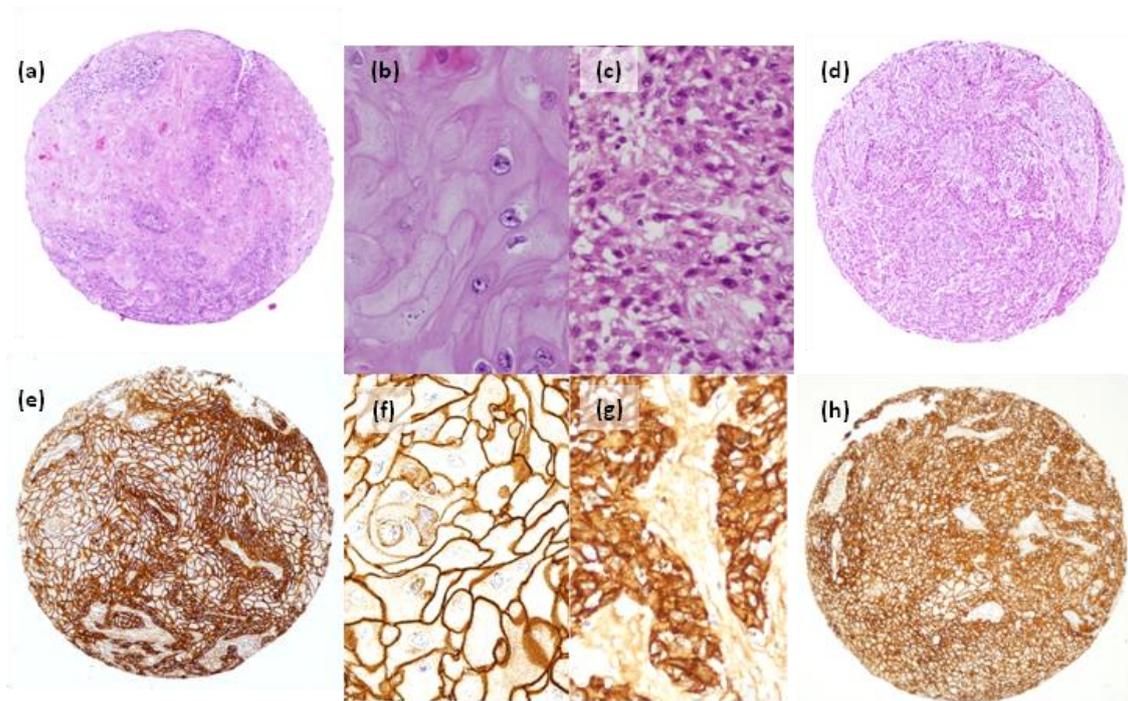


Figura 24: Expresión de EGFR en el CEC: Panel (1): H&E de dos CEC (a,d). Nótese la expresión ausente de EGFR (e, f), e intensa (g, h). Panel (2), distribución de la frecuencia de intensidad de tinción de EGFR según las zonas de diferenciación tumoral.

El **patrón aberrante de EGFR** hace referencia a la distribución subcelular de la molécula. EGFR es un receptor de membrana y, en condiciones normales, se expresa en la membrana plasmática, aunque en ciertas circunstancias puede observarse su expresión en el citoplasma, lo que se ha denominado expresión aberrante del EGFR (Uribe and Gonzalez, 2011). En general, si se considera aisladamente la expresión de EGFR en las zonas diferenciada e indiferenciada del CEC, ésta tendió a no ser aberrante. Al tener en cuenta la expresión media, y considerar tanto la zona diferenciada como la zona indiferenciada del tumor, fue ligeramente superior la proporción de tumores que presentaron expresión aberrante en alguna de las áreas que la de los tumores en los que EGFR se expresó en la membrana, si bien la proporción fue próxima al 50% para cada una de las categorías. Cuando una de las zonas del

tumor exhibió un patrón aberrante, se consideró que, globalmente, la expresión de EGFR tuvo un patrón aberrante, ya que se evaluó como presente/ausente. De este modo, se justifica esta aparente contradicción por la que, aunque en cada una de las zonas aisladas de los tumores la proporción de tumores con patrón aberrante fue menor, al referirnos a la expresión media, la proporción de tumores considerada con expresión aberrante se incrementó hasta prácticamente superar la proporción de tumores con expresión de EGFR en la membrana (Figura 25, Tabla 12).

Panel (1)



Panel (2)

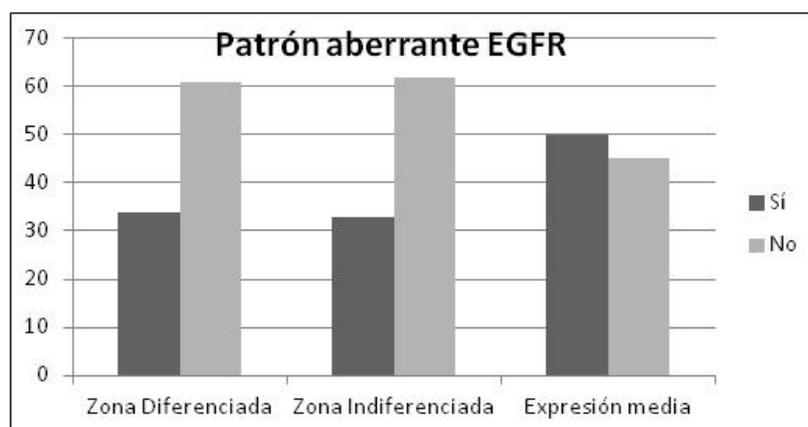


Figura 25: Patrón aberrante de expresión de EGFR: H&E de un CEC bien diferenciado (a,b) y de un CEC pobremente diferenciado (c,d). Nótese la expresión de membrana normal en el bien diferenciado (e,g) y el patrón aberrante de expresión, de membrana y citoplasmático, en el pobremente diferenciado (f,h).

Patrón aberrante EGFR		Zona diferenciada		Zona indiferenciada		Expresión media	
		N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
	Sí	34	35,79	33	34,74	50	52,63
	No	61	64,21	62	65,26	45	47,37
	Total	95	100,00	95	100,00	95	100,00

Tabla 12: Distribución de frecuencias del patrón de expresión de EGFR, tanto aberrante como no aberrante, en la serie de CEC estudiada. Se incluyen la expresión en las zonas diferenciadas, indiferenciadas y la expresión media.

La expresión de **EGFR**, como hemos indicado previamente, también fue evaluada mediante hibridación *in situ* de fluorescencia **FISH**, demostrándose amplificaciones en 6 casos, polisomías en 2 casos y ausencia de alteraciones en el resto de los tumores, utilizando los puntos de corte que se especifican en el apartado previo de esta sección de material y métodos. La Figura 26 muestra ejemplos de tinción de EGFR por FISH.

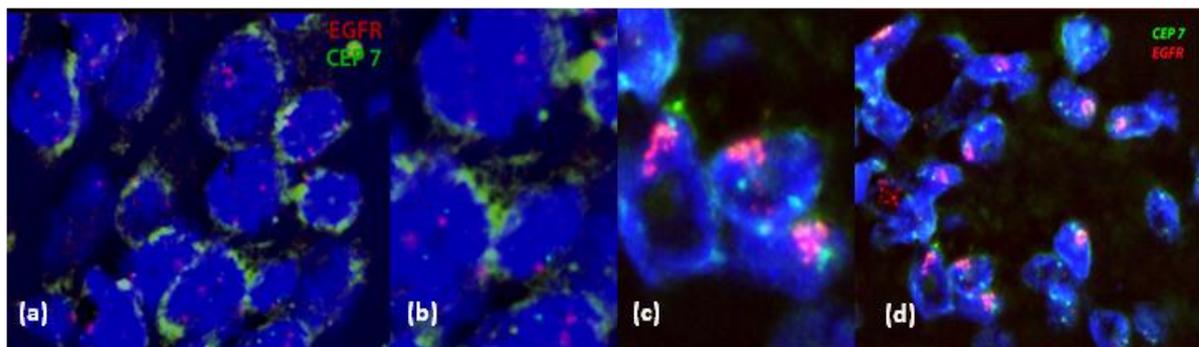


Figura 26: FISH para EGFR del CEC: Se muestran ejemplos de CEC sin cambios cromosómicos (a,b) y con amplificaciones (c,d) detectadas por FISH.

D2-40

D2-40 se ha asociado con mal pronóstico en algunas formas de cáncer. Algunos trabajos han demostrado que D2-40 se ha asociado a peor pronóstico en el CEC (Kreppel *et al.*, 2012; Toll *et al.*, 2012), pero existe controversia acerca del verdadero valor pronóstico de este marcador en el CEC.

D2-40/PODOPLANINA se expresó en los vasos linfáticos (Figura 27 -Panel 1-) y en las células tumorales en algunos casos. En estas últimas, D2-40 exhibió una tinción citoplasmática predominantemente, con refuerzo en la membrana plasmática en algunos casos (Figura 27 -Panel 2-). Globalmente, en los 94 tumores en los que pudimos evaluarlo, 56 tumores (59.57%)

presentaron ausencia de expresión de D2-40, 32 tumores (34.04%), expresión escasa y 6 tumores (6.38%) expresión moderada o intensa. D2-40 tendió a expresarse a lo largo del frente de invasión del tumor, especialmente en aquellos tumores con patrón de crecimiento infiltrativo (Figura 27 –Panel 3-). Considerando las zonas diferenciadas e indiferenciadas, D2-40 presentó más frecuentemente expresión nula en zonas diferenciadas (68.06% de los tumores), que en las pobremente diferenciadas (54.39%) aunque sobre las diferencias en la expresión de los diferentes marcadores en las distintas áreas del tumor nos referiremos en el apartado de resultados (Figura 28, Tabla 13).

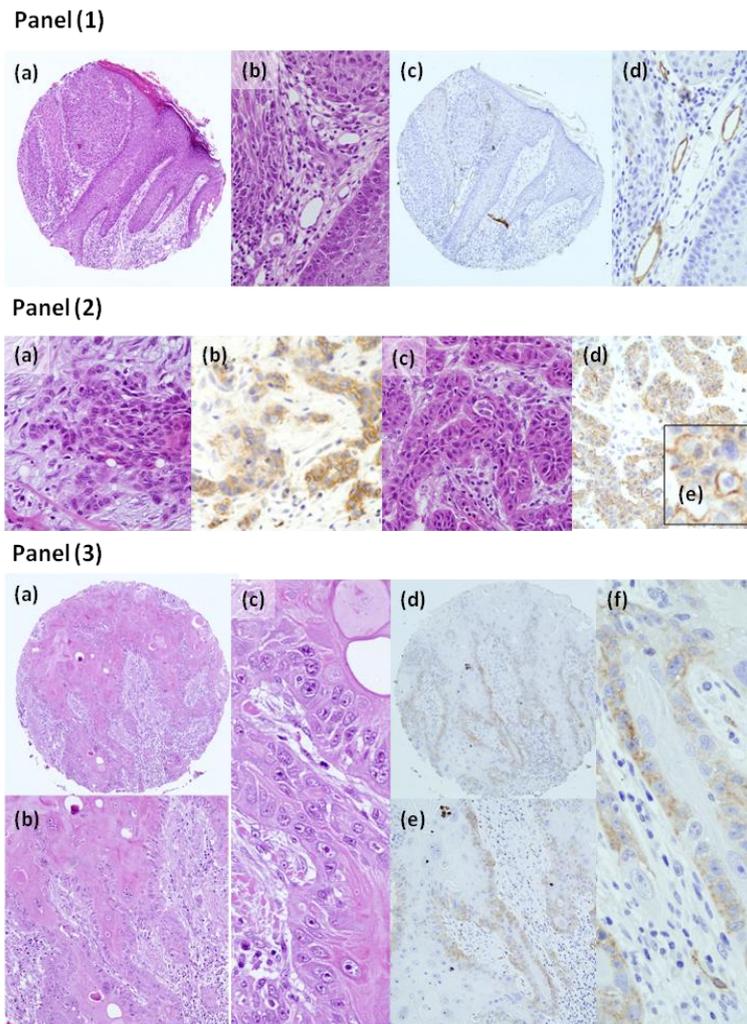
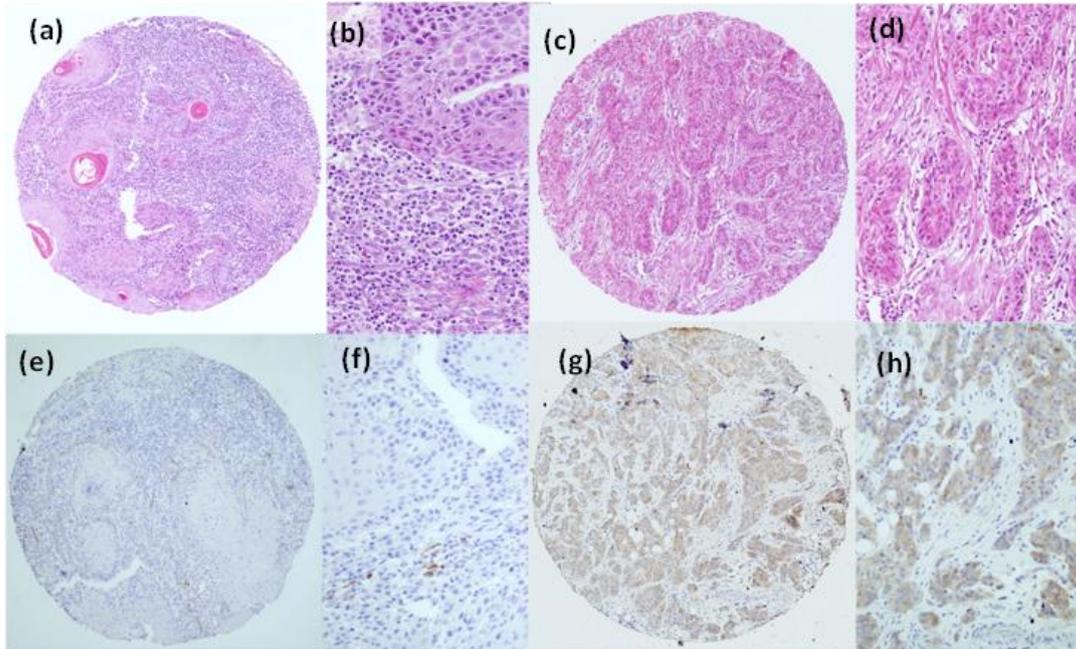


Figura 27: Características de la expresión de D2-40: Panel (1). (a) H&E de CEC; (b) se muestra a mayor aumento (100x) aquí se pueden apreciar con más detalle los vasos linfáticos (400x). (c) Inmunotinción frente a D2-40 en que se hacen evidentes los vasos linfáticos; (100x) (d) se muestra lo mismo con mayor detalle (400x). **Panel (2).** (a) H&E de células tumorales en un CEC con patrón de crecimiento infiltrativo (200x) (b) con tinción citoplasmática de D2-40 (200x). (c) H&E de CEC con patrón de crecimiento infiltrativo (c) con tinción citoplasmática y refuerzo en la membrana plasmática (d) (200x), mostrado con mayor detalle en (e) (400x). **Panel (3).** H&E en un CEC con patrón de crecimiento infiltrativo (a) (100x), (b) (200x), (c) (400x). D2-40 muestra positividad para la tinción en las células de la periferia de los lóbulos tumorales a lo largo del frente de invasión (d) (100x), (e) (200x), (f) (400x).

Panel (1)



Panel (2)

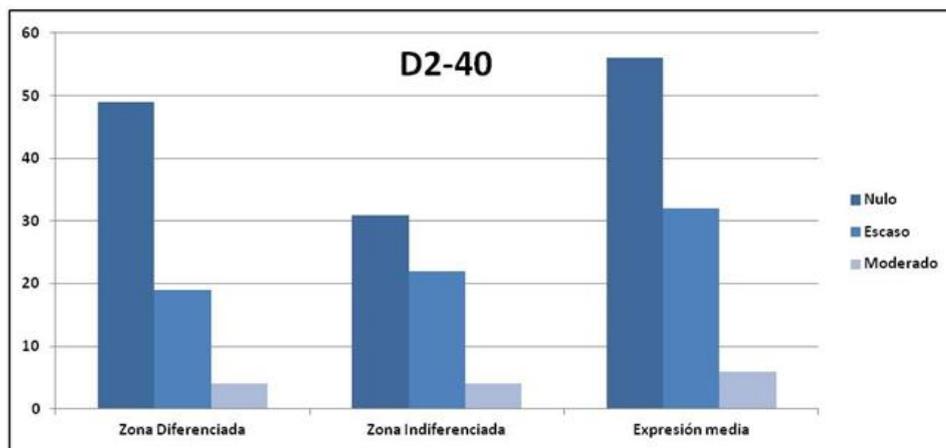


Figura 28: Expresión inmunohistoquímica de D2-40 en los CEC de nuestra serie de pacientes: Panel (1): H&E de un CEC bien diferenciado con patrón de crecimiento expansivo (a) (100x), (b) (200x) H&E de un CEC pobremente diferenciado con patrón de crecimiento infiltrativo (e) (100x), (f) (200x). El tumor de crecimiento expansivo muestra ausencia de expresión de D2-40 (e) (100x), (f) (200x). El tumor de crecimiento infiltrativo muestra una expresión intensa de D2-40 (g) (100x), (h) (200x); nótese el estroma desmoplásico en (f). **Panel (2).** Distribución de la expresión inmunohistoquímica de D2-40 en los CEC de nuestra serie en función del grado de diferenciación

CD44

CD44 fue el primer marcador de células *stem* que se empleó en tumores sólidos (Al-Hajj *et al.*, 2003) y se ha demostrado que una subpoblación de células CD44+ presenta propiedades de células *stem* tumorales en el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (Prince *et al.*, 2007). Las células CD44+ exhiben fuerte positividad para BMI-1 (marcador de células *stem*) y presentan propiedades de autorenovación y diferenciación (Prince *et al.*, 2007). Desde entonces, varios estudios han empleado el marcador CD44 para detectar células *stem* en cáncer (Chen *et al.*, 2010; Chikamatsu *et al.*, 2010; Krishnamurthy *et al.*, 2010). En este contexto, decidimos evaluar la influencia de este marcador en el CEC.

CD44 se expresó predominantemente en la membrana plasmática de las células tumorales y tuvo tendencia a localizarse en tumores infiltrativos y a lo largo del frente de invasión, pero no especialmente en los pobremente diferenciados. En relación con la frecuencia de tinción, fue moderada en casi el 40% de los tumores, escasa en algo más del 30%, nula en torno al 12% e intensa en aproximadamente un 15% (Tabla 13, Figuras 29-30).

Panel (1)

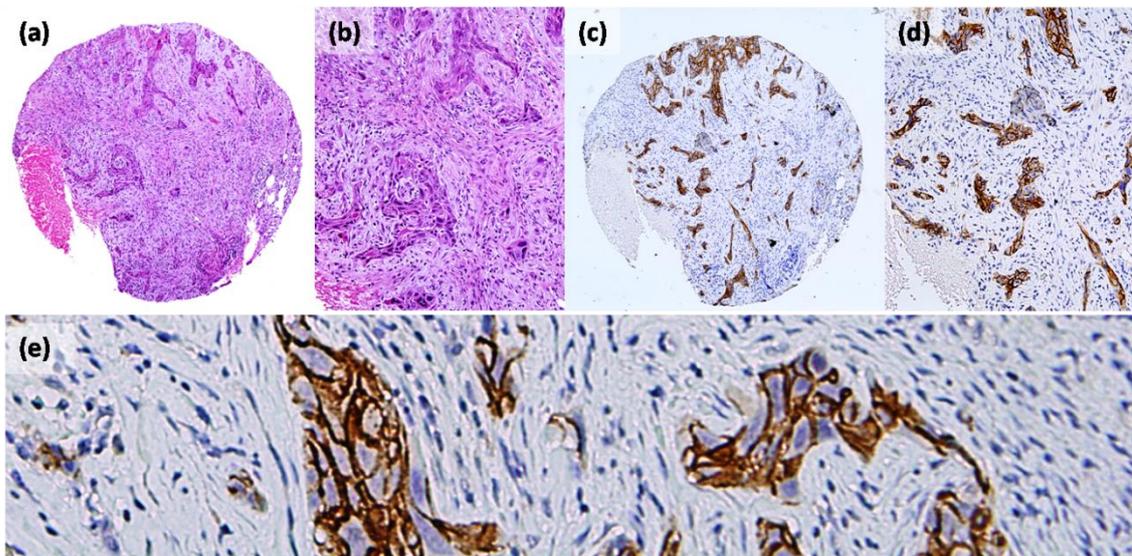


Figura 29: Expresión inmunohistoquímica de CD44 en el CEC: Panel (1): ejemplo de CEC con patrón de crecimiento infiltrativo en H&E (40x) (a) y (100x) (b) y marcada expresión frente a CD44 (40x) (c) y (100 x) (d). En la parte inferior del panel (1), se observa un detalle a 400x de la tinción inmunohistoquímica de CD44 que, predominantemente, se localiza en la membrana plasmática de las células tumorales.

Panel (2)

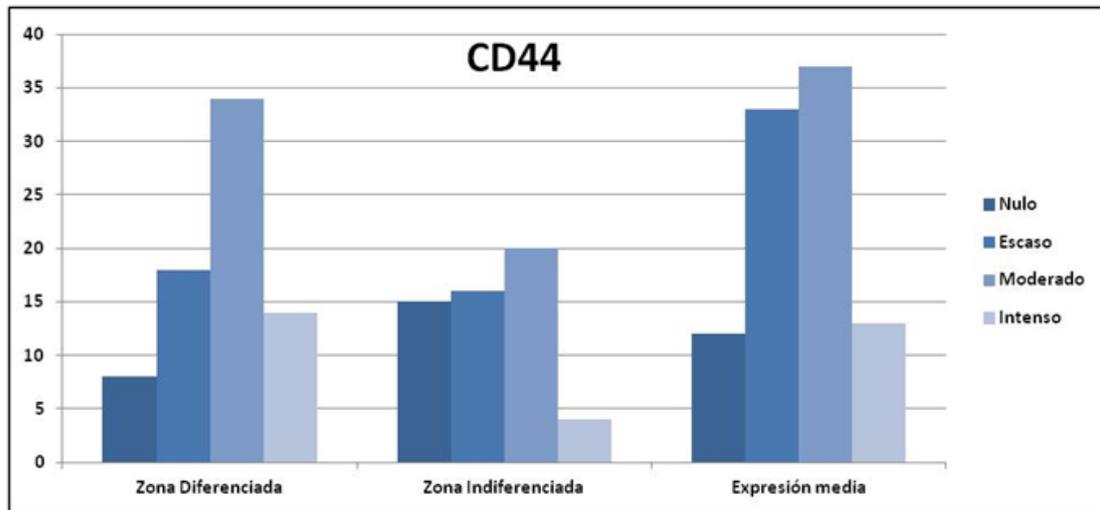


Figura 30: Expresión inmunohistoquímica de CD44 en el CEC: Panel (2): distribución de frecuencias de la intensidad de tinción de CD44 en nuestra serie de CEC, según el grado de diferenciación tumoral.

P53

P53 es un supresor tumoral que tiene importancia en distintas formas de cáncer (Levine and Oren, 2009). Aunque su mutación suele ser un evento tardío en la mayoría de los tumores, suele suceder de forma precoz en el CEC, especialmente debido a la influencia de la radiación ultravioleta (UV) (Ratushny *et al.*, 2012). Debe señalarse que es precisamente su detección lo que mejor predice su alteración funcional habitualmente por la mutación del gen que codifica P53. P53 es una molécula con una vida media muy corta y cuando está alargada indica un significado patológico (Chen *et al.*, 2013), y es precisamente en estas circunstancias cuando se detecta por inmunohistoquímica (Nelson *et al.*, 1994). Esto predice poca capacidad de discriminación entre subgrupos de CEC, porque la mayoría de estos tumores tienen P53 mutado (Brash *et al.*, 1991; Burnworth *et al.*, 2007; Campbell *et al.*, 1993; Nelson *et al.*, 1994), por lo que no ayuda a diferenciar entre grupos.

La expresión de P53 se detectó, globalmente, en unas tres cuartas partes de los casos de CEC de nuestra serie; y su grado de expresión más frecuente fue de forma moderada (Tabla 13, Figura 31).

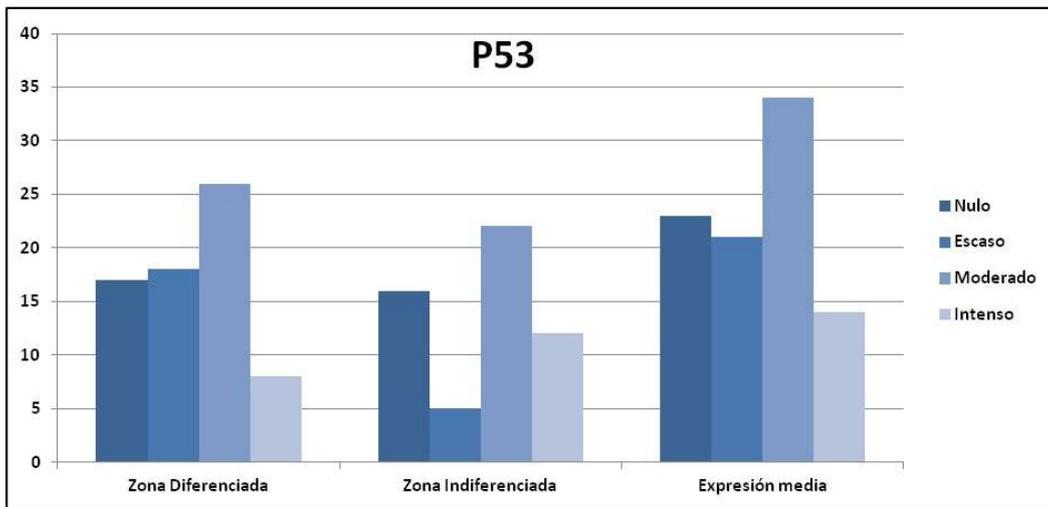


Figura 31: Distribución de la frecuencia de la intensidad de tinción de P53 en nuestra serie de CEC, según el grado de diferenciación de los tumores.

P16

Se ha demostrado que P16 exhibe funciones importantes en los queratinocitos (Burnworth *et al.*, 2007) y se ha identificado su inducción por la radiación UV (Ahmed *et al.*, 1999; Chazal *et al.*, 2002). Asimismo, se ha relacionado con el desarrollo del cáncer de piel (Mortier *et al.*, 2002), aunque su papel en el CEC y sus implicaciones potenciales en su pronóstico no son bien conocidas, motivo por el que decidimos evaluarlo. La expresión de P16 no se detectó en la mayoría de los casos de CEC de nuestra serie, especialmente en la zona indiferenciada y a nivel global. No obstante, algunos tumores sí expresaron P16 incluso de manera moderada e intensa. En las zonas indiferenciadas en más del 58% de los casos no se expresó P16, aunque su expresión fue intensa en el 11%. En las zonas diferenciadas P16 se expresó de manera intensa sólo en el 6% de los casos (Tabla 13, Figura 32).

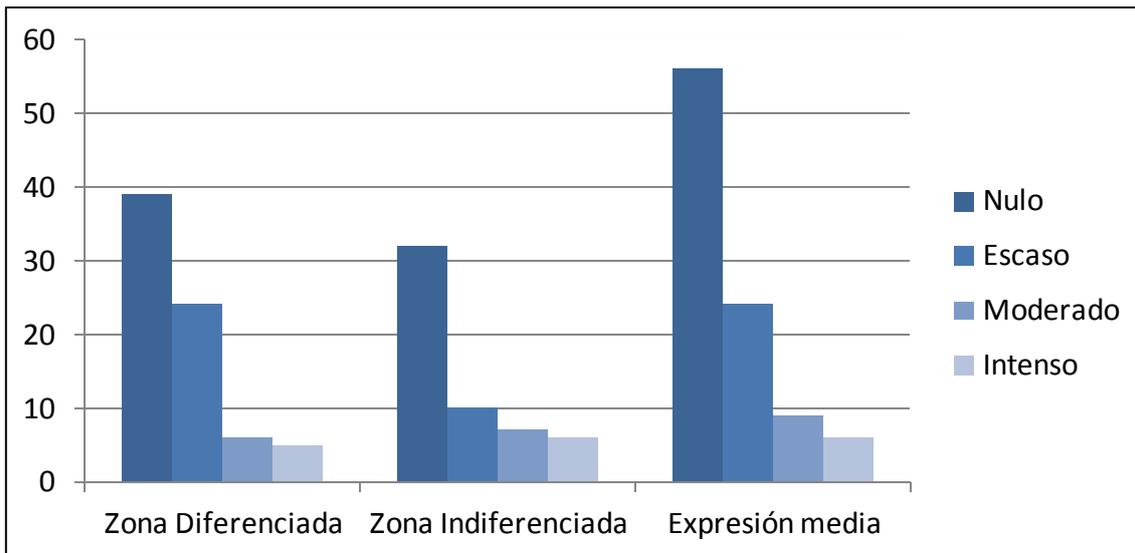


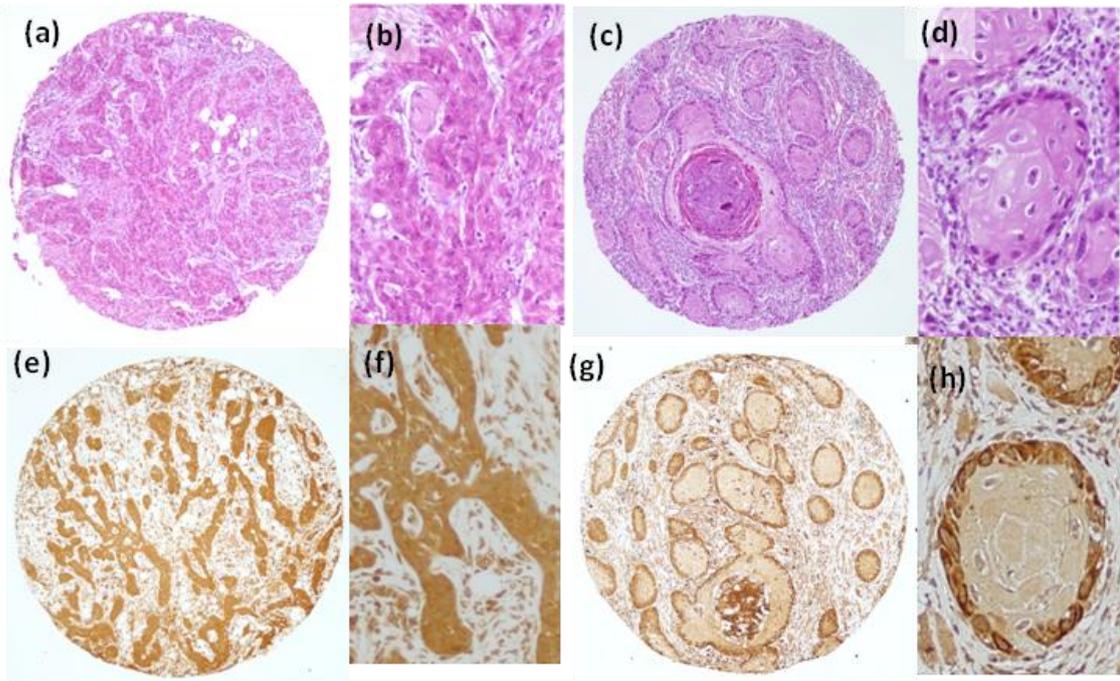
Figura 32: Distribución de las frecuencias de expresión de P16 en nuestra cohorte de CEC según las zonas de diferenciación tumoral.

CXCR4

La función de CXCR4 se ha relacionado con la progresión tumoral y el desarrollo de metástasis (Muller *et al.*, 2001). Además, la hipoxia induce la expresión del factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1), un factor de transcripción que activa la expresión de CXCR4 en las células tumorales (Staller *et al.*, 2003). Aquí nos planteamos evaluar la expresión de CXCR4 en nuestra cohorte de tumores.

La ausencia de expresión de CXCR4 en los CEC de nuestra serie fue poco frecuente. Esta molécula se expresó de manera escasa en la zona diferenciada, mientras que en la zona indiferenciada de los tumores la expresión moderada e intensa fue más abundante; por otra parte, tras hacer la media global entre zonas diferenciadas e indiferenciadas la expresión fue escasa. Teniendo en cuenta la relevancia de la expresión intensa de esta molécula en algunas formas de cáncer (Albert *et al.*, 2012; Albert *et al.*, 2013), esta variable se redasificó como expresión intensa/no intensa para realizar las comparaciones posteriores entre grupos, en función de distintas características histopatológicas y moleculares de los CEC (Tabla 13, Figura 33).

Panel (1)



Panel (2)

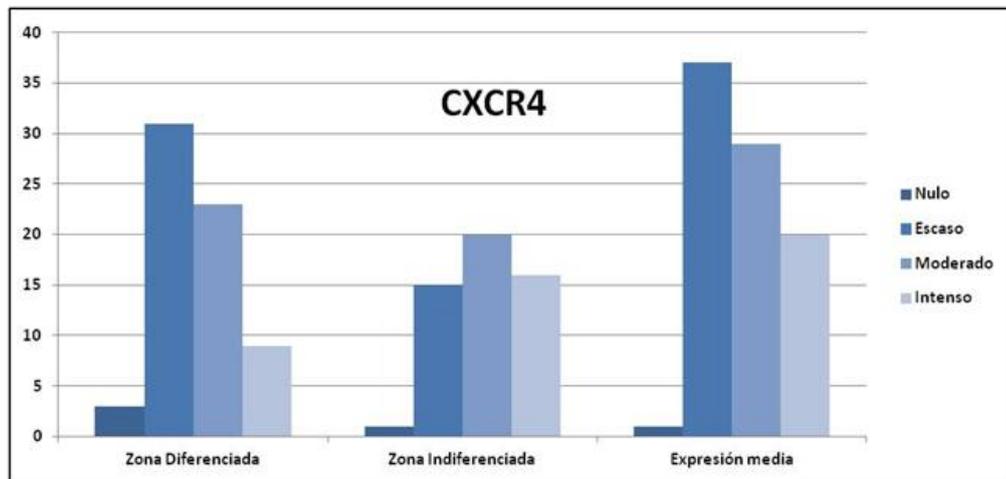


Figura 33: Expresión inmunohistoquímica de CXCR4 en nuestra cohorte de CEC. Panel (1) H&E de un CEC pobremente diferenciado con patrón de crecimiento infiltrativo (a) (100x), (b) (200x) y de un CEC bien diferenciado (c) (100x), (d) (200x). El tumor pobremente diferenciado exhibe una intensa expresión inmunohistoquímica de CXCR4 (d) (100x), (e) (200x) En el tumor bien diferenciado (g) (100x), (h) (200x) la expresión de CXCR4 se demuestra especialmente en las áreas proliferativas de los lóbulos tumorales (células de la periferia) y menos en las zonas con mayor grado de diferenciación queratósica (g) (100x), (h) (200x). **Panel (2):** Distribución de la frecuencia de la intensidad de expresión de CXCR4 en nuestra cohorte de tumores según las zonas de diferenciación.

QUERATINAS

Dado que los CEC son tumores epiteliales y las queratinas son marcadores comunes a los epitelomas o carcinomas, utilizamos AE-1 (un cóctel de anticuerpos sensible a distintas queratinas) para evaluar su expresión en nuestra serie de tumores cutáneos.

Como hemos indicado, AE-1 detecta un grupo de queratinas, lo que le da una sensibilidad relativamente alta, pero una especificidad baja (Fuertes *et al.*, 2013a). En cuanto a la expresión de queratinas, todos los tumores en nuestra serie mostraron positividad a AE-1, con algún grado de intensidad. Como cabría esperar, en la zona indiferenciada la proporción de casos con positividad débil fue más alta que en la zona diferenciada. Fue muy raro que AE-1 no se mostrara positivo en alguna de las zonas individuales de los tumores y, de hecho, a nivel global se expresó con cierto grado de intensidad en todos los casos (Tabla 13, Figura 34).

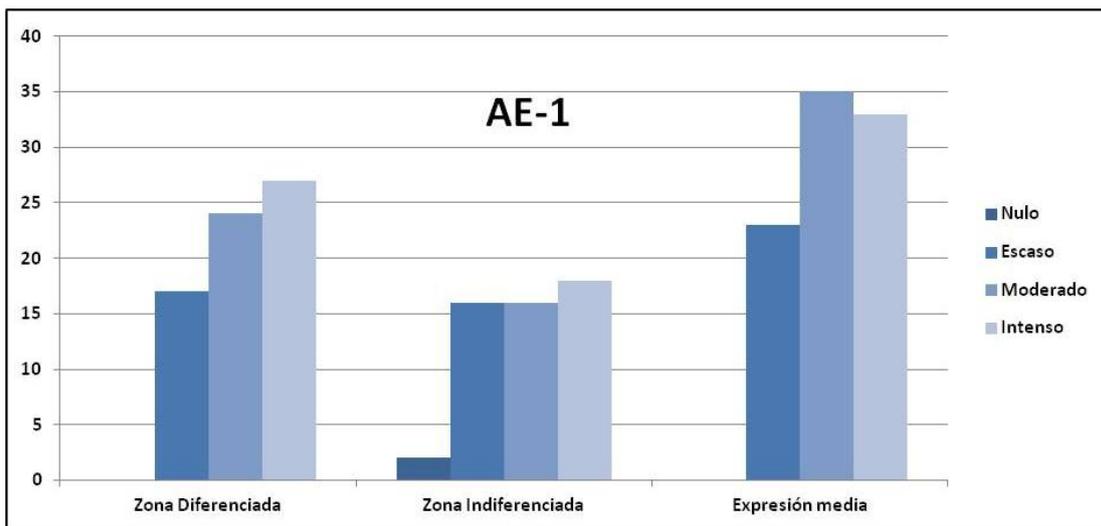


Figura 34: Distribución de frecuencias de la intensidad de marcaje de AE-1 frente a citoqueratinas en nuestra serie de CEC, según las zonas de diferenciación tumoral.

		Zona Diferenciada		Zona Indiferenciada		Expresión media	
		N	%	N	%	N	%
E-CADHERINA	Nulo	0	0	8	14,04	5	5,26
	Escaso	12	16,67	17	29,82	18	18,95
	Moderado	26	36,11	8	14,04	29	30,53
	Intenso	34	47,22	24	42,11	42	44,21
	Total	72	100	57	100	95	100
VIMENTINA	Nulo	64	88,89	37	64,91	70	75,27
	Escaso	8	11,11	5	8,77	14	15,05
	Moderado	0	0	7	12,28	5	4,3
	Intenso	0	0	8	14,04	5	5,38
	Total	72	100	57	100	93	100
P63	Escaso	20	28,99	2	4	17	19,32
	Moderado	35	50,72	25	50	45	51,14
	Intenso	14	20,29	23	46	26	29,55
	Total	69	100	50	100	88	100
EGFR	Nulo	2	2,82	1	1,82	2	2,13
	Escaso	6	8,45	4	7,27	7	7,45
	Moderado	37	52,11	28	50,91	52	55,32
	Intenso	26	36,62	22	40	33	35,11
	Total	71	100	55	100	94	100
D2-40	Nulo	49	68,06	31	54,39	56	59,57
	Escaso	19	26,39	22	38,6	32	34,04
	Moderado	4	5,56	4	7,02	6	6,38
	Total	72	100	57	100	94	100
CD44	Nulo	8	10,81	15	27,27	12	12,63
	Escaso	18	24,32	16	29,09	33	34,74
	Moderado	34	45,95	20	36,36	37	38,95
	Intenso	14	18,92	4	7,27	13	13,68
	Total	74	100	55	100	95	100

P53	Nulo	17	24,64	16	29,09	23	25
	Escaso	18	26,09	5	9,09	21	22,83
	Moderado	26	37,68	22	40	34	36,96
	Intenso	8	11,59	12	21,82	14	15,22
	Total	69	100	55	100	92	100
P16	Nulo	39	52,7	32	58,18	56	58,95
	Escaso	24	32,43	10	18,18	24	25,26
	Moderado	6	8,11	7	12,73	9	9,47
	Intenso	5	6,76	6	10,91	6	6,32
	Total	74	100	55	100	95	100
CXCR4	Nulo	3	4,55	1	1,92	1	1,15
	Escaso	31	46,97	15	28,85	37	42,53
	Moderado	23	34,85	20	38,46	29	33,33
	Intenso	9	13,64	16	30,77	20	22,99
	Total	66	100	52	100	87	100
AE1	Nulo	0	0	0	0	0	0
	Escaso	18	26	18	34,6	23	25,3
	Moderado	24	34,8	16	30,8	35	38,5
	Intenso	27	39,1	18	34,6	33	36,3
	Total	69	100	52	100	91	100

Tabla 13: Distribución de frecuencias, según las zonas de diferenciación tumoral, de la intensidad de tinción de las distintas moléculas evaluadas por inmunohistoquímica convencional en este estudio.

2.4.2 Descripción de las proteínas evaluadas en el grupo de CEC en los que los miRNA fueron estudiados por HIS y QPCR

La descripción de las variables moleculares evaluadas en la serie de CEC en los que se estudió la expresión de miRNA por HIS y QPCR aparece en la Tabla 14.

PROTEÍNAS	INTENSIDAD DE EXPRESIÓN	N	PORCENTAJE
P63	No expresa	9	21,4
	Expresa	33	78,6
D2-40	Nulo	23	52,3
	No nulo	21	47,7
EGFR	No intenso	25	56,8
	Intenso	19	43,2
E-CADHERINA	No intenso	27	61,4
	Intenso	17	38,6
VIMENTINA	Nulo	34	75,6
	No nulo	11	24,4
CD44	Nulo	5	11,1
	No nulo	40	88,9
CXCR4	No intenso	35	83,3
	Intenso	7	16,7
P16	No expresa	41	91,1
	Expresa	4	8,9
Ki-67	(media/DS)	20,67 (15,12)	

Tabla 14: Distribución de frecuencias de la expresión de las proteínas analizadas en este trabajo a nivel global en la sub-cohorte de tumores en los que la validación de la expresión de miRNAs se realizó tanto por QPCR como por hibridación in situ. (N): número de casos.

2.4.3 Descripción de las proteínas evaluadas en el grupo de enfermedad de Bowen y carcinoma bowenoide

Puesto que en este grupo todos los casos se consideraron como pobremente diferenciados, cuando nos referimos a la expresión de las diferentes moléculas analizadas, no tendremos en cuenta la zona diferenciada del tumor y, por lo tanto, la expresión media (que coincide con la expresión en la zona indiferenciada) es a la que se hará referencia. También hay que tener en cuenta la pérdida de algunos discos del *tissue-array* que ha impedido que tengamos datos de todas las proteínas en todos los tumores. La distribución de las frecuencias de tinción figura en la Tabla 15, Figura 35. Respecto a la expresión de las proteínas analizadas, el 85% de los casos (17) tuvieron expresión nula de **VIMENTINA** y sólo en un caso ésta fue moderada. Salvo un caso en que la tinción fue negativa, todos se tiñeron de manera moderada (8 casos) o intensa (8 casos) para **E-CADHERINA**. La **P53** se detectó en más de la mitad de los

casos y en un 25% su expresión fue intensa. En 5 casos (25%) **P16** no se expresó y en 2 casos (10%) ésta fue escasa, demostrándose una expresión moderada en el 20% e intensa en el 35%. La mitad de los casos presentaron una tinción intensa de **P63** y un 25% tinción moderada, únicamente 2 casos tuvieron una tinción escasa y ninguno presentó pérdida completa de tinción de esta proteína. **CD44** se expresó de manera intensa en 6 tumores (30%) y moderada en 8 (40%) y, únicamente, en 3 casos (15%) fue negativa. En 3 casos la tinción de **CXCR4** fue intensa (15%). La tinción de **EGFR** en 7 casos (35%) fue intensa y sólo un caso tuvo tinción negativa. De los casos en los que se demostró cierto grado de tinción para EGFR, el 60% (12 casos) tenían un patrón aberrante. En el 85% (17 casos) la tinción de **D2-40** fue negativa, y escasa en los restantes. La expresión de **AE-1** fue negativa únicamente en un caso, escasa en 6, moderada en 8 e intensa en 6. El índice proliferativo, medido a través de Ki-67 (MIB1), fue del 0% al 50%, con una media del 33,86% (Tabla 15, Figura 35).

PROTEÍNA	INTENSIDAD DE EXPRESIÓN	N	PORCENTAJE
E-CADHERINA	Nulo	1	5,00
	Es caso	8	40,00
	Moderado	8	40,00
	Intenso	3	15,00
VIMENTINA	Nulo	17	94,44
	Es caso	0	0,00
	Moderado	1	5,56
	Intenso	0	0,00
P63	Nulo	0	0,00
	Es caso	2	11,76
	Moderado	5	29,41
	Intenso	10	58,82
D2-40	Nulo	17	89,47
	Es caso	2	10,53
	Moderado	0	0,00
	Intenso	0	0,00
CD44	Nulo	3	15,00
	Es caso	3	15,00
	Moderado	8	40,00
	Intenso	6	30,00
EGFR	Nulo	1	5,26
	Es caso	3	15,79
	Moderado	8	42,11
	Intenso	7	36,84
P53	Nulo	7	38,89
	Es caso	2	11,11
	Moderado	4	22,22
	Intenso	5	27,78
P16	Nulo	5	26,32
	Es caso	3	15,79
	Moderado	4	21,05
	Intenso	7	36,84
CXCR4	Nulo	6	30,00
	Es caso	9	45,00
	Moderado	3	15,00
	Intenso	2	10,00
AE1	Nulo	1	5,56
	Es caso	6	33,33
	Moderado	8	44,44
	Intenso	3	16,67

Tabla 15: Resumen de la distribución de frecuencias de las tinciones por inmunohistoquímica evaluadas en el grupo de enfermedad de Bowen y “carcinoma bowenoide”. Como hemos indicado en el texto, sólo se consideró zona indiferenciada, por ser la única existente. (N): número de casos.

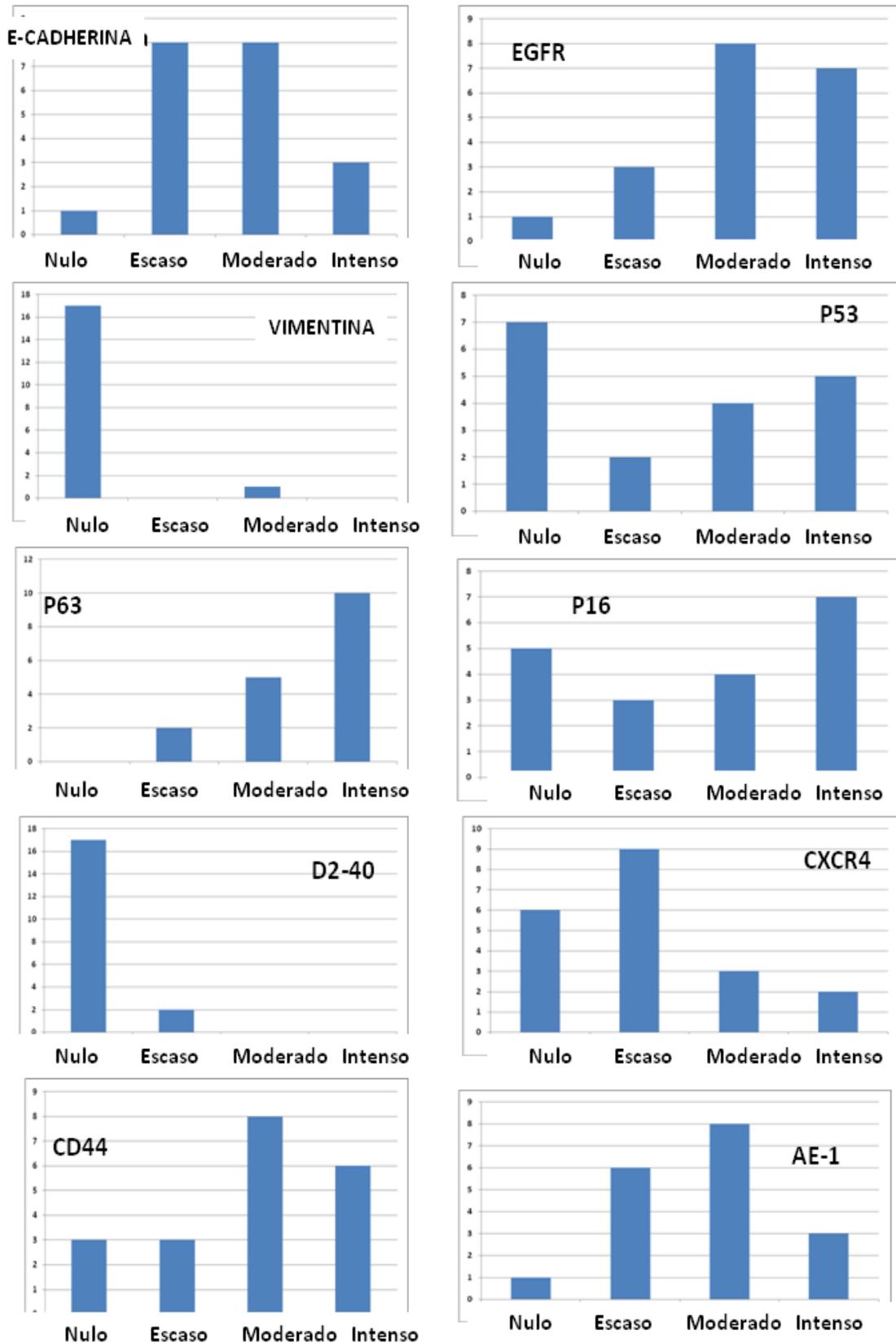


Figura 35: Distribución de frecuencias de las diferentes proteínas evaluadas en el este grupo "bowenoide".

3 LÍNEAS CELULARES Y ANÁLISIS DE MIRNAS

3.1 Descripción del panel de líneas celulares

En este trabajo hemos evaluado los patrones de expresión de miRNA en un panel de líneas celulares de piel que representan distintas fases evolutivas del CEC. Fueron generadas en el laboratorio del Dr. Allan Balmain (UCSF, San Francisco, CA, USA). La mayoría se generaron en ratones tras la aplicación del protocolo clásico de carcinogénesis química en dos pasos, un iniciador carcinógeno, el dimetil-benzantraceno (DMBA), seguido de la aplicación repetida de ésteres de forbol, el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) como factor promotor, inductor de inflamación y proliferación. Todas las líneas presentan como característica común la mutación en *H-Ras*. Estas líneas ya se han utilizado en múltiples estudios por la comunidad científica (Bailleul *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1998; Burns *et al.*, 1991; Diaz-Guerra *et al.*, 1992). Como hemos indicado, el panel de líneas celulares se utilizó para la identificación de miRNA expresados de forma diferencial a lo largo de la progresión del CEC en un contexto de condiciones puramente autónomo-celulares, es decir, sin la interferencia de otros compartimentos tanto locales como sistémicos (aunque entendemos que ello también puede suponer un sesgo, pues esos compartimentos están interrelacionados). El panel de líneas celulares y sus características se incluyen en la Tabla 16, Figura 36.

ORIGEN	NOMBRE	CARACTERÍSTICAS
No tumorales	C50	Queratinocitos inmortalizados.
	C5N	Inmortalizada in vitro. Deriva de raton Balb/c
	NK	Queratinocitos deficientes en P53
Papilomas	P6	Tumor benigno.
	MSCP1	Tumor benigno. Deriva de ratón F1 <i>Mus spetus /Mus musculus</i>
CEC bien diferenciados	B9	Mismo tumor que A5 y D3. Derivan de ratón F1 Procede del mismo tumor que B9. Fenotipo escamoso.
	PDV	Fenotipo escamoso.
	E4	Mismo tumor que H11. Fenotipo escamoso.
	PDVC57	Deriva de tumor originado por PDV. Fenotipo escamoso.
CEC indiferenciados	H11	Procede del mismo tumor que E4. Fibroblastoide por EMT.
	A5	Procede del mismo tumor que B9. Fibroblastoide por EMT.
	D3	Procede del mismo tumor que B9. Fibroblastoide por EMT.
	CarB	P53 salvaje. Deriva de ratón NIH. Fibroblastoide por EMT. Muy agresiva.
	CarC	P53 salvaje. Deriva de ratón NIH. Fibroblastoide por EMT. Muy agresiva.

Tabla 16: Características de las líneas celulares de origen murino que reproducen las diferentes fases de la carcinogénesis del CEC en las que se analizó la expresión diferencial de miRNAs.

Todas las líneas celulares fueron cultivadas en DMEM, con 200mM de glutamina, 10% de suero fetal bovino, penicilina-estreptomicina, a 37 °C y 5% de CO₂. Las células se recogieron al 70% de confluencia, sobre hielo para frenar el metabolismo celular y mejorar la viabilidad. Los RNAs totales, incluyendo miRNA, fueron extraídos inmediatamente

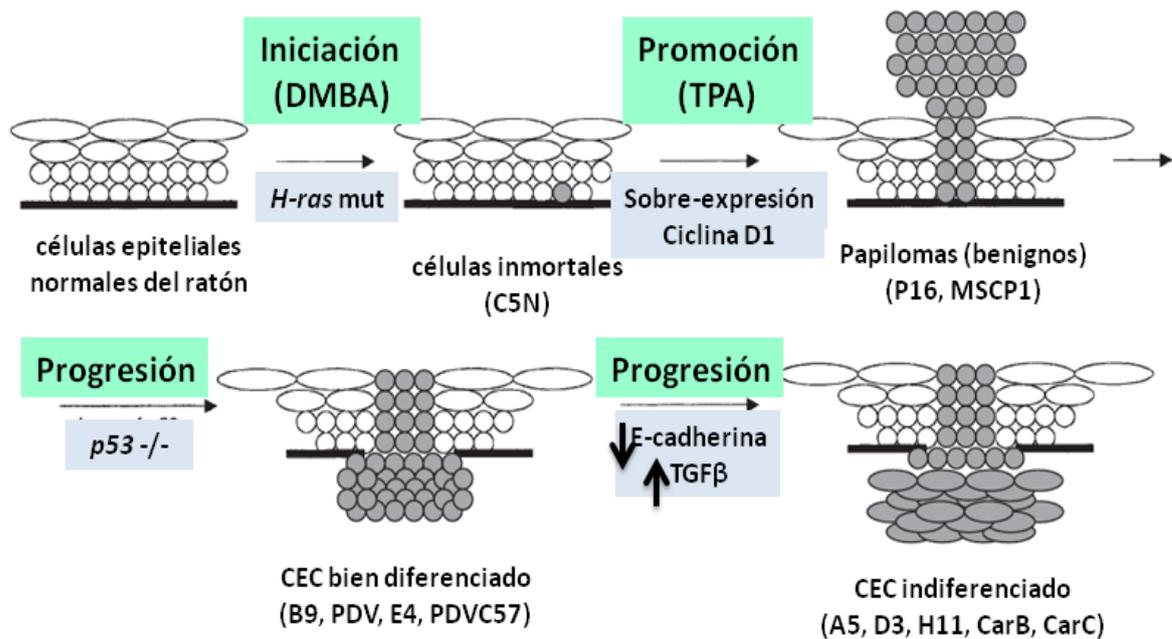


Figura 36: Representación de las diferentes fases del proceso de carcinogénesis química en el modelo murino, e identificación de las fases de las que derivan parte de las líneas celulares utilizadas (modificado de Burns et al 1991).

3.2 Resumen del diseño del estudio de miRNA

Nuestro objetivo fue identificar miRNA expresados diferencialmente en el panel de líneas celulares previamente descrito, con el fin de evaluar su expresión en algunos de ellos en la cohorte de tumores humanos. Primero se llevó a cabo la extracción del RNA total de la muestra mediante un kit incluyendo las poblaciones de miRNAs; seguido de la realización de microarrays específicos de miRNA. Una vez seleccionados los miRNA candidatos, tras el análisis bioinformático de los resultados obtenidos en el array, el siguiente paso fue validar los resultados en las mismas líneas celulares por medio de QPCR. Para ello, se sintetizó cDNA a partir del RNA extraído y posteriormente se realizó la QPCR. Finalmente, dos de los miRNA identificados, *miRNA-203* y *miRNA-205* que nos parecieron importantes por la bibliografía previa, se estudiaron en los tumores humanos.

El estudio de la expresión de *miRNA-203* y *miRNA-205* en los tumores se hizo mediante dos técnicas. Por un lado, mediante QPCR, en una cohorte prospectiva de CEC. Por otro, mediante hibridación in situ (ISH) sobre una cohorte mayor de tumores que incluyó los mismos tumores evaluados mediante QPCR y otros tomados de manera retrospectiva. Los casos del grupo de enfermedad de Bowen y carcinoma bowenoide sólo fueron validados mediante ISH. La idea de utilizar dos estrategias de evaluación de la expresión de los miRNA en los tumores, tuvo el fin de comparar los resultados obtenidos por ambos sistemas, para ver si eran superponibles entre sí o, determinar si uno de ellos era más robusto y eficiente que el otro. A lo largo de este apartado 3 del material y métodos iremos explicando sucesivamente los métodos empleados en el análisis y validación de los miRNA. El esquema del diseño de la evaluación de miRNA se representa en la Figura 37.

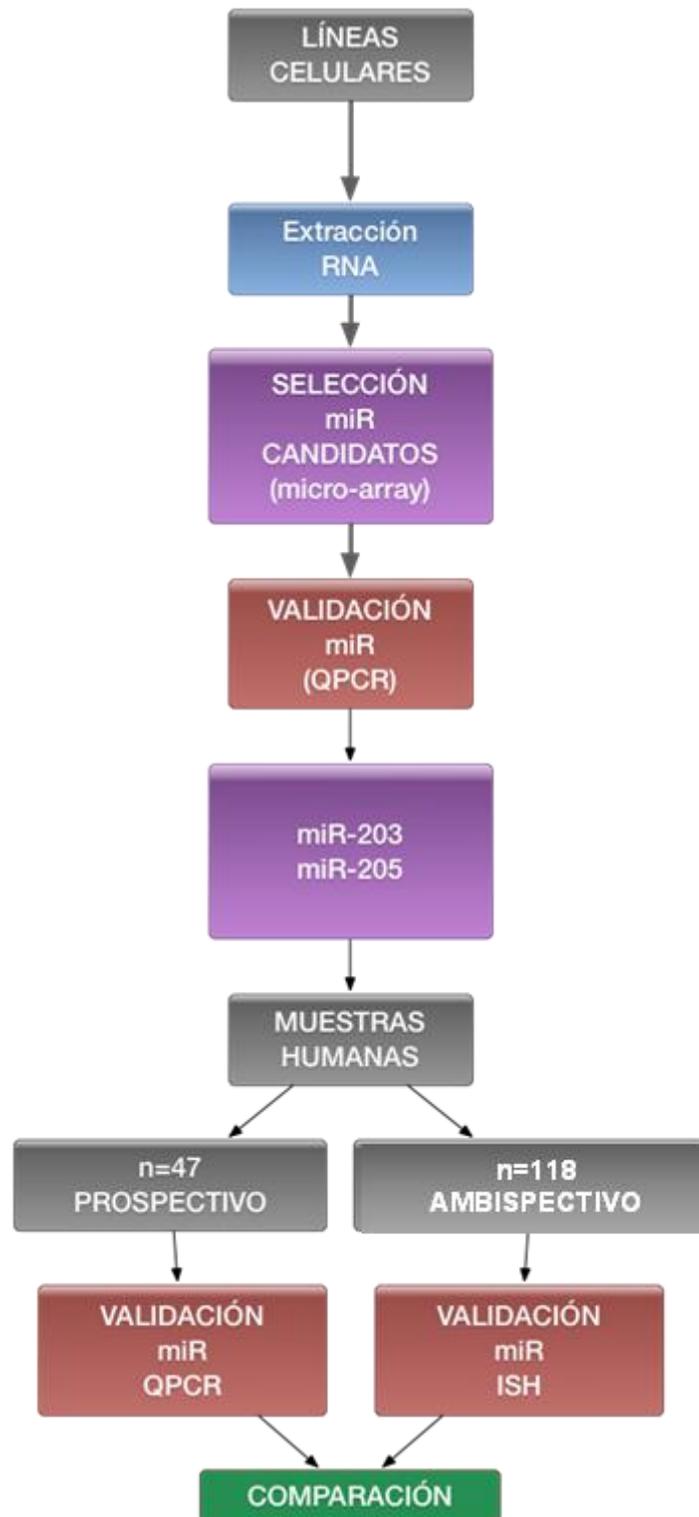


Figura 37: Algoritmo resumen de la metodología de análisis de los miRNA empleada en este trabajo de tesis doctoral.

3.3 Extracción del RNA total de las líneas celulares y muestras de tumores humanos

3.3.1 Extracción de RNA total incluyendo las subpoblaciones de miRNA

El protocolo seguido fue el recomendado por el fabricante del kit *miRNANEasy Mini Kit* (Qiagen #217004). La extracción de RNA mediante este kit está basada en la lisis de las muestras con fenol-guanidina y la purificación mediante membranas de sílice. El reactivo de lisis, QIAzol, incluido en el kit, es una solución monofásica de fenol e isotiocinato de guanidina, diseñado para facilitar la lisis de los tejidos, inhibir las RNasas y eliminar la mayor parte del DNA celular y las proteínas de la lisis orgánica.

Las muestras de líneas celulares y de tejidos fueron homogenizados con el reactivo de lisis QIAzol. Tras la adición de cloroformo, el homogeneizado fue separado por centrifugación en sus fases acuosa y orgánica. El RNA permaneció en la fase superior, la acuosa, mientras que el DNA se quedaba en la interfase, y las proteínas pasaron a la fase orgánica inferior, quedando algunas en la interfase. Se recogió la fase acuosa y se le añadió etanol, lo que permitió la precipitación del RNA total. La muestra se colocó entonces en una columna y se centrifugó, quedando el RNA total unido a la membrana mientras que el fenol y otros contaminantes fueron eliminados eficientemente. Este método permite eluir en agua un RNA de alta calidad y libre de nucleasas, incluidos los miRNAs (Figura 38).

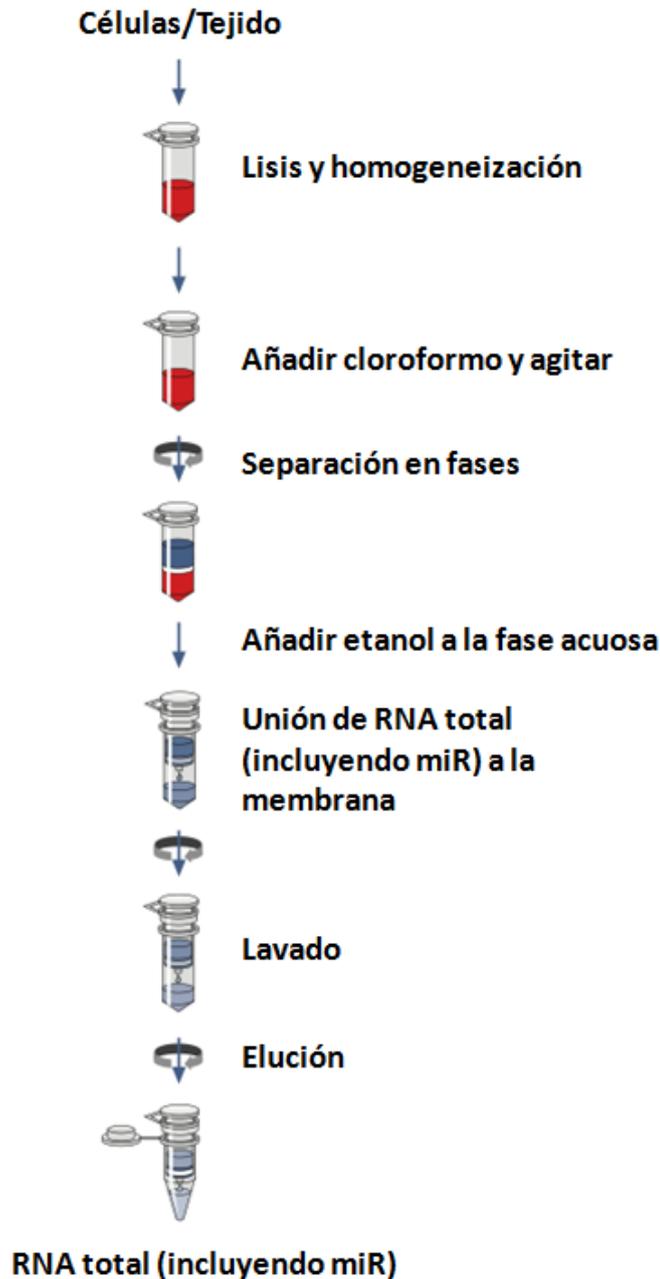


Figura 38: Resumen del proceso de extracción de RNA (kit miRNAeasy Mini de Qiagen).

El procedimiento fue muy similar para la extracción de RNA total de líneas celulares y de tejido, con mínimas diferencias iniciales. Para el caso de las líneas celulares fue importante cuantificar su concentración para no utilizar más de 1×10^7 células, y retirar el medio de cultivo completamente mediante centrifugación y lavado con PBS1x, ya puede afectar la eficiencia del proceso de extracción. En el caso del tejido, también fue importante estimar la cantidad del mismo para evitar muestras superiores a 50 mg que pudieran saturar el proceso. Resumidamente, el procedimiento consta de los pasos que se describen a continuación, todos los cuales deben realizarse en condiciones libres de RNasa:

3.3.2 Protocolo de extracción de RNA total incluyendo miRNA

- 1.) Se coloca la muestra en 700 µl de reactivo de lisis Qiazol.
- 2.) A continuación, se realiza la homogeneización de la muestra (TissueLyser® system) entre 20-40 segundos, hasta que la muestra tiene un color uniforme (color rosa claro).
- 3.) La muestra se deja reposar 5 minutos a temperatura ambiente (15-25° C), según las recomendaciones del fabricante. Este paso permite la disociación de las nucleoproteínas.
- 4.) Se añaden 140 µl de cloroformo al tubo que contiene la muestra y se agita con intensidad durante 15 segundos, lo que es importante para que las fases se separen eficientemente.
- 5.) Una vez más la muestra se deja a temperatura ambiente durante 2-3 minutos.
- 6.) Tras una centrifugación de 15 minutos a 12000 revoluciones por minuto (rpm) a 4°C, se produce la separación de las tres fases previamente comentadas, en la superior de las cuales (acuosa) se encuentran los RNA, incluyendo los miRNA.
- 7.) La fase acuosa se transfiere a un nuevo tubo (proporcionado por el fabricante) y se le añaden 525 µl de etanol al 100%, que debe mezclarse con la pipeta cuidadosamente. Se toman 700 µl de la muestra y se añaden a una columna RNeasy Mini que está introducida en un tubo de colector, seguido de un centrifugado.
- 8.) Tras una centrifugación a 10000 rpm durante 15 segundos, se desecha el líquido del tubo colector, y se repite el paso anterior.
- 9.) Se añaden 700 µl del Buffer RWT (proporcionado por el fabricante) a la columna y se centrifuga a 10000 rpm durante 15 segundos, y se desecha una vez más el líquido del tubo colector.
- 10.) Se añaden 500 µl del Buffer RPE (proporcionado por el fabricante) a la columna y se realiza el centrifugado en las mismas condiciones que en los dos pasos anteriores.
- 11.) Una vez más se añaden 500 µl de Buffer RPE y realiza una centrifugación más larga (2 minutos) a 10000 rpm. Esta centrifugación lava la membrana de la columna para garantizar que no haya restos de etanol en la última fase, de elución del RNA.
- 12.) Se desecha el tubo colector y se coloca la columna RNeasy Mini en un tubo de 1,5 ml (proporcionado por el fabricante). Se pipetea 50 µl de agua libre de RNasas directamente sobre la membrana de la RNeasy Mini, y se centrifuga durante 1 minuto a 10000 rpm, con lo que se produce la elución del RNA (que incluye los miRNA).

3.3.3 Valoración de la calidad de RNA extraído y determinación de su concentración

Se comprobó la calidad del RNA extraído mediante determinación de la absorbancia a 260 nm y 280 nm (ratio 1,9-2,1); y la concentración del mismo en cada una de las muestras mediante un espectrofotómetro (*Nanodrop*[®]). Cada muestra se valoró por triplicado empleando 1 µl de la misma y se consideraron aceptables las mediciones con +/- 30 ng/ml de diferencia. La concentración de la muestra se calculó a partir de la media de las medidas. Cuando se obtuvieron valores extremos, la muestra se homogeneizó y midió nuevamente. Finalmente, aquellas muestras en las que el ratio se alejó del valor óptimo o en las que se obtuvieron resultados discordantes fueron eliminadas del estudio y se repitió su extracción. Si la concentración del *Nanodrop*[®] fue superior a 1µg/µl, el RNA se diluyó a razón de 1:5 (en agua libre de RNasa). La calidad de los RNA que fueron a utilizarse en los arrays de expresión se volvió a determinar mediante el chip comercial de *Agilent*[®]. En la Figura 39 se representa una curva de absorbancia del RNA en el *Nanodrop*.

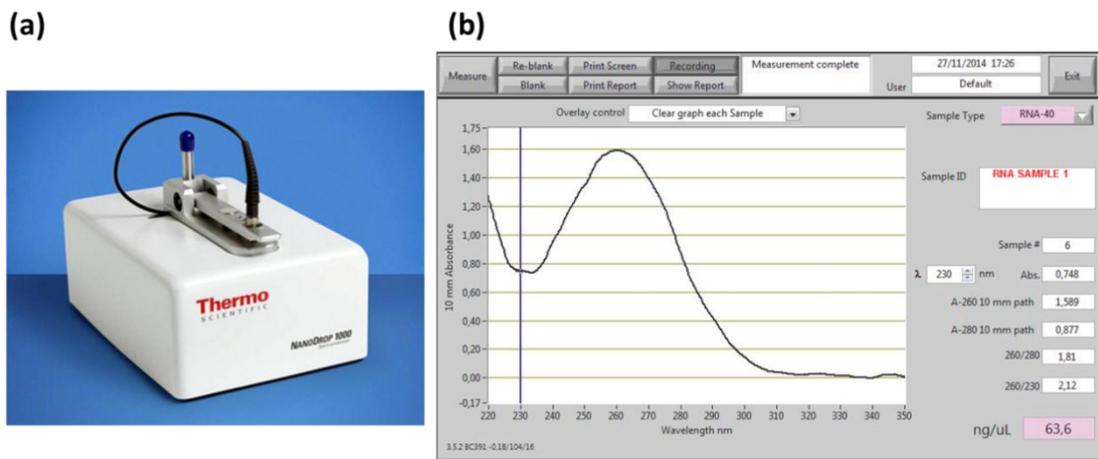


Figura 39: (a) Imagen representativa del espectrofotómetro *Nanodrop*; (b) imagen representativa de una curva de absorbancia de RNA determinada con el *Nanodrop*.

3.4 Selección de miRNA candidatos mediante microarrays de expresión

El proceso de hibridación manual de microarrays de miRNA de las líneas celulares se realizó con el kit comercial *miRNACURI™ LNA array (Exiqon)*, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Básicamente el proceso, que se desarrolla en dos días consecutivos, consistió en lo siguiente: El primer día se realizó el marcaje y durante la noche se realizó el proceso de hibridación. El segundo día, se procedió al lavado y la obtención de la señal mediante una

imagen digital que fue procesada bioinformáticamente. El proceso de hibridación manual de miRNA se resume en la Figura 40. En la Figura 41 aparece la disposición del array.

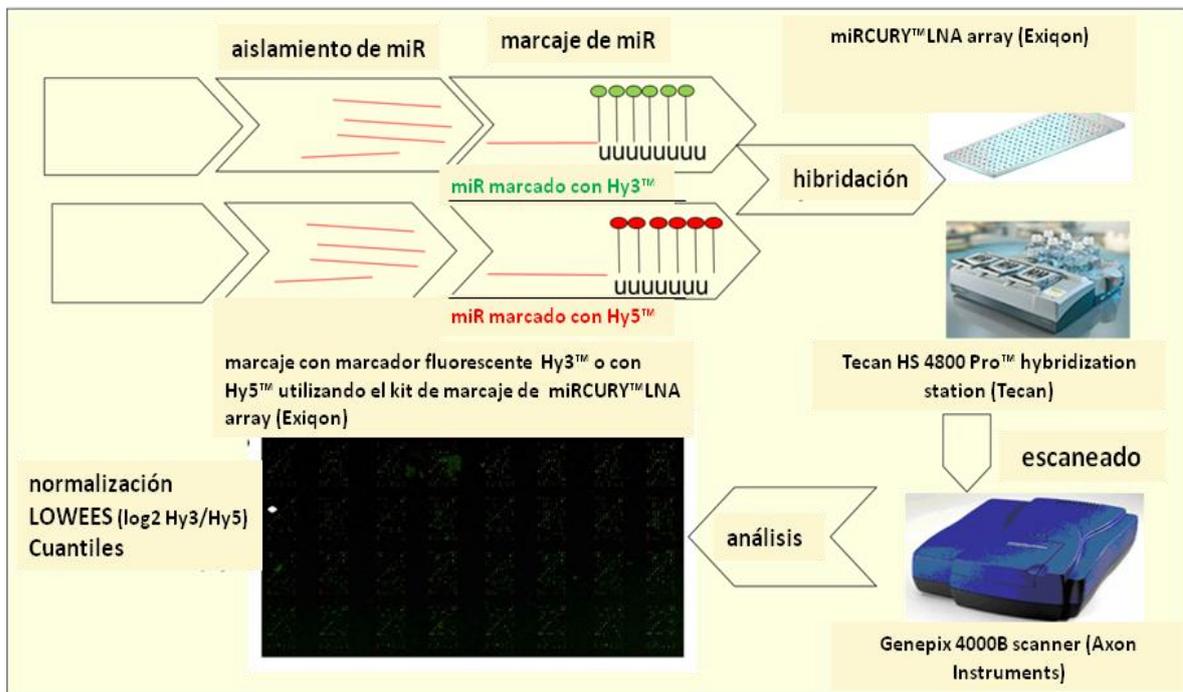


Figura 40: Resumen de los pasos del proceso de hibridación manual de los arrays de expresión.

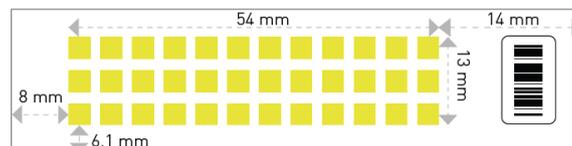


Figura 41: Disposición del array: El array consta de 36 sub-arrays, el tamaño del spot es de 100 μ m y la distancia entre spots de 215 μ m. Las dimensiones del microarray figuran en la imagen.

3.4.1 Marcaje

El primer paso fue el marcaje del RNA. Para ello se recomienda una cantidad de RNA total de 250 ng a 1 μ g para cada reacción de marcaje. Escogimos el sistema de doble marcaje (Hy3™, Hy5™) por facilitar la normalización por Lowes y porque también permitió evaluar un único marcaje (Hy3™) cuya normalización se hizo por cuantiles en el Servicio de Bioinformática del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de la Universidad de Salamanca. Para el proceso de marcaje, previo a la hibridación, se prepararon dos reacciones diferentes que se explicarán más adelante.

Inicialmente, se procedió a la reconstitución del control interno (*spike-in* miRNA) añadiendo 30 µl del agua libre de RNAsas del *kit* comercial y dejándolo en hielo durante 30 minutos y a la reconstitución de los reactivos fluorescentes Hy3™ (que se incorpora mejor a la sonda durante el marcaje) y Hy5™ con 29 µl de agua libre de RNAsas del kit cada uno. La disposición de la posición de captura de los *spike-in* de RNA en cada *subarray* figura en la imagen (Figura 42).

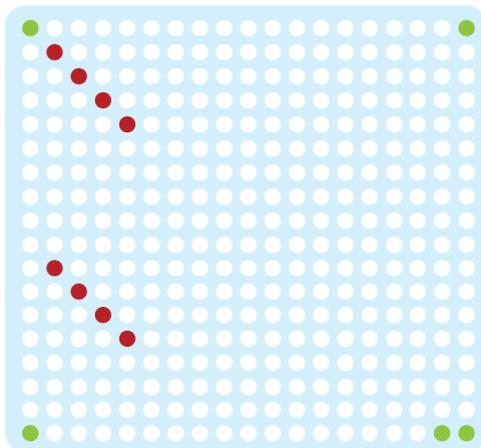


Figura 42: Los spots (puntos) blancos representan las muestras estándar, los spot verdes representan otros controles internos para el marcaje con Hy3™ y los spot rojos, las muestras control spike-in.

Reacción 1: Se preparó el primer *master mix-1* (MM-1). Por cada muestra se preparó 1 ng de RNA en 2 µl de volumen en un tubo *Eppendorff*® de PCR (concentración de 0.5 ng/µl). El MM-1 contiene 0.5 µl de enzima fosfatasa alcalina de origen intestinal (CIP), 0.5 µl de buffer para la CIP y 1 µl del *spike-in* RNA del kit reconstituido. A cada tubo de PCR con 2 µl de dilución de RNA se añadieron 2 µl del MM-1 para un volumen total de 4 µl. Se programó el termociclador a 37 °C durante 30 minutos, 95 °C durante 5 minutos, y se dejaron los tubos después a 4 °C o en hielo al menos durante al menos 5 minutos (Tabla 17).

REACTIVO	CANTIDAD
RNA total	2 ul (0,5 ng/ul)
Enzima CIP	0,5
Buffer para CIP	0,5
Spike-in	1
Volumen total	4

Tabla 17: Reactivos y cantidades de los mismos utilizados en la reacción 1 del proceso de marcaje previo a la hibridación.

Reacción 2: Se preparó un segundo *master mix* (MM-2). Por cada muestra se añadieron 3 µl de tampón de marcaje o *labelling buffer*, 1.5 µl de Hy3™, 2 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) y 2 µl de enzima de marcaje. Se añadieron 8.5 µl del MM-2 a los 4 µl de la primera reacción para un volumen final de 12.5 µl. Hy3 es de color rojo y se aplicó a la muestra; y Hy5 es verde y se aplicó a la muestra de referencia con la que se compararon todas las demás (en este caso C5N). Se programó el termodiclador a 16º C durante una hora, seguido de 65º C durante 15 minutos y de un mantenimiento a 4º C hasta el siguiente paso. Las muestras antes de seguir fueron sometidas a un pulso de centrifugación rápida o *spin* para bajar el contenido al fondo del tubo (Tabla 18).

REACTIVO	CANTIDAD
Reacción CIP	4
Tampón de marcaje	3
Hy3™ ó Hy5™	1,5
DMSO	2
Enzima de marcaje	2
Volumen total	12,5

Tabla 18: *Reactivos y cantidades de los mismos utilizados en la reacción de marcaje previo a la hibridación, en la reacción 2. Se añadió la sonda Hy5 al control C5N, y Hy3 a las muestras (resto de las diferentes líneas celulares).*

Preparación de los buffers de lavado. Se prepararon 300 ml de cada buffer de lavado, volumen mínimo que requiere la máquina de hibridación *Tecan® HS4800 Pro*. Se prepararon tres tampones de lavado distintos:

1.) Buffer A: Para su preparación se añadieron 30 ml de buffer de lavado salino 20X del kit, junto con 6 ml de solución detergente al 10%, también incluida en el kit, y 264 ml de agua libre de RNAasas. Ésta última fue agua con dietil-pirocarbonato (agua DEPC, Ambion®) que es un inhibidor de RNAasas.

2.) Buffer B: Para su preparación se añadieron 15 ml de buffer de lavado salino 20x y 285 ml de agua libre de nucleascon DEPC (Ambion®).

3.) Buffer C: Para su preparación, se añadieron 3 ml de buffer de lavado salino 20x y 297 ml de agua agua-DEPC (Ambion®).

3.4.2 Hibridación

El proceso de hibridación del array con las muestras de las líneas celulares se realizó en una máquina de hibridación *Tecan®HS4800Pro*. Una vez se completó la reacción 2, se llevaron las sondas a un volumen total de 50 µl (al realizar la hibridación para dos colores se mezclaron las dos sondas), es decir, que se añadieron 12.5µl más 12.5 µl para un volumen final de 25µl. A continuación, se añadieron otros 25 µl de buffer de hibridación almacenado a temperatura ambiente para alcanzar un volumen total de 50 µl. Se desnaturalizó la sonda en oscuridad a 95°C y se pasó a hielo durante 2 minutos, hasta cargar la cámara de hibridación con el array.

A continuación se procedió a cargar la cámara de hibridación con 80 µl de buffer de hibridación y 50 µl de la sonda marcada. En la máquina de hibridación *HS 4800 Pro, Tecan®* se utilizó el siguiente programa: hibridación a 56°C durante 16 horas, seguidos de un lavado de 2 ciclos de un minuto a 56°C con el buffer de lavado A; 2 ciclos de un minuto a 23°C con el buffer de lavado B y 2 ciclos de un minuto a 23°C con el buffer de lavado C; por último, seguido de otros 23 ciclos de 30 segundos con el mismo buffer C de lavado. Una vez se realizó la hibridación y el lavado, se comprobó la fluorescencia de las muestras mediante el programa *GenePix 4000B (Axon Instruments™)*. La imagen se recogió mediante fotografía digital y se guardó en un archivo en formato TIFF (Figura 43).

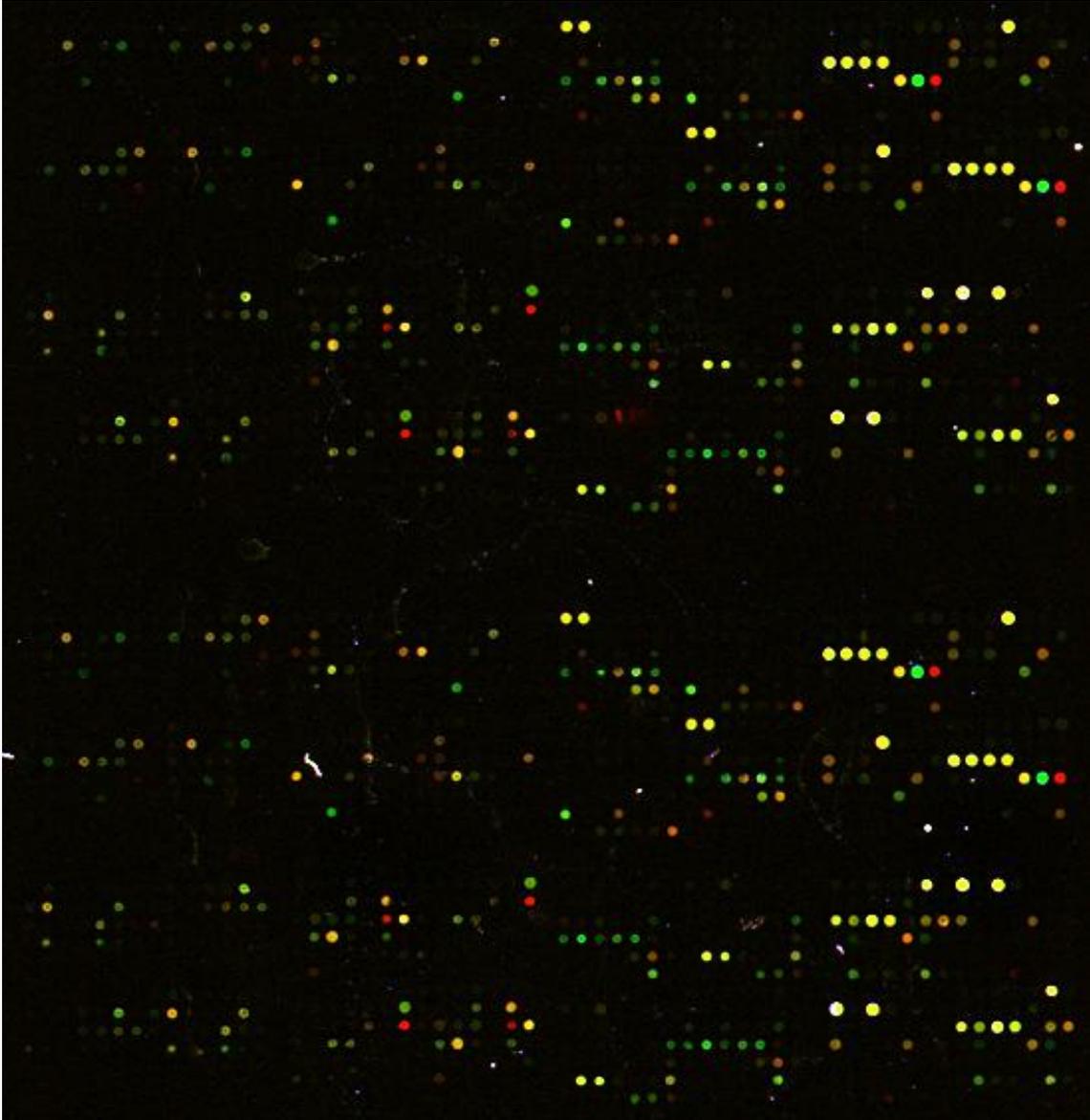


Figura 43: *Imagen de captación de un microarray de miRNAs. Nótese los diferentes spots. NOTA: Esta imagen de captación es la que se somete al análisis bioinformático posterior.*

3.4.3 Análisis bioinformático

Las imágenes obtenidas después del proceso de hibridación se procesaron con el programa informático *GenePix Pro® versión 6.0*, para tratamiento informático de las imágenes previo al análisis estadístico. Con él se procedió a eliminar los puntos en los que no existía señal o aquéllos en los que la hibridación fue defectuosa. Como los puntos se encuentran repetidos varias veces a lo largo del *slide*, si la hibridación ha sido óptima, aunque exista algún punto que no haya hibridado correctamente, su miRNA estará representado por el resto de puntos en los que se encuentra repetido y en los que se ha realizado la hibridación de manera

correcta. Cuando el *slide* tuvo una mala calidad de hibridación se repitió una segunda vez para conseguir un resultado satisfactorio. Empleamos el software libre *Pomelo-2* del CNIO (Madrid, España) para el análisis de los datos (Morrissey and Diaz-Uriarte, 2009). Los datos inicialmente se analizaron para dos colores por método de Lowess; su resultado no fue satisfactorio y se recurrió al análisis de un solo color y a la normalizaron por cuartiles empleando el software *Expander* (Shamir *et al.*, 2005), método recomendado actualmente por la página web de Exiqon para el análisis de este tipo de datos. De este modo se identificaron una serie de miRNAs expresados diferencialmente y que se exponen en la sección de resultados. Para el análisis posterior en los tumores humanos se eligieron los *miR-203* y el *miR-205*, por su interés en la literatura.

3.5 Validación de los miRNA candidatos mediante QPCR sobre líneas celulares

La validación de los miRNA candidatos se realizó mediante QPCR, utilizando el *miRNACURY LNA™ Universal RT microRNA PCR system* de Exiqon®. Los niveles de *miR-203* y *miR-205* se cuantificaron mediante QPCR. Se empleó un gen *housekeeping* (*S5*) y un control interno comercial (*spike-in*), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El primer paso antes de realizar la QPCR fue la obtención y preparación de la muestra de RNA (que ha quedado explicado más arriba). En segundo lugar, se realizó la síntesis de cDNA que se utilizará en la QPCR, seguido del análisis de los datos (Figura 44).

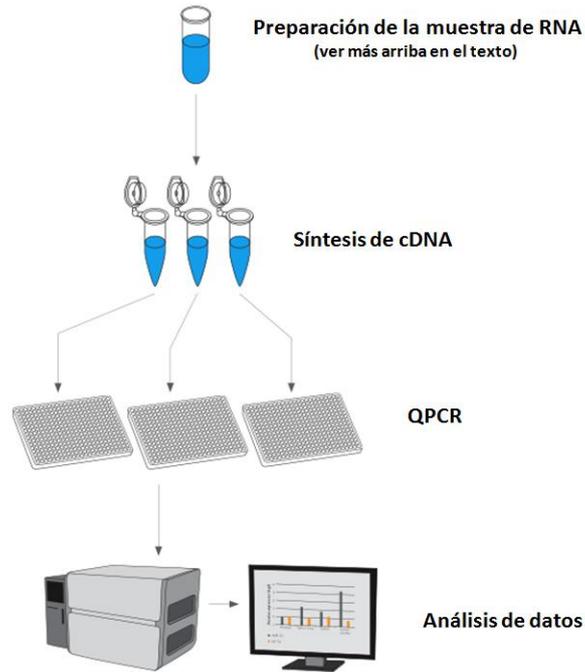


Figura 44: Diagrama del proceso de determinación de los miRNA mediante QPCR.

3.5.1 Síntesis de cDNA

En primer lugar el RNA se diluyó hasta una concentración de 5 ng/microl utilizando agua libre de RNAsa. A continuación, se prepararon los reactivos y se mezclaron de la siguiente manera (Tabla 19):

REACTIVO	CANTIDAD (µL)
Buffer de reacción 5X	4
Agua libre RNAsa	9
Spike-in (*)	1
RNA (5ng/µl)	4
Enzima retrotranscriptasa	2
VOLUMEN TOTAL	20

Tabla 19: Reactivos y cantidades empleados en el proceso de síntesis de cDNA: (*) control interno que se utiliza en el proceso de síntesis de cDNA para asegurar que la reacción de síntesis se produjo correctamente, su uso es opcional.

Los reactivos se mezclaron y tras un *spin* se incubaron según el siguiente programa: 60 minutos a 42 °C; seguido del calentamiento de la reacción para inactivar la enzima (a 95°C durante 5 minutos); posteriormente, se enfrió a 4°C y se almacenó a dicha temperatura. Con esto obtuvimos el cDNA que se utilizó posteriormente en la reacción de QPCR.

3.5.2 Reacción de QPCR

Posteriormente se procedió a la realización de la QPCR:

1.) Inmediatamente antes de realizar la QPCR se diluyó el cDNA previamente sintetizado, a razón de 1:80, en agua libre de DNAsas. No es aconsejable almacenar las muestras de cDNA diluido. Se recomienda prepararlas justo antes de la realización de la QPCR.

2.) A continuación se procedió a mezclar la muestra de cDNA, el SYBR green máster mix (MM) que incluye la Taq polimerasa, el buffer para la reacción y dNTPs y los oligonucleótidos específicos del miRNA a cuantificar, según se indica en la Tabla 20.

REACTIVO	CANTIDAD
SYBR green MM (con Taq polimerasa, buffer, dNTPs)	10
Oligonucleótidos	2
cDNA	8
Volumen total/reacción	20

Tabla 20: Reactivos y cantidades de los mismos empleados en la realización de la QPCR.

3.) Posteriormente, se procedió al sellado de la placa, se realizó un *spin* de la misma y se introdujo en el termociclador.

4.) El termociclador se programó según la Figura 45.

El análisis de los datos se realizó siguiendo el método del delta-delta-CT (Ginzinger, 2002).

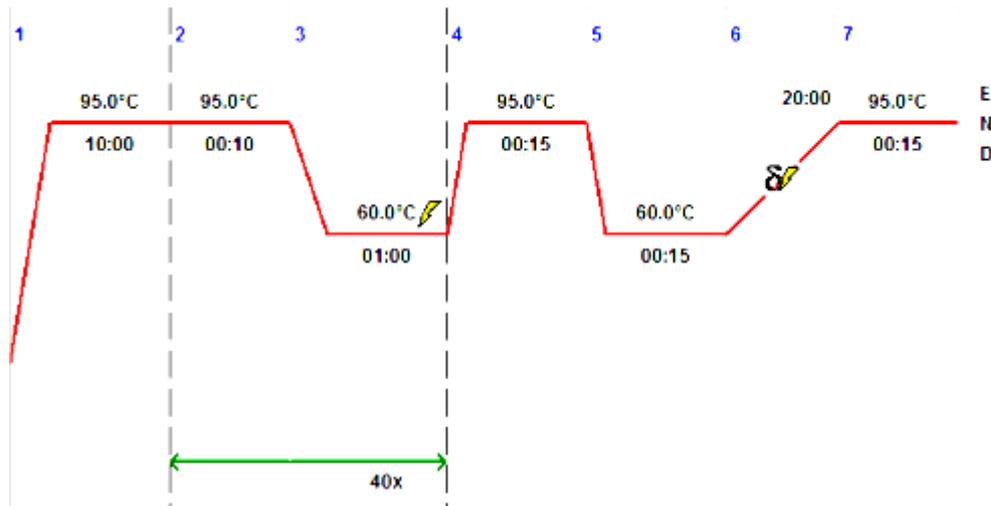


Figura 45: Programa de QPCR para la cuantificación de miRNAs empleado en este trabajo.

En teoría, la PCR dobla la cantidad de cDNA de partida al terminar cada ciclo de reacción. No obstante, esto no es totalmente correcto, ya que los reactivos se consumen a medida que el número de ciclos se incrementa, la reacción pierde eficiencia y tiende a una meseta (*plateau*). La PCR convencional (cualitativa) determina la cantidad de cDNA en el momento del *plateau*, con lo que tiene una escasa utilidad para valorar diferencias en los niveles de una molécula de partida. La QPCR permite detectar el cDNA precozmente, cuando su incremento aún se produce exponencialmente con cada nuevo ciclo de reacción, lo que proporciona una estimación precisa de la cantidad de cada molécula de cDNA que se analiza. El ciclo a partir del cual se detecta el producto amplificado (*threshold cycle*) es lo que se conoce con el nombre de Ct, el número de ciclo a partir del cual la señal de fluorescencia atraviesa el umbral de detección. El Ct se correlaciona inversamente con la cantidad de partida de la molécula de cDNA en cuestión. Dicho de otro modo, cuánto mayor es la cantidad de la molécula de partida, antes adquiere una cantidad que es detectada y por lo tanto más corto es el Ct. El Ct de cada muestra problema se compara con el Ct de un control, esta diferencia entre el Ct del control y de la muestra problema es el ΔCt . En términos de cuantificación relativa, estas diferencias se expresan como $2^{\Delta Ct}$. El gen control se compara con cada una de las muestras de estudio de la placa y de este modo se obtienen distintos ΔCt porque cada muestra problema está en una cantidad diferente y el control es constante entre las muestras (en nuestro caso el RNA U6). Las diferencias entre el ΔCt resultante de comparar una muestra problema con el control y el ΔCt resultante de comparar otra muestra problema distinta de la placa con el control se denomina $\Delta\Delta Ct$ y lo que permite es comparar las cantidades de dos muestras problemas entre sí a partir de las diferencias entre el *threshold cycle* de cada una de ellas y el control. La normalización, o lo que es lo mismo, la expresión de este valor en términos relativos da el valor de RQ y se expresa como $2^{\Delta\Delta Ct}$.

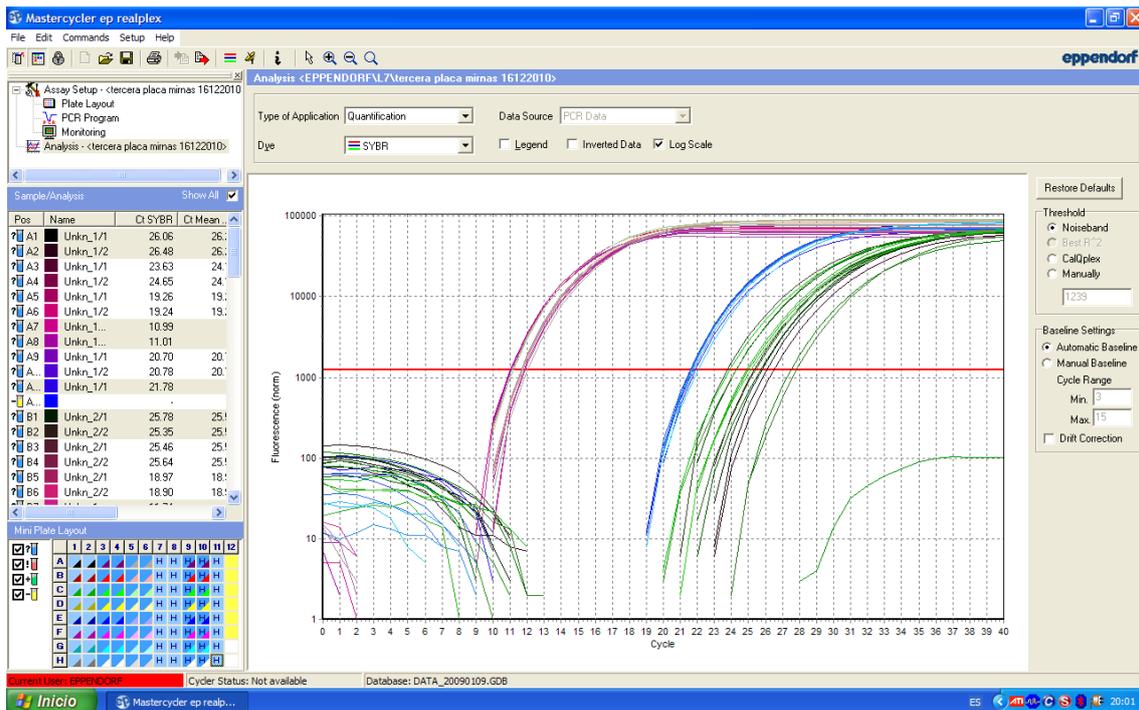


Figura 46: Output de los resultados de una QPCR de miRNAs.

3.6 Validación de *miRNA-203* y *miRNA-205* candidatos sobre muestras de tumores humanos

Tras la validación de los miRNA candidatos determinados en el array de miRNA en las líneas celulares, el siguiente paso en el diseño del estudio fue validar su expresión sobre tumores humanos. Para ello utilizamos dos métodos de evaluación diferentes, la QPCR de muestras humanas y la hibridación *in situ* de miRNA sobre tejidos en parafina, con la idea además de determinar cuál de ellas sería más eficiente y robusta para su utilización en tumores humanos. Los resultados obtenidos mediante la validación de miRNA en tumores humanos mediante QPCR los veremos en detalle en el apartado de resultados al igual que todos los datos relacionados con la expresión de miRNAs en las líneas celulares.

3.6.1 Detección de miRNA en tejidos incluidos en parafina mediante hibridación *in situ*

Se detectaron los miRNA candidatos sobre muestras incluidas en parafina mediante un proceso de hibridación *in situ* (ISH) empleando el kit “*miRNACURY LNA miRNA ISH on FFPE*

tissue samples”, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La ISH es uno de los métodos más comunes para visualizar la expresión y localización de genes en tejidos. Durante el proceso de detección de miRNAs mediante ISH, los miRNAs fueron “desenmascarados” empleando proteinasa K, lo que permitió que las sondas marcadas con digoxigenina (DIG) hibridaran con las secuencias de miRNAs. Las secuencias de las sondas de hibridación fueron las siguientes: 5'-CAGACTCCGGTGAATGAAGGA-3' (para el *miR-205*) y 5'-CAAGTGGTCCTAAACATTTAC-3' (para el *miR-203*). Tanto los extremos 5' como 3' se marcaron con DIG. Se utilizó la sonda inespecífica 5'-AGTCTATGGTATTTCAGTACTCA-3' como control. La DIG se detectó mediante un anticuerpo específico conjugado con fosfatasa alcalina. Ésta convierte los sustratos solubles 4-nitro azul de tetrazolio (NBT) y 5-bromo-4-doro-3-indolilfosfato (BCIP) en un precipitado azul oscuro insoluble en agua y alcohol, el NBT-BCIP (Figura 47). Finalmente, se añadió una tinción de contraste nuclear para proporcionar una mejor resolución histológica, en nuestro caso fue *Fast Red*.

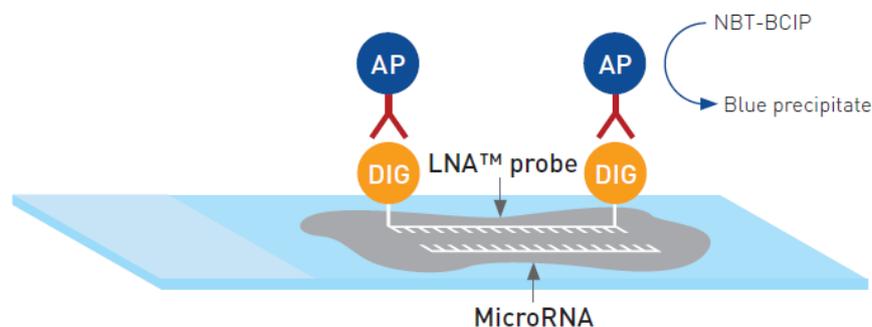


Figura 47: Esquema del proceso de hibridación utilizado en la HIS de miRNA.

Para la detección de los miRNA sobre muestras en parafina mediante ISH, inicialmente se desparafinó el tejido, dejándolo en una placa durante 1 hora a 65° C y se le sometió a tres lavados con xilol de 10 min cada uno, seguidos de la hidratación de las muestras con lavados sucesivos en etanoles de concentración decreciente al 100 %, 90 % y 70 %, respectivamente, durante 10 min cada uno. Después se introdujeron en agua y se incubaron durante 13-18 min (dependiendo el tejido) en proteinasa K a 37° C. Para eliminar la proteinasa K se introdujeron las muestras en agua durante 5 minutos adicionales y se dejaron secar.

A continuación, se añadió la sonda que previamente se desnaturalizó (4 min a 90° C) 25 µl de sonda y se dejó incubar durante 16 horas a 37° C. Posteriormente, se lavó con 5x PBS a 60° C durante 5 minutos, para eliminar la sonda, y se procedió a bloquear con una solución de bloqueo durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó una hora a 37° C con el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (Roche REF. #11 093 274 910). Se eliminó el anticuerpo sobrante con dos lavados de PBS-tween-20 a temperatura ambiente durante 5 minutos. En este momento, se procedió a la incubación con el sustrato NBT/BCIP (Roche REF #11 697 471 001) de revelado ya que el anticuerpo está conjugado con

fosfatasa alcalina, se incubó la muestra en el porta en esta solución a 30° C durante toda la noche. Finalmente, se hizo una contratinción con *Fast Red* (Vector Laboratorios, INC CA 94010) durante 5 minutos, se lavó con agua y se deshidrató con pases sucesivos en alcoholes de 70 %, 90 % y 100 %. Se montó añadiendo una gota medio de montaje y se dejó secar toda la noche. Se analizó al día siguiente.

Para el análisis de la intensidad de la tinción se evaluó de manera análoga al de las otras tinciones de inmunohistoquímica. En el caso de los miRNA y para valorar de manera más específica su relación con la capacidad de invasión tumoral, se evaluó también la intensidad de tinción específicamente en el frente de invasión del tumor. Los datos de la expresión de miRNAs mediante ISH los veremos en detalle en el apartado de resultados.

4 ESTUDIO ESTADÍSTICO Y ANÁLISIS MULTIVARIANTE

Se partió de un total de 118 individuos a los que se les diagnosticó de CEC.

Después del análisis descriptivo general de las variables que nos permitió conocer las características de la muestra, se procedió a la comparación de las mismas para determinar si existían relaciones entre ellas. Cuando las variables fueron cualitativas, utilizamos tablas de contingencia y se empleó el test de la Chi-Cuadrado de Independencia o bien el test exacto de Fisher cuando la frecuencia en alguna de las casillas de la tabla de contingencia fue menor de 5. Se rechazó la hipótesis nula (H_0) cuando el valor de P fue menor de 0.05. La representación gráfica de la relación estadística entre las variables se hizo mediante el software libre Cytoscape (v.3.1.0) (www.cytoscape.org).

Posteriormente, se construyeron modelos de regresión logística para predecir diferentes variables respuesta, en concreto: desarrollo de eventos de mala evolución clínica considerados de forma global, recidiva local, riesgo de progresión ganglionar y riesgo de progresión del TNM durante el seguimiento. Se emplearon distintas variables predictoras en cada caso y se utilizó el método de Ward para demostrar las variables que predecían de manera independiente la variable respuesta estudiada. Se consideraron significativas las variables para las que el valor de P fue menor de 0.05 (nivel de significación del 95%). La fuerza predictora se determinó mediante la *odd ratio* (OR) y con el intervalo de confianza (IC) del 95% (siempre y cuando éste no indujera el valor de 1).

Cuando se pretendió comparar una variable cuantitativa con una variable cualitativa de dos categorías, primero se aplicó la prueba no paramétrica de bondad de ajuste de Kolmogórov-Smirnov (Prueba K-S), para valorar si la variable cuantitativa se ajustaba a una distribución normal. Si la muestra seguía una distribución normal, se utilizó la prueba t de Student para contrastar la independencia de dos muestras y el test del ANOVA para comparar más de dos muestras entre sí. En caso de que los datos no siguieran una distribución normal se empleó la U de Mann-Whitney (para muestras independientes) y la W de Wilcoxon (para muestras relacionadas) cuando se compararon dos muestras o el test de Kruskal-Wallis cuando se compararon más de dos muestras independientes entre sí. En todos los casos utilizamos el nivel de significación del 95%.

La comparación de sucesos temporales, como la latencia hasta la aparición de los diferentes eventos (eventos de mala evolución clínica considerados de forma global, recidiva local, progresión ganglionar y progresión del TNM) se hizo por el método de Kaplan-Meier y se calculó el nivel de significación por el método de Mantel-Cox. Las variables identificadas como posibles factores de riesgo se introdujeron en el análisis multivariante, para identificar los factores de riesgo independientes de un determinado evento con el modelo de probabilidades

proporcionales de Cox. El riesgo alfa asumido durante el estudio fue del 5% (nivel de significación del 95%).

Se llevó a cabo un análisis multivariante mediante un biplot logístico externo (Demey et al., 2008), con el fin de evaluar si los miRNAs contribuyen, junto con otras variables clínico-patológicas y moleculares, a la definición de agrupaciones de pacientes con perfiles pronósticos similares. El algoritmo comienza con un Análisis de Coordenadas Principales (ACoP), técnica similar a las Componentes Principales pero para variables categóricas. Esta técnica nos permite representar a los pacientes en un espacio euclídeo de baja dimensión (un plano) en el cual la proximidad entre dos individuos indica que éstos tienen un perfil pronóstico similar de acuerdo a las variables consideradas. En este mapa euclídeo los pacientes son representados por puntos. Los ejes principales (horizontal y vertical) representan gradientes latentes sobre los que se ordenan los pacientes según su perfil pronóstico. El eje horizontal es siempre el que absorbe más información; por tanto el más importante para clasificar los pacientes desde el punto de vista pronóstico.

El segundo paso del algoritmo consiste en ajustar un modelo de Regresión Logística para cada variable, usando los gradientes latentes como variables independientes. Los coeficientes de regresión conforman los vectores que muestran la dirección que mejor predice la probabilidad de presencia de cada variable. En nuestro caso, se interpreta que la proyección de un paciente en la dirección de un vector cualquiera (miRNA o cualquier otra variable) predice la probabilidad de presencia de esa característica en el paciente. O sea, los pacientes representados en el sentido positivo del vector que representa a una variable son los que la característica está presente. De esta manera, para cada variable, el diagrama de ordenación (plano con los puntos que representan a los pacientes) puede ser dividido en dos regiones que predicen la presencia y/o la ausencia de esa característica. Las dos regiones están separadas por una línea que es perpendicular al vector que representa a la variable y corta el vector en el punto 0.50. Para facilitar la interpretación gráfica, en los extremos de cada vector se fijan puntos de predicción con probabilidad conocida, es así como el 0.50 se fija como punto de corte para la predicción de la presencia y 0.75 para la dirección de mayor probabilidad creciente (ver Figura 139, en el anexo).

La longitud del vector que representa a la variable debe ser interpretada como una medida inversa a la capacidad discriminante de la variable, esto es, vectores más cortos corresponden con variables que discriminan mejor a los pacientes según pronóstico. La relación entre las diferentes variables proyectadas sobre el plano Biplot, se interpreta según el ángulo que formen. Cuando dos variables tengan la misma dirección, o formen ángulos pequeños, se dice que están positivamente correlacionados, cuando tengan direcciones opuestas que se correlacionan negativamente; si forman ángulos rectos, son independientes.

La calidad de representación de cada variable se mide como el porcentaje de su variabilidad representada en la dimensión reducida. Se calcula como el coseno al cuadrado del ángulo entre el punto/vector en el espacio multidimensional y su proyección sobre el plano de la representación. Dado que la representación se centra en el origen, la variabilidad de cada variable se mide por su distancia al cuadrado del origen, de modo que la calidad de representación se puede medir por la relación entre la distancia al cuadrado en la dimensión reducida y la distancia al cuadrado en el espacio multidimensional. La calidad de representación de cada variable viene medida por la combinación de tres índices: el P (p-valor) en el modelo de regresión logística con el fin de analizar la relación de la solución y cada variable (mediante la *deviance*), la R^2 de Nagelkerke y el porcentaje de clasificación correcta, usando 0.5 como punto de corte para la probabilidad esperada. Para obtener grupos homogéneos aplicamos el análisis de dúster utilizando el método de Ward. Esto permitió obtener grupos de pacientes con perfiles similares. El algoritmo proporciona una representación gráfica simultánea de los pacientes y las variables, que es de interpretación sencilla y permite una exploración intuitiva y visual de la matriz de datos (Demey et al., 2008).

Se utilizó un programa informático creado por el Departamento de Estadística de la Universidad de Salamanca, basado en el código Matlab, para aplicar estos métodos y que puede obtenerse de forma gratuita en la página web <http://biplot.usal.es/ClassicalBiplot/index.html>. La técnica representa a los pacientes como puntos y las variables como vectores en un diagrama de dispersión, como un sistema de exploración de las características principales de la serie de datos. Resumiendo lo dicho anteriormente, el gráfico se interpreta de la siguiente manera: i.) la distancia entre pacientes (puntos) del diagrama de dispersión es inversamente proporcional a sus perfiles de similitud (es decir, los pacientes próximos tienen características similares); ii.) el ángulo entre los vectores (variables) indica el grado de asociación entre ellas (los ángulos agudos (pequeños) indican que las variables están estrechamente relacionadas, lo que quiere decir que cuando un paciente presenta una característica, es altamente probable que presente la otra y viceversa; iii.) la proyección de los pacientes (puntos) sobre el vector de las variables estima la probabilidad esperada de la característica para ese paciente (punto) dada sus características; iv.) la longitud de los vectores de cada variable indica el poder de discriminación de la variable para pacientes separados. Los vectores más cortos tienen mayor poder de discriminación siempre y cuando la representación gráfica esté bien hecha (Demey et al., 2008).

RESULTADOS

1 INTRODUCCIÓN A LOS RESULTADOS DE LA TESIS DOCTORAL

En la presente tesis doctoral evaluamos los factores pronósticos del carcinoma epidermoide cutáneo (CEC) a partir de tres niveles de análisis. Presentamos aquí un resumen que creemos ayuda a comprender mejor cómo están organizados los resultados y en definitiva cómo se ha concebido la tesis doctoral. En la Figura 48, se representan esquemáticamente los diferentes niveles de análisis (en relación con los objetivos definidos en la sección correspondiente) de esta tesis.

Inicialmente buscaremos factores pronósticos clínico-patológicos en el CEC. Además de los factores de riesgo clínico-patológicos reconocidos en el CEC, nuestro objetivo será también identificar nuevos factores de riesgo clínico-patológicos y/o validar factores clínico-patológicos cuyas implicaciones pronósticas están menos dadas. A partir de los resultados obtenidos del análisis univariante, nuestro objetivo es, especialmente, combinarlos para identificar aquellos factores de riesgo independiente de eventos de mala evolución clínica y de un acortamiento del intervalo libre de enfermedad en el CEC.

En segundo lugar, buscaremos proteínas con valor pronóstico en el CEC. Por un lado buscaremos asociaciones entre la expresión de las diferentes proteínas analizadas (que fueron seleccionadas a partir de la literatura) con las características clínico-patológicas y evolutivas del CEC, así como las relaciones existentes entre las propias proteínas entre sí. Una vez más, nuestro objetivo en este sentido será combinar los datos obtenidos del análisis univariante de proteínas, no solamente entre sí, sino también junto con otros previamente obtenidos del análisis clínico-patológico de los tumores, para identificar proteínas que constituyen factores de riesgo independiente del desarrollo de eventos de mala evolución clínica y del acortamiento del intervalo libre de enfermedad en el CEC y que puedan aportar datos adicionales del pronóstico del CEC.

En tercer lugar, buscaremos miRNAs –reguladores de la expresión génica implicados en cáncer– relacionados con el pronóstico en el CEC. Inicialmente evaluaremos la expresión diferencial de miRNAs en un panel de líneas celulares de origen murino que reproducen las diferentes fases de la evolución del CEC mediante micro-arrays de miRNAs. En segundo lugar, validaremos los datos del microarrays mediante QPCR y posteriormente evaluaremos la expresión de los miRNAs seleccionados y validados en las líneas celulares, en una serie de tumores humanos. Por un lado, seleccionaremos una serie de CEC de manera prospectiva, sobre los que se realizará la evaluación mediante QPCR. Por otro lado, seleccionaremos también retrospectivamente una serie de CEC con evolución clínica ya conocida. Las características clínico-patológicas y de expresión de proteínas serán evaluadas en todos los tumores. Los

miRNAs serán evaluados por hibridación in situ sobre los tejidos en parafina en todos los tumores (tanto aquéllos que se habían obtenido de manera prospectiva como los que se habían obtenido de manera retrospectiva). Según esto, tendremos que en una serie de tumores habremos evaluado la expresión de miRNAs mediante dos procedimientos distintos y en este sentido se compararán ambos sistemas de evaluación para ver cuál de los dos es más robusto y eficiente en tumores humanos. A continuación se comparará la expresión de miRNAs en tumores humanos con características clínico-patológicas y moleculares para buscar la asociación de la expresión de los mismos con fenotipos específicos de CEC. Una vez, buscaremos el valor pronóstico de los miRNAs en el CEC y para ello, pretenderemos construir un modelo que identifique clusters de tumores con diferente pronóstico en función de la expresión de los miRNAs evaluados y otras variables del resto de los niveles de análisis.

Por último combinaremos los datos de los tres niveles de análisis para intentar subclasificar tipos de CEC con arreglo a dichas características. En este sentido, nos centraremos en la comparación del CEC con el CEC derivado de enfermedad de Bowen (carcinoma bowenoide) y con la enfermedad de Bowen propiamente dicha. En el esquema se pretende mostrar un mapa de los diferentes niveles de análisis de CEC en la tesis doctoral y cómo se han relacionado entre sí para definir el pronóstico de la enfermedad.

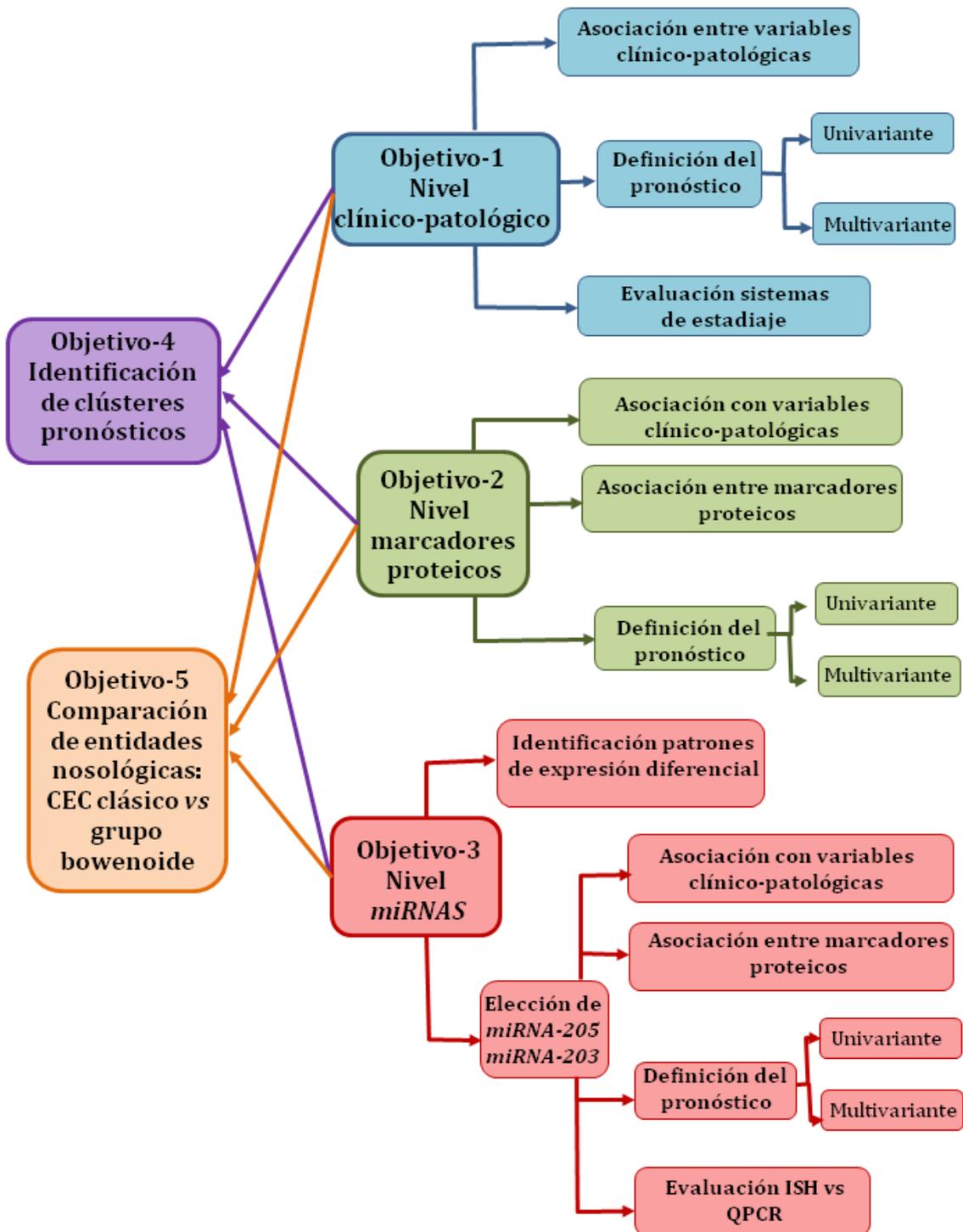


Figura 48: Diagrama de flujo que representa los distintos niveles de análisis desarrollados en esta tesis doctoral, qué se pretende obtener de ellos y cómo se relacionarán entre sí.

2 ANÁLISIS CLÍNICO-PATOLÓGICO DEL CARCINOMA EPIDERMOIDE CUTÁNEO:

2.1 Relación entre los parámetros clínico-patológicos analizados en el carcinoma epidermoide cutáneo

2.1.1 Asociación del grado de diferenciación del CEC con otras variables clínico-patológicas

Se estudió la existencia de asociaciones entre el grado de diferenciación del tumor con otras variables clínico-patológicas que figuran de manera detallada en la Tabla 21. En resumen, los tumores pobremente diferenciados exhibieron un patrón de crecimiento infiltrativo, mientras que en los tumores moderada y bien diferenciados el patrón de crecimiento fue predominante mixto y expansivo ($P = 0,000001$). Por otro lado, el grado pobre de diferenciación se observó más frecuentemente en los tumores que presentaron infiltración perineural ($P = 0,0001$) y linfovascular ($P = 0,001$), así como en aquéllos que exhibieron desmoplasia ($P = 0,001$), ulceración en el epitelio ($P = 0,048$) y un mayor espesor ($P = 0,003$).

Aquellos tumores con un buen grado de diferenciación presentaron con más frecuencia un infiltrado inflamatorio peritumoral intenso; mientras que los pobre y moderadamente diferenciados presentaron de forma predominante un grado de infiltrado inflamatorio peritumoral nulo o escaso-moderado ($P = 0,011$). Por otra parte, los tumores exhibieron más frecuentemente un grado de diferenciación pobre cuando presentaron un infiltrado inflamatorio intratumoral intenso; y fueron con más frecuencia moderadamente o/y bien diferenciados cuando el infiltrado inflamatorio intratumoral estuvo ausente ($P = 0,032$). La relación con el estadio tumoral al diagnóstico era esperable si tenemos en cuenta que es un parámetro histopatológico que sirve para definirlo (Farasat *et al.*, 2011) y, por lo tanto, no se ha tenido en cuenta (Tabla 21, Figuras 49-51).

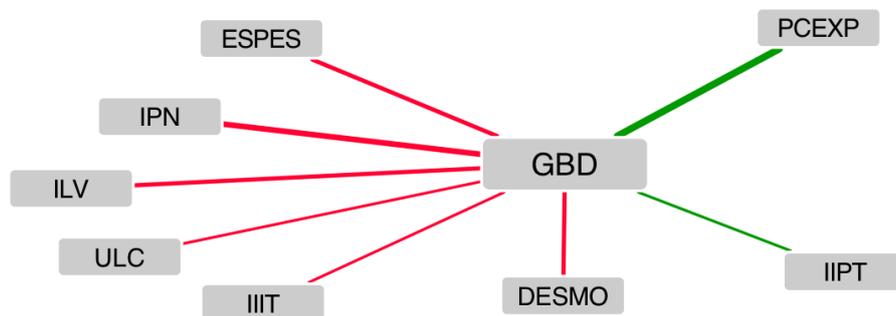
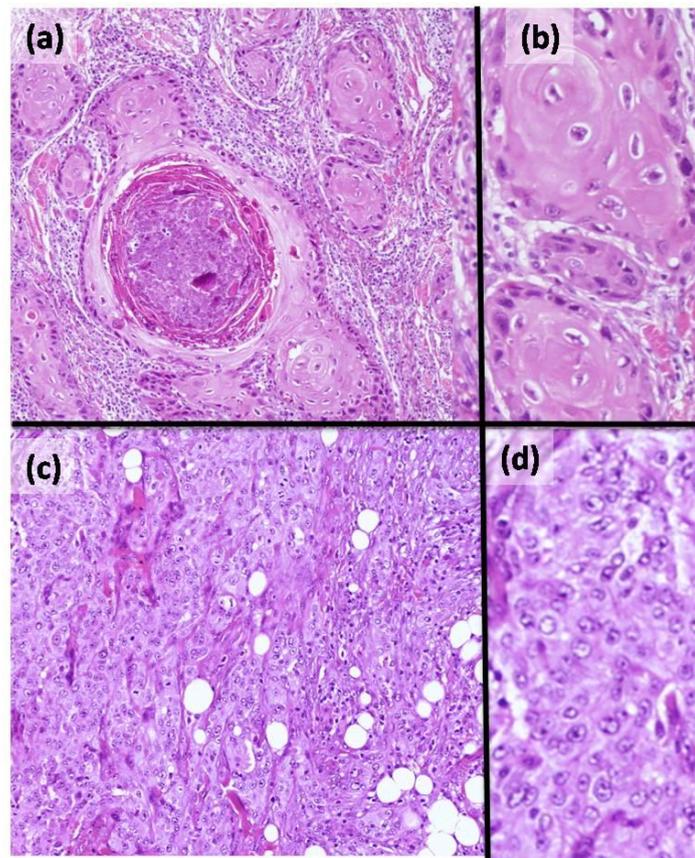


Figura 49: Panel superior. Imágenes de H&E que muestran tumores con diferente grado de diferenciación: (a) tumor bien diferenciado (200x) y (b) tumor bien diferenciado (400x) con evidentes globos corneos; (c) tumor pobremente diferenciado (200x) y (d) tumor pobremente diferenciado (400x) con ausencia de diferenciación queratósica. **Panel inferior. Asociaciones entre el grado de diferenciación con otras variables clínico-patológicas en los CEC, representadas mediante Cytoscape®.** Cada nodo muestra una variable clínico-patológica, cada línea indica asociación entre las variables, cuyo grosor es inversamente proporcional al valor de P. El color rojo indica asociación negativa, el verde, asociación positiva. GBD (grado de diferenciación bueno), PCEXP (patrón de crecimiento expansivo), ULC (ulceración), DESMO (desmoplasia), ILV (infiltración linfovascular), IPN (infiltración perineural), IIPT (infiltrado inflamatorio peritumoral intenso), IIIT (infiltrado inflamatorio intratumoral intenso), ESPES (espesor).

Grado de diferenciación					
		Bueno	Moderado	Pobre	
Patrón de crecimiento	Expansivo	16	10	0	0,000001
	Mixto	9	11	0	
	Infiltrativo	5	28	19	
Infiltración perineural	Sí	2	10	11	0,000158
	No	28	39	8	
Infiltración linfovascular	Sí	0	2	5	0,001
	No	30	45	12	
Desmoplasia	Sí	1	9	9	0,001
	No	29	40	10	
Ulceración	Sí	12	26	15	0,048
	No	13	12	3	
Infiltrado inflamatorio intratumoral	Nulo	19	22	5	0,032
	Valores intermedios	0	4	4	
	Intenso	11	23	10	
Infiltrado inflamatorio peritumoral	Nulo	0	2	3	0,011
	Valores intermedios	12	26	13	
	Intenso	18	21	3	
Espesor	(Me/RI)	4 (4)	6,5 (4)	6 (7,5)	0,003
Tamaño	(Me/RI)	19 (8,75)	18 (9)	20 (10)	N.S.

Tabla 21: Relación del grado de diferenciación y el resto de variables clínico-patológicas: Me (mediana), RI (rango intercuartílico), N.S. (no significativo).

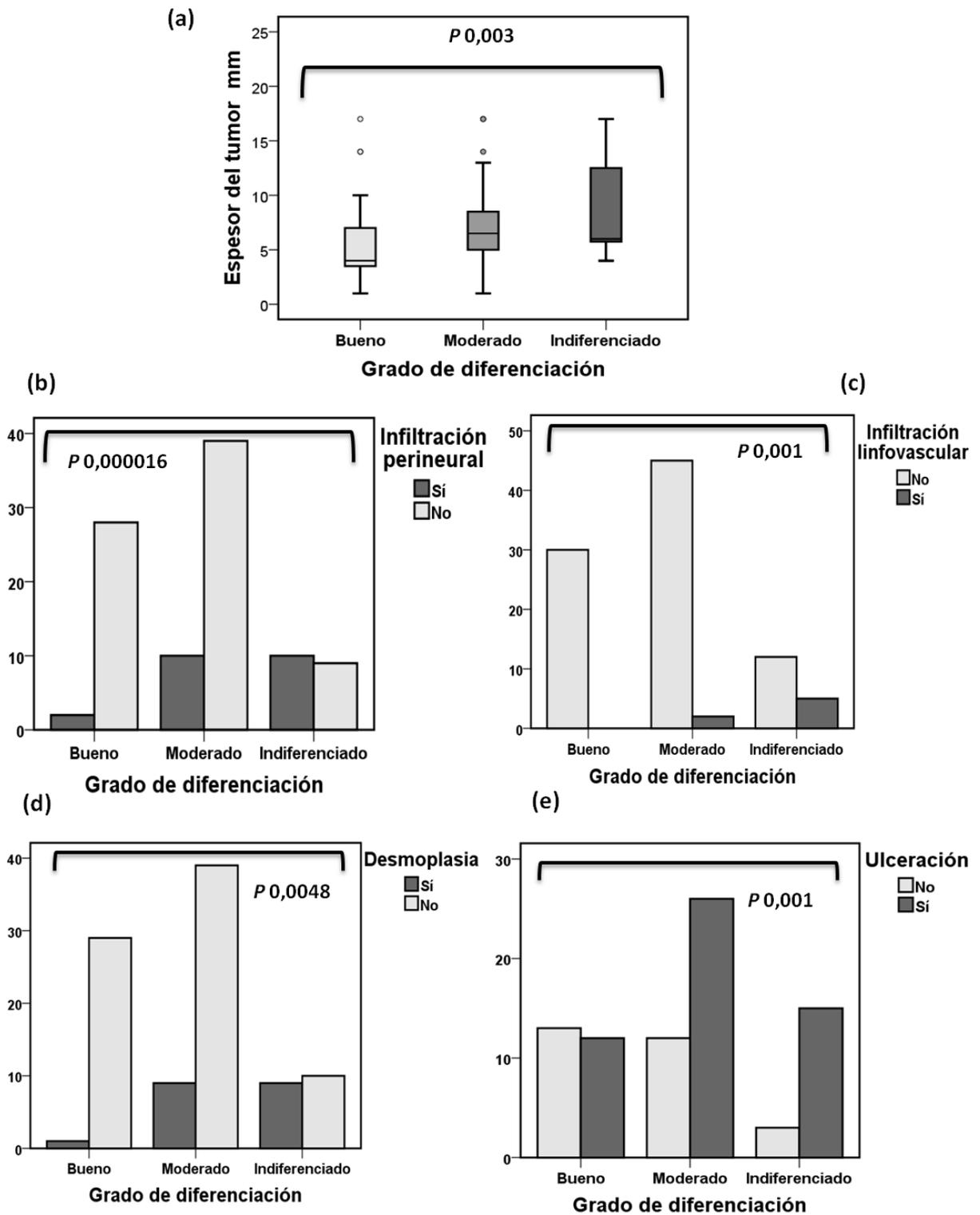


Figura 50: Representación gráfica de las asociaciones del grado de diferenciación con otras variables clínico-patológicas: (a) espesor del tumor, (b) infiltración perineural (c) infiltración linfovascular, (d) desmoplasia y (e) ulceración.

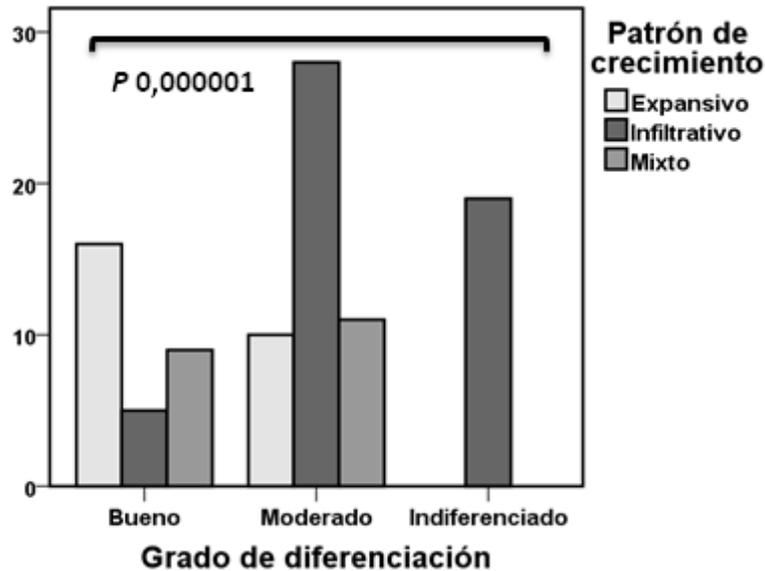


Figura 51: Representación gráfica de la correlación entre el grado de diferenciación y el patrón de crecimiento tumoral.

2.1.2 Relación del patrón de crecimiento tumoral con otras variables clínico-patológicas del CEC

Demostremos una asociación entre el patrón de crecimiento del CEC con una serie de variables clínico-patológicas que figuran en la Tabla 22. Por un lado, el patrón de crecimiento fue más frecuentemente infiltrativo en los tumores en estadio II *versus* en estadio I ($P = 0,001$), y en aquéllos en estadio T2b ($P = 0,0000006$) de la clasificación alternativa del *Brigham and Women's Hospital*. Fue también más frecuente el patrón de crecimiento infiltrativo en los tumores con grado de diferenciación pobre ($P = 0,0000001$), en aquéllos que presentaban estroma desmoplásico ($P = 0,00003$), ulceración en el epitelio ($P = 0,001$), infiltración perineural ($P = 0,000080$) y linfvascular ($P = 0,027$), así como en los de mayor tamaño ($P = 0,034$) y espesor ($P = 0,0001$). El patrón de crecimiento infiltrativo fue también más frecuente en los tumores con intenso infiltrado inflamatorio intratumoral ($P = 0,001$). Por otro lado, hubo una tendencia a presentar un patrón expansivo en aquellos casos con intenso infiltrado inflamatorio peritumoral ($P = 0,062$). Además, el patrón tendió a ser expansivo en los tumores que se diagnosticaron antes, con un menor tiempo de evolución ($P = 0,018$) (Tabla 22, Figuras 52-55).

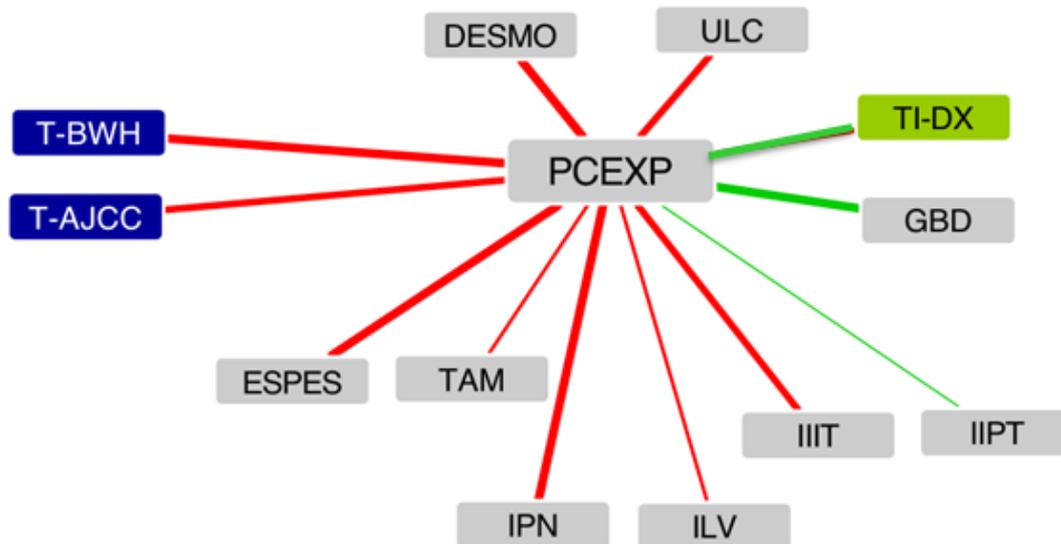


Figura 52: Relaciones entre el patrón de crecimiento y otras variables clínico patológicas. Esquema obtenido con el software libre Cytoscape®. Cada nodo muestra una variable clínico-patológica, cada línea indica la asociación entre las variables, cuyo grosor es inversamente proporcional al valor de P. El color gris de los nodos representa variables histopatológicas, el color verde representa variables clínicas y el color azul oscuro representa sistemas de estadiaje en el CEC. El color rojo de las líneas indica una asociación negativa, el color verde indica una asociación positiva. PCEXP: Patrón de crecimiento expansivo, ESPES (espesor), TAM (tamaño), TI-DX (tiempo hasta el diagnóstico del tumor primario), IIPT (infiltrado inflamatorio peritumoral intenso), IIT (infiltrado inflamatorio intratumoral intenso), IPN (infiltración perineural), ILV (infiltración linfovascular), ULC (ulceración), DESMO (desmoplasia), GDB (grado de diferenciación bueno), T-AJCC (estadio T2 según la clasificación de la AJCC), T-BWH (estadio T2b según la clasificación alternativa del Brigham and Women's Hospital).

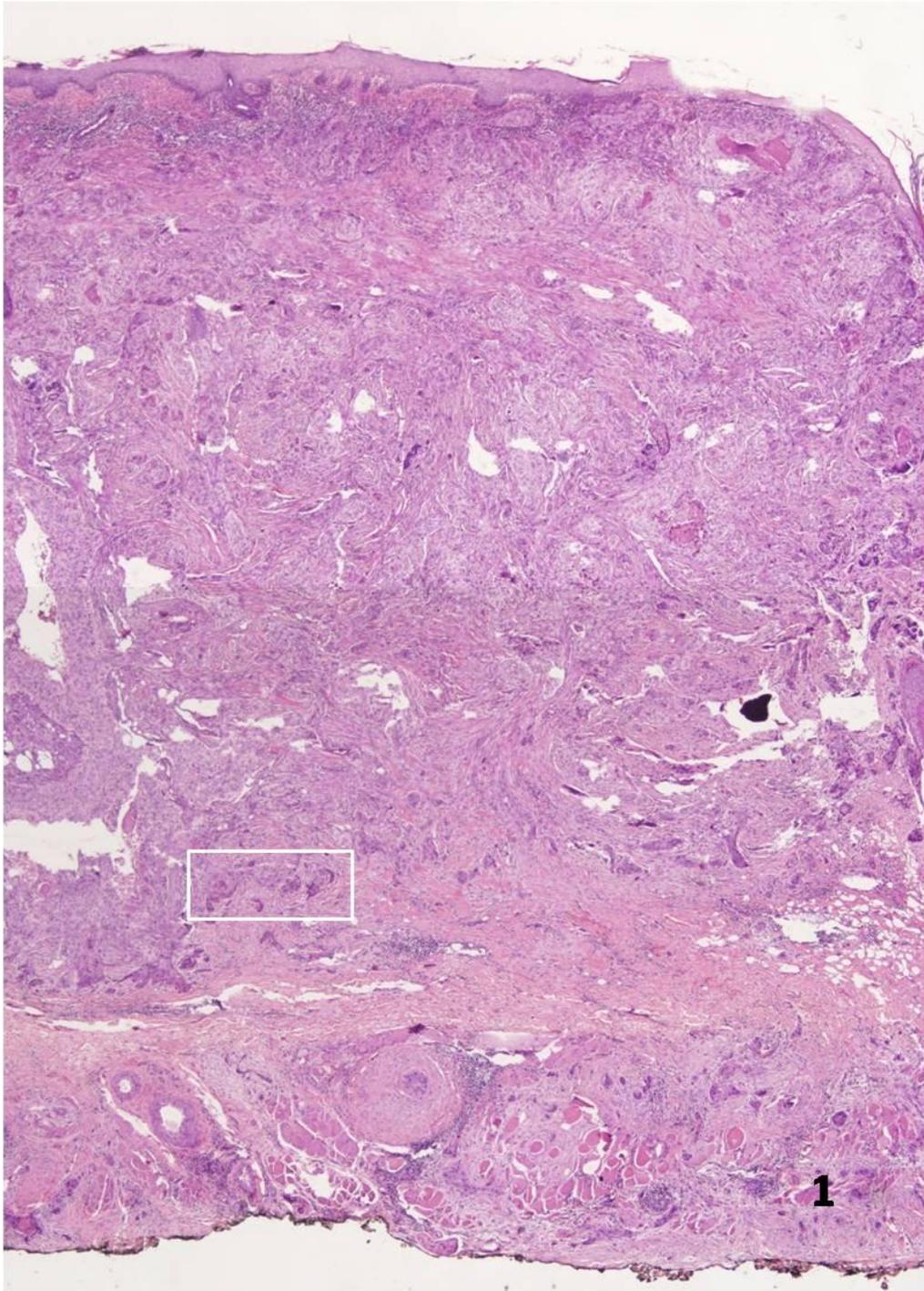


Figura 53: Imagen panorámica de un carcinoma epidermoide con patrón de crecimiento infiltrativo. El tumor es pobremente diferenciado, tiene un espesor > 2 mm, más de 2 cm de diámetro, exhibe desmoplasia y el marco blanco señala una zona en la que existía infiltración perineural.

Patrón de crecimiento					
		Expansivo	Mixto	Infiltrativo	
T-AJCC	I	15	10	10	0,001
	II	11	10	42	
T-BWH	T1	15	10	10	0,000006
	T2a	11	10	19	
	T2b	0	0	23	
Grado de diferenciación	Bueno	16	9	5	0,000001
	Moderado	10	11	28	
	Pobre	0	0	19	
Desmoplasia	Sí	0	0	19	0,00003
	No	26	20	33	
Ulceración	Sí	8	7	38	0,001
	No	14	4	9	
Infiltración perineural	Sí	0	1	22	0,000016
	No	26	19	30	
Infiltración linfovascular	Sí	0	0	7	0,027
	No	26	20	41	
Infiltrado inflamatorio intratumoral	Nulo	20	9	17	0,001
	Escaso/Mod	6	11	27	
	Intenso	0	0	8	
Infiltrado inflamatorio peritumoral	Nulo	0	0	5	0,062
	Escaso/Mod	15	7	29	
	Intenso	11	13	18	
Tiempo hasta el diagnóstico	<2 meses	7	1	3	0,018
	>2 meses	19	18	46	
Tamaño	(Me/RI)	16,5 (10,25)	18 (7,5)	20 (10)	0,034
Espesor	(Me/RI)	3,75 (3,75)	6 (4,05)	6,5 (7)	0,00001

Tabla 22: Asociaciones entre el patrón de crecimiento y el resto de variables clínico-patológicas. T-AJCC (estadio T según la clasificación de la AJCC), T-BWH (estadio T según la clasificación del Brigham and Women's Hospital), Me (mediana), RI (rango intercuartílico).

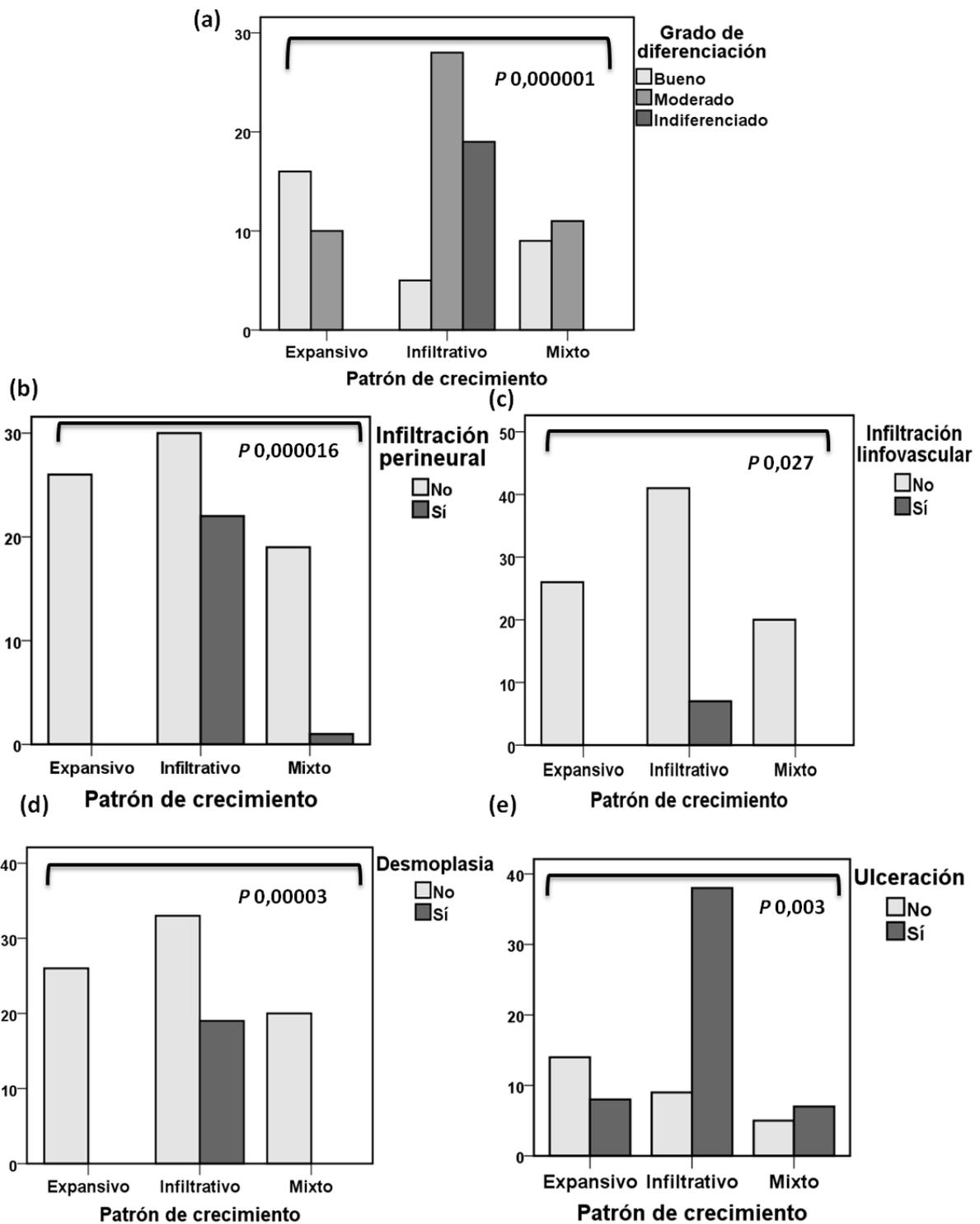


Figura 54: Asociaciones entre el patrón de crecimiento tumoral y otras características clínico-patológicas (I). El patrón de crecimiento del tumor se relacionó con (a) grado de diferenciación, (b) infiltración perineural, (c) infiltración linfovascular, (d) desmoplasia, y (e) ulceración.

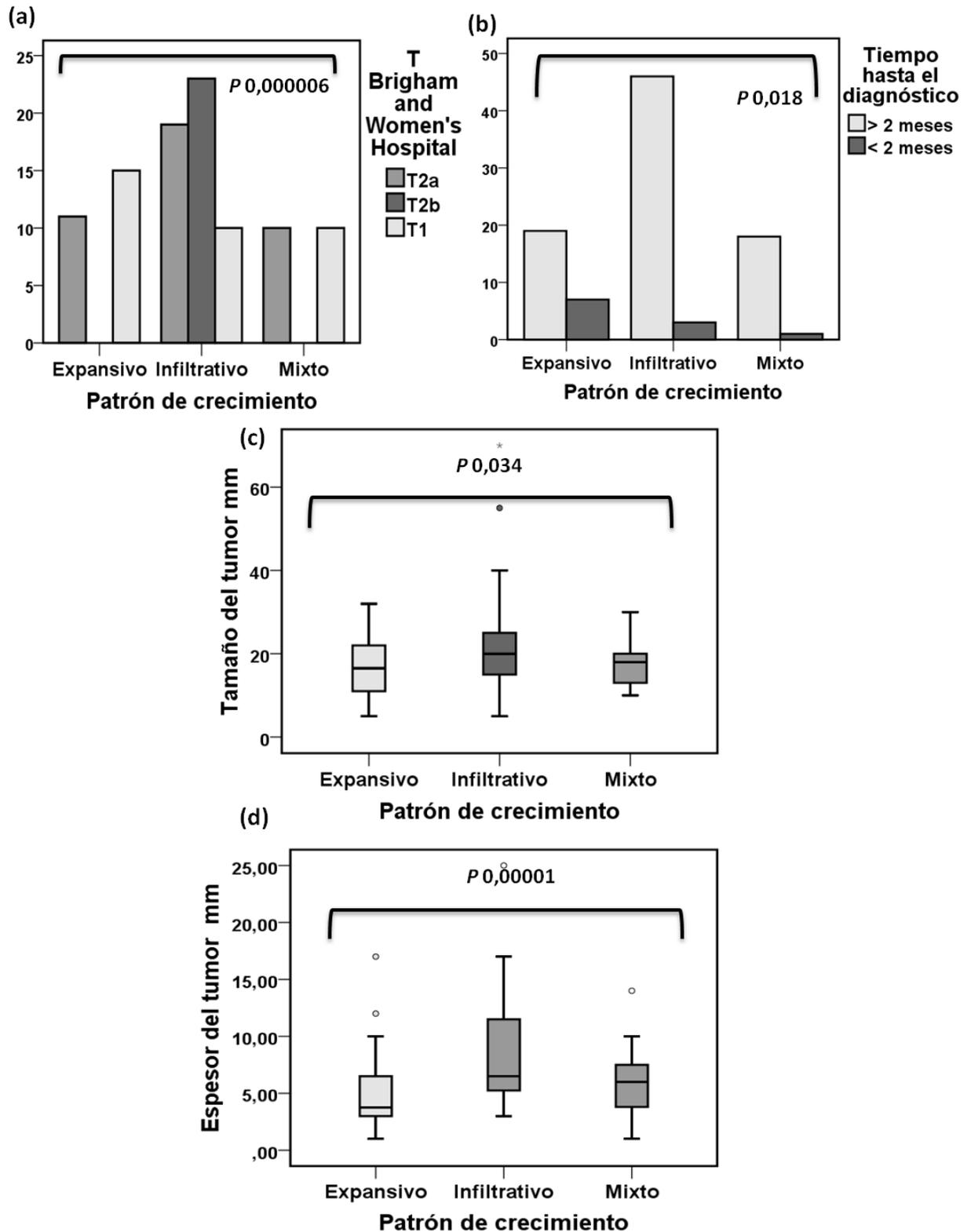


Figura 55: Asociaciones entre el patrón de crecimiento tumoral y otras características clínico-patológicas (II). (a) estadio T (Brigham and Women's Hospital), (b) tiempo hasta el diagnóstico del tumor, (c) tamaño, y (d) espesor.

2.1.3 Asociación de la desmoplasia con otras características clínico-patológicas del tumor

La presencia de desmoplasia se asoció a una serie de variables clínico-patológicas e histopatológicas que se describen de forma detallada en la Tabla 23. En cuanto a las primeras, la desmoplasia fue mayor de forma estadísticamente significativa cuanto mayor fue el estadio del TNM al diagnóstico, el estadio T alternativo *del Brigham and Women's Hospital* ($P = 0,000032$, T2b versus T2a y que T1) y la presencia de ulceración superficial ($P = 0,008$).

En cuanto a las variables histopatológicas, la desmoplasia fue significativamente mayor en tumores con grado pobre de diferenciación ($P = 0,001$), patrón de crecimiento infiltrativo ($P = 0,00003$) e infiltración perineural ($P = 0,0000005$). No se demostró relación estadísticamente significativa entre la desmoplasia y la infiltración linfocelular, la presencia de infiltrados inflamatorios, el espesor o el tamaño tumorales, aunque se observó una tendencia estadística para estas variables (Tabla 23, Figuras 56-58).

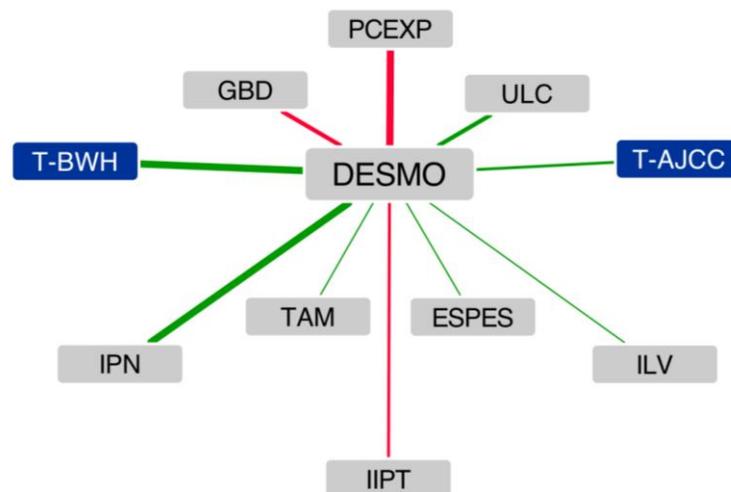


Figura 56: Asociaciones de la desmoplasia con otras variables clínico-patológicas. Figura obtenida mediante Cytoscape®. Cada nodo muestra una variable clínico-patológica, cada línea indica la asociación entre las variables, cuyo grosor es inversamente proporcional al valor de P. El color gris de los nodos representa variables histopatológicas y el color azul oscuro representa sistemas de estadiaje en el CEC. El color rojo de las líneas indica una asociación negativa, el color verde indica una asociación positiva. DESMO (desmoplasia), ESPES (espesor), TAM (tamaño), IIPT (infiltrado inflamatorio peritumoral intenso), IIIT (infiltrado inflamatorio intratumoral intenso), ILV (infiltración linfocelular), IPN (infiltración perineural), ULC (ulceración), PCEXP (patrón de crecimiento expansivo), GDB (grado de diferenciación bueno), T-AJCC (estadio T2 según la clasificación de la AJCC). T-BWH (estadio T2b según la clasificación alternativa del Brigham and Women's Hospital)

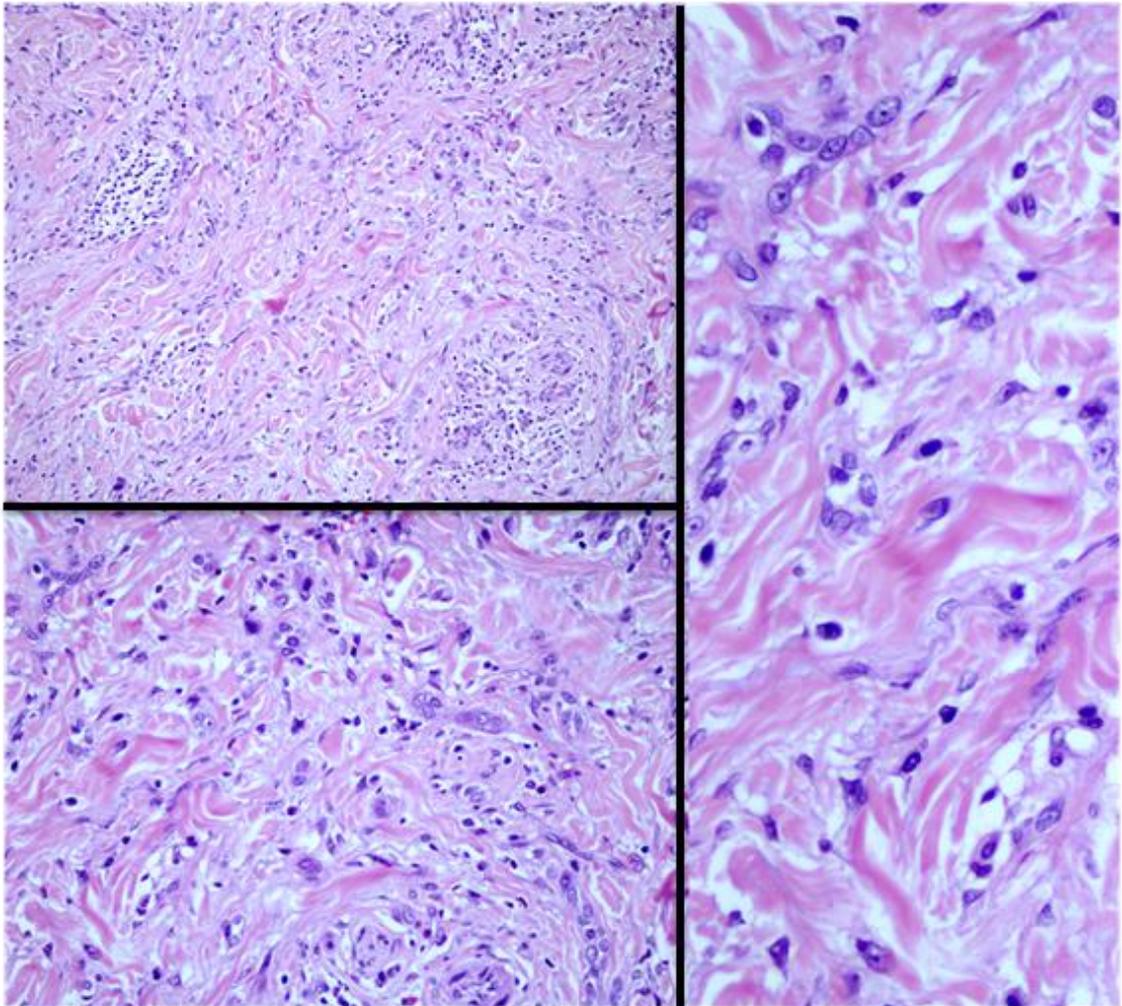


Figura 57: Desmoplasia: Detalle de un tumor con patrón de crecimiento infiltrativo, pobremente diferenciado, que presenta zonas de desmoplasia en el estroma. Nótese los haces de colágeno desmoplásicos en detalle en la imagen de la derecha.

Desmoplasia				
		Sí	No	
Estadio T- AJCC	I	3	32	0,044
	II	16	47	
Estadio T- BWH's	T1	2	32	0,000032
	T2a	4	36	
	T2b	12	11	
Grado de diferenciación	Bueno	1	29	0,001
	Moderado	9	40	
	Pobre	9	10	
Patrón de crecimiento	Expansivo	0	26	0,00003
	Mixto	19	20	
	Infiltrativo	0	33	
Ulceración	Sí	15	38	0,008
	No	1	27	
Infiltración perineural	Sí	12	11	0,000005
	No	7	68	
Infiltración linfovascular	Sí	3	4	0,077
	No	14	73	
Infiltrado inflamatorio peritumoral	Nulo-escaso	8	15	0,033
	Moderado-Intenso	11	64	
Infiltrado inflamatorio intratumoral	Nulo-escaso	6	15	N.S.
	Moderado-Intenso	13	64	
Tamaño	(Me/RI)	20 (15)	18 (9)	0,066
Espesor	(Me/RI)	6,5 (10)	6 (5,45)	0,075

Tabla 23: Asociaciones entre la desmoplasia y el resto de variables clínico-patológicas. T-AJCC (estadio T según la clasificación de la AJCC), T-BWH (estadio T según la clasificación del Brigham and Women's Hospital), Me (mediana), RI (rango intercuartílico), N.S. (no significativo).

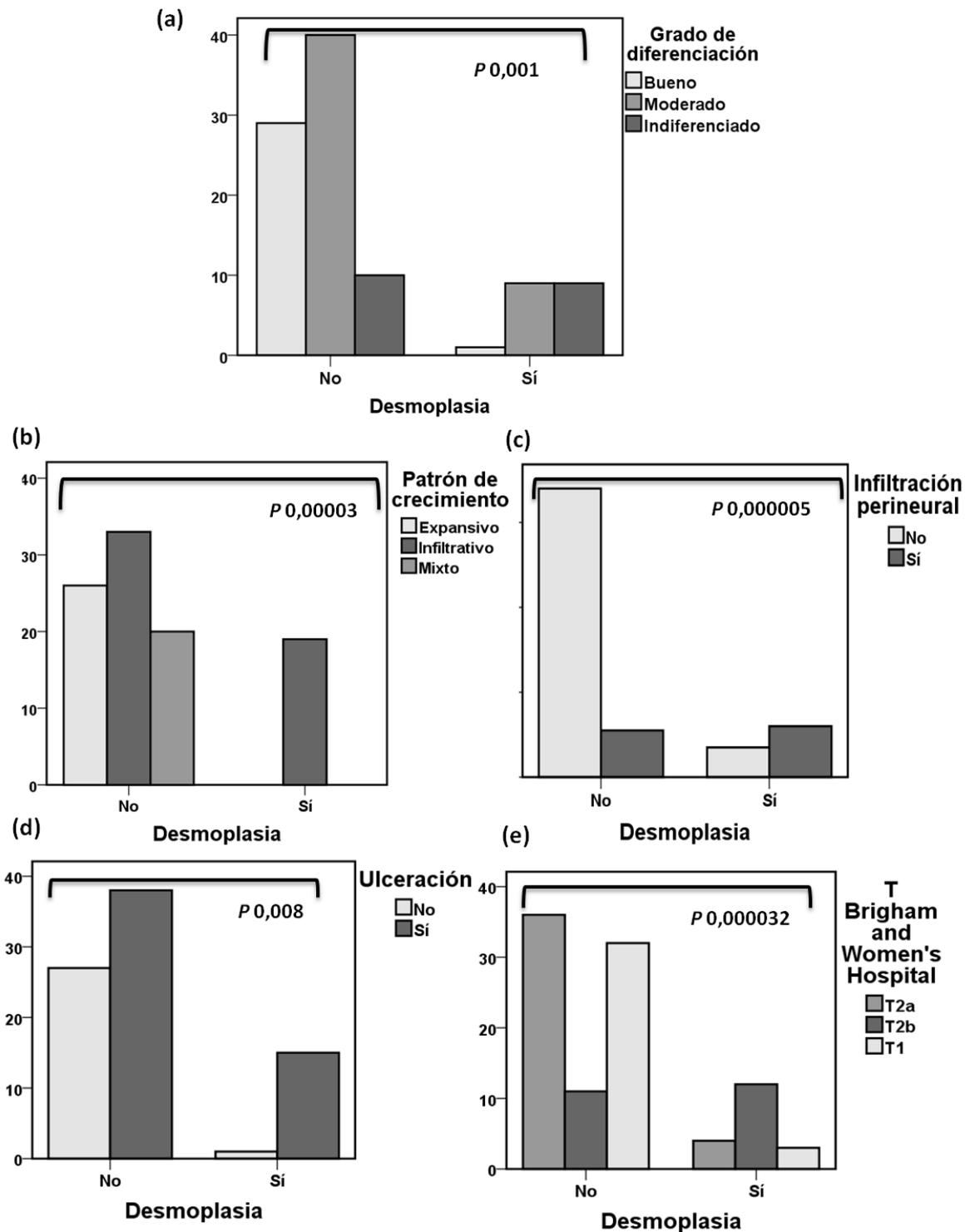


Figura 58: Representación gráfica de las asociaciones entre la desmoplasia y otras variables clínico-patológicas. (a) Grado de diferenciación, (b) patrón de crecimiento, (c) infiltración perineural, (d) ulceración y (e) estadio T según la clasificación del Brigham and Women's Hospital.

2.1.4 Asociación del tamaño tumoral con otras variables clínico-patológicas

El tamaño tumoral, en cuanto al diámetro mayor de su superficie, se relacionó con el espesor, de manera que los tumores con más superficie tuvieron también un mayor espesor (Figura 59). Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($P = 0,000050$; Correlación de Pearson, $R = 0,655$; $P < 0,000001$). El tamaño se relacionó también con el patrón de crecimiento, de manera que los tumores con patrón de crecimiento infiltrativo tendieron a ser más grandes que los no infiltrativos ($P = 0,034$); y existió una discreta tendencia a la relación entre la presencia de infiltración perineural y el tamaño ($P = 0,072$). Las asociaciones más relevantes entre el tamaño tumoral y el resto de las variables clínico-patológicas aparecen en las Figuras 60 y 61.

2.1.5 Relación del espesor tumoral con otras variables clínico-patológicas

El espesor tumoral se relacionó fuertemente con el tamaño tumoral (ver más arriba) (Figura 59). Fueron estadísticamente significativas las diferencias entre el valor medio del espesor de los tumores con el tamaño mayor y menor de 20 mm ($P = 0,00005$, test de Kruskal Wallis; y correlación de Pearson, $R = 0,655$; $P = 0,000001$). Se demostró la asociación entre el espesor de los tumores y su patrón de crecimiento, de manera que los tumores con patrón de crecimiento infiltrativo tuvieron mayor espesor que aquéllos con patrón de crecimiento mixto y expansivo ($P = 0,00001$). El espesor se asoció también con la presencia de infiltración perineural, de modo que los tumores que la presentaron fueron más gruesos que aquéllos sin infiltración perineural ($P = 0,006$). Existió también una tendencia estadística a la relación entre el espesor y la ulceración, aunque la significación de esta asociación fue más discreta que para el tamaño tumoral ($P = 0,084$); pero, en general, los tumores más gruesos estuvieron con más frecuencia ulcerados. Las relaciones estadísticas más importantes entre el espesor tumoral y las características clínico-patológicas de los tumores quedan representadas en las Figuras 60 y 61.

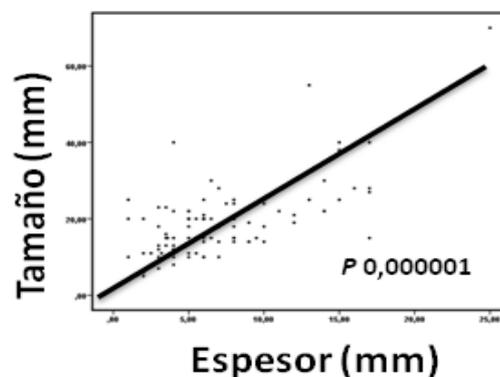


Figura 59: Diagrama de puntos de correlación entre el tamaño superficial del tumor y el espesor del mismo.

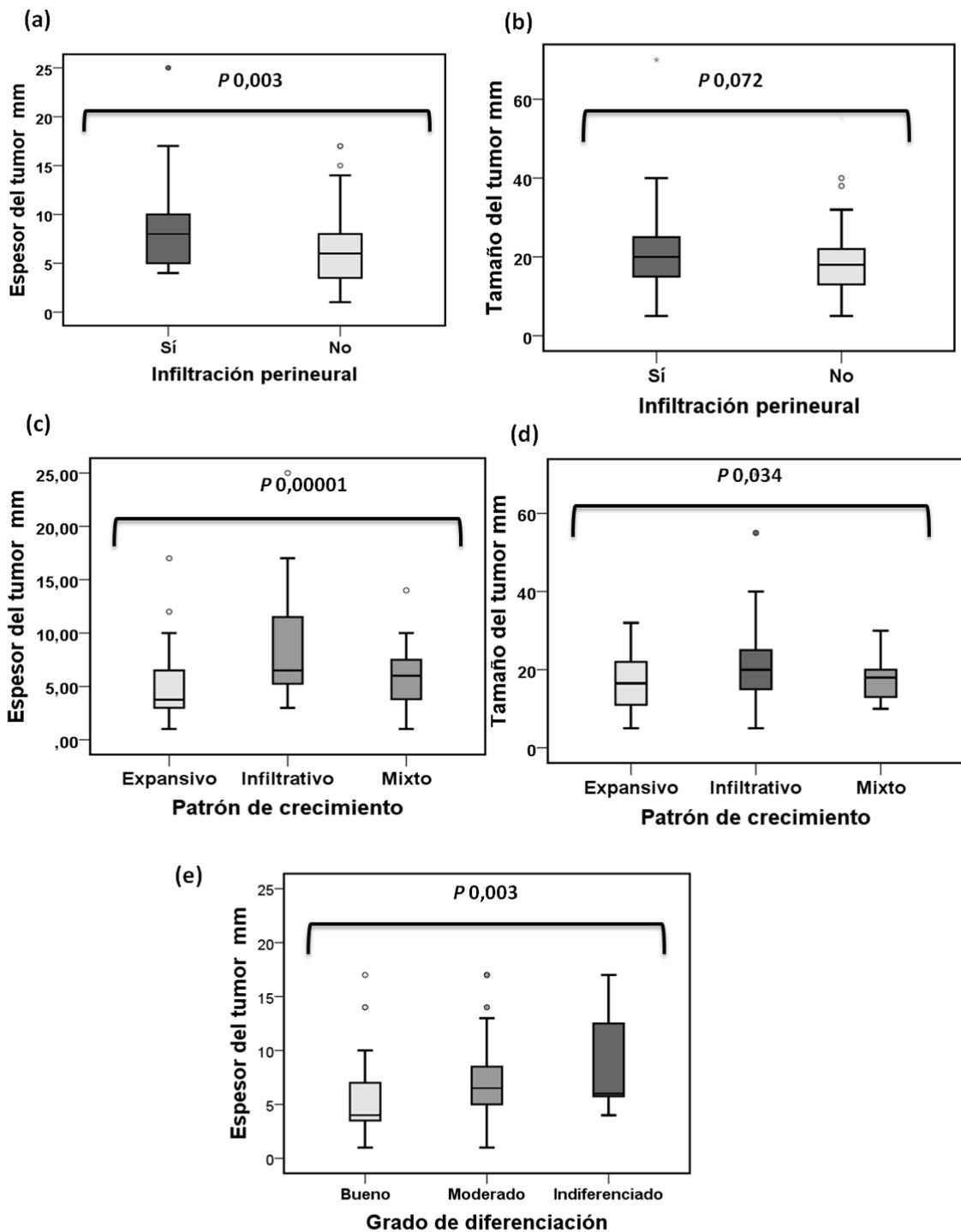


Figura 60: Representación gráfica de algunas correlaciones del tamaño y el esesor tumorales con otras variables clínico-patológicas. (a) Esesor e infiltración perineural, (b) tamaño tumoral e infiltración perineural, (c) esesor y patrón de crecimiento del tumor, (d) tamaño tumoral y patrón de crecimiento, (e) esesor y grado de diferenciación tumoral.

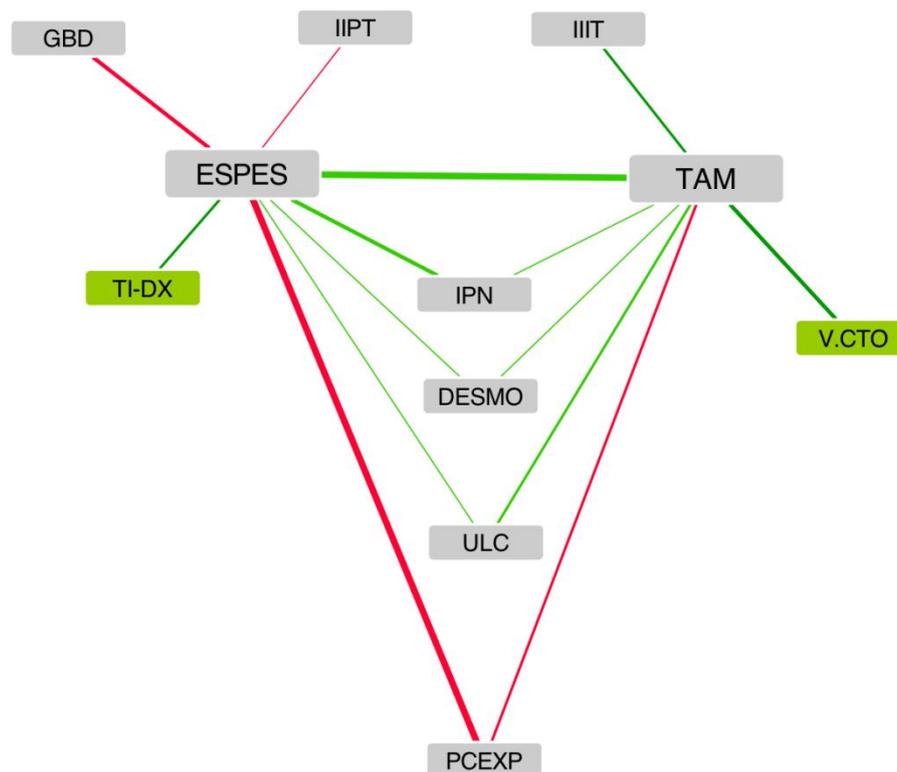


Figura 61: Asociaciones del espesor y el tamaño con otras variables clínico-patológicas. Figura obtenida mediante Cytoscape®. Cada nodo muestra una variable clínico-patológica, cada línea indica la asociación entre las variables, cuyo grosor es inversamente proporcional al valor de P. El color gris de los nodos representa variables histopatológicas y el color verde representa variables clínicas. El color rojo de las líneas indica una asociación negativa, el color verde indica una asociación positiva. ESPES (espesor), TAM (tamaño), DESMO (desmoplasia), IIPT (infiltrado inflamatorio peritumoral intenso), IIIT (infiltrado inflamatorio intratumoral intenso), IPN (infiltración perineural), ULC (ulceración), PCEXP (patrón de crecimiento expansivo), GDB (grado de diferenciación bueno), TI-DX (tiempo hasta el diagnóstico), V.CTO (velocidad de crecimiento rápida, más de 5 mm / mes.).

2.1.6 Asociación de la presencia de ulceración tumoral con otras características clínico-patológicas

La ulceración se relacionó con una serie de variables que se describen de manera detallada en la Tabla 24. Fue más frecuente en los tumores con mayor estadio TNM al diagnóstico ($P = 0,027$) y cuánto mayor fue el estadio T, según la clasificación alternativa del *Brigham and Women's Hospital* ($P = 0,007$). Por otro lado, fue de forma significativa más frecuente en los tumores con grado de diferenciación pobre *versus* moderadamente y bien diferenciados ($P = 0,048$), y con patrón de crecimiento infiltrativo *versus* mixto y expansivo ($P = 0,001$). Fue también más frecuente en los tumores que tenían infiltración perineural ($P = 0,023$), infiltración linfoscavicular ($P = 0,036$) y desmoplasia en el estroma ($P = 0,008$), así como en aquellos tumores de mayor tamaño ($P = 0,023$). Aunque no se demostró relación entre la presencia de ulceración y el espesor, ni con los infiltrados inflamatorios, sí existió cierta

tendencia estadística con el primero y con la intensidad del infiltrado inflamatorio intratumoral (Tabla 24). La Figura 62 representa las asociaciones estadísticas más relevantes de la ulceración y en la Figura 63 existe una imagen de Cytoscape a modo de resumen de las asociaciones encontradas entre la ulceración y otras variables clínico-patológicas.

Ulceración				
		Sí	No	
TNM al diagnóstico	I	13	14	0,027
	II	40	14	
Estadio T BWH	T1	13	14	0,007
	T2a	20	12	
	T2b	20	2	
Grado de diferenciación	Bueno	12	13	0,048
	Moderado	26	12	
	Pobre	15	3	
Patrón de crecimiento	Expansivo	8	8	0,001
	Mixto	7	7	
	Infiltrativo	38	38	
IPN	Sí	18	3	0,023
	No	25	35	
ILV	Sí	7	0	0,036/0,044
	No	42	28	
Desmoplasia	Sí	15	1	0,008
	No	38	27	
IIPT	Nulo	5	0	N.S.
	Valores intermedios	27	15	
	Intenso	21	13	
IIIT	Nulo	22	17	0,058
	Valores intermedios	23	11	
	Intenso	8	0	
Tamaño	(Me/RI)	20 (10)	14 (11)	0,023
Espesor	(Me/RI)	6,5 (5)	6 (13)	0,084

Tabla 24: Relación entre la ulceración y las variables clínico-patológicas: T BWH (estadio T según el Brigham and Women's Hospital), ILV (infiltración linfovascular), IPN (infiltración perineural), IIPT (infiltrado inflamatorio peritumoral), IIIT (infiltrado inflamatorio intratumoral), Me (mediana), RI (rango intercuartílico), N.S. (no significativo).

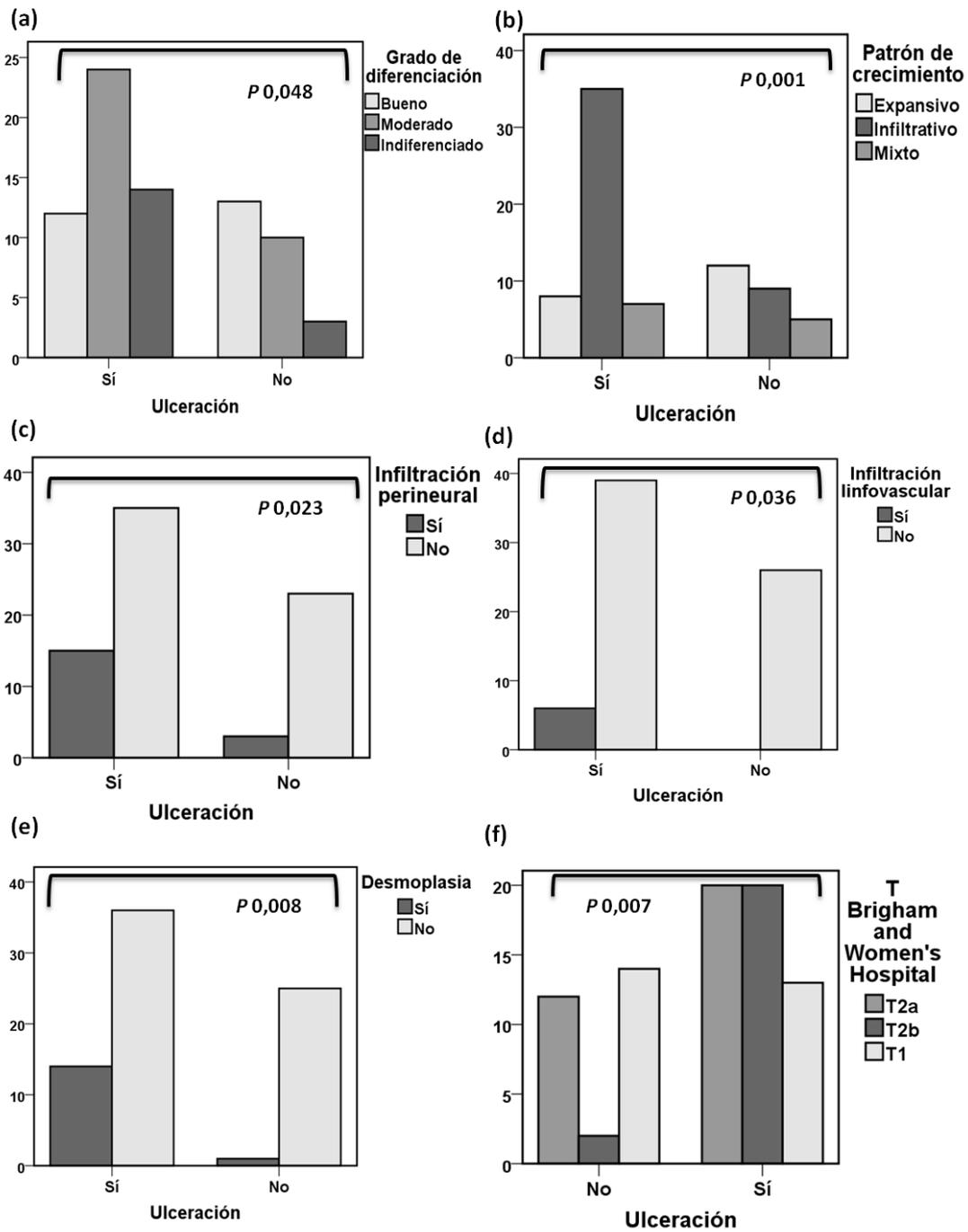


Figura 62: Representación gráfica de algunas asociaciones entre la ulceración y otras variables clínico-patológicas. (a) grado de diferenciación, (b) patrón de crecimiento, (c) infiltración perineural, (d) infiltración linfovascular, (e) desmoplasia, (f) estadio T según la clasificación del Brigham and Women's Hospital.

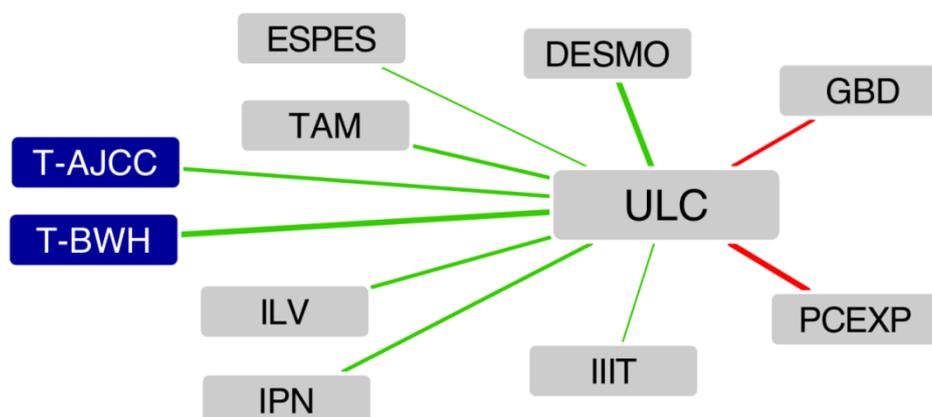


Figura 63: Relación de la presencia de ulceración con otras variables clínico-patológicas del CEC. Esquema obtenido mediante Cytoscape®. Cada nodo muestra una variable clínico-patológica, cada línea indica la asociación entre las variables, cuyo grosor es inversamente proporcional al valor de P . El color gris de los nodos representa variables histopatológicas y el color verde representa variables clínicas. El color rojo de las líneas indica una asociación negativa, el color verde indica una asociación positiva, el color azul oscuro indica distintos sistemas de estadiaje en el CEC. ULC (ulceración), ESPES (espesor), TAM (tamaño), IIIIT (infiltrado inflamatorio intratumoral), ILV (infiltración linfovascular), IPN (infiltración perineural), DESMO (desmoplasia), PCEXP (patrón de crecimiento expansivo), GBD (grado de diferenciación bueno), PCEXP (patrón de crecimiento expansivo), T-AJCC (estadio T2 según el American Joint Committee on Cancer), T-BWH (estadio T2b según la clasificación alternativa del Brigham and Women's Hospital).

2.1.7 Relación de la presencia de Infiltración perineural con otras variables clínico-patológicas

La presencia de infiltración perineural en el CEC se relacionó con las variables clínico-patológicas que figuran de manera detallada en la Tabla 25. Así, fue más frecuente en los tumores con grado pobre de diferenciación que en los moderadamente y bien diferenciados ($P = 0,00015$); y también fue más frecuente en aquéllos con patrón de crecimiento infiltrativo versus mixto y expansivo ($P = 0,000016$). Por otro lado, se asoció a tumores con infiltración linfovascular ($P = 0,011$), con los que exhibieron ulceración en el epitelio ($P = 0,023$) y desmoplasia en el estroma ($P = 0,000005$); así como con aquéllos con un mayor espesor ($P = 0,003$), asociándose con cierta tendencia estadística con los de mayor tamaño, pero sin alcanzar la significación (Tabla 25). En la Figura 64 se representa un ejemplo de tumor con infiltración perineural y en la Figura 65 los gráficos de barras de las asociaciones estadísticas más relevantes de la infiltración perineural con otras variables clínico-patológicas.

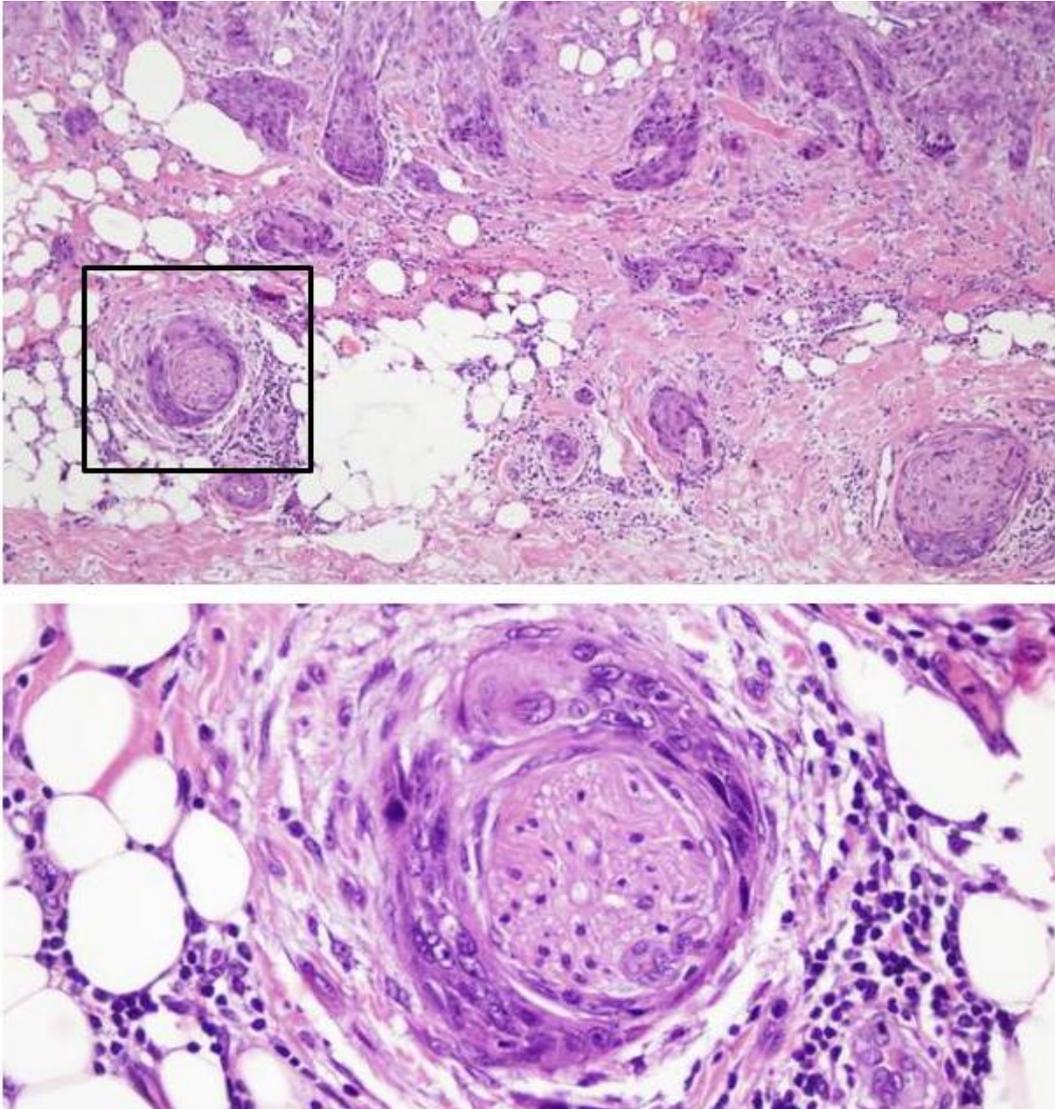


Figura 64: Infiltración perineural. CEC con patrón de crecimiento infiltrativo en el que se observan las células tumorales infiltrando alrededor de un nervio (infiltración perineural), que se destaca con un cuadrado en el panel superior y se observa a mayor detalle en el panel inferior.

Infiltración perineural				
		Sí	No	
Estadio T-AJCC	I	0	35	0,000044
	II	23	40	
Estadio T-BWH's	T1	0	35	<0,0001
	T2a	5	35	
	T2b	18	5	
Grado de diferenciación	Bueno	2	28	0,000158
	Moderado	10	29	
	Pobre	11	8	
Patrón de crecimiento	Expansivo	0	26	0,000016
	Mixto	1	19	
	Infiltrativo	22	30	
Desmoplasia	Sí	12	7	0,000005
	No	11	68	
Ulceración	Sí	18	35	0,023
	No	3	25	
Infiltración linfovascular	Sí	4	3	0,011
	No	15	72	
Espesor	(Me/RI)	8 (8,5)	6 (4,5)	0,003
Tamaño	(Me/RI)	20 (12)	18 (9)	0,072

Tabla 25: Asociaciones entre la infiltración perineural y el resto de las variables clínico-patológicas: T-AJCC (estadio T según el American Joint Committee on Cancer); T-BWH's (estadio T según la clasificación del Brigham and Women's Hospital), Me (mediana), RI (rango intercuartílico).

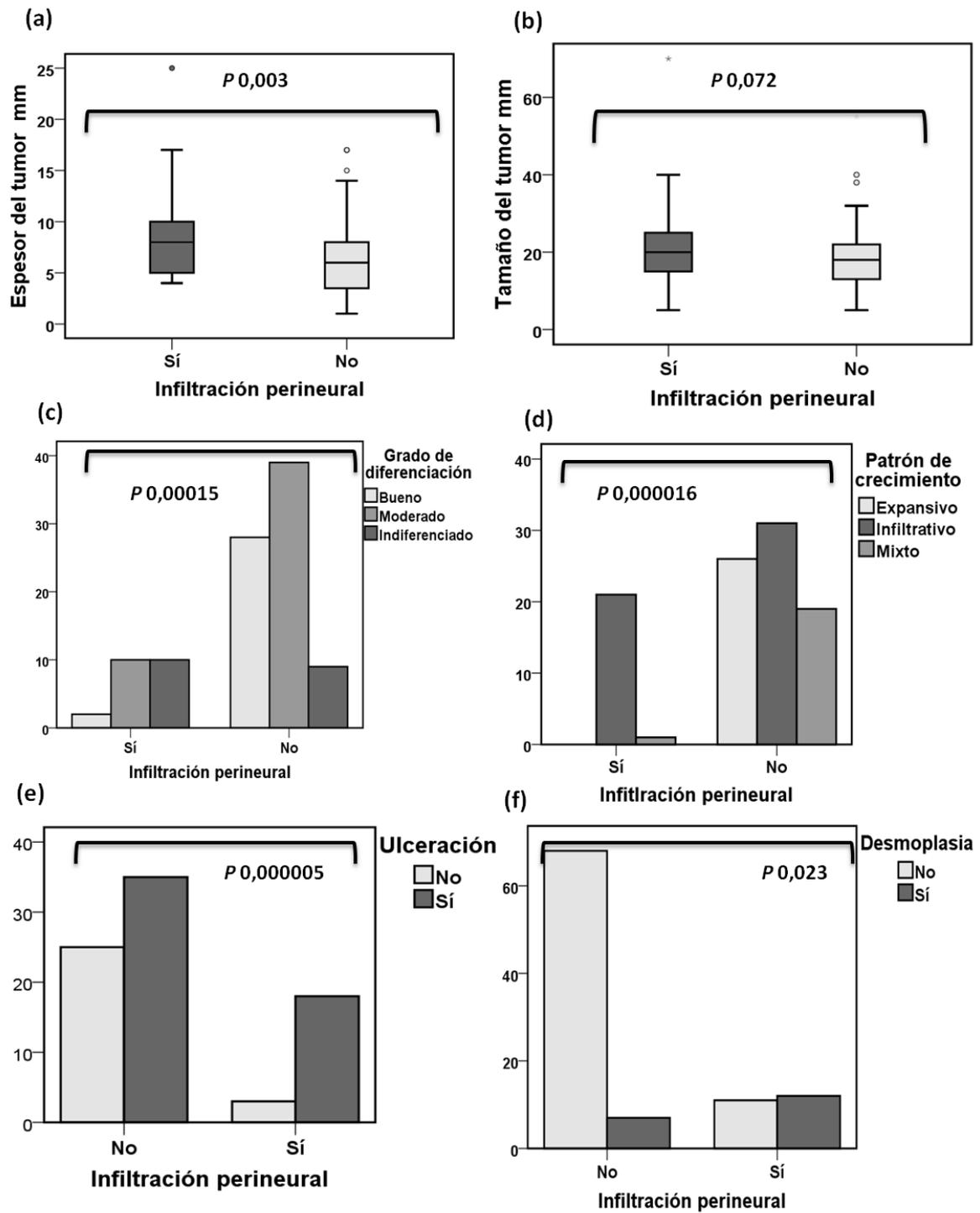


Figura 65: Representación gráfica de algunas asociaciones de la infiltración perineural con otras variables clínico-patológicas: (a) espesor, (b) tamaño, (c) grado de diferenciación, (d) patrón de crecimiento, (e) ulceración, (f) desmoplasia.

2.1.8 Relación de la infiltración linfovascular con otras variables clínico-patológicas del tumor

La infiltración linfovascular se asoció con las variables clínico-patológicas que figuran en la Tabla 26. Por un lado, la infiltración linfovascular fue más frecuente en los tumores con estadio T más avanzado de la clasificación del *Brigham and Women's Hospital (T-BWH)*. Así, fue más frecuente en tumores en estadio T2b *versus* T2a y T1 ($P = 0,002$). Por otra parte, se asoció con más frecuencia a tumores con grado pobre de diferenciación ($P = 0,001$) y a aquéllos con patrón de crecimiento infiltrativo ($P = 0,027$). La presencia de infiltración linfovascular se asoció también a la presencia de infiltración perineural ($P = 0,011$), a la de ulceración en el tumor ($P = 0,036$) y a la desmoplasia en el estroma (Tabla 26). En la Figura 66 se observa una imagen representativa de infiltración linfovascular, en la Figura 67 existen gráficos que exhiben las asociaciones estadísticas más relevantes de la infiltración linfovascular y en la Figura 68 se recoge una imagen resumen de las relaciones estadísticas de la infiltración linfovascular y perineural con otras variables clínico-patológicas.

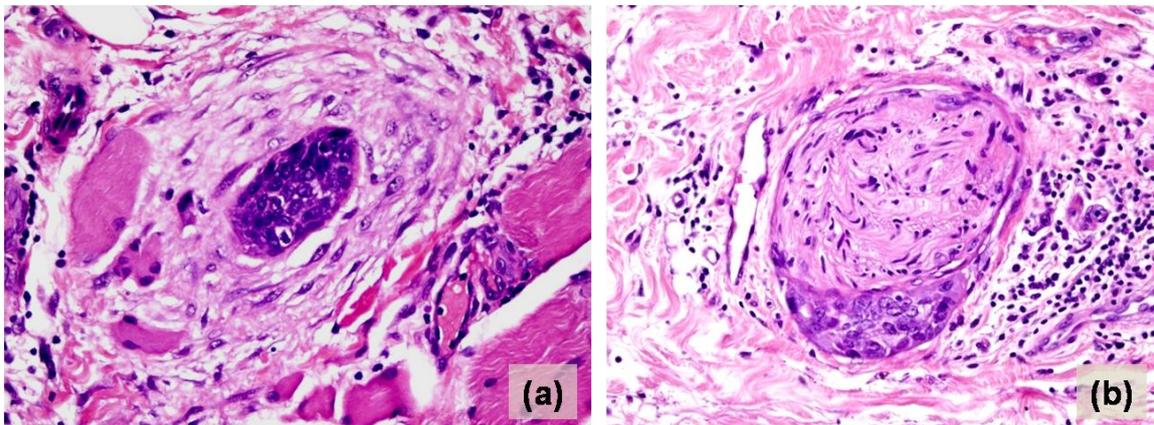


Figura 66: Imagen representativa de infiltración linfovascular y perineural: (a) Infiltración linfovascular, se aprecian células tumorales en la luz de un vaso próximo a músculo; (b) Infiltración perineural, pueden observarse células tumorales en la casi totalidad del perineuro.

Infiltración linfovascular				
		Sí	No	
Estadio T-BWH's	T1	1	34	
	T2a	1	39	0,002
	T2b	5	14	
Grado de diferenciación	Bueno	0	30	
	Moderado	2	45	0,001
	Pobre	5	12	
Patrón de crecimiento	Expansivo	0	26	
	Mixto	0	20	0,027
	Infiltrativo	7	41	
Infiltración perineural	Sí	4	15	0,011
	No	3	72	
Desmoplasia	Sí	3	14	0,077
	No	4	73	
Ulceración	Sí	7	42	0,036
	No	0	28	

Tabla 26: Asociación de la infiltración linfovascular y las variables clínico-patológicas. T-BWH's: (estadio T según la clasificación del Brigham and Women's Hospital).

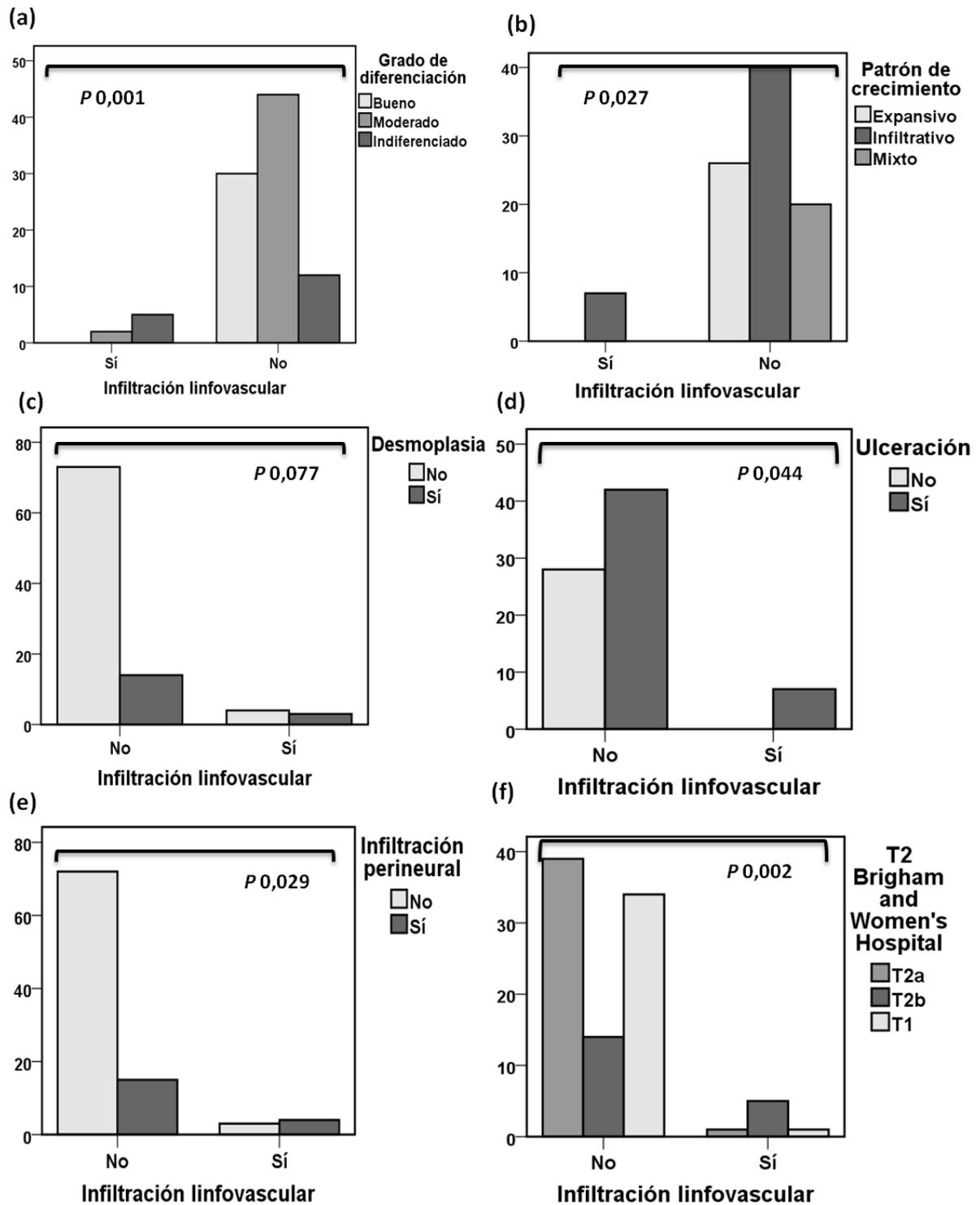


Figura 67: Representaciones de algunas asociaciones entre la infiltración linfovascular y otras variables clínico-patológicas: (a) grado de diferenciación, (b) patrón de crecimiento, (c) desmoplasia, (d) ulceración, (e) infiltración perineural, y (f) estadio T según la clasificación del Brigham and Women's Hospital.

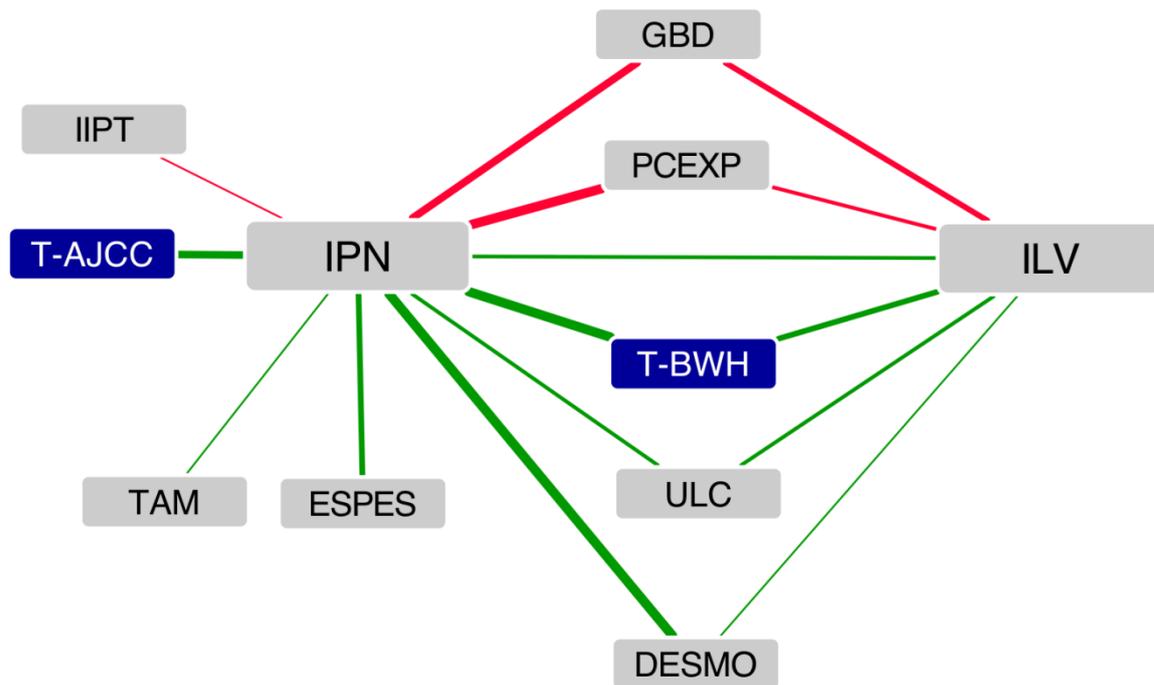


Figura 68: Relación entre la infiltración perineural, la infiltración linfovascular y el resto de variables clínico-patológicas evaluadas: Esquema obtenido mediante Cytoscape®. Cada nodo muestra una variable clínico-patológica, cada línea indica la asociación entre las variables, cuyo grosor es inversamente proporcional al valor de P. El color gris de los nodos representa variables histopatológicas y el color verde representa variables clínicas. El color rojo de las líneas indica una asociación negativa, el color verde indica una asociación positiva, el color azul oscuro indica distintos sistemas de estadiaje en el CEC. IPN (infiltración perineural), ILV (infiltración linfovascular), TAM (tamaño), ESPES (espesor), DESMO (desmoplasia), ULC (ulceración), GDB (grado de diferenciación bueno), PCEXP (patrón de crecimiento expansivo), IIPT (infiltrado inflamatorio peritumoral intenso), T-AJCC (estadio T2 según el American Joint Committee on Cancer), T-BWH's (estadio T2b según el sistema alternativo de estadiaje del Brigham and Women's Hospital).

2.1.9 Asociación de la presencia de infiltrados inflamatorios en el tumor con otras variables clínico-patológicas

Las implicaciones del infiltrado inflamatorio en el CEC no han sido estudiadas en profundidad; si bien, existen trabajos aislados donde no parece haberseles encontrado significación pronóstica, otros estudios parecen haber demostrado cierta influencia de los infiltrados inflamatorios en el pronóstico del CEC. (Azzimonti *et al.*, 2014; Coussens *et al.*, 1999; Dorta *et al.*, 2002; Meneses *et al.*, 1998). En nuestro estudio, se evaluó de manera independiente el infiltrado inflamatorio peritumoral y el intratumoral, cada uno de los cuales se asoció a las variables clínico-patológicas que aparecen de manera pormenorizada en la

Tabla 27. En las Figuras 69-71 se representan también asociaciones estadísticas de la intensidad de los infiltrados inflamatorios en el carcinoma epidermoide cutáneo y otras variables clínico-patológicas.

a. Infiltrado inflamatorio intratumoral

La intensidad del infiltrado inflamatorio intratumoral se relacionó con un mayor estadio TNM al diagnóstico del CEC (grado II vs I) ($P = 0,048$), y a un mayor grado del estadio T, en la clasificación alternativa *T-BWH* (T2b frente a T2a y T1). Asimismo, el infiltrado tumoral fue con más frecuencia intenso en tumores con grado pobre de diferenciación ($P = 0,032$), y con un patrón de crecimiento infiltrativo ($P = 0,021$). El infiltrado inflamatorio intratumoral intenso se asoció también a la presencia de ulceración en el epitelio ($P = 0,046$) y al mayor tamaño tumoral ($P = 0,024$) (Tabla 27).

b. Infiltrado inflamatorio peritumoral

La intensidad de infiltrado inflamatorio peritumoral se asoció a un menor grado de estadio T, según la *T-BWH* ($P = 0,019$), aunque no se logró demostrar significación estadística en función del TNM de la AJCC. Fue también con más frecuencia intenso en tumores con buen y moderado grado de diferenciación ($P = 0,01$), en tumores que exhibieron un patrón de crecimiento expansivo, en tumores que no presentaron infiltración perineural, en los de menor espesor y en los que tuvieron un índice de proliferación más bajo ($P = 0,040$) (Tabla 27).

		IIIT			IIPT		
		Intenso	No intenso		Intenso	No intenso	
Desmoplasia	Sí	2	17	NS	4	15	0,032
	No	6	73		38	41	
Ulceración	Sí	8	45	0,046	21	32	N.S.
	No	0	28		13	15	
Estadio TNM al diagnóstico	I	0	35	0,048	18	17	N.S.
	II	8	55		24	39	
Estadio T BWH	T1	0	35	0,052	18	17	0,019
	T2a	4	36		20	20	
	T2b	4	19		4	19	
Grado de diferenciación	Bueno	0	30	0,032	18	12	0,01
	Moderado	4	45		21	28	
	Pobre	4	15		3	16	
Patrón de crecimiento	Expansivo	0	26	0,001	11	15	0,066
	Mixto	0	20		13	7	
	Infiltrativo	8	44		18	34	
Infiltración perineural	Sí	20	3	N.S.	6	17	0,063
	No	70	5		36	39	
Progresión ganglionar	Sí	4	9	0,001	6	7	N.S.
	No	4	81		36	49	
Eventos	Sí	5	16	0,003	9	12	N.S.
	No	3	74		33	44	
Progresión TNM	Sí	4	10	0,003	6	8	N.S.
	No	4	80		36	48	
Espesor		6,25 (10,88)	6 (5)	N.S.	5,5 (4,5)	6 (5,5)	0,085
Tamaño		24,5 (23,75)	18 (9)	0,024	18 (8)	20 (11)	N.S.

Tabla 27: Relación entre la intensidad de los infiltrados inflamatorios peri e intratumorales y las diversas variables clínico-patológicas. IIIT (infiltrado inflamatorio intratumoral), IIPT (infiltrado inflamatorio peritumoral), Me (mediana), RI (rango intercuartílico), N.S (no significativo).

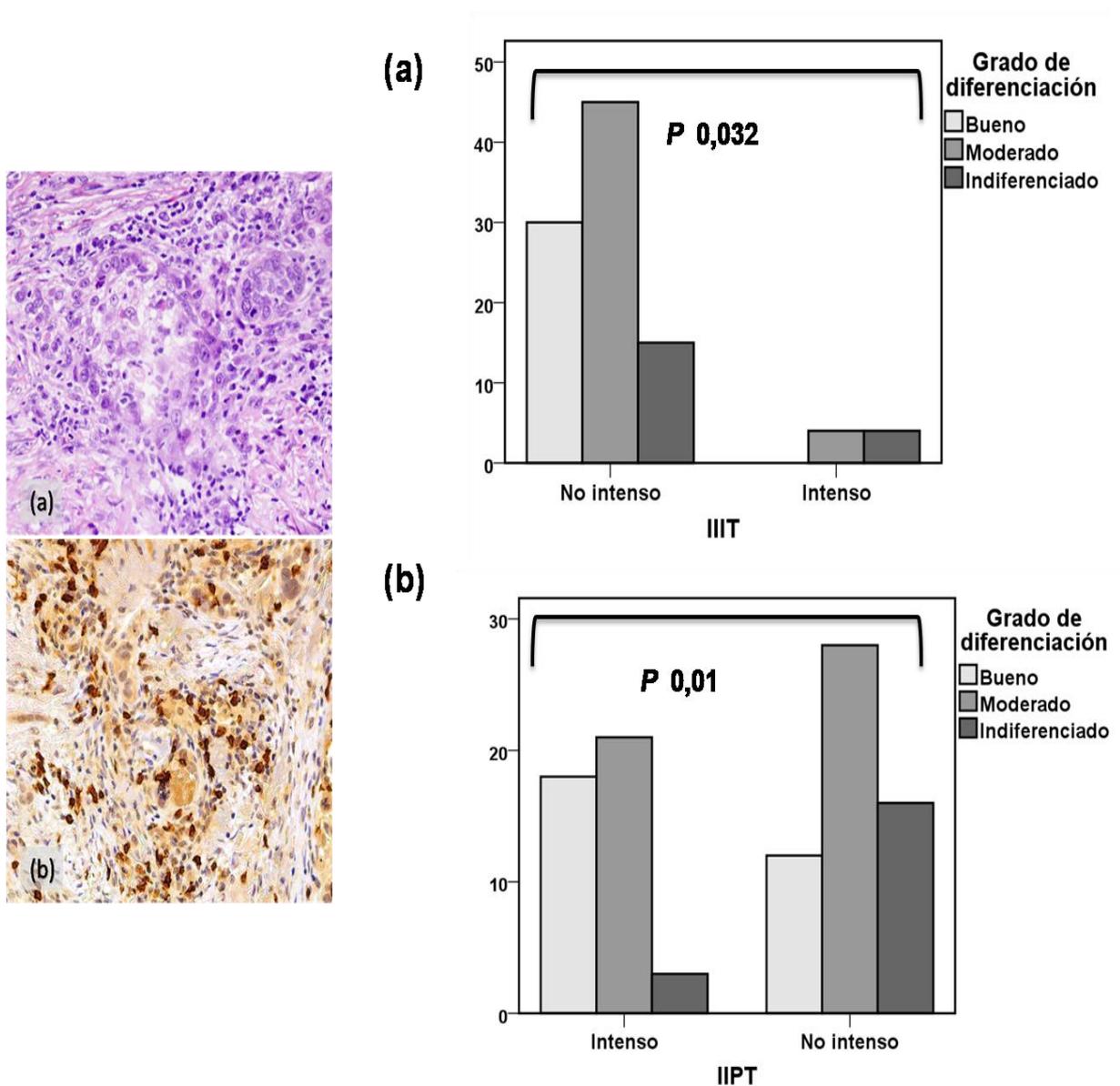


Figura 69: Representaciones de las asociaciones de los infiltrados inflamatorios en relación con el grado de diferenciación del tumor. En la imagen de la derecha (a) IIIT (infiltrado inflamatorio intratumoral), (b) IIPT (infiltrado inflamatorio peritumoral). En la imagen de la izquierda (a) podemos observar infiltrados inflamatorios intratumorales (H&E) en un CEC indiferenciado y su inmunexpresión con CD8 (b).

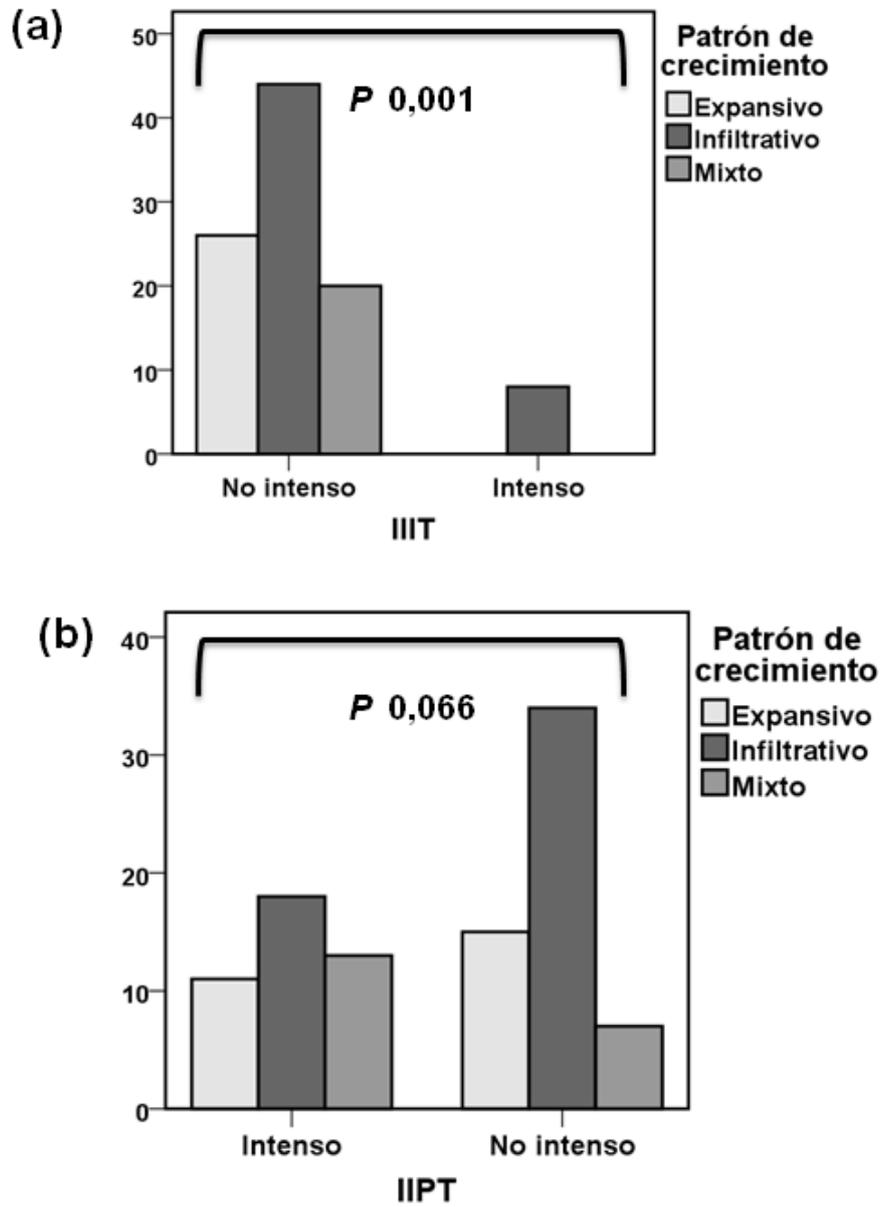


Figura 70; Representaciones de las asociaciones de los infiltrados inflamatorios en relación con el patrón de crecimiento tumoral. (a) IIIT (infiltrado inflamatorio intratumoral), (b) IIPT (infiltrado inflamatorio peritumoral).

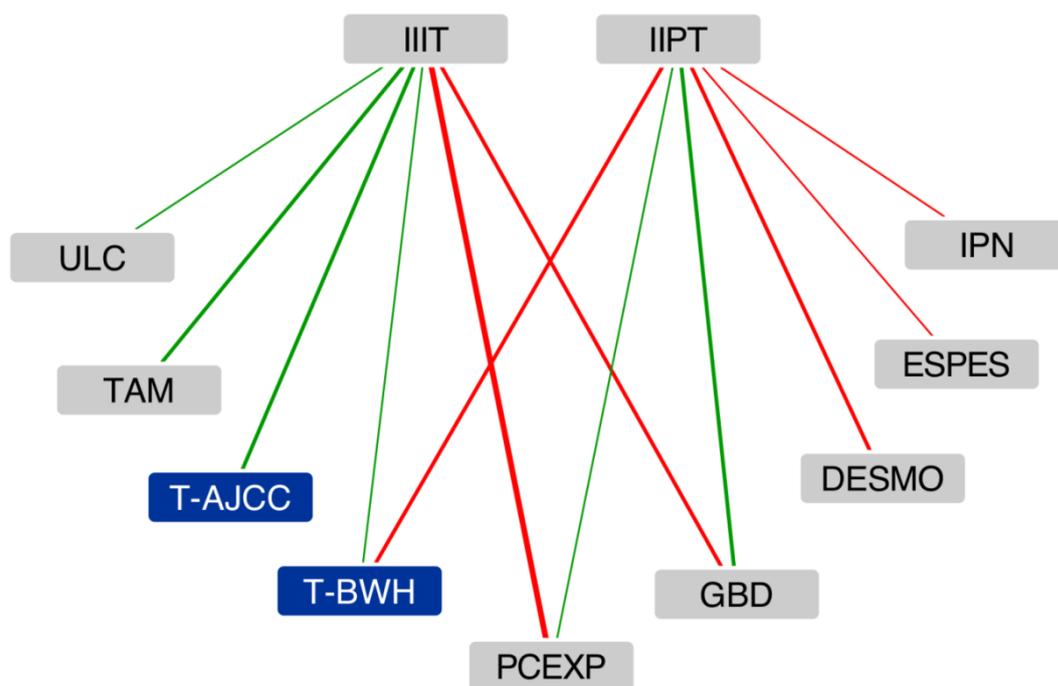


Figura 71: Relación entre los infiltrados inflamatorios y el resto de variables clínico-patológicas evaluadas: Esquema obtenido mediante Cytoscape®. Cada nodo muestra una variable clínico-patológica, cada línea indica la asociación entre las variables, cuyo grosor es inversamente proporcional al valor de P . El color gris de los nodos representa variables histopatológicas y el color verde representa variables clínicas. El color rojo de las líneas indica una asociación negativa, el color verde indica una asociación positiva, el color azul oscuro indica distintos sistemas de estadiaje en el CEC. IIPT (infiltrado inflamatorio peritumoral intenso), IIIT (infiltrado inflamatorio intratumoral intenso), IPN (infiltración perineural), TAM (tamaño), ESPES (espesor), DESMO (desmoplasia), GDB (grado de diferenciación bueno), PCEXP (patrón de crecimiento expansivo), T-AJCC (estadio T2 según el American Joint Committee on Cancer), T-BWH's (estadio T2b según el estadiaje alternativo del Brigham and Women's Hospital).

2.1.10 Asociación de la velocidad de crecimiento con otras variables clínico-patológicas

La velocidad de crecimiento (VC) se comparó con las características de los pacientes y los tumores. La VC se relacionó con el estadio tumoral T, según (BWH's) ($P = 0.003$), y según el estadio tumoral de la (AJCC) ($P = 0.001$). Los tumores de crecimiento rápido se asociaron a un mayor tamaño en superficie ($P = 0.003$), pero no a un mayor espesor. La velocidad de crecimiento exhibió una tendencia estadística a la asociación con eventos de mala evolución clínica ($P = 0.085$) y con el desarrollo de metástasis ganglionares ($P = 0.071$), aunque sin alcanzar la significación. La velocidad de crecimiento se asoció inversamente con el tiempo hasta el diagnóstico del tumor ($P = 0.003$), siendo los tumores de crecimiento rápido más precozmente diagnosticados. Finalmente la VC se relacionó con el índice proliferativo, medido a través del marcaje frente a Ki-67 por inmunohistoquímica, siendo, como cabría esperar, más

rápido el crecimiento de los tumores con índices proliferativos más elevados (Tabla 28, Figura 72).

El **tiempo hasta el diagnóstico** también se evaluó, para identificar asociaciones entre éste con características clínico-patológicas. Así, se asoció con el espesor del tumor ($P = 0,045$), siendo más gruesos aquellos tumores de diagnóstico más tardío; pero no se asoció con el tamaño horizontal del tumor. El tiempo hasta el diagnóstico se asoció también de forma positiva con el patrón de crecimiento expansivo y de forma negativa con la VC, como hemos señalado más arriba (Tabla 28, Figura 72).

Velocidad de crecimiento				
		<5mm / mes	>5mm / mes	P
GD	Bueno	20	8	N.S.
	Moderado-Pobre	41	21	
PC	Expansivo	17	8	N.S.
	No-expansivo	44	21	
Tamaño (Me/RI)		15 (11)	20 (7)	0,003
Espesor (Me/RI)		6 (5)	6 (6)	N.S.
T-BWH	T1	29	3	0,003
	T2a	20	16	
	T2b	12	10	
T-AJCC	T1	29	3	0,001
	T2	32	26	
Eventos globales	Yes	11	10	0,085
	No	50	19	
Progresión ganglionar	Yes	6	7	0,071
	No	55	22	
Recidiva local	Yes	7	5	N.S.
	No	54	24	
Ki-67 (Me/RI)		13,33 (15,42)	23,33 (27,50)	0,028
Tiempo hasta el diagnóstico	< 2 meses	60	19	0,00003
	> 2 meses	1	10	
ILE (IC)		10 (4,605-15,395)	4 (2,482-5,518)	0,005
Tiempo hasta PG (IC)		13 (5,799-20,201)	5 (3,048-12,752)	0,004
Tiempo hasta RL (IC)		8 (2,868-13,132)	4 (1,605-8,395)	0,082

Tiempo hasta el diagnóstico				
		<2 meses	> 2 meses	P
GD	Bueno	24	7	N.S.
	Moderado-Pobre	55	4	
PC	Expansivo	7	18	0,009
	No-expansivo	4	61	
Espesor (Me/RI)		5 (4)	6 (6)	0,045
Tamaño (Me/RI)		20 (7)	20 (10)	N.S.
Eventos globales	Yes	3	18	N.S.
	No	8	61	
Progresión ganglionar	Yes	3	10	N.S.
	No	8	69	
Recidiva local	Yes	1	11	N.S.
	No	10	68	

Tabla 28: Asociaciones de la velocidad de crecimiento de los tumores y del tiempo hasta el diagnóstico de CEC en nuestra cohorte: GD (grado de diferenciación), PC (patrón de crecimiento), T BWH's (estadio T según la clasificación del Brigham and Women's Hospital), T-AJCC (estadio T según el American Joint Committee on Cancer), ILE (intervalo libre de enfermedad), PG (progresión ganglionar), RL (recidiva local), Me (mediana), RI (rango intercuartílico), IC (intervalo de confianza), N.S. (no significativo).

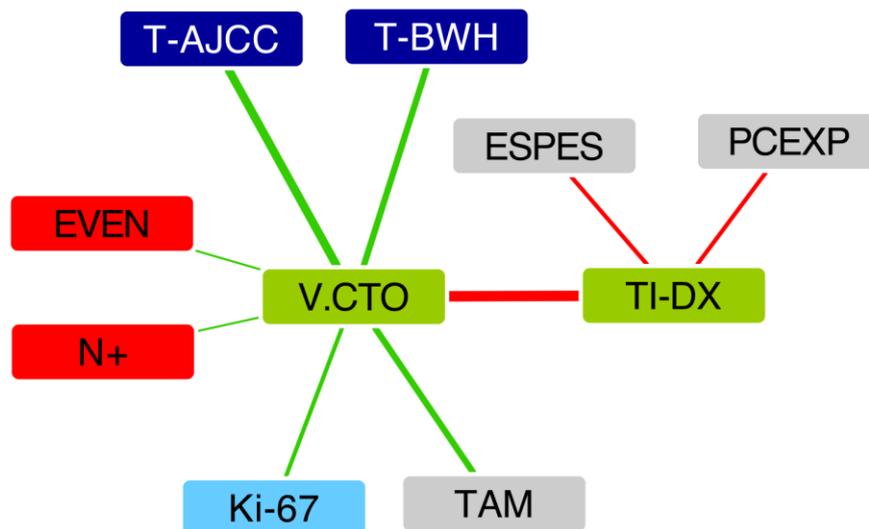


Figura 72: Relaciones más importantes entre la velocidad de crecimiento, el tiempo hasta el diagnóstico del tumor y el resto de las variables: Esquema obtenido mediante Cytoscape®. Cada nodo muestra una variable clínico-patológica, cada línea indica la asociación entre las variables, cuyo grosor es inversamente proporcional al valor de P. El color gris de los nodos representa variables histopatológicas, el color verde representa variables clínicas, el color azul oscuro representa sistemas de estadiaje en el CEC, el color azul celeste indica proteínas y el color rojo eventos de mala evolución clínica. El color rojo de las líneas indica una asociación negativa, el color verde indica una asociación positiva, el color azul oscuro indica distintos sistemas de estadiaje en el CEC. V.CTO (velocidad de crecimiento rápida, mayor de 5 mm / mes), TI-DX (tiempo hasta el diagnóstico del tumor menor de 2 meses), TAM (tamaño), ESPES (espesor), PCEXP (patrón de crecimiento expansivo), T-AJCC (estadio T2 según el American Joint Committee on Cancer), T-BWH's (estadio T2b según el Brigham and Women's Hospital), EVEN (eventos globales de mala evolución clínica durante el seguimiento), N+ (desarrollo de metástasis ganglionares durante el seguimiento).

2.2 Evaluación de los factores pronósticos clínico-patológicos en el CEC

Se evaluaron los eventos de mala evolución clínica en nuestra cohorte de CEC y se comparó su frecuencia, en función de las variables clínico-patológicas analizadas. Así, evaluamos la recidiva local, la progresión ganglionar, la progresión del TNM durante el seguimiento (que incluyó metástasis ganglionares y a distancia) y los eventos de mala evolución clínica considerados de forma global (es decir, que incluyeron cualquiera de los anteriores).

2.2.1 Variables clínico-patológicas relacionadas con el desarrollo de eventos de mala evolución clínica

Recordemos que se consideraron eventos de mala evolución clínica cualquiera de los acontecimientos adversos que aparecieron como consecuencia del tumor en un paciente a lo largo del seguimiento. Entre ellos, incluimos la recidiva local, la progresión ganglionar, el desarrollo de metástasis viscerales y la muerte por CEC. El desarrollo de eventos de mala evolución clínica durante el seguimiento del CEC se relacionó con las variables clínico-patológicas que figuran en la Tabla 29, Figuras 73-75.

Respecto a las variables clínicas asociadas al desarrollo de eventos de mala evolución considerados en su conjunto, encontramos la localización del tumor primario, que fue significativamente mayor para los tumores localizados en áreas de alto riesgo de cabeza y cuello ($P = 0,019$). Se asociaron también a los tumores extirpados incompletamente ($P = 0,040$) y hubo tendencia estadística a relacionarse con el sexo femenino ($P = 0,053$). Se asociaron también con un estadio mayor del TNM al diagnóstico (II versus I) ($P = 0,001$), y con una mayor T de la clasificación alternativa del *Brigham and Women's Hospital* (T2b frente a T2a y T1) ($P = 0,00004$).

Respecto a las variables histopatológicas, el desarrollo de eventos de mala evolución durante el seguimiento considerados de forma global, fue significativamente más frecuente en tumores pobremente diferenciados, que en aquéllos moderadamente y bien diferenciados ($P = 0,006$); y en los tumores con patrón de crecimiento infiltrativo versus mixto y expansivo ($P = 0,003$). Se asoció a la presencia de infiltración perineural ($P = 0,00004$) y de infiltración linfovascular ($P = 0,006$). No encontramos relación con la presencia de desmoplasia en el estroma, pero sí fue más frecuente en los tumores que exhibieron ulceración en el epitelio ($P = 0,007$). Por otra parte, el desarrollo de eventos de mala evolución clínica fue más frecuente en

los tumores de mayor tamaño ($P = 0,023$) y en aquéllos de mayor grosor ($P = 0,001$). Finalmente, el riesgo de desarrollar eventos de mala evolución clínica durante el seguimiento, se asoció a la presencia de un infiltrado inflamatorio intratumoral intenso ($P = 0,013$), aunque no existió relación con la intensidad del infiltrado inflamatorio peritumoral.

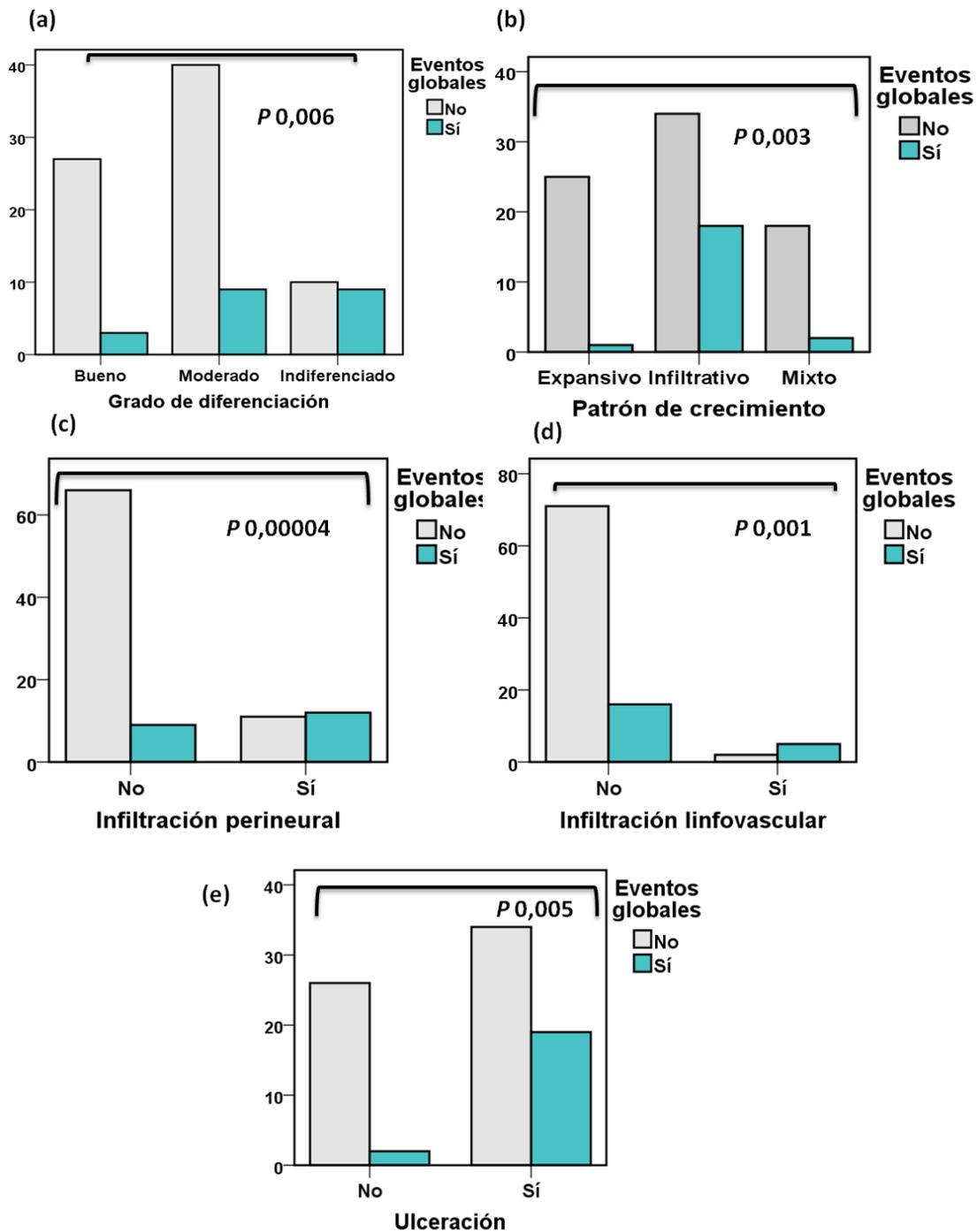
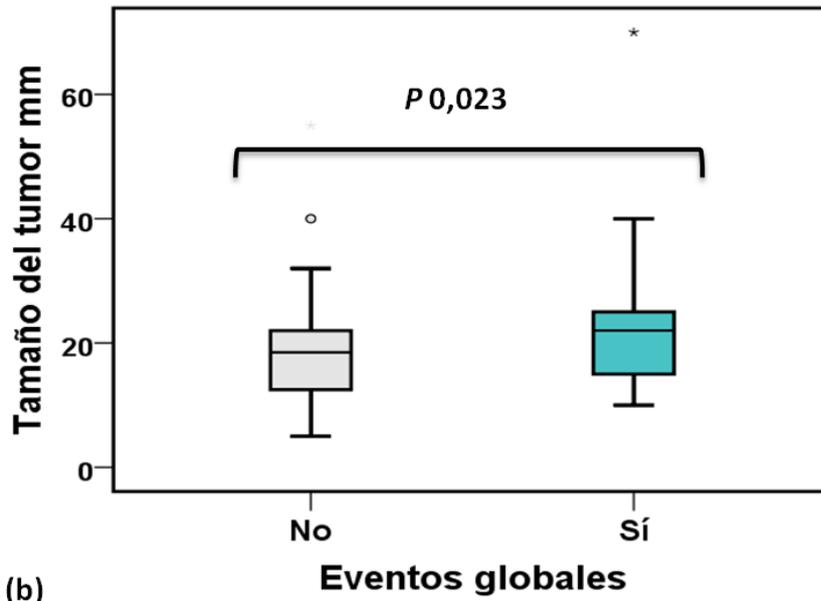


Figura 73: Variables clínico-patológicas relacionadas con un mayor riesgo de eventos de mala evolución clínica considerados de forma global durante el seguimiento (I): (a) grado de diferenciación, (b) patrón de crecimiento, (c) infiltración perineural, (d) infiltración linfovascular, (e) ulceración.

(a)



(b)

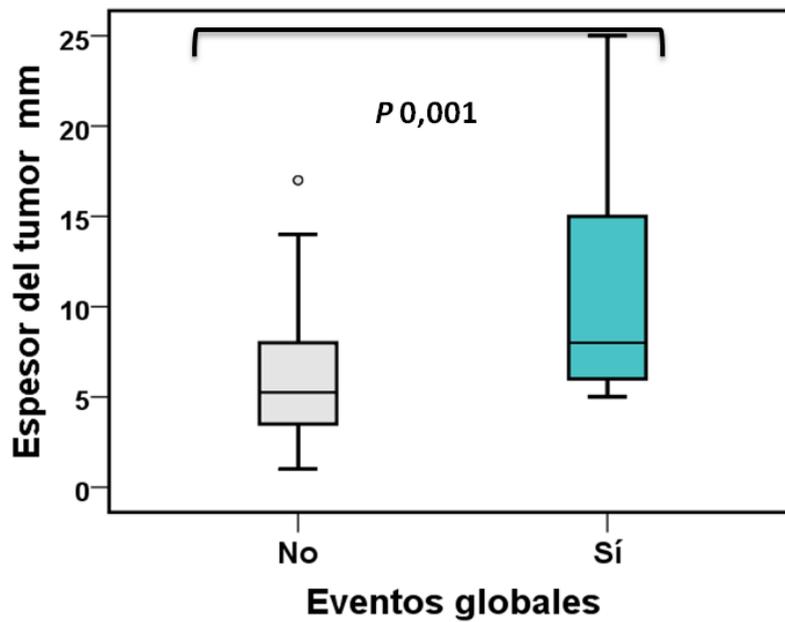


Figura 74: Variables clínico-patológicas relacionadas con un mayor riesgo de eventos de mala evolución clínica, considerados de forma global, durante el seguimiento (II): (a) Tamaño tumoral, (b) espesor del tumor.

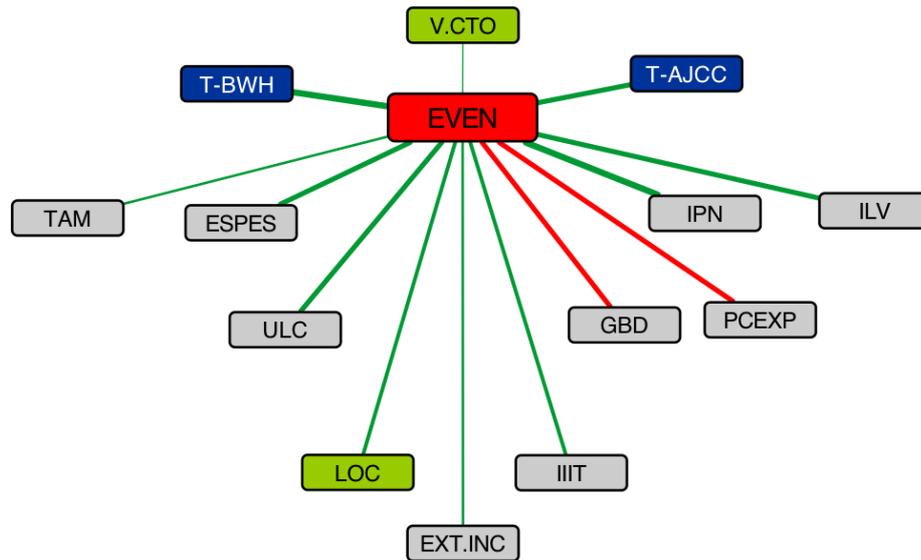


Figura 75: Variables clínico-patológicas relacionadas con el desarrollo de eventos de mala evolución clínica durante el seguimiento. Imagen obtenida mediante Cytoscape®. Cada nodo muestra una variable clínico-patológica, cada línea indica la asociación entre las variables, cuyo grosor es inversamente proporcional al valor de P. El color gris de los nodos representa variables histopatológicas, el color verde representa variables clínicas, el color azul oscuro representa sistemas de estadiaje en el CEC, el color azul celeste indica proteínas y el color rojo eventos de mala evolución clínica. El color rojo de las líneas indica una asociación negativa, el color verde indica una asociación positiva, el color azul oscuro indica distintos sistemas de estadiaje en el CEC. EVEN (eventos globales de mala evolución clínica durante el seguimiento), V.CTO (velocidad de crecimiento rápida –más de 5 mm / mes -), LOC (localización de alto riesgo), TAM (tamaño), ESPES (espesor), ULC (ulceración), EXT.INC (extirpación incompleta del tumor primario), IIIIT (infiltrado inflamatorio intratumoral intenso), GBD (grado de diferenciación bueno), PCEXP (patrón de crecimiento expansivo), IPN (infiltración perineural), ILV (infiltración linfocelular), T-AJCC (estadio T2 según la clasificación de la AJCC), T-BWH (estadio T2b según la clasificación del Brigham and Womens Hospital).

2.2.2 Variables relacionadas con el desarrollo de recidiva local

La recidiva local se relacionó con las variables clínicas e histopatológicas que figuran en la Tabla 29. Respecto a las variables clínicas, el desarrollo de recidiva local se asoció a un mayor estadio de la clasificación TNM al diagnóstico (II versus I) ($P = 0,004$), con un mayor grado del valor de T, según la clasificación alternativa *del T-BWH*, y con el sexo femenino ($P = 0,009$); aunque no se relacionó con la localización de tumor primario. Se vio cierta tendencia a la recidiva local en los CEC de mayor tamaño (de más de 20 mm), sobre todo en mujeres y, curiosamente, en los de menor tamaño en hombres ($P = 0,055$), pero no hubo diferencias en cuanto a la recidiva local en función del espesor y el sexo.

Sí existieron diferencias en la frecuencia del CEC según el sexo en función de la edad, de manera que en pacientes jóvenes fue más frecuente en los varones, y en pacientes más ancianos en las mujeres ($P = 0,001$); aunque debe añadirse que los tumores no fueron más grandes en las mujeres de nuestra serie porque fueran más grandes en pacientes de mayor edad. Tampoco hubo diferencias significativas entre la proporción de pacientes con antecedentes de cáncer cutáneo no melanoma entre hombres y mujeres, ni entre la proporción de tumores que se extirparon completamente entre hombres y mujeres, ni en relación con el grado de inmunodepresión Tabla 29. (Figuras 76-80)

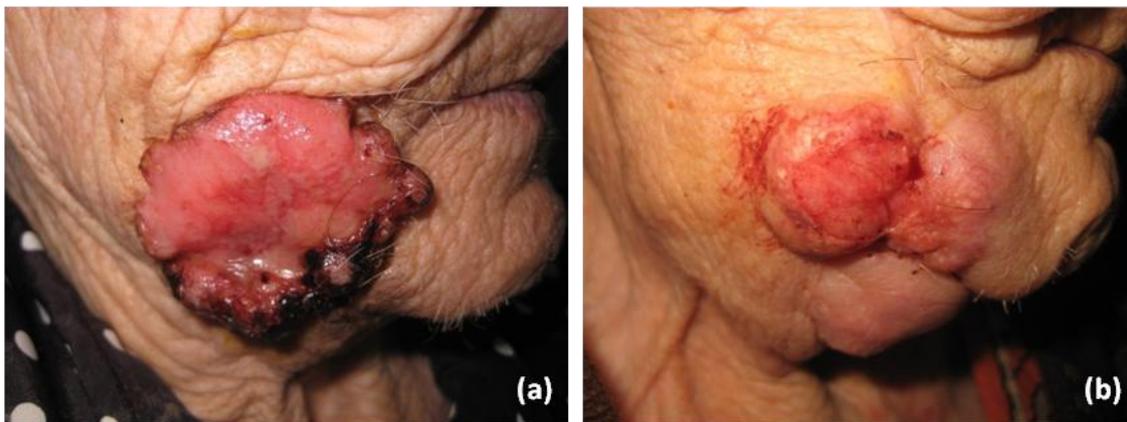


Figura 76: Recidiva local de CEC en mujer anciana (a) Carcinoma epidermoide en mujer anciana (tumor primario); (b) recidiva local con afectación mandibular tras tratamiento quirúrgico y radioterapia. El tumor primario (a), en este caso, presentaba además otros factores de riesgo como el tamaño > 2 cm, el espesor > 2 mm, la ulceración, el pobre grado de diferenciación, el patrón de crecimiento infiltrativo y la infiltración de planos profundos (más allá de la dermis). La recidiva del tumor (b) también era ulcerado, presentaba infiltración de planos profundos, tenía un tamaño > 2 cm, un espesor > 2 mm, un pobre grado de diferenciación, un patrón de crecimiento infiltrativo.

Respecto a las **variables histopatológicas**, el desarrollo de recidiva local se asoció al patrón de crecimiento infiltrativo ($P = 0,015$); no encontramos asociación con el grado de diferenciación. Fue también más frecuente en los tumores con infiltración linfovascular ($P = 0,042$), en aquellos que exhibieron ulceración en el epitelio ($P = 0,038$), y en los que presentaron un estroma desmoplásico ($P = 0,004$) e infiltración perineural ($P = 0,000007$). Por otra parte, la recidiva local fue también más frecuente en los tumores de mayor tamaño ($P = 0,017$), en aquellos de mayor grosor ($P = 0,002$) y en los que habían sido inadecuadamente extirpados ($P = 0,0004$).

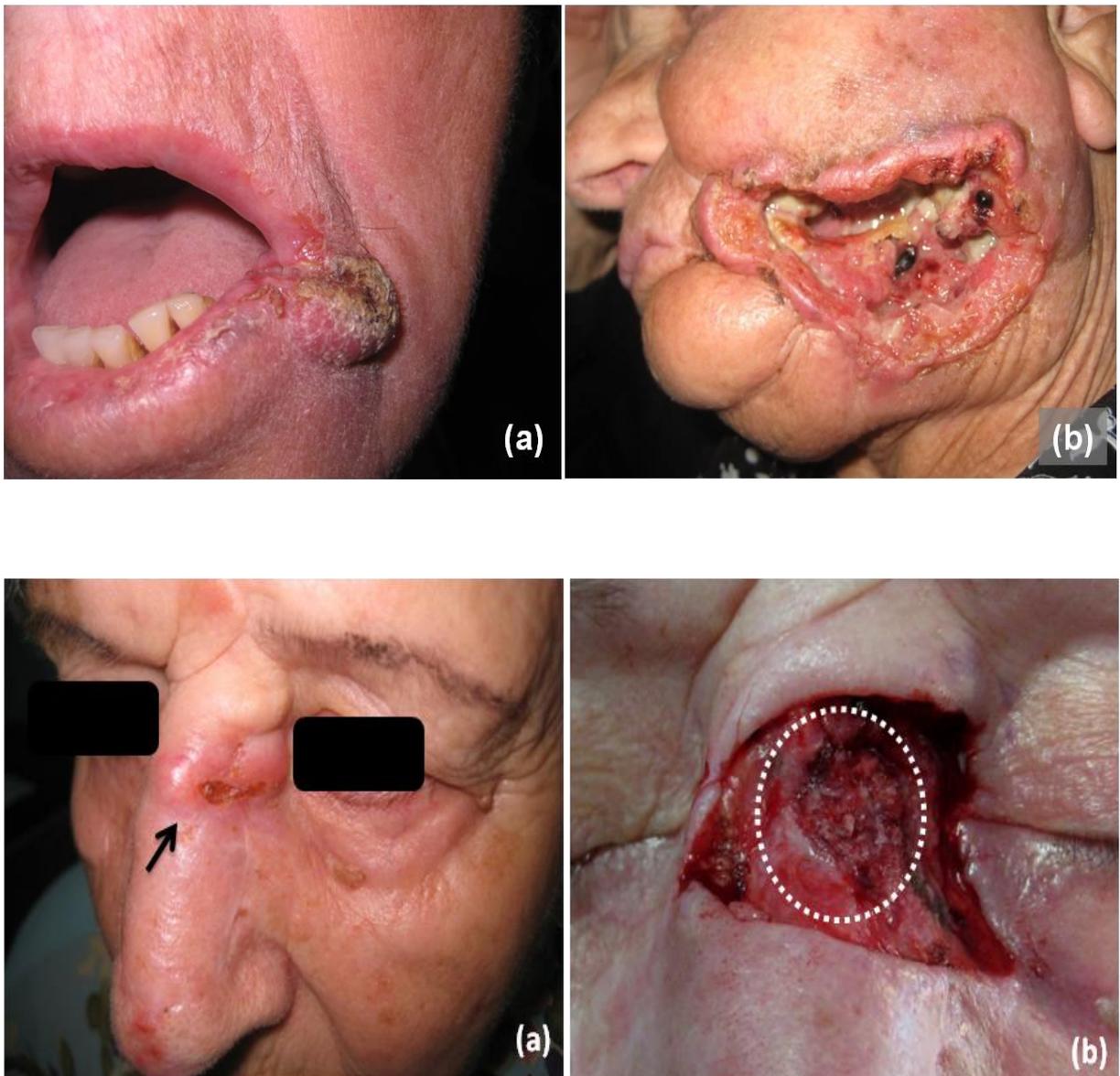


Figura 77: Recidiva de CEC. Panel (1).- En la imagen superior (a) Carcinoma epidermoide agresivo de rápido crecimiento en comisura labial izquierda. (b) Progresión, tras extirpación quirúrgica y radioterapia, con destrucción de todos los planos de la mejilla dificultando la ingesta. **Panel(2).**- En la imagen inferior (a) Recidiva de CEC en región proximal de la nariz incompletamente extirpado 4 meses antes. (a) nótese la recidiva del tumor (flecha negra), que exhibe ulceración del epitelio, y la cicatriz de la intervención previa de la lesión; (b) Durante la intervención quirúrgica se apreciaba infiltración tumoral de los huesos propios de la nariz (círculo con puntos discontinuos). En el estudio anatómo patológico, en ambos casos, existía infiltración perineural.

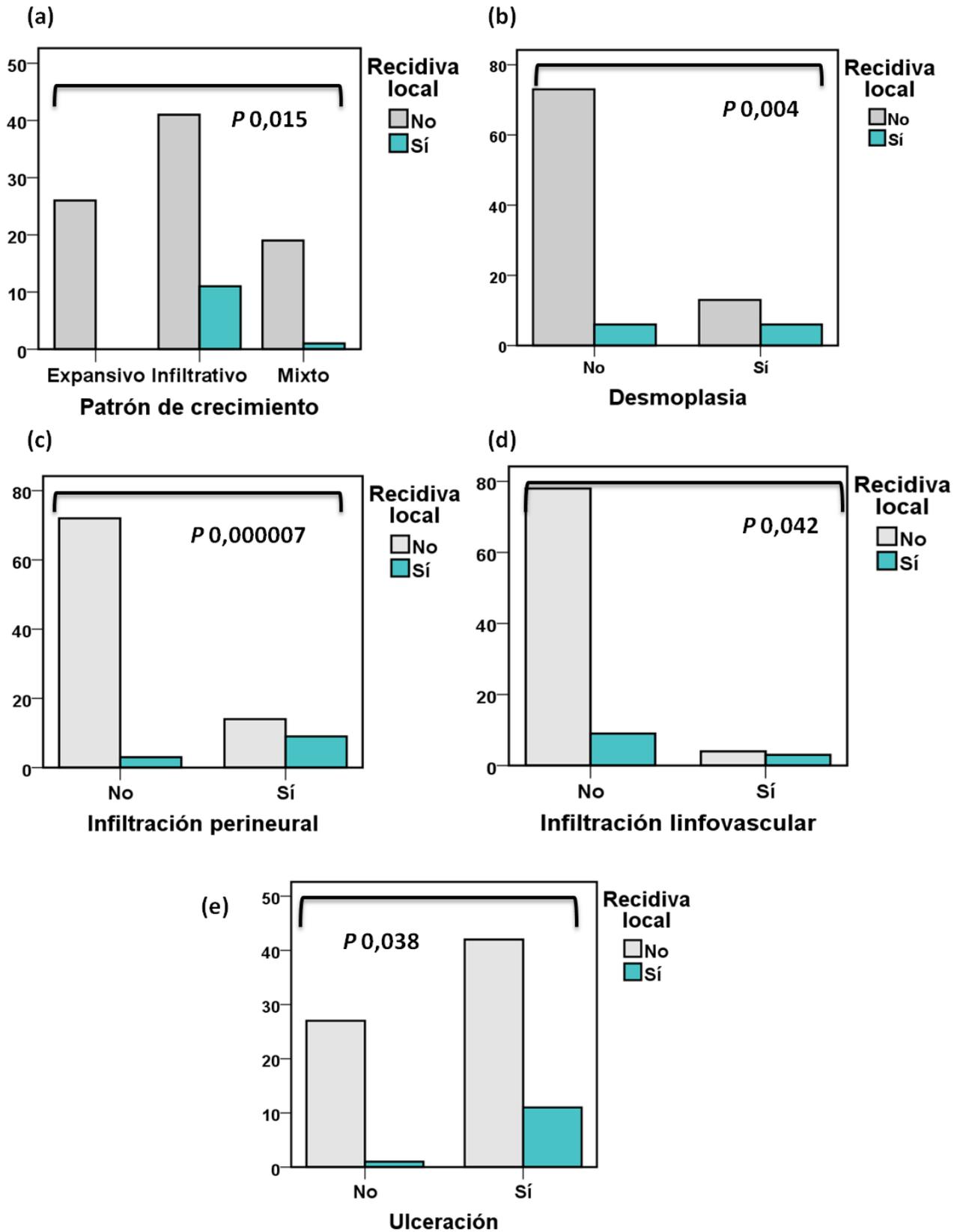


Figura 78: Relación entre variables clínico-patológicas y un mayor riesgo de recidiva (l) local en el CEC: (a) Patrón de crecimiento, (b) desmoplasia, (c) infiltración perineural, (d) infiltración linfovascular, (e) ulceración.

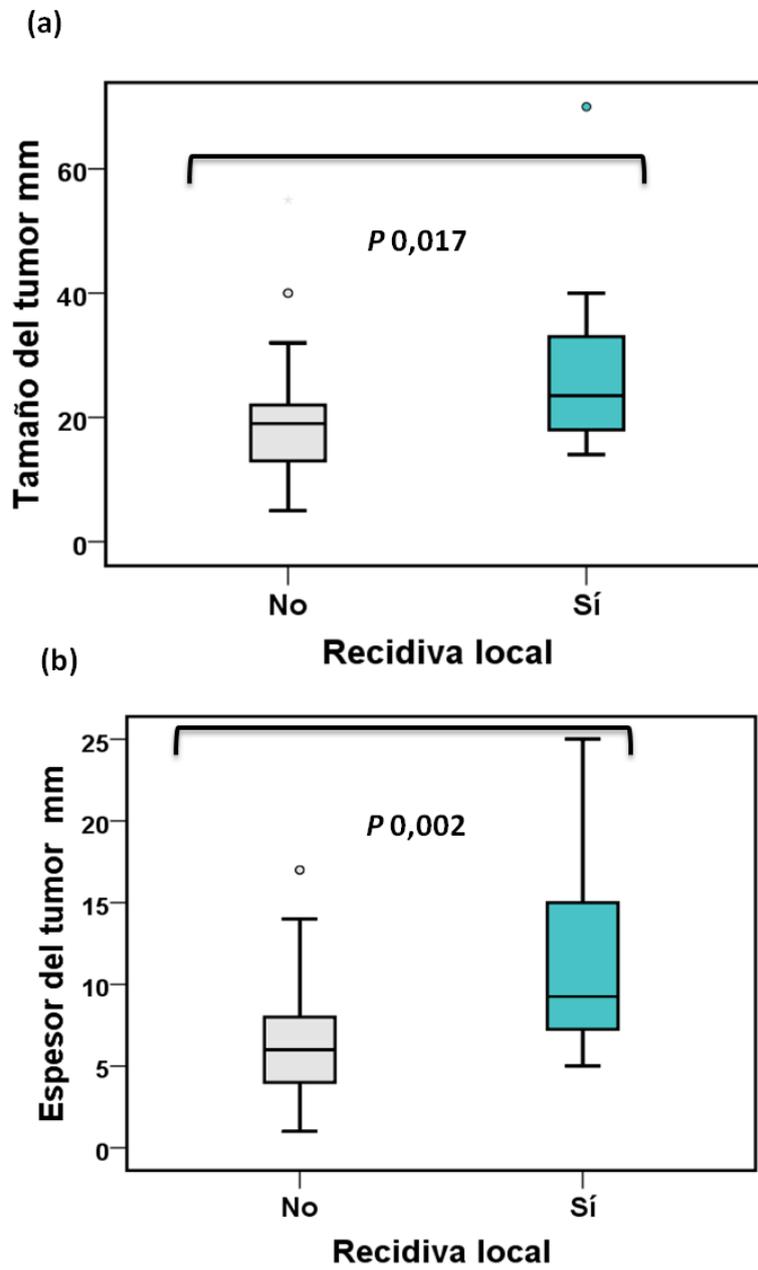


Figura 79: Relación entre variables clínico patológicas y un mayor riesgo de recidiva local en el CEC (II):
 (a) Tamaño tumoral y (b) espesor tumoral.

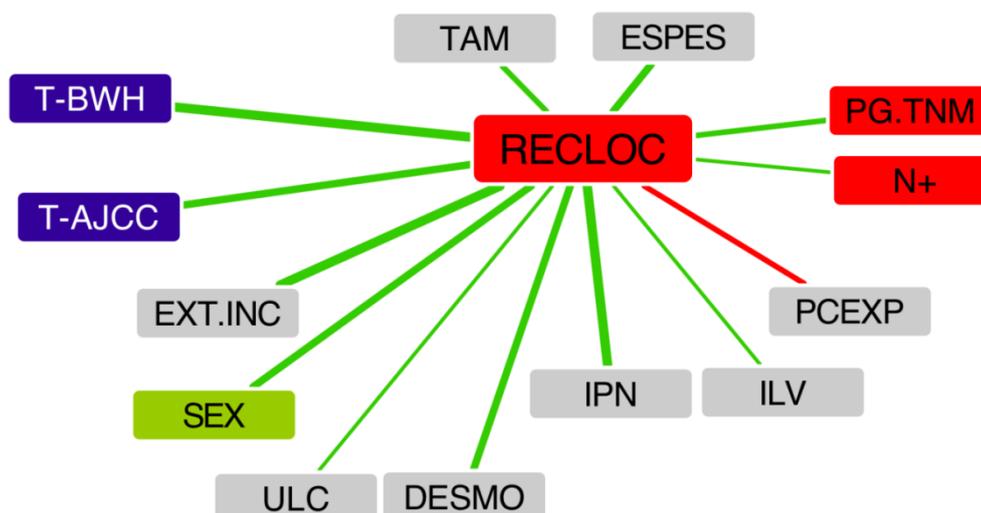


Figura 80: Variables clínico-patológicas relacionadas con el desarrollo de recidiva local. Imagen obtenida mediante Cytoscape®. Cada nodo muestra una variable clínico-patológica, cada línea indica la asociación entre las variables, cuyo grosor es inversamente proporcional al valor de P. El color gris de los nodos representa variables histopatológicas, el color verde representa variables clínicas, el color azul oscuro representa sistemas de estadiaje en el CEC, el color azul celeste indica proteínas y el color rojo eventos de mala evolución clínica. El color rojo de las líneas indica una asociación negativa, el color verde indica una asociación positiva, el color azul oscuro indica distintos sistemas de estadiaje en el CEC. RECLOC (recidiva local), N+ (desarrollo de metástasis ganglionares durante el seguimiento), PG.TNM (progresión del estadio TNM durante el seguimiento), SEX (sexo mujer), TAM (tamaño), ESPES (espesor), ULC (ulceración), DESMO (desmoplasia), EXT.INC (extirpación incompleta del tumor primario), PCEXP (patrón de crecimiento expansivo), IPN (infiltración perineural), ILV (infiltración linfovascular), T-AJCC (estadio T2 según la clasificación de la AJCC), T-BWH (estadio T2b según la clasificación del Brigham and Women's Hospital).

2.2.3 Variables clínico-patológicas relacionadas con el desarrollo de metástasis ganglionares

La progresión ganglionar (entendida como el desarrollo de metástasis ganglionares durante el seguimiento) se asoció a las variables clínicas e histopatológicas que figuran en la Tabla 29. Respecto a las variables clínicas, la progresión ganglionar fue más frecuente en los tumores en estadio II de la clasificación TNM de la AJCC al diagnóstico, que en aquéllos en estadio I ($P = 0,024$); y en aquéllos en estadio T2b que en los T2a y T1, según la clasificación del T-BWH ($P = 0,035$). El desarrollo de metástasis ganglionares fue también más frecuente en los tumores recurrentes ($P = 0,029$); y en los tumores que asentaron en las zonas de cabeza y cuello de alto riesgo, frente a las de bajo riesgo como tronco y miembros ($P = 0,002$); aunque no existieron diferencias en función del sexo ni se asociaron a la extirpación incompleta del tumor primario en nuestro estudio.

Respecto a las variables histopatológicas, la progresión ganglionar fue más frecuente en los tumores pobremente diferenciados, que en aquéllos con grado de diferenciación moderado y bueno ($P = 0,003$); y más frecuente en los tumores con patrón de crecimiento infiltrativo que en aquéllos con patrón mixto y expansivo ($P = 0,05$). Se asoció también a la presencia de infiltración perineural ($P = 0,006$) y linfovascular ($P = 0,006$) en el tumor primario; no presentó relación con la presencia de desmoplasia en el estroma; y fue más frecuente en los tumores que tenían ulceración en el epitelio ($P = 0,026$). Aunque no guardó relación con el tamaño tumoral en nuestra serie, sí lo hizo con el espesor del tumor primario, siendo más frecuente el desarrollo de metástasis ganglionares en los tumores más gruesos ($P = 0,015$). Por otra parte, aunque no se demostró relación con la intensidad del infiltrado inflamatorio peritumoral, sí fue más frecuente la progresión ganglionar en los tumores con un infiltrado inflamatorio intratumoral intenso, que en los que tenían un infiltrado intratumoral nulo, escaso o moderado ($P = 0,004$). (Véanse también Figuras 81-83)



Figura 81: Carcinoma epidermoide cutáneo con metástasis ganglionares: (a) CEC ulcerado en concha de pabellón auricular izquierdo (b) y (c) adenopatías metastásicas preauriculares, retroauriculares y en región suboccipital homolateral a los 3 meses de la extirpación tumoral, sin recidiva local del tumor. Se acompañaba de infiltración parotídea. El asterisco representa el colgajo de reconstrucción del defecto tras la extirpación del tumor primario (ausencia de recidiva local).

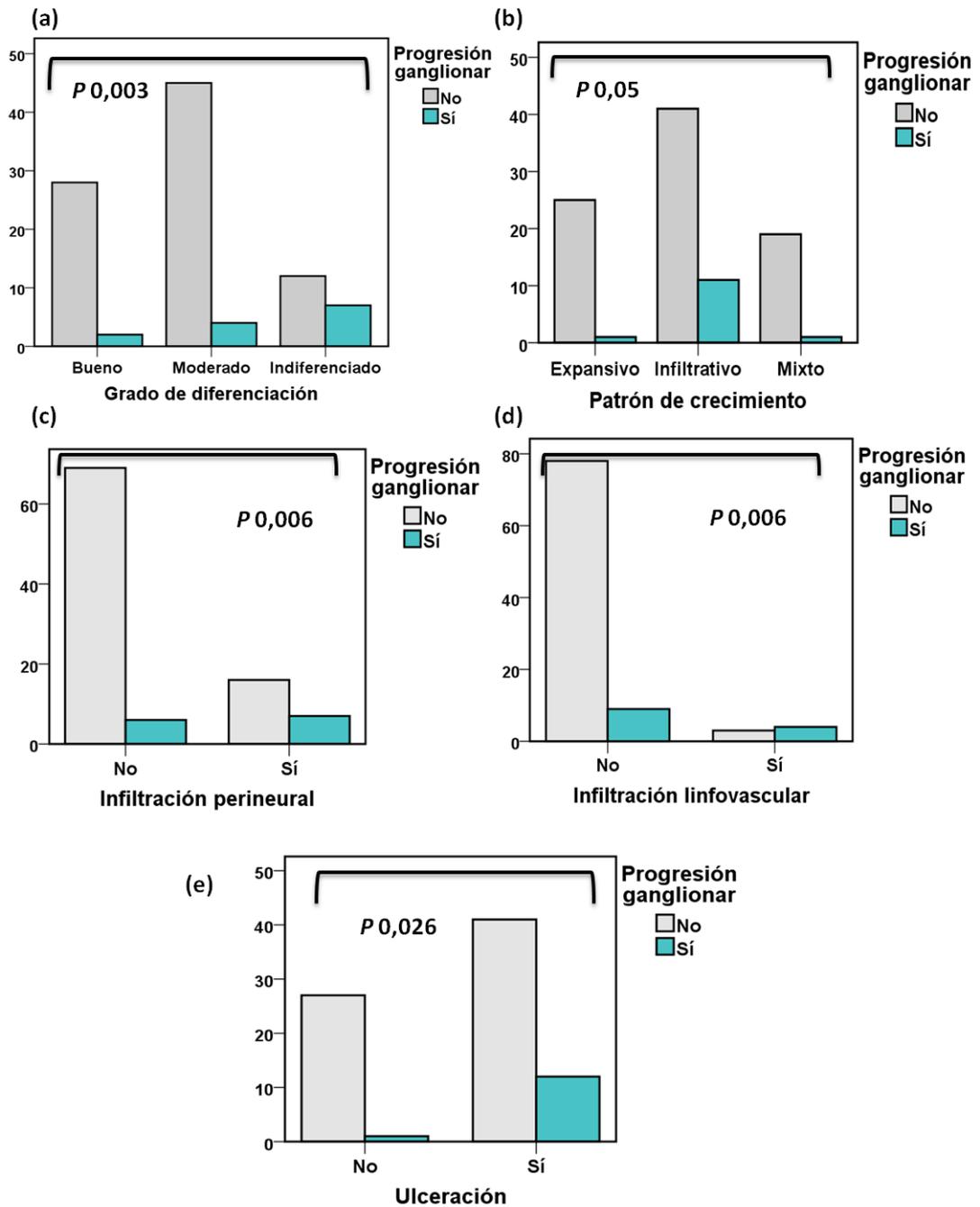


Figura 82: Variables clínico-patológicas relacionadas con un mayor riesgo de metástasis ganglionares: (a) grado de diferenciación, (b) patrón de crecimiento, (c) infiltración perneural, (d) infiltración linfovascular, (e) ulceración.

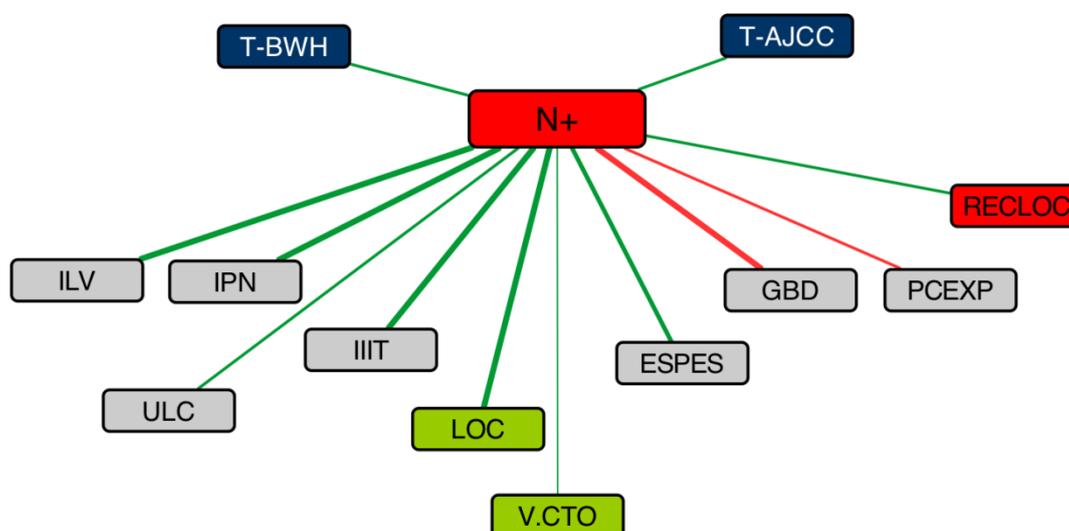


Figura 83: Variables clínico-patológicas relacionadas con el desarrollo de metástasis ganglionares. Imagen obtenida mediante Cytoscape®. Cada nodo muestra una variable clínico-patológica, cada línea indica la asociación entre las variables, cuyo grosor es inversamente proporcional al valor de P. El color gris de los nodos representa variables histopatológicas, el color verde representa variables clínicas, el color azul oscuro representa sistemas de estadiaje en el CEC y el color rojo eventos de mala evolución clínica. El color rojo de las líneas indica una asociación negativa, el color verde indica una asociación positiva, el color azul oscuro indica distintos sistemas de estadiaje en el CEC. N+ (desarrollo de metástasis ganglionares durante el seguimiento), RECLOC (recidiva local), ESPES (espesor), ULC (ulceración), GBD (grado de diferenciación bueno), PCEXP (patrón de crecimiento expansivo), IPN (infiltración perineural), ILV (infiltración linfocelular), IIIIT (infiltrado inflamatorio intratumoral intenso), V.CTO (velocidad de crecimiento rápida –más de 5 mm / mes -), LOC (localización de alto riesgo), T-AJCC (estadio T2 según la clasificación de la AJCC), T-BWH (estadio T2b según la clasificación del Brigham and Women’s Hospital).

2.2.4 Variables relacionadas con la progresión del estadio tumoral durante el seguimiento

La progresión del estadio TNM se asoció a las variables clínicas e histopatológicas que se indican en la Tabla 29. Respecto a las variables clínicas, la progresión del estadio TNM durante el seguimiento fue más probable en los tumores con mayor estadio TNM al diagnóstico (II vs. I) ($P = 0,013$), y en los tumores con mayor T, según la clasificación alternativa del T-BWH (T2b vs. T2a Vs T1) ($P = 0,013$). Por otra parte, la progresión fue mayor en las áreas de localización de cabeza y cuello de alto riesgo ($P = 0,001$) y en los tumores que recurrieron ($P = 0,013$).

Respecto a las variables histopatológicas, la progresión del estadio TNM durante el seguimiento se relacionó con el grado pobre de diferenciación tumoral ($P = 0,001$) y con el patrón de crecimiento infiltrativo ($P = 0,030$). Además, se asoció a la infiltración perineural ($P = 0,004$) y linfovascular con tendencia estadística ($P = 0,09$); y también fue más frecuente en los tumores ulcerados ($P = 0,018$), aunque no se relacionó con la presencia de desmoplasia. Si bien, no se demostró correlación con la intensidad del infiltrado inflamatorio peritumoral, la progresión del estadio TNM se asoció a la presencia de un infiltrado inflamatorio intratumoral intenso ($P = 0,009$) (Tabla 29, Figuras 84-85).

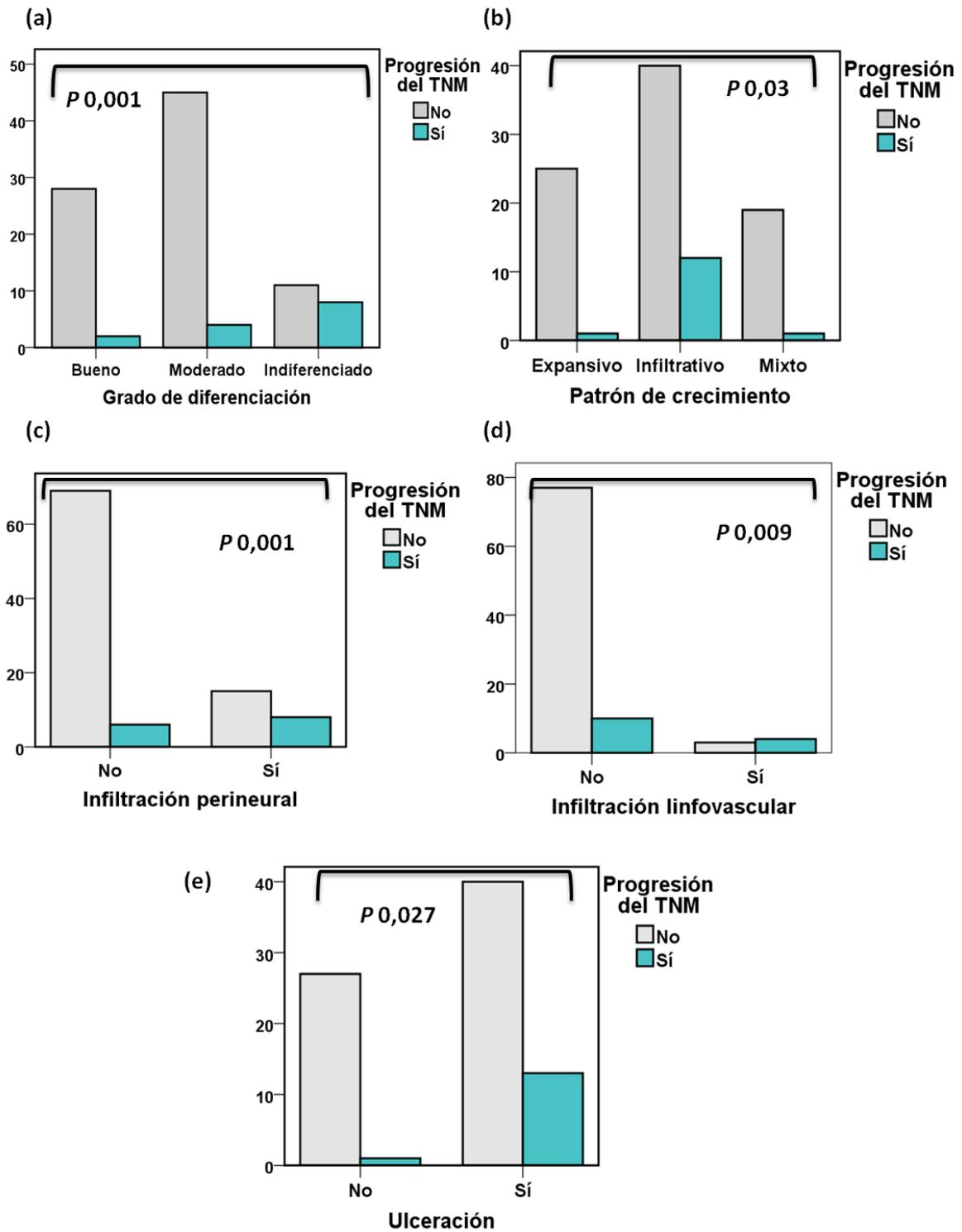


Figura 84: Variables clínico-patológicas asociadas a un mayor riesgo de progresión del TNM durante el seguimiento: (a) grado de diferenciación, (b) patrón de crecimiento, (c) infiltración perineural, (d) infiltración linfovascular, (e) ulceración.

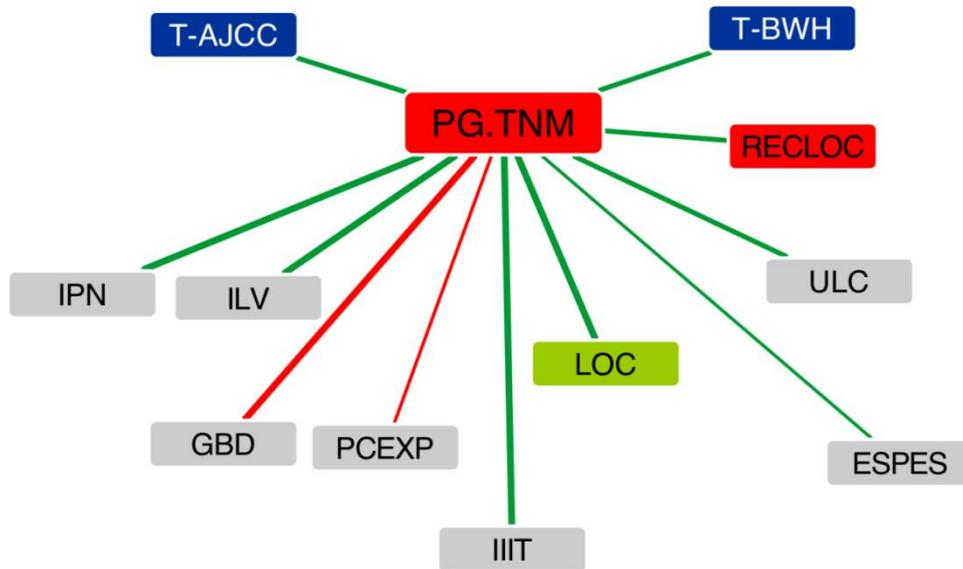


Figura 85: Variables clínico-patológicas relacionadas con la progresión del TNM durante el seguimiento. Imagen obtenida mediante Cytoscape®. Cada nodo muestra una variable clínico-patológica, cada línea indica la asociación entre las variables, cuyo grosor es inversamente proporcional al valor de P. El color gris de los nodos representa variables histopatológicas, el color verde representa variables clínicas, el color azul oscuro representa sistemas de estadiaje en el CEC y el color rojo eventos de mala evolución clínica. El color rojo de las líneas indica una asociación negativa, el color verde indica una asociación positiva, el color azul oscuro indica distintos sistemas de estadiaje en el CEC. PG.TNM (progresión del TNM durante el seguimiento), RECLOC (recidiva local), ESPES (espesor), ULC (ulceración), GBD (grado de diferenciación bueno), PCEXP (patrón de crecimiento expansivo), IPN (infiltración perineural), ILV (infiltración linfovascular) IIIIT (infiltrado inflamatorio intratumoral intenso), LOC (localización de alto riesgo), T-AJCC (estadio T2 según la clasificación de la AJCC), T-BWH (estadio T2b según la clasificación del Brigham and Women's Hospital).

		Eventos "globales"		Recidiva local		Progresión ganglionar		Progresión TNM	
		Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No
TNM diagnóstico AJCC	I	1	34	0	35	1	34	1	34
	II	20	43	12	51	12	51	13	50
		0,001		0,004		0,024		0,016	
Estadio T Brigham and Women's Hospital	T1	1	34	0	35	1	34	1	34
	T2a	8	32	4	36	6	34	6	34
	T2b	12	11	8	15	6	17	7	16
		0,00004		0,0003		0,035		0,013	
Patrón de crecimiento	Expansivo	1	25	0	26	1	25	1	25
	Mixto	2	18	1	19	1	19	1	19
	Infiltrativo	18	34	11	41	11	41	12	40
		0,003		0,015		0,05		0,03	
Grado diferenciación	Bueno	3	27	2	28	2	28	2	28
	Moderado	9	40	6	43	4	45	4	45
	Pobre	9	10	4	15	7	12	8	11
		0,006		N.S		0,003		0,001	
Desmoplasia	Sí	7	12	6	13	3	16	4	15
	No	14	65	6	73	10	69	10	69
		N.S.		0,004		N.S.		N.S.	
Ulceración	Sí	19	34	11	42	12	41	13	40
	No	2	26	1	27	1	27	1	27
		0,005		0,038		0,026		0,018	
IPN	Sí	12	11	9	14	7	16	8	15
	No	9	66	3	72	6	69	6	69
		0,00004		0,00007		0,006		0,001	
ILV	Sí	5	2	3	4	4	3	4	3
	No	16	71	9	78	9	78	10	77
		0,001		0,042		0,006		0,009	
IIIT	Nulo	8	38	5	41	3	43	4	42
	Valores intermedios	8	36	6	38	6	38	6	38
	Intenso	5	3	1	7	4	4	4	4
		0,013		N.S		0,004		0,009	

IIPT	Nulo	1	4	1	4	0	5	0	5
	Valores intermedios	11	40	7	44	7	44	8	43
	Intenso	9	33	4	38	6	36	6	36
		N.S.		N.S.		N.S.			
Sexo	Mujer	14	44	10	37	39	8	9	46
	Varón	7	33	2	49	46	5	5	38
		0,053		0,009		N.S.		N.S.	
Extirpación incompleta del tumor primario	No	7	9	7	9	2	14	3	13
	Sí	14	66	5	75	11	69	11	69
		0,020		0,0004		N.S.		N.S.	
Localización	CC alto R	15	31	7	39	12	34	13	33
	CC bajo R	6	32	5	33	1	37	1	37
	Tronco/ MM	0	14	0	14	0	14	0	14
		0,019		N.S.		0,002		0,001	
Recidiva local	Sí	No aplicable		No aplicable		4	8	5	7
	No					9	77	9	77
						0,029		0,013	
Espesor		0,001		0,002		0,015		0,027	
Tamaño		0,023		0,017		N.S.		N.S.	

Tabla 29: Relación de los eventos de mal pronóstico en el CEC (recidiva local, progresión ganglionar y metástasis a distancia) con parámetros clínico-patológicos. IPN (infiltración perineural), ILV (infiltración linfovascular), IIPT (infiltrado inflamatorio peritumoral), IIIT (infiltrado inflamatorio intratumoral), CC alto R (cabeza y cuello de alto riesgo), CC bajo R (cabeza y cuello de bajo riesgo), MM (miembros), AJCC (American Joint Committee on Cancer). La recidiva local se incluye entre los eventos de mala evolución considerados de forma global y, por ello, no se compara su relación con los mismos.

2.3 Resumen de las asociaciones clínico-patológicas más relevantes

En los apartados 1 y 2 de los resultados de este trabajo de tesis doctoral, hemos analizado las asociaciones entre las variables clínico-patológicas evaluadas y de éstas con los eventos de mala evolución clínica (cualquier evento considerado de forma global, y de forma individual con la recidiva local, progresión ganglionar y progresión del TNM durante el seguimiento). A modo de síntesis, la siguiente tabla 30 resume las asociaciones significativamente más relevantes y las tendencias estadísticas más significativas. De la misma manera, con el fin de recapitular, se representan en la figura 86 realizada con el programa *Cytoscape*, las variables clínico-patológicas y las asociaciones entre ellas.

VAR1	VAR2	P
DESMO	ILV	0,077
DESMO	ESPE	0,075
DESMO	TAM	0,066
DESMO	T-AJCC	0,044
DESMO	IIIT	0,033
DESMO	ULC	0,008
DESMO	GBD	0,001
DESMO	T-BWH	0,000032
DESMO	IPN	0,000005
ESPE	TI-DX	0,045
ESPE	GBD	0,003
ESPE	TAM	0,0000001
EVEN	TAM	0,023
EVEN	EXT.INC	0,02
EVEN	LOC	0,019
EVEN	IIIT	0,013
EVEN	GBD	0,006
EVEN	ULC	0,005
EVEN	PCEXP	0,003
EVEN	ESPE	0,001
EVEN	ILV	0,001
EVEN	T-AJCC	0,001
EVEN	IPN	0,00004
EVEN	T-BWH	0,00004
IIIT	T-BWH	0,052
IIIT	T-AJCC	0,048
IIIT	GBD	0,032
IIIT	TAM	0,024
IIPT	ESPE	0,085
IIPT	IPN	0,063
IIPT	T-BWH	0,019
IIPT	GBD	0,011
ILV	T-BWH	0,002

ILV	GBD	0,001
IPN	TAM	0,072
IPN	ILV	0,011
IPN	ESPE	0,003
IPN	T-AJCC	0,00044
IPN	GBD	0,00016
IPN	T-BWH	0,000001
N+	PCEXP	0,05
N+	T-BWH	0,035
N+	RECLOC	0,029
N+	ULC	0,026
N+	T-AJCC	0,024
N+	ESPE	0,015
N+	ILV	0,006
N+	IPN	0,006
N+	IIIT	0,004
N+	GBD	0,003
N+	LOC	0,002
PCEXP	IIPT	0,062
PCEXP	TAM	0,034
PCEXP	ILV	0,027
PCEXP	TI-DX	0,018
PCEXP	IIIT	0,001
PCEXP	T-AJCC	0,001
PCEXP	ULC	0,001
PCEXP	DESMO	0,00003
PCEXP	IPN	0,000016
PCEXP	ESPE	0,00001
PCEXP	T-BWH	0,000006
PCEXP	GBD	0,000001
PG.TNM	PCEXP	0,03
PG.TNM	ESPE	0,027
PG.TNM	ULC	0,018

PG.TNM	T-AJCC	0,016
PG.TNM	RECLOC	0,013
PG.TNM	T-BWH	0,013
RECLOC	TAM	0,017
PG.TNM	IIIT	0,009
PG.TNM	ILV	0,009
PG.TNM	GBD	0,001
PG.TNM	IPN	0,001
PG.TNM	LOC	0,001
RECLOC	ILV	0,042
RECLOC	ULC	0,038
RECLOC	PCEXP	0,015
RECLOC	SEX	0,009
RECLOC	DESMO	0,004
RECLOC	T-AJCC	0,004
RECLOC	ESPE	0,002
RECLOC	EXT.INC	0,0004
RECLOC	T-BWH	0,0003
RECLOC	IPN	0,00007
ULC	ESPE	0,084
ULC	IIIT	0,058
ULC	GBD	0,048
ULC	ILV	0,036
ULC	T-AJCC	0,027
ULC	IPN	0,023
ULC	TAM	0,023
ULC	T-BWH	0,007
V.CTO	EVEN	0,085
V.CTO	N+	0,071
V.CTO	TAM	0,003
V.CTO	T-BWH	0,003
V.CTO	T-AJCC	0,001
V.CTO	TI-DX	0,00003

Tablas 30: Resumen de resultados estadísticamente significativos (rojo) y/o con tendencia estadística (azul) en las comparaciones de variables clínico-patológicas en nuestra serie de CEC. VAR1 (variables 1), VAR2 (variable 2), DESMO (desmoplasia), ESPE (espesor), EVEN (eventos de mala evolución clínica considerados de forma global), EXT.INC (extirpación incompleta del tumor primario), GBD (grado de diferenciación bueno), IIIT (infiltrado inflamatorio intratumoral intenso), IIPT (infiltrado inflamatorio peritumoral intenso), IPN (infiltración perineural), ILV (infiltración linfocelular), LOC (localización de alto riesgo), N+ (desarrollo de metástasis ganglionares durante el seguimiento), PCEXP (patrón de crecimiento expansivo), PG.TNM (progresión del TNM durante el seguimiento), RECLOC (recidiva local), SEX (sexo mujer), T-AJCC (estadio T2 según la clasificación de la AJCC), TAM (tamaño), T-BWH (estadio T2b según la clasificación del Brigham and Women's Hospital), TI-DX (tiempo hasta el diagnóstico menor de 2 meses), ULC (ulceración), V.CTO (velocidad de crecimiento rápida –más de 5 mm / mes -).

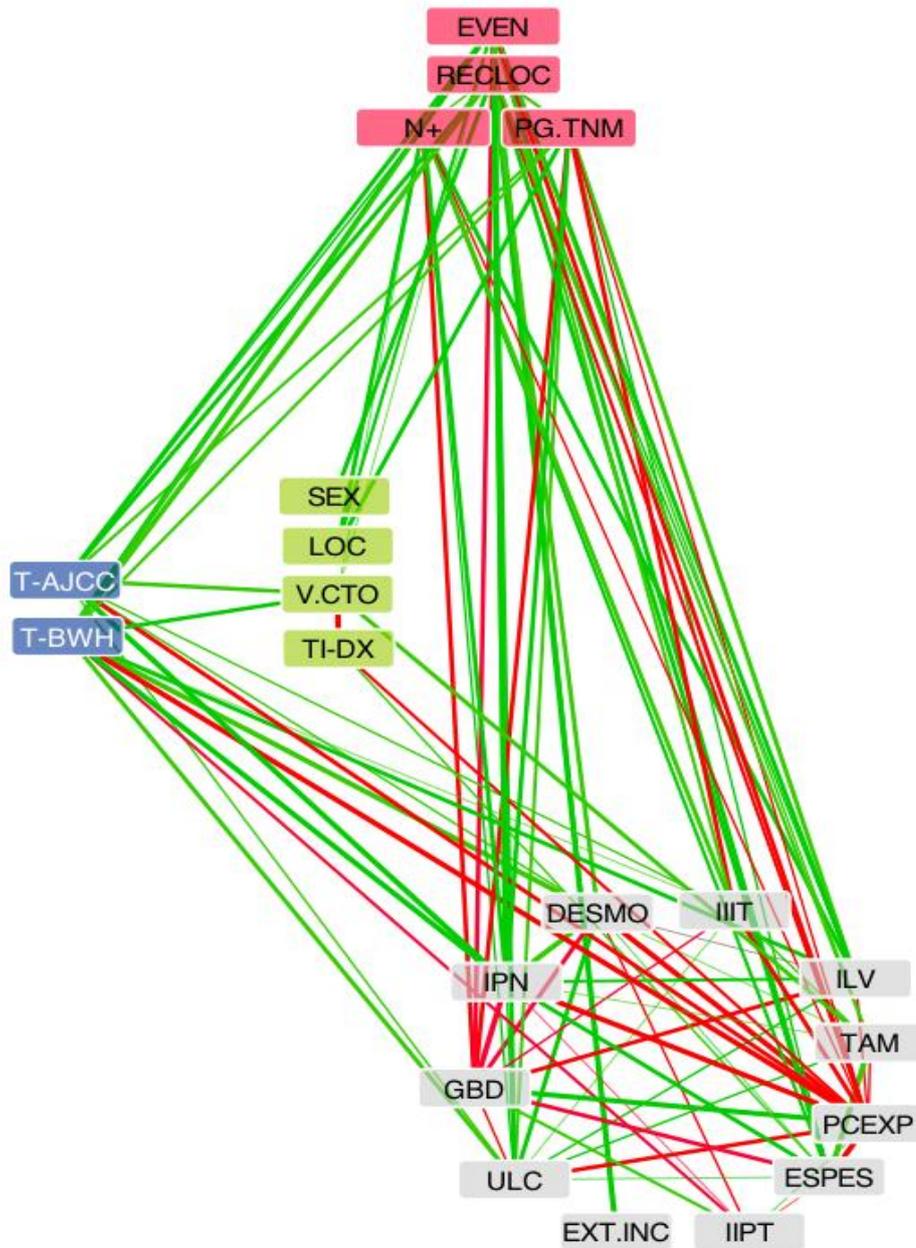


Figura 86: Red que muestra las asociaciones entre variables clínico-patológicas-evolutivas: Imagen obtenida mediante Cytoscape®. Cada nodo muestra una variable clínico-patológica, cada línea indica la asociación entre las variables, cuyo grosor es inversamente proporcional al valor de P. El color gris de los nodos representa variables histopatológicas, el color verde representa variables clínicas, el color azul oscuro representa sistemas de estadiaje en el CEC y el color rojo eventos de mala evolución clínica. El color rojo de las líneas indica una asociación negativa, el color verde indica una asociación positiva, el color azul oscuro indica distintos sistemas de estadiaje en el CEC. EVEN (eventos de mala evolución clínica durante el seguimiento), N+ (desarrollo de metástasis ganglionares durante el seguimiento), RECLOC (recidiva local), PG.TNM (progresión del TNM durante el seguimiento), ESPES (espesor), TAM (tamaño), ULC (ulceración), DESMO (desmoplasia), GBD (grado de diferenciación bueno), PCEXT (patrón de crecimiento expansivo), IPN (infiltración perineural), ILV (infiltración linfovascular), IIIT (infiltrado inflamatorio intratumoral intenso), IIPT (infiltrado inflamatorio peritumoral intenso), EXT.INC (extirpación incompleta del tumor primario), V.CTO (velocidad de crecimiento rápida –más de 5 mm / mes -), TI-DX (tiempo hasta el diagnóstico menor de 2 meses), LOC (localización de alto riesgo), SEX (sexo mujer), T-AJCC (estadio T2 según la clasificación de la AJCC), T-BWH (estadio T2b según la clasificación del Brigham and Women’s Hospital).

2.4 Desarrollo de modelos predictivos a partir de las variables clínico-patológicas

2.4.1 Predicción de eventos de mala evolución clínica considerados de forma global

Para evaluar la independencia de las variables clínico-patológicas asociadas al desarrollo de eventos de mala evolución clínica, considerados en su conjunto, se construyó un modelo de regresión logística. Se incluyeron como variables predictivas aquellas que habían demostrado relación con el desarrollo de dichos eventos en el análisis univariante y/o que habían demostrado relevancia en estudios previos (Brantsch *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 1992; Karia *et al.*, 2013a). Concretamente, se incluyeron: el espesor del tumor primario (< 2 mm / > 2 mm), el tamaño (< 20 mm / > 20 mm), el patrón de crecimiento (infiltrativo / no infiltrativo), la presencia de desmoplasia, la infiltración perineural, el grado de diferenciación (pobre / bueno-moderado), la localización (alto riesgo / bajo riesgo), el sexo, la inmunosupresión y la ulceración. Las variables que demostraron ser predictivas de forma independiente del desarrollo de eventos de mala evolución tumoral, considerados de forma global, fueron la ulceración ($P = 0,036$), la presencia de infiltración perineural ($P = 0,004$), y la localización del tumor en áreas de cabeza y cuello de alto riesgo ($P = 0,019$). Los valores de *odds ratio* (OR) y de los intervalos de confianza (IC), junto con los valores de P de las variables que se incluyen en la ecuación figuran en la Tabla 31. El modelo queda resumido por la ecuación $P(EVEN) = \frac{1}{1 + e^{3,858 - 1,801xIPN - 1,783xULC - 1,48xLOC}}$, donde *EVEN* representa los eventos globales de mala evolución clínica durante el seguimiento, *IPN* sería la infiltración perineural, *ULC* indica la ulceración y *LOC* la localización de alto riesgo tumor primario. La presencia de uno de los factores de la ecuación se sustituye por el valor 1 y la ausencia por el valor 0; es decir, si un CEC presenta infiltración perineural, está ulcerado y localizado en una zona de alto riesgo de cabeza y cuello (por ejemplo, en la oreja) tiene una probabilidad de dar lugar a algún evento de mala evolución clínica durante el seguimiento del 77,10 %; mientras que si no presenta ninguno de esos factores de alto riesgo, la probabilidad baja hasta un 2,06%. En todas las ecuaciones obtenidas tras la regresión logística, que presentemos a continuación, se explican los modelos con principios similares, por lo que ya no se explicaran de manera tan pormenorizada. El modelo resultante tuvo una especificidad del 96,7% y una eficacia global del 81,5%, R de Nagelkerke de 0,385.

VARIABLES EXPLICATIVAS	OR	I.C.	P
INFILTRACIÓN PERINEURAL	6,054	1,772-20,680	0,004
ULCERACIÓN	5,950	1,119-31,625	0,036
LOCALIZACIÓN (CC alto riesgo)	4,423	1,281-15,268	0,019

Tabla 31: Variables clínico-patológicas incluidas en el modelo de predicción de eventos de mala evolución clínica: OR (odds ratio), I.C. (intervalo de confianza al 95%), CC (cabeza y cuello).

2.4.2 Predicción de la recidiva local

Para evaluar la independencia de las variables clínico-patológicas analizadas en el desarrollo de la recidiva local se construyó también un modelo de regresión logística. Como variables explicativas, se induyeron aquellas que se habían asociado con la recidiva local en el análisis univariante, incluidas: el espesor del tumor primario (< 2 mm / > 2 mm), el tamaño horizontal del mismo (< 20 mm / > 20 mm), el patrón de crecimiento (infiltrativo / no infiltrativo), la desmoplasia, la infiltración perineural, el grado de diferenciación (pobre / bueno-moderado), la localización (CC alto riesgo / localización de bajo riesgo), el sexo, la inmunosupresión y la ulceración. El sexo femenino del paciente ($P = 0,036$) y la presencia de infiltración perineural ($P = 0,001$) fueron las variables que mejor definieron el riesgo de que un CEC tuviera una recidiva local durante el seguimiento (Tabla 32). El modelo queda definido por la ecuación $P(RECLOC) = 1/1 + e^{4,102 - 1,838xSEX - 2,591xIPN}$, donde *RECLOC* representa la recidiva local, *SEX* indica el sexo femenino e *IPN* la presencia de infiltración perineural. El modelo tiene una especificidad del 92.8% y una eficacia global para detectar la probabilidad de una recidiva local del de 88.9%, con una R de Nagelkerke de 0,399.

VARIABLES EXPLICATIVAS	OR	I.C.	P
SEXO femenino	6,28	1,125-35,06	0,036
INFILTRACIÓN PERINEURAL	13,34	2,93-60,652	0,001

Tabla 32: Variables clínico-patológicas predictoras independientes del desarrollo de recidiva local en el CEC. I.C. (intervalo de confianza al 95%), OR (odds ratio), CC (cabeza y cuello).



Figura 87: Recidiva local de un CEC en una mujer: Tumor primario (a), (b) y recidiva local (c) sobre la cicatriz del colgajo realizada para cubrir el defecto tras la extirpación, 8 meses antes.

2.4.3 Predicción del desarrollo de metástasis ganglionares

Para evaluar la independencia de las variables clínico-patológicas analizadas en este trabajo sobre el desarrollo de metástasis ganglionares, como en los casos anteriores, se elaboró un modelo multivariante de regresión logística. Como variables explicativas se incluyeron aquellas variables clínico-patológicas que demostraron relación con el desarrollo de metástasis ganglionares en el análisis univariante: el espesor del tumor primario (< 2 mm / > 2 mm), su tamaño horizontal (< 20 mm / > 20 mm), el patrón de crecimiento (infiltrativo / no infiltrativo), la infiltración perineural, el grado de diferenciación (pobre / bueno-moderado), el desarrollo de recidiva local durante el seguimiento y la extirpación incompleta del tumor.

Las variables que demostraron predecir de manera independiente el desarrollo de metástasis ganglionares fueron la localización del tumor en área de cabeza y cuello de alto riesgo, (OR = 14,661; $P = 0,013$) y el grado de diferenciación pobre del tumor primario (OR = 5,285; $P = 0,015$) (Tabla 33). La probabilidad de desarrollar metástasis ganglionares durante la evolución según el modelo se define a partir de la siguiente ecuación $P(N+) = 1/1 + e^{4,318 - 1,664 \times GPD - 2,685 \times LOC}$, donde $N+$ representa el desarrollo de metástasis ganglionares, GPD el grado de diferenciación pobre y LOC la localización del tumor en un área de alto riesgo, según las hemos definido en este trabajo. La especificidad del modelo fue del 91,8%; con una sensibilidad del 46,2%. La eficacia global del modelo fue del 85,4%. (R de Nagelkerke = 0,339).

VARIABLES EXPLICATIVAS	OR	I.C.	P
LOCALIZACIÓN (CC alto riesgo)	14,661	1,768-121,55	0,013
GRADO DE DIFERENCIACIÓN pobre	5,285	1,374-20,326	0,015

Tabla 33: Variables clínico-patológicas que explicaron el riesgo de progresión ganglionar de manera independiente. OR (odds ratio), I.C. (intervalo de confianza al 95%), CC (cabeza y cuello).

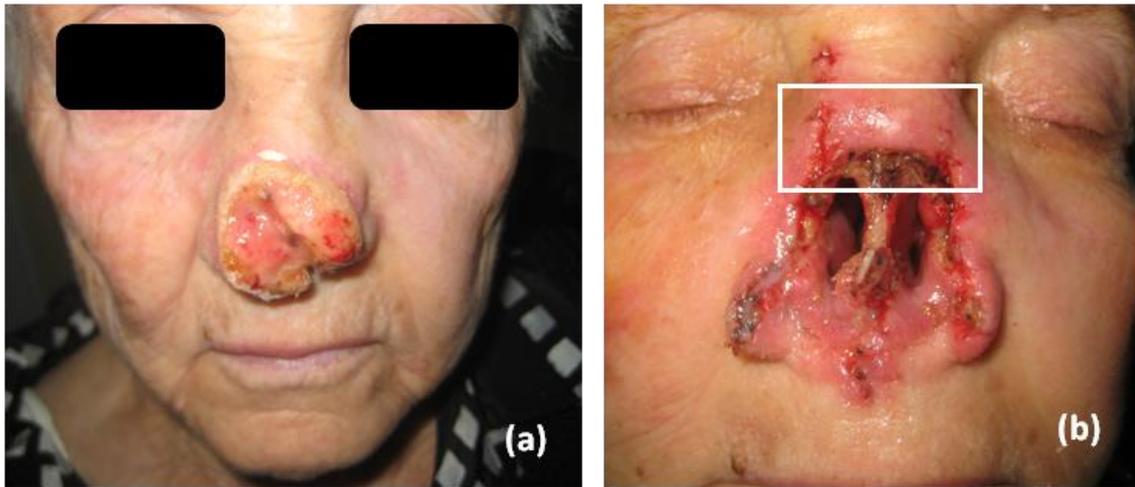


Figura 88: CEC asociado a metástasis ganglionares: (a) CEC pobremente diferenciado en punta nasal (localización de alto riesgo). (b) Fue tratado mediante amputación quirúrgica en bloque y posterior cirugía de Mohs en zona superior (rectángulo blanco). A los 9 meses la paciente desarrolló metástasis ganglionares que requirieron vaciamiento bilateral de cuello.

2.4.4 Predicción de la progresión del estadio de la clasificación TNM durante el seguimiento

Después evaluamos la independencia de las variables clínico-patológicas analizadas para predecir la progresión del estadio TNM durante la evolución tumoral. Para ello, se construyó un modelo multivariante de regresión logística con la progresión del estadio del TNM como variable respuesta. Como variables predictoras, de nuevo, se utilizaron aquellas variables clínico-patológicas que demostraron relación con la evolución del TNM en el estudio univariante. Así, se incluyeron en el modelo: el espesor del tumor primario, el tamaño, el patrón de crecimiento, la desmoplasia, la infiltración perineural, el grado de diferenciación, la localización, el sexo, la inmunosupresión, la ulceración y la recidiva local. Las variables que pronosticaron la progresión del TNM durante el seguimiento en el análisis multivariante fueron el grado de diferenciación pobre ($P = 0,008$), la localización de alto riesgo ($P = 0,009$) y la recidiva local ($P = 0,030$) (Tabla 34). La probabilidad de desarrollar progresión del TNM (según la clasificación oficial de la AJCC) durante el seguimiento según el modelo, se define por la ecuación $P(PG.TNM) = 1/1 + e^{4,906 - 1,918xRECLOC - 1,929xGPD - 2,937xLOC}$, donde $PG.TNM$ representa la progresión del TNM durante el seguimiento, $RECLOC$ indica el desarrollo de recidiva local del tumor primario, GPD representa el pobre grado de diferenciación del tumor y LOC la localización en una de las áreas de alto riesgo que hemos considerado en este trabajo. La especificidad del modelo fue del 100% y su eficacia global del mismo del 88,8%, R de Nagelkerke = 0,455.

VARIABLES EXPLICATIVAS	OR	IC	P
RECIDIVA LOCAL	6,80	1,21-38,21	0,030
GPD	6,88	1,65-28,72	0,008
LOCALIZACIÓN	18,85	2,05-173,49	0,009

Tabla 34: Variables clínico-patológicas que, de una manera independiente, definieron el riesgo de progresión del TNM durante el seguimiento en el CEC. Nótese que los intervalos de confianza fueron amplios, especialmente el de la localización GPD (grado pobre de diferenciación). OR (odds ratio), I.C. (intervalo de confianza al 95%).

2.4.5 Evaluación de la influencia de los infiltrados inflamatorios sobre el pronóstico en el CEC

La implicación de los infiltrados inflamatorios en el pronóstico del CEC ha sido poco estudiada (Arwert *et al.*, 2010; Azzimonti *et al.*, 2014). En este trabajo, hemos observado la relación entre la intensidad de los infiltrados inflamatorios con varios parámetros clínico-patológicos y evolutivos de la enfermedad. Con el objetivo de evaluar cuál de esas variables se asoció de forma independiente o por consecuencia de la co-variación, se construyeron modelos de regresión logística. La presencia de eventos de mala evolución clínica fueron las variables respuesta y como variables predictoras, dentro de las variables clínico-patológicas previamente asociadas, se incluyó la intensidad de los infiltrados inflamatorios.

a. Evaluación de los infiltrados inflamatorios como variables predictoras de eventos de mala evolución clínica considerados de forma global

Construimos un modelo de regresión logística empleando como variables predictoras el patrón de crecimiento, la infiltración perineural, el grado de diferenciación, el espesor, el tamaño, la localización y los infiltrados inflamatorios. Como variable respuesta se eligió el desarrollo de eventos de mala evolución clínica considerados de forma global.

Las variables que demostraron ser factores de riesgo independientes del desarrollo de eventos de mala evolución clínica fueron la infiltración perineural y el infiltrado inflamatorio intratumoral intenso. Los OR e IC así como los valores de *P* figuran en la Tabla 35. La probabilidad de desarrollar algún evento de mala evolución durante el seguimiento teniendo en cuenta (además del resto de las variables clínico-patológicas) los infiltrados inflamatorios, queda definida por la ecuación $P (EVEN) = 1/1 + e^{3,012-2,027xIPN-1,332xLOC-2,222xIIIT}$, donde EVEN representa el desarrollo de cualquier evento de mala evolución clínica durante el seguimiento, IPN representa a IPN, LOC representa la localización de alto riesgo e IIIT indica un infiltrado inflamatorio intratumoral intenso. El modelo tuvo una especificidad del 90,9% y una eficacia global del 83,7%, con una R de Nagelkerke de 0,363.

VARIABLES EXPLICATIVAS	OR	I.C.	<i>P</i>
INFILTRACIÓN PERINEURAL	7,538	2,364-24,85	0,001
LOCALIZACIÓN	3,790	1,120-12,82	0,032
IIIT intenso	9,224	1,648-51,633	0,011

Tabla 35: Variables que predijeron el desarrollo de eventos de mala evolución clínica considerados de forma global en el CEC cuando incluimos los infiltrados inflamatorios dentro de las variables predictoras. IIIT indica infiltrado inflamatorio intratumoral intenso. OR (odds ratio), I.C. (intervalo de confianza al 95%).

b. Participación de los infiltrados inflamatorios como variable de predicción del desarrollo de metástasis ganglionares en el CEC

Construimos un modelo de regresión logística para evaluar la influencia de los infiltrados inflamatorios, junto con el resto de las variables clínico-patológicas relevantes, para predecir el riesgo de desarrollar metástasis ganglionares. Las variables inducidas en el modelo

fueron: recidiva local, patrón de crecimiento, infiltración perineural, grado de diferenciación, espesor, tamaño tumoral y localización.

Las variables que demostraron de manera independiente relevancia para predecir metástasis ganglionares fueron la recidiva local, el grado de diferenciación pobre y el infiltrado inflamatorio intratumoral intenso. En la Tabla 36 figuran las características de los OR, intervalos de confianza y valores de *P*. La probabilidad de desarrollar progresión ganglionar durante el seguimiento, queda definida por la ecuación $P(N+) = 1/1 + e^{2,096-1,629xGPD-1,461xRECLOC-1,951xIIIT}$, en la que N+ representa la progresión ganglionar, GPD el grado pobre de diferenciación, RECLOC, la presencia de recidiva local e IIIT el infiltrado inflamatorio intratumoral intenso. El modelo tuvo una especificidad el 95,3% pero poco sensible (38,5%), con una eficacia global del 87,8%, con una R de Nagelkerke de 0,290.

VARIABLES EXPLICATIVAS	OR	I.C.	P-VALOR
RECIDIVA LOCAL	4,309	0,936-19,832	0,061
GPD	5,099	1,324-19,636	0,018
IIIT intenso	7,037	1,302-38,043	0,023

Tabla 36: Variables clínico-patológicas que definieron de manera independiente el riesgo de desarrollar metástasis ganglionares cuando se incluyeron los infiltrados inflamatorios dentro de las variables predictoras. IIIT (infiltrado inflamatorio intratumoral). Nótese, que la recidiva local (marcada en gris) incluye al número 1 dentro de su intervalo de confianza y, por lo tanto, no debe considerarse. GPD (grado de diferenciación pobre del tumor). OR (odds ratio), I.C. (intervalo de confianza al 95%).

c. Evaluación de los infiltrados inflamatorios intratumorales como variables de predicción de la progresión del estadio TNM durante el seguimiento del CEC

Para evaluar el valor de los infiltrados inflamatorios dentro de un modelo multivariante para predecir la progresión “del TNM” en el CEC, se evaluaron éstos junto con otras variables clínico-patológicas en un modelo de regresión logística. Así, se utilizaron como variables

predictoras la recidiva local, el patrón de crecimiento, la infiltración perineural, el grado de diferenciación, el espesor, la localización, el tamaño y la intensidad de los infiltrados inflamatorios intra- y peritumorales; y, como variable de respuesta, la progresión del TNM durante el seguimiento.

Las variables que demostraron predecir de manera independiente la progresión “del TNM” durante el seguimiento fueron la recidiva local ($P = 0,015$ y $OR = 6,587$), el grado de diferenciación ($P = 0,006$ y $OR = 6,787$) y el infiltrado inflamatorio intratumoral intenso ($P = 0,037$ y $OR = 6,303$). Se presentan los OR y los intervalos de confianza en la Tabla 37. El modelo queda definido por la ecuación $P(PG.TNM) = 1/1 + e^{3,906 - 1,885xRECLOC - 1,915xGPD - 1,641xIIIT}$, en la que $PG.TNM$ indica la progresión del TNM (de acuerdo con la clasificación oficial de la AJCC) durante el seguimiento, $RECLOC$ representa el desarrollo de recidiva local del tumor primario, GPD el grado de diferenciación pobre del tumor e $IIIT$ el infiltrado inflamatorio intratumoral intenso. El modelo tuvo una especificidad del 96,4% y una sensibilidad del 42,9%, con una eficacia global del 88,8%, R de Nagelkerke = 0,349.

VARIABLES EXPLICATIVAS	OR	I.C.	P
RECIDIVA LOCAL	6,587	1,447-29,997	0,015
GPD	6,787	1,754-26,256	0,006
IIIT intenso	6,303	1,122-35,395	0,037

Tabla 37: Variables que explicaron de manera independiente la progresión del TNM cuando se incluyeron los infiltrados inflamatorios dentro de las variables predictoras. IIIT (infiltrado inflamatorio intratumoral), GPD (grado pobre de diferenciación). OR (odds ratio), I.C. (intervalo de confianza al 95%).

2.4.6 Evaluación de la capacidad de predicción de eventos de mala evolución clínica por diferentes métodos de estadiaje

Como hemos indicado en la introducción, existen al menos tres sistemas de clasificación, por estadios de progresión, que se han mostrado eficaces para predecir tanto metástasis como recidiva local y eventos de mala evolución clínica considerados de forma global, en el CEC. Aunque en nuestro estudio, el análisis univariante mostró resultados estadísticamente significativos, y con ello su utilidad, para los tres sistemas, nos interesó evaluar cuál de ellos sería el mejor, según nuestros datos, para predecir los eventos de mala evolución clínica. Así, comparamos la capacidad de predecir eventos de mala evolución clínica entre los 3 sistemas de estadiaje mediante análisis multivariante, en el que se consideraron como variables predictoras el desarrollo de eventos de mala evolución clínica considerados todos en su conjunto, la recidiva local y el desarrollo de metástasis ganglionares.

Para ello, convertimos las variables en dicotómicas; así, utilizamos el estadio T2b frente a T2a y T1 en las variables de clasificación del estadiaje alternativo; empleamos T2 y T1 como categorías dentro del TNM de la AJCC; y un espesor mayor de 6 mm y menor de 6 mm en la clasificación basada en el espesor. De forma resumida, aplicando el método de Wald, comprobamos que el estadiaje alternativo de la BWH fue el mejor para predecir eventos de mala evolución clínica considerados de forma global y la recidiva local; mientras que el estadiaje basado en el espesor fue superior para predecir el desarrollo de metástasis, a partir de los datos de nuestra serie. Presentamos a continuación estos resultados con detalle.

a. Predicción de eventos de mala evolución clínica considerados de forma global según la AJCC, el BWH y el espesor con arreglo al trabajo de Brantsch *et al.*

En este estudio, el único intervalo de confianza que no incluyó al 1 fue el del estadiaje alternativo del Brigham and Women's Hospital que, por lo tanto, fue superior para predecir el riesgo de eventos de mala evolución clínica considerados globalmente, a partir de nuestra cohorte (Tabla 38). La capacidad predictiva del modelo se resume en la ecuación $P (EVEN) = 1/1 + e^{2,965-1,797xT-BWH-1,577xESPES*}$. En ella, *EVEN* representa la el desarrollo cualquier evento de mala evolución clínica durante el seguimiento, *T-BWH* se refiere al estadio T2b, según la clasificación alternativa del estadio T del tumor con arreglo al trabajo desarrollado en el *Brigham and Women's Hospital* y *ESPES** representa el espesor tumoral mayor o menor de 6 mm. El modelo tiene una especificidad de 89,3 y una eficacia global de 80,2, con una R de Nagelkerke de 0,298.

VARIABLES EXPLICATIVAS	OR	IC	P
ESPES*	4,838	1,241-18,862	0,023
T-BWH	6,034	1,968-18,502	0,002

Tabla 38: Sistema de estadiaje que mejor explicó el desarrollo de eventos de mala evolución clínica considerados de forma global durante el seguimiento. T-BWH (estadio T según la clasificación del *Brigham and Women's Hospital*). OR (odds ratio), I.C. (intervalo de confianza al 95%).

b. Predicción de la recidiva local según la AJCC, el BWH y el espesor con arreglo al trabajo de Brantsch *et al.*

El estadiaje alternativo del *Brigham and Women's Hospital* fue el que mejor predijo la recurrencia del tumor primario en el CEC a partir del análisis multivariante construido con nuestra cohorte (Tabla 39). La capacidad predictiva del modelo se resume en la ecuación $P(RECLOC) = \frac{1}{1 + e^{2,848 - 2,219xT-BWH}}$, en la que RECLOC representa el desarrollo de recidiva local durante el seguimiento y T-BWH se refiere al estadio T2b según la clasificación alternativa del estadio T del tumor con arreglo al trabajo desarrollado en el *Brigham and Women's Hospital*. El modelo tiene una especificidad del 100 % y una eficacia global del 87,5 %, con una R de Nagelkerke de 0,215.

VARIABLES EXPLICATIVAS	OR	IC	P
T-BWH	9,200	2,448-34,569	0,001

Tabla 39: Sistema de estadiaje que mejor definió el riesgo de recidiva local durante el seguimiento. T-BWH (estadio T según la clasificación del *Brigham and Women's Hospital*). OR (odds ratio), I.C. (intervalo de confianza al 95%).

c. Predicción de las metástasis ganglionares según la AJCC, el BWH y el espesor con arreglo al trabajo de Brantsch *et al.*

El espesor fue el mejor predictor de la progresión ganglionar según nuestro modelo en el análisis multivariante ($P = 0,021$), aunque el intervalo de confianza fue muy amplio (Tabla 40). La predictibilidad del modelo queda definido por la ecuación $P(N+) = \frac{1}{1 + e^{3,714 - 2,461 \times \text{ESPES}^*}}$, donde $N+$ representa el desarrollo de metástasis ganglionares durante el seguimiento y ESPES^* el espesor del tumor mayor de 6 mm (estadio T3 con arreglo al trabajo de Brantsch). La especificidad del modelo es del 100 % y la eficacia global del 86,5 %, con una R de Nagelkerke de 0,172

VARIABLES EXPLICATIVAS	OR	IC	P
ESPES*	11,714	1,456-94,226	0,021

Tabla 40: Sistema de estadiaje que mejor explicó el desarrollo de metástasis ganglionares en el CEC. *ESPES** espesor del tumor mayor de 6 mm (estadio T3 según el trabajo de Brantsch). OR (odds ratio), I.C. (intervalo de confianza al 95%).

d. Predicción de la progresión del estadio TNM según la AJCC, el BWH y el espesor con arreglo al trabajo de Brantsch *et al.*

Las dos variables seleccionadas por el modelo fueron la clasificación TNM de la AJCC y el espesor codificado con arreglo al trabajo de Brantsch *et al.* (Tabla 41). Aunque en los dos casos el intervalo de confianza contiene al 1, la variable que presentó un IC más estrecho y, por lo tanto, una mejor capacidad de predicción de la progresión del estadio tumoral durante el seguimiento, fue el espesor del tumor. Por tanto, ésta fue la variable que mejor predijo en nuestro estudio no sólo la progresión del estadio tumoral, sino también la progresión ganglionar durante el seguimiento. No obstante, únicamente hubo una tendencia sin verdadera significación estadística, lo que puede deberse bien al reducido tamaño de la muestra o bien a la escasa capacidad predictiva de los modelos de estadiaje. Hay que tener en cuenta que aunque el modelo de Wald seleccionó ambas variables, su IC incluye al valor de 1, por eso el valor de P es mayor de 0,05 y por lo tanto los resultados deben ser tomados con

precaución. Siendo puristas, en realidad no tenemos la capacidad de asegurar que un modelo es mejor que el otro para predecir progresión del TNM durante el seguimiento. La probabilidad de progresión del TNM durante el seguimiento queda definida por la fórmula $P(PG.TNM) = 1/1 + e^{4,209 - 1,394 \times ESPES^* - 1,819 \times TAJCC}$, en la que *PG.TNM* representa la progresión del TNM durante el seguimiento, *ESPES** representa el espesor mayor de 6 mm en base a la clasificación desarrollada por Brantsch *et al* y T-AJCC representa el estadio tumoral al diagnóstico según la AJCC. La especificidad del modelo es del 100% y la eficacia global del 85,4%, con una R de Nagelkerke de 0,187.

VARIABLES PREDICTIVAS	OR	IC	P
ESPESOR COD (<6/>6mm)	4,030	0,817-19,87	0,087
T-AJCC	6,164	0,742-51,22	0,092

Tabla 41: *Sistemas de estadiaje que mejor definieron la progresión del estadio TNM durante el seguimiento de los pacientes con CEC. ESPESOR* es el espesor del tumor codificado como menos y más de 6 mm. OR (odds ratio), I.C. (intervalo de confianza al 95%).*

2.5 Evaluación de las variables temporales de la enfermedad a partir de variables clínico-patológicas

Para evaluar la influencia de las variables clínico-patológicas en el tiempo hasta el desarrollo de distintos eventos mala evolución clínica, se construyeron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier.

2.5.1 Variables clínico-patológicas relacionadas con el tiempo hasta el desarrollo de eventos de mala evolución considerados de manera global

a. Inmunosupresión

La **inmunosupresión** se relacionó con el tiempo hasta el desarrollo de cualquier evento de mala evolución clínica en nuestra serie de CECs, ya fueran recidiva local, metástasis ganglionares, metástasis viscerales o muerte por el tumor. Así, el promedio de tiempo hasta el desarrollo de algún evento de mala evolución fue de 3,67 meses en el grupo de pacientes inmunodeprimidos, y de 10,7 meses, en el grupo de pacientes no inmunodeprimidos. Las diferencias fueron estadísticamente significativas, incluso a pesar del escaso número de pacientes inmunodeprimidos de nuestro estudio ($P = 0,047$; log-rank de Mantel-Cox) (Figura 89).

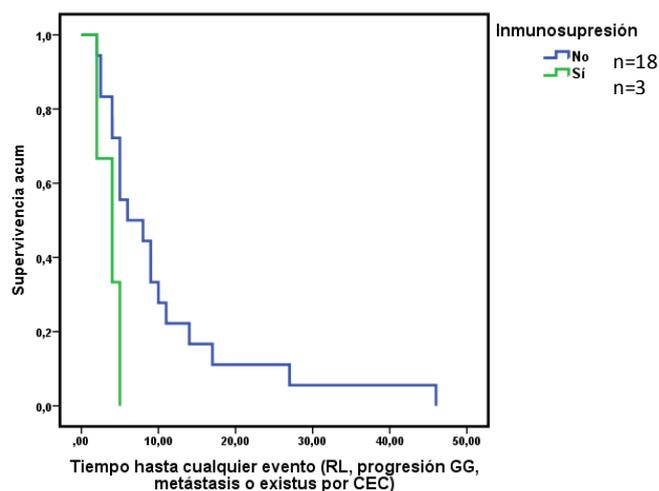


Figura 89: Asociación de la Inmunosupresión con el tiempo hasta el desarrollo de un evento de mala evolución clínica ($P = 0,048$; test log-rank de Mantel-Cox).

b. Velocidad de crecimiento

La velocidad de crecimiento superior a 5 mm al mes se asoció significativamente con un acortamiento del intervalo libre de enfermedad y con una menor latencia hasta el desarrollo de cualquier evento de mala evolución clínica durante el seguimiento ($P = 0,005$) (Figura 90).

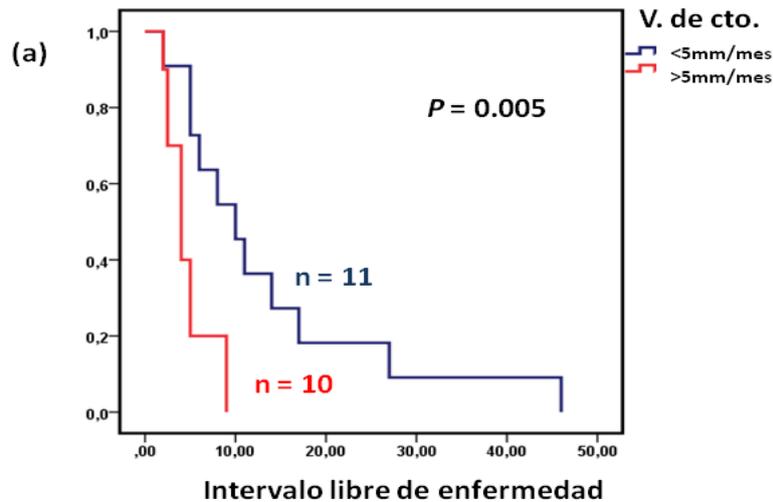


Figura 90: Curva de Kaplan-Meier que muestra las diferencias en el intervalo libre de enfermedad (tiempo hasta el desarrollo de cualquier evento) en función de la velocidad de crecimiento.

2.5.2 Variables clínico-patológicas relacionadas con el tiempo hasta la detección de afectación ganglionar

a. Infiltrado inflamatorio intratumoral

La intensidad del infiltrado inflamatorio intratumoral se relacionó con el tiempo de latencia hasta el desarrollo de metástasis ganglionares. El promedio de tiempo hasta el desarrollo del evento fue de 4,75 meses en el grupo de pacientes con tumores con un infiltrado inflamatorio intratumoral intenso, de 11,66 meses en el grupo con infiltrado inflamatorio intratumoral escaso o moderado y de 22,67 meses en el grupo sin infiltrado inflamatorio intratumoral ($P = 0,039$; log-rank test de Mantel-Cox) (Figura 91). Por tanto, el infiltrado inflamatorio intratumoral intenso se asoció a un tiempo de recaída corto y a un tiempo hasta la detección de metástasis ganglionares también corto. Cuando categorizamos la variable en dicotómica: no intenso (nulo-escaso-moderado) frente a intenso; y comparamos la latencia hasta el desarrollo de metástasis ganglionares, vimos que la mediana de tiempo hasta el desarrollo de metástasis ganglionares en el grupo con infiltrado inflamatorio intratumoral intenso fue menor de 5 meses, mientras que en el grupo con infiltrado inflamatorio intratumoral no intenso fue mayor de 10 meses ($P = 0,018$) (Figura 91). Es, no obstante, difícil sacar conclusiones fiables a partir de estos tamaños muestrales pequeños, lo que haría deseable poder validar estos resultados con una muestra de pacientes más amplia.

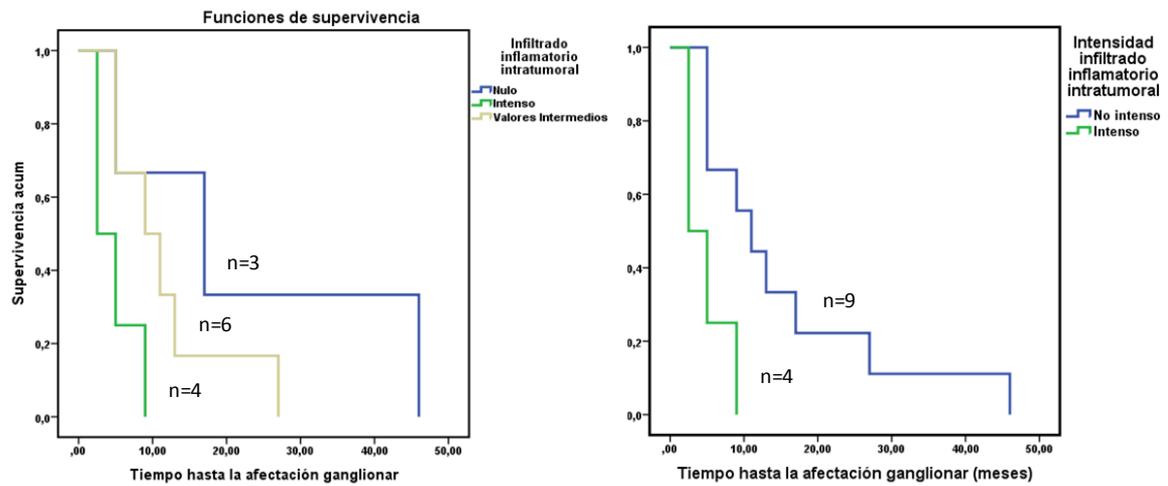


Figura 91: Asociación entre el infiltrado inflamatorio intratumoral y el tiempo hasta la afectación ganglionar (meses). (a) –izquierda- Para tres grados diferentes de infiltrado inflamatorio intratumoral ($P = 0,039$; log-rank test de Mantel-Cox); (b) –derecha- Para infiltrado inflamatorio intenso versus no intenso ($P = 0,018$; log-rank test de Mantel-Cox).

b. Velocidad de crecimiento

Evaluamos las diferencias en el intervalo libre de enfermedad en función de la velocidad de crecimiento mediante curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. La velocidad de crecimiento tumoral se asoció a un acortamiento de la latencia hasta la progresión ganglionar ($P = 0,004$). Así, los tumores con menos de 5 mm/mes de velocidad de crecimiento tuvieron una latencia hasta las metástasis ganglionares significativamente más larga que aquellos con más de 5 mm/mes. Sin embargo, el número pequeño de pacientes muertos por CEC en nuestra cohorte ($n = 5$), hace poco útil y poco fiable la evaluación de la latencia hasta la muerte (Figura 92).

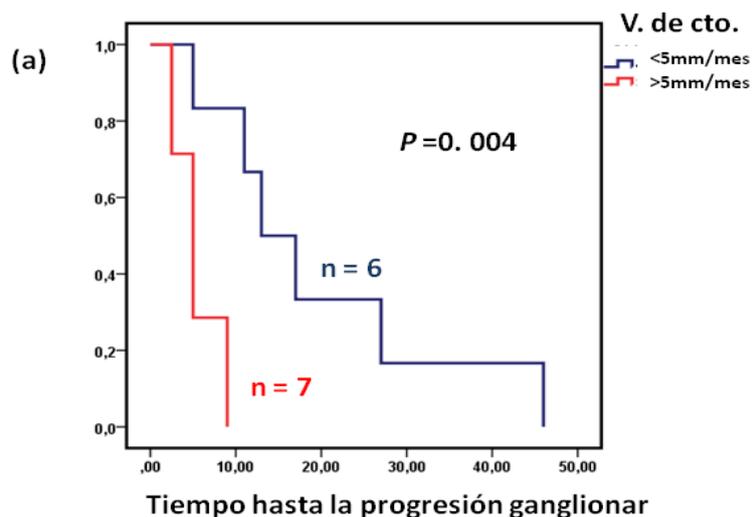


Figura 92: Curva de Kaplan-Meier que muestra las diferencias en la latencia hasta el desarrollo de metástasis ganglionares en función de la velocidad de crecimiento.

2.6 Resumen de las asociaciones más relevantes entre las variables clínico-patológicas y el tiempo hasta el desarrollo de eventos

Durante el apartado anterior hemos evaluado las variables clínico-patológicas relacionadas con un acortamiento de la latencia hasta el desarrollo de eventos de mala evolución considerados de manera global y hasta el desarrollo de progresión ganglionar. A continuación, a modo de resumen figuran las asociaciones estadísticamente más relevantes, que serían empleadas, junto con otras variables clínico-patológicas, para elaborar un modelo multivariante de regresión de Cox cuyos resultados se explican en el siguiente apartado (Tabla 42).

Variable	Evento	P
INMUNOS	LAT RECLOC	0,044
IIIT	LAT EVEN	0,008
INMUNOS	LAT EVEN	0,047
IIIT	LAT N+	0,039
V.CTO	LAT N+	0,029

Tabla 42: Resumen de resultados estadísticamente significativos de variables relacionadas con el tiempo de latencia hasta un evento de mala evolución clínica. INMUNOS (inmunosupresión), IIIT (infiltrado inflamatorio intratumoral), V.CTO (velocidad de crecimiento), LAT (latencia, tiempo hasta el desarrollo del evento), RECLOC (recidiva local), EVEN (eventos de mala evolución clínica considerados globalmente), N+ (desarrollo de metástasis ganglionares durante el seguimiento).

2.7 Evaluación de la influencia de variables clínico-patológicas sobre la latencia hasta el desarrollo de eventos de mala evolución clínica

Finalmente, realizamos un análisis multivariante de regresión de Cox para identificar la independencia de las variables implicadas en el intervalo libre de enfermedad y en el tiempo hasta la progresión ganglionar. Realizamos la regresión de Cox considerando como variables predictoras la velocidad de crecimiento y otras características clínicas e histopatológicas (estado inmunitario, tamaño del tumor, espesor tumoral, localización, grado de diferenciación, desmoplasia, patrón de crecimiento e infiltración perineural). La velocidad de crecimiento fue la única variable capaz de predecir el intervalo libre de enfermedad ($P = 0,013$) y de latencia hasta la aparición de metástasis ganglionares ($P = 0,033$) (Tabla 43).

VAR OBJETIVO	VARIABLE PREDICTIVA	OR	IC 95%	P
ILE	V.CTO	4,022	1,343-12,52	0,013
N+	V.CTO	9,843	1,186-81,681	0,033

Tabla 43: Variables asociadas de manera independiente a la reducción del tiempo hasta la progresión ganglionar (regresión de Cox). ILE (intervalo libre de enfermedad, tiempo hasta el desarrollo de cualquier evento de mala evolución clínica durante el seguimiento), N+ (desarrollo de metástasis ganglionares durante el seguimiento), V.CTO (velocidad de crecimiento).

3 RELACIÓN ENTRE VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS DEL CEC Y DIFERENTES MARCADORES MOLECULARES RELACIONADOS CON LA DIFERENCIACIÓN CUTÁNEA Y/O CON LA ONCOGÉNESIS

En nuestra serie, se evaluaron además de las características clínico-patológicas de los tumores, la expresión diferencial de distintos marcadores moleculares que se han implicado en la carcinogénesis del CEC. En primer lugar, analizamos las relaciones entre las diferentes variables moleculares y a continuación evaluamos la relación de dichas variables con las características clínico-patológicas de los tumores.

3.1 Relación entre diferentes marcadores moleculares en el CEC

A continuación se muestran los resultados de las asociaciones observadas entre la expresión de las distintas proteínas analizadas en nuestra cohorte de tumores.

3.1.1 La expresión de E-CADHERINA se relacionó con la expresión de VIMENTINA, P63, CD44 y CXCR4

La expresión media de E-CADHERINA fue más frecuente en los tumores que no expresaron VIMENTINA ($P = 0,002$), en aquéllos que no expresaron P63 ($P = 0,006$), en los que no expresaron CD44 ($P = 0,012$) y en aquellos tumores que no expresaron CXCR4 ($P = 0,011$). Más detalles de estos resultados se recogen en la Tabla 44. Algunas asociaciones relevantes entre la E-CADHERINA y otras proteínas analizadas se recogen en la Figura 93.

		E-CADHERINA		
		Expresión	No expresión	<i>P</i>
VIMENTINA	Expresión	3	6	0,005
	No expresión	67	16	
P63	Expresión	48	17	0,003
	No expresión	23	0	
CD44	Expresión	43	7	0,012
	No expresión	28	16	
CXCR4	Intenso	17	3	0,036
	No intenso	66	1	

Tabla 44: Relaciones entre la expresión de E-CADHERINA y otros marcadores moleculares en el CEC.

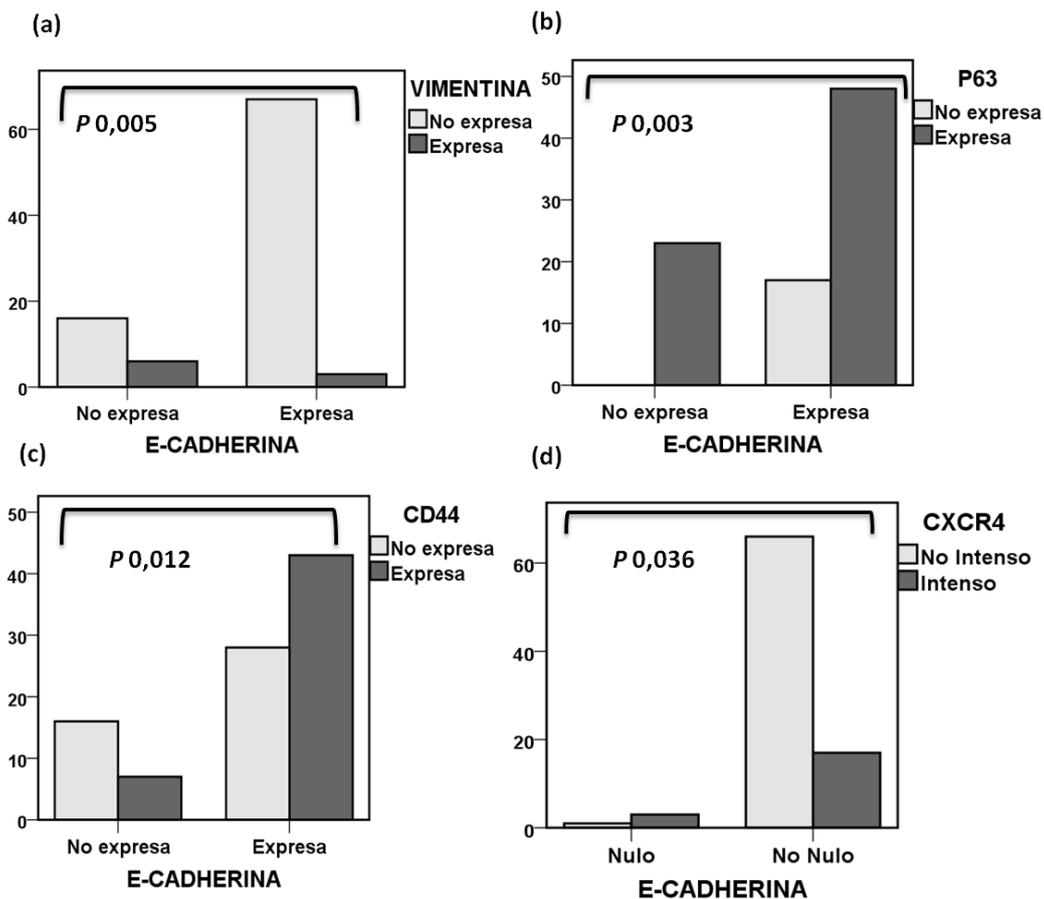


Figura 93: Asociaciones entre la expresión de E-CADHERINA y otras proteínas estudiadas en nuestra cohorte de CEC. (a) VIMENTINA, (b) P63, (c) CD44, (d) CXCR4.

3.1.2 La expresión de VIMENTINA se relacionó con la expresión de E-CADHERINA, P63 y CXCR4

La VIMENTINA es un filamento intermedio presente en el citoesqueleto de las células mesenquimales. La expresión media de VIMENTINA fue más frecuente en los tumores que no expresaron E-CADHERINA ($P = 0,002$)-, como hemos indicado más arriba, también en los tumores que expresaron intensamente CXCR4 ($P = 0,00001$) y en los tumores que expresaron P63 ($P = 0,038$) (Tabla 45). En la Figura 94 se representan gráficos de barras relevantes de la VIMENTINA y otras variables proteicas.

VIMENTINA				
		Expresión	No expresión	P
E-CADHERINA	Expresión	3	67	0,005
	No expresión	6	16	
P63	Expresión	21	48	0,038
	No expresión	1	16	
CXCR4	Intenso	6	14	0,001
	No intenso	3	63	

Tabla 45: Relaciones entre la expresión de VIMENTINA y la de otros marcadores en el CEC.

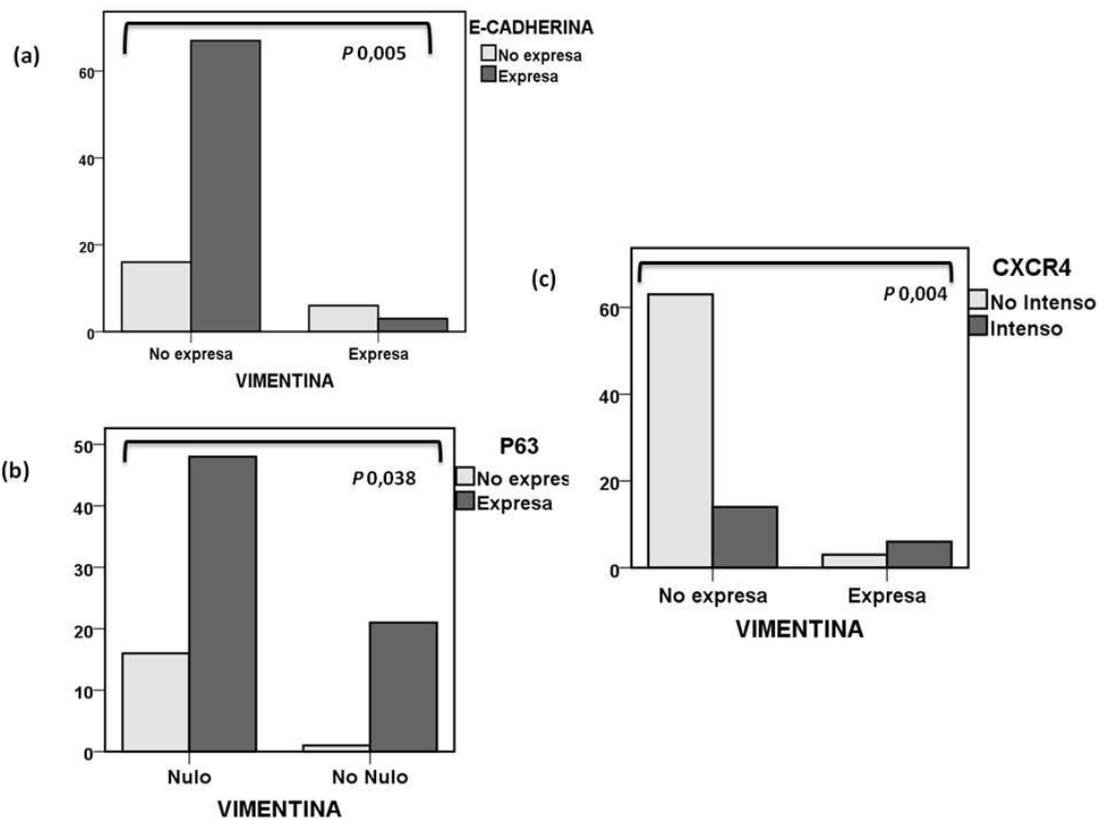


Figura 94: Representación gráfica de algunas asociaciones entre la expresión de VIMENTINA y otras proteínas. (a) E-CADHERINA, (b) P63, (c) CXCR4.

3.1.3 La expresión de P63 se relacionó con la expresión de E-CADHERINA, VIMENTINA y KI-67

P63 es un factor de transcripción relacionado, entre otros fenómenos, con la diferenciación epitelial y es marcador en la piel de fenotipo de célula *stem*. Los marcadores con cuya expresión se relacionó P63 en nuestro estudio figuran detalladamente en la Tabla 46. Brevemente, la expresión de P63 fue más frecuente en los tumores que no expresaron E-CADHERINA ($P = 0,006$) y en aquéllos que expresaron VIMENTINA ($P = 0,038$). Por otra parte, la expresión de P63 se relacionó con el índice proliferativo, de modo que éste último fue más elevado en los tumores que expresaron globalmente P63 y más bajo en los que no lo expresaron ($P = 0,015$) (Figura 95).

		P63		
		Expresión	No expresión	<i>P</i>
E-CADHERINA	Expresión	48	17	0,003
	No expresión	23	0	
VIMENTINA	Expresión	21	1	0,038
	No expresión	48	16	
Ki-67	Me/RI	17 (23,54)	10 (10)	0,015

Tabla 46: Relaciones entre la expresión de P63 y otros marcadores en el CEC. Me (mediana), RI (rango intercuartílico).

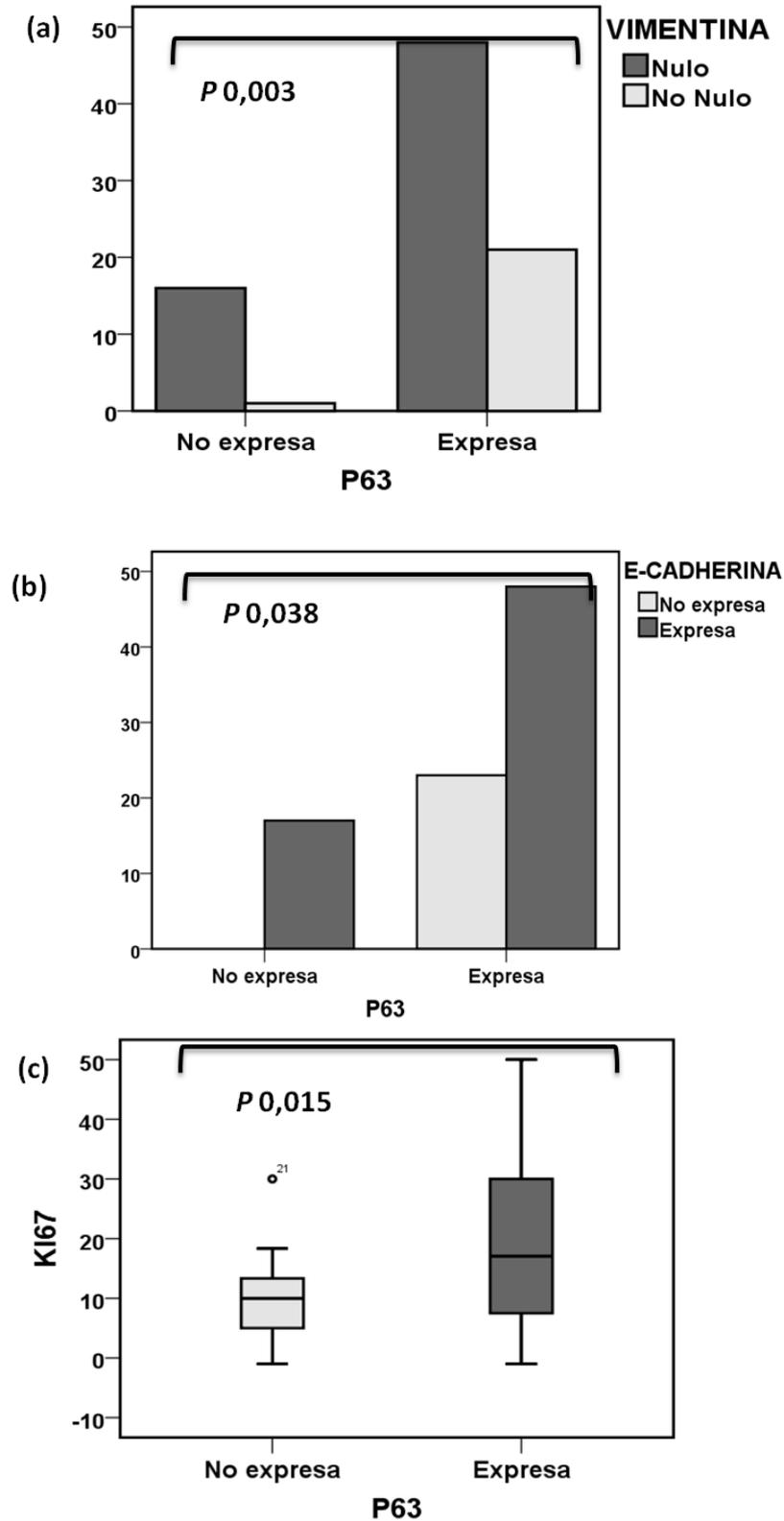


Figura 95: Algunas asociaciones entre la P63 y otras proteínas estudiadas en este trabajo . La expresión de P63 se relacionó con los niveles de: (a) E-CADHERINA, (b) VIMENTINA y (c) KI-67.

3.1.4 La expresión de CD44 se relacionó con la expresión de E-CADHERINA, AE1 y EGFR

CD44 es una glucoproteína de adhesión marcadora del fenotipo *stem* en diversos epitelios, entre ellos en la piel (Chikamatsu *et al.*, 2010). En nuestro estudio, la expresión de CD44 se relacionó con la de una serie de proteínas que figuran detalladamente en la Tabla 47. Así, la expresión de CD44 fue más frecuente en los tumores que conservaron la expresión de E-CADHERINA ($P = 0,012$); y se asoció a la expresión de AE-1, de manera que cuando AE-1 se expresó tendió también a hacerlo CD44 y, análogamente, cuando AE-1 no se expresó tendió a no hacerlo CD44 ($P = 0,006$). Además, la expresión de CD44 fue más frecuente en los tumores que expresaron intensamente EGFR ($P = 0,043$), aunque no se relacionó con la expresión de ninguno de los demás marcadores evaluados (ver Figura 96).

		CD44		
		Expresión	No expresión	<i>P</i>
E-CADHERINA	Expresión	43	28	0,012
	No expresión	7	16	
EGFR	Intenso	22	11	0,043
	No Intenso	28	33	
AE-1	Expresión	43	25	0,006
	No expresión	7	16	

Tabla 47: Relaciones entre la expresión de CD44 y la de otras proteínas.

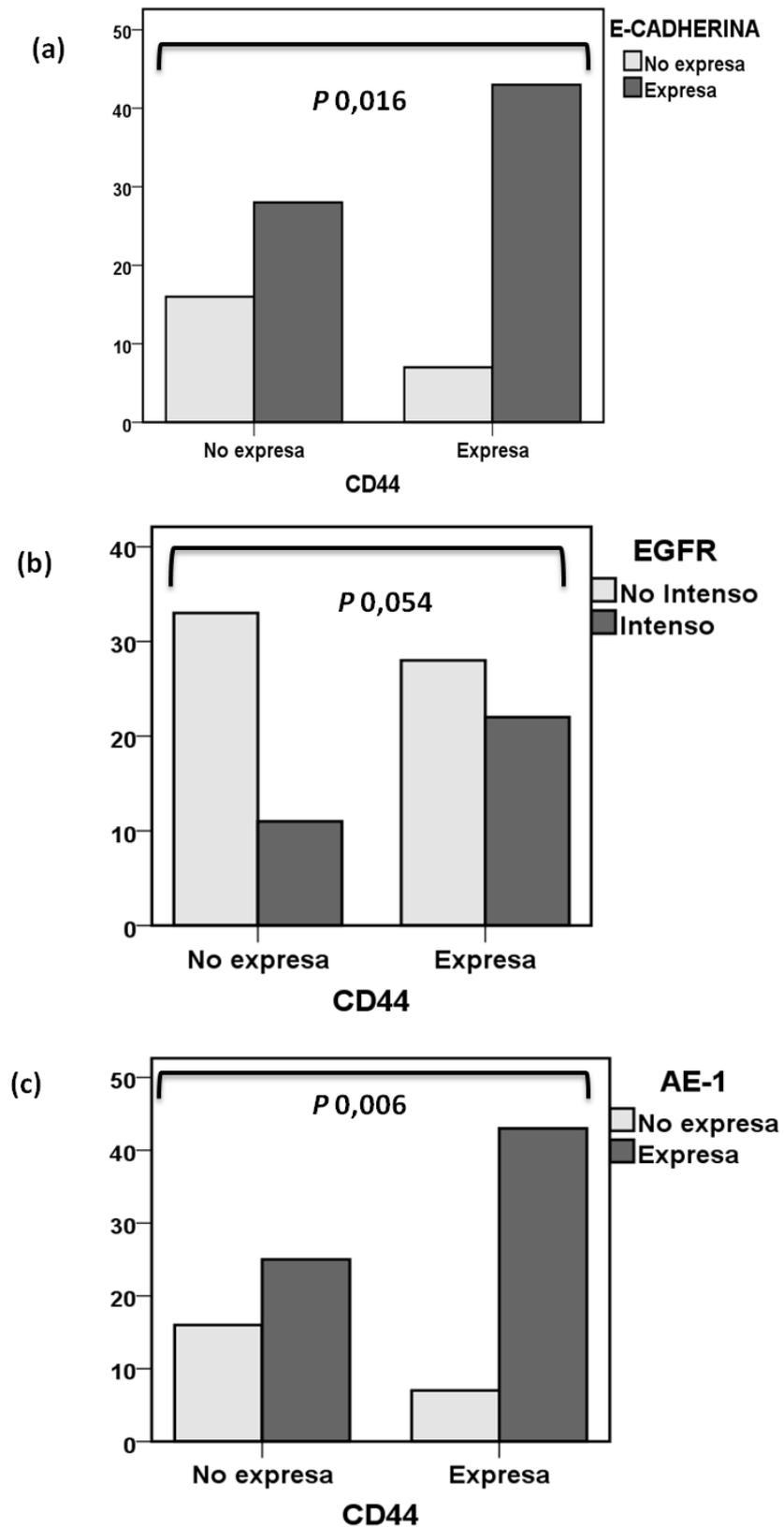


Figura 96: Asociaciones entre la expresión de CD44 y otras proteínas estudiadas en nuestra cohorte de CEC. La expresión de CD44 se relacionó con los niveles de expresión de (a) E-CADHERINA, (b) EGFR y (c) AE-1.

3.1.5 La expresión de CXCR4 se relacionó con la expresión de E-CADHERINA, VIMENTINA y AE-1

La expresión de CXCR4 se relacionó con una serie de marcadores que figuran detalladamente en la Tabla 48. La expresión de CXCR4 fue más frecuente en los tumores que no expresaron E-CADHERINA ($P = 0,011$) y en aquéllos que expresaron VIMENTINA ($P = 0,001$). Además, se asoció con la expresión de AE-1 ($P = 0,002$) y, sin alcanzar la significación estadística, con la expresión de P63 ($P = 0,075$) y la expresión intensa de EGFR ($P = 0,054$).

		CXCR4		
		Intenso	No intenso	<i>P</i>
E-CADHERINA	Expresión	17	66	0,036
	No expresión	3	1	
VIMENTINA	Expresión	6	3	0,001
	No expresión	14	63	
AE-1	Expresión	19	46	0,02
	No expresión	1	19	
P63	Expresión	16	48	0,075
	No expresión	1	16	

Tabla 48: Relación entre los niveles de expresión de CXCR4 y los de otras proteínas.

3.1.6 La expresión de EGFR se relacionó con la expresión de CD44, AE1, CXCR4 y Ki-67

a. Evaluación inmunohistoquímica de EGFR

La expresión de EGFR se relacionó con la de una serie de proteínas que se indican de manera detallada en la Tabla 49 (ver Figura 97). Así, la expresión intensa de EGFR en el CEC se relacionó con la expresión de CD44 ($P = 0,043$), con la expresión de AE-1 ($P = 0,029$) y fue más frecuente en los tumores que exhibieron expresión intensa de CXCR4, aunque sin alcanzar la

significación estadística ($P = 0,059$). La expresión intensa de EGFR se relacionó también con el índice proliferativo, medido mediante marcaje con anticuerpos frente a Ki-67, y fue más frecuente en los tumores con índices proliferativos más altos ($P = 0,021$).

EGFR				
		Intenso	No intenso	<i>P</i>
CD44	Expresión	22	28	0,043
	No expresión	11	33	
CXCR4	Intenso	11	9	0,054
	No Intenso	21	46	
AE-1	Expresión	29	39	0,029
	No expresión	4	19	
Ki-67	(Me/RI)	22,5 (28,34)	12,91 (17,09)	0,025

Tabla 49: Relación entre la expresión de EGFR y la de otras proteínas. Me (mediana), RI (rango intercuartílico).

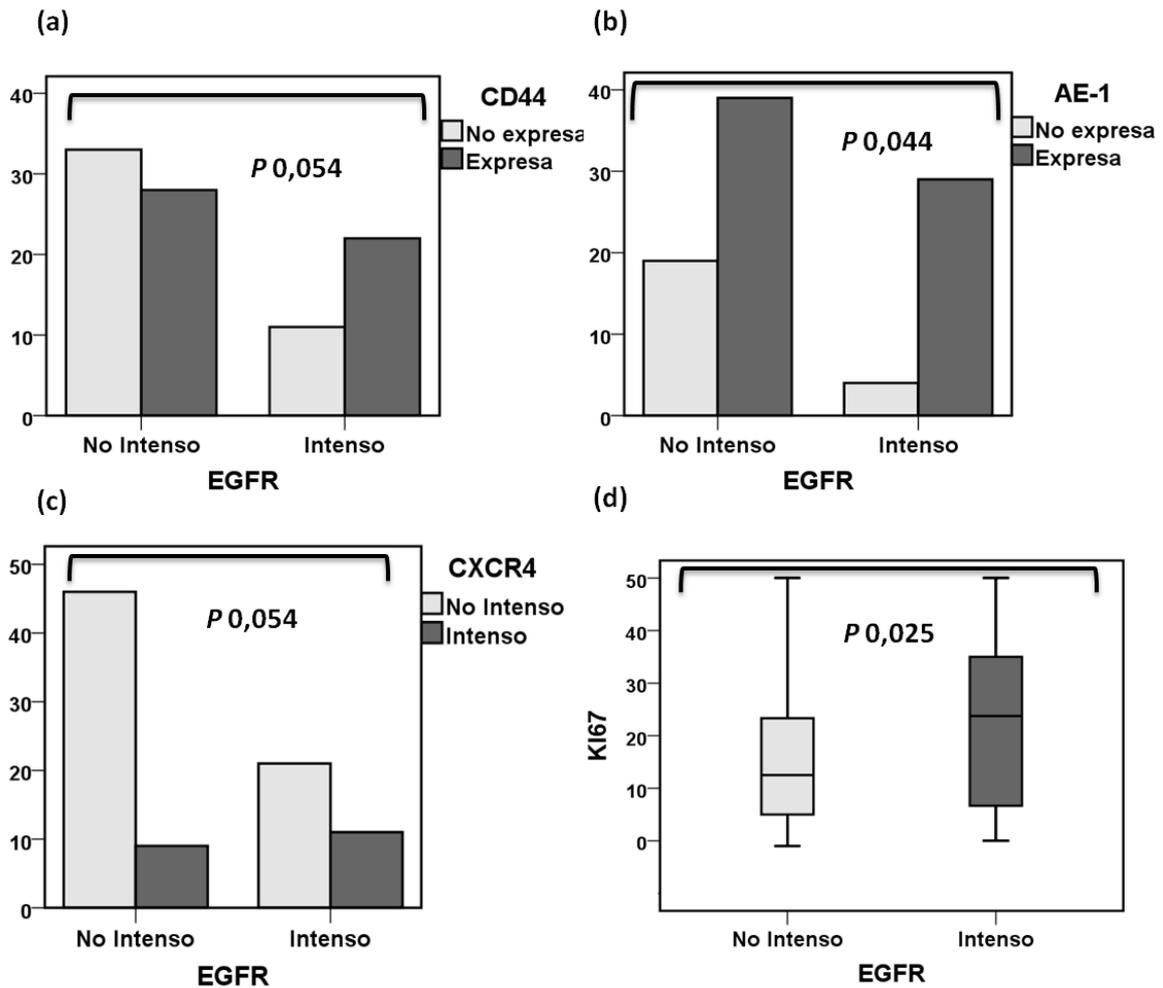


Figura 97: Asociaciones entre la expresión de EGFR y la de otras proteínas estudiadas en nuestra cohorte de CEC. La expresión de EGFR se relacionó los niveles de expresión de (a) CD44, (b) AE-1, (c) CXCR4 y (d) Ki-67).

b. Relación entre la expresión de EGFR medida por inmunohistoquímica y la detección de alteraciones genómicas mediante FISH

Se comparó la expresión media de EGFR y la existencia de aberraciones cromosómicas detectadas mediante FISH en nuestra serie de CEC. Se comprobó que la expresión intensa de EGFR fue más frecuente en los tumores que presentaron alteraciones cromosómicas (amplificaciones y múltiples polisomías), que en los que no presentaron cambios genómicos detectables ($P = 0,028$) (Figuras 98,99).

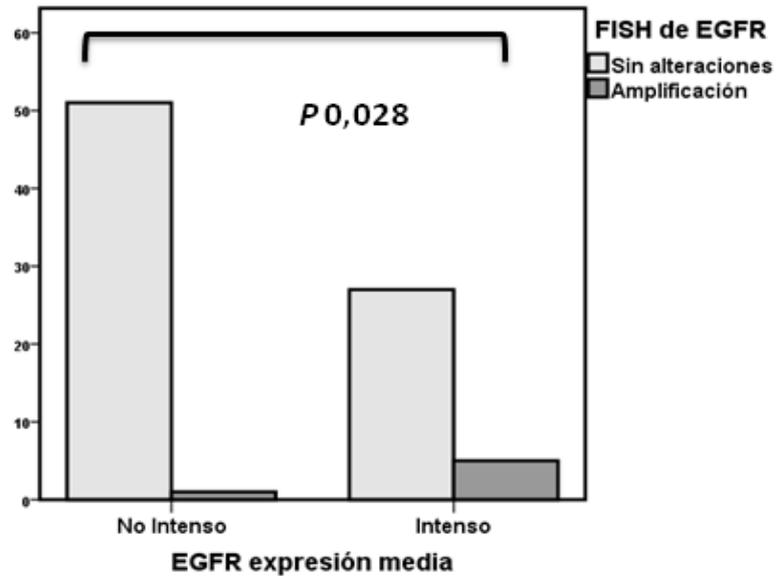


Figura 98: La intensidad de la expresión de EGFR se relacionó con los hallazgos encontrados por FISH ($P = 0,028$, test exacto de Fisher).

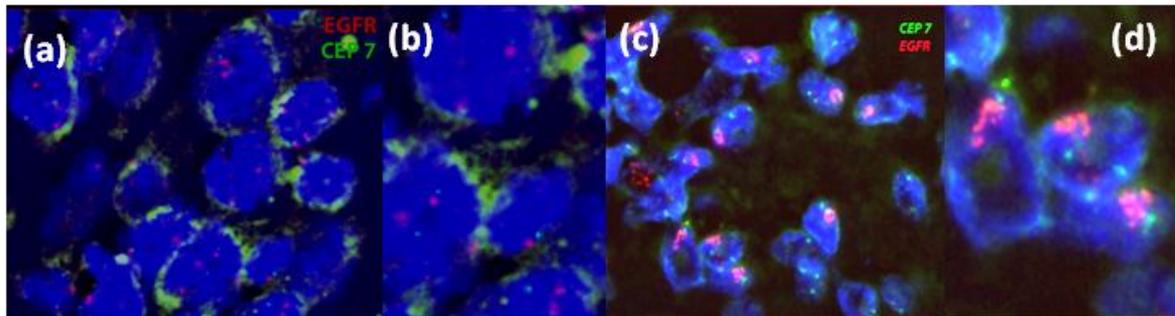


Figura 99: Imagen FISH para EGFR en CEC. (a) Tumor sin cambios genómicos, (b) tumor sin cambios fenómenos a mayor detalle, (c) tumor con amplificación de EGFR, (d) tumor con amplificación de EGFR a mayor detalle.

3.1.7 La expresión de D2-40 se relacionó con la expresión de VIMENTINA y CXCR4

La expresión de D2-40 se relacionó con la expresión de otros marcadores que figuran en la Tabla 50. Así, la expresión de D2-40 se relacionó con la expresión de VIMENTINA ($P = 0,016$) y tuvo tendencia a asociarse con la expresión intensa de CXCR4 ($P = 0,077$), aunque no se relacionó con ninguno de los demás marcadores evaluados.

D2-40				
		Nulo	No nulo	P
VIMENTINA	Expresión	2	7	0,016
	No expresión	53	30	
CXCR4	Intenso	17	3	0,077
	No intenso	65	2	

Tabla 50: Relación entre la expresión de D2-40 y otras proteínas en el CEC.

3.1.8 La expresión de AE1 se relacionó con la expresión de CXCR4, EGFR, E-CADHERINA, VIMENTINA y CD44

Como hemos indicado previamente, AE1 es un cóctel de anticuerpos frente a citoqueratinas (CKs) epidérmicas que, en concreto, marca las CKs ácidas de peso molecular bajo (de 10, 14, 15 y 16 KD) y la CK19 de peso molecular intermedio. Dentro de las CKs detectadas por AE1, entran CKs que inhiben la proliferación, otras que la incrementan, alguna con funciones relacionadas con la carcinogénesis, etc (ver introducción para más detalle).

En nuestro caso, la detección de CKs por AE-1 fue más frecuente en los tumores con expresión intensa de CXCR4 ($P = 0,025$), lo que se mantuvo al considerar individualmente las zonas diferenciada e indiferenciada de los tumores; también fue más intensa en aquellos tumores con expresión intensa de EGFR ($P = 0,024$), y en los que conservaron la expresión de E-CADHERINA ($P = 0,007$) y CD44 ($P = 0,006$).

3.1.9 La expresión de KI67 se relacionó con la expresión de VIMENTINA, EGFR y P63

El índice proliferativo en el CEC (medido mediante marcaje frente a KI-67) se relacionó con la expresión intensa de EGFR ($P = 0,025$), la de P63 ($P = 0,015$) y la de VIMENTINA ($P = 0,011$); de modo que la proliferación fue más elevada en los tumores con expresión intensa de EGFR y en aquellos que expresaron P63 y VIMENTINA (Figura 100).

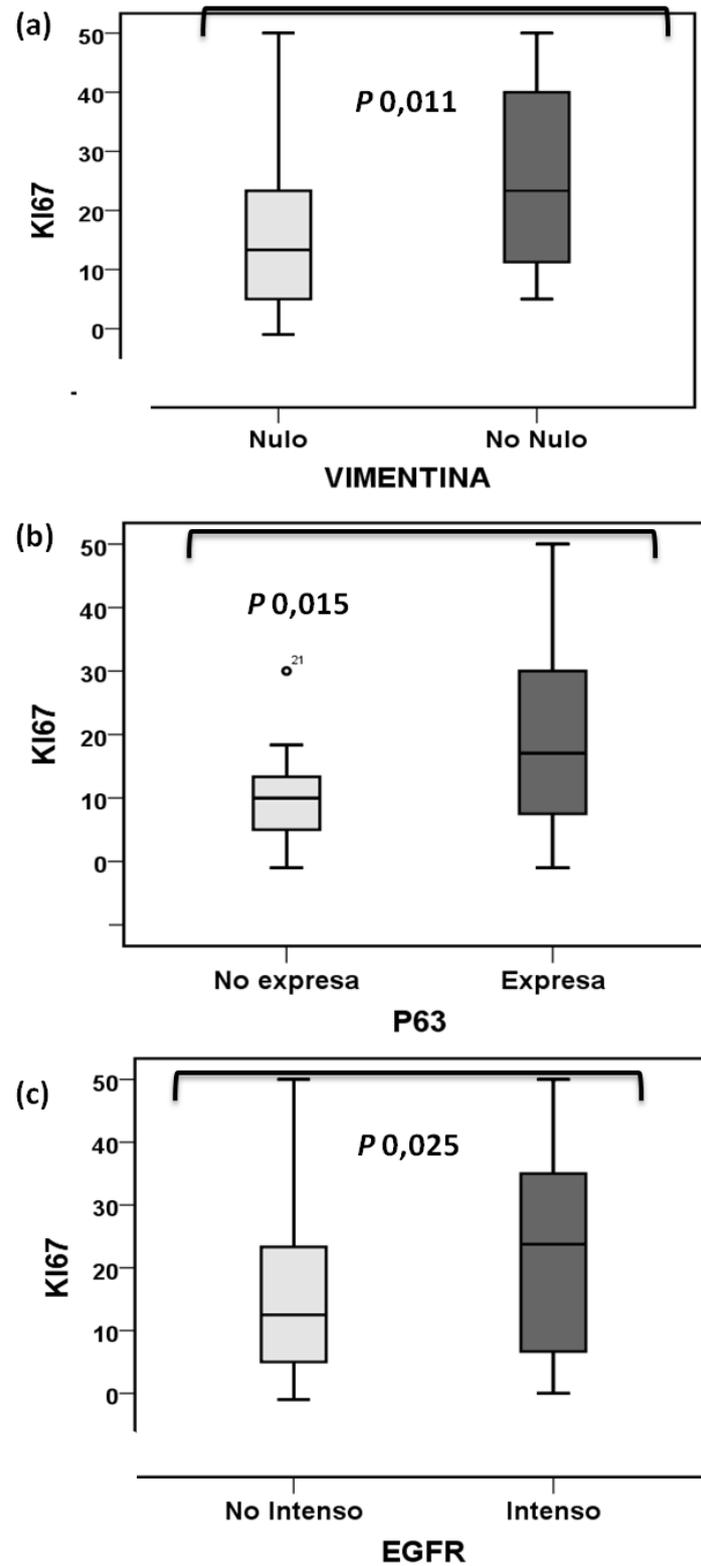


Figura 100: Representación de la relación entre los niveles de expresión de KI-67 y la expresión de otras proteínas en el CEC: (a) EGFR, (b) P63 y (c) VIMENTINA.

3.2 Expresión diferencial de los marcadores moleculares de naturaleza proteica analizados en las zonas diferenciada e indiferenciada de los tumores

En nuestro estudio, analizamos la expresión media de los diferentes marcadores moleculares en nuestra cohorte de CECs, y estudiamos su expresión en las zonas diferenciadas e indiferenciadas del tumor. Aunque existieron algunos tumores en los que predominó un grado de diferenciación bueno y otros en los que, en cambio, predominó un grado de diferenciación pobre (es decir, con más del 75% de las células tumorales con rasgos de buena o mala diferenciación, respectivamente), algunos tumores exhibieron una heterogeneidad más marcada. En este grupo de tumores, que clasificamos como **moderadamente diferenciados**, observamos zonas con una celularidad y unos rasgos histopatológicos más o menos intermedios entre los encontrados en las zonas más diferenciadas y las pobremente diferenciadas.

Evaluamos las diferencias de expresión de los diferentes marcadores estudiados en las distintas partes de los tumores, para lo que seleccionamos cilindros de tejido de las diferentes zonas, y que fueron incluidos en un *tissue array*. Estos tumores presentaron, por tanto, una zona diferenciada (ZD) y una zona indiferenciada (ZI).

Antes de ello, evaluamos la expresión de las diferentes moléculas teniendo en cuenta no sólo el tumor globalmente, sino también las diferentes áreas de los mismos. Así, se comparó la expresión de los diferentes marcadores entre las áreas diferenciadas e indiferenciadas de los tumores (cuando estos tenían un grado de diferenciación moderado y, por lo tanto, una representación destacada de cada una de ellas). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 51. En resumen, se demostraron diferencias significativas para todos los marcadores, salvo para el caso de P63 y CD44. Estas dos últimas moléculas están relacionadas con el fenotipo de célula *stem* en el epitelio de la piel (Chikamatsu *et al.*, 2010; Dotto and Glusac, 2006). El hecho de encontrar diferencias importantes entre los niveles de expresión de las distintas proteínas analizadas entre las zonas diferenciadas e indiferenciadas, justificó el haber analizado, por un lado, (i) la relación del nivel medio de expresión de esas moléculas con las distintas variables clínico-patológicas y moleculares, y, por otro, (ii) la relación entre la expresión de esos marcadores, específicamente en las zonas diferenciadas e indiferenciadas de los tumores, con las características clínico-patológicas, cuando fue posible.

		ZONA INDIFERENCIADA			
ZONA DIFERENCIADA	E-CADHERINA		E-CADHERINA		<i>p</i>
			No expresa	Expresa	0,00001
		No expresa	8	1	
		Expresa	10	16	
	VIMENTINA		VIMENTINA		0,006
			Nulo	No nulo	
		Nulo	25	7	
		No nulo	0	4	
	CXCR4		CXCR4		0,0001
			No Intenso	Intenso	
		No intenso	24	2	
		Intenso	0	5	
	EGFR		EGFR		0,00001
			No intenso	Intenso	
		No intenso	15	1	
		Intenso	4	12	
	P16		P16		0,000012
			No expresa	Expresa	
		No expresa	25	1	
		Expresa	1	7	
	P53		P53		0,002
			No expresa	Expresa	
		No expresa	10	7	
		Expresa	1	14	
	D2-40		D2-40		0,0000
			Nulo	No nulo	
		Nulo	19	4	
		No nulo	2	10	
AE-1		AE-1		0,002	
		No expresa	Expresa		
	No expresa	8	0		
	Expresa	7	15		

Tabla 51: Diferencias en la expresión de los diferentes marcadores proteicos entre las zonas diferenciada e indiferenciada de los tumores.

3.3 Resumen de las asociaciones observadas entre las proteínas analizadas en el CEC

En el apartado anterior de los resultados hemos evaluado las distintas asociaciones entre las proteínas analizadas en este trabajo. A modo de resumen, en la Tabla 52 se representan las más importantes y en la imagen de Cytoscape (Figura 101), se representan gráficamente las relaciones entre las distintas variables moleculares analizadas en dicho apartado. En el siguiente apartado, evaluaremos las asociaciones entre las diferentes proteínas aquí analizadas y las variables clínico-patológicas estudiadas.

VAR1	VAR2	P
AE-1	CD44	0,006
AE-1	E-CADHERINA	0,007
AE-1	CXCR4	0,02
D2-40	VIMENTINA	0,016
D2-40	CXCR4	0,077
E-CADHERINA	P63	0,003
E-CADHERINA	VIMENTINA	0,005
E-CADHERINA	CD44	0,012
E-CADHERINA	CXCR4	0,036
EGFR	Ki-67	0,025
EGFR	AE-1	0,029
EGFR	CD44	0,043
EGFR	CXCR4	0,054
P63	Ki-67	0,015
P63	CXCR4	0,075
VIMENTINA	CXCR4	0,001
VIMENTINA	Ki-67	0,011
VIMENTINA	P63	0,038

Tabla 52: Resumen de resultados estadísticamente significativos (rojo) y de asociaciones sólo con tendencia estadística (azul) en las comparaciones de la expresión de diferentes proteínas en nuestra serie de CEC. VAR1 (variable 1), VAR2 (variable 2), AE-1 (expresión de AE-1), CD44 (expresión de CD44), CXCR4 (expresión intensa de CXCR4), D2-40 (expresión de D2-40), E-CADHERINA (expresión de E-CADHERINA), EGFR (expresión intensa de EGFR), Ki-67 (alto índice proliferativo), P63 (expresión intensa de P63), VIMENTINA (expresión de VIMENTINA),

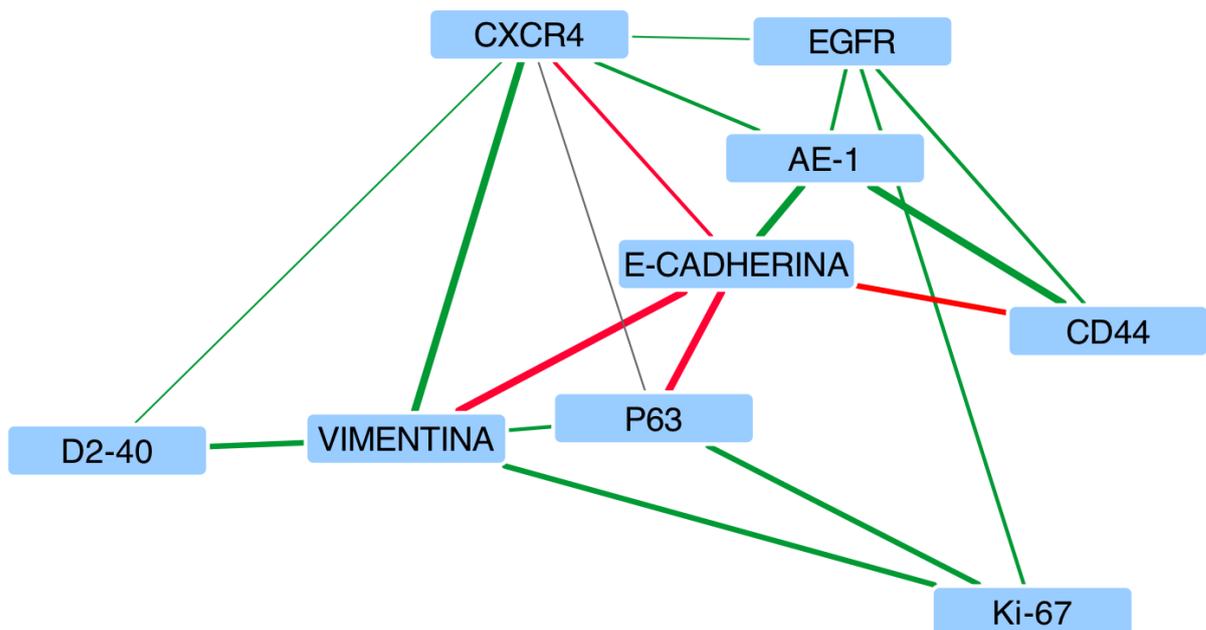


Figura 101: Red que muestra las asociaciones entre la expresión de las proteínas evaluadas: Imagen obtenida mediante Cytoscape®. Cada nodo muestra una variable clínico-patológica, cada línea indica la asociación entre las variables, cuyo grosor es inversamente proporcional al valor de P. El color azul celeste representa las proteínas. El color rojo de las líneas indica una asociación negativa, el color verde de las líneas indica una asociación positiva, el color azul oscuro indica distintos sistemas de estadiaje en el CEC. P63 (expresión intensa de P63), CD44 (expresión de CD44), CXCR4 (expresión intensa de CXCR4), E-CADHERINA (expresión de E-CADHERINA), AE-1 (expresión de AE-1), VIMENTINA (expresión de VIMENTINA), EGFR (expresión intensa de EGFR), D2-40 (expresión de D2-40), Ki-67 (alto índice proliferativo).

3.4 Marcadores proteicos cuya expresión se relacionó con variables clínico-patológicos del CEC

La expresión de los marcadores proteicos estudiados y su relación con las variables clínico-patológicas del CEC figuran detalladamente en la Tabla 53 (ver también Figuras 102-103). En concreto, y con respecto **al grado de diferenciación**, E-CADHERINA se expresó más frecuentemente en tumores bien diferenciados ($P = 0,023$), mientras que las expresiones de VIMENTINA ($P = 0,030$) y de CXCR4 ($P = 0,048$) lo hicieron más en los tumores pobremente diferenciados. Los parámetros que se asociaron más fuertemente con el grado de diferenciación pobre fueron la expresión de P63 ($P = 0,00001$) y el patrón aberrante de expresión de EGFR ($P = 0,012$).

En cuanto al **patrón de crecimiento**, la expresión de CD44 tendió a ser más frecuente en los tumores con patrón de crecimiento expansivo ($P = 0,061$); y el patrón aberrante de expresión de EGFR lo fue en la zona indiferenciada de los tumores con patrón de crecimiento infiltrativo ($P = 0,025$).

La expresión de D2-40 fue más frecuente en los tumores que presentaron un **estroma desmoplásico** ($P = 0,035$) y en aquellos que exhibieron **ulceración** en el epitelio ($P = 0,035$). La **infiltración perineural** se relacionó intensamente con la expresión de E-CADHERINA en las zonas indiferenciadas ($P = 0,000005$), pero no en las zonas diferenciadas, ni globalmente; así como con la expresión CD44 también en las zonas indiferenciadas ($P = 0,059$) y con la expresión global de CXCR4 ($P = 0,017$). Fue también más frecuente en los tumores que exhibieron una expresión intensa de EGFR en la zona diferenciada ($P = 0,006$).

La **infiltración linfovascular** fue más frecuente en los tumores que expresaron VIMENTINA ($P = 0,001$) y en los que expresaron CXCR4 ($P = 0,006$). El índice proliferativo tumoral, determinado por marcaje frente a KI-67, se asoció con el **infiltrado inflamatorio peritumoral**.

El marcaje frente a KI-67 se relacionó con la **velocidad de crecimiento** de los tumores ($P = 0,031$), de manera que fue mayor en los tumores de crecimiento más rápido (> 5 mm / mes) y más baja en los de crecimiento lento (< 5 mm / mes). Estos resultados fueron coherentes con el hecho de que los tumores que crecieron más rápidamente tuvieron un índice proliferativo más alto.

Grado de diferenciación					
		Bueno	Moderado	Pobre	
E-CADHERINA	Expresión	27	30	14	0,023
	No expresión	2	16	5	
VIMENTINA	Expresión (>10%)	3	12	8	0,03
	No expresión	26	34	10	
P63	Expresión	14	40	18	0,00001
	No expresión	13	5	1	
CXCR4	Intenso	4	*	7	0,048
	No intenso	25	*	11	
Patrón aberrante de EGFR	Sí	9	31	10	0,012
	No	20	16	9	
Patrón de crecimiento					
		Expansivo	Infiltrativo	Mixto	
CD44	Expresión	18	10	22	0,061
	No expresión	7	9	29	
Patrón aberrante de EGFR ZI	Sí	5	4	24	0,025
	No	20	27	15	
Desmoplasia					
		Sí	No		
D2-40	Sí	12	26		0,035
	No	7	49		
Ulceración					
		Sí	No		
D2-40	Nulo	26	23		0,003
	No nulo	25	3		
Infiltración perineural					
		Sí	No		
E-cadherina ZI	Expresión	20	12		0,000005
	No expresión	1	24		
CD44 ZI	Expresión	13	11		0,059
	No expresión	9	22		
CXCR4	Intenso	9	11		0,017
	No intenso	12	55		
EGFR ZD	Intenso	9	17		0,006
	No intenso	3	42		
Infiltración linfovascular					
		Sí	No		
VIMENTINA	Expresión	3	6		0,001
	No expresión	3	76		
CXCR4	Intenso	4	14		0,006
	No intenso	2	62		

Tabla 53: Relación entre las proteínas analizadas y las variables clínico-patológicas en el CEC. ZI, zona indiferenciada; ZD, zona diferenciada.

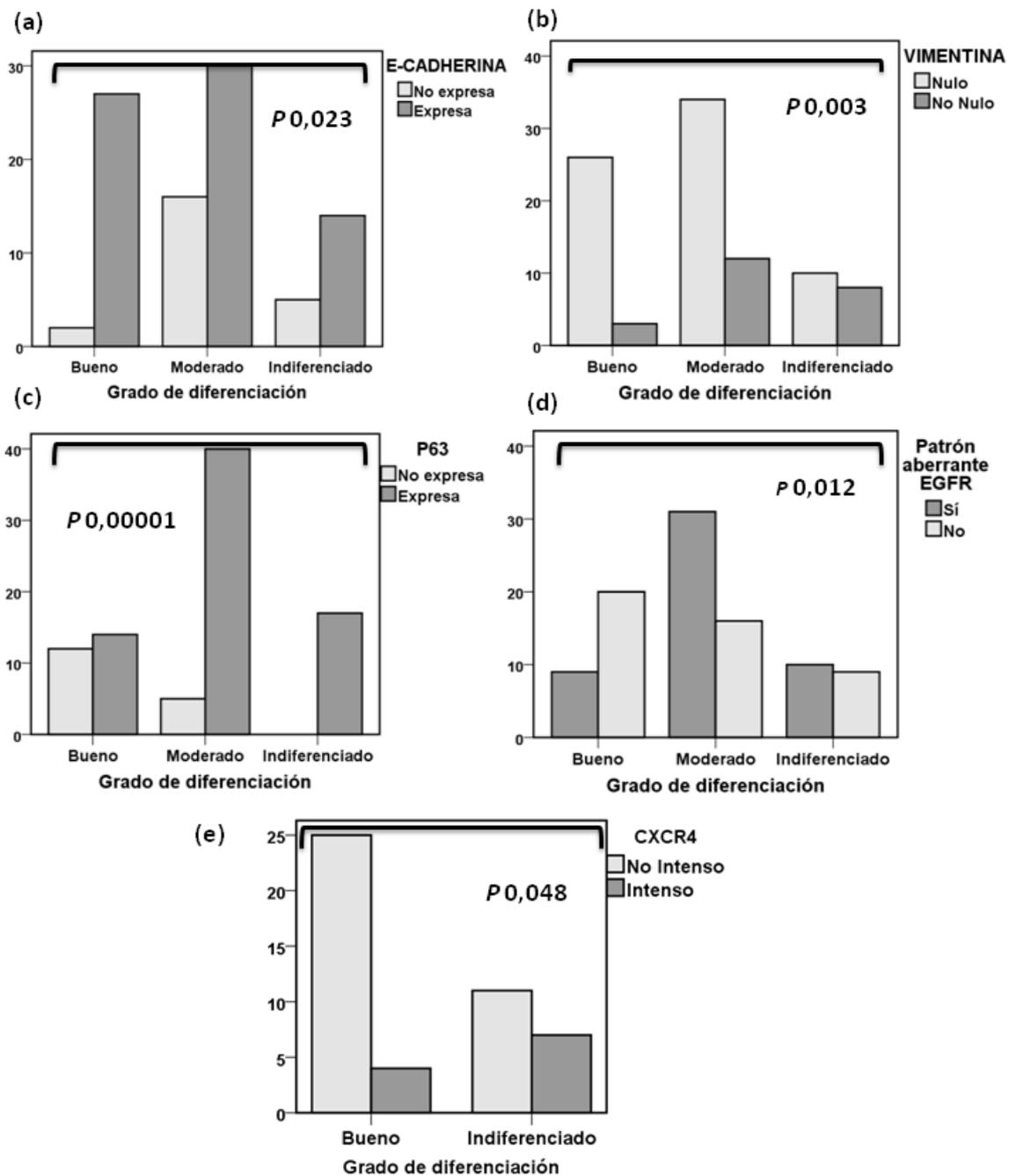


Figura 102: Marcadores proteicos relacionados con el grado de diferenciación. El grado pobre de diferenciación tumoral se relacionó con (a) la ausencia de expresión de E-CADHERINA (b) y la presencia de VIMENTINA, así como con la expresión (c) de P63 y (d) CXCR4 y (e) con el patrón aberrante de expresión de EGFR.

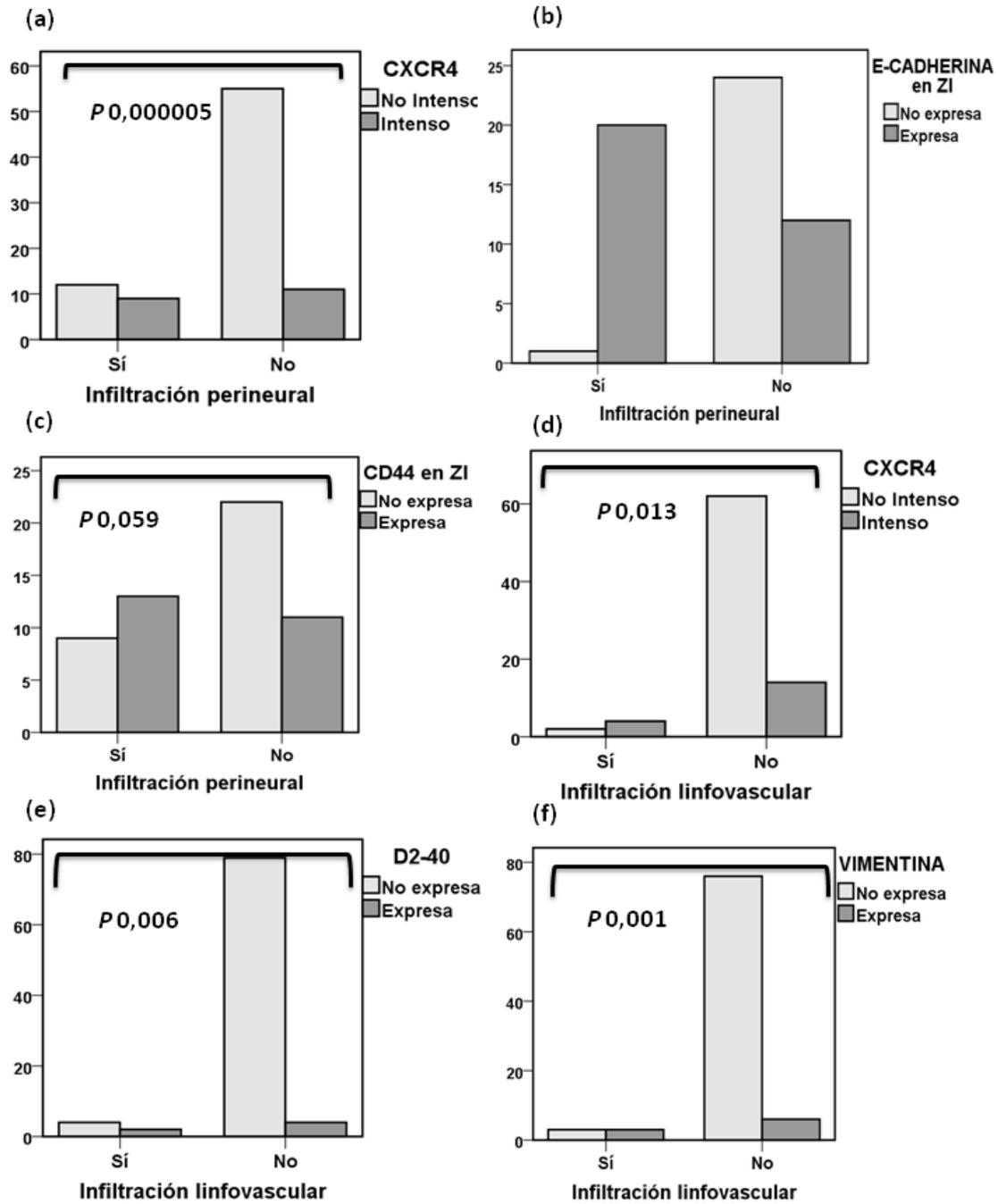


Figura 103 : Marcadores proteicos relacionados con la presencia de infiltración perineural y linfovascular. La infiltración linfovascular fue más frecuente cuando se expresó (a) CXCR4, (b) VIMENTINA y (d) D2-40; (c) la desmoplasia fue más frecuente cuando se expresó D2-40, (e) que también se asoció con la presencia de ulceración.

3.5 Marcadores proteicos cuya expresión se relacionó con el desarrollo de eventos de mala evolución clínica

Las proteínas cuya expresión se relacionó con el desarrollo de eventos de mala evolución clínica en el CEC figuran en la Tabla 54. Aunque sin alcanzar la significación estadística, los eventos de mala evolución clínica fueron más frecuentes en los tumores que expresaron VIMENTINA ($P = 0,078$) y en aquéllos que expresaron D2-40 ($P = 0,076$). Por otra parte, la recidiva local se asoció también a la expresión de VIMENTINA ($P = 0,07$) y D2-40 ($P = 0,06$), aunque manteniendo, como se ve, únicamente una tendencia estadística. La progresión ganglionar se relacionó con la expresión intensa de EGFR ($P = 0,01$), de manera que fue más frecuente cuando el tumor primario expresó intensamente este marcador. Además, el desarrollo de metástasis ganglionares se asoció a la expresión de P16 en la zona diferenciada ($P = 0,014$), a la expresión global de AE-1 ($P = 0,018$) y tendió a relacionarse con la expresión de CD44 en la zona indiferenciada ($P = 0,064$).

En cuanto a la progresión del estadio TNM durante el seguimiento, ésta se asoció a la expresión intensa de EGFR en el tumor primario ($P = 0,03$) y a presencia de P16 en la zona diferenciada del tumor ($P = 0,039$). La asociación estadísticamente significativa entre la expresión intensa de EGFR con la progresión ganglionar y la progresión del TNM durante el seguimiento, se mantuvo al evaluar la expresión de EGFR en la zona diferenciada e indiferenciada de los tumores. Así, los valores de la significación entre la expresión intensa de EGFR y la progresión ganglionar fue, en las zonas diferenciadas de $P = 0,012$ y para las indiferenciadas de $P = 0,023$; y para la progresión del TNM fue, en las zonas diferenciadas de $P = 0,013$ y en las indiferenciadas de $P = 0,034$.

A pesar de la escasez de pacientes que desarrollaron metástasis en órganos y causaron exitus por CEC en nuestro estudio, y dada la falta de consistencia que a este respecto tendría la aplicación de tests estadísticos, diremos que todos los tumores primarios que desarrollaron metástasis viscerales expresaron VIMENTINA y ninguno de ellos E-CADHERINA. Además, todos expresaron CXCR4, frente a un 20% de los tumores que no metastatizaron a órganos. Asimismo, tres cuartas partes de los tumores que resultaron en la muerte del paciente expresaron VIMENTINA y CXCR4, frente a proporciones mucho más bajas, del 6,7% y 20,5% de expresión de esos marcadores en los tumores primarios de los pacientes que no fallecieron.

Eventos de mal pronóstico considerados de forma global					
		Sí	No		
VIMENTINA	Expresa	4	5	0,078	
	No expresa	16	68		
D2-40	No nulo	12	26	0,076	
	Nulo	9	47		
Progresión TNM					
		Sí	No		
EGFR	Intenso	9	24	0,013	0,03
	No intenso	5	56		
P16 en ZD	Expresa	3	8	0,012	0,039
	No expresa	3	60		
Progresión ganglionar					
		Sí	No		
EGFR	Intenso	9	24	0,005	0,01
	No intenso	4	57		
P16 en ZD	Expresa	3	8	0,014	0,042
	No expresa	3	58		
CD44 en ZI	Expresa	8	15	0,064	
	No expresa	4	26		
AE-1	Expresa	13	53	0,021	0,018
	No expresa	0	23		
Recidiva local					
		Sí	No		
VIMENTINA	Expresa	3	6	0,036	0,07
	No expresa	8	76		
D2-40	No nulo	8	30	0,047	0,06
	Nulo	4	52		

Tabla 54: Relación entre las proteínas evaluadas en el estudio y las variables evolutivas en el CEC.

ZI, zona indiferenciada; ZD, zona diferenciada.

3.6 Resumen de las asociaciones entre la expresión de marcadores moleculares y las características clínico-patológicas de los tumores

A lo largo del apartado anterior hemos evaluado las asociaciones existentes entre los parámetros clínico-patológicos, incluyendo los eventos de mala evolución clínica, y la expresión de las distintas proteínas estudiadas. En este apartado, a modo de resumen, se recogen las asociaciones estadísticamente significativas y otras relevantes, resultantes del análisis univariante (Tabla 55, Figura 104). En los dos siguientes apartados, utilizaremos los datos más relevantes del estudio de estas proteínas y las utilizaremos junto con otras variables clínico-patológicas para crear modelos que permitan definir el pronóstico del CEC.

VAR1	VAR2	P
CD44	N+	0,064
D2-40	EVEN	0,036
D2-40	RECLOC	0,078
EGFR	PR.TNM	0,047
EGFR	N+	0,059
GBD	E-CADHERINA	0,012
GBD	VIMENTINA	0,013
GBD	P63	0,014
GBD	CXCR4	0,017
GBD	P.ab-EGFR	0,023
GBD	CD44	0,025
IIPT	E-CADHERINA	0,001
ILV	CXCR4	0,002
ILV	VIMENTINA	0,003
IPN	CD44	0,005
IPN	CXCR4	0,006
IPN	EGFR	0,012
P16	PR.TNM	0,048
P16	N+	0,061
PCEXP	P.ab-EGFR	0,03
TI-DX	KI-67	0,008
ULC	D2-40	0,012
VELCREC	KI-67	0,0001
VIMENTINA	EVEN	0,031
VIMENTINA	RECLOC	0,076

Tabla 55: Relaciones entre variables clínico-patológicas, evolutivas, y moleculares. VAR1 (variable 1), VAR2 (variable 2), AE-1 (expresión de AE-1), CD44 (expresión de CD44), CXCR4 (expresión intensa de CXCR4), D2-40 (expresión de D2-40), DESMO (desmoplasia), E-CADHERINA (expresión de E-CADHERINA), EGFR (expresión intensa de EGFR), EVEN (eventos globales de mala evolución clínica durante el seguimiento), GBD (grado de diferenciación bueno), IIPT (infiltrado inflamatorio peritumoral intenso), ILV (infiltración linfocelular), IPN (infiltración perineural), Ki-67 (índice proliferativo alto), N+ (desarrollo de metástasis ganglionares durante el seguimiento), P16, (expresión de P16), P63 (expresión intensa de P63), Pab.EGFR (patrón aberrante de expresión de EGFR), PCEXP (patrón de crecimiento expansivo), PG.TNM (progresión del TNM durante el seguimiento), RECLOC (recidiva local), ULC (ulceración), V.CTO (velocidad de crecimiento rápida –más de 5 mm / mes -), VIMENTINA (expresión de VIMENTINA).

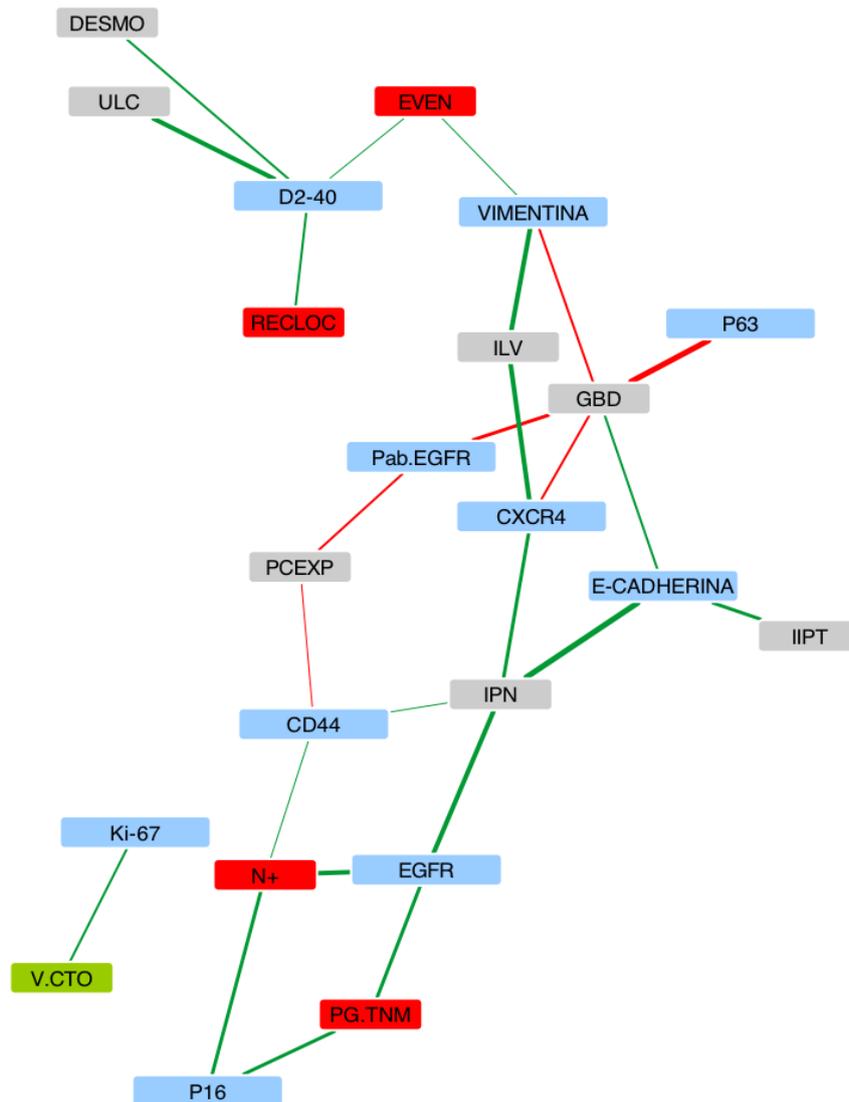


Figura 104: Red que muestra las asociaciones entre variables clínico-patológicas-evolutivas y la expresión de las proteínas analizadas: Imagen obtenida mediante Cytoscape®. Cada nodo muestra una variable clínico-patológica, cada línea indica la asociación entre las variables, cuyo grosor es inversamente proporcional al valor de P. El color gris de los nodos representa variables histopatológicas, el color verde representa variables clínicas, el color rojo eventos de mala evolución clínica y el color azul celeste las proteínas estudiadas. El color rojo de las líneas indica una asociación negativa y el color verde una asociación positiva. EVEN (eventos de mala evolución clínica durante el seguimiento considerados de forma global), N+ (desarrollo de metástasis ganglionares durante el seguimiento), RECLOC (recidiva local), PG.TNM (progresión del TNM durante el seguimiento), ULC (ulceración), DESMO (desmoplasia), GBD (grado de diferenciación bueno), PCEXP (patrón de crecimiento expansivo), IPN (infiltración perineural), ILV (infiltración linfovascular), IIPT (infiltrado inflamatorio peritumoral intenso), V.CTO (velocidad de crecimiento rápida –más de 5 mm/mes-), P63 (expresión intensa de P63), CD44 (expresión de CD44), CXCR4 (expresión intensa de CXCR4), E-CADHERINA (expresión de E-CADHERINA), AE-1 (expresión de AE-1), VIMENTINA (expresión de VIMENTINA), EGFR (expresión intensa de EGFR), Pab.EGFR (patrón aberrante de expresión de EGFR), D2-40 (expresión de D2-40), P16, (expresión de P16), Ki-67 (índice proliferativo alto).

3.7 Evaluación del valor predictivo de los marcadores moleculares sobre diferentes eventos de mala evolución clínica

Dentro los marcadores proteicos analizados, fue con el EGFR con el que se obtuvo un mayor grado de asociación entre su expresión y la existencia de eventos de mala evolución clínica en el análisis univariante. EGFR, además de asociarse su expresión global con el desarrollo de metástasis ganglionares y con la progresión del TNM durante el seguimiento, también lo hizo, con estas mismas complicaciones evolutivas de la enfermedad, cuando se evaluaron por separado las zonas diferenciadas e indiferenciadas de los CECs. Describimos a continuación estos resultados.

3.7.1 Evaluación de la expresión del EGFR como factor predictivo de metástasis ganglionares

Dado que, según los resultados previos en el análisis univariante, el EGFR podría ser un nuevo marcador predictor del desarrollo de metástasis ganglionares en la evolución del CEC, se construyó un modelo multivariante empleando la progresión ganglionar como variable respuesta. Como variables predictivas, se indujo la intensidad de expresión del EGFR, junto con las variables clínico-patológicas evaluadas relacionadas con la diseminación a ganglios. Entre ellas, se indujeron el espesor, el tamaño, el patrón de crecimiento, el grado de diferenciación, la infiltración perineural y la localización. Tras aplicar el método de Wald, se demostró que el EGFR ($P = 0,013$) y el grado de diferenciación ($P = 0,004$) se asociaron al desarrollo de metástasis ganglionares (Tabla 56). El modelo quedó definido por la ecuación $P(N+) = 1/1 + e^{3,319 - 1,734xGPD - 1,962xEGFR}$, en la que N+ representa el desarrollo de metástasis ganglionares, GPD el grado pobre de diferenciación y EGFR la expresión intensa de EGFR medida por inmunohistoquímica. La especificidad del modelo es del 95,1% y la eficacia global del 86,2% con una R de Nagelkerke de 0,277.

VARIABLES EXPLICATIVAS	OR	I.C.	P
EGFR	7,117	1,85-27,37	0,004
GPD	5,664	1,45-22,11	0,013

Tabla 56: Variables clínico-patológicas y moleculares que demostraron de manera independiente asociarse a un mayor riesgo de metástasis ganglionares en el CEC. EGFR (expresión intensa de EGFR determinada por inmunohistoquímica), GPD (grado de diferenciación pobre del tumor).

3.7.2 Evaluación de la expresión del EGFR como marcador de predicción de la progresión del estadio TNM

En base a que la expresión del EGFR podría ser también un nuevo marcador predictor del desarrollo de la progresión del estadio TNM en el CEC, se construyó un modelo multivariante empleando la progresión ganglionar como variable respuesta; y como variables predictoras la intensidad de expresión del EGFR y las variables clínico-patológicas evaluadas, incluidos el espesor, el tamaño, el patrón de crecimiento, el grado de diferenciación, la infiltración perineural y la localización. Tras aplicar el método de Wald, se demostró que la expresión del EGFR ($P = 0,024$; OR = 4,858) y el grado de diferenciación ($P = 0,007$; OR = 6,557) fueron variables que predijeron el desarrollo de metástasis ganglionares (Tabla 57). La especificidad fue próxima al 100% (98,8%), y la eficacia global fue del 86,2%, con una R de Nagelkerke = 0,336. Por tanto, el modelo incluyó a ambos, el grado pobre de diferenciación y la expresión intensa de EGFR medida por inmunohistoquímica y exhibió una tendencia para incluir a la infiltración perineural. La probabilidad de progresión del TNM durante el seguimiento queda definida por la fórmula $P(PG.TNM) = 1/1 + e^{3,600 - 1,881 \times GPD - 1,581 \times EGFR - 1,201 \times IPN}$, donde $PG.TNM$ representa la progresión del TNM durante el seguimiento, GPD el grado pobre de diferenciación del tumor primario, $EGFR$ la expresión intensa de EGFR del tumor primario e IPN la presencia de infiltración perineural.

VARIABLES EXPLICATIVAS	OR	IC	P
GPD	6,557	1,66-25,91	0,007
EGFR	4,858	1,23-19,23	0,024
INFILTRACIÓN PERINEURAL	3,324	0,873-12,652	0,078

Tabla 57: Variables clínico-patológicas y moleculares que demostraron de manera independiente su asociación a un mayor riesgo de progresión del estadio TNM durante el seguimiento clínico. GPD (grado pobre de diferenciación), EGFR (expresión intensa de EGFR determinada por inmunohistoquímica).

3.8 Estudio del valor predictivo de la expresión de los marcadores proteicos sobre las variables temporales de la enfermedad

3.8.1 Identificación de marcadores proteicos cuya expresión se asoció al tiempo de aparición de eventos de mala evolución clínica considerados de forma global

Sólo la expresión de D2-40 fue estadísticamente significativa para definir la latencia hasta cualquier evento de mala evolución clínica (incluidos recidiva local, metástasis ganglionares, metástasis viscerales y tiempo hasta el *exitus* por CEC). Así, la mediana de tiempo de latencia para el grupo que tumores que expresaron D2-40 fue menor en el grupo de tumores con expresión de D2-40 (5 meses), y más larga en el grupo de tumores que no expresaron este marcador (11 meses) ($P = 0,003$) (Figura 105, Tabla 58).

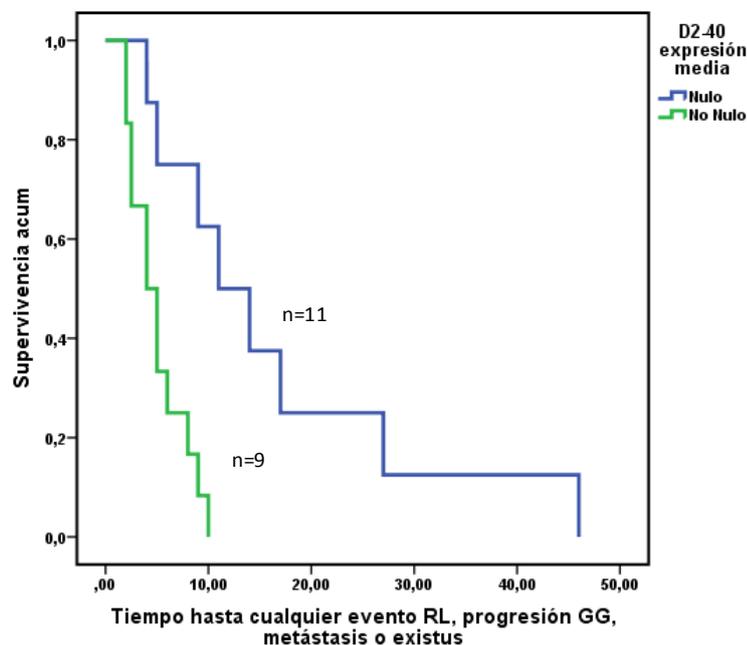


Figura 105: Tiempo hasta el desarrollo de cualquier evento de mala evolución clínica y expresión de D2-40 en el CEC ($P = 0,003$; log-rank test de Mantel-Cox).

3.8.2 Marcadores proteicos cuya expresión se asoció a la latencia hasta el desarrollo de metástasis ganglionares

La expresión de D2-40 se relacionó también con el tiempo hasta el desarrollo de metástasis ganglionares. La mediana de tiempo de latencia hasta el desarrollo de metástasis ganglionares fue de 5 meses en el grupo con cierto grado de expresión de D2-40, frente a 17 meses en el grupo sin expresión. Podemos decir que de los tumores que desarrollaron metástasis ganglionares, aquéllos que expresaron D2-40 en el tumor primario las desarrollaron más precozmente que los que no lo expresaron ($P = 0,008$). No obstante, hemos de tener en cuenta el pequeño tamaño de la muestra, lo que haría deseable validar estos resultados con una serie más amplia (Figura 106, Tabla 58).

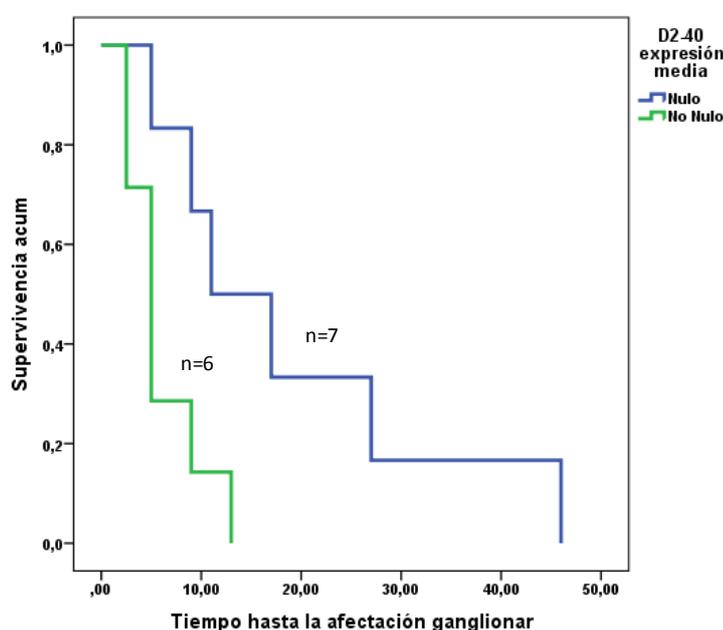


Figura 106: Tiempo hasta el desarrollo de metástasis ganglionares y expresión media de D2-40 ($P = 0,008$; log-rank test de Mantel-Cox)

VARIABLES OBJETIVO	D2-40(+)	D2-40(-)	P
LAT EVEN (meses) (me/IC)	5 (3,369-6,631)	11 (4,070-17,930)	0,002
LAT N+ (meses) (me/IC)	5 (3,50-6,50)	17 (4,118-19,882)	0,008

Tabla 58: Latencia hasta el desarrollo de eventos de mala evolución clínica considerados de forma global y de metástasis ganglionares en función de la expresión de D2-40. IC (intervalo de confianza), me (meses) LAT (latencia, tiempo hasta el desarrollo del evento), EVEN (eventos globales de mala evolución clínica), N+ (desarrollo de metástasis ganglionares durante el seguimiento). D2-40(+) (expresión de D2-40), D2-40(-) (ausencia de expresión de D2-40).

3.9 Evaluación del valor predictivo de la expresión de los marcadores proteicos, en combinación con otras variables clínico-patológicas, sobre la latencia de eventos de mala evolución clínica

3.9.1 Predicción de la latencia hasta el desarrollo de eventos de mala evolución clínica considerados de forma global

Construimos un modelo multivariante mediante una regresión de Cox, para evaluar la influencia de diversas variables sobre la latencia hasta el desarrollo de eventos de mala evolución clínica en el CEC. Las variables explicativas utilizadas fueron la expresión de D2-40, la inmunosupresión, la intensidad del infiltrado inflamatorio intratumoral y la velocidad de crecimiento (que ya habían demostrado en el estudio univariante su relación con el tiempo de latencia hasta la ocurrencia de eventos de mala evolución clínica). La única variable identificada relacionada de manera independiente fue la expresión de D2-40 ($P = 0,008$) (Tabla 59).

3.9.2 Variables predictoras de la latencia hasta el desarrollo de metástasis ganglionares

Para evaluar la influencia de las diferentes variables en relación con la latencia hasta el desarrollo de metástasis ganglionares, se incluyeron en el modelo las variables anteriormente señaladas y se comprobó que la única variable que predijo de manera independiente la latencia hasta la progresión ganglionar fue la expresión de D2-40 ($P = 0,030$) (Tabla 59).

3.9.3 Variables que pronosticaron la latencia hasta el desarrollo de recidiva local

Demostraron ser predictores independientes de la latencia hasta la recidiva local la inmunosupresión ($P = 0,030$) y la expresión de D2-40 ($P = 0,074$), aunque esta última sin alcanzar la significación estadística, pero siendo seleccionada por el modelo (Tabla 59).

VARIABLES OBJETIVO	VARIABLES PREDICTIVAS	OR	IC (95%)	P
LAT EVEN	D2-40	5.82	1.58-21.40	0.008
LAT RECLOC	INMUNOS	10.82	1.25-93.52	0,03
	D2-40	5.02	0.856-29.45	0.074
LAT N+	D2-40	5.99	1.19-30.04	0.030

Tabla 59: Resumen de la regresión de Cox para predecir el desarrollo de eventos de mala evolución clínica considerados de forma global y, específicamente, la recidiva local y la progresión ganglionar en función de las variables clínico-patológicas y moleculares evaluadas en nuestro estudio. LAT (latencia, tiempo hasta el desarrollo del evento), EVEN (eventos de mala evolución clínica durante el seguimiento), RECLOC (desarrollo de recidiva local), N+ (desarrollo de metástasis ganglionares durante el seguimiento), INMUNOS (inmunosupresión).

4 RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE MIRNAS Y OTROS PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS Y MOLECULARES ANALIZADOS

La existencia de asociaciones múltiples entre variables clínico-patológicas y moleculares observadas en este estudio, fue una de las razones para buscar la relación de estas variables con otros factores reguladores que pudieran influir sobre varios de ellos de forma simultánea. Los miRNA, por su función reguladora sobre diversas dianas de RNA de forma simultánea, como se indicó en secciones previas, son candidatos para testar su asociación con diferentes variables moleculares y clínico-patológicas del CEC de forma simultánea.

4.1 Identificación de miRNA candidatos mediante el empleo de *arrays* de expresión

Para la identificación de miRNA candidatos a tener interés en el pronóstico del CEC, se identificaron los perfiles de expresión de miRNA en un panel de líneas celulares que representan las diferentes fases evolutivas del CEC en ratón. Este grupo de líneas celulares se desarrolló en el laboratorio del Dr. Allan Balmain de la Universidad de California, San Francisco. La mayoría de ellas se obtuvieron de lesiones generadas tras la aplicación en la piel de ratón del protocolo clásico de carcinogénesis química a base de dimetil-benzantraceno (DMBA) y 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA o PMA). El panel incluye líneas derivadas de piel normal, lesiones premalignas, tumores malignos con fenotipo escamoso y tumores malignos con fenotipo fibroblastoide tras presentar transición epitelio-mesenquima. Este panel de líneas celulares ha sido validado ampliamente en diversos estudios por diferentes laboratorios (Bailleul *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1998; Burns *et al.*, 1991; Diaz-Guerra *et al.*, 1992; Quintanilla *et al.*, 1986; Stoler *et al.*, 1993). Dicho panel lo describimos con detalle en la sección de material y métodos.

Así, evaluamos la expresión diferencial de diferentes miRNA en las distintas líneas celulares mediante *arrays* de expresión que indujeron todos los miRNA descritos para distintas especies hasta el momento del ensayo. En la Figura 107 se muestra un *heatmap* que muestra la clasificación de las líneas celulares que representan distintas fases de progresión del cáncer de piel, mediante clúster no supervisado en función de la ratio de expresión maligno escamoso/maligno fusiforme, con 39 miRNA diferenciales. En la Tabla 60, incluimos la lista de esos 39 miRNA diferenciales. En la Figura 108 se representa el heatmap que muestra la clasificación de las líneas celulares mediante cluster no supervisado con 44 miRNAs que se expresan diferencialmente entre líneas de fenotipo benigno y maligno (Tabla 61).

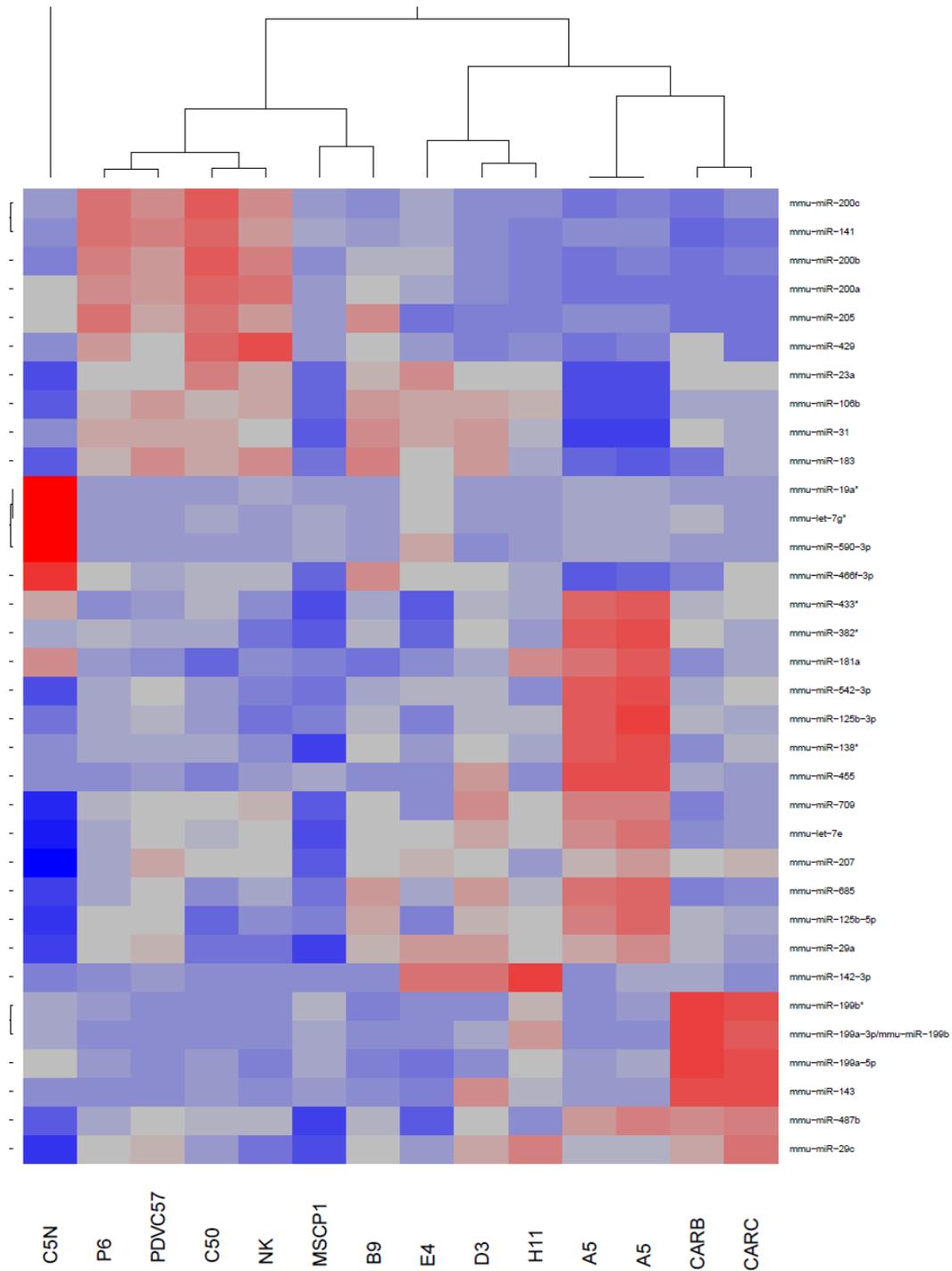


Figura 107: Heatmap que muestra la clasificación de las líneas celulares que representan distintas fases de progresión del cáncer de piel, mediante clúster no supervisado en función de la ratio de expresión maligno escamoso / maligno fusiforme con 34 miRNA diferenciales. A5 se estudió en dos arrays diferentes, nótese que en ambos casos ambos estudios quedan uno junto al otro, lo que sirve como control de la técnica. El color rojo indica expresión elevada, y el azul expresión disminuida. E4, aunque escamosa, en múltiples estudios se comporta como las fusiformes, es una línea a medio camino entre ambos tipos celulares.

Nombre	Escamoso maligno/Fusiforme
hsa-let-7e/mmu-let-7e	0,984363043
hsa-miR-106b/mmu-miR-106b	1,2373718
hsa-miR-125b/mmu-miR-125b-5p	0,930508368
hsa-miR-125b-1*/mmu-miR-125b-3p	0,916614371
hsa-miR-138-1*/mmu-miR-138*	0,927922444
hsa-miR-141/mmu-miR-141	1,248456624
hsa-miR-142-3p/mmu-miR-142-3p	0,960918943
hsa-miR-143/mmu-miR-143	0,810831542
hsa-miR-181a/mmu-miR-181 ^a	0,834085499
hsa-miR-183/mmu-miR-183	1,174870083
hsa-miR-199a-3p/hsa-miR-199b-3p	0,838962145
hsa-miR-199a-5p/mmu-miR-199a-5p	0,868124016
hsa-miR-19a*/mmu-miR-19a*	1,072471029
hsa-miR-200a/mmu-miR-200 ^a	1,236317599
hsa-miR-200b/mmu-miR-200b	1,254433549
hsa-miR-200c/mmu-miR-200c	1,20041902
hsa-miR-205/mmu-miR-205	1,310375905
hsa-miR-23a/mmu-miR-23 ^a	1,197435295
hsa-miR-29a/mmu-miR-29 ^a	1,020336089
hsa-miR-29c*/mmu-miR-29c*	0,977931819
hsa-miR-31/mmu-miR-31/rno-miR-31	1,198561664
hsa-miR-487b/mmu-miR-487b/rno-miR-487b	0,907007282
hsa-miR-542-3p/mmu-miR-542-3p/rno-miR-542-3p	0,931713424
hsa-miR-590-3p/mmu-miR-590-3p	1,061134163
mmu-let-7g*/mmu-let-7g*	1,088070853
mmu-miR-199b*	0,86668356
mmu-miR-207	1,008207165
mmu-miR-382*	0,893406772
mmu-miR-429/rno-miR-429	1,084639477
mmu-miR-433*	0,871127483
mmu-miR-455	0,891966463
mmu-miR-466f-3p	1,193907441
mmu-miR-685	0,976255931
mmu-miR-709	0,931843398

Tabla 60: Datos de los microarrays de miRNAs correspondientes al heatmap de la figura anterior. MiRNAs diferencialmente expresados entre las líneas celulares de CEC con fenotipo escamoso y fusiforme. hsa (Homo sapiens), mmu (Mus musculus).

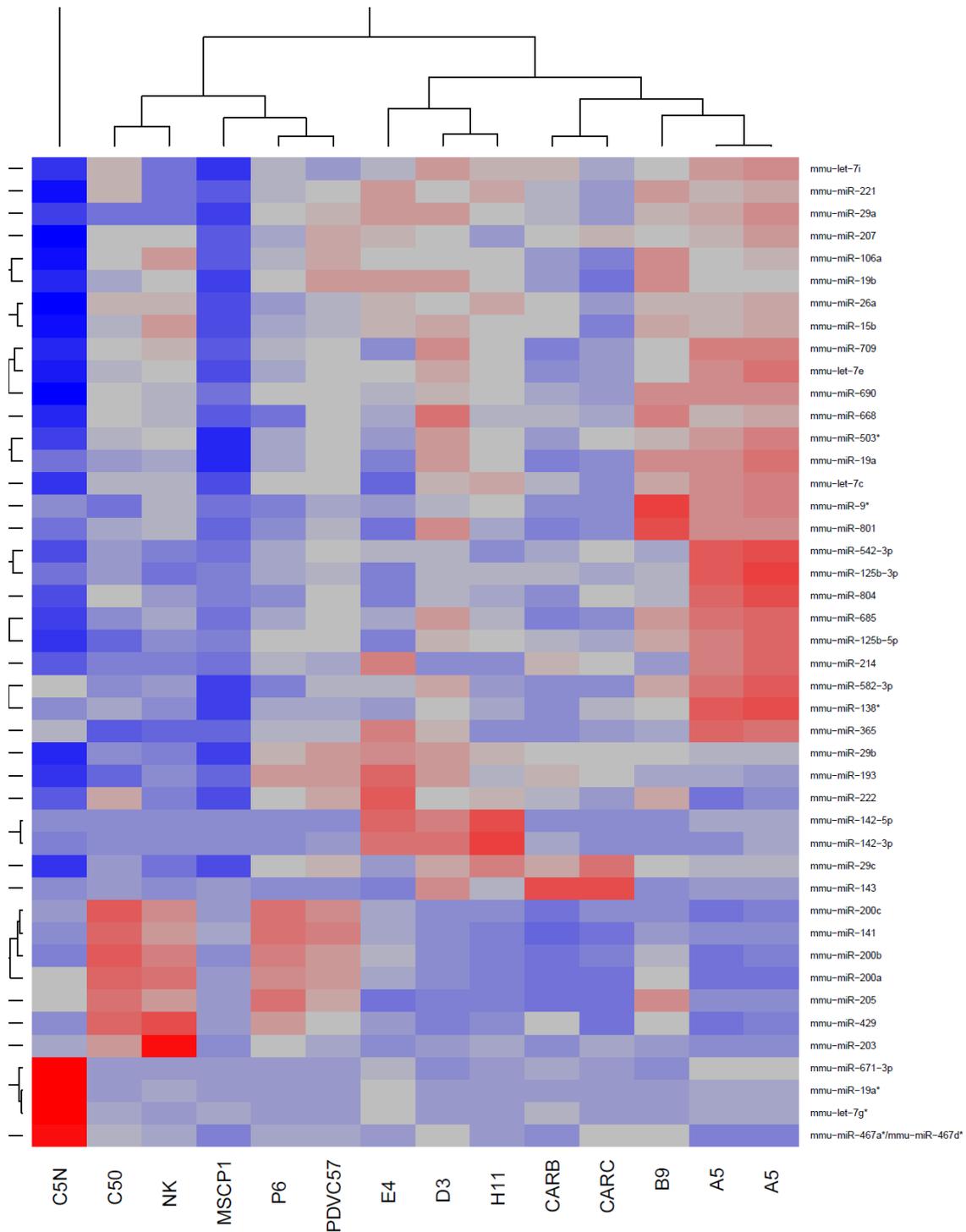


Figura 108: Heatmap donde se muestra la clasificación de las líneas celulares de origen murino que representan distintas fases de progresión del cáncer de piel, mediante clúster no supervisado. Para ello se ha usado la ratio de expresión maligno/benigno con 44 miRNA diferenciales. Nótese de nuevo como A5 en ambos estudios quedan uno junto al otro. El color rojo indica expresión elevada, y el azul expresión disminuida. Obsérvese de nuevo como E4, se comporta como última de las líneas escamosas quedando junto a las fusiformes. En este estudio, la excepción es B9 que queda junto a las A5, lo que puede explicarse en parte porque derivan del mismo tumor, y ambas son malignas (en este caso la discordancia la marcaría D3, que también pertenece al mismo tumor que A5 y B9).

Nombre	Maligno/Benigno
hsa-let-7c/mmu-let-7c	1,100974606
hsa-let-7e/mmu-let-7e	1,191758164
hsa-let-7g*/mmu-let-7g*	0,83936603
hsa-miR-125b/mmu-miR-125b-5p	1,249606619
hsa-miR-125b-1*/mmu-miR-125b-3p	1,108618258
hsa-miR-138-1*/mmu-miR-138*	1,11470725
hsa-miR-141/mmu-miR-141	0,80315814
hsa-miR-142-3p/mmu-miR-142-3p	1,207526339
hsa-miR-142-5p/mmu-miR-142-5p	1,15115594
hsa-miR-143/mmu-miR-143	1,133912002
hsa-miR-15b/mmu-miR-15b	1,130823221
hsa-miR-193a-3p/mmu-miR-193	1,169832726
hsa-miR-19a*/mmu-miR-19a*	0,836765971
hsa-miR-19a/mmu-miR-19 ^a	1,122313686
hsa-miR-19b/mmu-miR-19b	1,129720401
hsa-miR-200a/mmu-miR-200 ^a	0,811443131
hsa-miR-200b/mmu-miR-200b	0,816811101
hsa-miR-200c/mmu-miR-200c	0,791126198
hsa-miR-203/mmu-miR-203	0,869938056
hsa-miR-205/mmu-miR-205	0,767284988
hsa-miR-214/mmu-miR-214	1,1027814
hsa-miR-221/mmu-miR-221	1,18723529
hsa-miR-222/mmu-miR-222	1,104283227
hsa-miR-26a/mmu-miR-26 ^a	1,116673768
hsa-miR-29a/mmu-miR-29 ^a	1,247603269
hsa-miR-29c*/mmu-miR-29c*	0,99743562
hsa-miR-29c/mmu-miR-29c	1,170053884
hsa-miR-365/mmu-miR-365	1,140502443
hsa-miR-542-3p/mmu-miR-542-3p	1,149464514
hsa-miR-668/mmu-miR-668	1,176982861
hsa-miR-671-3p/mmu-miR-671-3p	0,8542968
hsa-miR-801/mmu-miR-801	1,146252111

hsa-miR-9*/mmu-miR-9*	1,15321527
mmu-let-7i	1,106874613
mmu-miR-106 ^a	1,116346268
mmu-miR-207	1,201939854
mmu-miR-429	0,876523181
mmu-miR-467a*/mmu-miR-467d*	0,896651726
mmu-miR-503*	1,10300442
mmu-miR-582-3p	1,111632988
mmu-miR-685	1,173493564
mmu-miR-690	1,180921831
mmu-miR-709	1,142374223
mmu-miR-804	1,101217303

Tabla 61: Datos de los microarrays de los 44 miRNAs que están representados gráficamente en el anterior heatmap. MiRNAs diferencialmente expresados entre las líneas celulares de CEC con fenotipo benigno y maligno. hsa (Homo sapiens), mmu (Mus musculus).

Al comparar el patrón de expresión de miRNA en líneas celulares normales (C50, C5N, NK), premalignas (P6, MSCP1), de CEC con diferenciación escamosa (PDVC57, E4 y B9) y de CEC con diferenciación fusocelular, fibroblastoide (A5, D3, H11, CarB y CarC) se obtuvieron una serie de miRNA expresados de forma diferencial, algunos de los cuales posteriormente se validaron mediante QPCR. Así, encontramos una serie de miRNA con expresión diferencial entre las células de fenotipo normal y premaligno, y las células de fenotipo de CEC. Así, el *miR-146a* y el *miR-146b* demostraron tener tendencia a sobreexpresarse en líneas celulares tumorales tanto benignas como malignas escamosas frente a células de piel normal, en las que su expresión fue más baja. Algo parecido sucedió con el *miR-154*. Por contra, el *miR-140-5p* tendió a infraexpresarse en líneas de CEC frente a líneas celulares de lesiones premalignas; y lo mismo sucedió con el *miR-196a*, que presentó un comportamiento más bifásico, con tendencia a la sobreexpresión desde las líneas PDV a PDVC57 y E4. El *miR-296-3p* también tuvo tendencia a la infraexpresión en líneas de CEC frente a las de piel normal y de lesiones premalignas

También evaluamos miRNA candidatos a estar implicados en la transición entre el fenotipo tumoral escamoso más diferenciado y el mesenquimal, más indiferenciado, en este modelo *in vitro*. Estos miRNA podrían estar implicados en la transición epitelio-mesenquima, mientras que los comentados en el punto anterior podrían ser candidatos importantes en el paso de la lesión premaligna (recordemos que incluso las líneas no tumorales como C5N, C50 y NK están inmortalizadas) a la maligna. Dentro de los miRNA que presentaron expresión diferencial entre líneas celulares B9, E4 y D3, H11 algunos se demostraron por QPCR de una

manera fiable. Así, los *miRNA769-3p*, *miRNA551a*, *miRNA130b*, *miRNA184* y *miRNA92* tendieron a perder su expresión en líneas celulares más mesenquimales con respecto a las de CEC más diferenciadas. En cambio, los *miR-662*, *miR-660*, *miR-224*, *miR-212*, *miR-186* y *miR-144* tendieron a sobreexpresarse en las líneas celulares con hábito más fusiforme o mesequimatoso. Además de los miRNA indicados más arriba, otros miRNA también se expresaron de forma diferencial entre líneas celulares de queratinocitos no tumorales y líneas de CEC. El *miR-506*, el *miR-584*, el *miR-27b* y el *miR-146b-3p* también se encontraron infraexpresados en líneas celulares de CEC frente a las de queratinocitos no tumorales

4.2 Validación de la expresión diferencial de miRNAs obtenida por microarrays mediante QPCR en las líneas celulares

Entre los miRNA expresados de forma diferencial, observamos la pérdida de expresión de *miR-200b* y *miR-205*, durante la transición epitelio-mesénquima, lo que está de acuerdo con la literatura (Bracken *et al.*, 2008; Gregory *et al.*, 2008). Fue también interesante la expresión diferencial del *miR-203* entre, por un lado, las líneas celulares de fenotipo no maligno, incluidas las de fenotipo normal C50 y NK, y las derivadas de lesiones premalignas como MSCP1 y P6; y, por el otro, entre las líneas de fenotipo no malignos y las de cáncer escamoso bien diferenciado como PDV, PDV57, B9 y E4 (Figura 109). Dado el interés descrito en la literatura de la participación de estos miRNA en la homeóstasis de la piel se decidió estudiar su expresión en nuestra cohorte de CEC, así como sus implicaciones en el pronóstico de la enfermedad.

Entre los miRNAs con expresión diferencial identificados, seleccionamos miR-203 y miR-205 para estudiar sus implicaciones en el desarrollo y evolución dinámica del CEC dada su importancia en la homeostasis cutánea (Lena *et al.*, 2008; Sonkoly *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013b; Yi *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2010) (Figure 109). Mir-205 se encontró infrarregulado en el grupo de líneas celulares más fusiformes (A5, D3, H11, CarB y CarC) en comparación con el resto de las líneas celulares del panel ($P = 0.019$) (Figure 106), de acuerdo con su papel en la supresión de la transición epitelio-mesénquima (EMT) (Gregory *et al.*, 2008). Además, existieron también marcadas diferencias entre la expresión de miR-205 en líneas celulares no malignas (C5N, NK, MSCP1, P6) y el grupo de líneas celulares derivadas de tumores malignos ($P = 0.001$) y especialmente con el grupo de líneas celulares con fenotipo fusiforme ($P = 0.008$) (Figure 109).

MiR-203 se encontró infrarregulado en líneas celulares malignas tanto escamosas como fusiformes en comparación con las líneas celulares no malignas ($P = 0.019$). Globalmente, ambos miRNAs se encontraron infrarregulados en el grupo de líneas celulares con fenotipo fusiforme (Figure 109), lo que indica la específica asociación de estas dos

moléculas con el mantenimiento del fenotipo epitelial en este contexto. Por lo tanto, la expresión diferencial demostrada en los miRNA-203 y miRNA-205 en diferentes fases de la progresión tumoral en el CEC, las convierte en buenos candidatos para la evaluación de su expresión en CEC humanos para determinar sus implicaciones clínicas.

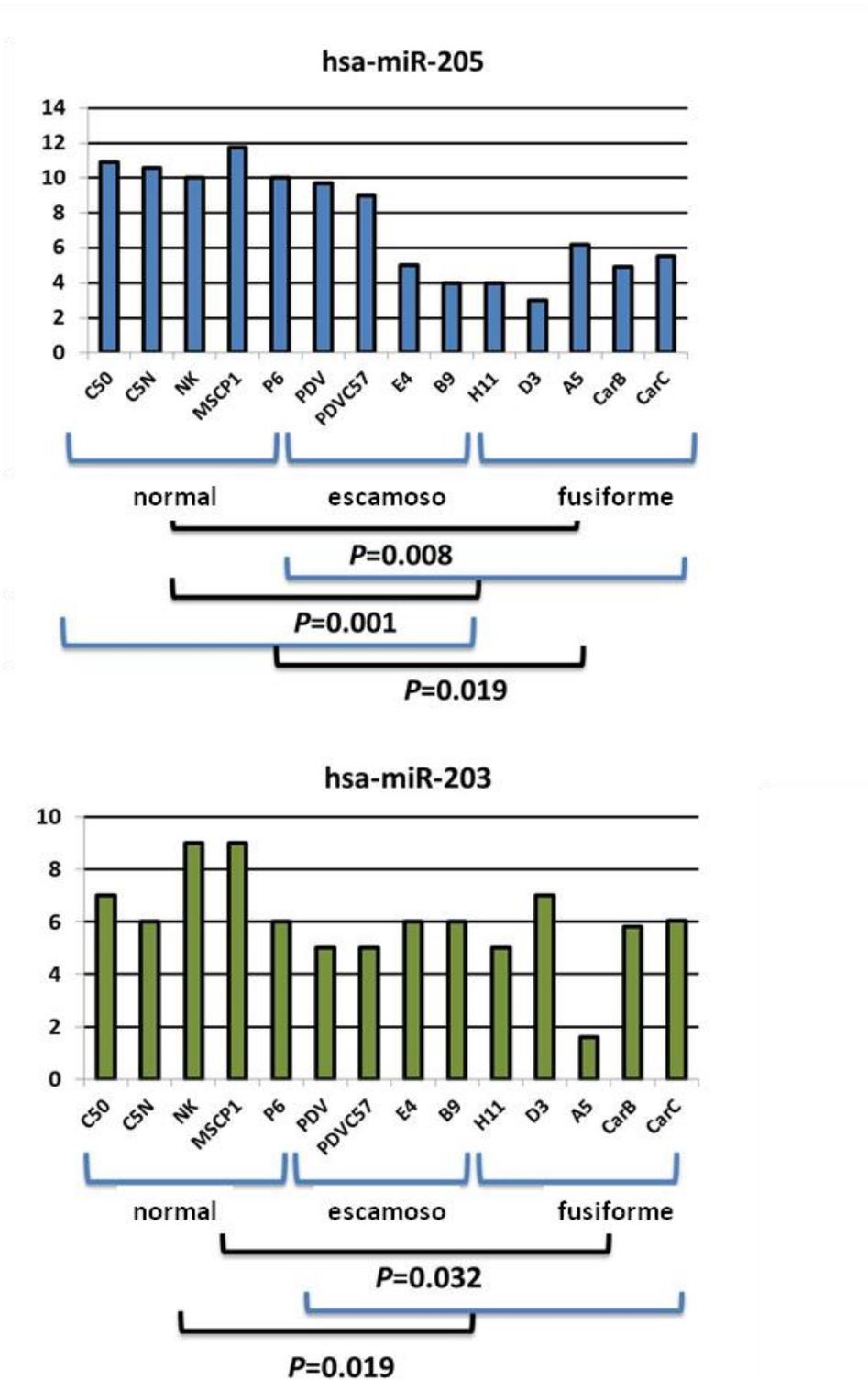


Figura 109: Validación de la expresión de miR-205 y miR-203 mediante QPCR en las líneas celular.

El siguiente paso de nuestro estudio fue evaluar la importancia de los miRNA seleccionados en la cohorte de CECs humanos de este trabajo. Para ello, determinamos su expresión en una serie de estos tumores a fin de estudiar su posible asociación con las características clínicas, histopatológicas y moleculares de la enfermedad.

4.3 Análisis de la expresión de miRNA mediante hibridación *in situ*

4.3.1 Nivel de expresión de miRNA determinados por hibridación *in situ* en tejidos en parafina en nuestra cohorte de CEC

Para el análisis de la expresión de los miRNA se consideró no solamente la intensidad de expresión en las zonas diferenciada, indiferenciada y global, sino también el frente de invasión. Hay que tener en cuenta que debido a las dificultades para la optimización de la técnica, la proporción de valores perdidos fue mayor que en el caso de las tinciones de inmunohistoquímica convencional.

a. Expresión de miRNA-203 en la cohorte de CEC

El *miRNA-203* es uno de los miRNA que más se han estudiado en la piel. Participa en el proceso de queratinización (Yi *et al.*, 2008). En nuestra serie, observamos que en la zona diferenciada de los tumores predominó la expresión moderada ver (Tabla 62, Figura 110); mientras que en la zona indiferenciada la expresión fue escasa o nula. En el frente de invasión, la mayoría de los casos carecieron de expresión o ésta fue escasa. Los datos globales y para cada zona del tumor se presentan de forma detallada en la Tabla 62.

	ZD		ZI		FI		IPN		Media	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Nulo	7	10,14	8	14,81	13	25,49	0	0,00	6	6,82
Escaso	27	39,13	33	61,11	24	47,06	1	10,00	48	54,55
Moderado	30	43,48	10	18,52	7	13,73	0	0,00	31	35,23
Intenso	5	7,25	3	5,56	7	13,73	9	90,00	3	3,41
Total	69	100,00	54,0	100,00	51	100,00	10	100,00	88	100,00

Tabla 62: Distribución de frecuencias de la intensidad de expresión para el miR-203 en nuestra serie de CEC. ZD (zona diferenciada), ZI (zona indiferenciada), FI (frente de invasión), IPN (área de infiltración perineural).

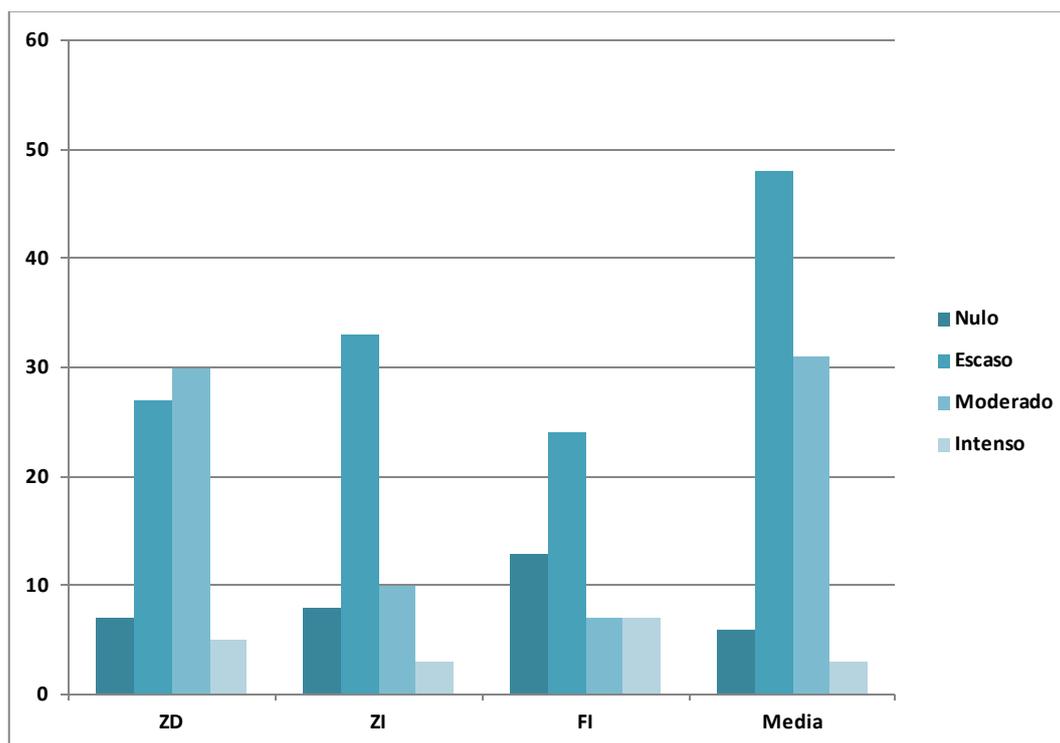


Figura 110: Gráfico de frecuencias de intensidad de expresión de *miRNA-203* en las diferentes áreas de los tumores de nuestra serie.

b. Expresión de *miRNA-205* en el CEC

La expresión del *miRNA-205* se comportó de manera distinta al *miRNA-203*. Así, en la zona diferenciada de los tumores, *miRNA-205* tendió a no expresarse o a hacerlo de manera escasa. En la zona indiferenciada *miRNA-205* se expresó con más frecuencia de manera moderada e intensa. Esta tendencia se mantuvo y/o acentuó en el frente de invasión. En cuanto a la expresión global en el tumor, *miRNA-205* se expresó con más frecuencia con una intensidad moderada, aunque hubo una proporción importante de tumores en los que se expresó de manera escasa (24,32%) o nula (22,97%), y algunos incluso presentaron una expresión global intensa (13,51%).

Evaluamos si esas diferencias en la intensidad de expresión de los miRNAs se relacionaron con la expresión diferencial de alguna otra molécula o si tuvieron relación con alguna propiedad biomédica o característica específica de los tumores (Tabla 63, Figura 111).

miRNA205		ZD		ZI		FI		IPN		Media	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
	Nulo	17	32,69	8	17,39	9	16,98	0	0,00	17	22,97
	Escaso	25	48,08	7	15,22	11	20,75	1	8,33	18	24,32
	Moderado	6	11,54	21	45,65	17	32,08	0	0,00	29	39,19
	Intenso	4	7,69	10	21,74	16	30,19	12	92,31	10	13,51
	Total	52	100,00	46,0	100,00	53	100,00	13	100,00	74	100,00

Tabla 63: Distribución de frecuencias de la intensidad de expresión para el miRNA-205 en nuestra serie de CEC. ZD (zona diferenciada), ZI (zona indiferenciada), FI (frente de invasión), IPN (área de infiltración perineural).

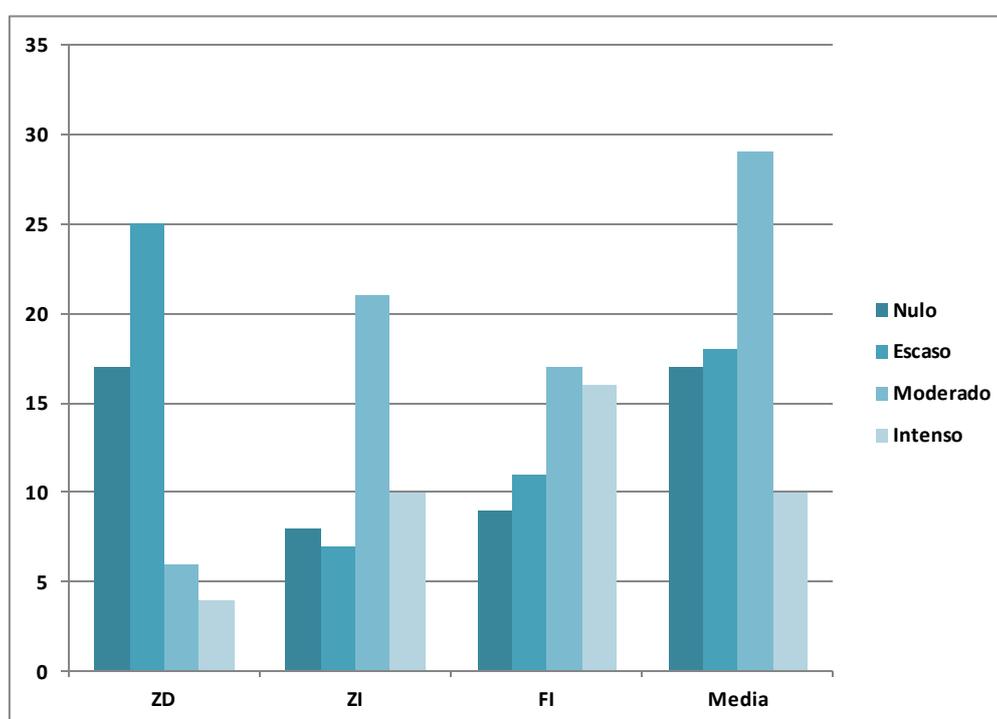


Figura 111: Gráfico de frecuencias de intensidad de expresión de miRNA-205 en las diferentes áreas de los tumores de nuestra serie.

Globalmente, *miRNA-203* y *miRNA-205* se expresaron con mayor intensidad en la piel normal adyacente al tumor que en el propio tumor, lo que podría sugerir que la expresión de estos miRNA tiende a disminuir durante el proceso de malignización. El *miRNA-203* se detectó preferentemente en las capas más altas del epitelio, y el *miRNA-205* en la capa basal e inmediatamente suprabasales, lo que está de acuerdo con la literatura en ambos miRNA (Wang *et al.*, 2013a; Wei *et al.*, 2010; Yi *et al.*, 2008) (Figura 112). Desde un punto de vista

descriptivo, en este estudio consideramos que la expresión de los miRNA estudiados en el tumor fue intensa cuando igualó en intensidad a la de la piel normal adyacente. Comprobamos, además, que el *miRNA-205* tendió a expresarse poco en los tumores bien diferenciados respecto de la piel normal adyacente y, en cambio, conservó mejor su expresión en aquellos tumores más indiferenciados; se observó lo contrario en el caso del *miRNA-203*.

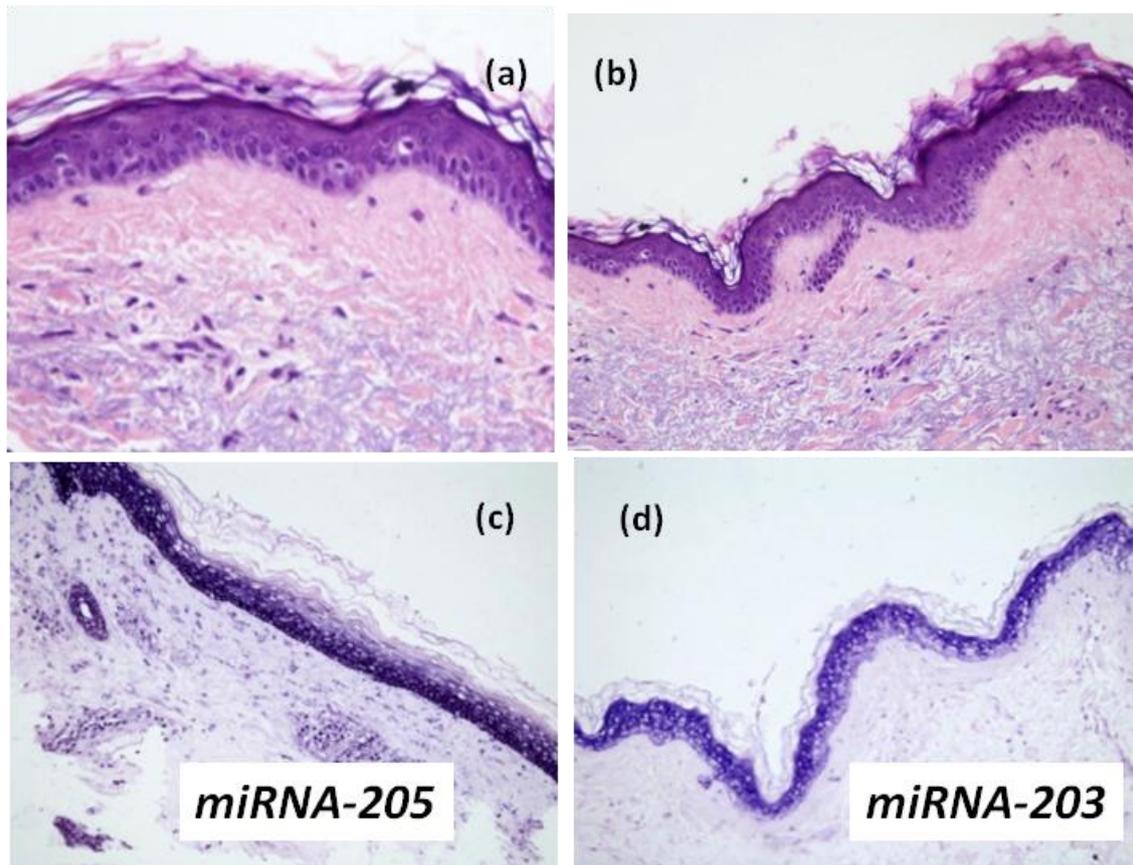


Figura 112: Tinción de *miRNA-205* y *miRNA-203* en piel normal adyacente al tumor: (a) y (b) Piel normal teñida con H&E; (c) expresión de *miRNA-205* teñido por hibridación *in situ* (predominante en estratos basales); (d) expresión de *miRNA-203* predominante en estratos superiores del epitelio.

4.3.2 Análisis comparativo entre del nivel de expresión de miRNA mediante hibridación *in situ*

El *miRNA-203* tendió a expresarse en las capas suprabasales y los estratos más diferenciados en la piel normal, y en las áreas más diferenciadas de los tumores (Figura 122). Por su parte, el *miRNA-205* tendió a expresarse en la capa basal y en las más inferiores, dentro del estrato espinoso, y en el frente de invasión tumoral, así como en aquellas áreas más pobremente diferenciadas intratumorales (Figura 122). La expresión del *miRNA-203* en el CEC se comportó de manera opuesta a la expresión del *miRNA-205*, tanto globalmente en el tumor

($P = 0,031$), como en el frente de invasión ($P = 0,001$), de manera que cuando uno de los dos miRNA se expresó el otro tendió a no hacerlo (Figura 113). La distribución de las frecuencias de tinción de cada uno de los dos miRNA en nuestra serie de CECs aparece en las Tablas 62, 63 y las Figuras 110, 111. La Figura 122 representa un ejemplo de la expresión diferencial de estos miRNAs en el CEC. La Figura 123 quiere representar un resumen de las asociaciones más relevantes del los miRNA-203 y miRNA-205 con otras variables clínico-patológicas y moleculares evaluadas en este trabajo.

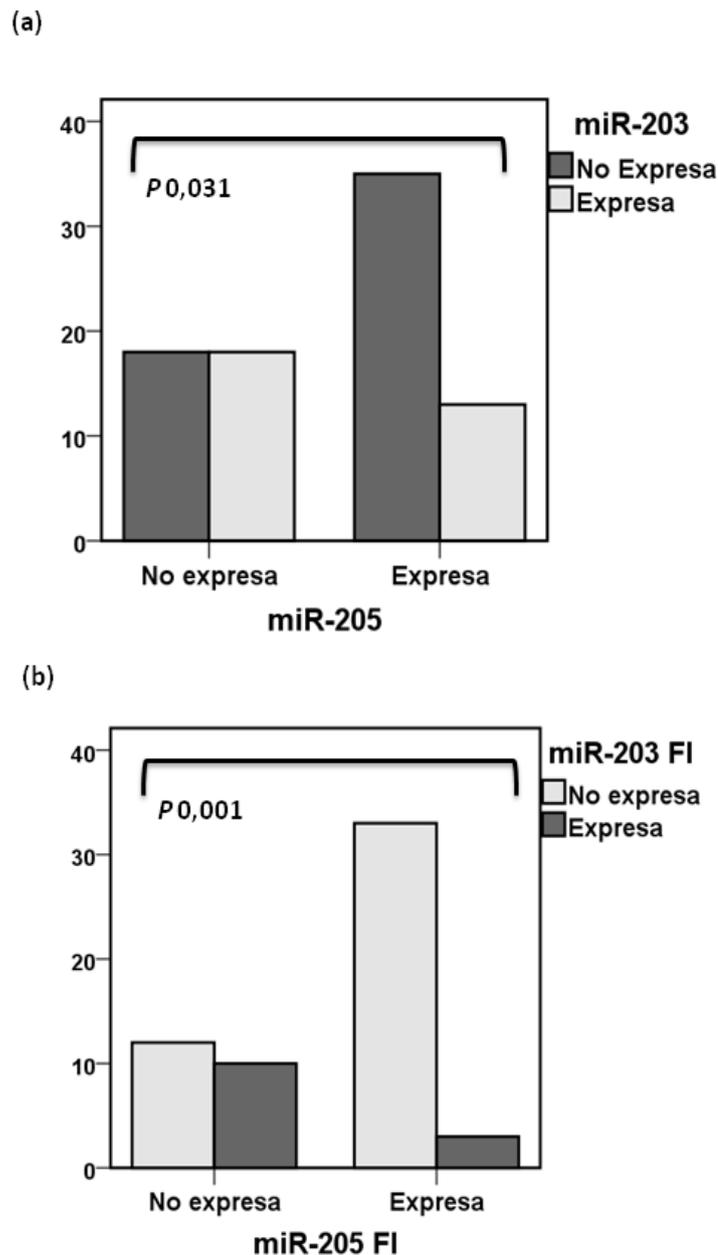


Figura 113: Relación entre los niveles de miR-203 y miR-205: (a) Asociación entre los niveles de expresión globales de miR-203 y miR-205; (b) asociación entre los niveles de miR-203 y miR-205 en el frente de invasión del tumor.

4.3.3 Relación entre los niveles de expresión de los miRNA y parámetros clínico-patológicos y evolutivos del CEC

a. Relación de la expresión de *miRNA-205* con características clínico-patológicas del CEC

En relación a la expresión del *miRNA-205* en el CEC, estudiamos tanto la expresión media, como su expresión en el frente de invasión. La **expresión media** del *miRNA-205* se relacionó con diferentes parámetros clínico-patológicos que figuran detalladamente en la Tabla 64. Así, el *miRNA-205* se expresó más frecuentemente en los tumores que desarrollaron recidiva local durante el seguimiento ($P = 0,043$) (Figura 114) y en los tumores en grado T2b frente a los que estaban en grado T2a o T1 ($P = 0,012$). Respecto a las variables clínico-patológicas, el *miRNA-205* se expresó más frecuentemente en los tumores que exhibieron un estroma desmoplásico ($P = 0,006$), con un grado pobre de diferenciación ($P = 0,006$), en aquéllos que presentaron infiltración perineural ($P = 0,014$), en los ulcerados ($P = 0,03$) y en los que presentaron un patrón de crecimiento infiltrativo ($P = 0,000027$) (Tabla 64). Nótese, que la expresión del *miRNA-205* se asoció fundamentalmente con variables clínico-patológicas indicadoras de mala evolución de la enfermedad (Figura 115, 123).

La expresión del *miRNA-205* en el frente de invasión se asoció a las variables clínico-patológicas que figuran en la Tabla 64. Su expresión fue más frecuente en el frente de invasión de los tumores con patrón de crecimiento infiltrativo, que en el borde de los tumores con patrón expansivo y/o mixto ($P = 0,006$), y en el frente de invasión de los tumores ulcerados ($P = 0,024$). Aún sin alcanzar la significación estadística, existió una tendencia a la asociación entre la expresión del *miRNA-205* en el frente de invasión y el grado de diferenciación pobre ($P = 0,097$), con la presencia de infiltración perineural ($P = 0,066$) y con el desarrollo de recidiva local ($P = 0,089$); no se demostró una relación clara con ninguna de las demás variables analizadas. Nótese de nuevo, que la expresión del *miRNA-205*, ahora en el frente de invasión, estuvo asociada con variables clínico-patológicas indicadoras de mala evolución (Tabla 65).

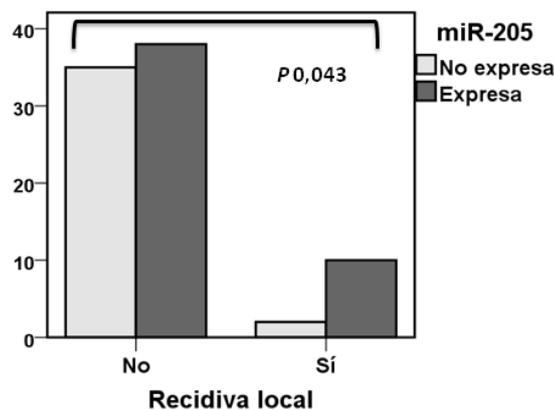


Figura 114: Asociación entre la expresión global de *miR-205* y el desarrollo de recidiva local durante el seguimiento.

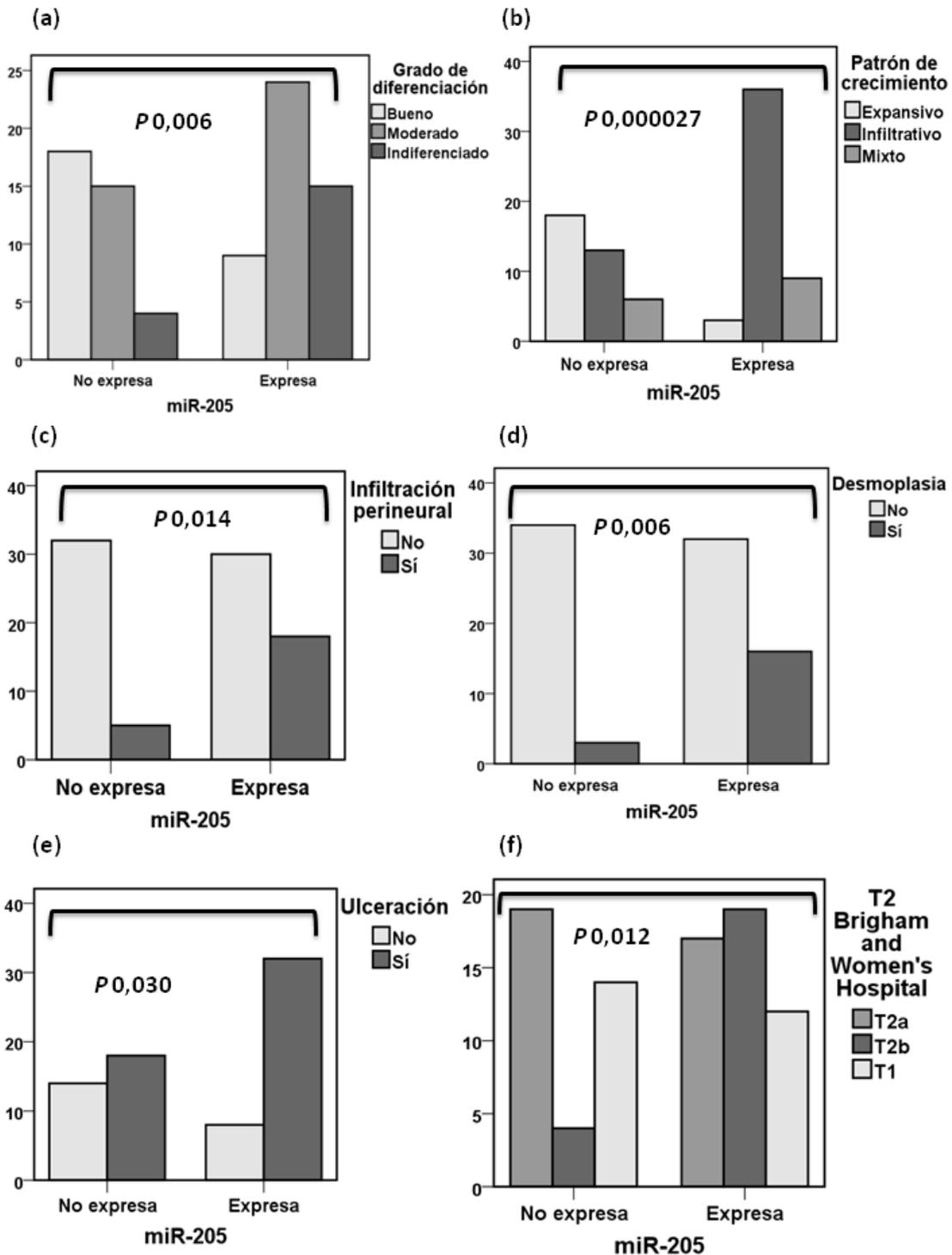


Figura 115: Asociaciones entre la expresión global de miR-205 y algunas variables clínico-patológicas: (a) grado de diferenciación, (b) patrón de crecimiento, (c) infiltración perineural, (d) desmoplasia, (e) ulceración, (f) estadio T según la clasificación del Brigham and Women's Hospital.

b. Relación de la expresión de *miRNA-203* con características clínico-patológicas del CEC

Como en el caso anterior, de nuevo estudiamos la expresión media y en el frente de invasión. La **expresión media** del *miRNA-203* se relacionó con los parámetros clínico-patológicos que figuran en la Tabla 64. El *miRNA-203* se expresó más frecuentemente en los tumores bien diferenciados *versus* los moderada y/o pobremente diferenciados ($P = 0,004$), así como en aquéllos con patrón de crecimiento expansivo *versus* mixto y/o infiltrativo ($P = 0,006$) y en los que no presentaron un estroma desmoplásico ($P = 0,028$). En este sentido, su expresión se comportó de manera inversa a la comprobada para el *miRNA-205*, en relación con los mismos parámetros. No se comprobó relación de la expresión del *miRNA-203* con ninguna más de las variables clínico-patológicas evaluadas (Figuras 116-117, 123).

La expresión del *miRNA-203* **en el frente de invasión** se asoció a las variables clínico-patológicas que figuran en la Tabla 65. Su expresión fue más frecuente en el frente de invasión de los tumores con patrón de crecimiento expansivo *versus* mixto y/o infiltrativo ($P = 0,006$); y en los bien diferenciados *versus* moderadamente y/o bien diferenciados ($P = 0,004$); así como en los tumores carentes de un estroma desmoplásico ($P = 0,007$) y en los que no presentaron infiltración perineural ($P = 0,08$), esto último sin alcanzar la significación estadística. Asimismo, la expresión del *miRNA-203* fue menos frecuente en los tumores de mayor grosor ($P = 0,041$), siendo el espesor medio del grupo de tumores que expresó el *miRNA-203* en el frente de invasión de 5,86 mm frente a 8,96 mm en el grupo que no lo expresó. También se expresó menos en el frente de invasión de los tumores más grandes ($P = 0,044$), siendo el tamaño medio de los tumores que no expresaron el *miRNA-203* de 22,76 mm de diámetro frente a 16,74 mm de media en los que lo expresaron. Nótese, como al contrario que el *miRNA-205*, la expresión del *miRNA-203*, tanto de forma general como en el frente de invasión, se asoció con variables clínico-patológicas indicadoras de buen pronóstico (Figuras 116-117, 123).

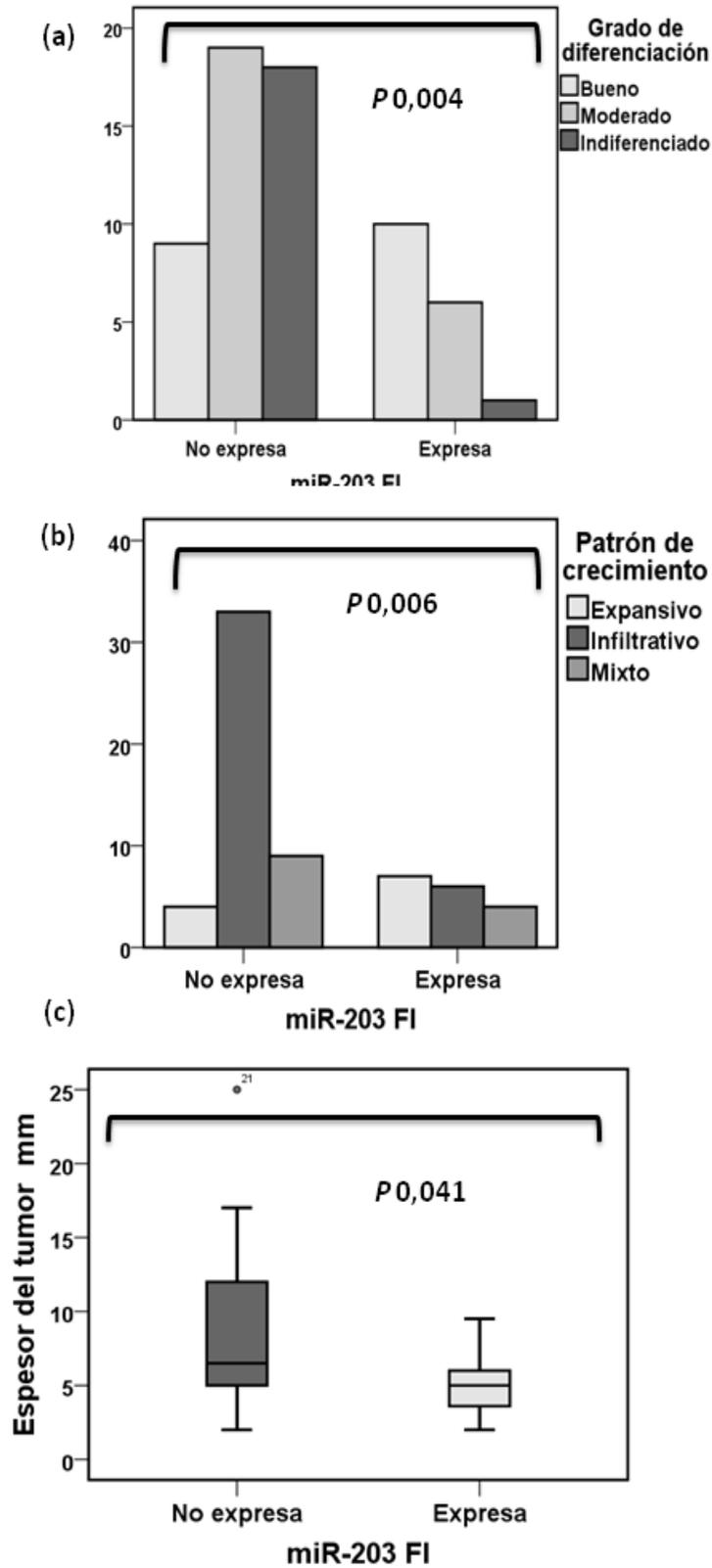


Figura 116: Asociaciones entre la expresión del miR-203 y algunas variables clínico-patológicas (I): (a) grado de diferenciación, (b) patrón de crecimiento, (c) espesor tumoral. FI (frente de invasión).

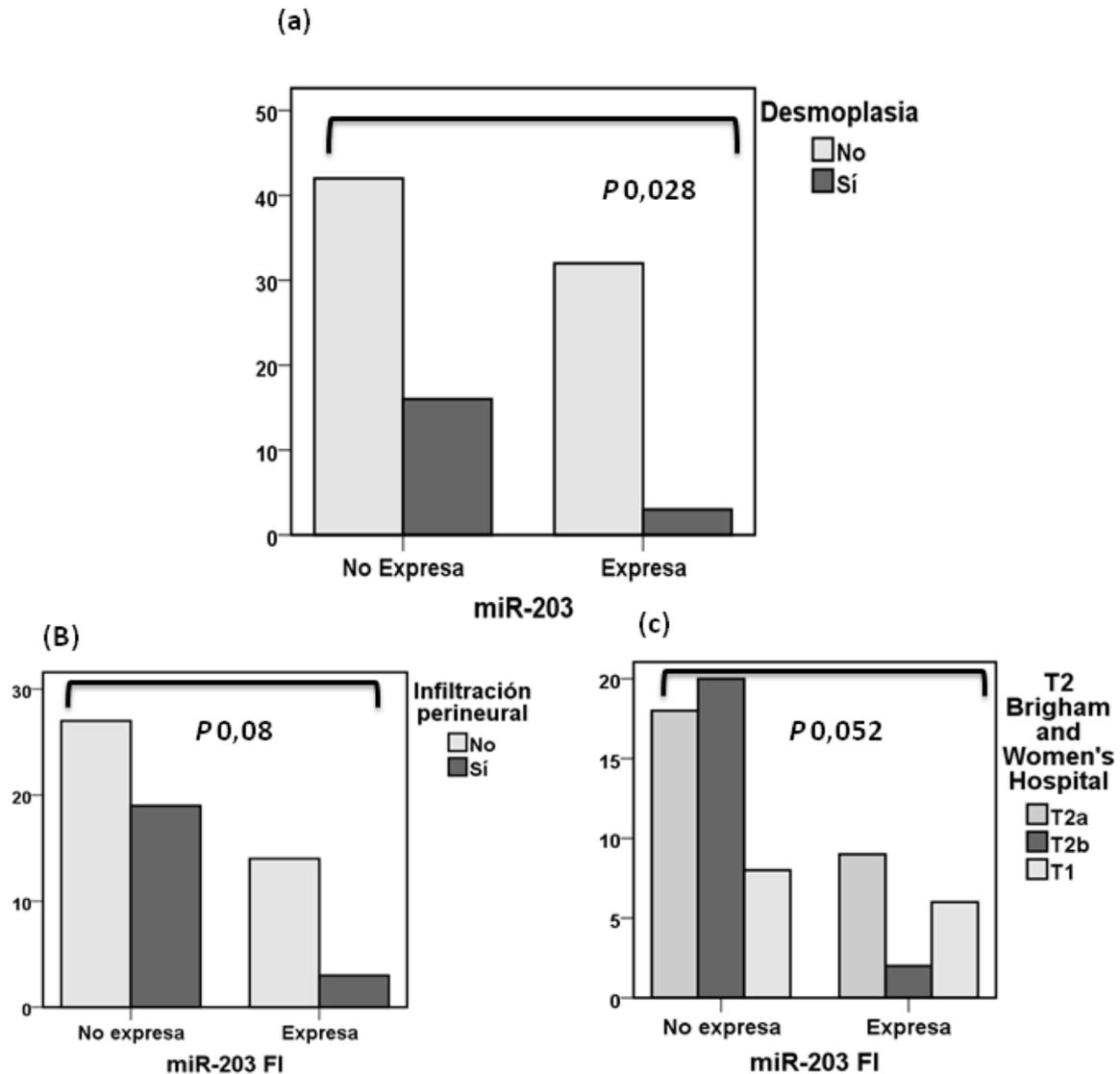


Figura 117: Asociaciones entre la expresión del miR-203 y algunas variables clínico-patológicas (II): (a) desmoplasia, (b) infiltración perineural, (c) Estadio T según la clasificación del Brigham and Women's Hospital.

4.3.4 Relación entre los niveles de expresión de los miRNA y los parámetros moleculares analizados en el CEC

a. miRNA-205

Las relaciones del *miRNA-205* con los parámetros moleculares estudiados se reflejan detalladamente en la Tabla 64. El *miRNA-205* se expresó más de forma estadísticamente significativa en los tumores que no expresaron E-CADHERINA ($P = 0,048$), y fue también más frecuente en los tumores que expresaron VIMENTINA ($P = 0,055$). Por otro lado, la expresión

del *miR*-205 fue más frecuente en los tumores que expresaron P63 ($P = 0,029$). La expresión del *miR*-205 fue menos frecuente en los tumores que expresaron CD44 que en los que no lo expresaron ($P = 0,002$) (Tabla 64 y Figura 118, 119, 123).

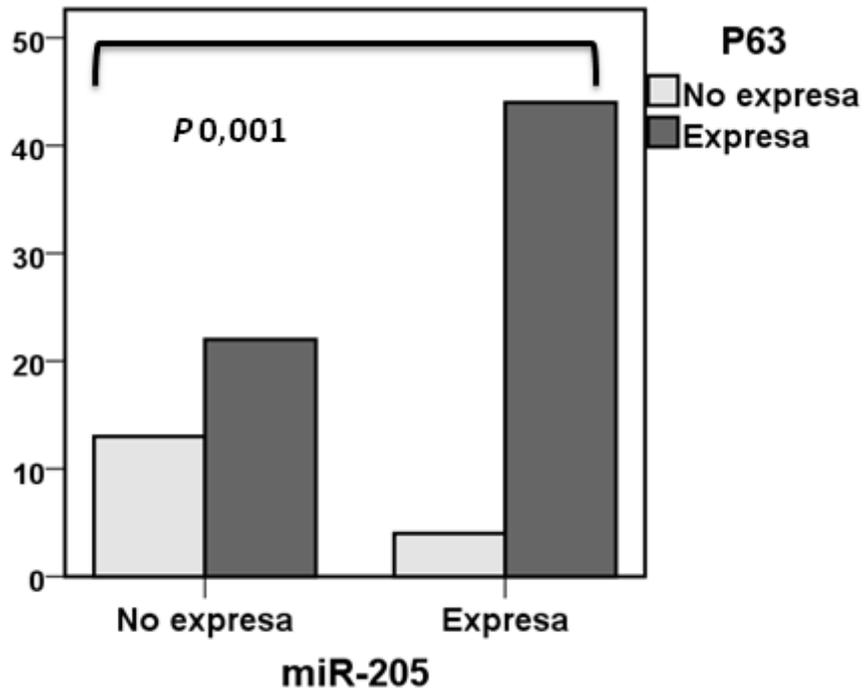


Figura 118: Asociación entre la expresión de *miR*-205 y la de P63.

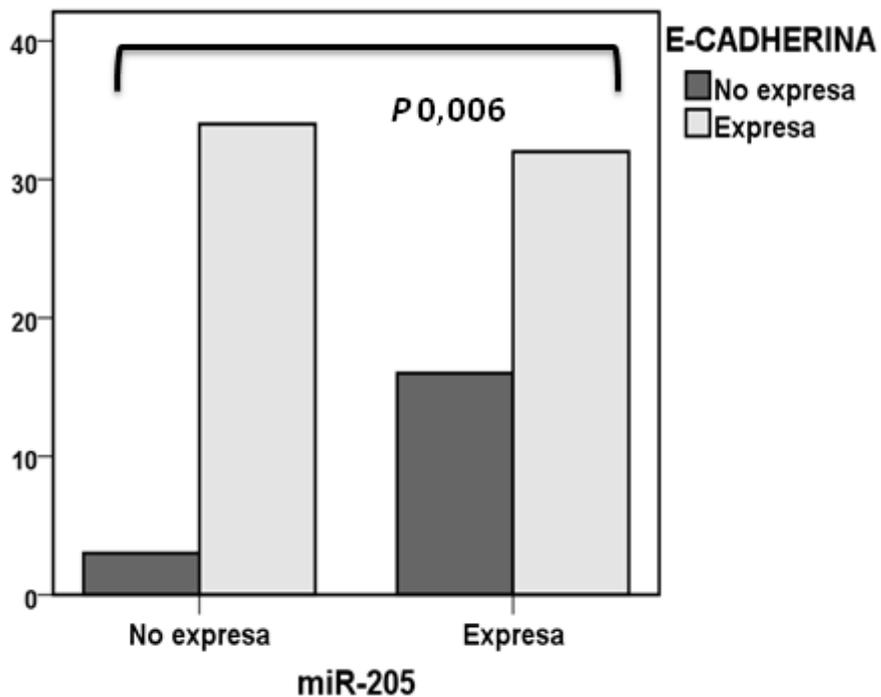


Figura 119: Asociación entre la expresión de E-CADHERINA y la de *miR*-205

b. miRNA-203

La expresión del *miRNA-203* se asoció con una serie de parámetros moleculares que se indican en la Tabla 64. La expresión del *miRNA-203* se comportó de manera opuesta a la de P63, de manera que la expresión de este miRNA fue más frecuente en los tumores que no expresaron P63 ($P = 0,001$); lo que concuerda con los datos que existen de la relación entre ambas moléculas en el epitelio cutáneo (Yi *et al.*, 2008), y es opuesta a la relación que tiene P63 con el *miRNA-205* (Wang *et al.*, 2013a). Asimismo, el *miRNA-203*, al revés de lo que sucede con el *miRNA-205*, se expresó más en los tumores que expresaron CD44, aunque sin alcanzar la significación estadística ($P = 0,074$) (Figura 120, 121, 123 y Tabla 64).

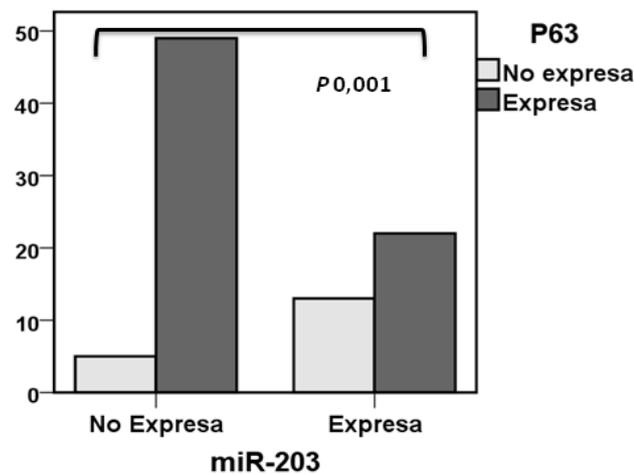


Figura 120: Asociación entre la expresión de *miRNA-203* y la de P63.

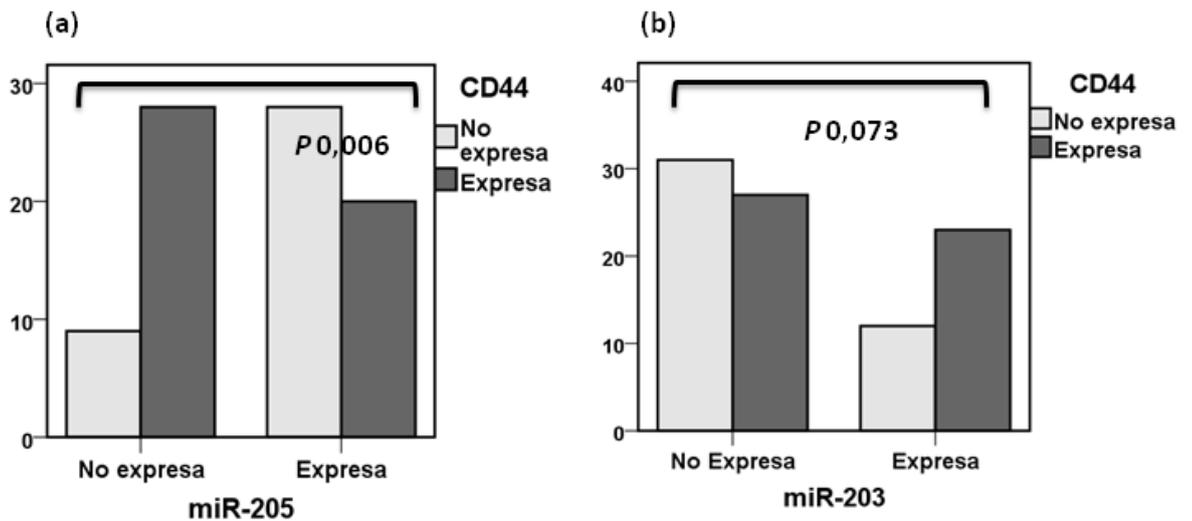


Figura 121: Asociación entre la expresión de los *miRNA-205* y *miRNA-203* con la expresión de CD44: (a) *miRNA-205* y CD44, (b) *miRNA-203* y CD44.

	miRNA203			miRNA205			
		Expresión	No expresión	P	Expresión	No expresión	P
Desmoplasia	Sí	3	16	0,028	16	3	0,006
	No	32	42		32	34	
Patrón de crecimiento	Expansivo	7	4	0,006	3	18	0,000027
	Mixto	4	9		9	6	
	Infiltrativo	6	33		36	13	
Grado de diferenciación	Bueno	10	9	0,004	9	18	0,006
	Moderado	6	19		25	15	
	Pobre	1	18		15	4	
Infiltración perineural	Sí	7	16	N.S.	18	5	0,014
	No	28	42		30	32	
Recidiva local	Sí	3	9	N.S.	10	2	0,043
	No	32	49		38	35	
T-BWH	T1	12	21	N.S.	12	14	0,012
	T2a	16	21		17	4	
	T2b	7	16		19	19	
Ulceración	Sí	21	30	N.S.	32	18	0,03
	No	11	15		8	14	
E-CADHERINA	Expresa	26	43	N.S.	32	34	0,006
	No expresa	9	14		16	3	
P63	Expresa	22	49	0,001	44	22	0,001
	No expresa	13	5		4	13	
CD44	Expresa	23	27	0,073	20	28	0,002
	No expresa	12	31		28	9	
VIMENTINA	Expresa	3	6	N.S.	7	1	0,055
	No expresa	32	50		39	36	

Tabla 64: Relación entre los niveles de expresión global de miR-203 y miR-205, y las variables clínico-patológicas y moleculares evaluadas. N.S (no significativo), T-BWH (estadio T según la clasificación del Brigham and Women's Hospital).

		<i>miRNA203</i> FI			<i>miRNA205</i> FI		
		Expresa	No expresa	<i>P</i>	Expresa	No expresa	<i>P</i>
Grado de diferenciación	Bueno	10	9	0,004	8	11	0,097
	Moderado	6	19		17	8	
	Pobre	1	18		14	5	
Patrón de crecimiento	Expansivo	7	4	0,006	3	9	0,006
	Mixto	4	9		6	5	
	Infiltrativo	6	33		30	10	
Desmoplasia	Sí	0	15	0,007	11	4	N.S.
	No	17	31		28	20	
Infiltración perineural	Sí	3	19	0,08	17	5	0,066
	No	14	27		22	19	
Ulceración	Sí	9	29	N.S.	28	12	0,024
	No	6	9		5	9	
Espesor	Me/RI	5 (4)	6,5 (7)	0,041	6,25 (7)	6 (5)	N.S.
Tamaño	Me/RI	16 (8)	20 (10)	0,045	20 (11)	18,5 (7)	N.S.

Tabla 65: Relación entre los niveles de expresión de miR-203 y miR-205 en el frente de invasión y las variables clínico-patológicas. FI (Frente de invasión), Me (mediana), RI (rango intercuartílico), N.S. (no significativo).

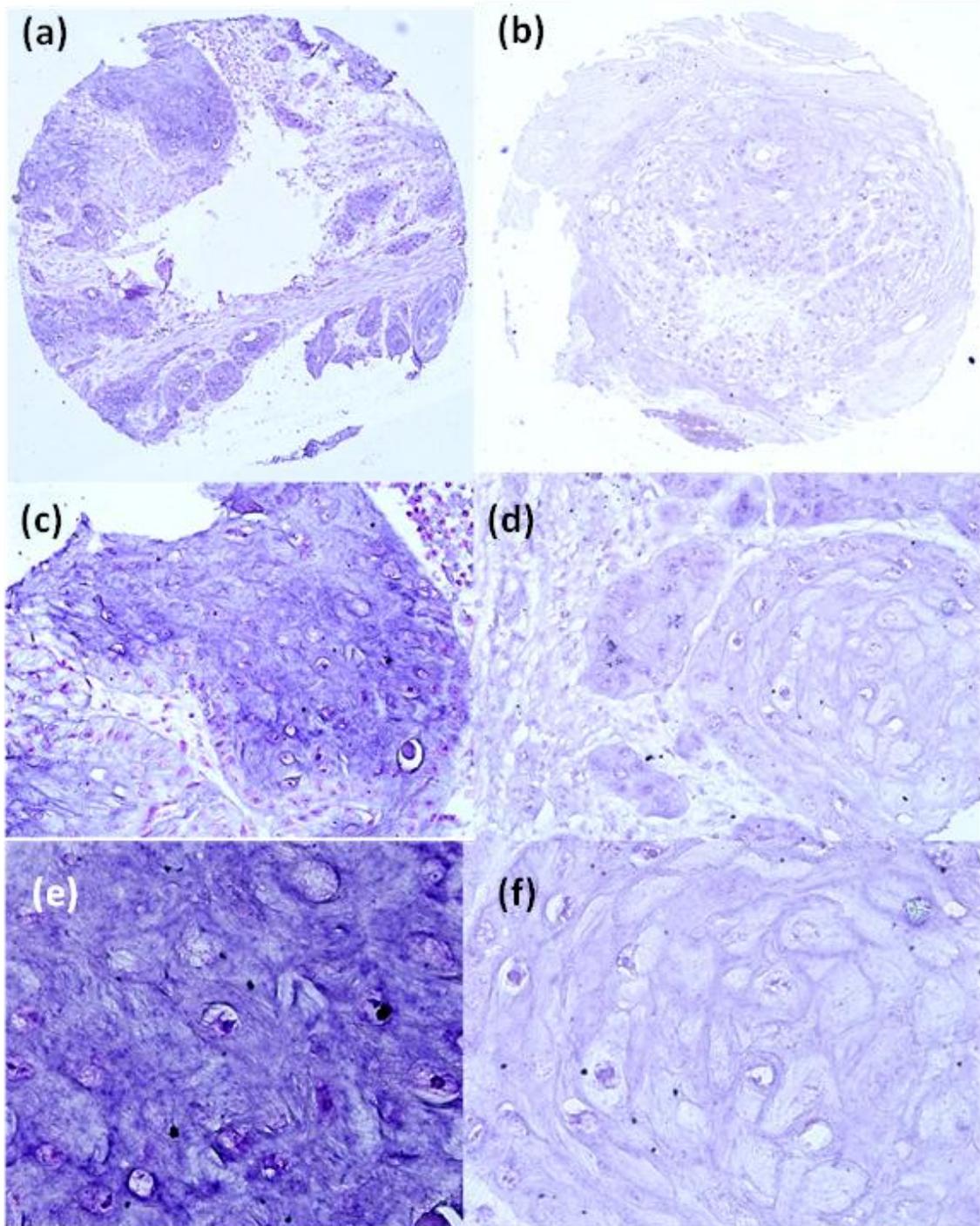


Figura 122: Tinción de miRNA-203 y de miRNA-205 en un tumor bien diferenciado. A la izquierda se observa una tinción intensa para miRNA-203 y a la derecha una ausencia de tinción del miRNA-205. (a) miRNA-203 100x, (b) miRNA -205 100x, (c) miRNA -203 200x, (d) miRNA -205 200x, (e) miRNA -203 400x, (f) miRNA -205 400x.

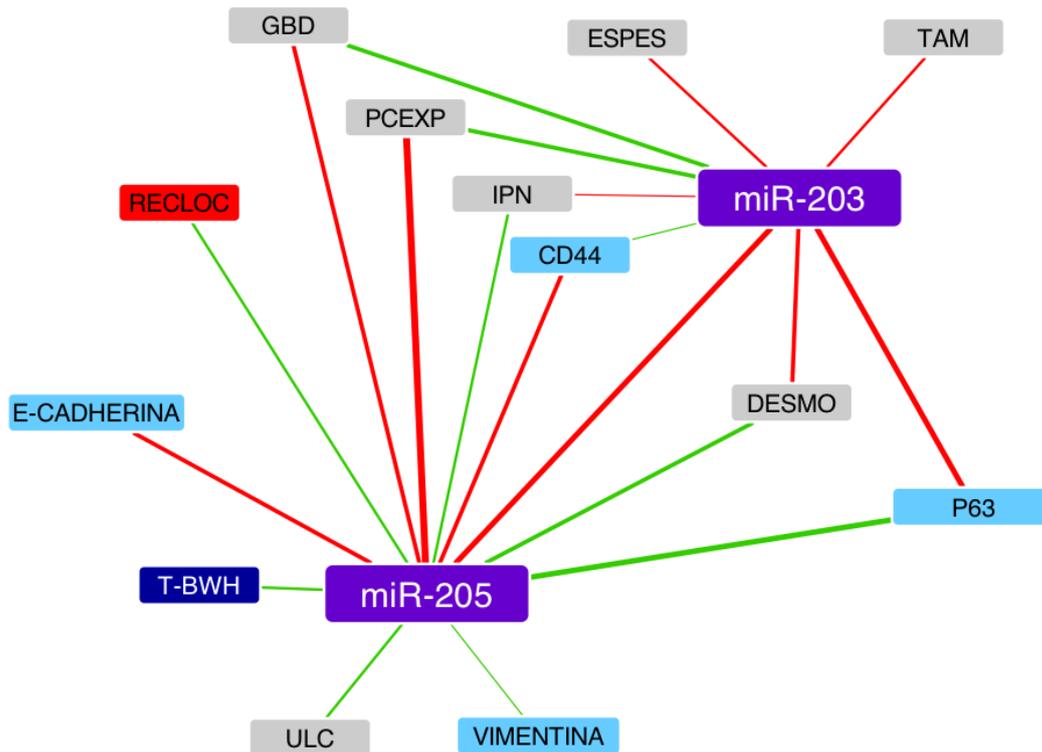


Figura 123: Red que muestra las asociaciones entre variables clínico-patológicas-evolutivas y las proteínas analizadas: Imagen obtenida mediante Cytoscape®. Cada nodo muestra una variable clínico-patológica, cada línea indica la asociación entre las variables, cuyo grosor es inversamente proporcional al valor de P . El color gris de los nodos representa variables histopatológicas, el color azul oscuro representa sistemas de estadiaje en el CEC, el color rojo eventos de mala evolución clínica, el color azul celeste las proteínas estudiadas, y el color morado representa los miRNA analizados. El color rojo de las líneas indica una asociación negativa y el color verde una asociación positiva entre las variables. RECLOC (recidiva local), TAM (tamaño), ESPES (espesor), ULC (ulceración), DESMO (desmoplasia), GBD (grado de diferenciación bueno), PCEXP (patrón de crecimiento expansivo), IPN (infiltración perineural), P63 (expresión intensa de P63), CD44 (expresión de CD44), E-CADHERINA (expresión de E-CADHERINA), VIMENTINA (expresión de VIMENTINA), T-BWH (estadio T2b según la clasificación alternativa del Brigham and Women's Hospital), miR-203 (expresión de miR-203), miR-205 (expresión de miR-205).

4.4 Evaluación de parámetros temporales de la enfermedad en función de la expresión de los miRNA estudiados

La expresión del *miR-203* se relacionó con la latencia hasta el desarrollo de la recidiva local en el CEC. La mediana de tiempo hasta la recurrencia fue de 4,8 meses en el grupo de tumores que no expresaron el *miR-203* y de 10,5 meses en el grupo de tumores que lo expresaron (Figura 124). Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($P = 0,015$; *log-Rank de Mantel-Cox*) y demuestran que la expresión del *miR-203* en el CEC primario se asocia a un alargamiento del periodo libre de enfermedad tras el tratamiento.

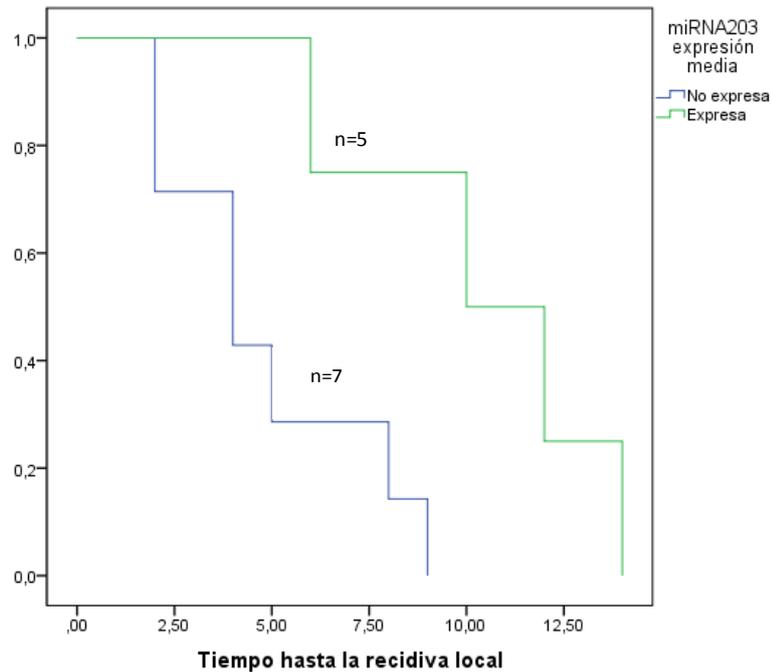


Figura 124: Gráfico de latencia hasta la recidiva local del CEC en relación con la expresión media de *miR-203* (Kaplan-Meier y $P = 0.015$ log-rank test).

Desde el punto de vista pronóstico, *miRNA-205* se relacionó, como queda expresado más arriba, con un mayor riesgo de recidiva local y la expresión de *miRNA-203* se relacionó con un alargamiento de la latencia hasta el desarrollo de la recidiva local durante el seguimiento. Aunque se realizaron estudios de regresión logística para intentar evaluar el valor de estos miRNAs como factores de riesgo independientes, no mostraron una fuerza suficiente en comparación con otras variables clínico-patológicas y moleculares. Esto es comprensible por cuanto ciertos aspectos fenotípicos de la enfermedad relacionados con mal pronóstico del CEC, son a menudo el resultado de varias vías moleculares y en este sentido es difícil que una única vía pueda tener una fuerza comparable. Sin embargo, con otro método de análisis multivariante (biplot logístico multinomial) los miRNAs sí son capaces de discriminar entre grupos pronósticos de la enfermedad mejor que las variables fenotípicas y el resto de las variables moleculares no combinadas con ellos, como veremos más adelante.

4.5 Análisis de la expresión de miRNA mediante QPCR en la serie de CEC

Se emplearon dos métodos para analizar la expresión de los miRNA seleccionados (*miRNA-203* y *miRNA-205*) en las muestras humanas: la QPCR y la hibridación *in situ*. La QPCR se llevó a cabo sobre muestras congeladas que se fueron recogiendo en un estudio prospectivo a lo largo de 5 años; el estudio de hibridación *in situ* se realizó sobre una serie más amplia que incluyó, además de parte de los anteriores, tumores de pacientes previamente recogidos sobre bloques de parafina y con evolución clínica ya conocida.

4.5.1 Nivel de expresión de miRNAs en los tumores humanos en que la validación se realizó tanto mediante QPCR como mediante hibridación *in situ*

Los niveles de expresión de los miRNA obtenidos por QPCR en nuestra serie de tumores humanos fueron normalizados y, posteriormente, se estudió la existencia de asociaciones con los parámetros clínico-patológicos. Esta serie de tumores fue evaluada para la expresión de miRNA tanto mediante hibridación *in situ* como mediante QPCR, con la idea de comparar los resultados obtenidos con ambos procedimientos (Tabla 66).

miRNAs ISH	<i>miRNA-205</i> ISH	No expresa	12	32,4
		Expresa	25	67,6
	<i>miRNA-203</i> ISH	No expresa	31	70,5
		Expresa	13	29,5
miRNAs QPCR	RQ <i>miRNA-203</i> (media/DS)		5,41 (8,27)	
	RQ <i>miRNA-205</i> (media/DS)		4,68 (7,97)	

Tabla 66: Resumen de los niveles de expresión de miRNAs en la serie de tumores que fueron evaluados mediante QPCR y ISH: DS (desviación estándar) ISH (hibridación *in situ*).

Se trató, por tanto, de una muestra de CEC de menor tamaño que la utilizada para llevar a cabo la hibridación *in situ*, bastante homogénea.

4.5.2 Relación entre los niveles de expresión de miRNA por QPCR en el CEC y las características clínico-patológicas y moleculares de los mismos

Lo primero que estudiamos fue la relación entre los niveles de expresión de miRNAs determinados por QPCR, con las características clínico-patológicas. No encontramos relación estadística con ninguno de los parámetros clínico-patológicos estudiados (datos no mostrados). Los niveles de expresión por QPCR para el *miRNA-205* fueron más altos en tumores pobremente diferenciados, que en los bien y moderadamente diferenciados, aunque sin demostrarse significación estadística. Lo que, globalmente, está de acuerdo con los datos obtenidos en la hibridación *in situ*. Con respecto a la relación con parámetros moleculares la expresión de *miRNA-205* fue más alta en los tumores que expresaron P63 ($P = 0,052$), en los que expresaron VIMENTINA ($P = 0,055$) y en los que no expresaron CD44 ($P = 0,071$), lo que guarda relación con las asociaciones encontradas por hibridación *in situ* con estas moléculas (Figura 125, Tabla 67).

Para el *miRNA-203*, su expresión fue más elevada en los tumores que expresaron intensamente E-CADHERINA, lo que guarda relación con el hecho de que el *miR-203* se expresó más en los tumores bien diferenciados; aunque no demostramos asociación entre el grado de diferenciación y la expresión de *miRNA-203* (Figura 126, Tabla 67). Globalmente, por lo tanto, se conservó cierto grado de relación entre la determinación de *miRNA-203* y *miRNA-205* por QPCR y por hibridación *in situ* pero el rendimiento fue mucho más bajo en cuanto a la falta de asociación con características clínico-patológicas. Aunque de ello hablaremos en el apartado de la discusión, podemos adelantar que esto es comprensible si se tienen en cuenta: (i) el tamaño menor de la muestra; (ii) que no analizamos exclusivamente células tumorales, sino una mezcla de éstas con otros componentes, como los estromales; y, sobre todo, (iii) que la porción del tumor que se tomó para la realización de la QPCR no fue, por definición, representativa de todo el tumor, sino de una parte, obtenida de forma aleatoria antes del estudio histopatológico.

		RQ <i>miRNA-205</i> (*)	P
P63	No expresión	0,78 (1,97)	0,052
	Expresión	1,53 (7)	
VIMENTINA	Nulo	1,08 (1,93)	0,055
	No nulo	7,08 (9,819)	
CD44	Nulo	2,27 (0,63)	0,071
	No nulo	1,08 (3,63)	
GD	Bueno	1,72 (2,448)	NS
	Moderado	1 (3,34)	
	Indiferenciado	7 (21,9)	
		RQ <i>miRNA-203</i> (*)	P
E-CADHERINA	No intenso	1 (7,43)	0,055
	Intenso	3,25 (2,70)	

Tabla 67: Tabla que resume las tendencias más importantes encontradas a partir del análisis de la expresión de *miR-205* y *miR-203* por QPCR. GD (grado de diferenciación). (*) Media y desviación estándar. NS (no significativo).

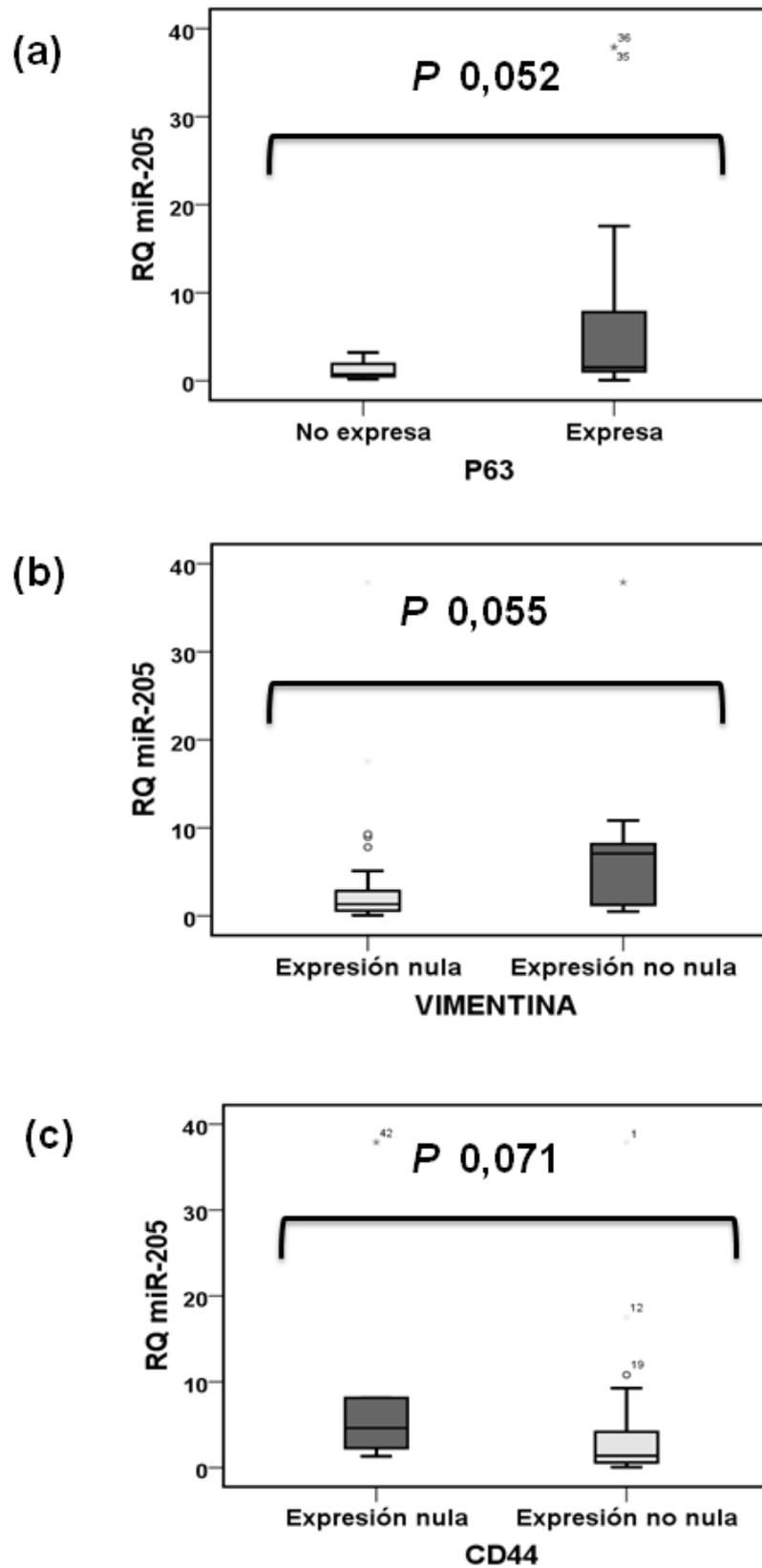


Figura 125: Relación entre la expresión de miR-205 cuantificada mediante QPCR y otras moléculas en el CEC: (a) P63, (b) VIMENTINA, y (c) CD44.

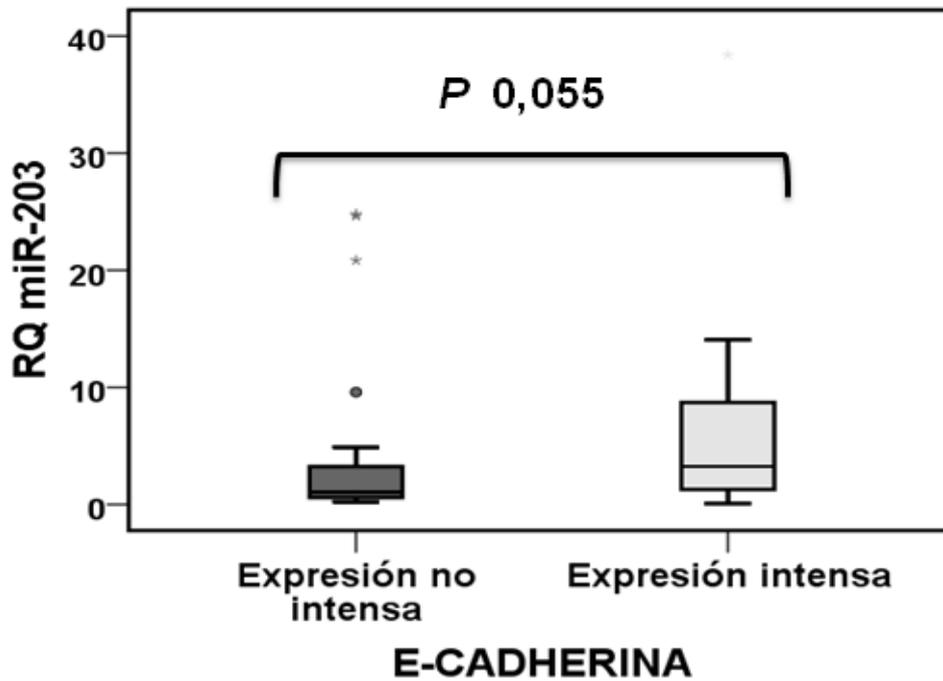


Figura 126 Asociación entre la expresión del miR-203 determinada por QPCR y la expresión de E-CADHERINA.

4.6 Comparación de la evaluación de los niveles de miRNAs en tumores humanos mediante QPCR y mediante hibridación *in situ*

Se compararon los valores de expresión de miRNAs obtenidos por hibridación *in situ* y los valores obtenidos mediante QPCR. Los resultados que se obtuvieron mediante la QPCR no fueron contradictorios con lo que obtuvimos mediante la hibridación *in situ*. De hecho, en parte guardaron una tendencia similar. Sin embargo el rendimiento proporcionado por la evaluación de miRNAs mediante QPCR fue muy inferior en términos de resultados relevantes obtenidos. El rendimiento obtenido con la determinación de *miRNA-203* fue menor que para *miRNA-205*.

5 IDENTIFICACIÓN DE CLÚSTERS CON DIFERENTE VALOR PRONÓSTICO EN FUNCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MIRNAS Y DE PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

Se llevó a cabo un análisis multivariante mediante un biplot logístico externo, con el fin de evaluar si los miRNAs contribuyen, junto con otras variables clínico-patológicas y moleculares, a la definición de agrupaciones de pacientes con perfiles pronósticos similares. En el modelo se seleccionaron las variables de los valores de expresión del *miR-203* y del *miR-205*, la infiltración perineural, el grado de diferenciación, el patrón de crecimiento y la desmoplasia (Tabla 68). La bondad de ajuste del modelo fue del 88,59%. Se detectaron cuatro clústeres de pacientes ordenados según dos gradientes pronósticos bien diferenciados en función de las variables explicativas seleccionadas en el modelo. El *cluster 1* (rosa en la Figura 127), con 17 pacientes (18,48%), representó a los pacientes con mejor pronóstico. Si proyectamos el valor de las variables de este clúster, comprobamos que todas ellas se encontraron en la región de la ausencia (no infiltración perineural, no desmoplasia, no patrón infiltrativo, no expresión del *miR-205*); excepto para el grado de diferenciación, que no fue bueno en un 52,94% de los casos, y la expresión del *miR-203* que se expresó en el 76,47% de los CEC del grupo. Para facilitar la interpretación, en el anexo se representa una figura similar a la 127 en la que en el gráfico se visualizan las direcciones sobre las que aparecen las diferentes variables.

Los pacientes que pertenecieron al *cluster 2* (azul en la Figura 127), fueron 32 (34,78%) y en el *cluster 3* (negro en la Figura 127) 18 pacientes (19,56%). Ambos ocuparon posiciones similares en relación con el gradiente horizontal, pero se diferenciaron en su relación con el gradiente vertical. Esto es, tuvieron características más parecidas en términos pronósticos –si bien el éste fue algo mejor para el clúster 2 que para el clúster 3-, con ciertas diferencias relacionadas con la presencia/ausencia de las variables. Estos dos clústeres fueron más heterogéneos en términos de la expresión de miRNAs que los clústeres 1 y 4, y tendrían un pronóstico intermedio. Así, en el *cluster 2*, que podría ser considerado el segundo en términos de buen pronóstico, el 78,12% de los tumores exhibieron un grado de diferenciación pobre o moderado, y un 71,87% de los casos un patrón infiltrativo. La infiltración perineural afectó al 6,25% y la desmoplasia al 3,1%. La expresión del *miR-203* y del *miR-205* para este clúster fue en el 56,25% y el 50% de los tumores, respectivamente.

El *cluster 3* sería el siguiente en términos de pronóstico y estuvo caracterizado porque un 5,55% de los tumores presentaron infiltración perineural, ninguno tuvo desmoplasia, todos fueron bien diferenciados y sólo el 16,6% exhibió patrón de crecimiento infiltrativo, ningún tumor expresó aquí el *miR-203* y el 55,5% de los casos expresó el *miR-205*.

El *cluster 4* (color rojo en la Figura 127), fue el de peor pronóstico y se caracterizó por incluir un 72% de CEC con infiltración perineural, un 68% de desmoplasia, un 100% con patrón infiltrativo, cerca de la mitad con grado de diferenciación moderado o pobre, un 28% con expresión del *miR-203* y un 88% con expresión del *miR-205*. En la Figura 127 se muestra la organización de los *clusters* según este biplot logístico bidimensional, en las Figuras 128 y 129 se demuestra la predictibilidad de los miRNAs y en la Figura 130 se demuestra el biplot tridimensional.

Los *clústeres* se construyeron en función de las variables señaladas más arriba, pero si se evalúa el desarrollo de eventos de mala evolución clínica entre los pacientes de los 4 *clusters*, se reproduce el gradiente pronóstico comprobado, de manera que en el cluster 1 se acortó el periodo libre de enfermedad en el 5,8%, en el clúster 2 en el 15,6%, en el clúster 3 en el 16,64% y en el clúster 4 en el 40%, diferencias que fueron estadísticamente significativas ($P = 0,037$). Es interesante señalar que en relación con los *clústeres*, el gradiente pronóstico se asoció con una progresiva mayor proporción de expresión del *miR-205* que fue desde el 0% en el *cluster 1* al 88% en el *cluster 4*, el de peor pronóstico. En cuanto a la expresión del *miR-203* en los clústeres, la tendencia fue inversa en relación con el gradiente pronóstico (Tabla 68).

	CLÚSTER 1	CLÚSTER 2	CLÚSTER 3	CLÚSTER 4
N	17	32	18	25
IPN (%)	0	6,25	5,55	72
DESMO (%)	0	3,12	0	68
PCINF (%)	0	50	16,66	100
GDMP (%)	52,94	78,87	0	44
MiR-203 (%)	76,47	56,25	0	28
MiR-205 (%)	0	50	55,5	88
EVENTOS	5,8 %	15,6 %	16,64 %	40 %

Tabla 68: Resumen de las características de los clústeres identificados en el estudio. N (número de pacientes), IPN (infiltración perineural), DESMO (desmoplasia), PCINF (patrón de crecimiento infiltrativo), GDMP (grado de diferenciación moderado o pobre).

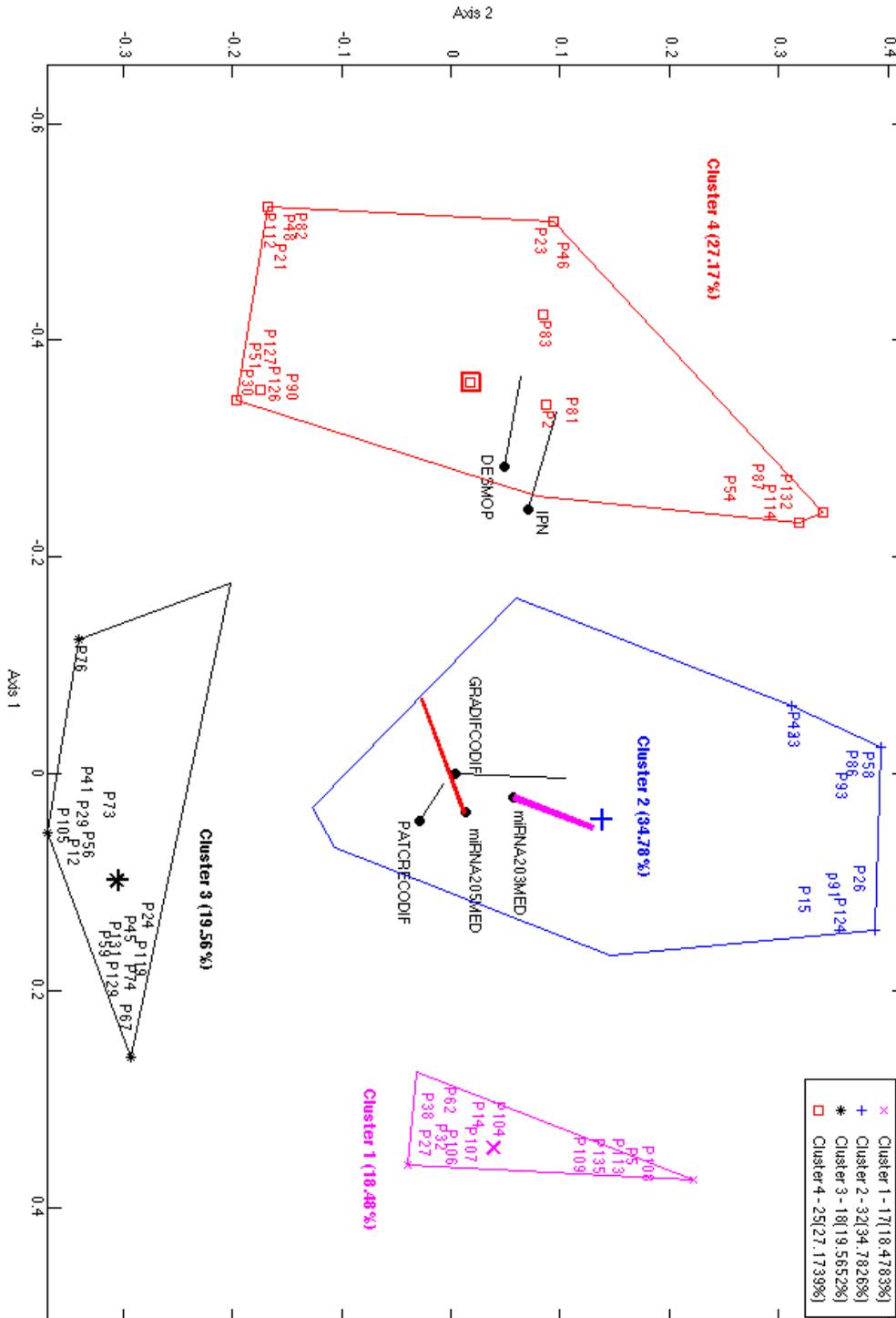


Figura 127: Biplot logístico bidimensional. El cluster 1 (rosa), con 17 pacientes (18,48%), incluyó a los casos con mejor pronóstico. Incluyó tumores sin infiltración perineural, sin desmoplasia, sin patrón infiltrativo, sin expresión del miR-205 y expresión del miR-203 en el 76,47% de los casos. El cluster 4 (rojo), fue el de peor pronóstico, con alta frecuencia de infiltración perineural, desmoplasia y patrón de crecimiento infiltrativo, con un 28% de los casos con expresión del miR-203 y un 88% de los mismos con expresión del miR-205. Los clústeres 2 y 3, representaron grupos de pronóstico intermedio.

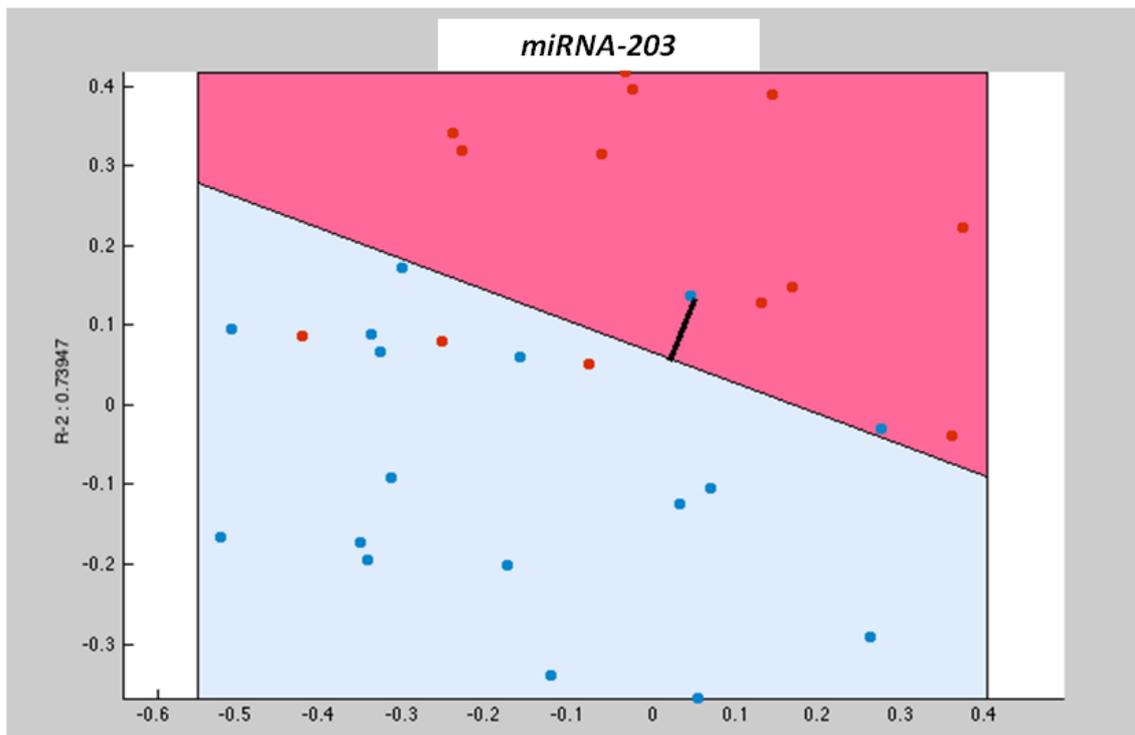


Figura 128: Predictibilidad de la expresión del miR-203 según el modelo derivado del biplot bidimensional.

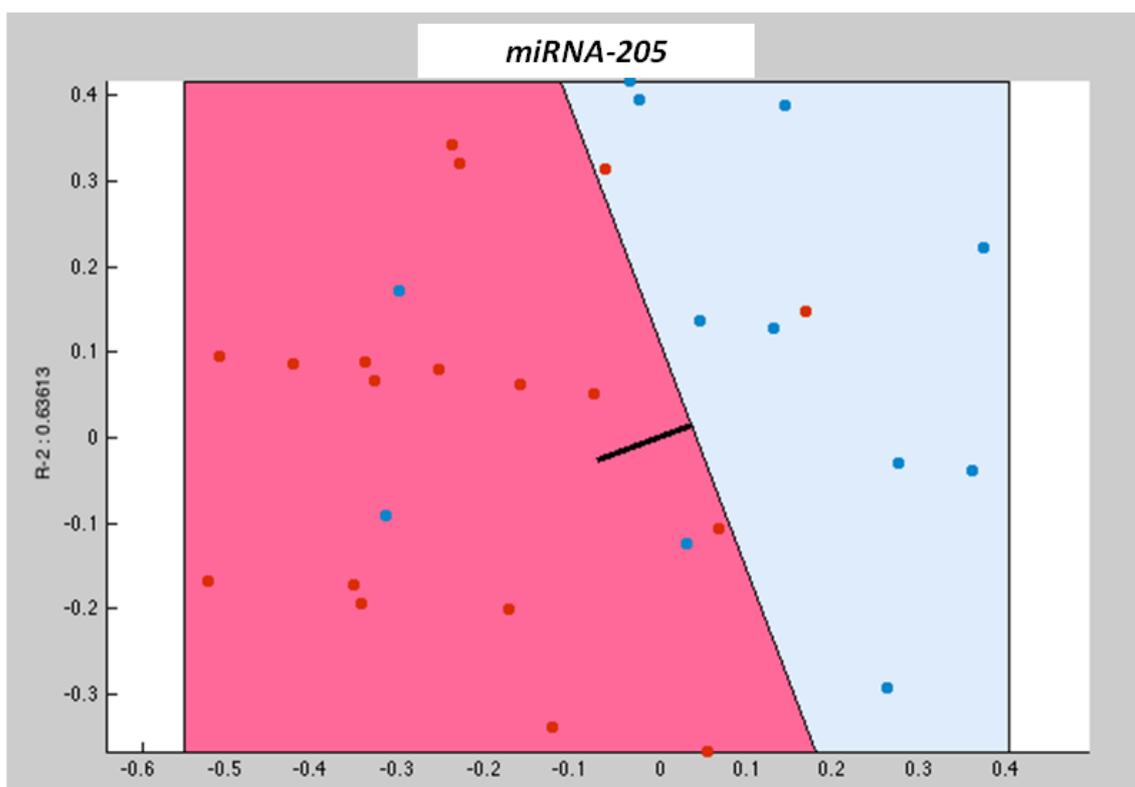


Figura 129: Predictibilidad de la expresión de miRNA-205 según el modelo obtenido del Biplot bidimensional.

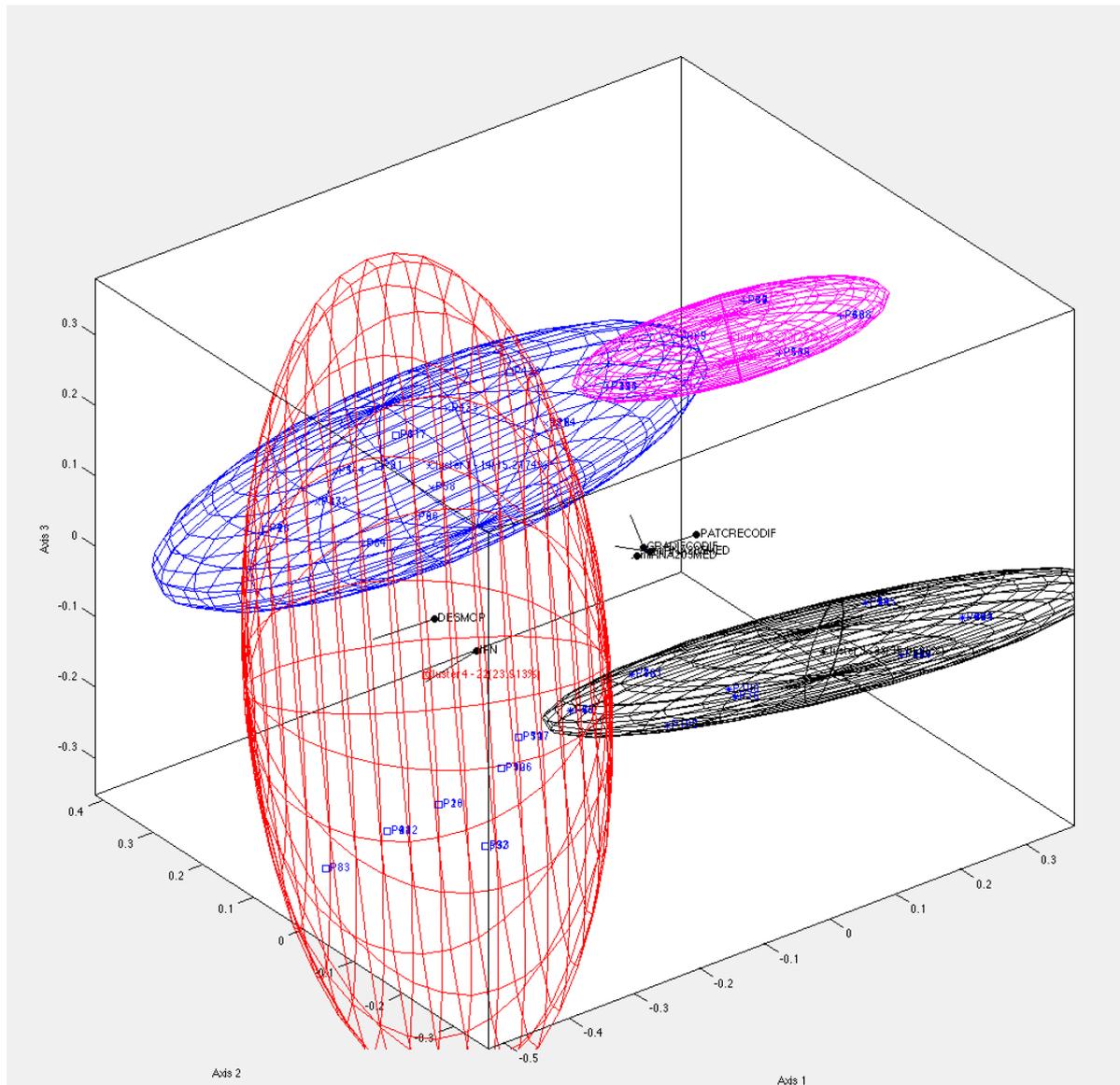


Figura 130: Biplot logístico tridimensional: El clúster 1 (rosa), representa a los pacientes con mejor pronóstico, el clúster 4 sería el de peor pronóstico y los clústers 2 y 3 serían aquéllos con pacientes que tienen un pronóstico intermedio.

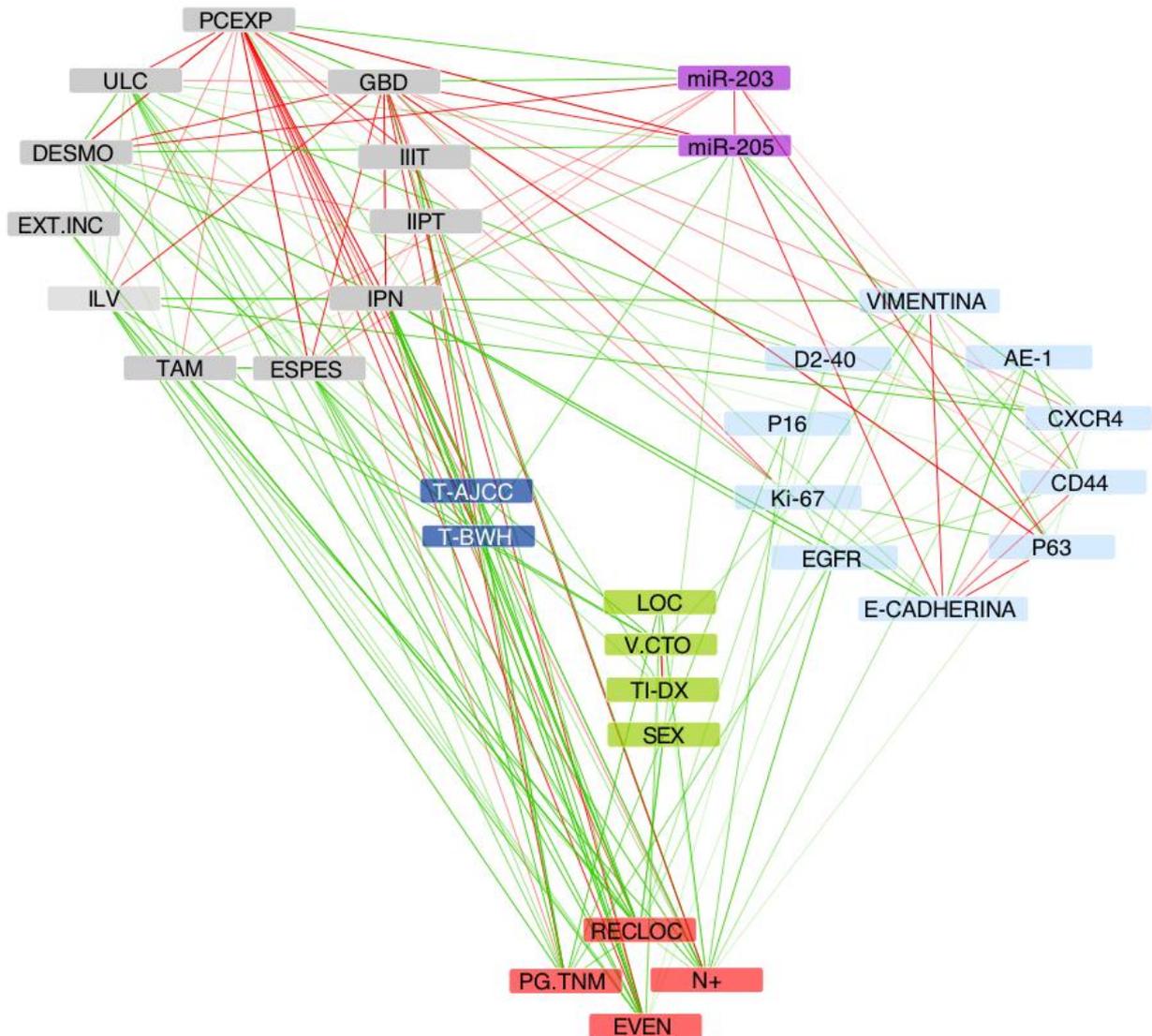


Figura 131: Red que muestra las asociaciones más importantes entre variables analizadas en el CEC: Imagen obtenida mediante Cytoscape®. Cada nodo muestra una variable clínico-patológica, cada línea indica la asociación entre las variables, cuyo grosor es inversamente proporcional al valor de P. El color gris de los nodos representa variables histopatológicas, el color verde representa variables clínicas, el color azul oscuro representa sistemas de estadiaje en el CEC, el color rojo eventos de mala evolución clínica, el color azul celeste muestra las proteínas analizadas y el color morado los miRs. El color rojo de las líneas indica una asociación negativa y el color verde una asociación positiva entre las variables conectadas. EVEN (eventos de mala evolución clínica considerados de forma global durante el seguimiento), N+ (desarrollo de metástasis ganglionares durante el seguimiento), RECLOC (recidiva local), PG.TNM (progresión del TNM durante el seguimiento), ESPES (espesor), TAM (tamaño), ULC (ulceración), DESMO (desmoplasia), GBD (grado de diferenciación bueno), PCEXT (patrón de crecimiento expansivo), IPN (infiltración perineural), ILV (infiltración linfovascular), IIIT (infiltrado inflamatorio intratumoral intenso), IIPT (infiltrado inflamatorio peritumoral intenso), EXT.INC (extirpación incompleta del tumor primario), V.CTO (velocidad de crecimiento rápida –más de 5 mm / mes -), TI-DX (tiempo hasta el diagnóstico menor de 2 meses), LOC (localización de alto riesgo), SEX (sexo mujer), T-AJCC (estadio T2 según la clasificación de la AJCC), T-BWH (estadio T2b según la clasificación del Brigham and Women’s Hospital), P63 (expresión intensa de P63), CD44 (expresión de CD44), CXCR4 (expresión intensa de CXCR4), E-CADHERINA (expresión de E-CADHERINA), AE-1 (expresión de AE-1), VIMENTINA (expresión de VIMENTINA), EGFR (expresión intensa de EGFR), Pab.EGFR (patrón aberrante de expresión de EGFR), D2-40 (expresión de D2-40), P16, (expresión de P16), Ki-67 (alto índice proliferativo), miR-203 (expresión de miR-203), miR-205 (expresión de miR-205).

6 COMPARACIÓN ENTRE EL GRUPO DE CEC CLÁSICO Y EL GRUPO DE ENFERMEDAD DE BOWEN Y CARCINOMA BOWENOIDE

El CEC es un proceso en múltiples fases, que se inicia en la piel normal y evoluciona hasta un carcinoma intraepitelial (queratosis actínica y enfermedad de Bowen). El motivo de incluir pacientes con enfermedad de Bowen en el estudio se debió a que durante el análisis de los datos observamos diferencias entre el grupo con enfermedad de Bowen y el grupo de CEC típico. Además, vimos que unos cuantos tumores invasores, clasificados como “carcinomas bowenoides” (CB) tuvieron unas características que, histopatológicamente y desde el punto de vista molecular, les conferían mucho más parecido con la enfermedad de Bowen que con el resto de los CEC; y en ese punto pensamos que debíamos analizar dicho grupo por separado, a pesar de que el tamaño de la muestra fuera pequeño.

6.1 Nivel de expresión de miRNA determinados por hibridación *in situ* en tejidos en parafina en nuestra cohorte de CB

En el caso del *miRNA-205*, en 14 casos la tinción fue negativa o escasa y únicamente en 3 casos fue moderada o intensa. En relación con el *miRNA-203*, en 18 casos la tinción fue nula o escasa y únicamente en 1 caso la tinción fue moderada o intensa.

6.2 Relaciones entre el grupo de CEC clásico y el grupo de enfermedad de Bowen y “carcinoma bowenoide”

Las diferencias principales entre el CEC clásico y el “CEC bowenoide/enfermedad de Bowen” se recogen en la (Tabla 69). Brevemente, en relación con el **grado de diferenciación**, los 20 casos del grupo del “CEC bowenoide” fueron indiferenciados, con células de gran tamaño, en algunos casos con citoplasma claro, mitosis abundantes, núcleos grandes, nucléolos prominentes, pleomorfismo celular y ausencia de puentes intercelulares, frente a sólo un 19,4% (19/98) en el grupo de CEC clásico. En este último grupo, la mitad de los casos tuvieron un grado de diferenciación moderado y el 30,6% (30/98) fueron bien diferenciados. En los casos de enfermedad de Bowen, en los que la capa basal se encontraba respetada, las células basales fueron pequeñas y cuboidales, y contrastaron claramente con las células atípicas intraepiteliales, que reprodujeron las características antes comentadas ($P < 0,0001$).

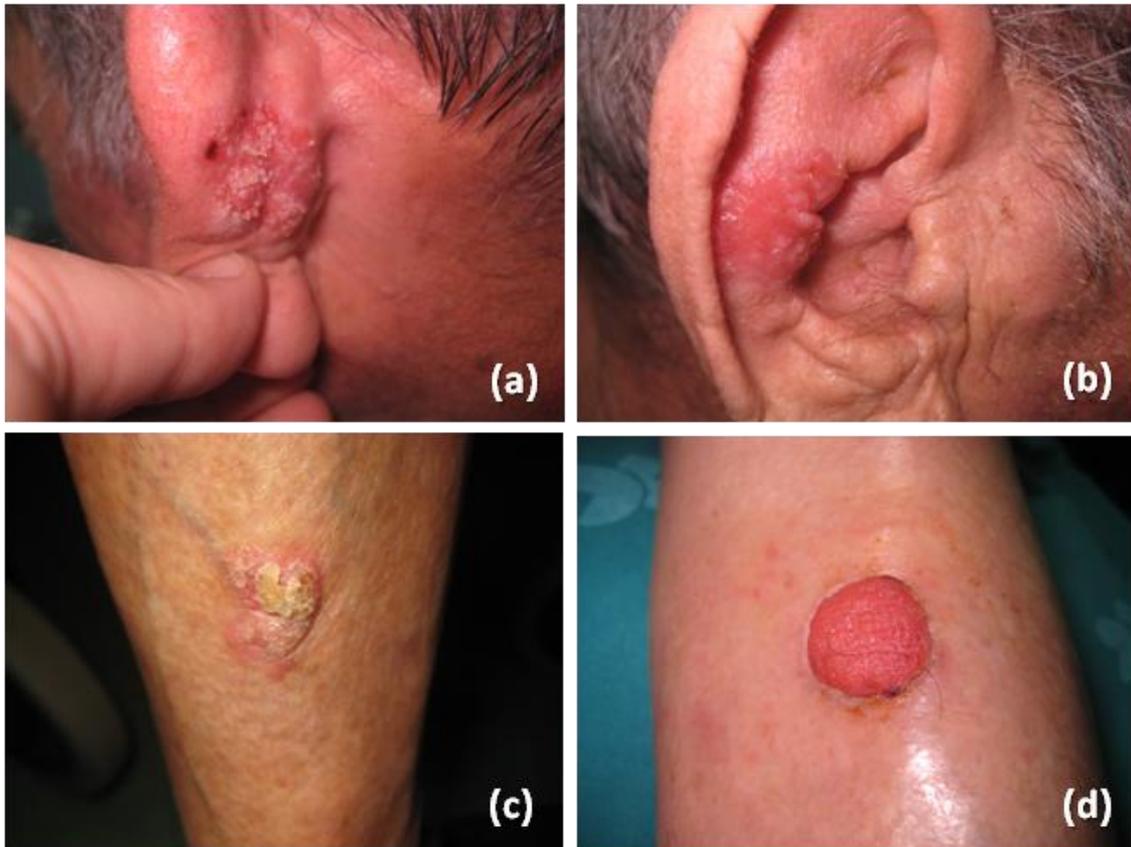


Figura 132: Enfermedad de Bowen y carcinoma bowenoide: Enfermedad de Bowen en la imagen de la izquierda(a) y (c). Carcinoma bowenoide (b) y (d) en la imagen de la derecha.

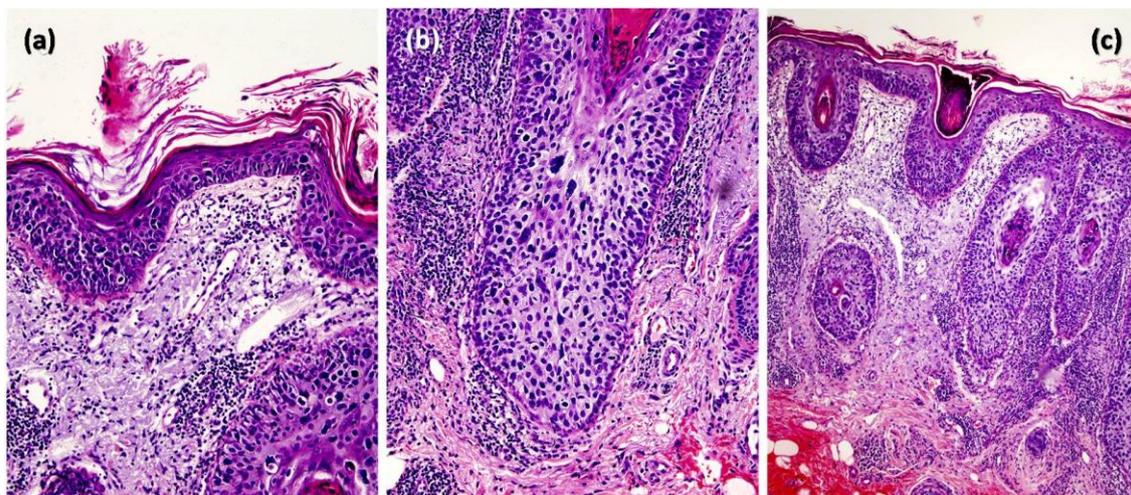


Figura 133: Histopatología de enfermedad de Bowen. Carcinoma intraepitelial con invasión de los folículos pilosebáceos (a y c). Intenso pleomorfismo celular a expensas de células de gran tamaño, con nucleos irregulares y mitosis (b).

De los 12 tumores invasivos presentes en el grupo de enfermedad Bowen y carcinoma bowenoide, “grupo bowenoide” de ahora en adelante, más del 90% (10/11) presentaron un **patrón de crecimiento** expansivo, frente al 26% (25/96) en el grupo de CEC dásico. Ninguno tuvo un patrón de crecimiento infiltrativo frente a un 56,3% (54/96) en el grupo de CEC clásico, y menos del 10% presentaron un patrón de crecimiento mixto frente a un 17,7% (17/96) en el grupo de CEC típico. Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($P < 0,0001$).

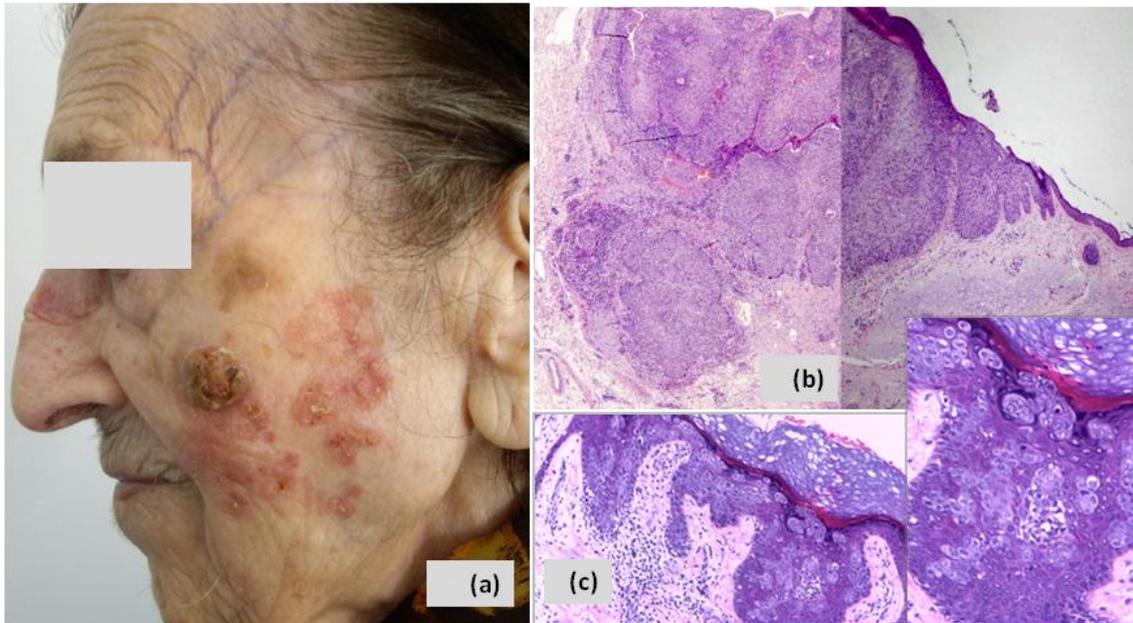


Figura 134: Carcinoma bowenoide y enfermedad de Bowen: Carcinoma bowenoide, sobre enfermedad de Bowen, en mejilla izquierda (a). El estudio dermatopatológico muestra un carcinoma indiferenciado con crecimiento expansivo (b). A mayor detalle la proliferación intraepidérmica de células tumorales en las áreas de carcinoma “in situ” (enfermedad de Bowen) (c).

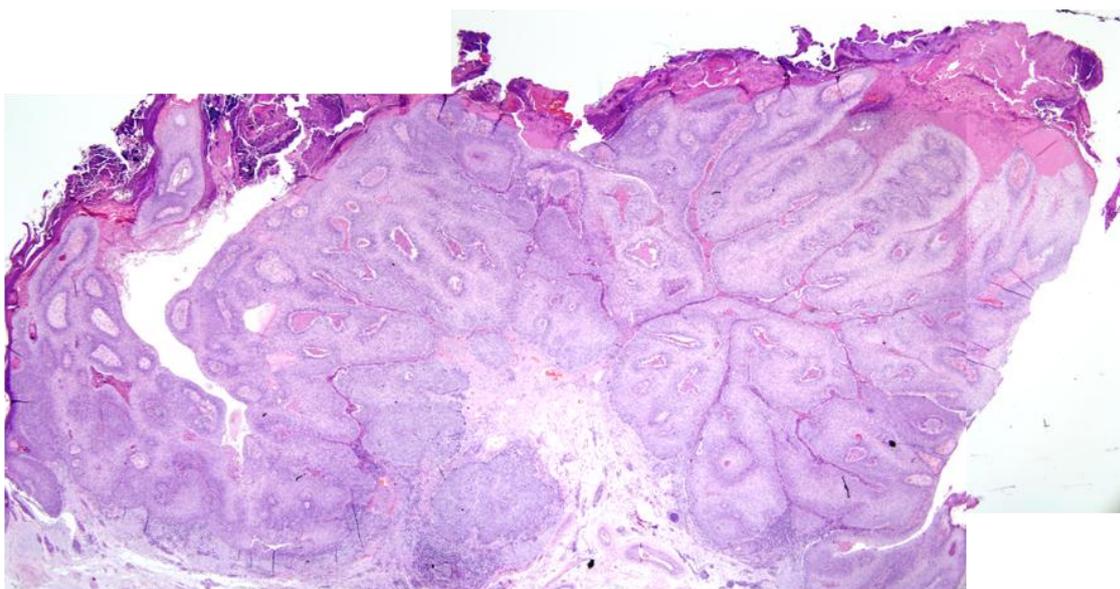


Figura 135: Carcinoma bowenoide. Tumoraación indiferenciada de células claras con crecimiento expansivo.

Respecto a la **queratosis actínica asociada al tumor**, ésta se presentó en un 72,9% de los CEC clásicos (70/96), frente a un 50% en el “grupo Bowen” (10/20) ($P = 0,044$).

Con respecto a la **infiltración perineural**, sin alcanzar la significación estadística, hubo una diferencia clara ($P = 0,065$) entre estos dos grupos. Así, ninguno de los casos del “grupo bowenoide” exhibió infiltración perineural (obviamente, esto no podía suceder en los casos intraepiteliales, pero tampoco pasaba en los 12 casos de “carcinoma bowenoide” invasor), frente a un 22,7% de casos del grupo de CEC típico (22/97). En relación con la **desmoplasia**, frente a un 19,38% de tumores del “grupo de CEC clásico” (19/98) en las que se objetivó, no existió ningún caso en la enfermedad de Bowen y “carcinoma bowenoide” con estos rasgos ($P = 0,040$).

En cuanto a la comparación de marcadores proteínicos y de miRNA entre los dos grupos, en este punto se demostraron diferencias estadísticamente significativas para varios de los marcadores analizados como AE1, P16, D2-40 y una tendencia estadística para VIMENTINA (Tabla 69). Además, fueron muy evidentes las diferencias en la expresión de los *miRNA-205* y *miRNA-203* entre ambos grupos. Así, frente a un 75,3% de los tumores del grupo CEC típico que expresaron **AE1** (70/93), un 94,4% de los casos lo expresaron en el “grupo Bowen” (17/18) ($P = 0,024$). En relación con la expresión de **P16**, frente a un 58,9% que tuvieron una expresión negativa de este marcador en el grupo de CEC típico (56/95), la proporción bajó hasta el 27,8% en el “grupo bowenoide” (5/18). Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($P = 0,015$). La expresión de **D2-40** también exhibió diferencias marcadas entre los dos grupos. Así, frente a un 59,6% con expresión negativa para este marcador en el grupo del CEC típico (56/94), casi el 90% presentaron expresión negativa en el “grupo Bowen” (89,5%, 17/19; $P = 0,013$). En relación con la expresión de **VIMENTINA**, globalmente, ésta se expresó más en el grupo del CEC típico y menos en el “grupo bowenoide”, aunque no se alcanzó la significación estadística ($P = 0,070$) (Tabla 69). En el grupo bowenoide la expresión de P63 fue muy frecuente y se mantuvo la expresión de **E-CADHERINA** (Figura 136)

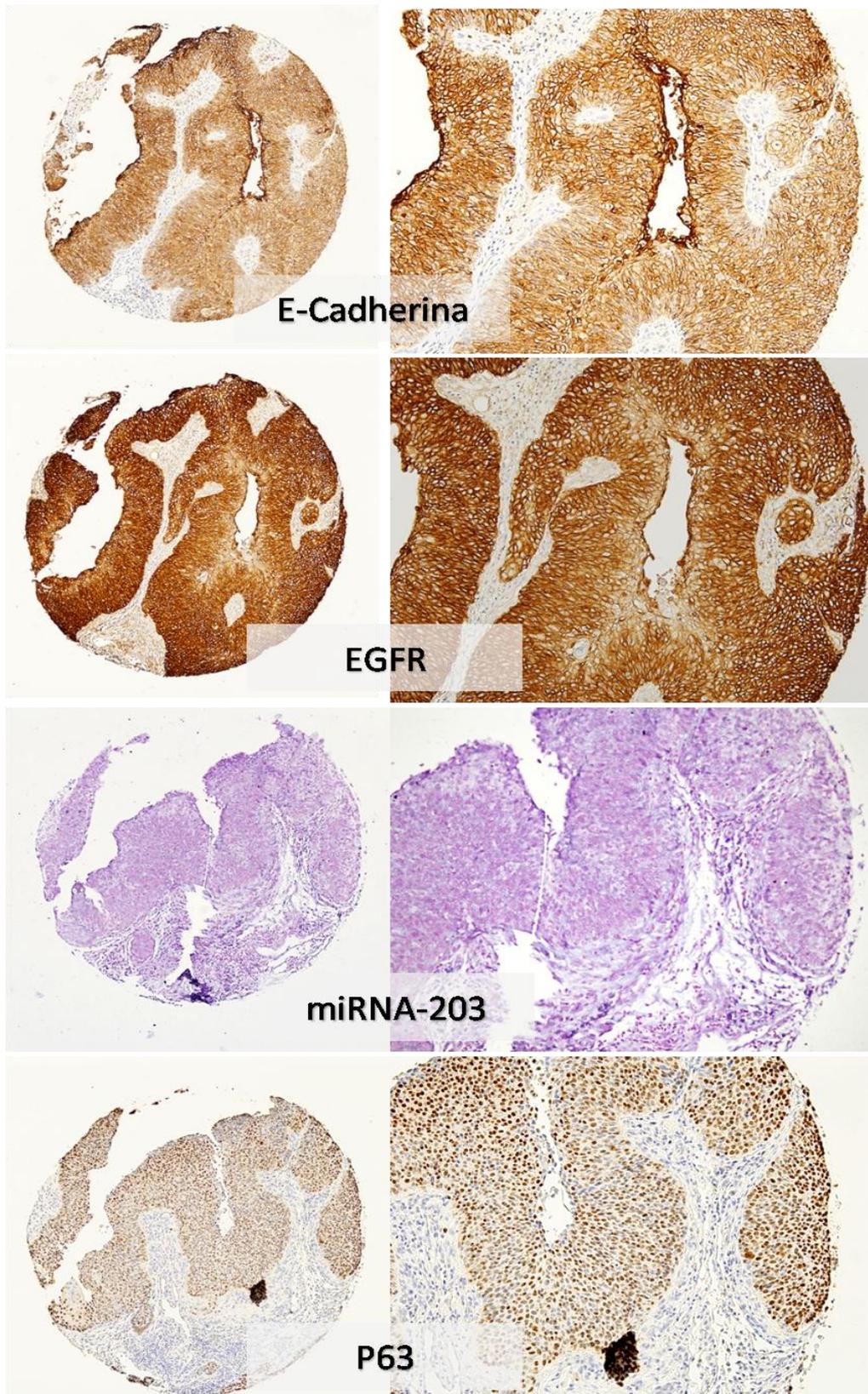


Figura 136: Inmunohistoquímica en el carcinoma bowenoide. Expresión intensa de E-CADHERINA, EGFR y P63. Ausencia de expresión de miRNA-203, con un patrón de expresión inverso al de P63. Se aprecia expresión aberrante (citoplásmica) de EGFR.

En cuanto a la expresión diferencial de miRNA entre ambos grupos, existieron diferencias estadísticamente significativas en la expresión del *miRNA-203* y *miRNA-205*. Así, frente a un 56,4% de tumores del grupo de CEC típico que no expresaron el *miRNA-203* (53/94), el 90% de los casos del “grupo bowenoide” no lo hicieron (18/20) ($P = 0,05$). Estas diferencias son interesantes puesto que en los tumores del “grupo bowenoide”, las células tienden a no diferenciarse y, efectivamente, el *miRNA-203* juega un papel fundamental a este respecto en el desarrollo de la estratificación de la piel y los epitelios en general. Sobre este punto profundizaremos en el apartado de la discusión. En el caso del *miRNA-205*, en cambio, frente a un 62,8% de tumores en el grupo del CEC dásico (59/94) que lo expresaron, sólo el 30% del “grupo bowenoide” lo hizo (6/20) ($P = 0,007$) (Tabla 69).

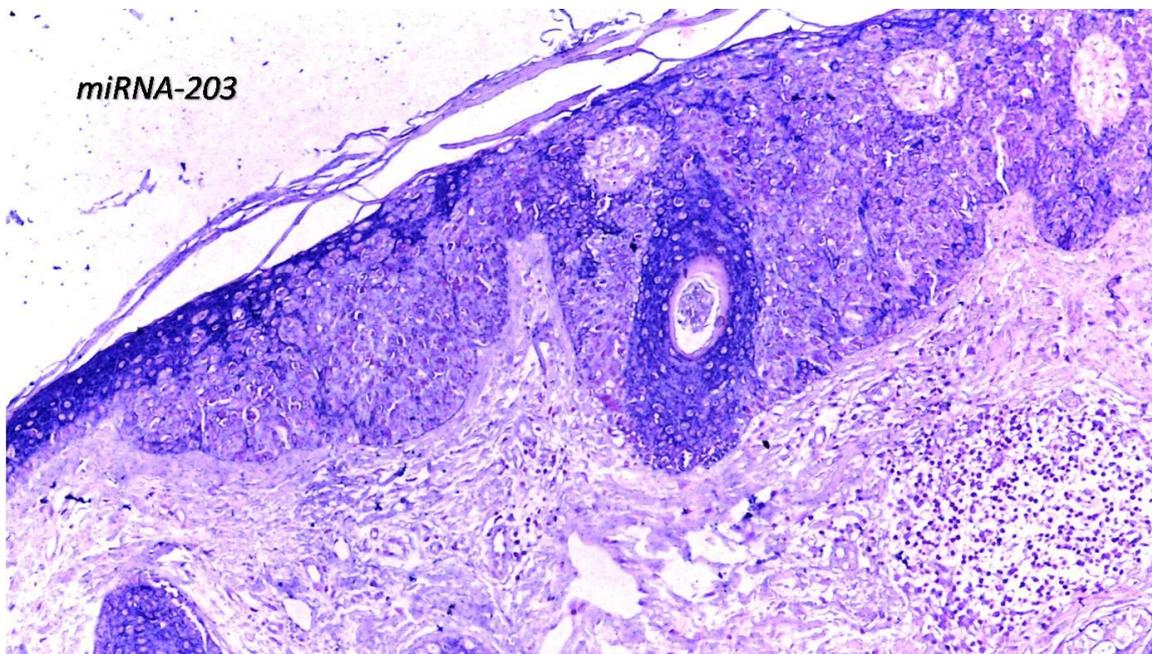


Figura 137: Expresión del *miRNA-203* en la enfermedad de Bowen: Pérdida de expresión de *miRNA-203*. Se mantiene la expresión en la zona intrapidérmica del epitelio folicular.

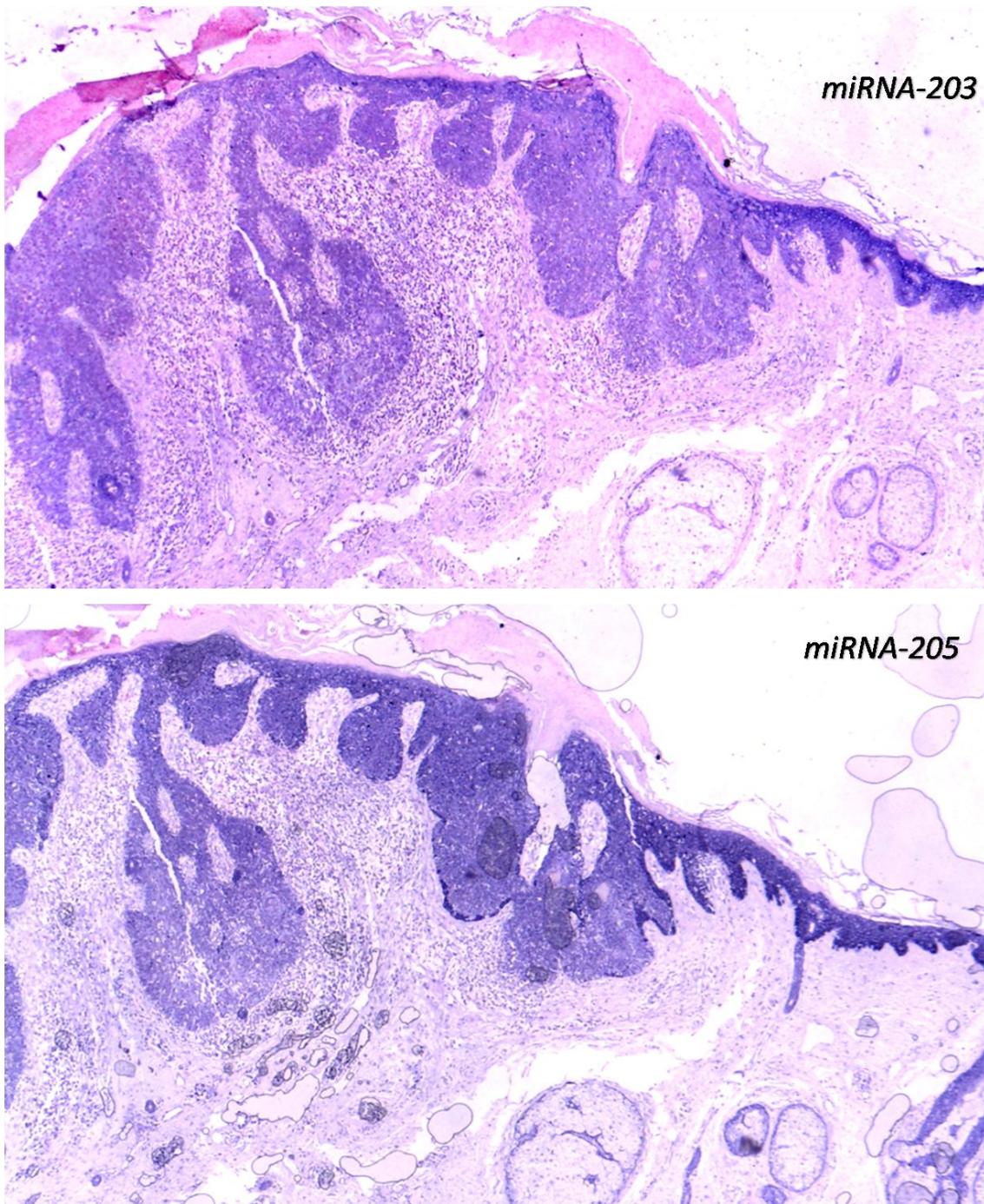


Figura 138: Expresión de miRNA-203 y miRNA-205 en el carcinoma bowenoide. Pérdida de expresión de miRNA-203 y miRNA-205 con relación a la piel normal adyacente.

	CEC	EB/CECB	P
Grado de diferenciación			
Bueno	30	0	0,0001
Moderado	49	0	
Indiferenciado	19	20	
Patrón de crecimiento			
Expansivo	26	10	0,0001
Infiltrativo	54	0	
Mixto	17	1	
No aplicable	0	9	
Queratosis actínica asociada a tumor			
Sí	70	10	0,044
No	26	10	
Infiltración perineural			
Sí	22	0	0,065
No	75	20	
Desmoplasia			
Sí	19	0	0,040
No	79	20	
D2-40			
Nulo	56	17	0,013
No Nulo	38	2	
P16			
Nulo	56	5	0,015
No Nulo	39	13	

Tabla 69: Tabla que muestra las diferencias más significativas entre los grupos de CEC típico y bowenoide encontradas en nuestro estudio. CEC (carcinoma epidermoide cutáneo), EB/CECB (enfermedad de Bowen/carcinoma epidermoide cutáneo bowenoide).

7 RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE ESTE TRABAJO DE TESIS DOCTORAL EN FUNCIÓN DE LOS OBJETIVOS

El objetivo global de esta tesis doctoral fue definir mejor el pronóstico del CEC. A continuación presentamos un resumen de los resultados obtenidos por objetivo específico (Figura 5 y Figura 48).

7.1 Resumen de los resultados del OBJETIVO 1: Definición del pronóstico del CEC a partir de características clínico-patológicas (nivel 1)

El objetivo 1 de esta tesis doctoral consistió en definir el pronóstico del CEC en función de las asociaciones del nivel clínico-patológico. Para ello, definimos asociaciones entre distintas características clínico-patológicas y evaluamos la capacidad de dichas características para definir el pronóstico de forma individual y colectiva mediante modelos de análisis multivariante. Así, se identificaron como rasgos clínico-patológicos de alto riesgo en el CEC y se relacionaron con el desarrollo de eventos de mala evolución clínica durante el seguimiento los siguientes: el tamaño horizontal y espesor tumorales, la infiltración perineural y linfovascular, el grado de diferenciación, el patrón de crecimiento, la ulceración, la desmoplasia, la recidiva local, la localización de alto riesgo, el sexo femenino, la velocidad de crecimiento y la presencia de infiltrados inflamatorios.

7.1.1 Asociaciones entre distintas características clínico-patológicas

El **tamaño** y el espesor del CEC correlacionaron entre sí (Figura 59). Un tamaño tumoral mayor se relacionó con una velocidad de crecimiento más alta. El **espesor** se asoció con la presencia de infiltración perineural, con el patrón de crecimiento infiltrativo y con el grado pobre de diferenciación del CEC.

El grado pobre de **diferenciación** se relacionó con el patrón de crecimiento infiltrativo, con la presencia de infiltración perineural y linfovascular, con la desmoplasia y con la ulceración. Por otro lado, los tumores indiferenciados exhibieron más frecuentemente un infiltrado inflamatorio intratumoral intenso y un infiltrado inflamatorio peritumoral escaso o ausente. Además, los tumores pobremente diferenciados presentaron un mayor espesor (Tabla 21).

La **infiltración perineural** se relacionó con el grado pobre de diferenciación, el patrón de crecimiento infiltrativo, la infiltración linfovascular, la presencia de desmoplasia, la ulceración y un espesor tumoral mayor (Tabla 25). La **infiltración linfovascular** se relacionó con el grado pobre de diferenciación, el patrón de crecimiento infiltrativo, la ulceración, estadios tumorales mayores al diagnóstico (según la clasificación alternativa del Brigham and Women's Hospital), con la presencia de infiltración perineural y tendió a ser más frecuente en los tumores que presentaron estroma desmoplásico (Tabla 26).

La **desmoplasia** se relacionó con la infiltración perineural, con el grado pobre de diferenciación, el patrón de crecimiento infiltrativo, la ulceración y tendió a asociarse con tumores de mayor tamaño y espesor. A pesar de no estar incluido en el estadiaje del CEC, la presencia de desmoplasia se asoció a estadios tumorales mayores al diagnóstico. Desde otro punto de vista, los tumores con desmoplasia exhibieron más a menudo ausencia o escaso infiltrado inflamatorio peritumoral (Tabla 23).

El **patrón de crecimiento** infiltrativo se relacionó con la presencia de infiltración perineural y linfovascular, así como con el espesor y tamaño tumorales, con el grado pobre de diferenciación y con la desmoplasia. A pesar de no ser un parámetro incluido en los sistemas de estadiaje del CEC, el patrón de crecimiento infiltrativo se asoció a estadios tumorales más altos al diagnóstico. Además, los tumores con patrón de crecimiento infiltrativo exhibieron más a menudo un infiltrado inflamatorio intratumoral intenso. Por otro lado, los tumores con patrón de crecimiento expansivo tendieron a diagnosticarse más precozmente (Tabla 22).

La **ulceración** del tumor se relacionó con el mayor tamaño y espesor tumorales, la infiltración perineural y linfovascular, el patrón de crecimiento infiltrativo, el grado pobre de diferenciación y, en general, con estadios tumorales más avanzados al diagnóstico. Los tumores ulcerados exhibieron más frecuentemente un infiltrado inflamatorio intratumoral intenso (Tabla 24).

El **infiltrado inflamatorio intratumoral** intenso se relacionó con parámetros de mal pronóstico en el CEC, como el grado pobre de diferenciación, el patrón de crecimiento infiltrativo, la presencia de ulceración, el mayor tamaño del tumor y estadios tumorales mayores al diagnóstico. El **infiltrado inflamatorio peritumoral** intenso se asoció con la ausencia de desmoplasia, estadios tumorales más bajos al diagnóstico y con el buen grado de diferenciación. Además, tendió a relacionarse con la ausencia de infiltración perineural, con el patrón de crecimiento expansivo y con tumores de menor espesor (Tabla 27).

La **velocidad de crecimiento** mayor de 5 mm/mes se relacionó positivamente con un mayor tamaño tumoral y, de forma negativa, con el tiempo hasta el diagnóstico del tumor. El

tiempo hasta el diagnóstico del tumor mayor de 2 meses se asoció a tumores con mayor espesor y también con patrón de crecimiento no expansivo (Tabla 28).

7.1.2 Características clínico-patológicas que definen el pronóstico del CEC de forma individual: análisis univariante

El **tamaño** se relacionó con el desarrollo de eventos de mala evolución clínica considerados de forma global y con la recidiva local. El **espesor** se asoció a un mayor riesgo de eventos de mala evolución clínica durante el seguimiento de manera global e, individualmente, con un mayor riesgo de recidiva local, de metástasis ganglionares y de progresión del TNM durante el seguimiento (Tabla 29).

El grado pobre de **diferenciación** se relacionó con eventos de mala evolución clínica durante el seguimiento de forma global y, específicamente, con la progresión ganglionar y del TNM (Tabla 29).

La **infiltración perineural** se asoció con el desarrollo de eventos de mala evolución clínica durante el seguimiento y, específicamente, con la presencia de recidiva local, metástasis ganglionares y con la progresión del TNM. La **infiltración linfovascular** se asoció con el desarrollo de eventos de mala evolución clínica de manera global y, específicamente, se asoció al desarrollo de recidiva local, al desarrollo de metástasis ganglionares y a la progresión del TNM durante el seguimiento, aunque no de manera independiente de otros factores de riesgo (Tabla 29).

La **localización de alto riesgo** del tumor se relacionó con el desarrollo de eventos de mala evolución clínica y, específicamente, con el desarrollo de metástasis ganglionares y con el aumento del estadiaje durante el seguimiento del CEC (Tabla 29).

La **recidiva local** se asoció con una serie de características del tumor primario, inducidas un mayor estadio T al diagnóstico, el patrón de crecimiento infiltrativo, la presencia de desmoplasia, la ulceración, la infiltración perineural y la linfovascular, así como con el mayor tamaño y espesor tumorales, y con la extirpación incompleta del tumor primario. Además, la recidiva local se relacionó con el sexo femenino (Tabla 29).

La **desmoplasia** se asoció a un mayor riesgo de recidiva local. El **patrón de crecimiento infiltrativo** y la **ulceración** se asociaron al desarrollo de eventos de mala evolución clínica durante el seguimiento y, concretamente, con el desarrollo de recidiva local, de metástasis ganglionares y de progresión del TNM (Tabla 29).

El **infiltrado inflamatorio intratumoral** intenso se relacionó con un acortamiento del intervalo hasta el desarrollo de metástasis ganglionares. Por otro lado, se asoció a eventos de mala evolución clínica y, en concreto, a la progresión ganglionar y a la progresión del estadio TNM durante el seguimiento (Tabla 29).

La **velocidad de crecimiento** mayor de 5 mm/mes se relacionó, de manera independiente, con un acortamiento del periodo libre de enfermedad y con una menor latencia hasta el desarrollo de metástasis ganglionares (Tabla 28). El **estado inmunitario del paciente** se asoció a un acortamiento del periodo libre de enfermedad, aunque su influencia fue menor que la de la velocidad de crecimiento.

7.1.3 Características clínico-patológicas que definieron el pronóstico del CEC de forma combinada: Modelos multivariantes

En el modelo de regresión logística que tuvo en cuenta los factores clínico-patológicos relacionados con el pronóstico del CEC, el desarrollo de eventos de mala evolución clínica, considerados de forma global se explicó a partir de la presencia de infiltración perineural y ulceración, y de la localización del tumor primario en un área de alto riesgo (Tabla 31).

La recidiva local estuvo determinada por la presencia de infiltración perineural y por el sexo femenino del paciente (Tabla 32). Aunque el sexo femenino no es un factor de riesgo independiente reconocido del desarrollo de recidiva local en el CEC, en nuestro estudio sí se demostró y de hecho, no existieron diferencias en términos de grado de diferenciación, patrón de crecimiento, localización, tamaño, espesor, desmoplasia, presencia de infiltración perineural y linfovascular entre los tumores de hombres y mujeres en nuestra serie de pacientes. Por su parte, el desarrollo de metástasis ganglionares durante el seguimiento quedó definido por el pobre grado de diferenciación y la localización del tumor primario en un área de alto riesgo (Tabla 33). Por otra parte, el desarrollo de recidiva local del tumor primario, el pobre grado de diferenciación y la localización del tumor primario en una zona de alto riesgo fueron los factores de riesgo independientes de la progresión del TNM durante el seguimiento (Tabla 34).

Al considerar también los infiltrados inflamatorios en el análisis multivariante, encontramos que el desarrollo de eventos de mala evolución clínica durante el seguimiento considerados de manera global se explicó a partir de la presencia de infiltración perineural, de la localización del tumor en un área de alto riesgo y de la presencia de un infiltrado inflamatorio intratumoral intenso (Tabla 35). Por su parte, la recidiva local, el pobre grado de diferenciación y el infiltrado inflamatorio intratumoral intenso fueron los factores de riesgo

independientes de la progresión ganglionar en nuestro estudio (Tabla 36), al igual que de la progresión del TNM (Tabla 37).

Al considerar las variables clínico-patológicas para predecir la latencia hasta el desarrollo de eventos de mala evolución clínica mediante regresión de Cox, la velocidad de crecimiento mayor de 5 mm / mes se identificó como el único factor de riesgo independiente del acortamiento del intervalo libre de enfermedad y del acortamiento de la latencia hasta el desarrollo de metástasis ganglionares (Tabla 43).

7.1.4 Evaluación de la utilidad de los sistemas de estadiaje más utilizados en la actualidad en el CEC para definir mejor el pronóstico de la enfermedad

Los sistemas de estadiaje actuales son útiles pero resultan incompletos para definir el pronóstico del CEC, por lo que es necesario mejorarlos. Aunque el estadio del tumor se asoció al desarrollo de eventos de mala evolución clínica en el CEC de manera global y, específicamente, a cada uno de los eventos por separado, su capacidad predictiva no fue la misma en todos ellos. Según nuestro estudio, los eventos de mala evolución clínica considerados de manera global quedaron mejor definidos por el sistema de estadiaje alternativo del *Brigham and Women's Hospital* y por el sistema basado en el espesor tumoral (Tabla 38). El estadiaje alternativo del *Brigham and Women's Hospital* fue superior a los otros dos para predecir el riesgo de recidiva local durante el seguimiento (Tabla 39); y el sistema basado en el espesor fue mejor para definir la progresión ganglionar en el CEC (Tabla 40). El sistema basado en el espesor y el sistema de estadiaje de la AJCC fueron superiores al estadiaje alternativo del *Brigham and Women's Hospital* para predecir progresión del TNM durante el seguimiento en el CEC a partir de los datos de nuestro estudio (Tabla 41).

7.2 Resumen de los resultados del OBJETIVO 2: Identificación de marcadores proteicos (nivel 2) cuya expresión en el tumor primario se relacionó con el pronóstico del CEC

El objetivo 2 pretendió definir el pronóstico del CEC en función de las asociaciones del nivel de marcadores proteicos, solos o en combinación con características clínico-patológicas del CEC. Para ello, definimos asociaciones entre la expresión de distintos marcadores proteicos y su capacidad para definir características clínico-patológicas de forma individual y en combinación.

7.2.1 Asociaciones entre las proteínas analizadas en el CEC

La expresión diferencial de E-CADHERINA, VIMENTINA, P53, P16, CXCR4, D2-40 y AE-1 en diferentes áreas del tumor demostró que los CEC son tumores heterogéneos (Tabla 51).

La expresión de E-CADHERINA se relacionó inversamente con la expresión de VIMENTINA, P63, CD44 y CXCR4 (Tabla 44).

La expresión de VIMENTINA se relacionó directamente con la expresión de P63 y CXCR4 e inversamente con la expresión de E-CADHERINA (Tabla 45).

La expresión de P63 se relacionó positivamente con la expresión de VIMENTINA y Ki-67 y negativamente con la expresión de E-CADHERINA (Tabla 46).

La expresión de CD44 se asoció positivamente con la expresión de EGFR, con la de E-CADHERINA y con la expresión de múltiples queratinas (detectadas mediante el anticuerpo pan-queratinas AE-1) (Tabla 47).

CXCR4 se relacionó directamente con la expresión de VIMENTINA, P63 y AE-1 e inversamente con la expresión de E-CADHERINA (Tabla 48).

La expresión de EGFR se asoció positivamente con la expresión de Ki-67, CD44, con la expresión intensa de CXCR4 y con la positividad de AE-1 (Tabla 49).

Los cambios genómicos determinados por FISH de EGFR se asociaron con su sobre-expresión determinada por inmunohistoquímica (Figuras 98,99).

La expresión de D2-40 se asoció con la expresión de VIMENTINA y con la expresión intensa de CXCR4 (Tabla 50).

La positividad para el anticuerpo pan-queratinas AE-1 se relacionó positivamente con la expresión intensa de CXCR4 y de EGFR, y con la positividad de E-CADHERINA.

El índice proliferativo (Ki-67) se relacionó positivamente con la expresión de VIMENTINA y P63, y con la expresión intensa de EGFR (Figura 100).

7.2.2 Asociación de las proteínas evaluadas en el CEC y características clínico-patológicas del tumor

El grado pobre de diferenciación del CEC se relacionó con la menor expresión de E-CADHERINA, con una mayor expresión de VIMENTINA y CXCR4. Se relacionó con la expresión de P63 y con el patrón aberrante de expresión de EGFR (Tabla 53).

La expresión de D2-40 se relacionó con la ulceración y la desmoplasia, y el patrón de crecimiento infiltrativo tendió a relacionarse con la expresión de CD44 (Tabla 53).

La infiltración linfovascular se relacionó con la expresión de VIMENTINA y CXCR4. Por su parte, la presencia de infiltración perineural se relacionó también con la expresión intensa de CXCR4 y, curiosamente, con la expresión de E-CADHERINA en la zona indiferenciada del tumor (Tabla 53).

Los tumores con índices proliferativos altos tuvieron lógicamente una velocidad de crecimiento mayor (Tabla 28).

7.2.3 Proteínas que definieron el pronóstico del CEC de forma individual: análisis univariante

La expresión de VIMENTINA y D2-40 tendieron a asociarse con el desarrollo de eventos de mala evolución clínica de forma global y, en concreto, se relacionó con el desarrollo de la recidiva local (Tabla 54).

La expresión intensa de EGFR se asoció con el desarrollo de metástasis ganglionares y con la progresión del TNM durante el seguimiento. La expresión de P16, en la zona diferenciada del tumor, y la expresión de CD44 en la zona indiferenciada, también se relacionaron con eventos de mala evolución clínica, concretamente con el desarrollo de metástasis ganglionares (Tabla 54).

7.2.4 Proteínas que definieron el pronóstico del CEC de manera combinada: Modelos multivariantes

Cuando se combinaron los datos obtenidos del análisis univariante de los marcadores proteicos con los de las variables clínico-patológicas con importancia en el diagnóstico del tumor, el desarrollo de metástasis ganglionares quedó definido por la intensa expresión de

EGFR en el tumor primario y el pobre grado de diferenciación como factores de riesgo independientes de dicho evento (Tabla 56). A su vez, el pobre grado de diferenciación, la presencia de infiltración perineural y la expresión intensa de EGFR fueron los factores de riesgo independientes de progresión del TNM seleccionados por el modelo (Tabla 57).

Por otro lado, al considerar los marcadores proteicos en combinación con las variables clínico-patológicas a la hora de definir la latencia hasta el desarrollo de eventos, comprobamos que la expresión de D2-40 fue el único factor de riesgo independiente del acortamiento del intervalo libre de enfermedad y de la latencia hasta el desarrollo de metástasis ganglionares. Por su parte, la latencia hasta la recidiva local quedó definida por la expresión de D2-40 y por el estado inmunitario del paciente (Tabla 59).

7.3 Resumen de los resultados del OBJETIVO 3: Análisis del nivel 3 (miRNAs) y relación con factores pronósticos en el CEC

El objetivo 3 de este trabajo pretendió definir el pronóstico del CEC en función de los miRNA identificados, solos o en combinación con características clínico-patológicas del CEC y/o la expresión de distintos marcadores proteicos.

7.3.1 Identificación del patrón de expresión diferencial de miRNAs en distintas fases de progresión del CEC en un panel de líneas celulares. Elección de *miRNA-205* y *miRNA-203*

Se identificó el patrón de expresión diferencial de miRNA entre distintas fases de progresión del CEC en un panel de líneas celulares de origen murino, obtenidas en distintas fases evolutivas de la enfermedad. Así, identificamos 39 miRNAs expresados de forma diferencial entre las líneas celulares del CEC con fenotipo escamoso y de fenotipo fusiforme (Tabla 60). Además, encontramos 44 miRNAs expresados diferencialmente entre las líneas celulares no tumorales y aquellas líneas procedentes de CEC. Entre los miRNA expresados de forma diferencial elegimos el miR-205 y el miR-203 por su interés en la homeóstasis de la piel, para evaluar posteriormente su valor como marcadores pronósticos de la enfermedad (Tabla 61).

Mediante QPCR demostramos que *miRNA-205* se encuentra infraexpresado en el grupo de líneas celulares más fusiformes (A5, D3, H11, CarB y CarC), en comparación con el resto de las líneas celulares del panel; y, también infraexpresado, pero en un grado menor, entre las líneas celulares no malignas (C5N, NK, MSCP1, P6) y las derivadas de tumores malignos con buena diferenciación epitelial (PDV, PDVC57, B9, E4). *MiR-203* se encontró

infrarregulado en líneas celulares malignas, tanto escamosas como fusiformes, en comparación con las líneas celulares no malignas (Figura 109).

El *miRNA-203* tendió a expresarse en la piel normal en capas más altas del epitelio y el *miRNA-205* en estratos basales y suprabasales (Figura 112). El *miRNA-203* tendió a expresarse en las áreas más diferenciadas de los CEC, mientras que el *miRNA-205* tendió a hacerlo en las áreas más invasivas. Existieron, además, diferencias entre la intensidad de expresión de ambos miRNA, tanto a nivel global como en el frente de invasión del CEC.

7.3.2 Relación entre los niveles de expresión de *miRNA-203* y *miRNA-205* en el tumor primario con características clínico-patológicas

Los niveles de expresión de *miRNA-205* y de *miRNA-203* se asociaron a características clínico-patológicas en el CEC. El *miRNA-203* se asoció con la ausencia de desmoplasia, el patrón de crecimiento expansivo y un buen grado de diferenciación. La expresión del *miRNA-203* en el frente de invasión se asoció a tumores más pequeños y con menor espesor. El *miRNA-205* se relacionó con la presencia de desmoplasia, el patrón de crecimiento infiltrativo, el grado pobre de diferenciación, con la presencia de infiltración perineural, con la ulceración y con estadios tumorales más altos al diagnóstico (Tabla 64, 65).

7.3.3 Relación de la expresión de *miRNA-203* y *miRNA-205* con la de otros marcadores proteicos analizados en este trabajo

La expresión de *miRNA-203* y *miRNA-205* se asoció con la expresión de P63. Así, cuando P63 se expresó, tendió a hacerlo el *miRNA-205* y a no expresarse el *miRNA-203*, y viceversa. Por otro lado, la expresión de *miRNA-205* se relacionó inversamente con la expresión de E-CADHERINA y de CD44, y tendió a hacerlo de forma positiva con la expresión de VIMENTINA (Tabla 64, 65).

7.3.4 Pronóstico de CEC relacionado con la expresión de miRNAs: análisis univariante

La expresión del *miR-205* se relacionó con un mayor riesgo de recidiva local del tumor primario durante el seguimiento (Tabla 64). La expresión de *miR-203* se asoció a un mayor tiempo hasta el desarrollo de la recidiva local (Figura 124).

7.3.5 Comparación de la QPCR y la hibridación *in situ* como técnicas de análisis de la expresión de miRNAs en el CEC

La hibridación *in situ* sobre muestras en parafina fue una técnica más eficiente que la QPCR para encontrar asociaciones entre la expresión de miRNAs con otras variables y con el pronóstico de la enfermedad.

7.4 Resumen de los resultados del OBJETIVO 4. Identificación de clústers de pacientes con diferente pronóstico

El objetivo 4 pretendió definir clústeres de pacientes con CEC de diferente pronóstico, en función de las asociaciones encontradas en los distintos niveles indicados. Para ello, se incluyeron los miRNAs validados (*miRNA-203* y *miRNA-205*) y factores estudiados de los diferentes niveles clínico-patológicos y moleculares, en un biplot logístico multinomial.

El *miRNA-205* y el *miRNA-203* ayudaron a identificar subgrupos con distinto pronóstico en el CEC. Así, mientras *miRNA-203* se expresó más frecuentemente en tumores que exhibieron una mejor evolución clínica y un pronóstico más favorable, el *miRNA-205* se expresó con más frecuencia en tumores con peor pronóstico (Tabla 68, Figuras 127-130).

7.5 Resumen de los resultados del OBJETIVO 5. Comparación del CEC clásico con el CEC bowenoide/enfermedad de Bowen

El objetivo 5 evaluó si las diferentes niveles de asociaciones estudiadas se relacionaron entre sí de forma distinta en diferentes formas histopatológicas de CEC, con el fin de determinar si se trataba de entidades clínicas diferentes. En este estudio, nos hemos centrado en estudiar si esos niveles de interacciones fueron distintos en el CEC clásico *versus* el CEC bowenoide/enfermedad de Bowen.

Los resultados mostraron que el grupo de carcinomas que derivaron de la enfermedad de Bowen fueron, con mayor frecuencia, pobremente diferenciados y exhibieron un patrón de crecimiento expansivo, así como ausencia de desmoplasia y de infiltración perineural. Por otro lado, la presencia de queratosis actínica asociada a la enfermedad de Bowen y al carcinoma que derivaba de placas de enfermedad de Bowen, se vio con menos frecuencia en esta entidad que en el resto de los CEC (Tabla 69).

La expresión diferencial de proteínas y miRNA, unida a las características clínicas de la enfermedad, sugieren que la enfermedad de Bowen y el “carcinoma bowenoide” podrían pertenecer a un subgrupo de carcinomas queratinocíticos distinto al resto de los carcinomas epidermoides cutáneos.

DISCUSIÓN

El carcinoma epidermoide cutáneo (CEC) es la segunda forma de cáncer más frecuente en humanos después del carcinoma basocelular (CBC) y puede ser localmente agresivo y metastatizar (Rowe *et al.*, 1992). Existen diversos factores clínico-patológicos de reconocido valor pronóstico en el CEC, como el tamaño y el espesor tumorales (Veness *et al.*, 2006), el grado de diferenciación (Brinkman *et al.*, 2014), la presencia de infiltración perineural (Leibovitch *et al.*, 2005) o la recidiva local (Clayman *et al.*, 2005); y otros en los que existe una menor evidencia pero que también se han asociado a un peor pronóstico en este tumor, como el patrón de crecimiento infiltrativo (Breuninger *et al.*, 1997), la presencia de ulceración (Cherpelis *et al.*, 2002), la desmoplasia (Brantsch *et al.*, 2008) o la velocidad de crecimiento rápida (Fitzpatrick and Harwood, 1985). Inicialmente, evaluamos todos esos factores clínico-patológicos en nuestra serie de tumores y demostramos su relación con el pronóstico en este tumor, en algunos casos con independencia de otros factores riesgo.

Por otro lado, y a pesar de que el conocimiento de las características clínico-patológicas del tumor se ha ido progresivamente incrementando en los últimos años, existe una falta de marcadores moleculares que ayuden a definir mejor el pronóstico de estos tumores. En este sentido, evaluamos en nuestra serie de tumores diferentes marcadores moleculares relacionados con el desarrollo del cáncer en general, y con el CEC en particular, aunque su influencia real sobre el pronóstico del CEC sea limitada en la mayoría de los casos. Posteriormente, comparamos la expresión de estas moléculas con características clínico-patológicas y evolutivas de los tumores, lo que permitió comprobar el valor pronóstico de algunos de esos marcadores y, en algunos casos, su valor pronóstico independiente de otros factores de riesgo.

Además, estudiamos la expresión diferencial de miRNAs, en un panel de líneas celulares que representan las diferentes fases de evolución del CEC. Teniendo en cuenta los miRNAs con una expresión diferencial entre las líneas celulares de diferentes fases de la enfermedad, y la información procedente de la literatura, se seleccionaron el *miRNA-203* (Lena *et al.*, 2008) y el *miRNA-205* (Wang *et al.*, 2013a) para su evaluación por hibridación *in situ* en nuestra serie de tumores humanos. Así se estudio su distribución según la heterogeneidad histopatológica de los tumores y se evaluó su asociación con las características clínico-patológicas y moleculares de los mismos. Por último, demostramos que la expresión diferencial de *miRNA-203* y de *miRNA-205* identifica subgrupos de carcinoma epidermoide con distinto valor pronóstico.

Finalmente, comparamos nuestra serie de CEC con una pequeña serie de casos de enfermedad de Bowen y de CEC que se habían originado sobre una enfermedad de Bowen (carcinoma bowenoide). A partir de las diferencias de expresión de diferentes moléculas, incluidos los miRNAs, entre ambos grupos sugerimos que la enfermedad de Bowen y en carcinoma bowenoide podrían tener un origen diferente al del resto de los CEC.

1 FACTORES PRONÓSTICOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS EN EL CEC

1.1 Características clínico-patológicas del CEC con valor pronóstico reconocido

Existen una serie de características clínico-patológicas en el CEC primario que de acuerdo con la literatura, son útiles para predecir el pronóstico de la enfermedad por su asociación con eventos de mala evolución clínica. Entre ellas están el tamaño tumoral (entendido, como hemos indicado, como diámetro mayor de la superficie tumoral), el espesor, el grado de diferenciación, la infiltración perineural, y la localización del tumor (Rowe *et al.*, 1992). La recidiva local del tumor primario es otro factor de mal pronóstico en el CEC, no sólo porque en sí misma representa un evento de mala evolución clínica, sino también porque predispone a otros eventos de mala evolución, como el desarrollo de metástasis.

Pasamos a continuación a discutir nuestros resultados sobre estas características tumorales, en cuanto a su utilidad como factores pronósticos de la enfermedad en relación con lo descrito en la literatura.

1.1.1 El tamaño y el espesor tumorales

Por su relación entre tamaño y espesor tumorales, vamos a considerar ambos en el mismo apartado, aunque separadamente. Ciertamente, ambos suelen correlacionar positivamente (Veness *et al.*, 2006), lo que hemos ratificado en nuestro estudio (Figura 59). Tanto el tamaño como el espesor tumorales se han identificado como factores de riesgo independientes de la recurrencia local y de metástasis en el CEC (Roozeboom *et al.*, 2012).

a. El tamaño tumoral

El tamaño del tumor primario, definido como el diámetro mayor de la superficie visible del mismo, ha sido descrito en diferentes estudios como un factor pronóstico importante relacionado con el desarrollo de eventos de mala evolución clínica en el CEC (Clayman *et al.*, 2005; Cherpelis *et al.*, 2002; Kraus *et al.*, 1998; Rowe *et al.*, 1992). Así, el tamaño del tumor se ha relacionado con el riesgo de desarrollar metástasis ganglionares. En este sentido, se han establecido varios posibles puntos de corte en el tamaño tumoral para identificar los tumores con mayor riesgo de producir diseminación locorregional (Moore *et al.*, 2005). La mayoría de las referencias han establecido en 2 cm el punto de corte a partir del que los pacientes

tendrían un riesgo más alto de desarrollar progresión ganglionar (Breuninger *et al.*, 1990; Clayman *et al.*, 2005; Cherpelis *et al.*, 2002; Kraus *et al.*, 1998; Rodolico *et al.*, 2004; Rowe *et al.*, 1992). Por este motivo, también se ha tomado ese valor como referencia en la clasificación TNM de la AJCC (Farasat *et al.*, 2011). Además, existe evidencia de la relevancia de este punto de corte en diversos estudios mediante análisis multivariante (Carter *et al.*, 2013; Schmults *et al.*, 2012). Por todo ello, también hemos tomado esta referencia de 2 cm en el tamaño tumoral como punto de corte de mal pronóstico en nuestro estudio.

En nuestro trabajo no se demostró relación entre un tamaño del tumor mayor de 2 cm y el riesgo de metástasis ganglionares (Tabla 29). De hecho, siete tumores de los que desarrollaron progresión ganglionar tenían un diámetro menor de 2 cm, lo que sugiere que otros factores, aparte del diámetro tumoral, deben tener un papel relevante en el pronóstico del CEC. Algunos trabajos han sugerido que el tamaño por sí solo tendría un escaso valor predictivo de metástasis (Nolan *et al.* 2005). De hecho, en una serie grande de pacientes tratados de metástasis ganglionares por CEC (n=266), se obtuvo una mediana de tamaño tumoral de 1,5 cm, lo que les hizo sugerir que, incluso en pacientes con lesiones relativamente pequeñas, el riesgo de metástasis puede ser significativo (Veness *et al.*, 2006). En nuestro estudio la mediana del tamaño tumoral fue de 1,95 cm en el grupo de tumores que no desarrolló metástasis ganglionares, y de 2 cm en el grupo que desarrolló metástasis, lo que pone de manifiesto la escasa capacidad del tamaño tumoral para discriminar entre CEC de bajo y alto riesgo.

El tamaño horizontal del tumor sí se relacionó con el desarrollo de eventos de mala evolución clínica durante el seguimiento y, en concreto, con el desarrollo de recidiva local en el análisis univariante (Tabla 29). Si bien, no se demostró su independencia como factor predictivo de mala evolución en el estudio multivariante, probablemente debido a su covariación con otras variables de alto riesgo, como el patrón de crecimiento infiltrativo, el mayor espesor del tumor y la infiltración perineural. Así, el mayor tamaño tumoral también se ha asociado a la presencia de infiltración perineural en otros estudios (Carter *et al.*, 2013).

Por otra parte, encontramos una asociación directa entre el tamaño horizontal del tumor y su velocidad de crecimiento (algo que discutiremos más adelante de una manera más detallada) (Tabla 28), aunque no demostramos una relación entre el tamaño y el tiempo hasta el diagnóstico del CEC. En otros estudios, un retraso superior a 18 meses hasta el tratamiento quirúrgico, se ha relacionado con el mayor tamaño tumoral (Renzi *et al.*, 2010); algo que, sin embargo, no se ha demostrado en otro estudio reciente (Kricker *et al.*, 2014) y que nosotros tampoco hemos comprobado en nuestra serie. Nuestros datos sugieren que el tamaño del tumor no depende tanto del tiempo en que la lesión es dejada sin tratamiento, como de la velocidad de crecimiento del tumor *per se*.

b. El espesor tumoral

El espesor tumoral se ha relacionado con mal pronóstico en el CEC en diferentes estudios (Brantsch *et al.*, 2008; Breuninger *et al.*, 1990; Breuninger *et al.*, 1997). En nuestro trabajo, el espesor del tumor primario se asoció positivamente con un mayor tamaño tumoral (Figura 59), la presencia de un patrón de crecimiento infiltrativo (Tabla 22), la infiltración perineural (Tabla 25) y el grado pobre de diferenciación (Tabla 21), todos ellos factores de mal pronóstico conocidos en el CEC (Brantsch *et al.*, 2008; Clayman *et al.*, 2005; Cherpelis *et al.*, 2002). Por otra parte, el espesor tumoral también se relacionó con el desarrollo de eventos de mala evolución clínica durante el seguimiento y, de manera específica, con la recidiva local, el desarrollo de metástasis ganglionares y con la progresión del TNM, en el análisis univariante (Tabla 29).

En nuestro estudio establecimos el punto de corte en 2 mm de espesor, que es el que considera como factor de riesgo de mala evolución del CEC la clasificación TNM de la AJCC (Farasat *et al.*, 2011). Si bien, en el modelo multivariante, el espesor no permaneció como factor de riesgo independiente del desarrollo de dichos eventos de mala evolución clínica. Se ha publicado que, en general, los tumores de menos de 2 mm de profundidad tienen un riesgo escaso de desarrollar eventos de mala evolución clínica si han sido adecuadamente extirpados (Brantsch *et al.*, 2008; Breuninger *et al.*, 1997; Martorell-Calatayud *et al.*, 2013).

Otras variables clínico-patológicas que se introdujeron en el modelo de análisis multivariante junto al espesor para predecir la evolución del CEC (y con las que el éste presentó covariación), sí fueron seleccionadas por el modelo como factores predictores de mala evolución. Ese fue el caso del grado pobre de diferenciación y la infiltración perineural. Ello sugiere que dichas variables tendrían, al menos con nuestros datos, un mayor valor predictivo que el espesor si se tiene en cuenta el punto de corte en 2 mm, como hemos considerado nosotros. Hay que tener en consideración que se han publicado otros puntos de corte de espesor tumoral como más específicos en cuanto a su capacidad para predecir eventos de mala evolución en el CEC (Brantsch *et al.*, 2008). Si bien, nosotros hemos tomado el punto de corte de 2 mm por ser el que se ha empleado también en otros estudios en los que se ha basado la AJCC para establecer la clasificación TNM del CEC (Farasat *et al.*, 2011). Así, otros trabajos han establecido en 4-5 mm el punto de corte más sensible para diferenciar tumores con bajo y alto riesgo de diseminación sistémica (Dinehart and Pollack, 1989; Kraus *et al.*, 1998; Rodolico *et al.*, 2004; Stein and Tahan, 1994). En general, como hemos indicado, los tumores con menos de 2 mm de espesor tienen una probabilidad casi nula de desarrollar metástasis (Breuninger *et al.*, 1997); incluso hasta los 4 mm la probabilidad de metástasis continúa siendo baja en el CEC (Frierson and Cooper, 1986; Onercl *et al.*, 2000); mientras que a partir de 5 mm dicha probabilidad se incrementa significativamente (Breuninger *et al.*, 1997). Así, en una serie de 266 pacientes con CEC de cabeza y cuello y con metástasis linfáticas, se demostró una mediana de espesor tumoral de 6 mm, si bien más del 65% de los tumores

tuvieron un espesor superior a 4 mm (Veness *et al.*, 2006). En nuestro estudio la mediana del espesor fue de 8 mm en el grupo de pacientes que desarrollaron metástasis ganglionares, y de 5,75 mm en el grupo de tumores que no las desarrollaron (Tabla 29); el tiempo de seguimiento fue superior a 5 años en todos los casos. Si tenemos en cuenta los eventos de mala evolución de manera global, la mediana del espesor fue de 5,25 mm en el grupo que no desarrolló eventos de mala evolución, y de 8 mm en el grupo que sí los desarrolló (Tabla 29). Lo que es más, ningún tumor con un espesor menor de 2 mm desarrolló eventos de mala evolución durante el seguimiento en nuestro estudio, lo que parece sugerir que éste no es un punto de corte útil para discriminar el riesgo de metástasis en el CEC.

También en este contexto, un estudio prospectivo con un número elevado de casos de CEC (n = 653) estableció tres puntos de corte para el espesor con interés pronóstico (menos de 2 mm, de 2 a 6 mm y más de 6 mm) (Brantsch *et al.*, 2008). En ese estudio el espesor fue el factor de riesgo independiente más importante en el pronóstico del CEC, teniendo en cuenta estos puntos de corte, y sugirieron un estadiaje nuevo del tumor en base a su espesor. Serían T1 los CEC menores de 2mm de espesor; T2, los de 2 a 6 mm de espesor; y T3, los de más de 6 mm. Estos autores además sugirieron que los tumores con desmoplasia y los presentes en pacientes inmunodeprimidos debían identificarse también como de alto riesgo (Brantsch *et al.*, 2008). Aparte del espesor del CEC en mm, también se ha analizado el valor pronóstico de la profundidad de la invasión tumoral propiamente (Clayman *et al.*, 2005; Cherpelis *et al.*, 2002; Rowe *et al.*, 1992) y se ha identificado como un factor de riesgo del desarrollo de metástasis independiente en algunos estudios (Clayman *et al.*, 2005).

En nuestro estudio, encontramos una correlación clara entre el tamaño y el espesor tumorales, tal y como se ha demostrado en otros trabajos (Veness *et al.*, 2006) (Figura 59). Se ha propuesto que dado que no todos los tumores gruesos metastatizan, es posible que aquellos tumores de un diámetro de superficie dado que tengan un menor espesor posean una menor tendencia a diseminar (Veness *et al.*, 2006). En cualquier caso, la importancia del tamaño y el espesor tumorales como factores de alto riesgo de mala evolución clínica en el CEC es evidente; aunque el hecho de que los puntos de corte a la hora de considerar el espesor no estén bien definidos, y el hecho de que en muchas historias clínicas puedan faltar datos fiables del tamaño tumoral, pueden restarles valor predictivo. Pero dada su posible utilidad, estos estudios y nuestros resultados resaltan la importancia de completar las historias clínicas con estos datos de la forma más precisa posible.

1.1.2 El grado de diferenciación

El grado de diferenciación tumoral es un factor pronóstico conocido en el CEC desde hace años (Brantsch *et al.*, 2008; Brinkman *et al.*, 2014; Cherpelis *et al.*, 2002; Frierson and Cooper, 1986; Kyrgidis *et al.*, 2010; Rowe *et al.*, 1992). En nuestro estudio, los tumores

pobrementemente diferenciados se asociaron al desarrollo de eventos de mala evolución clínica de manera global y, específicamente, con un mayor riesgo de metástasis ganglionares y de progresión del estadio TNM de la AJCC (Tabla 29). Se comprobó además que los tumores pobrementemente diferenciados exhibieron con mayor frecuencia un patrón de crecimiento infiltrativo y un estroma desmoplásico (Tabla 21). Además, presentaron más frecuentemente infiltración perineural y linfovascular, y ulceración superficial del epitelio (Tabla 21). Por otra parte, los tumores pobrementemente diferenciados con mayor frecuencia presentaron un mayor espesor (Tabla 21). En nuestro estudio, el grado pobre de diferenciación fue además factor de riesgo independiente del desarrollo de metástasis ganglionares en el análisis multivariante (Tabla 33).

El grado pobre de diferenciación es un factor de riesgo del desarrollo de eventos de mala evolución clínica. Se utiliza para modificar el estadio T del tumor, según la clasificación TNM de la AJCC de 2010, que pasa de T1 a T2 en caso de que se cumplan dos factores de riesgo, uno de los cuales puede ser el grado pobre de diferenciación (Farasat *et al.*, 2011). Varios estudios han demostrado asociación entre el grado pobre de diferenciación del CEC y el desarrollo de metástasis (Breuninger *et al.*, 1990; Breuninger *et al.*, 1997; Cherpelis *et al.*, 2002; Frierson *et al.*, 1988; Petter and Haustein, 1998; Rowe *et al.*, 1992; Veness *et al.*, 2006); incluso con independencia de otros factores de riesgo (Brantsch *et al.*, 2008; Brinkman *et al.*, 2014; Kyrgidis *et al.*, 2010). En nuestro estudio, más de la mitad de los casos con metástasis ganglionares procedieron de tumores pobrementemente diferenciados, que representaron menos del 20% de los tumores de nuestra serie. En el análisis multivariante, el grado pobre de diferenciación tumoral confirió un riesgo 5,28 veces superior de desarrollar metástasis ganglionares (Tabla 33), y de 6,88 veces de desarrollar progresión del estadio de la clasificación TNM de la AJCC (Tabla 34). Sin embargo, el CEC también puede metastatizar independientemente de su grado de diferenciación histopatológica (Veness *et al.*, 2006). Según nuestro estudio, el grado pobre de diferenciación es, por tanto, un factor de riesgo independiente de progresión en el CEC, algo que parece también evidente en otros trabajos (Brinkman *et al.*, 2014; Kyrgidis *et al.*, 2010). En este sentido, hay que tener en cuenta que, a pesar de que un tumor se encuentre bien extirpado, el que sea pobrementemente diferenciado le otorga un mayor riesgo de desarrollar eventos de mala evolución clínica durante el seguimiento, por lo que es preciso prestar una mayor atención al seguimiento de pacientes con CEC pobrementemente diferenciados.

1.1.3 La infiltración perineural

En nuestro estudio, la infiltración perineural se relacionó con el desarrollo de eventos de mala evolución clínica durante el seguimiento y, específicamente, con la presencia de recidiva local, metástasis ganglionares y la progresión de la clasificación TNM (Tabla 29). La infiltración perineural se relacionó también en este trabajo, con otros factores de mal

pronóstico clínico-patológicos reconocidos por otros estudios, como el grado pobre de diferenciación (Brantsch *et al.*, 2008; Jambusaria-Pahlajani *et al.*; Karia *et al.*, 2013b), el patrón de crecimiento infiltrativo (Cherpelis *et al.*, 2002; Frierson and Cooper, 1986), la presencia de desmoplasia (Brantsch *et al.*, 2008), un espesor tumoral mayor (Brantsch *et al.*, 2008; Roozeboom *et al.*, 2012) y un mayor tamaño (Carter *et al.*, 2013) (Tabla 25). En el análisis multivariante la infiltración perineural fue un factor de riesgo independiente de la aparición de recidiva local (Tabla 32) y del desarrollo de eventos de mala evolución clínica considerados de forma global (Tabla 31).

La presencia de infiltración perineural se encuentra entre el 2,5% y el 5% de los CEC (Rowe *et al.*, 1992) y, en algunos casos, se ha demostrado que ocurre como hallazgo incidental hasta en el 10% de los mismos (Clayman *et al.*, 2005). En nuestra cohorte, la infiltración perineural se encontró un 23,4 % de los tumores, pero ello no refleja la incidencia real de este fenómeno en el CEC; en nuestro trabajo fue mucho más alta debido al diseño ambispectivo del estudio, que incluyó tumores de mala evolución conocida. La infiltración perineural se incluye en la última edición del estadiaje del CEC de la AJCC como una característica de alto riesgo de mala evolución (Farasat *et al.*, 2011). Ciertamente, varios estudios han demostrado que la infiltración perineural se asocia al riesgo de recidiva local y metástasis en el CEC (Adams *et al.*, 2014; Carter *et al.*, 2013; Verburg *et al.*, 2014). Así, Goepfert *et al.* demostraron un incremento del riesgo de metástasis ganglionares y a distancia en los CEC que exhibieron infiltración perineural (Goepfert *et al.*, 1984). Además, se ha demostrado que es un factor de riesgo independiente de supervivencia (Kyrgidis *et al.*, 2010). A pesar de ello, sorprende que algunos de los últimos estudios más consistentes sobre CEC no hayan evaluado su influencia (Brantsch *et al.*, 2008).

Como hemos indicado, la infiltración perineural se ha propuesto como factor de riesgo de recidiva local del CEC en varios estudios. En algunos de ellos, el valor de la infiltración perineural se ha demostrado como factor de riesgo independiente en análisis multivariantes (Balamucki *et al.*, 2011; Kyrgidis *et al.*, 2010; Schmults *et al.*, 2013), aunque en otros no (Campoli *et al.*, 2014; Leibovitch *et al.*, 2005). También se ha llegado a estudiar la influencia del grosor de los filetes nerviosos infiltrados sobre el pronóstico de los CEC (Carter *et al.*, 2013; Ross *et al.*, 2009); así, parece que la infiltración perineural de filetes más gruesos (> 0,1 mm) se ha relacionado con un pronóstico más desfavorable. Pero los autores son cautos y establecen que el mayor riesgo de progresión y muerte en esos tumores, también pudiera deberse a otros factores de riesgo asociados, debido a la ausencia de resultados concluyentes en el análisis multivariante (Carter *et al.*, 2013). En nuestro estudio, hemos demostrado relación entre la presencia de infiltración perineural y el mal pronóstico de la enfermedad, aunque sin tener en cuenta el grosor de los filetes nerviosos infiltrados, cuya influencia estamos pendientes de evaluar. La infiltración perineural se asoció con todos los eventos de mala evolución clínico-patológica en el análisis univariante (Tabla 29). Además, en el estudio multivariante también demostramos que es un factor de riesgo independiente del desarrollo de recidiva local. Así, la

presencia de infiltración perineural en el tumor primario otorgó un riesgo 6,05 veces mayor de desarrollar cualquier evento de mala evolución durante el seguimiento (Tabla 31) y, en concreto, de 12,75 veces mayor de presentar recidiva local (Tabla 32).

Por otra parte, se ha publicado que existe una mayor incidencia de metástasis ganglionares y a distancia en tumores con infiltración perineural (Cherpelis *et al.*, 2002; Frierson and Cooper, 1986; Goepfert *et al.*, 1984; Moore *et al.*, 2005), y se ha relacionado con una menor supervivencia y un mayor riesgo de muerte relacionada con el CEC (Clayman *et al.*, 2005; Schmults *et al.*, 2013). En nuestro estudio, la infiltración perineural se asoció a un mayor riesgo de metástasis en el análisis univariante, aunque no pudimos demostrar su independencia en el análisis multivariante. No evaluamos la relación entre la presencia de infiltración perineural y la mortalidad asociada a CEC, por el escaso número de pacientes que habían fallecido por este tumor al finalizar el estudio (n = 5).

En definitiva, la infiltración perineural parece un claro factor relacionado con el pronóstico del CEC. Por un lado, se ha relacionado con un mayor riesgo de recidiva local (Balamucki *et al.*, 2011), algo que también hemos demostrado en nuestro estudio con independencia de otros factores de riesgo. Por otro, se ha relacionado con un mayor riesgo de metástasis (Moore *et al.*, 2005), lo que también hemos demostrado en nuestro estudio en el análisis univariante; y por último, con un mayor riesgo de muerte por enfermedad en el CEC (Schmults *et al.*, 2013).

1.1.4 La localización

Se ha publicado que las áreas que muestran una mayor incidencia de CEC metastásicos son el pabellón auricular y el labio (Veness *et al.*, 2006). Otras localizaciones, que se podrían considerar de riesgo intermedio, incluirían el cuero cabelludo (principalmente la sien), el área perineal y genital, y las partes acras (manos y pies) (Clayman *et al.*, 2005). Por otra parte, es importante tener en cuenta que los tumores que surgen en áreas no fotoexpuestas como el periné, la región sacra y las plantas de los pies, presentan mayor frecuencia de metástasis que las zonas de fotoexposición crónica (Motley *et al.*, 2002). Según un estudio clásico de factores pronósticos en el CEC, se estableció que la localización se asocia con la frecuencia de diseminación. Así, las zonas con CEC de más riesgo de diseminación en orden creciente son: 1) lugares expuestos al sol (excluyendo labio y oreja); 2) labio; 3) oreja; 4) zonas no expuestas; y 5) áreas previamente radiadas o sometidas a daño térmico, úlceras crónicas, enfermedad de Bowen o procesos inflamatorios crónicos (Rowe *et al.*, 1992). En la serie publicada por Brantsch *et al.*, no se demostró que la localización en el labio inferior incrementara el riesgo de metástasis, lo que les llevó a destacar la relevancia del espesor del tumor como marcador pronóstico de la enfermedad (Brantsch *et al.*, 2008). Sin embargo, en la séptima edición de la AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) de estadiaje del CEC, se incluyen las localizaciones

de oreja y labio inferior dentro de los factores pronósticos (Metchnikoff *et al.*, 2012). En general, se asume que el labio inferior y la oreja son localizaciones de alto riesgo para el desarrollo de metástasis en el CEC. Las lesiones en o en torno a la oreja se consideran que tienen una incidencia más alta de metástasis ganglionares (Afzelius *et al.*, 1980; Lee *et al.*, 1996; Rowe *et al.*, 1992). Incluso algunos autores defienden como tratamiento preventivo la disección ganglionar en pacientes seleccionados de alto riesgo que tienen lesiones localizadas en la oreja o en la región preauricular (Lai *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 1996; Tavin and Persky, 1996; Yoon *et al.*, 1992). No obstante, existen otras localizaciones que, aunque no confieran un riesgo equivalente a las anteriores, también incrementan el riesgo de metástasis. La *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) reconoce como localizaciones de alto riesgo en el CEC el labio inferior, la oreja, la región preauricular, la nariz, el párpado y la sien.

En nuestro estudio, hemos considerado como localizaciones de alto riesgo las que reconoce la NCCN. En este contexto, 46 casos (46,8 %) se localizaron en áreas de alto riesgo. Observamos que, efectivamente, estas localizaciones se asociaron a una mayor probabilidad de sufrir metástasis ganglionares y progresión en general, así como a un mayor riesgo de eventos de mala evolución clínica considerados de globalmente, en el análisis univariante, aunque no se asociaron a un mayor riesgo de recidiva local del tumor (Tabla 29). La localización de alto riesgo se asoció también con eventos de mala evolución clínica en el análisis multivariante y confirió un riesgo 4,42 veces mayor de desarrollar cualquier evento de mala evolución clínica durante el seguimiento (Tabla 31), y 18,85 veces mayor de desarrollar progresión del TNM (Tabla 34). Nuestro estudio, por tanto, confirma la importancia de la localización en el CEC y demuestra que, independientemente de otros factores de riesgo asociados, la localización del tumor primario otorga un riesgo mayor de complicaciones en esta enfermedad.

1.1.5 La recidiva local

La frecuencia de recidiva local en el CEC varía, según las series, entre un 8 y un 13 % de los casos (Brantsch *et al.*, 2008; Eroglu *et al.*, 1996; Mourouzis *et al.*, 2009; Petter and Haustein, 1998; Roozeboom *et al.*, 2012; Rowe *et al.*, 1992; Weinberg *et al.*, 2007); y se reconoce de forma unánime como un factor de mal pronóstico en el CEC. En nuestra serie hubo 12 casos que desarrollaron recidiva local durante el seguimiento (el 12,24 %); aunque, como hemos indicado, esta proporción puede encontrarse sesgada debido a que el diseño del estudio no fue puramente prospectivo. El tiempo hasta la recidiva local varió en nuestra serie desde los 2,5 a los 14 meses. Resulta sorprendente que los tumores que desarrollaron recidiva local más precozmente presentaban márgenes quirúrgicos libres tras su extirpación, en los cortes evaluados.

Como hemos indicado, la recidiva local se considera un factor de mal pronóstico en el CEC y por ello, suele evaluarse en los estudios sobre factores pronósticos del CEC, y también de otros tumores. Los CEC recurrentes tienden a ser de mayor tamaño que los tumores primarios y se asocian con más frecuencia a infiltración perineural, infiltración linfovascular e infiltración del tejido celular subcutáneo (Clayman *et al.*, 2005). Además, los tumores recurrentes tienen un mayor riesgo de volver a recurrir localmente que los tumores primarios (Clayman *et al.*, 2005), probablemente debido a la mayor frecuencia de factores de riesgo de mal pronóstico que asocian. En nuestro caso no se evaluó el tumor secundario –recurrente–, sino el tumor primario que dio lugar a la recidiva local. No obstante, evaluar los CEC que han recurrido y su comparación con los tumores primarios podría arrojar más luz sobre las características y el pronóstico de este evento de mala evolución clínica. Los tumores que desarrollan recidiva local también se asocian a mayor riesgo de metástasis ganglionares (Cherpelis *et al.*, 2002; Veness *et al.*, 2006). Por todo ello, predecir el desarrollo de la recidiva local es un objetivo esencial en diversos estudios de factores pronósticos del CEC (Roozeboom *et al.*, 2012).

En nuestro estudio, la recidiva local se relacionó con una serie de características del tumor primario, incluidas un mayor estadio T al diagnóstico, patrón de crecimiento infiltrativo, desmoplasia, la ulceración superficial, infiltración perineural y linfovascular, así como con tumores primarios más grandes y de mayor espesor (Tabla 29). Además, la recidiva local se relacionó con el sexo femenino (algo que discutiremos más adelante). En el análisis multivariante, los factores independientes de riesgo de recidiva local fueron solamente la infiltración perineural y el sexo femenino (Tabla 32). La infiltración perineural confirió un riesgo 12,75 veces mayor de recidiva local en los tumores que la presentaban. Respecto al sexo femenino, lo discutiremos en detalle en el apartado correspondiente de esta discusión.

El espesor y el tamaño tumorales se han demostrado como factores de riesgo de recidiva local en otros estudios (Dinehart and Peterson, 2005; Roozeboom *et al.*, 2012); especialmente el espesor tumoral y la desmoplasia fueron factores de riesgo independientes en una cohorte grande de pacientes a la que ya nos hemos referido previamente en esta discusión (Brantsch *et al.*, 2008). Además, la recidiva local se ha relacionado en otros estudios con la invasión de estructuras más profundas (Clayman *et al.*, 2005) y con localizaciones de labio inferior y pabellón auricular (Quaedvlieg *et al.*, 2006; Rowe *et al.*, 1992). La recidiva local se ha asociado también a la extirpación incompleta del tumor primario (Huang and Boyce, 2004; Veness, 2007). En nuestro estudio, ya hemos indicado que los tumores que recurrieron precozmente habían exhibido márgenes quirúrgicos libres de tumor en el estudio histopatológico lo que pone de manifiesto la necesidad de definir de manera más adecuada y consensuada los márgenes quirúrgicos en el CEC (Brodland and Zitelli, 1992; de Visscher *et al.*, 2002; Huang and Boyce, 2004; Thomas *et al.*, 2003).

En nuestro trabajo, la infiltración perineural se relacionó claramente con el riesgo de recidiva local, tanto en el análisis univariante (Tabla 29) como en la regresión logística (Tabla 32). Otros estudios ya demostraron la independencia de la infiltración perineural como factor de riesgo de recidiva local en el CEC (Balamucki *et al.*, 2011; Kyrgidis *et al.*, 2010); pero en otros, no se relacionó con la presencia de recidiva local (Roozeboom *et al.*, 2012). Sorprende que, a pesar de que la infiltración perineural forma parte de los criterios de estadiaje de la AJCC y de la UICC, otros estudios importantes no hayan evaluado la asociación de la infiltración perineural como factor de riesgo sobre la recidiva local (Brantsch *et al.*, 2008).

Ya en los años 80 un estudio demostró diferencias significativas entre el riesgo de progresión ganglionar en tumores primarios y tumores que habían recurrido localmente (15% vs 2%)(Grover *et al.*, 1989). Poco después, una revisión sistemática clásica que evaluó los factores de riesgo en el CEC, demostró a partir de los datos de otros estudios previamente publicados, que la incidencia de metástasis ganglionares era más alta en los tumores que habían desarrollado una recidiva local en el labio inferior y la oreja (Rowe *et al.*, 1992). Otros estudios más recientes han demostrado que la recidiva local se asocia a un mayor riesgo de metástasis ganglionares en el CEC (Cherpelis *et al.*, 2002; Dean *et al.*; Veness *et al.*, 2006). En nuestro estudio demostramos mediante análisis multivariante que la recidiva local es un factor independiente de riesgo de progresión del CEC, y que su presencia incrementa en 6,8 veces la probabilidad de progresión del TNM (Tabla 34).

1.2 Características clínico-patológicas y epidemiológicas del CEC con valor pronóstico probable

Existen otras características clínico-patológicas y epidemiológicas del CEC con valor pronóstico probable, según la literatura, como son la desmoplasia y el patrón de crecimiento (Brantsch *et al.*, 2008; Cherpelis *et al.*, 2002). Pasamos a discutir las, arreglo a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral.

1.2.1 Desmoplasia

La desmoplasia en el CEC ha sido considerada una característica de tumores más agresivos (Brantsch *et al.*, 2008). La incidencia de desmoplasia en el CEC varía de unos estudios a otros, aunque en los dos estudios prospectivos más consistentes que han evaluado este fenómeno en el CEC fue del 7,4 % (Breuninger *et al.*, 1997) y del 8,3 % (Brantsch *et al.*, 2008). En nuestro estudio, demostramos la presencia de desmoplasia en un 19,3 % de los tumores, lo que como ya hemos indicado, no refleja realmente la frecuencia de este hallazgo en el CEC,

sino que es más alto por el diseño del trabajo. En general, se considera que la desmoplasia es un hallazgo poco frecuente en el CEC (Brantsch *et al.*, 2008).

La presencia de desmoplasia se ha relacionado con un mayor riesgo de progresión tumoral en el CEC en un estudio con 184 pacientes (Petter and Haustein, 1998); con tumores localmente agresivos en otro estudio con 73 pacientes (Salmon *et al.*, 2011); y con un riesgo 6 veces superior de metástasis ganglionares y 10 veces más alto de recidiva local, ambos en un estudio llevado a cabo sobre 594 pacientes (Breuninger *et al.*, 1997). En otro estudio, un análisis multivariante demostró que la desmoplasia fue un factor de riesgo independiente para el desarrollo de recidiva local (n = 623 pacientes) (Brantsch *et al.*, 2008). A pesar del posible valor de la desmoplasia como factor histopatológico de alto riesgo en el CEC, ésta no se ha considerado hasta el momento en la definición del estadiaje evolutivo de estos tumores (Karia *et al.*, 2013b).

En nuestro estudio, la desmoplasia se relacionó con varios factores de mal pronóstico. Concretamente, con la presencia de infiltración perineural, al grado pobre de diferenciación y, especialmente, al patrón de crecimiento infiltrativo (Tabla 23), lo que de alguna manera, ya se había reconocido en trabajos anteriores (Salmon *et al.*, 2011). Además, se relacionó con un riesgo mayor de recidiva local del tumor en el análisis univariante (Tabla 29). No obstante, no se demostró su valor como factor predictor independiente en el análisis multivariante, aunque existen otros estudios que sí lo han hecho (Brantsch *et al.*, 2008). En este sentido, serán necesarios nuevos estudios de validación para valorar la influencia real de la desmoplasia en el pronóstico del CEC y sobre todo, su independencia real como factor de alto riesgo. En cuanto a su asociación con otros factores histopatológicos, en nuestro estudio, la presencia de desmoplasia se relacionó de forma importante con la infiltración perineural y con el patrón de crecimiento infiltrativo. No obstante, el trabajo más consistente en el que se evaluó la desmoplasia como factor pronóstico del CEC y a partir del cual se concluyó su independencia como factor de riesgo de la recidiva local, no evaluó estas otras características en los tumores estudiados (Brantsch *et al.*, 2008). Sería, por lo tanto, útil evaluar la desmoplasia junto con otros factores de riesgo histopatológicos relacionados con el desarrollo de recidiva local con los que ésta puede co-variar, con el fin de demostrar su independencia real.

Además, resulta especialmente interesante y poco conocida la biología tumoral relacionada con la desmoplasia, prácticamente no estudiada en el CEC, aunque mejor conocida en otros tumores. En general, el microambiente tumoral se ha estudiado poco en el CEC, y su mejor conocimiento ayudaría a conocer mejor el comportamiento biológico y evolutivo del CEC. En este sentido, TGF-beta se ha identificado como un factor molecular relacionado con el desarrollo del cáncer y tiene un reconocido papel en el microambiente tumoral (Massague, 2012; Pickup *et al.*, 2013; Wakefield and Hill, 2013), así como en estados pro-fibróticos (Chen *et al.*, 2011; Henderson and Sheppard, 2012; Kulkarni *et al.*, 2011), por lo que sería interesante

evaluar su papel en el desarrollo de la desmoplasia en el CEC y, en este sentido, tenemos la idea de llevar a cabo estudios en el futuro.

1.2.2 Patrón de crecimiento infiltrativo

En estudios ya antiguos se identificó el patrón de crecimiento como un factor pronóstico en el CEC (Frierson and Cooper, 1986; Frierson *et al.*, 1988). También se ha demostrado la existencia de asociación entre patrón de crecimiento infiltrativo y tumores más pobremente diferenciados, infiltración perineural, mayor espesor (Frierson and Cooper, 1986), y una mayor frecuencia de desmoplasia (Salmon *et al.*, 2011). Más recientemente, el patrón de crecimiento infiltrativo se ha relacionado con mal pronóstico en el carcinoma epidermoide oral (Cherpelis *et al.*, 2002; Soland *et al.*, 2008). La presencia o ausencia de un componente infiltrativo en el frente de invasión del CEC se discutió en la elaboración de las guías dínicas de la NCCN®. Algunos autores reconocieron este parámetro como un factor de riesgo. Sin embargo, los patólogos integrantes del comité que elaboró la última actualización de las guías de la NCCN® este mismo año 2015, defendieron que ese parámetro histopatológico se correlaciona con el grado de diferenciación, y lo consideraron una característica descriptiva que no es referida rutinariamente en los informes. Por este motivo, el patrón de crecimiento infiltrativo fue excluido como factor de riesgo en la última actualización de dichas guías (NCCN, 2015).

En nuestro estudio, el patrón de crecimiento se relacionó con varios factores de mal pronóstico del CEC, de acuerdo con otros trabajos publicados, como son la infiltración perineural (Frierson and Cooper, 1986) y linfovascular, el espesor (Frierson and Cooper, 1986) y el tamaño tumorales, con la desmoplasia, algo más recientemente observado (Salmon *et al.*, 2011), y con el grado pobre de diferenciación (Frierson and Cooper, 1986) (Tabla 22). Dado que el tamaño y el espesor tumorales correlacionan fuertemente entre sí, no sólo en nuestro trabajo, sino también en otros estudios (Veness *et al.*, 2006), no es de extrañar que el patrón de crecimiento infiltrativo también se asocie al tamaño horizontal del tumor. En el análisis univariante, el patrón de crecimiento infiltrativo se relacionó con el desarrollo de eventos de mala evolución clínica, y específicamente con la recidiva local, el riesgo de metástasis ganglionares y la progresión de la clasificación TNM durante el seguimiento (Tabla 29). El patrón de crecimiento infiltrativo se ha identificado como factor de riesgo de metástasis en el CEC (Cherpelis *et al.*, 2002), aunque sin demostrarse su independencia con un análisis multivariante. No es de extrañar que dado que el patrón de crecimiento infiltrativo se asocia a varios factores de alto riesgo en el CEC, se asocie también con el desarrollo de metástasis. No obstante, en el análisis multivariante no demostramos que el patrón de crecimiento fuera un factor de riesgo independiente de predicción de eventos de mala evolución clínica. En este sentido, parece ser un factor de mal pronóstico pero co-varía con otros factores también de mal pronóstico a los que se asocia y que, probablemente, tengan una mayor influencia a la

hora de definir comportamiento del CEC. Por otro lado, en nuestra serie el patrón de crecimiento infiltrativo afectó a más de la mitad de los tumores (n = 52), lo que puede haber reducido la capacidad de discriminación de este factor.

Es necesario tener en cuenta que el patrón de crecimiento no se ha estudiado extensamente en series grandes de pacientes con CEC y en este sentido, sería interesante evaluarlo en series más numerosas. Lo más importante en el patrón de crecimiento no es el aspecto descriptivo, sino el diferente comportamiento potencial de las áreas infiltrativas del tumor. Un mejor conocimiento del comportamiento de las áreas infiltrativas y de sus diferentes aspectos biológicos, podría ayudar a definir mejor el componente del tumor responsable de las metástasis y de la recidiva local. Por todo ello, una evaluación más exhaustiva del patrón de crecimiento en el CEC y específicamente, del componente celular del frente de invasión de estos tumores, parece un punto pendiente que podría ser interesante desarrollar en el futuro.

1.2.3 La ulceración

La ulceración, definida como una solución de continuidad en el epitelio tumoral, se ha estudiado poco en el CEC. Se ha demostrado que la ulceración es un factor pronóstico independiente importante en otras formas de cáncer de piel, como el melanoma (Balch *et al.*, 2009). Se desconoce la frecuencia de la ulceración en el CEC, pero en un estudio reciente se ha visto que los tumores ulcerados se han asociado a una reducción de la supervivencia (Kricker *et al.*, 2014). A pesar de que se ha descrito que, en general, los tumores ulcerados tienden a ser más grandes (Kricker *et al.*, 2014), y acumulan otros factores de mal pronóstico asociados, la relevancia de la ulceración como factor de riesgo de una menor supervivencia sólo se ha demostrado en un único trabajo (Petter and Haustein, 1998). Posteriormente, otros estudios han evaluado también la influencia de la ulceración en el pronóstico del CEC, pero sin encontrar una relación clara con este (Clayman *et al.*, 2005). Estudios posteriores, con grandes series de pacientes, no han evaluado la ulceración en el CEC y su potencial relación con el pronóstico. La ulceración es un parámetro no incluido dentro de los factores de riesgo modificadores del estadio T en la última clasificación de la AJCC del año 2010 (Farasat *et al.*, 2011) ni en el estadiaje alternativo del *Brigham and Women's Hospital (BWH)* (Karia *et al.*, 2013b) y tampoco se reconoce dentro de los factores de riesgo del NCCN.

En nuestra serie de pacientes se comprobó ulceración en 53 tumores y se demostró en el análisis univariante correlación con varios parámetros clínico-patológicos de mal pronóstico, como fueron con el mayor tamaño y espesor tumorales, la infiltración perineural y linfovascular, el patrón de crecimiento infiltrativo, el grado pobre de diferenciación y, en general, con estadios tumorales más avanzados (Tabla 24). La presencia de ulceración se ha relacionado con un elevado índice mitótico (Petter and Haustein, 1998), aunque nosotros no lo

hemos demostrado, y con una cierta tendencia a asociarse con espesor tumoral (Petter and Haustein, 1998). Además, se ha relacionado con la velocidad de crecimiento (Kricker *et al.*, 2014), con la que tampoco hemos encontrado asociación. No obstante, encontramos que la velocidad de crecimiento y el índice proliferativo sí se encuentran relacionados en nuestro estudio. La correlación de la ulceración con otros factores de mal pronóstico no ha sido convenientemente evaluada. En nuestro estudio además, la presencia de ulceración en el tumor se relacionó con el desarrollo de eventos de mala evolución considerados de forma global y, específicamente, con la recidiva local y el desarrollo de metástasis (Tabla 29). Demostramos además, en un modelo multivariante, que la asociación de la ulceración con eventos de mala evolución clínica fue independiente de otros factores de riesgo, de modo que la presencia de ulceración se asoció a un incremento del riesgo de 5,95 veces de desarrollar algún evento de mala evolución clínica (Tabla 31). Pensamos que la ulceración debería ser un parámetro evaluado en series más largas de pacientes, para intentar validar nuestros resultados que claramente, indican que la ulceración puede ser un factor predictivo de mal pronóstico en el CEC.

1.2.4 El sexo femenino puede ser un factor de riesgo independiente del desarrollo de recidiva local

El sexo no es un factor de riesgo reconocido en el CEC. Algunos estudios relacionan el sexo masculino con una mayor frecuencia de metástasis (Brougham *et al.*, 2012b) o con tumores de mayor tamaño (Clayman *et al.*, 2005); aunque esos trabajos no han confirmado que el sexo masculino sea un factor de riesgo independiente mediante estudios multivariantes (Brougham *et al.*, 2012a). El sexo femenino no se ha relacionado hasta ahora en la literatura con un mayor riesgo de metástasis ni de progresión en el CEC. Se ha indicado que los tumores tendrían a ser más grandes en pacientes varones (Kricker *et al.*, 2014), algo que nosotros no hemos observado en nuestra serie de pacientes.

En nuestro estudio, en el análisis univariante comprobamos un mayor riesgo de recidiva local en mujeres (Tabla 29). Aunque también se observó cierta tendencia a que los CEC de mayor tamaño (de más de 20 mm) se dieran en mujeres, y los de menor tamaño en hombres, ésta asociación no alcanzó la significación estadística. Por otra parte, no hubo diferencias en función del sexo en el espesor, ni en el riesgo de infiltración perineural, ni linfovascular, ni asociación con un patrón de crecimiento concreto, ni con el grado de diferenciación, ni con la presencia de desmoplasia. Tampoco hubo diferencias significativas entre hombres y mujeres en la proporción de pacientes con antecedentes de cáncer cutáneo de tipo no melanoma, ni entre la proporción de tumores que se extirparon completamente, ni en relación con el grado de inmunodepresión. Es interesante resaltar que las diferencias relacionadas con el sexo y el riesgo de recidiva local en el CEC en nuestra serie, se demostraron

independientes de otros factores de riesgo mediante el análisis multivariante, en el que se demostró que el sexo femenino confería un riesgo 6,24 veces superior de desarrollar recidiva local (Tabla 32).

Estos hallazgos deberán confirmarse en estudios posteriores con series de pacientes más grandes. Por otro lado, al ser evidente en nuestro estudio la evaluación de la influencia del sexo en el pronóstico, si ésta no se ha demostrado previamente, nos preguntamos si podríamos estar cometiendo algún tipo de sesgo que pudiera ser, de alguna manera, responsable de este resultado. Por ello pensamos que este resultado debe ser tomado con cautela, hasta que podamos validarlo con una serie más grande de pacientes, idealmente procedentes de varios centros, para evitar el sesgo potencial que pudiéramos estar cometiendo nosotros si existiera, y que no somos capaces de identificar.

1.2.5 El infiltrado inflamatorio como posible factor pronóstico

Los infiltrados inflamatorios y sus características han sido poco estudiados como factor pronóstico del CEC, y no se induyen como criterio de estadiaje en la dasificación TNM de la AJCC, ni como factor de riesgo en las guías de la NCCN. No obstante, el microambiente del tumor y la inflamación asociada al mismo, se han relacionado con la patogenia y el pronóstico de diversas formas de cáncer, y existe un intenso campo de trabajo en esa línea de investigación (Allen and Louise Jones, 2010; Antonioli *et al.*, 2013; Bissell and Hines, 2011; Jochems and Schlom, 2011; Vasievich and Huang, 2011; Vered *et al.*, 2011b). Incluso se ha demostrado que las células epiteliales pueden transformarse por influencia de un infiltrado inflamatorio crónico (Arwert *et al.*, 2010).

Los infiltrados inflamatorios en el CEC sólo han sido evaluados en trabajos aislados. Aunque su valor pronóstico es dudoso con la información disponible, existen estudios que sí han encontrado alguna información en este sentido, tanto para el infiltrado inflamatorio en general, como para el predominio de distintos componentes celulares en el mismo. Así, se ha descrito que el infiltrado del CEC se ha asociado al tamaño del tumor y la profundidad de invasión (Meneses *et al.*, 1998). También se han asociado con un peor pronóstico la presencia de mastocitos (Coussens *et al.*, 1999), la presencia de eosinófilos (Dorta *et al.*, 2002) y el predominio de macrófagos (Sica *et al.*, 2006). Aunque, para algunos autores, la inflamación asociada al tumor no ha sido identificada como un factor de riesgo de metástasis (Cherpelis *et al.*, 2002), otros autores sí han reconocido su influencia en el pronóstico y en la progresión ganglionar (Moore *et al.*, 2005).

Hay que distinguir, según su localización, entre infiltrado inflamatorio peritumoral e intratumoral. La mayoría de los tumores de nuestra serie presentaron un infiltrado inflamatorio peritumoral moderado (33/98) o intenso (42/98). Curiosamente, en el infiltrado

inflamatorio intratumoral se invirtió la tendencia, pues éste fue más frecuentemente nulo (46/98) o escaso (31/98) (Figura 14). En nuestro estudio, la intensidad del infiltrado inflamatorio peritumoral se asoció a tumores con características de mejor pronóstico, tales como un menor grado de estadio T (según la clasificación alternativa del *Brigham and Women's Hospital*), tumores con buen y moderado grado de diferenciación, con patrón de crecimiento expansivo, carentes de infiltración perineural, de menor espesor y con un índice de proliferación más bajo (Tabla 27). El infiltrado inflamatorio peritumoral no se relacionó con el desarrollo de eventos de mala evolución durante el seguimiento. Esto contrasta con otros estudios que sí han relacionado el infiltrado inflamatorio peritumoral con un peor pronóstico del CEC (Costa Ade *et al.*, 2005) (Tabla 29).

Por otra parte, el infiltrado inflamatorio intratumoral intenso se relacionó en nuestro estudio con parámetros de peor pronóstico en el CEC, tales como un mayor estadio T al diagnóstico, un grado pobre de diferenciación, un patrón de crecimiento infiltrativo, ulceración en el epitelio y un mayor tamaño tumoral (Tabla 27). Además, el infiltrado inflamatorio intratumoral intenso se asoció a un mayor riesgo de desarrollar eventos de mala evolución durante el seguimiento considerados de forma global, en concreto con la progresión ganglionar (Tabla 29). Además, cuando se incluyeron los infiltrados inflamatorios entre las variables clínico-patológicas al elaborar la regresión logística, el infiltrado inflamatorio intratumoral intenso fue un factor de riesgo independiente predictor de eventos de mala evolución considerados de forma global (Tabla 35) y, en concreto, de la progresión ganglionar (Tabla 36) y de la progresión del TNM (Tabla 37).

En cuanto a las características del componente inflamatorio, en general, los estudios en cáncer se han centrado especialmente en los linfocitos, en el infiltrado inflamatorio linfoide intratumoral (Moore *et al.*, 2005). Más recientemente, se ha prestado atención a la intensidad de los infiltrados inflamatorios y a las características fenotípicas de los mismos. Se ha demostrado la importancia de la inmunidad celular en el carcinoma epidermoide de mucosa oral, señalando el predominio de los linfocitos T y de los macrófagos frente a los linfocitos B en el infiltrado inflamatorio. Aunque no se han visto diferencias significativas en esos infiltrados en función del grado de diferenciación del tumor, ni tampoco se ha demostrado significación pronóstica en la enfermedad en función de las características del infiltrado inflamatorio (Vieira *et al.*, 2008). Finalmente, un estudio reciente parece atribuir un valor pronóstico a la presencia importante de linfocitos T reguladores intratumorales en comparación con los citotóxicos, tal y como se ha demostrado en otras formas de cáncer (Azzimonti *et al.*, 2014). No obstante, los resultados que arrojan los estudios hasta el momento publicados a este respecto son controvertidos. Además, el diseño de los estudios ha sido muy distinto en cada caso, de manera que no existen estudios que hayan validado lo demostrado en otros previos. En definitiva, el infiltrado inflamatorio podría jugar un papel importante en el CEC y deberían diseñarse más estudios de cara a conocer mejor su relevancia en el pronóstico de la enfermedad. El mayor interés en la investigación de los infiltrados inflamatorios en el cáncer se

está centrando en la evaluación del inmunofenotipo de las células inflamatorias y en este sentido tenemos la intención de, en estudios futuros, valorar los tipos celulares que infiltran en el CEC e intentar correlacionarlo con el pronóstico de los tumores.

1.3 Evaluación de la capacidad predictiva de mala evolución clínica mediante sistemas de estadiaje diferentes

En la edición de la AJCC del año 2010 sobre el estadiaje del CEC, los tumores se clasifican en T1, cuando tienen menos de 2 cm de diámetro; y en T2, cuando son mayores de 2 cm de diámetro y, a su vez, asocian dos o más factores de riesgo (como infiltración perineural, espesor mayor de 2 mm de diámetro, localización en labio inferior y/o oreja y grado pobre de diferenciación) (Farasat *et al.*, 2011; Metchnikoff *et al.*, 2012). Debido a cómo esta clasificación define los estadios T1 y T2, la mayoría de los CEC caen en alguno de estos dos estadios. Dada la frecuencia escasa de metástasis en los tumores de tamaño pequeño y sin factores de riesgo asociados, y la frecuencia pequeña de invasión del hueso, la inmensa mayoría de los eventos de mala evolución clínica en el CEC se producen en los tumores que, según la actual clasificación de la AJCC, se categorizan como en estadio T2. En este sentido, parece que el sistema de clasificación actual de la AJCC para el CEC tendría una escasa potencia en la predictibilidad de eventos de mala evolución clínica para la mayor parte de los casos. Por ello, se han diseñado estudios para intentar predecir de manera más fiable el pronóstico de pacientes con CEC, especialmente con la idea de definir mejor el subtipo T2. Comentamos a continuación someramente los estudios más importantes sobre ello y discutimos nuestros resultados en ese contexto.

Como ya comentamos, en un estudio prospectivo con una serie grande de pacientes, se le dio prioridad al espesor del tumor como base para establecer el estadio T. Los autores sugirieron que los tumores menores de 2 mm de espesor deberían ser clasificados como T1, los de 2 a 6 mm como T2 y los de más de 6 mm como T3 (Brantsch *et al.*, 2008). Estos autores demostraron que el espesor era capaz de discriminar mejor el riesgo de metástasis que otros factores de riesgo. No obstante, en la clasificación de la AJCC del año 2010, no se siguieron estas recomendaciones y sólo se realizaron cambios muy sutiles sobre la clasificación previa TNM. Más recientemente, un estudio sobre 256 casos sugirió la existencia de 4 factores de riesgo independientes en el pronóstico de pacientes con CEC: el grado pobre de diferenciación, el diámetro tumoral mayor de 2 cm, la presencia de infiltración perineural y la invasión más allá del tejido celular subcutáneo (Jambusaria-Pahlajani *et al.*, 2009). Estos factores se incorporaron para elaborar un estadiaje alternativo del estadio T. Los autores concluyeron que los tumores sin ninguno de los anteriores factores de riesgo debían considerarse T1; aquéllos con un único factor de riesgo, T2a; los tumores que incluyeran 2 ó 3 factores de riesgo debían considerarse T2b; y la presencia de 4 factores de riesgo y/o de la invasión del hueso, T4

(Jambusaria-Pahlajani *et al.*, 2009). Los hallazgos iniciales se validaron posteriormente en una serie de 1818 pacientes, demostrando un mayor valor predictivo que el estadiaje estándar (Karia *et al.*, 2013b). En este sentido, aparte del estadiaje de la IUAC (*International Union Against Cancer*), previamente ya comparado en uno de los estudios que aquí se comentan (Karia *et al.*, 2013b), existen la clasificación de la AJCC (TNM) (Farasat *et al.*, 2011; Metchnikoff *et al.*, 2012), la clasificación alternativa del *Brigham and Women's Hospital* (Jambusaria-Pahlajani *et al.*; Karia *et al.*, 2013b) y el estadiaje tumoral basado en el espesor (Brantsch *et al.*, 2008).

En nuestro estudio construimos un modelo de regresión logística, para evaluar la capacidad predictiva sobre eventos de mala evolución clínica en el CEC, basados en cada uno de estos sistemas de clasificación. Obtuvimos que, los tumores clasificados como T2b en la clasificación del *Brigham and Women's Hospital*, pronosticaron de forma más específica la evolución posterior de la enfermedad que los clasificados como T2 en la clasificación TNM de la AJCC y que los que midieron más de 6 mm de espesor (T3) en lo referente al desarrollo de recidiva local (Tabla 39). Considerando cualquier evento de mala evolución clínica, la clasificación alternativa del *Brigham and Women's Hospital* y la clasificación basada en el espesor fueron superiores a la clasificación TNM de la AJCC (Tabla 38). Desde otro punto de vista, el espesor mayor de 6 mm predijo mejor el desarrollo de metástasis ganglionares que ninguno de los otros sistemas (Tabla 40). El estadiaje basado en el espesor y el estadiaje de la AJCC fueron los que mejor predijeron la progresión del TNM durante el seguimiento (Tabla 41). En resumen, la séptima edición de la clasificación TNM tiene un valor predictivo discreto de eventos de mala evolución clínica y progresión de la enfermedad, y parece que debería ser mejorada. A la luz de estos resultados, serían necesarios nuevos estudios que confirmen que la clasificación TNM necesitaría reconsiderarse para sus siguientes ediciones. También podría ser interesante llevar a cabo un estadiaje que indujera más de un sistema, lo que podría definir mejor la evolución tumoral en diferentes aspectos evolutivos de la enfermedad.

1.4 La velocidad de crecimiento y la inmunosupresión están relacionados con la latencia hasta el desarrollo de eventos de mala evolución clínica

1.4.1 El estado inmunitario del paciente

La inmunosupresión aumenta significativamente la incidencia de CEC (Euvrard *et al.*, 2003; Frierson *et al.*, 1988) y se ha relacionado con el desarrollo de metástasis en estudios con series grandes de pacientes (Brantsch *et al.*, 2008). No existe un consenso claro sobre qué criterios tener en cuenta para considerar que un paciente está inmunodeprimido. En nuestro

estudio, hemos considerado como pacientes inmunodeprimidos; (i) aquéllos que habían sido previamente trasplantados de un órgano sólido o de médula ósea y estaban con tratamiento inmunosupresor, o (ii) que tuvieran una medicación inmunosupresora de forma crónica, o (iii) que tuvieran leucemia linfática crónica. No existía ningún paciente VIH positivo. La literatura sobre pacientes trasplantados proporciona evidencia de un comportamiento tumoral agresivo y una mayor incidencia de metástasis en el CEC (Euvrard *et al.*, 2003). Un estudio retrospectivo de 307 pacientes con CEC, confirmó que aquéllos que habían recibido trasplante de órganos sólidos tenían una enfermedad más agresiva (Lott *et al.*, 2010). No está claro si esta mayor frecuencia de metástasis es simplemente debida al mayor número de tumores por paciente o si refleja un comportamiento más agresivo a nivel biológico. Parece que el tipo de inmunosupresor aplicado en el tratamiento también podría influir en el comportamiento tumoral. Así, los CEC agresivos, con transición epitelio-mesenquimal, son particularmente frecuentes en pacientes tratados con ciclosporina, lo que se ha asociado con la capacidad de ésta para inducir la producción de TGF-beta a nivel local (Harradine *et al.*, 2009). La NCCN® reconoce la inmunosupresión como un factor de riesgo en el CEC (NCCN, 2015).

En nuestro estudio, el número de pacientes inmunodeprimidos fue escaso (n = 10). Observamos una mayor velocidad hasta el desarrollo de recidiva local en estos pacientes y en el análisis univariante también hubo relación entre la inmunodepresión y el desarrollo de eventos de mala evolución clínica considerados de forma global (Figura 89). En el estudio multivariante mediante regresión de Cox, la inmunosupresión fue un factor de riesgo independiente del acortamiento del intervalo libre de enfermedad, junto con la expresión de D2-40 (Tabla 59). Serían útiles estudios más amplios sobre el comportamiento del CEC en pacientes inmunodeprimidos. Por otra parte, la mayoría de las referencias al respecto se basan en registros de pacientes sometidos a trasplante de órganos sólidos, siendo muy escasas las referencias al riesgo de cáncer cutáneo en pacientes sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos, algo que nuestro grupo de trabajo ya está evaluando.

1.4.2 La velocidad de crecimiento se asocia a una menor latencia hasta la progresión ganglionar

Algunos trabajos han investigado la influencia de la velocidad de crecimiento en ciertas formas de cáncer, con énfasis en el pronóstico. Una mayor velocidad de crecimiento se ha relacionado con un peor pronóstico en el cáncer de pulmón (Mattem and Volm, 2001), cáncer renal (Kato *et al.*, 2004), cáncer de mama (Galante *et al.*, 1986), carcinoma epidermoide de laringe (van Bockel *et al.*) y melanoma (Muhonen *et al.*, 1992); en este último, la velocidad de crecimiento se ha relacionado con la positividad en la biopsia selectiva del ganglio centinela (Tejera-Vaquero *et al.*, 2012a). Además, la velocidad de crecimiento se ha relacionado con la respuesta al tratamiento en cáncer (Ferte *et al.*; Niu *et al.*, 2014), y con un acortamiento del

intervalo libre de enfermedad y una menor latencia hasta la progresión ganglionar en el melanoma (Tejera-Vaquerizo *et al.*, 2010; Tejera-Vaquerizo *et al.*, 2012b).

Por todos estos datos previos en la literatura, parecía que la velocidad de crecimiento podría ser un parámetro clínico interesante para ser evaluado en nuestro estudio. En general, la velocidad de crecimiento se ha evaluado poco en el CEC, sin embargo, existe evidencia en la práctica clínica que sugiere una relación entre los CEC de crecimiento rápido y un pronóstico peor. Cuando un tumor crece rápido eso significa que su tasa de proliferación es más elevada (Liu *et al.*, 2008). El conocido marcaje frente a Ki-67 se relacionó con la velocidad de crecimiento en nuestro estudio, lo que pensamos que confiere fiabilidad a la medida de la velocidad de crecimiento en este trabajo (Tabla 28). Únicamente un artículo antiguo ha puesto de manifiesto que una velocidad de crecimiento rápida es un factor de mal pronóstico en el CEC (Fitzpatrick and Harwood, 1985). Los autores sugirieron el término de epiteloma agudo para esta variante de CEC (Fitzpatrick and Harwood, 1985). En aquel trabajo describieron que la variante de crecimiento rápido de CEC normalmente exhibió una costra central y, con frecuencia, un grado de diferenciación bueno (Fitzpatrick and Harwood, 1985). En nuestro estudio, la velocidad de crecimiento fue independiente del grado de diferenciación y del patrón de crecimiento de los tumores (Tabla 28).

A pesar de la falta de estudios consistentes, el grupo de trabajo de la NCCN® (NCCN, 2015) considera la velocidad de crecimiento rápida como un factor de mal pronóstico en el CEC. En nuestro estudio, la velocidad de crecimiento rápida se asoció a estadios tumorales más altos, tanto con en el sistema de estadiaje de la AJCC (Metchnikoff *et al.*, 2012), como con en el estadiaje alternativo del *Brigham and Women's Hospital* (Karia *et al.*, 2013b). Globalmente, se asume que el tiempo hasta el diagnóstico del tumor es un factor determinante en el tamaño del CEC (Eide *et al.*, 2005; Renzi *et al.*, 2010), pero en un artículo reciente sobre la velocidad de crecimiento, en una serie grande de pacientes con cáncer cutáneo no melanoma, los autores no encontraron asociación entre el tamaño del CEC y el tiempo transcurrido desde que la lesión había sido detectada por el paciente por primera vez y su diagnóstico en la consulta (Kricker *et al.*, 2014). Estos hallazgos sugieren que la velocidad de crecimiento es un factor más importante para el tamaño tumoral final en el momento del diagnóstico, que el tiempo que una lesión permanece sin tratamiento en el CEC (Kricker *et al.*, 2014); lo que, obviamente, no quiere decir que el tiempo sin diagnóstico no influya en el tamaño final, y que un diagnóstico más temprano no sea deseable. En nuestro estudio también hemos observado que los tumores con velocidades de crecimiento más altas fueron normalmente más grandes (Tabla 28). Por el contrario, no encontramos asociación entre el tamaño del tumor y el tiempo transcurrido desde que lo detectó el paciente hasta el diagnóstico de los tumores en la consulta (Tabla 28). Ello apoya que la velocidad de crecimiento es un factor más relevante en el tamaño final del CEC, y que el tamaño tumoral está menos influido por el tiempo que una lesión permanece sin tratamiento. Pero es importante resaltar que, en nuestro estudio, el tiempo hasta el diagnóstico sí se correlacionó con el espesor tumoral, independientemente del

tamaño en superficie del tumor, con la importancia que esto supone (Tabla 28). Por otro lado, el tiempo hasta el diagnóstico se correlacionó de forma inversa con la velocidad de crecimiento, lo que indica que cuanto mayor fue la velocidad de crecimiento del tumor, más precozmente fue consultado; probablemente, porque el paciente se dio cuenta más rápidamente de la lesión, el crecimiento rápido le supuso una mayor alarma y lo consultó antes que si se hubiera desarrollado lentamente.

En nuestro estudio, los tumores de crecimiento rápido (> 5 mm/mes) mostraron un acortamiento del intervalo libre de enfermedad y menor tiempo hasta la progresión ganglionar que los tumores de crecimiento más lento (< 5 mm/mes) (Figuras 90 y 92). No existe un consenso sobre qué punto de corte tomar para considerar la velocidad de crecimiento tumoral como un parámetro de alto riesgo. En este trabajo proponemos 5 mm al mes como un punto de corte fiable. En el análisis multivariante, confirmamos que la mayor velocidad de crecimiento fue un factor de riesgo independiente del acortamiento del intervalo libre de enfermedad y de la latencia hasta el desarrollo de metástasis ganglionares (Tabla 43).

En nuestro estudio, hemos demostrado las implicaciones de la velocidad de crecimiento en el intervalo libre de enfermedad y en la latencia hasta la progresión ganglionar, pero a partir de una serie limitada de pacientes. En función de estos resultados, pensamos que la velocidad de crecimiento debería ser evaluada más extensamente y validada en series más grandes de pacientes. Ello permitiría llegar a conclusiones más contundentes, no sólo de su papel como factor de mal pronóstico en el CEC, sino también sobre la conveniencia de guías de manejo y de seguimiento de estos pacientes, que deben ser vigilados más estrechamente. Por último, consideramos que recoger de forma sistemática la velocidad de crecimiento en el CEC es una buena práctica clínica que puede ser útil para predecir el pronóstico de los pacientes y que no supone costes adicionales en el manejo de la enfermedad.

2 FACTORES PRONÓSTICOS MOLECULARES EN EL CARCINOMA EPIDERMÓIDE CUTÁNEO

2.1 Son necesarios nuevos marcadores moleculares con valor predictivo en el CEC

Aunque se ha avanzado significativamente en el conocimiento de los factores pronósticos implicados en el CEC, especialmente desde el punto de vista clínico-patológico, no se ha logrado predecir completamente el comportamiento del tumor. Por ello, se han llevado a cabo diversos estudios moleculares con la idea de identificar marcadores que pudieran ser útiles a la hora de predecir el riesgo de mala evolución del tumor. En la mayoría de los casos, los estudios moleculares llevados a cabo han tenido un objetivo descriptivo y de comparación del comportamiento de esas moléculas en el CEC respecto de las queratosis actínicas o de la piel normal y, normalmente, sobre muestras pequeñas (Burnworth *et al.*, 2007; Campbell *et al.*, 1993; Delilbasi *et al.*, 2004; Dotto and Glusac, 2006; Gottlieb *et al.*, 1988; Hodges and Smoller, 2002; Mortier *et al.*, 2002; Soufir *et al.*, 1999; Toll *et al.*, 2010). En otras ocasiones los estudios se basaron sobre resultados en líneas celulares o en modelos animales (Bailleul *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1998; Burns *et al.*, 1991; Diaz-Guerra *et al.*, 1992; Dominey *et al.*, 1993; Frame *et al.*, 1998; Ichikawa *et al.*, 2000; Linardopoulos *et al.*, 1995), que no siempre producen resultados superponibles a lo que sucede en los tumores en el hombre y que al menos requieren posteriormente ser validados sobre muestras humanas. Además, en pocas ocasiones los estudios han tenido un enfoque pronóstico y, a menudo, los resultados no se han apoyado en análisis multivariantes para intentar evaluar el valor de los marcadores de una manera independiente. A pesar del indudable interés que han tenido la mayoría de los trabajos publicados a este respecto, su relevancia clínica hasta ahora ha sido limitada. En este sentido, ni el estadiaje de la AJCC (Farasat *et al.*, 2011), ni las guías clínicas de la NCCN® (NCCN, 2015) incluyen ningún marcador molecular como factor de riesgo del CEC o como factor predictivo de respuesta al tratamiento. Esto contrasta con lo que sucede en otros tumores, en los que el conocimiento de los factores moleculares implicados en su desarrollo son más conocidos. Por tanto, parece necesario incrementar la investigación de factores moleculares que participen en la patogenia del CEC, de modo que ayuden a conocer mejor la evolución de los tumores, el pronóstico de los pacientes y su potencial utilidad como dianas terapéuticas.

2.2 Los carcinomas epidermoides cutáneos son heterogéneos a nivel histopatológico y molecular

Los tumores sólidos, en general, y los carcinomas epidermoides, en particular, son heterogéneos (Marusyk *et al.*, 2012). Esto se debe a que la tumorigénesis es un proceso dinámico y ello hace que los modelos *in vitro* no sean, a veces, del todo extrapolables. Por otra parte, las líneas celulares derivadas de tumores, en muchas ocasiones se obtienen de la zona más abundante del tumor, lo que complica la predicción del pronóstico, porque los eventos de mala evolución clínica pueden proceder de un área del tumor que no tiene por qué ser la más abundante. No obstante, las líneas celulares tienen una enorme utilidad para la evaluación de las características biológicas del cáncer en general, aunque lo deseable es validar los resultados obtenidos a través de ellas en tumores humanos.

En nuestro conocimiento, no se han estudiado en profundidad las características de expresión de diferentes marcadores en las diferentes áreas del CEC, al menos explícitamente. Sin embargo, existe una creciente información que demuestra que los tumores tienen áreas diferentes y de hecho parece que en muchos casos, es precisamente el comportamiento de una de esas áreas, más que el comportamiento global de todo el tumor, el que determina el comportamiento biológico y el pronóstico del mismo (Prince *et al.*, 2007). Sería interesante evaluar en qué medida la expresión diferencial de estos marcadores en las diferentes zonas del tumor puede predecir un determinado comportamiento biológico.

Por todo lo anterior, en nuestro estudio hemos evaluado los niveles de expresión de distintos marcadores moleculares en las diferentes áreas de los tumores, previa selección de zonas representativas de los mismos. Evaluamos las diferencias de expresión entre las zonas más y menos diferenciadas, así como en el frente de invasión. En concreto comprobamos diferencias en la expresión de E-CADHERINA, VIMENTINA, CXCR4, EGFR, P16, P53, D2-40 y AE-1 (Tabla 51). Únicamente, no observamos diferencias significativas entre las distintas áreas del tumor en el caso de P63 y de CD44, ambos marcadores de células *stem* de la piel (Finlan and Hupp, 2007; Prince *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2011). Conviene señalar que aunque no demostramos diferencias entre las áreas del mismo tumor en el caso de la P63, su expresión sí se relacionó fuertemente con los tumores pobremente diferenciados, aunque en aquellos moderadamente diferenciados, no se demostraron diferencias entre las distintas áreas en función de la expresión de este parámetro. Como hemos indicado, este estudio de la expresión de marcadores moleculares en las diferentes zonas del tumor se hizo con el fin de evaluar las implicaciones clínicas de la heterogeneidad tumoral en el CEC.

2.3 Relación entre la expresión de marcadores moleculares con distintas características clínico-patológicas y evolutivas en el CEC.

2.3.1 La transición epitelio-mesénquima en el CEC

En general, los tumores diferenciados y las zonas diferenciadas de los tumores moderadamente diferenciados tienden a expresar E-CADHERINA y a no expresar VIMENTINA (Fuertes *et al.*, 2013b; Masferrer *et al.*, 2014). La expresión de VIMENTINA en los tumores de origen epitelial y en los CEC, se hace más evidente cuando en el tumor tiene lugar el proceso de transición epitelio-mesénquima (Hoot *et al.*, 2008; Nakamura and Tokura), que se ha asociado a la invasión tumoral (Hoot *et al.*, 2008; Nakamura and Tokura) y a la aparición de tumores de características sarcomatosas a partir de un origen epitelial (Cui W *et al.*, 1996), que en el caso del CEC son particularmente frecuentes en pacientes trasplantados tratados con ciclosporina (Harradine *et al.*, 2009). En cuanto al proceso invasivo, es raro ver en tumores una transición epitelio-mesénquima completa, sino más bien sólo parcial, sin alcanzar la célula un fenotipo fibroblastoide completo, y sin una sustitución completa del citoesqueleto epitelial por uno fusocelular, de VIMENTINA (Lu *et al.*, 2013; Micalizzi *et al.*, 2010; Nakaya and Sheng, 2013; Savagner, 2010; Toll *et al.*, 2013a). Además, se ha demostrado que la transición epitelio-mesénquima induce células con propiedades *stem* (Mani *et al.*, 2008).

Aunque la expresión de VIMENTINA es, de forma general, poco frecuente en el CEC, en nuestra serie de tumores, como cabría esperar, tendió a expresarse más en los tumores indiferenciados y en las zonas indiferenciadas de los tumores moderadamente diferenciados (Tabla 13, Figura 22), justo al contrario de lo que sucedió con E-CADHERINA (Tabla 13, Figura 21). Observamos la reducción de la expresión de membrana de E-CADHERINA, algo que se ha demostrado en el CEC en otros trabajos (Cano *et al.*, 2000; Lyakhovitsky *et al.*, 2004). Comprobamos que dicha expresión se mantenía de forma moderada/intensa en el 74,7 % de los tumores de nuestra serie, mientras se había perdido en la mayoría de las células en el resto de los tumores. Por otra parte, la pérdida de dicha expresión, fue significativamente más frecuente en las áreas indiferenciadas. De hecho, la expresión de E-CADHERINA se asoció con el grado bueno de diferenciación (Tabla 53). En un estudio reciente en que se evaluaron marcadores de transición epitelio-mesénquima en el CEC metastásico y no metastásico, se demostró una pérdida global de expresión de E-CADHERINA (considerando que su expresión es lo normal en el epitelio de la piel), si bien, la pérdida de expresión en la membrana no fue significativamente distinta en ambos grupos, pero la expresión nuclear de E-CADHERINA sí fue más común en los CEC metastásicos (Toll *et al.*, 2013a). En este sentido se ha publicado que la expresión de E-CADHERINA a nivel nuclear podría tener interés diagnóstico en otros tumores (Chetty R and Serra, 2008). Estamos pendientes de evaluar en nuestras muestras la existencia y significado de E-CADHERINA a nivel nuclear.

En nuestro estudio, la expresión de VIMENTINA se demostró, aproximadamente, en un 10 % de la muestra global. En las zonas diferenciadas, ninguno de los casos demostró expresión de VIMENTINA (moderada-intensa) (Tabla 13); en este sentido, se observó una marcada diferencia entre las áreas más y menos diferenciadas de los tumores (Tabla 51). La expresión de VIMENTINA en el trabajo anteriormente citado (Toll *et al.*, 2013a), fue significativamente más frecuente en el grupo de los CEC metastásicos (67,9%), que en el grupo de los CEC no metastásicos (31,4 %). Estas proporciones son más elevadas que las demostradas en nuestro estudio. Ello puede deberse a que los puntos de corte utilizados para su evaluación fueron distintos. Así, estos autores consideraron marcaje de VIMENTINA positivo a partir del 10% de células marcadas, mientras que en nuestro caso, tras la dicotomización de la variable, consideramos expresión positiva de VIMENTINA por encima del 25 % de células marcadas. Si tenemos en cuenta los mismos criterios seguidos por Toll y colaboradores, el porcentaje de tumores con expresión positiva de VIMENTINA fue superior al 25 % en nuestra serie, lo que se aproxima más al valor mostrado por esos autores.

En nuestro estudio, comprobamos que la expresión de VIMENTINA se relacionó con el grado pobre de diferenciación del tumor y con la presencia de infiltración linfovascular (Tabla 53). Además, se asoció a la presencia de eventos de mala evolución clínica durante el seguimiento, considerados de manera global, y específicamente, con el riesgo de recidiva local (Tabla 54). En este sentido, se ha demostrado que la expresión de VIMENTINA se relaciona con la recidiva local, la muerte relacionada con la enfermedad, estadios T más avanzados, el grado pobre de diferenciación y la desmoplasia (Toll *et al.*, 2013a). En nuestro estudio, no hemos conseguido demostrar asociación con la desmoplasia, ni con la infiltración perineural; además, no consideramos útil evaluar la asociación de la expresión de VIMENTINA con la muerte relacionada por CEC, por el escaso tamaño de la muestra de pacientes fallecidos por la enfermedad en nuestra serie. Como cabría esperar, la expresión de VIMENTINA y E-CADHERINA se correlacionaron inversamente en nuestro estudio (Tabla 44); lo que está de acuerdo con otros trabajos (Toll *et al.*, 2013a). No obstante, la expresión de VIMENTINA parece más útil para predecir progresión en el CEC, que la pérdida de la expresión de membrana de E-CADHERINA (Martins *et al.*, 2009; Toll *et al.*, 2013a) algo que nosotros también demostramos en el análisis univariante, aunque por el escaso tamaño de la muestra no hemos insistido en la discusión de este dato.

Las diferencias observadas en los niveles de expresión de VIMENTINA y E-CADHERINA en las zonas diferenciadas e indiferenciadas de los tumores y en el frente de invasión, probablemente esté regulada por los mismos factores de transcripción que determinan la transición epitelio-mesénquima completa. Por ello, para estudiar mejor estas diferencias de expresión de E-CADHERINA y VIMENTINA en las diferentes zonas del tumor, se necesitarían evaluar esos factores de transcripción y moléculas relacionadas con la misma, tales como SNAI1/SNAIL, SNAI2/SLUG, ZEB, TWIST y TGF-BETA, entre otros (Derynck *et al.*, 2014; Karreth

and Tuveson, 2004; Lamouille *et al.*, 2014; Peinado *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2013c; Zavadil and Bottinger, 2005), pero esto inicialmente, escapa a los objetivos de este estudio.

2.3.2 Importancia de P63 en el CEC

En nuestro estudio, todos los tumores exhibieron cierto grado de expresión de P63 (Tabla 13); y la expresión moderada-intensa (esto es superior al 25 % de la celularidad tumoral) se produjo en el 80,6 % de los casos. Hemos visto que P63 es un marcador nuclear en los queratinocitos del CEC, y que en la piel normal se expresa especialmente en las células de las capas más bajas, lo que está de acuerdo con la literatura (Dotto and Glusac, 2006; Oh *et al.*, 2011). En nuestro trabajo, la expresión de P63 fue mucho más frecuente en los tumores pobremente diferenciados (Tabla 53), algo que también se ha demostrado previamente en otro estudio (Dotto and Glusac, 2006). De hecho, P63 es un marcador que se ha relacionado con los CEC de células fusiformes y se ha identificado como marcador bastante específico de los mismos, aunque en el trabajo original se estudió una muestra relativamente pequeña ($n = 13$) (Dotto and Glusac, 2006). En general, como hemos indicado, P63 tiende a expresarse en el epitelio en capas basales y en células *stem* de la piel normal. Como es sabido, la zona basal de la piel es de alta proliferación (Fuentes *et al.*, 2013a). Ello puede concordar con el hecho de que, en nuestro estudio, la expresión de P63 se relacionó con un mayor índice proliferativo de los tumores, y se correlacionó de forma directa con la expresión de Ki-67 (Tabla 46, Figura 100). Efectivamente, hay evidencias que demuestran que P63 regularía la proliferación de los queratinocitos a partir de la regulación negativa de PTEN y con la activación de la vía de señalización de AKT implicada en la proliferación celular, entre otros procesos (Leonard *et al.*, 2011).

En nuestro estudio, comprobamos también una correlación inversa entre la expresión de P63 y la expresión de E-CADHERINA, y una asociación directa de P63 con la expresión de VIMENTINA (Tabla 46). Desde un punto de vista biológico, como hemos indicado, P63 parece tener importancia en la vía de señalización de AKT, que activaría la expresión de P63 (Leonard *et al.*, 2011). La vía de AKT parece también importante en la patogenia del CEC y se activaría a la vez que se produce la transición epitelio-mesénquima (Barrette *et al.*, 2014). Eso podría justificar que la expresión de P63 esté relacionada estadísticamente con marcadores de la transición epitelio-mesénquima (con E-CADHERINA de forma negativa y con VIMENTINA de manera positiva). Si bien, esta interpretación puede ser reduccionista, pues existen varias isoformas de AKT con funciones biológicas diferentes, según el contexto. Se desconocen en parte los activadores de la vía de AKT en el CEC y, en este sentido, P63 pudiera participar en esa activación (Leonard *et al.*, 2011).

Aparte de la relación de P63 con los tumores con grado pobre de diferenciación, la expresión de P63 es más frecuente en los tumores con índices de proliferación elevados y,

dato que se expresa en células de la capa basal de la piel normal donde la proliferación es mayor, es posible que también esté relacionada con la proliferación en el CEC. En nuestro estudio, como hemos indicado, la expresión de P63 se asoció a la pérdida de E-CADHERINA y a la expresión de VIMENTINA, algo que va a favor de que su expresión sea paralela a la pérdida de diferenciación y, en su caso, a la transición epitelio-mesenquima. En este sentido, P63 podría ser un marcador de CEC de peor pronóstico (con grado pobre de diferenciación), pero en nuestro trabajo, no se asoció con el desarrollo de eventos de mala evolución clínica.

2.3.3 Proliferación

El antígeno nuclear Ki-67 es un marcador de proliferación expresado únicamente en fases activas del ciclo celular, no se expresa en células en senescencia o en reposo (G0), ni en G1 temprana (Healy *et al.*, 1995). Por tanto, la cuantificación de su expresión en tejidos incluidos en parafina proporciona una buena estimación del índice de proliferación tumoral y de la fracción en crecimiento de una determinada subpoblación celular.

En general, se ha observado que la expresión de Ki-67 es más alta en el CEC (Shimizu *et al.*, 1999) y en la enfermedad de Bowen (Baum *et al.*, 1994) que en la piel normal. Se ha publicado que la expresión de Ki-67 se correlacionaría con la diferenciación, el espesor y la profundidad de invasión del CEC (Mansoor *et al.*, 1996). Pero, a pesar del valor pronóstico demostrado de este marcador en diversas formas de cáncer, algunos estudios no han demostrado un valor pronóstico claro en el CEC, en cuanto a la recurrencia tumoral y las metástasis (Kanitakis *et al.*, 1997); ni en el carcinoma epidermoide de pene (Stankiewicz *et al.*, 2012), aunque otros estudios aislados sí han demostrado su utilidad pronóstica (Jensen *et al.*; Petter and Haustein, 1998; Stankiewicz *et al.*, 2012). Por todo ello, su valor real sigue siendo controvertido.

En nuestro estudio, el marcaje frente a Ki-67 se correlacionó con el tamaño horizontal del tumor, pero no con el espesor. La expresión de Ki-67 no se asoció a ninguna otra característica histopatológica en nuestra serie; pero sí se correlacionó positivamente con la velocidad de crecimiento tumoral, aunque ya hemos discutido extensamente sobre ella en el apartado correspondiente. Por otra parte, existió una tendencia hacia la correlación entre la expresión de Ki-67 y el tiempo hasta la progresión ganglionar, aunque sin alcanzar la significación estadística, de manera que Ki-67 tendió a estar más elevado cuánto más precoz fue el desarrollo de metástasis ganglionares. El bajo número de pacientes que desarrollaron progresión ganglionar en nuestro estudio, hace que estos datos deban tomarse con precaución. No obstante, la relación que existe entre la velocidad de crecimiento y la latencia hasta la progresión ganglionar (que hemos discutido en el apartado correspondiente) y la co-variación entre Ki-67 y la velocidad de crecimiento, hacen pensar que, efectivamente, la expresión elevada de Ki-67 pudiera ser un marcador de mal pronóstico en el CEC.

Aunque los mecanismos de proliferación no se conocen bien en el CEC, la proliferación de los queratinocitos se ha relacionado con la expresión de EGFR (Jost *et al.*, 2000). Ello está de acuerdo con nuestro estudio, donde la positividad frente a Ki-67 se relacionó positivamente con la intensidad de expresión de EGFR (Tabla 49). Este receptor induce además la migración de queratinocitos normales y aumenta su supervivencia y la resistencia a la apoptosis (Rodeck *et al.*, 1997). En nuestro trabajo, la expresión de EGFR no se relacionó con parámetros clínico-patológicos, aunque sí lo hizo su expresión aberrante o citoplasmática, que fue especialmente frecuente en los tumores pobremente diferenciados (Tabla 53).

Como ya hemos explicado, la expresión de Ki-67 únicamente se asoció al tamaño horizontal del tumor, y se correlacionó con la expresión de P63 (Tabla 46) y de VIMENTINA (Tabla 45). La expresión de VIMENTINA no se ha reconocido como molécula relacionada claramente con la proliferación celular; pero su expresión en el CEC es más evidente en las zonas habitualmente más proliferantes, esto es las más indiferenciadas o tras la transición epitelio-mesénquima (Barrette *et al.*, 2014), lo que podría justificar la relación entre la expresión de VIMENTINA y de Ki-67.

2.3.4 Marcadores moleculares en CEC agresivos

En nuestro estudio, los tumores más indiferenciados y con rasgos de mayor agresividad, aparte de expresar más frecuentemente VIMENTINA y P63, y con menor frecuencia E-CADHERINA, tendieron a expresar más intensamente D2-40, EGFR y CXCR4. De los dos primeros hablaremos específicamente más adelante.

A pesar de lo indicado, la proporción de tumores que expresaron CXCR4 intensamente en nuestro estudio fue escasa (Tabla 13). Se ha demostrado que CXCR4 tiene un papel importante en el desarrollo de metástasis (Muller *et al.*, 2001). Su papel en el CEC no es bien conocido, aunque se ha reconocido su importancia en otras formas de cáncer, incluyendo otros tumores epiteliales que pueden ser superponibles en ciertos aspectos al CEC, como es el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (Albert *et al.*, 2012). Se ha reconocido el papel de CXCR4 en la migración celular y en la transición epitelio-mesénquima (Albert *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2005), lo que coincide con su expresión intensa en los tumores más agresivos en nuestra serie. Dado que el papel más importante conocido de CXCR4 en la carcinogénesis es en su participación en el desarrollo de metástasis, especialmente regulando la migración de las células tumorales a los tejidos que expresan CXCL12 (Muller *et al.*, 2001), sería interesante poder contar con una serie de CEC metastásicos más amplia para poder obtener información fiable y relevante a este respecto.

Por otra parte, hay dos aspectos que nos gustaría indicar sobre los tumores agresivos en nuestro estudio. Primero, los tumores con infiltración perineural tendieron a expresar

intensamente E-CADHERINA en la zona de infiltración del perineuro (Tabla 53), lo que haría pensar que el proceso de infiltración perineural no estaría, en principio, muy relacionado con la transición epitelio-mesénquima típica. Segundo, en nuestro estudio, P16 tendió a expresarse en la zona diferenciada de tumores agresivos (Tabla 54). Se ha publicado que en el CEC la expresión de P16 mostraría un incremento gradual desde la queratosis actínica pasando por el CEC *in situ* e invasor, respectivamente (Hodges and Smoller, 2002). P16 se ha relacionado con la senescencia de los queratinocitos y parece implicado también con el carcinoma epidermoide y lesiones premalignas de la mucosa oral (Parkinson, 2010). Quizás esto pueda deberse a un efecto dual de esta proteína en el proceso de carcinogénesis del CEC, tal y como se ha demostrado que existe con algunas otras moléculas como el TGF-beta.

2.3.5 EGFR es un factor pronóstico independiente del desarrollo de metástasis ganglionares y de progresión del TNM

Se ha demostrado la sobre-expresión de EGFR en diversos tumores humanos como cáncer de ovario, de cuello de útero, de vesícula, de esófago (Mukaiida *et al.*, 1991), de mama, de endometrio, colorrectal (Nicholson *et al.*, 2001) y en el CE de cabeza y cuello (Ang *et al.*, 2002; Derynck *et al.*, 1987; Maurizi *et al.*, 1996; Maurizi *et al.*, 1992; Niemiec *et al.*, 2004; Ozawa *et al.*, 1989; Rubin Grandis *et al.*, 1996). Aunque algunos autores han indicado una sobre-estimación de la relevancia de EGFR como factor pronóstico en el CE de cabeza y cuello (Fischer *et al.*, 2008), un meta-análisis demostró su relevancia pronóstica tanto de la sobre-expresión de EGFR como de las aberraciones cromosómicas del EGFR en estos tumores (Zhu *et al.*, 2013b).

La evidencia derivada de los estudios en otras formas de cáncer y específicamente en el CE de cabeza y cuello, nos indujo a estudiar la expresión de EGFR en el CEC. Se ha demostrado que EGFR se expresa con frecuencia en el CEC (Toll *et al.*, 2010). Además, se ha demostrado una frecuencia más alta de expresión aberrante citoplasmática de EGFR en el CEC en comparación con el queratoacantoma (Uribe and Gonzalez, 2011), y más del 43% de los CEC avanzados muestran sobre-expresión de EGFR (Fogarty *et al.*, 2007), aunque los datos con respecto a su asociación con la agresividad de los tumores es más controvertida. Así, mientras unos autores defienden que la expresión de EGFR se relacionaría con CECs más agresivos (Ch'ng *et al.*, 2008; Maubec *et al.*, 2005; Shimizu *et al.*, 2001), otros no parecen encontrarlo como un marcador pronóstico útil (Sweeny *et al.*, 2011). También se ha observado en el CEC la pérdida de la expresión de membrana de EGFR y su acumulación en el citoplasma (expresión aberrante), lo que se ha sugerido que sería el resultado de mutaciones en el gen de *EGFR* (Groves *et al.*, 1992). Se ha demostrado la sobre-expresión de EGFR en el 78,1 % de los casos de una serie de CEC (Toll *et al.*, 2010) y en el 56 % de una serie de CEC avanzados (Sweeny *et al.*, 2011) aunque sin implicaciones pronósticas en ninguna de las dos. En nuestra serie, hemos

demostrado sobre-expresión de EGFR en 33 casos (35,1 %) (Tabla 13) y fue significativamente más frecuente en los tumores primarios que progresaron, demostrándose (Tabla 54) su independencia en el análisis multivariante (Tablas 56, 57).

Las aberraciones cromosómicas que afectan al gen de *EGFR* en el CEC se han evaluado por hibridación *in situ* en diferentes estudios. En un estudio en el que se propuso que la sobre-expresión de EGFR era factor pronóstico del CEC, no se encontraron amplificaciones del gen EGFR, pero sí polisomías en el 20% de los casos (Ch'ng *et al.*, 2008). Otro estudio sí detectó amplificaciones en el gen *EGFR* en el 20% de los casos, pero predominaron las aberraciones numéricas en el 77% de los CECs, si bien, no se evaluó su posible relación con el pronóstico (Toll *et al.*, 2010). También demostraron un porcentaje más alto de queratinocitos con sobre-expresión de EGFR por inmunohistoquímica que aberraciones cromosómicas numéricas determinadas por FISH (Toll *et al.*, 2010). Por esta razón, parece que la sobre-expresión de EGFR no se correlacionaría necesariamente con las aberraciones cromosómicas numéricas determinadas por FISH. En nuestro estudio, se observó la amplificación del gen *EGFR* en el 7,1% de los casos por FISH, y no demostramos polisomías ni otros cambios en el resto de las muestras. Encontramos que la sobre-expresión de EGFR fue más común en los tumores con amplificación del gen (Figura 98); aunque estos datos deben ser tomados con precaución, debido al pequeño número de tumores que mostraron amplificación del gen *EGFR*.

El valor pronóstico de la sobreexpresión de *EGFR* en el CEC no se conoce bien, debido a los resultados controvertidos procedentes de distintos grupos de trabajo, como hemos comentado. En nuestra serie de pacientes con CEC observamos que la sobre-expresión de EGFR tiene implicaciones en el pronóstico, pues se asoció a la presencia de metástasis ganglionares y progresión tumoral, tanto en el análisis univariante (Tabla 54) como en el multivariante (Tablas 56, 57). Ello sugiere que las terapias anti-EGFR podrían ser útiles en ciertos pacientes seleccionados con CEC metastásico. Además, nuestros resultados, entre otros, avalan que existe evidencia para considerar que la sobre-expresión de EGFR podría ser un marcador molecular de mal pronóstico en el CEC. Pero se necesitarían de nuevo más estudios con series más grandes de pacientes para confirmar estas proposiciones.

2.3.6 La expresión de D2-40 se relaciona con la latencia hasta el desarrollo de eventos de mala evolución clínica en el CEC

D2-40 o PODOPLANINA se ha relacionado con el pronóstico de algunos tumores (Doeden *et al.*, 2009; Vormittag *et al.*, 2009), incluyendo el CEC (Toll *et al.*, 2012). Sin embargo, el mecanismo por el que D2-40 podría influir en la patogenia y comportamiento del CEC no se conoce bien. Se sabe que D2-40 puede actuar facilitando la migración de las células tumorales a partir de la remodelación de su citoesqueleto (Wicki *et al.*, 2006), lo que sugiere que podría

intervenir en el proceso de transición epitelio-mesenquima. El marcaje en el CEC frente a D2-40 de las células del endotelio linfático y de las células tumorales, es similar a los patrones de expresión que se observan en otras formas de carcinoma epidermoide, como los de la cavidad oral y la laringe (Kreppel *et al.*, 2011; Vormittag *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2006); aunque existen algunas diferencias en lo relativo a la frecuencia e intensidad de su expresión, siendo más baja en los CEC (Kreppel *et al.*, 2012). Dado que la expresión de D2-40 parece estar ligada a la diseminación por vía linfática del tumor, estas diferencias en la expresión de D2-40 entre tumores quizás reflejen el menor riesgo del desarrollo de metástasis linfáticas descrito en los CEC (Kreppel *et al.*, 2012) al compararlos con los CE de la cavidad oral o laringe. Otros autores han encontrado una correlación entre niveles bajos de expresión de D2-40 y la diseminación linfática, así como con el desarrollo de metástasis ganglionares en el cáncer de cuello de útero (Dumoff *et al.*, 2006) y en el cáncer de pulmón (Shimada *et al.*, 2009), lo que sugiere que D2-40 podría jugar papeles distintos en la carcinogénesis en función del contexto y del tipo de cáncer.

En general, el patrón de expresión de D2-40 y su asociación con el desarrollo de eventos de mala evolución clínica en el CEC se ha estudiado poco en trabajos anteriores. En nuestro estudio, la expresión elevada de D2-40 se asoció a un acortamiento de la latencia hasta el desarrollo de metástasis ganglionares y eventos de mala evolución clínica, considerados de forma global, así como a una tendencia hacia a una menor latencia en el desarrollo de la recidiva local (Tabla 59). Por tanto, la expresión de D2-40 parece estar relacionada, no sólo con el desarrollo de metástasis ganglionares, sino también con la recidiva local, y podría establecer una conexión molecular entre ambos fenómenos, algo ya conocido a nivel dínico (Veness *et al.*, 2006). En el estudio multivariante, D2-40 fue el único factor de riesgo independiente del acortamiento del periodo libre de enfermedad o latencia hasta el desarrollo de eventos de mala evolución clínica, y hasta el desarrollo de metástasis ganglionares (Tabla 59). La inmunodepresión y la expresión de D2-40 estuvieron asociadas con una menor latencia hasta la recaída en esta cohorte (Tabla 59).

En nuestro trabajo además, la expresión de D2-40 se identificó como un factor de riesgo para el desarrollo de eventos de cualquier evento de mala evolución clínica y del desarrollo de recidiva local (Tabla 54). D2-40 se ha relacionado previamente con el mayor riesgo de metástasis ganglionares en el CEC (Kreppel *et al.*, 2012; Toll *et al.*, 2012). En nuestro estudio, no conseguimos demostrar un mayor riesgo de metástasis dependiente de la expresión de D2-40, probablemente debido al pequeño grupo de pacientes con metástasis en nuestra cohorte, pero las metástasis que aparecen lo hacen más precozmente en los tumores que expresan este marcador. Otros autores tampoco han demostrado esta asociación aunque en ese trabajo relacionaron la expresión de D2-40 con una menor tasa de supervivencia a los 5 años (Kreppel *et al.*, 2011; Vinicius *et al.*, 2011) algo que nosotros no pudimos evaluar correctamente por el escaso tamaño de muestra de pacientes que fallecieron por CEC en nuestra cohorte.

Además, observamos una tendencia hacia la asociación entre la expresión de D2-40 y otra serie de características clínicopatológicas de los tumores, habitualmente indicadoras de mal pronóstico (Tabla 53). Así, encontramos asociación con el tamaño del tumor, algo que ya se había observado previamente (Kreppel *et al.*, 2011); con el patrón de crecimiento infiltrativo, también indicado en otro estudio (Toll *et al.*, 2012); y con la desmoplasia, que en nuestro conocimiento sería la primera observación al respecto (Tabla 53). En resumen, nuestro trabajo confirma las implicaciones en el pronóstico de D2-40 en el CEC y, además, identifica su relevancia en la latencia hasta el desarrollo de eventos de mala evolución clínica y su asociación con un acortamiento del periodo libre de enfermedad. Aunque está creciendo la evidencia de las implicaciones en el pronóstico de la expresión de D2-40 en el CEC, se necesitarían más estudios con series más grandes de pacientes para validar estos resultados preliminares.

3 MIRNA-203 Y MIRNA-205 SE EXPRESAN DE MANERA DIFERENTE EN EL CEC E IDENTIFICAN SUBGRUPOS CON DIFERENTE PRONÓSTICO

Hasta el momento el papel de los miRNAs en el CEC es desconocido. Aunque algunos autores han demostrado patrones diferenciales de expresión de miRNAs en líneas celulares de cáncer de piel (Bruegger *et al.*, 2013), y en el CEC de zonas expuestas y no expuestas a la exposición solar crónica (Dziunycz *et al.*, 2010), su valor pronóstico potencial no se ha explorado en detalle. En este estudio, identificamos los patrones de expresión de miRNAs en un panel bien definido de líneas celulares de CEC de origen múrido, que representan las distintas fases de la progresión de este tumor (Linardopoulos *et al.*, 1995; Navarro *et al.*, 1991; Oft *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2013), empleando *microarrays* específicos para la detección y cuantificación de la expresión de miRNAs. A partir de los resultados obtenidos de la expresión diferencial en el panel de líneas celulares, y teniendo en cuenta sus implicaciones en la homeostasis de la piel normal, seleccionamos *miRNA-203* y *miRNA-205* (Lena *et al.*, 2008; Tran *et al.*, 2012) como miRNAs candidatos para estudiar su patrón de expresión, su asociación con distintas características clínico-patológicas y su valor pronóstico en la cohorte de CECs de este estudio. Finalmente, construimos un modelo de regresión logística multinomial para diferenciar *clústeres* o grupos de tumores con distinto pronóstico, en base a la expresión de estos miRNAs y otras características clínico-patológicas.

3.1 La expresión de *miRNA-203* y *miRNA-205* se asociaron diferentes características clínico-patológicas y evolutivas de la enfermedad

Hemos evaluado las asociaciones de los patrones de expresión de *miRNA-203* y *miRNA-205*, y su grado de asociación con las características clínicas, histopatológicas y de seguimiento en nuestra cohorte de pacientes. De forma global, podemos decir que estos dos miRNAs se asociaron a diferentes variables de una manera mutuamente excluyente (Figuras 112, 113).

3.1.1 miRNA-205 y CEC

Existe una falta de conocimiento sobre el papel del *miR-205* en la patogenia del CEC. Se ha demostrado que sus niveles se encuentran más elevados en el tumor que en la piel normal (Bruegger *et al.*, 2013), en la que su expresión se restringe especialmente a la capa basal y a las células progenitoras, encontrándose ausente en capas suprabasales del epitelio (Wang *et al.*, 2013a). Ciertamente, en nuestro estudio, en la piel normal el *miRNA-205* tendió a

expresarse en la capa basal y en las capas más bajas del epitelio (Figura 112), tal y como se ha publicado previamente (Wang *et al.*, 2013a). La expresión de *miRNA-205* en los tumores se asoció a variables histopatológicas de mal pronóstico, como el patrón de crecimiento infiltrativo, la infiltración perineural y la presencia de desmoplasia (Tablas 64, 65). Por otra parte, encontramos que la expresión de *miRNA-205* se correlacionó con el riesgo de recidiva local (Figura 114), aunque no encontramos asociación con otros eventos de mala evolución clínica durante el seguimiento.

Se ha descrito que el *miRNA-205* mantendría la proliferación epitelial durante el desarrollo de la piel, y la falta de su expresión inhibiría la proliferación de las células de la capa basal (Wang *et al.*, 2013a). Aunque se ha descrito que el *miRNA-205* exhibiría una función represora de la transición epitelio-mesenquima mediante la inhibición de factores de transcripción ZEB que la promueven (Gregory *et al.*, 2008), en nuestro estudio hemos observado la expresión del *miRNA-205* a lo largo del frente de invasión. Esto puede estar en consonancia con el hecho de que en el frente de invasión del epitelio de tumores humanos, rara vez se observa una transición epitelio-mesenquimal pura. De hecho, mientras la transición epitelio-mesenquima se acepta como un programa crítico durante la embriogénesis, su participación en el desarrollo de metástasis de carcinomas ha sido cuestionada por diversos autores (Garber, 2008; Ledford, 2011; Tarin *et al.*, 2005). Además, se ha propuesto que durante el proceso de invasión de los carcinomas habría más bien una transición epitelio-mesenquimal parcial, en que las células epiteliales perderían su polaridad en parte, así como sus propiedades de adhesión y tendrían una diferenciación epitelial más pobre, pero sin adquirir un fenotipo mesenquimal completo (Lu *et al.*, 2013; Micalizzi *et al.*, 2010; Nakaya and Sheng, 2013; Savagner, 2010). Se ha indicado que la participación de la familia de los *miRNA-200*, a la que pertenece *miR-205*, en la regulación de este estado intermedio, podría ser importante (Lu *et al.*, 2013).

En nuestro estudio, también observamos una correlación positiva entre el patrón de expresión del *miRNA-205* y el de P63 (Tabla 64, Figura 118); de tal manera que cuando el primero se expresó, P63 tendió a expresarse también. Esto está de acuerdo con el hecho, ya publicado, de que P63 induciría la expresión del *miRNA-205*, y con la asociación positiva entre la expresión de ambas moléculas que se observa en algunas formas de cáncer (Gandellini *et al.*, 2009; Tran *et al.*, 2012; Tucci *et al.*, 2012).

Un punto importante de nuestro trabajo sería la sugerencia de un potencial efecto protumoral del *miRNA-205* en el CEC. En este sentido, se han acumulado evidencias de que el *miR-205* podría tener un doble comportamiento. Por un lado, podría funcionar como un supresor tumoral, principalmente a través del mantenimiento del fenotipo epitelial por medio de la inhibición de la transición epitelio-mesenquima completa, a través de la inhibición de factores de transcripción como ZEB, con la consiguiente re-expresión de E-CADHERINA (Gregory *et al.*, 2008). Por otro lado, también podría funcionar como oncogén,

fundamentalmente a través de la activación de la vía de señalización de AKT (Cai *et al.*, 2013; Lei *et al.*, 2013; Qu *et al.*, 2012). Por ello, dependiendo del contexto tumoral, *miRNA-205* podría jugar un papel u otro (Qin *et al.*, 2013). Nuestros resultados sugieren que el papel del *miRNA-205* en el CEC sería más bien oncogénico, ya que el *miRNA-205* se expresó en las zonas indiferenciadas y en el frente de invasión de los CEC, en el que también existe una pérdida de diferenciación. El *miRNA-205* probablemente ayude a mantener un fenotipo epitelial más inmaduro y proliferativo, como sucede en la capa basal de la piel, y en el contexto tumoral asociándose a zonas del tumor más indiferenciadas y agresivas. Esto podría producirse a partir de la activación de la vía de señalización de AKT, como sucede en la piel normal (Wang *et al.*, 2013a), y en otros tumores (Cai *et al.*, 2013; Karaayvaz *et al.*, 2012; Lei *et al.*, 2013; Qu *et al.*, 2012). Ello también es consistente con la correlación inversa entre *miRNA-205* y E-CADHERINA encontrada en nuestro estudio (Tabla 64). Sería interesante evaluar en los tumores los niveles de expresión de algunos intermediarios de la vía AKT, como PTEN, o el de distintas isoformas de AKT, y valorar su relación con la expresión de *miRNA-205* en los tumores, para profundizar en la relación entre esta vía de señalización y el *miRNA-205*.

3.1.2 *miRNA-203* y CEC

En nuestro estudio, los patrones de expresión del *miRNA-203* se asociaron a variables de buen pronóstico en el CEC (Tablas 64, 65). El *miR-203* se expresó más frecuentemente en tumores bien diferenciados, y en aquéllos que exhibían un patrón de crecimiento expansivo, mientras que no se detectó en la mayoría de los tumores con patrón de crecimiento infiltrativo, pobremente diferenciados o desmoplásicos. Además, los tumores en los que no se expresó el *miRNA-203* presentaron una recidiva local más precoz que aquellos que lo expresaron (Figura 124). En los tumores bien diferenciados, *miRNA-203* tendió a expresarse en torno a las áreas con diferenciación queratósica (Figura 122). En la piel normal, se expresó en las capas suprabasales (Figura 112), coincidiendo con la pérdida de P63, algo que ya se ha demostrado en anteriores estudios (Lena *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2010). En los tumores, la expresión de *miRNA-203* se correlacionó inversamente con la expresión de P63, de manera que los tumores que expresaron *miRNA-203* tendieron a no expresar P63 (Tabla 64, Figura 120).

Sorprende el hecho por el que a pesar del papel conocido de *miRNA-203* en la diferenciación de la piel normal y en la homeostasis de los queratinocitos (Lena *et al.*, 2008), este miRNA no haya sido adecuadamente estudiado en el CEC. Se ha sugerido, no obstante, un papel supresor tumoral del *miRNA-203* en el carcinoma basocelular (Sunkoly *et al.*, 2012) y en otras formas de cáncer (Bian *et al.*, 2012; Bo *et al.*, 2011; Chiang *et al.*, 2010; He *et al.*, 2013; van Kempen *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013a; Zhu *et al.*, 2013a), aunque también se ha relacionado con una función oncogénica en algunos tumores (Greither *et al.*, 2009; Ikenaga *et al.*, 2010). Nuestros resultados apoyan que el *miRNA-203* se

comportaría como un supresor tumoral en el CEC e identificaría un subgrupo de tumores con mejor pronóstico. Su asociación con tumores bien diferenciados, con un patrón de crecimiento no infiltrativo y con tumores no desmoplásicos, nos sugiere que pueda jugar un papel en la inhibición de la migración celular de los queratinocitos en el CEC.

3.1.3 Expresión y asociaciones excluyentes entre el *miRNA-203* y el *miRNA-205*

Un aspecto muy interesante que encontramos en nuestro trabajo fue el patrón de expresión heterogéneo y parcialmente excluyente de *miRNA-203* y *miRNA-205* a través de los tumores, dependiendo del grado de diferenciación y en el frente de invasión (Figura 113). Así, *miRNA-205* se expresó fundamentalmente en las áreas pobremente diferenciadas, en el frente de invasión (siendo muy evidente su expresión en la invasión perineural) y en tumores desmoplásicos (Tabla 63); mientras que el *miRNA-203* se expresó de forma preferente en áreas bien diferenciadas, fuera del frente de invasión y en las áreas no desmoplásicas (Tabla 62), en un patrón parcialmente excluyente con el de *miRNA-205* (Figura 112). Estos hallazgos están a favor de un papel oncogénico del *miRNA-205* y un papel supresor tumoral del *miRNA-203* en la patogenia del CEC. En este estudio, por primera vez demostramos la localización diferencial de ambos miRNAs, *miRNA-203* y *miRNA-205*, en el CEC, y correlacionamos sus patrones de expresión con variables clínico-patológicas e evolutivas del tumor. En nuestro conocimiento, no existen otros trabajos que hayan evaluado la expresión diferencial de estos miRNAs en el CEC; que por otro lado nótese que es consistente con la expresión que se observa de estos miRNAs en la piel normal, con el *miRNA-205* en zonas basales de mayor proliferación y menor diferenciación, y el *miR-203* en zonas suprabasales menos proliferativas y más diferenciadas (Lena *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2013a).

3.2 Significado de la expresión de *miRNA-203* y *miRNA-205* en el pronóstico del CEC

Finalmente, integrando los patrones de expresión de esos miRNAs junto con parámetros clínicos e histopatológicos con valor pronóstico en el CEC, identificamos dústeres de tumores con diferente pronóstico a través de un modelo de regresión logística multinomial. Aunque estos clústeres se basaron en variables clínicas e histopatológicas diversas, es importante resaltar que quedaron bien definidos por los patrones globales de expresión de *miRNA-203* y *miRNA-205* (Tabla 68, Figuras 127, 130).

Así, el clúster-1, con el mejor pronóstico, se caracterizó por la ausencia de expresión de *miR-205* y una elevada frecuencia de expresión de *miR-203*. Por el contrario, el clúster-4, con

el peor pronóstico, mostró una elevada proporción de tumores con expresión de *miR-205* y una ausencia del *miR-203*. Además, se comprobó un progresivo incremento en la proporción de tumores que expresaron *miR-205* a medida que también presentaban más características de mal pronóstico. *MIR-203* siguió, en general, una tendencia inversa, siendo su expresión más frecuente en los clústeres con tumores que tenían un mejor pronóstico y, viceversa, menos frecuente en los dústeres con tumores de pronóstico más desfavorable.

Considerando los dústeres generados, debe repararse en el hecho de que ninguno de los tumores en el clúster-1, de buen pronóstico, exhibió infiltración perineural, desmoplasia, ni patrón de crecimiento infiltrativo; mientras que todos los tumores del clúster-4, de mal pronóstico, exhibieron un patrón de crecimiento infiltrativo y la mayoría presentaban infiltración perineural y desmoplasia. Lo que es más, la proporción de tumores con moderado o grado pobre de diferenciación fue inesperadamente elevada en los clústers-1 y 2. De hecho, la frecuencia de otras características indicadoras de mal pronóstico no siguió siempre un gradiente por el que su frecuencia tendiera a ser más alta en los dústeres de peor pronóstico, aunque globalmente sí lo hicieron. Por ello, los miRNAs ayudaron a identificar el pronóstico de los tumores más allá de otros parámetros ya más establecidos. Así, existieron diferencias significativas en el desarrollo de eventos de mala evolución clínica entre los clústeres seleccionados por nuestro modelo, de modo que el número de eventos de mala evolución fue más frecuente en los tumores del dúster 4 y, progresivamente, menos frecuente en los clústeres 3, 2 y 1.

A la luz de estos resultados, creemos que los miRNAs podrían ser marcadores pronósticos útiles en el CEC. Además, teniendo en cuenta que los miRNAs son moléculas clave, que afectan a diferentes procesos en la homeostasis celular a través de la regulación de múltiples proteínas, los tratamientos basados en miRNAs diana quizás podrían ser más efectivos que aquéllos que se dirigen únicamente frente a una única proteína. Por ello, quizás lleguen a tener un potencial terapéutico en el CEC y en otros tumores epiteliales.

3.3 Comparación de la QPCR y la hibridación in situ como técnicas para evaluar la expresión de miRNAs en muestras humanas de CEC

Aunque los datos de expresión de miRNAs obtenidos mediante QPCR e hibridación in situ no fueron contradictorios y de hecho guardaron una tendencia similar, el número de asociaciones encontradas mediante hibridación in situ fue mucho mayor en este estudio. El rendimiento obtenido mediante QPCR para miRNA-203 fue algo menor que para el miRNA-205. Estos hallazgos nos hacen sugerir que aunque la QPCR es una técnica muy sensible y muy útil para evaluar la expresión de miRNAs en las líneas celulares, resulta menos rentable en muestras humanas de CEC. Esto puede deberse en parte a que los tumores sólidos, como el

CEC, son heterogéneos. Por otra parte, el tejido que se analiza mediante QPCR es un *pool* de células de distinto origen. Por un lado existen células del parénquima tumoral –que nos interesa evaluar especialmente en este caso-, pero también existen áreas de estroma, incluso áreas de tejido normal adyacente al tumor. La imposibilidad de discriminar entre dichos componentes tisulares (salvo que se realice una microdissección del tejido) hace que la expresión de las moléculas estudiadas no proceda exclusivamente del área de interés. Por otra parte, el hecho de que no se pueda evaluar estructuralmente el tejido, hace que no resulte posible diferenciar dentro de un tumor en qué áreas del mismo se encuentran preferentemente expresados los miRNAs (frente de invasión, áreas diferenciadas etc.). Por este motivo, para evaluar la expresión de miRNAs en el CEC recomendamos utilizar la hibridación in situ frente a la QPCR, que consideramos que ofrece una mayor rentabilidad y una idea más real de cómo se expresan los miRNAs en la piel y en el propio tumor.

4 EL CARCINOMA BOWENOIDE PODRÍA SER UN SUBTIPO DIFERENTE DE CEC

El CEC intraepitelial se conoce con el nombre de enfermedad de Bowen. Representa un cambio de todo el espesor del epitelio, con pérdida de polaridad celular, atípica citológica significativa y mitosis (Alam and Ratner, 2001). Cuando la enfermedad de Bowen se transforma en un CEC invasor, se forman islas de queratinocitos que tienden a penetrar en la dermis, en ocasiones con características fenotípicas diversas (Kao, 1986). Podemos denominar al CEC invasor que se produce en el contexto de una enfermedad de Bowen como carcinoma bowenoide.

En nuestro estudio, los casos de carcinoma bowenoide exhibieron unas características histopatológicas y moleculares significativamente distintas del resto de los CEC (Tabla 69). Así, los carcinomas bowenoides tendieron a exhibir un grado pobre de diferenciación, pero con un crecimiento expansivo. Carecieron de desmoplasia y de infiltración perineural, y tendieron a expresar con mayor frecuencia P16 y D2-40. Por otra parte, y aunque no se demostraron diferencias significativas con el resto de los CEC, se comprobó que la expresión de P63 fue muy frecuente, al igual que la de CD44 (Tabla 15, Figura 35), marcadores de célula *stem* epitelial (Aruffo *et al.*, 1990; Chikamatsu *et al.*, 2010; Oh *et al.*, 2011; Prince *et al.*, 2007). Además, y a pesar de ser indiferenciados citológicamente, no expresaron VIMENTINA y mantuvieron la expresión de E-CADHERINA, lo que estaría en relación con su origen epitelial.

En nuestro conocimiento, no existen hasta la fecha trabajos previos que comparen la expresión de diferentes marcadores en el CEC típico y en el CEC bowenoide, o entre la queratosis actínica y la enfermedad de Bowen. En nuestro estudio, resultaron interesantes las diferencias comprobadas en relación con la expresión de los miRNAs. Así, los casos de carcinoma bowenoide tendieron a no expresar *miRNA-203*, lo que está de acuerdo con el hecho de que son citológicamente indiferenciados y que expresan P63 intensamente (Lena *et al.*, 2008); pero también tendieron a no expresar *miRNA-205*, lo que se asocia quizás a su comportamiento más favorable y al hecho de que mantengan la expresión de E-CADHERINA (Gregory *et al.*, 2008). A este respecto, se asume que el carcinoma bowenoide tiende a tener un comportamiento más agresivo que los CEC típicos. En realidad, la evidencia de esta afirmación procede de casos aislados o de series de pacientes pequeñas (Cassarino *et al.*, 2006b; Gonzalez-Perez *et al.*, 1997; Herat *et al.*, 2006; Kao, 1986), y hemos de añadir que en nuestra serie de carcinomas bowenoides también lo fue (con 12 casos de carcinoma bowenoide invasor).

La enfermedad de Bowen se localiza más frecuentemente que el CEC clásico a nivel perianal (Alam and Ratner, 2001; Arlette and Trotter, 2004), y los carcinomas bowenoides agresivos también se han descrito en esa área (Herat *et al.*, 2006), que ya confieren de por sí

un peor pronóstico en el CEC clásico (Martorell-Calatayud *et al.*, 2013), lo que se reconoce en el grupo de trabajo de la NCCN. Por este motivo, quizás la afirmación de la mayor agresividad del carcinoma bowenoide deba ser validada en series de pacientes más grandes, para demostrar que el peor pronóstico de esta entidad existe con independencia de otros factores de riesgo, como la localización. En general, las series grandes de carcinomas epidermoides que evalúan el pronóstico de la enfermedad, no establecen distinción entre CEC bowenoides y típicos. En nuestro caso, las diferencias encontradas entre estas dos posibles entidades en la expresión de miRNAs e histopatológicas nos hizo analizarlos por separado.

Aunque los datos evolutivos que se derivan de la serie de carcinoma bowenoide aquí representada no son muy fiables, por la falta de eventos clínicos de mala evolución durante el seguimiento en dichos pacientes, las diferentes características histopatológicas y, sobre todo, moleculares (tanto inmunohistoquímicas como de expresión diferencial de miRNAs), nos hacen sugerir que pueda tratarse de una entidad diferente y elucubrar que quizás tenga un origen celular distinto al de la mayoría de los carcinomas epidermoides. En este sentido, el carcinoma bowenoide, en ocasiones desarrolla rasgos de diferenciación basaloide o pseudofolicular. Un trabajo reciente establece que el CEC derivaría de células *stem* localizadas en el epitelio interfolicular de la piel, mientras que el carcinoma basocelular probablemente lo haga de células *stem* del folículo. Aunque no hemos podido comparar aquí casos de carcinoma basocelular con los de CEC y con los de carcinoma bowenoide, lo que sí parece claro es que existen varios nichos de células *stem* en el epitelio de la piel (Arwert *et al.*, 2012; Perez-Losada and Balmain, 2003), y no sería raro que diferentes tumores tuvieran orígenes en subpoblaciones de células *stem* distintas. Serían necesarios más estudios para validar estas hipótesis, a partir de una serie más grande de carcinomas epidermoides bowenoides y con un panel de marcadores epiteliales más complejo.

En cualquier caso, y a parte de los datos derivados de este estudio, existe una observación clínica que también hace pensar que se trate de entidades distintas. Habitualmente, los pacientes que desarrollan un CEC invasor clásico, exhiben signos de exposición solar crónica y múltiples queratosis actínicas. Los casos de enfermedad de Bowen suelen asentar en zonas de piel, que aunque se encuentre crónicamente expuesta al sol, no suelen albergar un número abundante de queratosis actínicas; de hecho, es frecuente observarla como una lesión aislada, algo que ya observaron los autores clásicos cuando definieron esta entidad (Bowen, 1912; Lee and Wick, 1990). Desde otro punto de vista, en nuestra serie, los casos de carcinoma bowenoide que procedieron de áreas de enfermedad de Bowen aparecieron, significativamente, con más frecuencia en personas que no tenían antecedentes de queratosis actínica. Por otra parte, dentro de las múltiples queratosis actínicas que tienen algunos pacientes (el prototipo de paciente que habitualmente acaba desarrollando un CEC clásico), no es raro que algunas abarquen todo el epitelio (lo que se puede llamar queratosis actínica bowenoide) pero, hasta que acaban convirtiéndose en

carcinoma epidermoide invasor, tienen la peculiaridad de respetar bastante bien el infundíbulo folicular, algo que en el caso de la enfermedad de Bowen no sucede.

Por todas las razones expuestas, sería interesante diseñar un estudio que pudiera confirmar o desmentir que, por un lado, la enfermedad de Bowen es una entidad diferente y, posiblemente, con un origen celular distinto a las queratosis actínicas; y por el otro, que el carcinoma bowenoide también es diferente del CEC clásico, en el que se han centrado la mayoría de los estudios con series grandes de pacientes. Incluso dentro de la teoría sobre el desarrollo tumoral en múltiples fases que se aplica a diferentes tumores epiteliales, incluido el CEC, la tendencia es a pensar que desde la piel normal se desarrollaría la queratosis actínica, posteriormente, la enfermedad de Bowen y, finalmente, el carcinoma epidermoide invasor. Pues bien, podría ser también que el queratinocito a partir del que se forma el don de células cancerígenas pudiera dar lugar, por un lado, a una queratosis actínica y ésta, posteriormente, a un CEC clásico y, por otro, a una enfermedad de Bowen, que en caso de invadir estructuras más allá de la membrana basal del epitelio lo haría como carcinoma bowenoide.

5 PERSPECTIVAS FUTURAS

Existen marcadores de mal pronóstico reconocidos en el CEC como el grado de diferenciación, el espesor, el tamaño tumoral, la infiltración perineural, la localización en áreas de alto riesgo y la recidiva local, que también hemos comprobado en nuestra serie de pacientes. Además, hemos comprobado que -como ya se ha sugerido en otros estudios- la desmoplasia, el patrón de crecimiento y la ulceración, así como el infiltrado inflamatorio podrían ser variables relacionadas con el pronóstico en este tumor y, por primera vez, hemos establecido un punto de corte de velocidad de crecimiento a partir del cual podríamos considerar que un CEC es de alto riesgo, lo que ayudaría en el manejo de estos pacientes. Sería interesante validar con series más grandes de pacientes el valor de la desmoplasia, el patrón de crecimiento infiltrativo, la ulceración y de la velocidad de crecimiento, para poder predecir mejor implicaciones potenciales de estas variables en el manejo de los pacientes con CEC. Conocer mejor la naturaleza de los infiltrados inflamatorios en el CEC también podría ayudar a establecer en qué medida influye la inmunidad en la promoción o en la lucha frente a este tumor y, aunque existe algún estudio preliminar al respecto, sería necesario validarlo con series más grandes y confirmarlo con otros trabajos.

En este estudio, además hemos establecido que la sobreexpresión de EGFR es un factor de riesgo independiente de progresión en el CEC; y que la expresión de D2-40 se relaciona con el acortamiento del intervalo libre de enfermedad en este tumor, ambos resultados pensamos que pueden ayudar a esdarecer parte de la controversia existente sobre el tema (Ch'ng *et al.*, 2008; Sweeny *et al.*, 2011; Toll *et al.*, 2012). No obstante, existen muchas lagunas en la biología de este tumor y en general sobre los marcadores moleculares con valor pronóstico. TGF-beta sería un marcador interesante a estudiar en el futuro para intentar valorar en qué medida tiene influencia en el desarrollo del CEC *in vivo* tal y como se ha demostrado en modelos *in vitro*, dada su relación con la transición epitelio-mesenquima y con procesos profibróticos, y habida cuenta de que en el CEC la desmoplasia tiende a asociarse a un patrón de crecimiento infiltrativo. Además, conocer mejor el resto de los factores implicados en la transición epitelio-mesenquima (i.e. TWIST, SNAI1, SNAI2) y de intermediarios de la vía de señalización fosfo-AKT (PTEN, SHIP2, AKT1, AKT2, AKT3), podría ayudar a conocer mejor en qué medida la transición epitelio-mesenquima se produce paralelamente a la activación de la vía AKT en este tumor, como recientemente se ha sugerido.

Por encima del nivel de expresión de marcadores proteicos, hemos visto cómo la expresión diferencial de *miRNA-203* y *miRNA-205* se relaciona con el pronóstico en el CEC, lo que representa la primera aproximación al pronóstico de este tumor en base a la expresión de miRNAs. No obstante, hemos comprobado la expresión diferencial de otros miRNAs entre líneas celulares de CEC derivadas de múridos y en este sentido, validar algunos otros miRNAs

en tumores humanos podrá arrojar más luz sobre el *miRNA-oma* en el CEC. Además, dado que estas moléculas son reguladoras importantes de la expresión génica, que pueden afectar a la expresión de diversas proteínas, su conocimiento podría permitir establecer conexiones entre ellas y algunos de los procesos biológicos relacionados con el CEC. El hecho de disponer de líneas celulares de este tumor nos permitirá profundizar en los fenómenos biológicos del mismo para, posteriormente, validar las observaciones en series de tumores de nuestro archivo. No olvidemos también que tanto las proteínas como los miRNAs son potenciales dianas moleculares. En este sentido, un mayor conocimiento de los fenómenos relacionados con el desarrollo de este tumor abre la puerta a posibles aplicaciones terapéuticas para los pacientes con tumores localmente avanzados irresecables y/o metastásicos.

Finalmente, hemos visto cómo un tipo de CECs que derivan de la enfermedad de Bowen exhiben características diferentes a las del CEC convencional. Aunque estudiamos únicamente una pequeña serie de tumores de estas características, se abre aquí un nuevo campo de trabajo con el fin de validar esta hipótesis en una serie de tumores más grande, que nos permita comprobar si, efectivamente, es un subtipo diferente del CEC clásico y quizás con un origen celular distinto.

CONCLUSIONES

Primera conclusión: En general, las características clínico-patológicas del carcinoma epidermoide cutáneo se asocian entre sí en función de su pronóstico y de este modo, contribuyen a definirlo. Específicamente:

1.1. El grado de diferenciación, la infiltración perineural, la recidiva local, la localización de alto riesgo y el infiltrado inflamatorio intratumoral intenso son factores de riesgo independiente de mal pronóstico; por otro lado, la velocidad de crecimiento mayor de 5 mm / mes es el factor de riesgo clínico-patológico más importante de acortamiento de intervalo libre de enfermedad en el carcinoma epidermoide cutáneo.

1.2. La utilización simultánea en el mismo paciente de varios de los sistemas de estadiaje del carcinoma epidermoide cutáneo existentes, basados en distintas características clínico-patológicas, hace que mejore su capacidad predictiva del riesgo de mala evolución de la enfermedad.

Segunda conclusión: Hemos definido la existencia de asociaciones entre distintos marcadores proteicos y entre éstos y las características clínico-patológicas de la enfermedad. Con ello, hemos definido el pronóstico del carcinoma epidermoide cutáneo. De forma particular:

2.1. La expresión intensa de EGFR es factor de riesgo independiente de metástasis ganglionares y progresión del TNM.

2.2. La expresión de D2-40 se relaciona de forma independiente con el acortamiento del intervalo libre de enfermedad en el carcinoma epidermoide cutáneo.

Tercera conclusión: Hemos identificado el patrón de expresión diferencial de miRNAs en distintas fases de progresión del carcinoma epidermoide cutáneo. El *miRNA-203* y el *miRNA-205* exhiben expresión diferencial y mutuamente excluyente en el CEC. La expresión de estos dos miRNAs se asocia a la de distintos marcadores proteicos y características clínico-patológicas de la enfermedad. En concreto:

3.1. La expresión de *miRNA-205* se asocia a factores clínico-patológicos de mal pronóstico y a un mayor riesgo de recidiva local. Además, se relaciona positivamente con la expresión de P63.

3.2. La expresión *miRNA-203* se asocia a factores clínico-patológicos de buen pronóstico y a una mayor latencia hasta la recurrencia del tumor primario. A su vez, se relaciona negativamente con la expresión de P63.

3.3. En cuanto a las técnicas de evaluación de la expresión de miRNAs, la hibridación *in situ* se mostró más eficaz que la QPCR al permitir, por un lado, evaluar la heterogeneidad intratumoral y por otro, excluir las áreas del tejido no relacionadas con el tumor.

Cuarta conclusión: Hemos identificado subgrupos de pacientes con diferente pronóstico en el carcinoma epidermoide cutáneo considerando diferentes características clínico-patológicas y moleculares de forma simultánea. La expresión de *miRNA-203* y *miRNA-205* contribuye de forma eficaz a la discriminación de dichos subgrupos.

Quinta conclusión: El carcinoma epidermoide cutáneo derivado de enfermedad de Bowen exhibe rasgos clínico-patológicos y moleculares distintos a los del resto de los carcinomas epidermoides cutáneos; si bien aún no podemos concluir, de forma definitiva y con nuestros datos, que se trate de un subtipo distinto de carcinoma epidermoide cutáneo.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

Abdulla FR, Feldman SR, Williford PM, Krowchuk D, Kaur M (2005) Tanning and skin cancer. *Pediatr Dermatol* 22:501-512.

Adams CC, Thomas B, Bingham JL (2014) Cutaneous squamous cell carcinoma with perineural invasion: a case report and review of the literature. *Cutis* 93:141-144.

Afzelius LE, Gunnarsson M, Nordgren H (1980) Guidelines for prophylactic radical lymph node dissection in cases of carcinoma of the external ear. *Head Neck Surg* 2:361-365.

Ahmed NU, Ueda M, Ichihashi M (1999) Induced expression of p16 and p21 proteins in UVB-irradiated human epidermis and cultured keratinocytes. *J Dermatol Sci* 19:175-181.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3983-3988.

Alam M, Nanda S, Mittal BB, Kim NA, Yoo S (2011) The use of brachytherapy in the treatment of nonmelanoma skin cancer: a review. *J Am Acad Dermatol* 65:377-388.

Alam M, Ratner D (2001) Cutaneous squamous-cell carcinoma. *N Engl J Med* 344:975-983.

Alberg AJ, Fischer AH (2014) Is a personal history of nonmelanoma skin cancer associated with increased or decreased risk of other cancers? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 23:433-436.

Albert S, Hourseau M, Halimi C, Serova M, Descatoire V, Barry B, *et al.* (2012) Prognostic value of the chemokine receptor CXCR4 and epithelial-to-mesenchymal transition in patients with squamous cell carcinoma of the mobile tongue. *Oral Oncol* 48:1263-1271.

Albert S, Riveiro ME, Halimi C, Hourseau M, Couvelard A, Serova M, *et al.* (2013) Focus on the role of the CXCL12/CXCR4 chemokine axis in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 35:1819-1828.

Alter M, Satzger I, Mattern A, Kapp A, Gutzmer R (2014) Treatment of advanced cutaneous squamous cell carcinomas with epidermal growth factor receptor inhibitors. *Dermatology* 227:289-294.

Allen M, Louise Jones J (2010) Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *J Pathol* 223:162-176.

Andersson K, Michael KM, Luostarinen T, Waterboer T, Gislefoss R, Hakulinen T, *et al.* (2012) Prospective study of human papillomavirus seropositivity and risk of nonmelanoma skin cancer. *Am J Epidemiol* 175:685-695.

Anforth R, Fernandez-Penas P, Long GV (2013) Cutaneous toxicities of RAF inhibitors. *Lancet Oncol* 14:e11-18.

Ang KK, Berkey BA, Tu X, Zhang HZ, Katz R, Hammond EH, *et al.* (2002) Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* 62:7350-7356.

Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, Hasko G (2013) Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nat Rev Cancer* 13:842-857.

Ariyaratnam J, Subramanian V (2014) Association between thiopurine use and nonmelanoma skin cancers in patients with inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 109:163-169.

Arlette JP, Trotter MJ (2004) Squamous cell carcinoma in situ of the skin: history, presentation, biology and treatment. *Australas J Dermatol* 45:1-9; quiz 10.

Armstrong BK, Kridker A (2001) The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B* 63:8-18.

Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B (1990) CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61:1303-1313.

Arwert EN, Hoste E, Watt FM (2012) Epithelial stem cells, wound healing and cancer. *Nat Rev Cancer* 12:170-180.

Arwert EN, Lal R, Quist S, Rosewell I, van Rooijen N, Watt FM (2010) Tumor formation initiated by nondividing epidermal cells via an inflammatory infiltrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:19903-19908.

Atkar R, Ocampo M, Euvrard S, McGregor J, Kanitakis J, Harwood C (2013) Ultraviolet radiation exposure through window glass may be associated with localization of nonmelanoma skin cancer in organ transplant recipients: a study in France and the UK. *Br J Dermatol* 169:484-485.

Azzimonti B, Zavattaro E, Provasi M, Vidali M, Conca A, Catalano E, *et al.* (2014) Intense Foxp3 CD25 regulatory T cell infiltration is associated with high-grade cutaneous squamous cell carcinoma and counterbalanced by CD8 /Foxp3 CD25 ratio. *Br J Dermatol*.

Bailleul B, Surani MA, White S, Barton SC, Brown K, Blessing M, *et al.* (1990) Skin hyperkeratosis and papilloma formation in transgenic mice expressing a ras oncogene from a suprabasal keratin promoter. *Cell* 62:697-708.

Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, *et al.* (1990) p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 50:7717-7722.

Balamucki CJ, Mancuso AA, Amdur RJ, Kirwan JM, Morris CG, Flowers FP, *et al.* (2011) Skin carcinoma of the head and neck with perineural invasion. *Am J Otolaryngol* 33:447-454.

Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, *et al.* (2009) Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 27:6199-6206.

Balkwill F (2004) Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 4:540-550.

Balmain A, Yuspa SH (2014) Milestones in skin carcinogenesis: the biology of multistage carcinogenesis. *J Invest Dermatol* 134:E2-7.

Barrette K, Van Kelst S, Wouters J, Marasigan V, Fieuws S, Agostinis P, *et al.* (2014) Epithelial-Mesenchymal Transition during invasion of cutaneous Squamous Cell Carcinoma is paralleled by AKT activation. *Br J Dermatol*.

Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-297.

Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136:215-233.

Baum HP, Meurer I, Unteregger G (1994) Expression of proliferation-associated proteins (proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen) in Bowen's disease. *Br J Dermatol* 131:231-236.

Belisario JC (1965) Brief review of keratoacanthomas and description of keratoacanthoma centrifugum marginatum, another variety of keratoacanthoma. *Aust J Dermatol* 8:65-72.

Bennett M, Comber H, Deady S (2012) Incidence of nonmelanoma skin cancer in Ireland. *Br J Dermatol* 168:452.

Bentzen J, Kjellberg J, Thorgaard C, Engholm G, Phillip A, Storm HH (2013) Costs of illness for melanoma and nonmelanoma skin cancer in Denmark. *Eur J Cancer Prev* 22:569-576.

Bernat-Garcia J, Morales Suarez-Varela M, Vilata-Corell JJ, Marquina-Vila A (2014) Detection of human papillomavirus in nonmelanoma skin cancer lesions and healthy perilesional skin in kidney transplant recipients and immunocompetent patients. *Actas Dermosifiliogr* 105:286-294.

Bhawan J (2007) Squamous cell carcinoma in situ in skin: what does it mean? *J Cutan Pathol* 34:953-955.

Bian K, Fan J, Zhang X, Yang XW, Zhu HY, Wang L, *et al.* (2012) MicroRNA-203 leads to G1 phase cell cycle arrest in laryngeal carcinoma cells by directly targeting survivin. *FEBS Lett* 586:804-809.

Bissell MJ, Hines WC (2011) Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat Med* 17:320-329.

Bizub D, Blair D, Alvord G, Skalka AM (1988) Correlation between H-ras p21TLeu61 protein content and tumorigenicity of NIH3T3 cells. *Oncogene* 3:443-448.

Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, Spiteri I, Chin SF, Dunning MJ, *et al.* (2007) MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol* 8:R214.

Blomberg M, Friis S, Munk C, Bautz A, Kjaer SK (2012) Genital warts and risk of cancer: a Danish study of nearly 50 000 patients with genital warts. *J Infect Dis* 205:1544-1553.

Bo J, Yang G, Huo K, Jiang H, Zhang L, Liu D, *et al.* (2011) microRNA-203 suppresses bladder cancer development by repressing bcl-w expression. *FEBS J* 278:786-792.

Boeri M, Verri C, Conte D, Roz L, Modena P, Facchinetti F, *et al.* (2011) MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:3713-3718.

Boukamp P (2005) Non-melanoma skin cancer: what drives tumor development and progression? *Carcinogenesis* 26:1657-1667.

Bowen J (1912) Precancerous dermatoses: A study of two cases of chronic atypical proliferation. *J Cut Dis* 30:241-255.

Bracke ME, Van Roy FM, Mareel MM (1996) The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis. *Curr Top Microbiol Immunol* 213 (Pt 1):123-161.

Bracken CP, Gregory PA, Kolesnikoff N, Bert AG, Wang J, Shannon MF, *et al.* (2008) A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 68:7846-7854.

Brand D, Ackerman AB (2000) Squamous cell carcinoma, not basal cell carcinoma, is the most common cancer in humans. *J Am Acad Dermatol* 42:523-526.

Brantsch KD, Meisner C, Schonfisch B, Trilling B, Wehner-Caroli J, Rocken M, *et al.* (2008) Analysis of risk factors determining prognosis of cutaneous squamous-cell carcinoma: a prospective study. *Lancet Oncol* 9:713-720.

Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, *et al.* (1991) A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10124-10128.

Bremnes RM, Veve R, Hirsch FR, Franklin WA (2002) The E-cadherin cell-cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis, and prognosis. *Lung Cancer* 36:115-124.

Breuninger H, Black B, Rassner G (1990) Microstaging of squamous cell carcinomas. *Am J Clin Pathol* 94:624-627.

Breuninger H, Schaumburg-Lever G, Holzschuh J, Horny HP (1997) Desmoplastic squamous cell carcinoma of skin and vermilion surface: a highly malignant subtype of skin cancer. *Cancer* 79:915-919.

Brewer JD, Shanafelt TD, Khezri F, Sosa Seda IM, Zubair AS, Baum CL, *et al.* (2014) Increased incidence and recurrence rates of nonmelanoma skin cancer in patients with non-Hodgkin lymphoma: A Rochester Epidemiology Project population-based study in Minnesota. *J Am Acad Dermatol* 72:302-309.

Brinkman JN, Hajder E, van der Holt B, Den Bakker MA, Hovius SE, Mureau MA (2014) The Effect of Differentiation Grade of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma on Excision Margins, Local Recurrence, Metastasis, and Patient Survival: A Retrospective Follow-up Study. *Ann Plast Surg*.

Broder A (1921) Squamous-cell epithelioma of the skin. *Ann Surg* 73:141-160.

Brodland DG, Zitelli JA (1992) Surgical margins for excision of primary cutaneous squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 27:241-248.

Brothers WS, New WN, Nickel WR (1960) Keratoacanthoma. A review of histopathological specimens previously diagnosed as keratoacanthoma or as squamous cell carcinoma of the skin. *Arch Dermatol* 81:369-372.

Brougham ND, Dennett ER, Cameron R, Tan ST (2012a) The incidence of metastasis from cutaneous squamous cell carcinoma and the impact of its risk factors. *J Surg Oncol* 106:811-815.

Brougham ND, Dennett ER, Tan ST (2012b) Changing incidence of non-melanoma skin cancer in New Zealand. *ANZ J Surg* 81:633-636.

Brown K, Buchmann A, Balmain A (1990) Carcinogen-induced mutations in the mouse c-Ha-ras gene provide evidence of multiple pathways for tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:538-542.

Brown K, Strathdee D, Bryson S, Lambie W, Balmain A (1998) The malignant capacity of skin tumours induced by expression of a mutant H-ras transgene depends on the cell type targeted. *Curr Biol* 8:516-524.

Bruegger C, Kempf W, Spoerri I, Arnold AW, Itin PH, Burger B (2013) MicroRNA expression differs in cutaneous squamous cell carcinomas and healthy skin of immunocompetent individuals. *Exp Dermatol* 22:426-428.

Bryan RT, Tselepis C (2010) Cadherin switching and bladder cancer. *J Urol* 184:423-431.

Buda A, Pignatelli M (2004) Cytoskeletal network in colon cancer: from genes to clinical application. *Int J Biochem Cell Biol* 36:759-765.

Bundgaard T, Bentzen SM, Wildt J (1994) The prognostic effect of tobacco and alcohol consumption in intra-oral squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 30B:323-328.

Burns PA, Kemp CJ, Gannon JV, Lane DP, Bremner R, Balmain A (1991) Loss of heterozygosity and mutational alterations of the p53 gene in skin tumours of interspecific hybrid mice. *Oncogene* 6:2363-2369.

Burnworth B, Arendt S, Muffler S, Steinkraus V, Brocker EB, Birek C, *et al.* (2007) The multi-step process of human skin carcinogenesis: a role for p53, cyclin D1, hTERT, p16, and TSP-1. *Eur J Cell Biol* 86:763-780.

Cai J, Fang L, Huang Y, Li R, Yuan J, Yang Y, *et al.* (2013) miR-205 targets PTEN and PHLPP2 to augment AKT signaling and drive malignant phenotypes in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 73:5402-5415.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, *et al.* (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15524-15529.

Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, *et al.* (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2999-3004.

Campbell C, Quinn AG, Ro YS, Angus B, Rees JL (1993) p53 mutations are common and early events that precede tumor invasion in squamous cell neoplasia of the skin. *J Invest Dermatol* 100:746-748.

Campoli M, Brodland DG, Zitelli J (2014) A prospective evaluation of the clinical, histologic, and therapeutic variables associated with incidental perineural invasion in cutaneous squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 70:630-636.

Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, *et al.* (2000) The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2:76-83.

Carter JB, Johnson MM, Chua TL, Karia PS, Schmultz CD (2013) Outcomes of primary cutaneous squamous cell carcinoma with perineural invasion: an 11-year cohort study. *JAMA Dermatol* 149:35-41.

Casparis S, Borm JM, Tektas S, Kamarachev J, Locher MC, Damerau G, *et al.* (2014) Oral lichen planus (OLP), oral lichenoid lesions (OLL), oral dysplasia, and oral cancer: retrospective analysis of clinicopathological data from 2002-2011. *Oral Maxillofac Surg*.

Cassarino DS, Derienzo DP, Barr RJ (2006a) Cutaneous squamous cell carcinoma: a comprehensive clinicopathologic classification--part two. *J Cutan Pathol* 33:261-279.

Cassarino DS, Derienzo DP, Barr RJ (2006b) Cutaneous squamous cell carcinoma: a comprehensive clinicopathologic classification. Part one. *J Cutan Pathol* 33:191-206.

Cavalcante AS, Anbinder AL, Carvalho YR (2008) Actinic cheilitis: clinical and histological features. *J Oral Maxillofac Surg* 66:498-503.

Clayman GL, Lee JJ, Holsinger FC, Zhou X, Duvic M, El-Naggar AK, *et al.* (2005) Mortality risk from squamous cell skin cancer. *J Clin Oncol* 23:759-765.

Clayton AS, Stasko T (2003) Treatment of nonmelanoma skin cancer in organ transplant recipients: review of responses to a survey. *J Am Acad Dermatol* 49:413-416.

Cocchetto V, Magrin P, de Paula RA, Aide M, Monte Razo L, Pantaleao L (2013) Squamous cell carcinoma in chronic wound: Marjolin ulcer. *Dermatol Online J* 19:7.

Cohen N, Plaschkes Y, Pevzner S, Loewenthal M (1972) Review of 57 cases of keratoacanthoma. *Plast Reconstr Surg* 49:138-142.

Cohen S (1965) The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). *Dev Biol* 12:394-407.

Corbalan-Velez R, Ruiz-Macia JA, Brufau C, Oviedo-Ramirez I, Martinez-Barba E, Lopez-Lozano JM, *et al.* (2010) [Solar elastosis in cutaneous squamous cell carcinoma]. *Actas Dermosifiliogr* 101:517-523.

Costa Ade L, Araujo Junior RF, Ramos CC (2005) Correlation between TNM classification and malignancy histological feature of oral squamous cell carcinoma. *Braz J Otorhinolaryngol* 71:181-187.

Coussens LM, Raymond WW, Bergers G, Laig-Webster M, Behrendtsen O, Werb Z, *et al.* (1999) Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev* 13:1382-1397.

Cox AD, Der CJ (2011) Ras history: The saga continues. *Small GTPases* 1:2-27.

Cox NH, Eedy DJ, Morton CA (2007) Guidelines for management of Bowen's disease: 2006 update. *Br J Dermatol* 156:11-21.

Criscione VD, Weinstock MA, Naylor MF, Luque C, Eide MJ, Bingham SF (2009) Actinic keratoses: Natural history and risk of malignant transformation in the Veterans Affairs Topical Tretinoin Chemoprevention Trial. *Cancer* 115:2523-2530.

Croce C (2012) Introduction to the role of microRNAs in cancer diagnosis, prognosis, and treatment. *Cancer J* 18:213-214.

Cui W, Fowles DJ, Bryson S, Duffie E, Ireland H, Balmain A, *et al.* (1996) *TGFbeta1* inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice. *Cell* 86:531-542.

Ch'ng S, Low I, Ng D, Brasch H, Sullivan M, Davis P, *et al.* (2008) Epidermal growth factor receptor: a novel biomarker for aggressive head and neck cutaneous squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* 39:344-349.

Chandramohan K, Mathews A, Kurian A, Thomas S, Ramachandran K (2009) Squamous cell carcinoma arising from perineal lesion in a familial case of Hidradenitis suppurativa. *Int Wound J* 6:141-144.

Chapel TA, Rahbari H (1980) Genital bowenoid papulosis--squamous cell carcinoma in situ. *Sex Transm Dis* 7:139-141.

Chappell WH, Steelman LS, Long JM, Kempf RC, Abrams SL, Franklin RA, *et al.* Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget* 2:135-164.

Chazal M, Marionnet C, Michel L, Mollier K, Dazard JE, Della Valle V, *et al.* (2002) P16(INK4A) is implicated in both the immediate and adaptative response of human keratinocytes to UVB irradiation. *Oncogene* 21:2652-2661.

Chen AC, Halliday GM, Damian DL (2013) Non-melanoma skin cancer: carcinogenesis and chemoprevention. *Pathology* 45:331-341.

Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, *et al.* (2005a) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 33:e179.

Chen GJ, Feldman SR, Williford PM, Hester EJ, Kiang SH, Gill I, *et al.* (2005b) Clinical diagnosis of actinic keratosis identifies an elderly population at high risk of developing skin cancer. *Dermatol Surg* 31:43-47.

Chen J, Chen JK, Nagai K, Plieth D, Tan M, Lee TC, *et al.* (2011) EGFR signaling promotes TGFbeta-dependent renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 23:215-224.

Chen J, Ruczinski I, Jorgensen TJ, Yenokyan G, Yao Y, Alani R, *et al.* (2008) Nonmelanoma skin cancer and risk for subsequent malignancy. *J Natl Cancer Inst* 100:1215-1222.

Chen YW, Chen KH, Huang PI, Chen YC, Chiou GY, Lo WL, *et al.* Cucurbitacin I suppressed stem-like property and enhanced radiation-induced apoptosis in head and neck squamous carcinoma--derived CD44(+)/ALDH1(+) cells. *Mol Cancer Ther* 9:2879-2892.

Chen YW, Chen KH, Huang PI, Chen YC, Chiou GY, Lo WL, *et al.* (2010) Cucurbitacin I suppressed stem-like property and enhanced radiation-induced apoptosis in head and neck squamous carcinoma--derived CD44(+)/ALDH1(+) cells. *Mol Cancer Ther* 9:2879-2892.

Cheng Y, Zhou Y, Jiang W, Yang X, Zhu J, Feng D, *et al.* (2012) Significance of E-cadherin, beta-catenin, and vimentin expression as postoperative prognosis indicators in cervical squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* 43:1213-1220.

Cherpelis BS, Marcusen C, Lang PG (2002) Prognostic factors for metastasis in squamous cell carcinoma of the skin. *Dermatol Surg* 28:268-273.

Chetty R, Serra S (2008) Nuclear E-cadherin immunoexpression: from biology to potential applications in diagnostic pathology. *Adv Anat Pathol* 15:234-240.

Chiang Y, Song Y, Wang Z, Chen Y, Yue Z, Xu H, *et al.* (2010) Aberrant expression of miR-203 and its clinical significance in gastric and colorectal cancers. *J Gastrointest Surg* 15:63-70.

Chikamatsu K, Takahashi G, Sakakura K, Ferrone S, Masuyama K (2010) Immunoregulatory properties of CD44+ cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 33:208-215.

Cho H, Hall JG, Kosmoski C, Fox RL, Mastin T (2010) Tanning, skin cancer risk, and prevention: a content analysis of eight popular magazines that target female readers, 1997-2006. *Health Commun* 25:1-10.

Cho WC (2009) MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 42:1273-1281.

Chuang TY, Popescu NA, Su WP, Chute CG (1990) Squamous cell carcinoma. A population-based incidence study in Rochester, Minn. *Arch Dermatol* 126:185-188.

Dajee M, Lazarov M, Zhang JY, Cai T, Green CL, Russell AJ, *et al.* (2003) NF-kappaB blockade and oncogenic Ras trigger invasive human epidermal neoplasia. *Nature* 421:639-643.

De Hertog SA, Wensveen CA, Bastiaens MT, Kielich CJ, Berkhout MJ, Westendorp RG, *et al.* (2001) Relation between smoking and skin cancer. *J Clin Oncol* 19:231-238.

de Jong MC, Pramana J, van der Wal JE, Lacko M, Peutz-Kootstra CJ, de Jong JM, *et al.* (2010) CD44 expression predicts local recurrence after radiotherapy in larynx cancer. *Clin Cancer Res* 16:5329-5338.

De Matos AJ, Lopes CC, Faustino AM, Carnevalheira JG, Rutteman GR, Gartner Mde F (2007) E-cadherin, beta-catenin, invasion and lymph node metastases in canine malignant mammary tumours. *APMIS* 115:327-334.

de Visscher JG, Gooris PJ, Vermey A, Roodenburg JL (2002) Surgical margins for resection of squamous cell carcinoma of the lower lip. *Int J Oral Maxillofac Surg* 31:154-157.

Dean NR, Sweeny L, Magnuson JS, Carroll WR, Robinson D, Desmond RA, *et al.* Outcomes of recurrent head and neck cutaneous squamous cell carcinoma. *J Skin Cancer* 2011:972497.

Delilbasi CB, Okura M, Iida S, Kogo M (2004) Investigation of CXCR4 in squamous cell carcinoma of the tongue. *Oral Oncol* 40:154-157.

Demey JR, Vicente-Villardón JL, Galindo-Villardón MP, Zambrano AY (2008) Identifying molecular markers associated with classification of genotypes by External Logistic Biplots. *Bioinformatics* 24:2832-2838.

Denning MF, Wang Y, Nickoloff BJ, Wrone-Smith T (1998) Protein kinase Cdelta is activated by caspase-dependent proteolysis during ultraviolet radiation-induced apoptosis of human keratinocytes. *J Biol Chem* 273:29995-30002.

Derynck R, Goeddel DV, Ullrich A, Gutterman JU, Williams RD, Bringman TS, *et al.* (1987) Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors alpha and beta and the epidermal growth factor receptor by human tumors. *Cancer Res* 47:707-712.

Derynck R, Muthusamy BP, Saeteum KY (2014) Signaling pathway cooperation in TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol* 31C:56-66.

Desai B, Ma T, Zhu J, Chellaiah MA (2009) Characterization of the expression of variant and standard CD44 in prostate cancer cells: identification of the possible molecular mechanism of CD44/MMP9 complex formation on the cell surface. *J Cell Biochem* 108:272-284.

Diaz-Guerra M, Haddow S, Bauluz C, Jorcano JL, Cano A, Balmain A, *et al.* (1992) Expression of simple epithelial cytokeratins in mouse epidermal keratinocytes harboring Harvey ras gene alterations. *Cancer Res* 52:680-687.

Diepgen TL, Fartasch M, Drexler H, Schmitt J (2012) Occupational skin cancer induced by ultraviolet radiation and its prevention. *Br J Dermatol* 167 Suppl 2:76-84.

Diepgen TL, Mahler V (2002) The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol* 146 Suppl 61:1-6.

Dinehart SM, Peterson S (2005) Evaluation of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous squamous cell carcinoma and proposal of a new staging system. *Dermatol Surg* 31:1379-1384.

Dinehart SM, Pollack SV (1989) Metastases from squamous cell carcinoma of the skin and lip. An analysis of twenty-seven cases. *J Am Acad Dermatol* 21:241-248.

Doeden K, Ma Z, Narasimhan B, Swetter SM, Detmar M, Dadras SS (2009) Lymphatic invasion in cutaneous melanoma is associated with sentinel lymph node metastasis. *J Cutan Pathol* 36:772-780.

Dominey AM, Wang XJ, King LE, Jr., Nanney LB, Gagne TA, Sellheyer K, *et al.* (1993) Targeted overexpression of transforming growth factor alpha in the epidermis of transgenic mice elicits hyperplasia, hyperkeratosis, and spontaneous, squamous papillomas. *Cell Growth Differ* 4:1071-1082.

Dominguez-Cruz JJ, Nieto-Garcia A, Rios JJ, Moreno-Ramirez D (2013) Second nonmelanoma skin cancer in Spain: frequency and chronology. *Br J Dermatol* 170:716-719.

Dorta RG, Landman G, Kowalski LP, Lauris JR, Latorre MR, Oliveira DT (2002) Tumour-associated tissue eosinophilia as a prognostic factor in oral squamous cell carcinomas. *Histopathology* 41:152-157.

dos Santos LR, Cernea CR, Kowalski LP, Carneiro PC, Soto MN, Nishio S, *et al.* (1996) Squamous-cell carcinoma of the lower lip: a retrospective study of 58 patients. *Sao Paulo Med J* 114:1117-1126.

Dotto GP (2008) Notch tumor suppressor function. *Oncogene* 27:5115-5123.

Dotto JE, Glusac EJ (2006) p63 is a useful marker for cutaneous spindle cell squamous cell carcinoma. *J Cutan Pathol* 33:413-417.

Drvar DL, Lipozencic J, Sabol I, Mokos ZB, Ilic I, Grce M (2014) Human papillomavirus status in extragenital nonmelanoma skin cancers. *Clin Dermatol* 32:248-252.

du Rieu MC, Torrisani J, Selves J, Al Saati T, Souque A, Dufresne M, *et al.* (2010) MicroRNA-21 is induced early in pancreatic ductal adenocarcinoma precursor lesions. *Clin Chem* 56:603-612.

Dumoff KL, Chu CS, Harris EE, Holtz D, Xu X, Zhang PJ, *et al.* (2006) Low podoplanin expression in pretreatment biopsy material predicts poor prognosis in advanced-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated by primary radiation. *Mod Pathol* 19:708-716.

Dziunycz P, Iotzova-Weiss G, Eloranta JJ, Lauchli S, Hafner J, French LE, *et al.* (2010) Squamous cell carcinoma of the skin shows a distinct microRNA profile modulated by UV radiation. *J Invest Dermatol* 130:2686-2689.

Effiom OA, Adeyemo WL, Omitola OG, Ajayi OF, Emmanuel MM, Gbotolorun OM (2008) Oral squamous cell carcinoma: a clinicopathologic review of 233 cases in Lagos, Nigeria. *J Oral Maxillofac Surg* 66:1595-1599.

Eide MJ, Weinstock MA, Dufresne RG, Jr., Neelagaru S, Risica P, Burkholder GJ, *et al.* (2005) Relationship of treatment delay with surgical defect size from keratinocyte carcinoma (basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma of the skin). *J Invest Dermatol* 124:308-314.

Einspahr JG, Alberts DS, Wameke JA, Bozzo P, Basye J, Grogan TM, *et al.* (1999) Relationship of p53 mutations to epidermal cell proliferation and apoptosis in human UV-induced skin carcinogenesis. *Neoplasia* 1:468-475.

El-Abaseri TB, Fuhman J, Trempus C, Shendrik I, Tennant RW, Hansen LA (2005) Chemoprevention of UV light-induced skin tumorigenesis by inhibition of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 65:3958-3965.

el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, *et al.* (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75:817-825.

El-Husseiny G, Kandil A, Jamshed A, Khafaga Y, Saleem M, Allam A, *et al.* (2000) Squamous cell carcinoma of the oral tongue: an analysis of prognostic factors. *Br J Oral Maxillofac Surg* 38:193-199.

Epstein E, Epstein NN, Bragg K, Linden G (1968) Metastases from squamous cell carcinomas of the skin. *Arch Dermatol* 97:245-251.

Epstein JH (1983) Photocarcinogenesis, skin cancer, and aging. *J Am Acad Dermatol* 9:487-502.

Eroglu A, Berberoglu U, Berreroğlu S (1996) Risk factors related to locoregional recurrence in squamous cell carcinoma of the skin. *J Surg Oncol* 61:124-130.

Euvrard S, Kanitakis J, Claudy A (2003) Skin cancers after organ transplantation. *N Engl J Med* 348:1681-1691.

Euvrard S, Kanitakis J, Decullier E, Butnaru AC, Lefrancois N, Boissonnat P, *et al.* (2006) Subsequent skin cancers in kidney and heart transplant recipients after the first squamous cell carcinoma. *Transplantation* 81:1093-1100.

Euvrard S, Kanitakis J, Pouteil-Noble C, Claudy A, Touraine JL (1997) Skin cancers in organ transplant recipients. *Ann Transplant* 2:28-32.

Farasat S, Yu SS, Neel VA, Nehal KS, Lardaro T, Mihm MC, *et al.* (2011) A new American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous squamous cell carcinoma: creation and rationale for inclusion of tumor (T) characteristics. *J Am Acad Dermatol* 64:1051-1059.

Fatani MI, Hussain WM, Baltow B, Alsharif S Cutaneous horn arising from an area of discoid lupus erythematosus on the scalp. *BMJ Case Rep* 2014.

Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759-767.

Feldman SR, Fleischer AB, Jr. (2011) Progression of actinic keratosis to squamous cell carcinoma revisited: clinical and treatment implications. *Cutis* 87:201-207.

Feller L, Wood NH, Khammissa RA, Lemmer J (2010a) Human papillomavirus-mediated carcinogenesis and HPV-associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 1: human papillomavirus-mediated carcinogenesis. *Head Face Med* 6:14.

Feller L, Wood NH, Khammissa RA, Lemmer J (2010b) Human papillomavirus-mediated carcinogenesis and HPV-associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 2: Human papillomavirus associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Face Med* 6:15.

Ferte C, Fernandez M, Hollebecque A, Koscielny S, Levy A, Massard C, *et al.* Tumor growth rate is an early indicator of antitumor drug activity in phase I clinical trials. *Clin Cancer Res* 20:246-252.

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9:102-114.

Finlan LE, Hupp TR (2007) p63: the phantom of the tumor suppressor. *Cell Cycle* 6:1062-1071.

Fischer C, Zlobec I, Stockli E, Probst S, Storck C, Tornillo L, *et al.* (2008) Is immunohistochemical epidermal growth factor receptor expression overestimated as a prognostic factor in head-neck squamous cell carcinoma? A retrospective analysis based on a tissue microarray of 365 carcinomas. *Hum Pathol* 39:1527-1534.

Fitzpatrick PJ, Harwood AA (1985) Acute epithelioma--an aggressive squamous cell carcinoma of the skin. *Am J Clin Oncol* 8:468-471.

Fitzpatrick SG, Hirsch SA, Gordon SC (2014) The malignant transformation of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a systematic review. *J Am Dent Assoc* 145:45-56.

Fleming MD, Hunt JL, Purdue GF, Sandstad J (1990) Marjolin's ulcer: a review and reevaluation of a difficult problem. *J Burn Care Rehabil* 11:460-469.

Fogarty GB, Conus NM, Chu J, McArthur G (2007) Characterization of the expression and activation of the epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinoma of the skin. *Br J Dermatol* 156:92-98.

Frame S, Crombie R, Liddell J, Stuart D, Linardopoulos S, Nagase H, *et al.* (1998) Epithelial carcinogenesis in the mouse: correlating the genetics and the biology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353:839-845.

Frankel DH, Hanusa BH, Zitelli JA (1992) New primary nonmelanoma skin cancer in patients with a history of squamous cell carcinoma of the skin. Implications and recommendations for follow-up. *J Am Acad Dermatol* 26:720-726.

Frierson HF, Jr., Cooper PH (1986) Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the lower lip. *Hum Pathol* 17:346-354.

Frierson HF, Jr., Deutsch BD, Levine PA (1988) Clinicopathologic features of cutaneous squamous cell carcinomas of the head and neck in patients with chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Hum Pathol* 19:1397-1402.

Fuertes L, Santonja C, Kutzner H, Requena L (2013a) Immunohistochemistry in dermatopathology: a review of the most commonly used antibodies (part I). *Actas Dermosifiliogr* 104:99-127.

Fuertes L, Santonja C, Kutzner H, Requena L (2013b) Immunohistochemistry in Dermatopathology: A Review of the Most Commonly Used Antibodies (Part II). *Actas Dermosifiliogr* 104:181-203.

Fuster JJ, Sanz-Gonzalez SM, Moll UM, Andres V (2007) Classic and novel roles of p53: prospects for anticancer therapy. *Trends Mol Med* 13:192-199.

Galante E, Gallus G, Guzzon A, Bono A, Bandieramonte G, Di Pietro S (1986) Growth rate of primary breast cancer and prognosis: observations on a 3- to 7-year follow-up in 180 breast cancers. *Br J Cancer* 54:833-836.

Gallagher RP, Hill GB, Bajdik CD, Coldman AJ, Fincham S, McLean DI, *et al.* (1995) Sunlight exposure, pigmentation factors, and risk of nonmelanocytic skin cancer. II. Squamous cell carcinoma. *Arch Dermatol* 131:164-169.

Gandellini P, Folini M, Longoni N, Pennati M, Binda M, Colecchia M, *et al.* (2009) miR-205 Exerts tumor-suppressive functions in human prostate through down-regulation of protein kinase Cepsilon. *Cancer Res* 69:2287-2295.

Ganesan P, Ali SM, Wang K, Blumenschein GR, Esmaeli B, Wolff RA, *et al.* (2014) Epidermal Growth Factor Receptor P753S Mutation in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Responsive to Cetuximab-Based Therapy. *J Clin Oncol*.

Garber K (2008) Epithelial-to-mesenchymal transition is important to metastasis, but questions remain. *J Natl Cancer Inst* 100:232-233, 239.

Garcia-Serra A, Hinerman RW, Mendenhall WM, Amdur RJ, Morris CG, Williams LS, *et al.* (2003) Carcinoma of the skin with perineural invasion. *Head Neck* 25:1027-1033.

Gheldof A, Berx G (2013) Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. *Prog Mol Biol Transl Sci* 116:317-336.

Ginzinger DG (2002) Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 30:503-512.

Giroldi LA, Shimazui T, Schalken JA, Yamasaki H, Bringuier PP (2000) Classical cadherins in urological cancers. *Morphologie* 84:31-38.

Gloster HM, Jr., Brodland DG (1996) The epidemiology of skin cancer. *Dermatol Surg* 22:217-226.

Goepfert H, Dichtel WJ, Medina JE, Lindberg RD, Luna MD (1984) Perineural invasion in squamous cell skin carcinoma of the head and neck. *Am J Surg* 148:542-547.

Goette DK (1976) Review of erythroplasia of Queyrat and its treatment. *Urology* 8:311-315.

Gonzalez-Perez R, Gardeazabal J, Eizaguirre X, Diaz-Perez JL (1997) Metastatic squamous cell carcinoma arising in Bowen's disease of the palm. *J Am Acad Dermatol* 36:635-636.

Goodison S, Urquidi V, Tarin D (1999) CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol* 52:189-196.

Gordon SW (1977) Squamous cell carcinoma arising in hidradenitis suppurativa: case report. *Plast Reconstr Surg* 60:800-802.

Gorzelnik LM (1986) Oral squamous cell carcinoma--a review of 524 cases. *Penn Dent J (Phila)* 87:16-18.

Gottlieb AB, Chang CK, Posnett DN, Fanelli B, Tam JP (1988) Detection of transforming growth factor alpha in normal, malignant, and hyperproliferative human keratinocytes. *J Exp Med* 167:670-675.

Gould VE, Gould KA (1999) E-cadherin as tumor differentiation marker and as architectural determinant. *Hum Pathol* 30:1273-1275.

Graham JH, Helwig EB (1973) Erythroplasia of Queyrat. A clinicopathologic and histochemical study. *Cancer* 32:1396-1414.

Grant WB (2007) A meta-analysis of second cancers after a diagnosis of nonmelanoma skin cancer: additional evidence that solar ultraviolet-B irradiance reduces the risk of internal cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103:668-674.

Graziano V, De Laurenzi V (2011) Role of p63 in cancer development. *Biochim Biophys Acta* 1816:57-66.

Green A (1992) Changing patterns in incidence of non-melanoma skin cancer. *Epithelial Cell Biol* 1:47-51.

Gregory PA, Bracken CP, Bert AG, Goodall GJ (2008) MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle* 7:3112-3118.

Greither T, Grochola LF, Udelnow A, Lautenschlager C, Wurl P, Taubert H (2009) Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *Int J Cancer* 126:73-80.

Grover R, Douglas RG, Shaw JH (1989) Carcinoma of the lip in Auckland, New Zealand, 1969-1987. *Head Neck* 11:264-268.

Groves RW, Allen MH, MacDonald DM (1992) Abnormal expression of epidermal growth factor receptor in cutaneous epithelial tumours. *J Cutan Pathol* 19:66-72.

Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A (2004) The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4:361-370.

Guenther ST, Hurwitz RM, Buckel LJ, Gray HR (1999) Cutaneous squamous cell carcinomas consistently show histologic evidence of in situ changes: a clinicopathologic correlation. *J Am Acad Dermatol* 41:443-448.

Hanke M, Hoefig K, Merz H, Feller AC, Kausch I, Jocham D, *et al.* A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol Oncol* 28:655-661.

Hansen LA, Woodson RL, 2nd, Holbus S, Strain K, Lo YC, Yuspa SH (2000) The epidermal growth factor receptor is required to maintain the proliferative population in the basal compartment of epidermal tumors. *Cancer Res* 60:3328-3332.

Harradine KA, Ridd K, Saunier EF, Clermont FF, Perez-Losada J, Moore DH, *et al.* (2009) Elevated cutaneous Smad activation associates with enhanced skin tumor susceptibility in organ transplant recipients. *Clin Cancer Res* 15:5101-5107.

Hartevelt MM, Bavink JN, Kootte AM, Vermeer BJ, Vandenbroucke JP (1990) Incidence of skin cancer after renal transplantation in The Netherlands. *Transplantation* 49:506-509.

He J, Deng Y, Yang G, Xie W (2013) MicroRNA-203 down-regulation is associated with unfavorable prognosis in human glioma. *J Surg Oncol* 108:121-125.

Healy E, Angus B, Lawrence CM, Rees JL (1995) Prognostic value of Ki67 antigen expression in basal cell carcinomas. *Br J Dermatol* 133:737-741.

Heider KH, Dammrich J, Skroch-Angel P, Muller-Hermelink HK, Vollmers HP, Herrlich P, *et al.* (1993) Differential expression of CD44 splice variants in intestinal- and diffuse-type human gastric carcinomas and normal gastric mucosa. *Cancer Res* 53:4197-4203.

Henderson NC, Sheppard D (2012) Integrin-mediated regulation of TGFbeta in fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 1832:891-896.

Herat A, Shirato K, Damian DL, Finlayson R, Whitfeld M (2006) Invasive squamous cell carcinoma arising in refractory perianal Bowen's disease in a HIV-positive individual. *Australas J Dermatol* 47:120-123.

Hodges A, Smoller BR (2002) Immunohistochemical comparison of p16 expression in actinic keratoses and squamous cell carcinomas of the skin. *Mod Pathol* 15:1121-1125.

Hoeijmakers JH (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411:366-374.

Hoot KE, Lighthall J, Han G, Lu SL, Li A, Ju W, *et al.* (2008) Keratinocyte-specific Smad2 ablation results in increased epithelial-mesenchymal transition during skin cancer formation and progression. *J Clin Invest* 118:2722-2732.

Housman TS, Feldman SR, Williford PM, Fleischer AB, Jr., Goldman ND, Acostamadiedo JM, *et al.* (2003) Skin cancer is among the most costly of all cancers to treat for the Medicare population. *J Am Acad Dermatol* 48:425-429.

Huang CC, Boyce SM (2004) Surgical margins of excision for basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma. *Semin Cutan Med Surg* 23:167-173.

Hug DH (2004) Association of nonmelanoma skin cancer with second malignancy. *Cancer* 101:206-207.

Ichikawa M, Nakane H, Marra G, Corti C, Jiricny J, Fitch M, *et al.* (2000) Decreased UV sensitivity, mismatch repair activity and abnormal cell cycle checkpoints in skin cancer cell lines derived from UVB-irradiated XPA-deficient mice. *Mutat Res* 459:285-298.

Ikenaga N, Ohuchida K, Mizumoto K, Yu J, Kayashima T, Sakai H, *et al.* (2010) MicroRNA-203 expression as a new prognostic marker of pancreatic adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 17:3120-3128.

Iorio MV, Croce CM (2012) MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* 4:143-159.

Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, *et al.* (2005) MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 65:7065-7070.

Iorio MV, Visone R, Di Leva G, Donati V, Petrocca F, Casalini P, *et al.* (2007) MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res* 67:8699-8707.

Jambusaria-Pahlajani A, Hess SD, Katz KA, Berg D, Schmults CD Uncertainty in the perioperative management of high-risk cutaneous squamous cell carcinoma among Mohs surgeons. *Arch Dermatol* 146:1225-1231.

Jambusaria-Pahlajani A, Kanetsky PA, Karia PS, Hwang WT, Gelfand JM, Whalen FM, *et al.* Evaluation of AJCC tumor staging for cutaneous squamous cell carcinoma and a proposed alternative tumor staging system. *JAMA Dermatol* 149:402-410.

Jambusaria-Pahlajani A, Kanetsky PA, Karia PS, Hwang WT, Gelfand JM, Whalen FM, *et al.* (2013) Evaluation of AJCC tumor staging for cutaneous squamous cell carcinoma and a proposed alternative tumor staging system. *JAMA Dermatol* 149:402-410.

Jambusaria-Pahlajani A, Miller CJ, Quon H, Smith N, Klein RQ, Schmults CD (2009) Surgical monotherapy versus surgery plus adjuvant radiotherapy in high-risk cutaneous squamous cell carcinoma: a systematic review of outcomes. *Dermatol Surg* 35:574-585.

Jarkowski A, 3rd, Hare R, Loud P, Skitzki JJ, Kane JM, 3rd, May KS, *et al.* (2014) Systemic Therapy in Advanced Cutaneous Squamous Cell Carcinoma (CSCC): The Roswell Park Experience and a Review of the Literature. *Am J Clin Oncol*.

Jensen V, Prasad AR, Smith A, Raju M, Wendel CS, Schmelz M, *et al.* Prognostic criteria for squamous cell cancer of the skin. *J Surg Res* 159:509-516.

Jensen V, Prasad AR, Smith A, Raju M, Wendel CS, Schmelz M, *et al.* (2009) Prognostic criteria for squamous cell cancer of the skin. *J Surg Res* 159:509-516.

Jiang W, Ananthaswamy HN, Muller HK, Kripke ML (1999) p53 protects against skin cancer induction by UV-B radiation. *Oncogene* 18:4247-4253.

Jochems C, Schlom J (2011) Tumor-infiltrating immune cells and prognosis: the potential link between conventional cancer therapy and immunity. *Exp Biol Med (Maywood)* 236:567-579.

Joensuu H, Ristamaki R, Klemi PJ, Jalkanen S (1993) Lymphocyte homing receptor (CD44) expression is associated with poor prognosis in gastrointestinal lymphoma. *Br J Cancer* 68:428-432.

Johannesdottir SA, Lash TL, Jensen AO, Farkas DK, Olesen AB (2012) Mortality in cancer patients with a history of cutaneous squamous cell carcinoma--a nationwide population-based cohort study. *BMC Cancer* 12:126.

Johnson TM, Rowe DE, Nelson BR, Swanson NA (1992) Squamous cell carcinoma of the skin (excluding lip and oral mucosa). *J Am Acad Dermatol* 26:467-484.

Joseloff E, Cataisson C, Aamodt H, Ocheni H, Blumberg P, Kraker AJ, *et al.* (2002) Src family kinases phosphorylate protein kinase C delta on tyrosine residues and modify the neoplastic phenotype of skin keratinocytes. *J Biol Chem* 277:12318-12323.

Joshua B, Kaplan MJ, Doweck I, Pai R, Weissman IL, Prince ME, *et al.* (2011) Frequency of cells expressing CD44, a head and neck cancer stem cell marker: correlation with tumor aggressiveness. *Head Neck* 34:42-49.

Jost M, Huggett TM, Kari C, Rodeck U (2001) Matrix-independent survival of human keratinocytes through an EGF receptor/MAPK-kinase-dependent pathway. *Mol Biol Cell* 12:1519-1527.

Jost M, Kari C, Rodeck U (2000) The EGF receptor - an essential regulator of multiple epidermal functions. *Eur J Dermatol* 10:505-510.

Jovanovic A, Schulten EA, Kostense PJ, Snow GB, van der Waal I (1993) Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 22:459-462.

Jung GW, Dover DC, Salopek TG (2014) Risk of second primary malignancies following a diagnosis of cutaneous malignant melanoma or nonmelanoma skin cancer in Alberta, Canada from 1979 to 2009. *Br J Dermatol* 170:136-143.

Junkins-Hopkins JM (2010) Tanning and skin cancer. *J Am Acad Dermatol* 62:854-856.

Kamstrup MR, Gniadecki R, Skovgaard GL (2007) Putative cancer stem cells in cutaneous malignancies. *Exp Dermatol* 16:297-301.

Kanitakis J, Audeffray D, Claudy A (2006) Squamous cell carcinoma of the skin complicating lupus vulgaris. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 20:114-116.

Kanitakis J, Narvaez D, Euvrard S, Faure M, Claudy A (1997) Proliferation markers Ki67 and PCNA in cutaneous squamous cell carcinomas: lack of prognostic value. *Br J Dermatol* 136:643-644.

Kao GF (1986) Carcinoma arising in Bowen's disease. *Arch Dermatol* 122:1124-1126.

Karaayvaz M, Zhang C, Liang S, Shroyer KR, Ju J (2012) Prognostic significance of miR-205 in endometrial cancer. *PLoS One* 7:e35158.

Karagas MR, Nelson HH, Zens MS, Linet M, Stukel TA, Spencer S, *et al.* (2007) Squamous cell and basal cell carcinoma of the skin in relation to radiation therapy and potential modification of risk by sun exposure. *Epidemiology* 18:776-784.

Karasoy Yesilada A, Zeynep Sevim K, Ozgur Sucu D, Akcal A, Karsidag S, Kilinc L, *et al.* (2013) Marjolin ulcer: clinical experience with 34 patients over 15 years. *J Cutan Med Surg* 17:404-409.

Karatzas G, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Chatzigianni E, Papanikolaou S, Riza F, *et al.* (1999) E-cadherin expression correlates with tumor differentiation in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 46:232-235.

Karia PS, Han J, Schmults CD (2013a) Cutaneous squamous cell carcinoma: estimated incidence of disease, nodal metastasis, and deaths from disease in the United States, 2012. *J Am Acad Dermatol* 68:957-966.

Karia PS, Jambusaria-Pahlajani A, Harrington DP, Murphy GF, Qureshi AA, Schmults CD (2013b) Evaluation of American Joint Committee on Cancer, International Union Against Cancer, and Brigham and Women's Hospital tumor staging for cutaneous squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 32:327-334.

Karreth F, Tuveson DA (2004) Twist induces an epithelial-mesenchymal transition to facilitate tumor metastasis. *Cancer Biol Ther* 3:1058-1059.

Kashima HK, Kutcher M, Kessis T, Levin LS, de Villiers EM, Shah K (1990) Human papillomavirus in squamous cell carcinoma, leukoplakia, lichen planus, and clinically normal epithelium of the oral cavity. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 99:55-61.

Kato M, Suzuki T, Suzuki Y, Terasawa Y, Sasano H, Arai Y (2004) Natural history of small renal cell carcinoma: evaluation of growth rate, histological grade, cell proliferation and apoptosis. *J Urol* 172:863-866.

Katz AD, Urbach F, Lilienfeld AM (1957) The frequency and risk of metastases in squamous-cell carcinoma of the skin. *Cancer* 10:1162-1166.

Katz KA, Marcil I, Stern RS (2002) Incidence and risk factors associated with a second squamous cell carcinoma or basal cell carcinoma in psoralen + ultraviolet a light-treated psoriasis patients. *J Invest Dermatol* 118:1038-1043.

Khavari PA (2006) Modelling cancer in human skin tissue. *Nat Rev Cancer* 6:270-280.

Kim DJ, Angel JM, Sano S, DiGiovanni J (2009a) Constitutive activation and targeted disruption of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) in mouse epidermis reveal its critical role in UVB-induced skin carcinogenesis. *Oncogene* 28:950-960.

Kim YK, Yu J, Han TS, Park SY, Namkoong B, Kim DH, *et al.* (2009b) Functional links between clustered microRNAs: suppression of cell-cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer. *Nucleic Acids Res* 37:1672-1681.

Kinsella AR, Green B, Lepts GC, Hill CL, Bowie G, Taylor BA (1993) The role of the cell-cell adhesion molecule E-cadherin in large bowel tumour cell invasion and metastasis. *Br J Cancer* 67:904-909.

Kolev V, Mandinova A, Guinea-Viniegra J, Hu B, Lefort K, Lambertini C, *et al.* (2008) EGFR signalling as a negative regulator of Notch1 gene transcription and function in proliferating keratinocytes and cancer. *Nat Cell Biol* 10:902-911.

Kraus DH, Carew JF, Harrison LB (1998) Regional lymph node metastasis from cutaneous squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 124:582-587.

Kreppel M, Drebber U, Wedemeyer I, Eich HT, Backhaus T, Zoller JE, *et al.* (2011) Podoplanin expression predicts prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma treated with neoadjuvant radiochemotherapy. *Oral Oncol* 47:873-878.

Kreppel M, Krakowezki A, Kreppel B, Drebber U, Wedemeyer I, Mauch C, *et al.* (2012) Podoplanin expression in cutaneous head and neck squamous cell carcinoma--prognostic value and clinicopathologic implications. *J Surg Oncol* 107:376-383.

Kricker A, Armstrong B, Hansen V, Watson A, Singh-Khaira G, Lecathelinais C, *et al.* (2014) Basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma growth rates and determinants of size in community patients. *J Am Acad Dermatol* 70:456-464.

Krishnamurthy S, Dong Z, Vodopyanov D, Imai A, Helman JI, Prince ME, *et al.* Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. *Cancer Res* 70:9969-9978.

Krishnamurthy S, Dong Z, Vodopyanov D, Imai A, Helman JI, Prince ME, *et al.* (2010) Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. *Cancer Res* 70:9969-9978.

Kubo Y, Urano Y, Yoshimoto K, Iwahana H, Fukuhara K, Arase S, *et al.* (1994) p53 gene mutations in human skin cancers and precancerous lesions: comparison with immunohistochemical analysis. *J Invest Dermatol* 102:440-444.

Kulkarni AA, Thatcher TH, Olsen KC, Maggirwar SB, Phipps RP, Sime PJ (2011) PPAR-gamma ligands repress TGFbeta-induced myofibroblast differentiation by targeting the PI3K/Akt pathway: implications for therapy of fibrosis. *PLoS One* 6:e15909.

Kyrgidis A, Tzellos TG, Kechagias N, Patrikidou A, Xirou P, Kitikidou K, *et al.* (2010) Cutaneous squamous cell carcinoma (SCC) of the head and neck: risk factors of overall and recurrence-free survival. *Eur J Cancer* 46:1563-1572.

Lai SY, Weinstein GS, Chalian AA, Rosenthal DI, Weber RS (2002) Parotidectomy in the treatment of aggressive cutaneous malignancies. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 128:521-526.

Laing KJ, Secombes CJ (2004) Chemokines. *Dev Comp Immunol* 28:443-460.

Lamouille S, Xu J, Derynck R (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:178-196.

Lane DP (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358:15-16.

LaRiviere W, Pickett AB (1979) Clinical criteria in diagnosis of early squamous cell carcinoma of the lower lip. *J Am Dent Assoc* 99:972-977.

Lawoyin JO, Lawoyin DO, Aderinokun G (1997) Intra-oral squamous cell carcinoma in Ibadan: a review of 90 cases. *Afr J Med Med Sci* 26:187-188.

Lawrie CH, Soneji S, Marafioti T, Cooper CD, Palazzo S, Paterson JC, *et al.* (2007) MicroRNA expression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of diffuse large B cell lymphoma. *Int J Cancer* 121:1156-1161.

Lazarov M, Kubo Y, Cai T, Dajee M, Tarutani M, Lin Q, *et al.* (2002) CDK4 coexpression with Ras generates malignant human epidermal tumorigenesis. *Nat Med* 8:1105-1114.

Lebanony D, Benjamin H, Gilad S, Ezagouri M, Dov A, Ashkenazi K, *et al.* (2009) Diagnostic assay based on hsa-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small-cell lung carcinoma. *J Clin Oncol* 27:2030-2037.

Ledford H (2011) Cancer theory faces doubts. *Nature* 472:273.

Lee D, Nash M, Har-El G (1996) Regional spread of auricular and periauricular cutaneous malignancies. *Laryngoscope* 106:998-1001.

Lee M, Wick M (1990) Bowen's disease. *CA Cancer J Clin* 40:237-242.

Lee YS, Dutta A (2009) MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol* 4:199-227.

Leffell DJ (2000) The scientific basis of skin cancer. *J Am Acad Dermatol* 42:18-22.

Lefort K, Mandinova A, Ostano P, Kolev V, Calpini V, Kolfshoten I, *et al.* (2007) Notch1 is a p53 target gene involved in human keratinocyte tumor suppression through negative regulation of ROCK1/2 and MRCKalpha kinases. *Genes Dev* 21:562-577.

Lei L, Huang Y, Gong W (2013) miR-205 promotes the growth, metastasis and chemoresistance of NSCLC cells by targeting PTEN. *Oncol Rep* 30:2897-2902.

Leibovitch I, Huilgol SC, Selva D, Hill D, Richards S, Paver R (2005) Cutaneous squamous cell carcinoma treated with Mohs micrographic surgery in Australia II. Perineural invasion. *J Am Acad Dermatol* 53:261-266.

Leiter U, Garbe C (2008) Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer--the role of sunlight. *Adv Exp Med Biol* 624:89-103.

Lena AM, Shalom-Feuerstein R, Rivetti di Val Cervo P, Aberdam D, Knight RA, Melino G, *et al.* (2008) miR-203 represses 'stemness' by repressing DeltaNp63. *Cell Death Differ* 15:1187-1195.

Leocata P, Crisman G, Vitale AR, Siniscalchi G, Biondi P, Colella G (2009) Squamous cell carcinoma arising from long-term (50-year) Lupus vulgaris: is there a need for a close medical follow-up in such chronic diseases? *Infez Med* 17:249-253.

Leon J, Kamino H, Steinberg JJ, Pellicer A (1988) H-ras activation in benign and self-regressing skin tumors (keratoacanthomas) in both humans and an animal model system. *Mol Cell Biol* 8:786-793.

Leonard MK, Kommagani R, Payal V, Mayo LD, Shamma HN, Kadakia MP (2011) DeltaNp63alpha regulates keratinocyte proliferation by controlling PTEN expression and localization. *Cell Death Differ* 18:1924-1933.

Lever LR, Lawrence CM (1995) Nonmelanoma skin cancer associated with use of a tanning bed. *N Engl J Med* 332:1450-1451.

Levine AJ, Oren M (2009) The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* 9:749-758.

Levine JA, Sorace M, Spencer J, Siegel DM (2005) The indoor UV tanning industry: a review of skin cancer risk, health benefit claims, and regulation. *J Am Acad Dermatol* 53:1038-1044.

Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120:15-20.

Lewis KG, Weinstock MA (2007) Trends in nonmelanoma skin cancer mortality rates in the United States, 1969 through 2000. *J Invest Dermatol* 127:2323-2327.

Li J, Lee YS (1996) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in pseudoepitheliomatous hyperplasia, keratoacanthoma and squamous cell carcinoma of the skin. *Ann Acad Med Singapore* 25:526-530.

Li W, Marshall C, Mei L, Dzubow L, Schmults C, Dans M, *et al.* (2005) Srcasm modulates EGF and Src-kinase signaling in keratinocytes. *J Biol Chem* 280:6036-6046.

Li W, Marshall C, Mei L, Gelfand J, Seykora JT (2007) Srcasm corrects Fyn-induced epidermal hyperplasia by kinase down-regulation. *J Biol Chem* 282:1161-1169.

Liang H, Wu H, Giorgadze TA, Sariya D, Bellucci KS, Veerappan R, *et al.* (2007) Podoplanin is a highly sensitive and specific marker to distinguish primary skin adnexal carcinomas from adenocarcinomas metastatic to skin. *Am J Surg Pathol* 31:304-310.

Lim JL, Stern RS (2005) High levels of ultraviolet B exposure increase the risk of non-melanoma skin cancer in psoralen and ultraviolet A-treated patients. *J Invest Dermatol* 124:505-513.

Linardopoulos S, Street AJ, Quelle DE, Parry D, Peters G, Sherr CJ, *et al.* (1995) Deletion and altered regulation of p16INK4a and p15INK4b in undifferentiated mouse skin tumors. *Cancer Res* 55:5168-5172.

Lindelof B, Eklund G (1986) Incidence of malignant skin tumors in 14,140 patients after Grenz-ray treatment for benign skin disorders. *Arch Dermatol* 122:1391-1395.

Liu W, McArthur GA, Trivett M, Murray WK, Wolfe R, Kelly JW (2008) Correlation of subjective self-reported melanoma growth rate with objective tumor proliferation markers. *Arch Dermatol* 144:555-556.

Lo Muzio L, Mignogna MD, Favia G, Procaccini M, Testa NF, Bucci E (1998) The possible association between oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma: a clinical evaluation on 14 cases and a review of the literature. *Oral Oncol* 34:239-246.

Lobo DV, Chu P, Grekin RC, Berger TG (1992) Nonmelanoma skin cancers and infection with the human immunodeficiency virus. *Arch Dermatol* 128:623-627.

Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F (2012) A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 166:1069-1080.

Lopes FF, da Costa Miguel MC, Pereira AL, da Cruz MC, de Almeida Freitas R, Pinto LP, *et al.* (2009) Changes in immunoexpression of E-cadherin and beta-catenin in oral squamous cell carcinoma with and without nodal metastasis. *Ann Diagn Pathol* 13:22-29.

Lott DG, Manz R, Koch C, Lorenz RR (2010) Aggressive behavior of nonmelanotic skin cancers in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 90:683-687.

Lowery AJ, Miller N, Devaney A, McNeill RE, Davoren PA, Lemetre C, *et al.* (2009) MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Res* 11:R27.

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, *et al.* (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435:834-838.

Lu M, Jolly MK, Levine H, Onuchic JN, Ben-Jacob E (2013) MicroRNA-based regulation of epithelial-hybrid-mesenchymal fate determination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:18144-18149.

Lyakhovitsky A, Barzilai A, Fogel M, Trau H, Huszar M (2004) Expression of e-cadherin and beta-catenin in cutaneous squamous cell carcinoma and its precursors. *Am J Dermatopathol* 26:372-378.

Mack B, Gires O (2008) CD44s and CD44v6 expression in head and neck epithelia. *PLoS One* 3:e3360.

Mackintosh LJ, de Koning MN, Quint WG, Ter Schegget J, Morgan IM, Herd RM, *et al.* (2009) Presence of beta human papillomaviruses in nonmelanoma skin cancer from organ transplant recipients and immunocompetent patients in the West of Scotland. *Br J Dermatol* 161:56-62.

Maclean GM, Coleman DJ (2007) Three fatal cases of squamous cell carcinoma arising in chronic perineal hidradenitis suppurativa. *Ann R Coll Surg Engl* 89:709-712.

Mahomed F, Altini M, Meer S (2007) Altered E-cadherin/beta-catenin expression in oral squamous carcinoma with and without nodal metastasis. *Oral Dis* 13:386-392.

Malvey J (2014) A new vision of actinic keratosis beyond visible clinical lesions. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 29 Suppl 1:3-8.

Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, *et al.* (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133:704-715.

Mansoor A, McKee PH, Simpson JA, McGuire B, Hobbs C (1996) Prognostic significance of Ki-67 and p53 immunoreactivity in cutaneous squamous cell carcinomas. *Am J Dermatopathol* 18:351-357.

Marder MZ, Deesen KC (1982) Transformation of oral lichen planus to squamous cell carcinoma: a literature review and report of case. *J Am Dent Assoc* 105:55-60.

Mareel M, Boterberg T, Noe V, Van Hoorde L, Vermeulen S, Bruyneel E, *et al.* (1997) E-cadherin/catenin/cytoskeleton complex: a regulator of cancer invasion. *J Cell Physiol* 173:271-274.

Markopoulos A, Albanidou-Farmaki E, Kayavis I (2004) Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. *Oral Dis* 10:212-216.

Marks R, Foley P, Goodman G, Hage BH, Selwood TS (1986) Spontaneous remission of solar keratoses: the case for conservative management. *Br J Dermatol* 115:649-655.

Marks R, Rennie G, Selwood TS (1988) Malignant transformation of solar keratoses to squamous cell carcinoma. *Lancet* 1:795-797.

Martinez JC, Otley CC (2001) The management of melanoma and nonmelanoma skin cancer: a review for the primary care physician. *Mayo Clin Proc* 76:1253-1265.

Martinez JC, Otley CC, Stasko T, Euvrard S, Brown C, Schanbacher CF, *et al.* (2003) Defining the clinical course of metastatic skin cancer in organ transplant recipients: a multicenter collaborative study. *Arch Dermatol* 139:301-306.

Martins VL, Vyas JJ, Chen M, Purdie K, Mein CA, South AP, *et al.* (2009) Increased invasive behaviour in cutaneous squamous cell carcinoma with loss of basement-membrane type VII collagen. *J Cell Sci* 122:1788-1799.

Martorell-Calatayud A, Sanmartin Jimenez O, Cruz Mojarrieta J, Guillen Barona C (2013) Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: Defining the High-Risk Variant. *Actas Dermosifiliogr*.

Marusyk A, Almendro V, Polyak K (2012) Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer* 12:323-334.

Masferrer E, Ferrandiz-Pulido C, Masferrer-Niubo M, Rodriguez-Rodriguez A, Gil I, Pont A, *et al.* (2014) Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Penile Squamous Cell Carcinoma. *J Urol*.

Massague J (2012) TGFbeta signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:616-630.

Matsumura Y, Tarin D (1992) Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. *Lancet* 340:1053-1058.

Mattern J, Volm M (2001) Clinical estimation of the growth rate of lung cancer. *Anticancer Res* 21:4067-4070.

Mattie MD, Benz CC, Bowers J, Sensinger K, Wong L, Scott GK, *et al.* (2006) Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Mol Cancer* 5:24.

Maubec E, Duvillard P, Velasco V, Cridx B, Avril MF (2005) Immunohistochemical analysis of EGFR and HER-2 in patients with metastatic squamous cell carcinoma of the skin. *Anticancer Res* 25:1205-1210.

Maurizi M, Almadori G, Ferrandina G, Distefano M, Romanini ME, Cadoni G, *et al.* (1996) Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 74:1253-1257.

Maurizi M, Scambia G, Benedetti Panici P, Ferrandina G, Almadori G, Paludetti G, *et al.* (1992) EGF receptor expression in primary laryngeal cancer: correlation with clinico-pathological features and prognostic significance. *Int J Cancer* 52:862-866.

McCord MW, Mendenhall WM, Parsons JT, Flowers FP (1999) Skin cancer of the head and neck with incidental microscopic perineural invasion. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 43:591-595.

McGregor WG, Chen RH, Lukash L, Maher VM, McCormick JJ (1991) Cell cycle-dependent strand bias for UV-induced mutations in the transcribed strand of excision repair-proficient human fibroblasts but not in repair-deficient cells. *Mol Cell Biol* 11:1927-1934.

Mehrany K, Byrd DR, Roenigk RK, Weenig RH, Phillips PK, Nguyen TH, *et al.* (2003) Lymphocytic infiltrates and subclinical epithelial tumor extension in patients with chronic leukemia and solid-organ transplantation. *Dermatol Surg* 29:129-134.

Mehrany K, Weenig RH, Lee KK, Pittelkow MR, Otley CC (2005) Increased metastasis and mortality from cutaneous squamous cell carcinoma in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Am Acad Dermatol* 53:1067-1071.

Melino G (2011) p63 is a suppressor of tumorigenesis and metastasis interacting with mutant p53. *Cell Death Differ* 18:1487-1499.

Mendenhall WM, Amdur RJ, Hinerman RW, Cognetta AB, Mendenhall NP (2009) Radiotherapy for cutaneous squamous and basal cell carcinomas of the head and neck. *Laryngoscope* 119:1994-1999.

Mendonca H, Rebelo C, Fernandes A, Lino A, Garcia e Silva L (1991) Squamous cell carcinoma arising in hidradenitis suppurativa. *J Dermatol Surg Oncol* 17:830-832.

Meneses A, Verastegui E, Barrera JL, Zinser J, de la Garza J, Hadden JW (1998) Histologic findings in patients with head and neck squamous cell carcinoma receiving perilymphatic natural cytokine mixture (IRX-2) prior to surgery. *Arch Pathol Lab Med* 122:447-454.

Meng X, Wuyi L, Yuhong X, Xinming C Expression of CXCR4 in oral squamous cell carcinoma: correlations with clinicopathology and pivotal role of proliferation. *J Oral Pathol Med* 39:63-68.

Metchnikoff C, Mully T, Singer JP, Golden JA, Arron ST (2012) The 7th edition AJCC staging system for cutaneous squamous cell carcinoma accurately predicts risk of recurrence for heart and lung transplant recipients. *J Am Acad Dermatol* 67:829-835.

Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL (2010) Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15:117-134.

Miller CS, White DK (1996) Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 82:57-68.

Miller DL, Weinstock MA (1994) Nonmelanoma skin cancer in the United States: incidence. *J Am Acad Dermatol* 30:774-778.

Mills AA (2006) p63: oncogene or tumor suppressor? *Curr Opin Genet Dev* 16:38-44.

Mitchell C (2010) The importance of skin cancer prevention in organ transplant patients an editorial to paper by Salgo: 'switch to sirolimus in long-term renal transplant recipients: reduced premalignancies and nonmelanoma skin cancer in a controlled, prospective, randomized, blinded study'. *Am J Transplant* 10:1343-1344.

Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, *et al.* (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10513-10518.

Mitsudomi T, Yatabe Y (2009) Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *FEBS J* 277:301-308.

Moehrle M (2008) Outdoor sports and skin cancer. *Clin Dermatol* 26:12-15.

Mohs FE, Snow SN (1985) Microscopically controlled surgical treatment for squamous cell carcinoma of the lower lip. *Surg Gynecol Obstet* 160:37-41.

Molho-Pessach V, Lotem M (2007) Ultraviolet radiation and cutaneous carcinogenesis. *Curr Probl Dermatol* 35:14-27.

Moll UM, Slade N (2004) p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol Cancer Res* 2:371-386.

Montoro JR, Ricz HA, Souza L, Livingstone D, Melo DH, Tiveron RC, *et al.* (2008) Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Braz J Otorhinolaryngol* 74:861-866.

Moore BA, Weber RS, Prieto V, El-Naggar A, Holsinger FC, Zhou X, *et al.* (2005) Lymph node metastases from cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope* 115:1561-1567.

Mora RG, Perniciaro C (1981) Cancer of the skin in blacks. I. A review of 163 black patients with cutaneous squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 5:535-543.

Morrissey ER, Diaz-Uriarte R (2009) Pomelo II: finding differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res* 37:W581-586.

Morselli P, Masciotra L, Pinto V, Zollino I, Brunelli G, Carinci F (2007) Clinical parameters in T1N0M0 lower lip squamous cell carcinoma. *J Craniofac Surg* 18:1079-1082.

Mortier L, Marchetti P, Delaporte E, Martin de Lassalle E, Thomas P, Piette F, *et al.* (2002) Progression of actinic keratosis to squamous cell carcinoma of the skin correlates with deletion of the 9p21 region encoding the p16(INK4a) tumor suppressor. *Cancer Lett* 176:205-214.

Motley R, Kersey P, Lawrence C (2002) Multiprofessional guidelines for the management of the patient with primary cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 146:18-25.

Motswaledi MH, Doman C (2007) Lupus vulgaris with squamous cell carcinoma. *J Cutan Pathol* 34:939-941.

Mourouzis C, Boynton A, Grant J, Umar T, Wilson A, Macpheson D, *et al.* (2009) Cutaneous head and neck SCCs and risk of nodal metastasis - UK experience. *J Craniomaxillofac Surg* 37:443-447.

Muehleisen B, Pazhenkottil A, French LE, Hofbauer GF (2013) Nonmelanoma skin cancer in organ transplant recipients: increase without delay after transplant and subsequent acceleration. *JAMA Dermatol* 149:618-620.

Muhonen T, Pyrhonen S, Laasonen A, Wasenius VM, Asko-Seljavaara S, Franssila K, *et al.* (1992) Tumour growth rate and DNA flow cytometry parameters as prognostic factors in metastatic melanoma. *Br J Cancer* 66:528-532.

Mukaida H, Toi M, Hirai T, Yamashita Y, Toge T (1991) Clinical significance of the expression of epidermal growth factor and its receptor in esophageal cancer. *Cancer* 68:142-148.

Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, *et al.* (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410:50-56.

Nakamura M, Sugita K, Tokura Y (2010) Expression of Snail1 in the vimentin-expressing squamous cell carcinoma mimicking atypical fibroxanthoma: possible involvement of an epithelial-mesenchymal transition. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 24:1365-1366.

Nakamura M, Tokura Y Epithelial-mesenchymal transition in the skin. *J Dermatol Sci* 61:7-13.

Nakamura S, Nishioka K (2003) Enhanced expression of p16 in seborrhoeic keratosis; a lesion of accumulated senescent epidermal cells in G1 arrest. *Br J Dermatol* 149:560-565.

Nakaya Y, Sheng G (2013) EMT in developmental morphogenesis. *Cancer Lett* 341:9-15.

Nakazawa H, English D, Randell PL, Nakazawa K, Martel N, Armstrong BK, *et al.* (1994) UV and skin cancer: specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:360-364.

Naldi L, Fortina AB, Lovati S, Barba A, Gotti E, Tessari G, *et al.* (2000) Risk of nonmelanoma skin cancer in Italian organ transplant recipients. A registry-based study. *Transplantation* 70:1479-1484.

Natalwala A, Spychal R, Tselepis C (2008) Epithelial-mesenchymal transition mediated tumorigenesis in the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol* 14:3792-3797.

Navarro P, Gomez M, Pizarro A, Gamallo C, Quintanilla M, Cano A (1991) A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule during tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. *J Cell Biol* 115:517-533.

NCCN (2015) NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines) Squamous cell skin cancer. www.nccn.org version 1.2015.

Nelson MA, Einspahr JG, Alberts DS, Balfour CA, Wymer JA, Welch KL, *et al.* (1994) Analysis of the p53 gene in human precancerous actinic keratosis lesions and squamous cell cancers. *Cancer Lett* 85:23-29.

Neville BW, Day TA (2002) Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* 52:195-215.

Ng EK, Wong CL, Ma ES, Kwong A (2009) MicroRNAs as New Players for Diagnosis, Prognosis, and Therapeutic Targets in Breast Cancer. *J Oncol* 2009:305420.

Nguyen TH, Ho DQ (2002) Nonmelanoma skin cancer. *Curr Treat Options Oncol* 3:193-203.

Nicolas M, Wolfer A, Raj K, Kummer JA, Mill P, van Noort M, *et al.* (2003) Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet* 33:416-421.

Nicholson RI, Gee JM, Harper ME (2001) EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 37 Suppl 4:S9-15.

Niemiec J, Kolodziejcki L, Dyczek S, Gasinska A (2004) Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in surgically treated squamous cell lung cancer patients. *Folia Histochem Cytobiol* 42:111-118.

Nijkamp MM, Span PN, Hoogsteen IJ, van der Kogel AJ, Kaanders JH, Bussink J (2011) Expression of E-cadherin and vimentin correlates with metastasis formation in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Radiother Oncol* 99:344-348.

Nindl I, Gottschling M, Krawtchenko N, Lehmann MD, Rowert-Huber J, Eberle J, *et al.* (2007) Low prevalence of p53, p16(INK4a) and Ha-ras tumour-specific mutations in low-graded actinic keratosis. *Br J Dermatol* 156 Suppl 3:34-39.

Niu NN, Niemierko A, Larvie M, Curtin H, Loeffler JS, McKenna MJ, *et al.* (2014) Pretreatment growth rate predicts radiation response in vestibular schwannomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 89:113-119.

Noe V, Chastre E, Bruyneel E, Gespach C, Mareel M (1999) Extracellular regulation of cancer invasion: the E-cadherin-catenin and other pathways. *Biochem Soc Symp* 65:43-62.

Nuovo G, Lee EJ, Lawler S, Godlewski J, Schmittgen T (2009) In situ detection of mature microRNAs by labeled extension on ultramer templates. *Biotechniques* 46:115-126.

O'Day E, Lal A (2010) MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. *Breast Cancer Res* 12:201.

Obernosterer G, Martinez J, Alenius M (2007) Locked nucleic acid-based in situ detection of microRNAs in mouse tissue sections. *Nat Protoc* 2:1508-1514.

Oft M, Akhurst RJ, Balmain A (2002) Metastasis is driven by sequential elevation of H-ras and Smad2 levels. *Nat Cell Biol* 4:487-494.

Oh JE, Kim RH, Shin KH, Park NH, Kang MK (2011) DeltaNp63alpha protein triggers epithelial-mesenchymal transition and confers stem cell properties in normal human keratinocytes. *J Biol Chem* 286:38757-38767.

Oien KA, Evans TR (2008) Raising the profile of cancer of unknown primary. *J Clin Oncol* 26:4373-4375.

Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K, Inoue M, Tahara H, Kobayashi T, *et al.* (1993) Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Res* 53:1696-1701.

Okuyama R, Nguyen BC, Talora C, Ogawa E, Tommasi di Vignano A, Lioumi M, *et al.* (2004) High commitment of embryonic keratinocytes to terminal differentiation through a Notch1-caspase 3 regulatory mechanism. *Dev Cell* 6:551-562.

Okuyama R, Tagami H, Aiba S (2008) Notch signaling: its role in epidermal homeostasis and in the pathogenesis of skin diseases. *J Dermatol Sci* 49:187-194.

Oliver AJ, Helfrick JF, Gard D (1996) Primary oral squamous cell carcinoma: a review of 92 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 54:949-954; discussion 955.

Onerd M, Yilmaz T, Gedikoglu G (2000) Tumor thickness as a predictor of cervical lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the lower lip. *Otolaryngol Head Neck Surg* 122:139-142.

Ortonne JP (2002) From actinic keratosis to squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 146 Suppl 61:20-23.

Ozawa S, Ueda M, Ando N, Shimizu N, Abe O (1989) Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer* 63:2169-2173.

Pacifico A, Goldberg LH, Peris K, Chimenti S, Leone G, Ananthaswamy HN (2008) Loss of CDKN2A and p14ARF expression occurs frequently in human nonmelanoma skin cancers. *Br J Dermatol* 158:291-297.

Paredes J, Figueiredo J, Albergaria A, Oliveira P, Carvalho J, Ribeiro AS, et al. (2012) Epithelial E- and P-cadherins: role and clinical significance in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1826:297-311.

Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E, et al. (2009) Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res* 15:5473-5477.

Parkinson EK (2010) Senescence as a modulator of oral squamous cell carcinoma development. *Oral Oncol* 46:840-853.

Patrascu V, Georgescu CV, Tanase LE, Mogoanta SS (2008) Metastasized squamous cell carcinoma developed on lupus vulgaris. *Rom J Morphol Embryol* 49:91-96.

Peinado H, Olmeda D, Cano A (2007) Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 7:415-428.

Pena JT, Sohn-Lee C, Rouhanifard SH, Ludwig J, Hafner M, Mihailovic A, et al. (2009) miRNA in situ hybridization in formaldehyde and EDC-fixed tissues. *Nat Methods* 6:139-141.

Perez-Losada J, Balmain A (2003) Stem-cell hierarchy in skin cancer. *Nat Rev Cancer* 3:434-443.

Petitjean A, Hainaut P, Caron de Fromental C (2006) TP63 gene in stress response and carcinogenesis: a broader role than expected. *Bull Cancer* 93:E126-135.

Petter G, Haustein UF (1998) Squamous cell carcinoma of the skin--histopathological features and their significance for the clinical outcome. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 11:37-44.

Peyrin-Biroulet L, Khosrotehrani K, Carrat F, Bouvier AM, Chevaux JB, Simon T, *et al.* (2011) Increased risk for nonmelanoma skin cancers in patients who receive thiopurines for inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 141:1621-1628 e1621-1625.

Pickup M, Novitskiy S, Moses HL (2013) The roles of TGFbeta in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer* 13:788-799.

Pierceall WE, Goldberg LH, Tainsky MA, Mukhopadhyay T, Ananthaswamy HN (1991) Ras gene mutation and amplification in human nonmelanoma skin cancers. *Mol Carcinog* 4:196-202.

Plaza JA, Ortega PF, Stockman DL, Suster S (2010) Value of p63 and podoplanin (D2-40) immunoreactivity in the distinction between primary cutaneous tumors and adenocarcinomas metastatic to the skin: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 79 cases. *J Cutan Pathol* 37:403-410.

Preston DS, Stern RS (1992) Nonmelanoma cancers of the skin. *N Engl J Med* 327:1649-1662.

Prime SS, Thakker NS, Pring M, Guest PG, Paterson IC (2001) A review of inherited cancer syndromes and their relevance to oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 37:1-16.

Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, *et al.* (2007) 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* 104:973-978.

Purdie KJ, Lambert SR, Teh MT, Chaplin T, Molloy G, Raghavan M, *et al.* (2007) Allelic imbalances and microdeletions affecting the PTPRD gene in cutaneous squamous cell carcinomas detected using single nucleotide polymorphism microarray analysis. *Genes Chromosomes Cancer* 46:661-669.

Qin AY, Zhang XW, Liu L, Yu JP, Li H, Wang SZ, *et al.* (2013) MiR-205 in cancer: an angel or a devil? *Eur J Cell Biol* 92:54-60.

Qu C, Liang Z, Huang J, Zhao R, Su C, Wang S, *et al.* (2012) MiR-205 determines the radioresistance of human nasopharyngeal carcinoma by directly targeting PTEN. *Cell Cycle* 11.

Quaedvlieg PJ, Creyten DH, Epping GG, Peutz-Kootstra CJ, Nieman FH, Thissen MR, *et al.* (2006) Histopathological characteristics of metastasizing squamous cell carcinoma of the skin and lips. *Histopathology* 49:256-264.

Quintanilla M, Brown K, Ramsden M, Balmain A (1986) Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature* 322:78-80.

Ramis-Conde I, Drasdo D, Anderson AR, Chaplain MA (2008) Modeling the influence of the E-cadherin-beta-catenin pathway in cancer cell invasion: a multiscale approach. *Biophys J* 95:155-165.

Ratushny V, Gober MD, Hick R, Ridky TW, Seykora JT (2012) From keratinocyte to cancer: the pathogenesis and modeling of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Clin Invest* 122:464-472.

Raymond CK, Roberts BS, Garrett-Engle P, Lim LP, Johnson JM (2005) Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs. *RNA* 11:1737-1744.

Rehman I, Takata M, Wu YY, Rees JL (1996) Genetic change in actinic keratoses. *Oncogene* 12:2483-2490.

Renzi C, Mastroeni S, Passarelli F, Mannooranparampil TJ, Caggiati A, Potenza C, *et al.* (2010) Factors associated with large cutaneous squamous cell carcinomas. *J Am Acad Dermatol* 63:404-411.

Rich AM, Radden BG (1984) Squamous cell carcinoma of the oral mucosa: a review of 244 cases in Australia. *J Oral Pathol* 13:459-471.

Ridky TW, Chow JM, Wong DJ, Khavari PA (2010) Invasive three-dimensional organotypic neoplasia from multiple normal human epithelia. *Nat Med* 16:1450-1455.

Rigel DS (2008) Cutaneous ultraviolet exposure and its relationship to the development of skin cancer. *J Am Acad Dermatol* 58:S129-132.

Rigel DS (2014) Commentary: The incidence of nonmelanoma skin cancer: can we make an impact? *J Am Acad Dermatol* 71:27-28.

Rigel SD (2006) *Cancer of the Skin*. Elsevier Inc.

Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A (2008) Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:402-412.

Ristamaki R, Joensuu H, Lappalainen K, Teerenhovi L, Jalkanen S (1997) Elevated serum CD44 level is associated with unfavorable outcome in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 90:4039-4045.

Roa WH, Kim JO, Razzak R, Du H, Guo L, Singh R, *et al.* Sputum microRNA profiling: a novel approach for the early detection of non-small cell lung cancer. *Clin Invest Med* 35:E271.

Rodeck U, Jost M, Kari C, Shih DT, Lavker RM, Ewert DL, *et al.* (1997) EGF-R dependent regulation of keratinocyte survival. *J Cell Sci* 110 (Pt 2):113-121.

Rodolico V, Barresi E, Di Lorenzo R, Leonardi V, Napoli P, Rappa F, *et al.* (2004) Lymph node metastasis in lower lip squamous cell carcinoma in relation to tumour size, histologic variables and p27Kip1 protein expression. *Oral Oncol* 40:92-98.

Ronel DN, Schwager RG, Avram MR (2004) Squamous cell carcinoma of the scalp after radiotherapy for tinea capitis. *Dermatol Surg* 30:446-449.

Roozeboom MH, Lohman BG, Westers-Attema A, Nelemans PJ, Botterweck AA, van Marion AM, *et al.* (2012) Clinical and histological prognostic factors for local recurrence and metastasis of cutaneous squamous cell carcinoma: analysis of a defined population. *Acta Derm Venereol* 93:417-421.

Rosenberg CA, Greenland P, Khandekar J, Loar A, Ascensao J, Lopez AM (2004) Association of nonmelanoma skin cancer with second malignancy. *Cancer* 100:130-138.

Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, Rosenwald S, Spector Y, Zepeniuk M, *et al.* (2008) MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat Biotechnol* 26:462-469.

Ross AS, Whalen FM, Elenitsas R, Xu X, Troxel AB, Schmults CD (2009) Diameter of involved nerves predicts outcomes in cutaneous squamous cell carcinoma with perineural invasion: an investigator-blinded retrospective cohort study. *Dermatol Surg* 35:1859-1866.

Rowe DE, Carroll RJ, Day CL, Jr. (1992) Prognostic factors for local recurrence, metastasis, and survival rates in squamous cell carcinoma of the skin, ear, and lip. Implications for treatment modality selection. *J Am Acad Dermatol* 26:976-990.

Rubin Grandis J, Melhem MF, Barnes EL, Tweardy DJ (1996) Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 78:1284-1292.

Ruegg CP, Graf N, Muhleisen B, Szucs TD, French LE, Surber C, *et al.* (2012) Squamous cell carcinoma of the skin induces considerable sustained cost of care in organ transplant recipients. *J Am Acad Dermatol* 67:1242-1249.

Rundel RD (1983) Promotional effects of ultraviolet radiation on human basal and squamous cell carcinoma. *Photochem Photobiol* 38:569-575.

Saito M, Tucker DK, Kohlhorst D, Niessen CM, Kowalczyk AP (2012) Classical and desmosomal cadherins at a glance. *J Cell Sci* 125:2547-2552.

Salmon PJ, Hussain W, Geisse JK, Grekin RC, Mortimer NJ (2011) Sclerosing squamous cell carcinoma of the skin, an underemphasized locally aggressive variant: a 20-year experience. *Dermatol Surg* 37:664-670.

Salon C, Moro D, Lantuejoul S, Brichon Py P, Drabkin H, Brambilla C, *et al.* (2004) E-cadherin-beta-catenin adhesion complex in neuroendocrine tumors of the lung: a suggested role upon local invasion and metastasis. *Hum Pathol* 35:1148-1155.

Sandhu S, Garzon R (2011) Potential applications of microRNAs in cancer diagnosis, prognosis, and treatment. *Semin Oncol* 38:781-787.

Savage JA, Maize JC, Sr. (2013) Keratoacanthoma clinical behavior: a systematic review. *Am J Dermatopathol* 36:422-429.

Savagner P (2010) The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon. *Ann Oncol* 21 Suppl 7:vii89-92.

Schimanski CC, Bahre R, Gockel I, Muller A, Frerichs K, Horner V, *et al.* (2006) Dissemination of hepatocellular carcinoma is mediated via chemokine receptor CXCR4. *Br J Cancer* 95:210-217.

Schmults CD, Karia PS, Carter JB, Han J, Qureshi AA (2012) Factors predictive of recurrence and death from cutaneous squamous cell carcinoma: a 10-year, single-institution cohort study. *JAMA Dermatol* 149:541-547.

Schmults CD, Karia PS, Carter JB, Han J, Qureshi AA (2013) Factors predictive of recurrence and death from cutaneous squamous cell carcinoma: a 10-year, single-institution cohort study. *JAMA Dermatol* 149:541-547.

Schoof CR, Botelho EL, Izzotti A, Vasques Ldos R (2012) MicroRNAs in cancer treatment and prognosis. *Am J Cancer Res* 2:414-433.

Schreiber MM, Moon TE, Fox SH, Davidson J (1990) The risk of developing subsequent nonmelanoma skin cancers. *J Am Acad Dermatol* 23:1114-1118.

Schulman JM, Fisher DE (2009) Indoor ultraviolet tanning and skin cancer: health risks and opportunities. *Curr Opin Oncol* 21:144-149.

Schulte JH, Marschall T, Martin M, Rosenstiel P, Mestdagh P, Schlierf S, *et al.* (2010) Deep sequencing reveals differential expression of microRNAs in favorable versus unfavorable neuroblastoma. *Nucleic Acids Res* 38:5919-5928.

Schulze K, Schwartz RA, Lambert WC (1984) Erythroplasia of Queyrat. *Am Fam Physician* 29:185-186.

Schwartz RA (1979) The keratoacanthoma: a review. *J Surg Oncol* 12:305-317.

Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 11:426-437.

Sekulic A, Kim SY, Hostetter G, Savage S, Einspahr JG, Prasad A, *et al.* (2010) Loss of inositol polyphosphate 5-phosphatase is an early event in development of cutaneous squamous cell carcinoma. *Cancer Prev Res (Phila)* 3:1277-1283.

Sempere LF, Christensen M, Silahatoglu A, Bak M, Heath CV, Schwartz G, *et al.* (2007) Altered MicroRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer. *Cancer Res* 67:11612-11620.

Serewko MM, Popa C, Dahler AL, Smith L, Strutton GM, Coman W, *et al.* (2002) Alterations in gene expression and activity during squamous cell carcinoma development. *Cancer Res* 62:3759-3765.

Serrano M (1997) The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res* 237:7-13.

Seykora JT, Mei L, Dotto GP, Stein PL (2002) 'Srcasm: a novel Src activating and signaling molecule. *J Biol Chem* 277:2812-2822.

Shamir R, Maron-Katz A, Tanay A, Linhart C, Steinfeld I, Sharan R, *et al.* (2005) EXPANDER--an integrative program suite for microarray data analysis. *BMC Bioinformatics* 6:232.

Shimada Y, Ishii G, Nagai K, Atsumi N, Fujii S, Yamada A, *et al.* (2009) Expression of podoplanin, CD44, and p63 in squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Sci* 100:2054-2059.

Shimizu T, Izumi H, Oga A, Furumoto H, Murakami T, Ofuji R, *et al.* (2001) Epidermal growth factor receptor overexpression and genetic aberrations in metastatic squamous-cell carcinoma of the skin. *Dermatology* 202:203-206.

Shimizu T, Murakami T, Oga A, Furumoto H, Nakano J, Muto M (1999) Prognostic significance of expression of p53 protein and Ki-67 antigen in well-differentiated squamous cell carcinoma of the skin. *J Dermatol* 26:837-840.

Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P (2006) Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 42:717-727.

Sivasankar S (2013) Tuning the kinetics of cadherin adhesion. *J Invest Dermatol* 133:2318-2323.

Slaper H, Velders GJ, Daniel JS, de Gruijl FR, van der Leun JC (1996) Estimates of ozone depletion and skin cancer incidence to examine the Vienna Convention achievements. *Nature* 384:256-258.

Smith A, Teknos TN, Pan Q (2012) Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 49:287-292.

Sobin L, M G, Wittekind C (2009) TNM Classification of malignant tumours. 7th edition.

Soland TM, Brusevold IJ, Koppang HS, Schenck K, Bryne M (2008) Nerve growth factor receptor (p75 NTR) and pattern of invasion predict poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Histopathology* 53:62-72.

Sonkoly E, Loven J, Xu N, Meisgen F, Wei T, Brodin P, *et al.* (2012) MicroRNA-203 functions as a tumor suppressor in basal cell carcinoma. *Oncogenesis* 1:e3.

Sotillo Gago I, Martinez Sahuquillo A, Matilla A, Garcia Perez A (1977) [Spinocellular epithelioma following scleroatrophic autoaneous licher]. *Actas Dermosifiliogr* 68:219-220.

Soufir N, Moles JP, Vilmer C, Moch C, Verola O, Rivet J, *et al.* (1999) P16 UV mutations in human skin epithelial tumors. *Oncogene* 18:5477-5481.

Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ, Krek W (2003) Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature* 425:307-311.

Stankiewicz E, Ng M, Cuzick J, Mesher D, Watkin N, Lam W, *et al.* (2012) The prognostic value of Ki-67 expression in penile squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* 65:534-537.

Stein AL, Tahan SR (1994) Histologic correlates of metastasis in primary invasive squamous cell carcinoma of the lip. *J Cutan Pathol* 21:16-21.

Sterz CM, Kulle C, Dakic B, Makarova G, Bottcher MC, Bette M, *et al.* (2009) A basal-cell-like compartment in head and neck squamous cell carcinomas represents the invasive front of the tumor and is expressing MMP-9. *Oral Oncol* 46:116-122.

Stoler AB, Stenback F, Balmain A (1993) The conversion of mouse skin squamous cell carcinomas to spindle cell carcinomas is a recessive event. *J Cell Biol* 122:1103-1117.

Streilein JW, Taylor JR, Vincek V, Kurimoto I, Richardson J, Tie C, *et al.* (1994) Relationship between ultraviolet radiation-induced immunosuppression and carcinogenesis. *J Invest Dermatol* 103:107S-111S.

Sugiyama M, Bhawal UK, Kawamura M, Ishioka Y, Shigeishi H, Higashikawa K, *et al.* (2007) Human papillomavirus-16 in oral squamous cell carcinoma: clinical correlates and 5-year survival. *Br J Oral Maxillofac Surg* 45:116-122.

Sweeny L, Dean NR, Magnuson JS, Carroll WR, Helman EE, Hyde SO, *et al.* (2011) EGFR expression in advanced head and neck cutaneous squamous cell carcinoma. *Head Neck* 34:681-686.

Syed V, Mak P, Du C, Balaji KC (2008) Beta-catenin mediates alteration in cell proliferation, motility and invasion of prostate cancer cells by differential expression of E-cadherin and protein kinase D1. *J Cell Biochem* 104:82-95.

Syrjanen KJ (1984) Current concepts of human papillomavirus infections in the genital tract and their relationship to intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Obstet Gynecol Surv* 39:252-265.

Syrjanen KJ (1986) Human papillomavirus (HPV) infections of the female genital tract and their associations with intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Pathol Annu* 21 Pt 1:53-89.

Syrjanen SM, Syrjanen KJ, Happonen RP (1988) Human papillomavirus (HPV) DNA sequences in oral precancerous lesions and squamous cell carcinoma demonstrated by in situ hybridization. *J Oral Pathol* 17:273-278.

Takabayashi T, Takahashi N, Okamoto M, Yagi H, Sato M, Fujieda S (2009) Lipopolysaccharides increase the amount of CXCR4, and modulate the morphology and invasive activity of oral cancer cells in a CXCL12-dependent manner. *Oral Oncol* 45:968-973.

Tanaka M, Kitajima Y, Edakuni G, Sato S, Miyazaki K (2002) Abnormal expression of E-cadherin and beta-catenin may be a molecular marker of submucosal invasion and lymph node metastasis in early gastric cancer. *Br J Surg* 89:236-244.

Tanaka N, Odajima T, Ogi K, Ikeda T, Satoh M (2003) Expression of E-cadherin, alpha-catenin, and beta-catenin in the process of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 89:557-563.

Tarin D, Thompson EW, Newgreen DF (2005) The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. *Cancer Res* 65:5996-6000; discussion 6000-5991.

Tavin E, Persky M (1996) Metastatic cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck region. *Laryngoscope* 106:156-158.

Tejera-Vaquerizo A, Lopez-Navarro N, Alcaide-Martin A, Herrera-Acosta E, Herrera-Ceballos E (2010) Correlation of the growth rate of melanoma with the temporal appearance of metastasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 25:366-367.

Tejera-Vaquerizo A, Nagore E, Herrera-Acosta E, Martorell-Calatayud A, Martin-Cuevas P, Traves V, *et al.* (2012a) Prediction of sentinel lymph node positivity by growth rate of cutaneous melanoma. *Arch Dermatol* 148:577-584.

Tejera-Vaquerizo A, Nagore E, Melendez JJ, Lopez-Navarro N, Martorell-Calatayud A, Herrera-Acosta E, *et al.* (2012b) Chronology of metastasis in cutaneous melanoma: growth rate model. *J Invest Dermatol* 132:1215-1221.

Tercedor J, Rodenas JM, Lopez Hernandez B, Herranz MT (1997) [Oral leukoplasia]. *Med Clin (Barc)* 109:358-359.

Tessari G, Girolomoni G (2012) Nonmelanoma skin cancer in solid organ transplant recipients: update on epidemiology, risk factors, and management. *Dermatol Surg* 38:1622-1630.

Thami GP, Kaur S (2003) Genital lichen sclerosus, squamous cell carcinoma and circumcision. *Br J Dermatol* 148:1083-1084.

Thomas DJ, King AR, Peat BG (2003) Excision margins for nonmelanotic skin cancer. *Plast Reconstr Surg* 112:57-63.

To MD, Perez-Losada J, Mao JH, Balmain A (2005) Crosstalk between Pten and Ras signaling pathways in tumor development. *Cell Cycle* 4:1185-1188.

Toll A, Gimeno-Beltran J, Ferrandiz-Pulido C, Masferrer E, Yebenes M, Jucgla A, *et al.* (2012) D2-40 immunohistochemical overexpression in cutaneous squamous cell carcinomas: a marker of metastatic risk. *J Am Acad Dermatol* 67:1310-1318.

Toll A, Masferrer E, Hernandez-Ruiz ME, Ferrandiz-Pulido C, Yebenes M, Jaka A, *et al.* (2013a) Epithelial to mesenchymal transition markers are associated with an increased metastatic risk in primary cutaneous squamous cell carcinomas but are attenuated in lymph node metastases. *J Dermatol Sci.*

Toll A, Masferrer E, Hernandez-Ruiz ME, Ferrandiz-Pulido C, Yebenes M, Jaka A, *et al.* (2013b) Epithelial to mesenchymal transition markers are associated with an increased metastatic risk in primary cutaneous squamous cell carcinomas but are attenuated in lymph node metastases. *J Dermatol Sci* 72:93-102.

Toll A, Salgado R, Yebenes M, Martin-Ezquerro G, Gilaberte M, Baro T, *et al.* (2010) Epidermal growth factor receptor gene numerical aberrations are frequent events in actinic keratoses and invasive cutaneous squamous cell carcinomas. *Exp Dermatol* 19:151-153.

Tralongo V, Rodolico V, Luciani A, Marra G, Daniele E (1999) Prognostic factors in oral squamous cell carcinoma. A review of the literature. *Anticancer Res* 19:3503-3510.

Tran MN, Choi W, Wszolek MF, Navai N, Lee IL, Nitti G, *et al.* (2012) The p63 protein isoform DeltaNp63alpha inhibits epithelial-mesenchymal transition in human bladder cancer cells: role of MIR-205. *J Biol Chem* 288:3275-3288.

Tsuji T (1997) Keratoacanthoma and squamous cell carcinoma: study of PCNA and Le(Y) expression. *J Cutan Pathol* 24:409-415.

Tucci P, Agostini M, Grespi F, Markert EK, Terrinoni A, Vousden KH, *et al.* (2012) Loss of p63 and its microRNA-205 target results in enhanced cell migration and metastasis in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:15312-15317.

Tytor M, Olofsson J, Ledin T, Brunk U, Klintenberg C (1990) Squamous cell carcinoma of the oral cavity. A review of 176 cases with application of malignancy grading and DNA measurements. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 15:235-252.

Uribe P, Gonzalez S (2011) Epidermal growth factor receptor (EGFR) and squamous cell carcinoma of the skin: molecular bases for EGFR-targeted therapy. *Pathol Res Pract* 207:337-342.

van Bockel LW, Verduijn GM, Monnikhof EM, Pameijer FA, Terhaard CH The importance of actual tumor growth rate on disease free survival and overall survival in laryngeal squamous cell carcinoma. *Radiother Oncol* 112:119-124.

van Hogerlinden M, Rozell BL, Ahrlund-Richter L, Toftgard R (1999) Squamous cell carcinomas and increased apoptosis in skin with inhibited Rel/nuclear factor-kappaB signaling. *Cancer Res* 59:3299-3303.

van Kempen LC, van den Hurk K, Lazar V, Michiels S, Winnepenninckx V, Stas M, *et al.* (2012) Loss of microRNA-200a and c, and microRNA-203 expression at the invasive front of primary cutaneous melanoma is associated with increased thickness and disease progression. *Virchows Arch* 461:441-448.

Vasievich EA, Huang L (2011) The suppressive tumor microenvironment: a challenge in cancer immunotherapy. *Mol Pharm* 8:635-641.

Veness MJ (2007) High-risk cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Biomed Biotechnol* 2007:80572.

Veness MJ, Palme CE, Morgan GJ (2006) High-risk cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck: results from 266 treated patients with metastatic lymph node disease. *Cancer* 106:2389-2396.

Veness MJ, Quinn DI, Ong CS, Keogh AM, Macdonald PS, Cooper SG, *et al.* (1999) Aggressive cutaneous malignancies following cardiothoracic transplantation: the Australian experience. *Cancer* 85:1758-1764.

Verburg M, Lang M, Muhlstadt M, Klein A, Schaubert J, Sattler EC, *et al.* (2014) Cutaneous Squamous Cell Carcinoma with Perineural Invasion: Report on Eight Cases and Review of the Literature. *Dermatology*.

Vered M, Allon I, Buchner A, Dayan D (2011a) E-cadherin in oral SCC: an analysis of the confusing literature and new insights related to its immunohistochemical expression. *Histol Histopathol* 27:141-150.

Vered M, Dayan D, Salo T (2011b) The role of the tumour microenvironment in the biology of head and neck cancer: lessons from mobile tongue cancer. *Nat Rev Cancer* 11:382; author reply 382.

Vieira FL, Vieira BJ, Guimaraes MA, Aarestrup FM (2008) Cellular profile of the peritumoral inflammatory infiltrate in squamous cells carcinoma of oral mucosa: Correlation with the expression of Ki67 and histologic grading. *BMC Oral Health* 8:25.

Vinidius de LV, Scapulatempo C, Perpetuo NM, Mohamed F, de Carvalho TS, de Oliveira AT, *et al.* (2011) Prognostic and risk factors in patients with locally advanced cutaneous squamous cell carcinoma of the trunk and extremities. *J Skin Cancer* 2011:420796.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000) Surfing the p53 network. *Nature* 408:307-310.

Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, *et al.* (2006) A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2257-2261.

Vormittag L, Thurnher D, Geleff S, Pammer J, Heiduschka G, Brunner M, *et al.* (2009) 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* 73:913-918.

Vousden KH, Lane DP (2007) p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:275-283.

Vousden KH, Prives C (2009) Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137:413-431.

Wakefield LM, Hill CS (2013) Beyond TGFbeta: roles of other TGFbeta superfamily members in cancer. *Nat Rev Cancer* 13:328-341.

Wang D, Zhang Z, O'Loughlin E, Wang L, Fan X, Lai EC, *et al.* (2013a) MicroRNA-205 controls neonatal expansion of skin stem cells by modulating the PI(3)K pathway. *Nat Cell Biol* 15:1153-1163.

Wang N, Li Q, Feng NH, Cheng G, Guan ZL, Wang Y, *et al.* (2013b) miR-205 is frequently downregulated in prostate cancer and acts as a tumor suppressor by inhibiting tumor growth. *Asian J Androl* 15:735-741.

Wang N, Wu QL, Fang Y, Mai HQ, Zeng MS, Shen GP, *et al.* (2005) Expression of chemokine receptor CXCR4 in nasopharyngeal carcinoma: pattern of expression and correlation with clinical outcome. *J Transl Med* 3:26.

Wang Y, Becker D (1996) Differential expression of the cyclin-dependent kinase inhibitors p16 and p21 in the human melanocytic system. *Oncogene* 12:1069-1075.

Wang Y, Shi J, Chai K, Ying X, Zhou BP (2013c) The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets* 13:963-972.

Weber GF, Ashkar S, Cantor H (1997) Interaction between CD44 and osteopontin as a potential basis for metastasis formation. *Proc Assoc Am Physicians* 109:1-9.

Weedon D, LeBoit P, Burg G, Sarasin S (2005) Pathology and Genetics of Tumours of the Skin. World Health Organization Classification of Tumours

Wei T, Orfanidis K, Xu N, Janson P, Stahle M, Pivarcsi A, *et al.* (2010) The expression of microRNA-203 during human skin morphogenesis. *Exp Dermatol* 19:854-856.

Weinberg AS, Ogle CA, Shim EK (2007) Metastatic cutaneous squamous cell carcinoma: an update. *Dermatol Surg* 33:885-899.

Weinberg J (2012) Overall increasing incidence of nonmelanoma skin cancer. *Rev Recent Clin Trials* 7:1.

Weinstock MA (1993) Nonmelanoma skin cancer mortality in the United States, 1969 through 1988. *Arch Dermatol* 129:1286-1290.

Weinstock MA (1994) Epidemiologic investigation of nonmelanoma skin cancer mortality: the Rhode Island Follow-Back Study. *J Invest Dermatol* 102:6S-9S.

Weinstock MA, Bogaars HA, Ashley M, Litle V, Bilodeau E, Kimmel S (1991) Nonmelanoma skin cancer mortality. A population-based study. *Arch Dermatol* 127:1194-1197.

Werner RN, Sammain A, Erdmann R, Hartmann V, Stockfleth E, Nast A (2013) The natural history of actinic keratosis: a systematic review. *Br J Dermatol* 169:502-518.

Wicki A, Lehenbre F, Wick N, Hantusch B, Kerjaschki D, Christofori G (2006) Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell* 9:261-272.

Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S (2009) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 11:228-234.

Wong CE, Yu JS, Quigley DA, To MD, Jen KY, Huang PY, *et al.* (2013) Inflammation and Hras signaling control epithelial-mesenchymal transition during skin tumor progression. *Genes Dev* 27:670-682.

Wright JR, Jr. (2012) Albert C. Broders' paradigm shifts involving the prognostication and definition of cancer. *Arch Pathol Lab Med* 136:1437-1446.

Xiang F, Lucas R, Hales S, Neale R (2014) Incidence of nonmelanoma skin cancer in relation to ambient UV radiation in white populations, 1978-2012: empirical relationships. *JAMA Dermatol* 150:1063-1071.

Xing L, Todd NW, Yu L, Fang H, Jiang F Early detection of squamous cell lung cancer in sputum by a panel of microRNA markers. *Mod Pathol* 23:1157-1164.

Yadav V, Yanez NC, Fenton SE, Denning MF (2010) Loss of protein kinase C delta gene expression in human squamous cell carcinomas: a laser capture microdissection study. *Am J Pathol* 176:1091-1096.

Yang A, McKeon F (2000) P63 and P73: P53 mimics, menaces and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:199-207.

Yanofsky VR, Mercer SE, Phelps RG (2011) Histopathological variants of cutaneous squamous cell carcinoma: a review. *J Skin Cancer* 2011:210813.

Yarden Y, Pines G (2012) The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer* 12:553-563.

Yi R, Poy MN, Stoffel M, Fuchs E (2008) A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'. *Nature* 452:225-229.

Yoon M, Chougule P, Dufresne R, Wanebo HJ (1992) Localized carcinoma of the external ear is an unrecognized aggressive disease with a high propensity for local regional recurrence. *Am J Surg* 164:574-577.

Yoshinaga S, Hauptmann M, Sigurdson AJ, Doody MM, Freedman DM, Alexander BH, *et al.* (2005) Nonmelanoma skin cancer in relation to ionizing radiation exposure among U.S. radiologic technologists. *Int J Cancer* 115:828-834.

Young AR (2004) Tanning devices--fast track to skin cancer? *Pigment Cell Res* 17:2-9.

Yu HS, Liao WT, Chai CY (2006) Arsenic carcinogenesis in the skin. *J Biomed Sci* 13:657-666.

Yu J, Peng H, Ruan Q, Fatima A, Getsios S, Lavker RM (2010) MicroRNA-205 promotes keratinocyte migration via the lipid phosphatase SHIP2. *FASEB J* 24:3950-3959.

Yu L, Todd NW, Xing L, Xie Y, Zhang H, Liu Z, *et al.* (2011) Early detection of lung adenocarcinoma in sputum by a panel of microRNA markers. *Int J Cancer* 127:2870-2878.

Yu X, Jiang X, Li H, Guo L, Jiang W, Lu SH (2013) miR-203 Inhibits the Proliferation and Self-Renewal of Esophageal Cancer Stem-Like Cells by Suppressing Stem Renewal Factor Bmi-1. *Stem Cells Dev* 23:576-585.

Yuan P, Temam S, El-Naggar A, Zhou X, Liu DD, Lee JJ, *et al.* (2006) Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome. *Cancer* 107:563-569.

Yuan Y, Zeng ZY, Liu XH, Gong DJ, Tao J, Cheng HZ, *et al.* (2011) MicroRNA-203 inhibits cell proliferation by repressing DeltaNp63 expression in human esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 11:57.

Zandi R, Larsen AB, Andersen P, Stockhausen MT, Poulsen HS (2007) Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor. *Cell Signal* 19:2013-2023.

Zavadil J, Bottinger EP (2005) TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 24:5764-5774.

Zawirska A, Adamski Z, Stawicka E, Schwartz RA (2009) Cutaneous squamous cell carcinoma developing in lupus vulgaris exfoliatus persistent for 40 years. *Int J Dermatol* 48:125-127.

Zhang F, Yang Z, Cao M, Xu Y, Li J, Chen X, *et al.* (2013a) MiR-203 suppresses tumor growth and invasion and down-regulates MiR-21 expression through repressing Ran in esophageal cancer. *Cancer Lett* 342:121-129.

Zhang H, Liu J, Yue D, Gao L, Wang D, Wang C (2013b) Clinical significance of E-cadherin, beta-catenin, vimentin and S100A4 expression in completely resected squamous cell lung carcinoma. *J Clin Pathol* 66:937-945.

Zhang JY, Tao S, Kimmel R, Khavari PA (2005) CDK4 regulation by TNFR1 and JNK is required for NF-kappaB-mediated epidermal growth control. *J Cell Biol* 168:561-566.

Zhang X, Gureasko J, Shen K, Cole PA, Kuriyan J (2006) An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* 125:1137-1149.

Zhang Z, Filho MS, Nor JE (2011) The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral Oncol* 48:1-9.

Zhao L, Li W, Marshall C, Griffin T, Hanson M, Hick R, *et al.* (2009) Srcasm inhibits Fyn-induced cutaneous carcinogenesis with modulation of Notch1 and p53. *Cancer Res* 69:9439-9447.

Zheng Z, Pan J, Chu B, Wong YC, Cheung AL, Tsao SW (1999) Downregulation and abnormal expression of E-cadherin and beta-catenin in nasopharyngeal carcinoma: close association with advanced disease stage and lymph node metastasis. *Hum Pathol* 30:458-466.

Zhu X, Er K, Mao C, Yan Q, Xu H, Zhang Y, *et al.* (2013a) miR-203 suppresses tumor growth and angiogenesis by targeting VEGFA in cervical cancer. *Cell Physiol Biochem* 32:64-73.

Zhu X, Zhang F, Zhang W, He J, Zhao Y, Chen X (2013b) Prognostic role of epidermal growth factor receptor in head and neck cancer: a meta-analysis. *J Surg Oncol* 108:387-397.

Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J, *et al.* (1994) Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 372:773-776.

Zilfou JT, Lowe SW (2009) Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a001883.

ÍNDICES DE TABLAS Y FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de los factores de riesgo clínico-patológicos más importantes en el CEC. ...22

Figura 2: Esquema de las características del panel de líneas celulares del modelo DMBA-TPA de CEC.....46

Figura 3: Esquema de la biogénesis de los microRNAs.....48

Figura 4: La relación entre los niveles definidos no es lineal, sino que hay múltiples asociaciones intra-nivel (no representadas) y entre niveles no necesariamente contiguos.....56

Figura 5: Relación entre los objetivos planteados58

Figura 6: (a) CEC asentando en labio inferior; (b) CEC en región temporal izquierda; (c) CEC zona mandibular; (d) CEC en dorso de mano izquierda.....64

Figura 7: CEC en zonas de piel fotoexpuesta con intenso daño actínico65

Figura 8: Distribución del estadio TNM en los pacientes al diagnóstico67

Figura 9: Grado de diferenciación del CEC.75

Figura 10: Patrón de crecimiento en los CEC.....76

Figura 11: CEC bien diferenciado con patrón de crecimiento expansivo.....77

Figura 12: Imagen panorámica de un tumor moderadamente diferenciado con patrón de crecimiento mixto.....77

Figura 13: CEC pobremente diferenciado y con patrón de crecimiento infiltrativo.....78

Figura 14: Distribución de las frecuencias de intensidad del infiltrado inflamatorio.....79

Figura 15: CEC ulcerados.....80

Figura 16: Con una aguja de calibre fino se extrae un molde de parafina del bloque receptor. Empleamos coordenadas específicas medidas con precisión micrométrica.84

Figura 17: Se toma una “biopsia” de la zona marcada en el bloque donante con una aguja de centro hueco y de mayor grosor que la anterior.....85

Figura 18: Introducción del cilindro tomado del bloque tumoral en el hueco que hemos dejado en el bloque donante.....85

Figura 19: Presión con un portaobjetos cada cilindro inducido con el fin de dejarlos todos a la misma altura.....86

Figura 20: Esquema que representa la hibridación in situ de fluorescencia (FISH) para EGFR...91

Figura 21: Expresión de E-CADHERINA en nuestra cohorte de pacientes.....93

Figura 22: Distribución de frecuencias de la intensidad de tinción de VIMENTINA en nuestra cohorte de CEC en función de la diferenciación tumoral.94

Figura 23: Distribución de frecuencias de la intensidad de expresión de P63 en los CEC de nuestra cohorte según las zonas de diferenciación tumoral.95

Figura 24: Expresión de EGFR en el CEC.96

Figura 25: Patrón aberrante de expresión de EGFR97

Figura 26: FISH para EGFR del CEC.98

Figura 27: Características de la expresión de D2-4099

Figura 28: Expresión inmunohistoquímica de D2-40 en los CEC de nuestra serie de pacientes 100

Figura 29: Expresión inmunohistoquímica de CD44 en el CEC: Panel (1)..... 101

Figura 30: Expresión inmunohistoquímica de CD44 en el CEC: Panel (2)..... 102

Figura 31: Distribución de la frecuencia de la intensidad de tinción de P53 en nuestra serie de CEC, según el grado de diferenciación de los tumores. 103

Figura 32: Distribución de las frecuencias de expresión de P16 en nuestra cohorte de CEC según las zonas de diferenciación tumoral. 104

Figura 33: Expresión inmunohistoquímica de CXCR4 en nuestra cohorte de CEC..... 105

Figura 34: Distribución de frecuencias de la intensidad de marcaje de AE-1 frente a citoqueratinas en nuestra serie de CEC, según las zonas de diferenciación tumoral. 106

Figura 35: Distribución de frecuencias de las diferentes proteínas evaluadas en el este grupo “bowenoide”. 112

Figura 36: Representación de las diferentes fases del proceso de carcinogénesis química en el modelo murino, e identificación de las fases de las que derivan parte de las líneas celulares utilizadas. 115

Figura 37: Algoritmo resumen de la metodología de análisis de los miRNA empleada en este trabajo de tesis doctoral. 117

Figura 38: Resumen del proceso de extracción de RNA. 119

Figura 39: (a) Imagen representativa del espectrofotómetro Nanodrop; (b) imagen representativa de una curva de absorbancia de RNA determinada con el Nanodrop. 121

Figura 40: Resumen de los pasos del proceso de hibridación manual de los arrays de expresión. 122

Figura 41: Disposición del array..... 122

Figura 42: Los spots (puntos) blancos representan las muestras estándar, los spot verdes representan otros controles internos para el marcaje con Hy3™ y los spot rojos, las muestras control spike-in..... 123

<i>Figura 43: Imagen de captación de un microarray de miRNAs.</i>	126
<i>Figura 44: Diagrama del proceso de determinación de los miRNA mediante QPCR.....</i>	128
<i>Figura 45: Programa de QPCR para la cuantificación de miRNAs empleado en este trabajo. ...</i>	130
<i>Figura 46: Output de los resultados de una QPCR de miRNAs.</i>	131
<i>Figura 47: Esquema del proceso de hibridación utilizado en la HIS de miRNA.....</i>	132
<i>Figura 48: Diagrama de flujo que representa los distintos niveles de análisis desarrollados en esta tesis doctoral, qué se pretende obtener de ellos y cómo se relacionarán entre sí.</i>	141
<i>Figura 49: Panel superior. Imágenes de H&E que muestran tumores con diferente grado de diferenciación: Panel inferior. Asociaciones entre el grado de diferenciación con otras variables clínico-patológicas en los CEC.....</i>	143
<i>Figura 50: Representación gráfica de las asociaciones del grado de diferenciación con otras variables clínico-patológicasn.....</i>	145
<i>Figura 51: Representación gráfica de la correlación entre el grado de diferenciación y el patrón de crecimiento tumoral.....</i>	146
<i>Figura 52: Relaciones entre el patrón de crecimiento y otras variables clínico patológicas. ...</i>	147
<i>Figura 53: Imagen panorámica de un carcinoma epidermoide con patrón de crecimiento infiltrativo.....</i>	148
<i>Figura 54: Asociaciones entre el patrón de crecimiento tumoral y otras características clínico-patológicas (I).</i>	150
<i>Figura 55: Asociaciones entre el patrón de crecimiento tumoral y otras características clínico-patológicas (II).</i>	151
<i>Figura 56: Asociaciones de la desmoplasia con otras variables clínico-patológicas.....</i>	152
<i>Figura 57: Desmoplasia imagen histopatológica:.....</i>	153
<i>Figura 58: Representación gráfica de las asociaciones entre la desmoplasia y otras variables clínico-patológicas.....</i>	155
<i>Figura 59: Diagrama de puntos de correlación entre el tamaño superficial del tumor y el espesor del mismo.....</i>	156
<i>Figura 60: Representación gráfica de algunas correlaciones del tamaño y el espesor tumorales con otras variables clínico-patológicas.....</i>	157
<i>Figura 61: Asociaciones del espesor y el tamaño con otras variables clínico-patológicas. Figura obtenida mediante Cytoscape®.....</i>	158
<i>Figura 62: Representación gráfica de algunas asociaciones entre la ulceración y otras variables clínico-patológicas.....</i>	160

Figura 63: Relación de la presencia de ulceración con otras variables clínico-patológicas del CEC	161
Figura 64: Infiltración perineural	162
Figura 65: Representación gráfica de algunas asociaciones de la infiltración perineural con otras variables clínico-patológicas.....	164
Figura 66: Imagen representativa de infiltración linfovascular y perineural.	165
Figura 67: Representaciones de algunas asociaciones entre la infiltración linfovascular y otras variables clínico-patológicas	167
Figura 68: Relación entre la infiltración perineural, la infiltración linfovascular y el resto de variables clínico-patológicas evaluadas.....	168
Figura 69: Representaciones de las asociaciones de los infiltrados inflamatorios en relación con el grado de diferenciación del tumor.....	171
Figura 70; Representaciones de las asociaciones de los infiltrados inflamatorios en relación con el patrón de crecimiento tumoral.....	172
Figura 71: Relación entre los infiltrados inflamatorios y el resto de variables clínico-patológicas evaluadas	173
Figura 72: Relaciones más importantes entre la velocidad de crecimiento, el tiempo hasta el diagnóstico del tumor y el resto de las variables.....	176
Figura 73: Variables clínico-patológicas relacionadas con un mayor riesgo de eventos de mala evolución clínica considerados de forma global durante el seguimiento (I).....	178
Figura 74: Variables clínico-patológicas relacionadas con un mayor riesgo de eventos de mala evolución clínica, considerados de forma global, durante el seguimiento (II).	179
Figura 75: Variables clínico-patológicas relacionadas con el desarrollo de eventos de mala evolución clínica durante el seguimiento.....	180
Figura 76: Carcinoma epidermoide en mujer anciana.....	181
Figura 77: Recidiva de CEC.	182
Figura 78: Relación entre variables clínico-patológicas y un mayor riesgo de recidiva (I) local en el CEC.	183
Figura 79: Relación entre variables clínico patológicas y un mayor riesgo de recidiva local en el CEC (II).....	184
Figura 80: Variables clínico-patológicas relacionadas con el desarrollo de recidiva local.	185
Figura 81: Carcinoma epidermoide cutáneo con metástasis ganglionares.....	186
Figura 82: Variables clínico-patológicas relacionadas con un mayor riesgo de metástasis ganglionares.....	187

Figura 83: Variables clínico-patológicas relacionadas con el desarrollo de metástasis ganglionares..... 188

Figura 84: Variables clínico-patológicas asociadas a un mayor riesgo de progresión del TNM durante el seguimiento..... 190

Figura 85: Variables clínico-patológicas relacionadas con la progresión del TNM durante el seguimiento..... 191

Figura 86: Red que muestra las asociaciones entre variables clínico-patológicas-evolutivas. . 196

Figura 87: Recidiva local de un CEC en una mujer:..... 199

Figura 88: CEC asociado a metástasis ganglionares. 201

Figura 89: Asociación de la Inmunosupresión con el tiempo hasta el desarrollo de un evento de mala evolución clínica..... 210

Figura 90: Curva de Kaplan-Meier que muestra las diferencias en el intervalo libre de enfermedad (tiempo hasta el desarrollo de cualquier evento) en función de la velocidad de crecimiento..... 211

Figura 91: Asociación entre el infiltrado inflamatorio intratumoral y el tiempo hasta la afectación ganglionar (meses)..... 212

Figura 92: Curva de Kaplan-Meier que muestra las diferencias en la latencia hasta el desarrollo de metástasis ganglionares en función de la velocidad de crecimiento..... 213

Figura 93: Asociaciones entre la expresión de E-CADHERINA y otras proteínas estudiadas en nuestra cohorte de CEC..... 216

Figura 94: Representación gráfica de algunas asociaciones entre la expresión de VIMENTINA y otras proteínas..... 217

Figura 95: Algunas asociaciones entre la P63 y otras proteínas estudiadas en este trabajo ... 219

Figura 96: Asociaciones entre la expresión de CD44 y otras proteínas estudiadas en nuestra cohorte de CEC..... 221

Figura 97: Asociaciones entre la expresión de EGFR y la de otras proteínas estudiadas en nuestra cohorte de CEC..... 224

Figura 98: La intensidad de la expresión de EGFR se relacionó con los hallazgos encontrados por FISH..... 225

Figura 99: Imagen FISH para EGFR en CEC..... 225

Figura 100: Representación de la relación entre los niveles de expresión de KI-67 y la expresión de otras proteínas en el CEC..... 227

Figura 101: Red que muestra las asociaciones entre la expresión de las proteínas evaluadas. 231

Figura 102: Relaciones del grado de diferenciación con marcadores proteicos..... 234

<i>Figura 103: La infiltración linfovascular fue más frecuente cuando se expresó.....</i>	<i>235</i>
<i>Figura 104: Red que muestra las asociaciones entre variables clínico-patológicas-evolutivas y la expresión de las proteínas analizadas.....</i>	<i>240</i>
<i>Figura 105: Tiempo hasta el desarrollo de cualquier evento de mala evolución clínica y expresión de D2-40 en el CEC.....</i>	<i>243</i>
<i>Figura 106: Tiempo hasta el desarrollo de metástasis ganglionares y expresión media de D2-40.....</i>	<i>244</i>
<i>Figura 107: Heatmap que muestra la clasificación de las líneas celulares que representan distintas fases de progresión del cáncer de piel, mediante clúster no supervisado en función de la ratio de expresión maligno escamoso / maligno fusiforme con 34 miRNA diferenciales.</i>	<i>248</i>
<i>Figura 108: Heatmap donde se muestra la clasificación de las líneas celulares de origen murino que representan distintas fases de progresión del cáncer de piel, mediante clúster no supervisado.....</i>	<i>250</i>
<i>Figura 109: Validación de la expresión de miR-205 y miR-203 mediante QPCR en las líneas celular.</i>	<i>254</i>
<i>Figura 110: Gráfico de frecuencias de intensidad de expresión de miR-203 en las diferentes áreas de los tumores de nuestra serie.</i>	<i>256</i>
<i>Figura 111: Gráfico de frecuencias de intensidad de expresión de miR-205 en las diferentes áreas de los tumores de nuestra serie.</i>	<i>257</i>
<i>Figura 112: Tinción de miRNA-205 y miRNA-203 en piel normal adyacente al tumor.....</i>	<i>258</i>
<i>Figura 113: Relación entre los niveles de miR-203 y miR-205.</i>	<i>259</i>
<i>Figura 114: Asociación entre la expresión global de miR-205 y el desarrollo de recidiva local durante el seguimiento.</i>	<i>260</i>
<i>Figura 115: Asociaciones entre la expresión global de miR-205 y algunas variables clínico-patológicas.</i>	<i>261</i>
<i>Figura 116: Asociaciones entre la expresión del miR-203 y algunas variables clínico-patológicas (I).</i>	<i>263</i>
<i>Figura 117: Asociaciones entre la expresión del miR-203 y algunas variables clínico-patológicas (II)</i>	<i>264</i>
<i>Figura 118: Asociación entre la expresión de miR-205 y la de P63.</i>	<i>265</i>
<i>Figura 119: Asociación entre la expresión de E-CADHERINA y la de miR-205.....</i>	<i>265</i>
<i>Figura 120: Asociación entre la expresión de miRNA-203 y la de P63.</i>	<i>266</i>
<i>Figura 121: Asociación entre la expresión de los miRNA-205 y miRNA-203 con la expresión de CD44</i>	<i>266</i>

Figura 122: Tinción de miRNA-203 y de miRNA-205 en un tumor bien diferenciado..... 269

Figura 123: Red que muestra las asociaciones entre variables clínico-patológicas-evolutivas y las proteínas analizadas..... 270

Figura 124: Gráfico de latencia hasta la recidiva local del CEC en relación con la expresión media de miR-203 271

Figura 125: Relación entre la expresión de miR-205 cuantificada mediante QPCR y otras moléculas en el CEC..... 275

Figura 126 Asociación entre la expresión del miR-203 determinada por QPCR y la expresión de E-CADHERINA..... 276

Figura 127: Biplot logístico bidimensional. 280

Figura 128: Predictibilidad de la expresión del miR-203 según el modelo derivado del biplot bidimensional..... 281

Figura 129: Predictibilidad de la expresión de miRNA-205 según el modelo obtenido del Biplot bidimensional. 281

Figura 130: Biplot logístico tridimensional..... 282

Figura 131: Red que muestra las asociaciones más importantes entre variables analizadas en el CEC..... 283

Figura 132: Enfermedad de Bowen y carcinoma bowenoide: 285

Figura 133: Histopatología de la enfermedad de Bowen..... 284

Figura 134: Carcinoma bowenoide y enfermedad de Bowen..... 285

Figura 135: Histopatología del carcinoma bowenoide..... 285

Figura 136: Inmunohistoquímica en el carcinoma bowenoide..... 287

Figura 137: Expresión del miRNA-203 en la enfermedad de Bowen..... 288

Figura 138: Expresión de miRNA-203 y miRNA-205 en el carcinoma bowenoide..... 289

Figura 139: Predicción de la expresión de miRNA-205. 448

Figura 140: Biplot logístico bidimensional en que se visualizan las direcciones de las variables y las proyecciones del cluster 1..... 449

Figura 141: Invasión perineural de carcinoma epidermoide cutáneo..... 450

Figura 142: Carcinoma epidermoide infiltrativo de rápido crecimiento..... 450

Figura 143: Carcinoma epidermoide en paciente inmunosuprimida..... 450

Figura 144: Carcinoma epidermoide de gran tamaño en el dorso de la mano..... 451

Figura 145 Expresión de miRNA-205 en un CEC moderadamente diferenciado..... 451

Figura 146: Expresión de marcadores proteicos y proliferativos en un CEC bien diferenciado y en un CEC indiferenciado (tipo fusocelular)..... 452

Figura 147: Histopatología del carcinoma bowenoide..... 453

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Estadio TNM según la séptima edición de la AJCC.27

Tabla 2: Estadiaje según la séptima edición de la AJCC.....28

Tabla 3: Comparación del estadio T del CEC según la séptima edición de la AJCC y la clasificación alternativa del BWH.....28

Tabla 4: Tabla que releja los estudios sobre mortalidad en CEC29

Tabla 5: Resumen de características clínico-epidemiológicas y evolutivas de la serie de carcinoma epidermoide cutáneo.....66

Tabla 6: Resumen de características clínico-epidemiológicas y evolutivas.....68

Tabla 7: Descripción de la muestra de casos de enfermedad de Bowen y "carcinomas bowenoide" de nuestra cohorte.....70

Tabla 8: Distribución de frecuencias de la celularidad predominante en los infiltrados inflamatorios peritumoral e intratumoral.....80

Tabla 9: Resumen de características histopatológicas de la serie de carcinoma epidermoide cutáneo.81

Tabla 10: Variables histopatológicas de la muestra de CEC en los que la validación de la expresión de miRNAs se realizó por QPCR y por HIS.....82

Tabla 11: Anticuerpos utilizados en la inmunohistoquímica, con su dilución, casa comercial y clon.88

Tabla 12: Distribución de frecuencias de expresión del patrón de expresión de EGFR, tanto aberrante como no aberrante, en la serie de CEC estudiada. Se incluyen la expresión en las zonas diferenciadas, indiferenciadas y la expresión media.98

Tabla 13: Distribución de frecuencias, según las zonas de diferenciación tumoral, de la intensidad de tinción de las distintas moléculas evaluadas por inmunohistoquímica convencional en este estudio.....108

Tabla 14: Distribución de frecuencias de la expresión de las proteínas analizadas en este trabajo a nivel global en la sub-cohorte de tumores en los que la validación de la expresión de miRNAs se realizó tanto por QPCR como por hibridación in situ.109

Tabla 15: Resumen de la distribución de frecuencias de las tinciones por inmunohistoquímica evaluadas en el grupo de enfermedad de Bowen y "carcinoma bowenoide".....111

Tabla 16: Características de las líneas celulares de origen murino que reproducen las diferentes fases de la carcinogénesis del CEC en las que se analizó la expresión diferencial de miRNAs. .114

Tabla 17: Reactivos y cantidades de los mismos utilizados en la reacción 1 del proceso de marcaje previo a la hibridación.....123

<i>Tabla 18: Reactivos y cantidades de los mismos utilizados en la reacción de marcaje previo a la hibridación, en la reacción 2.....</i>	124
<i>Tabla 19: Reactivos y cantidades empleados en el proceso de síntesis de cDNA.....</i>	128
<i>Tabla 20: Reactivos y cantidades de los mismos empleados en la realización de la QPCR</i>	129
<i>Tabla 21: Relación del grado de diferenciación y el resto de variables clínico-patológicas.....</i>	144
<i>Tabla 22: Asociaciones entre el patrón de crecimiento y el resto de variables clínico-patológicas.</i>	149
<i>Tabla 23: Asociaciones entre la desmoplasia y el resto de variables clínico-patológicas.....</i>	154
<i>Tabla 24: Relación entre la ulceración y las variables clínico-patológicas.....</i>	159
<i>Tabla 25: Asociaciones entre la infiltración perineural y el resto de las variables clínico-patológicas.</i>	163
<i>Tabla 26: Asociación de la infiltración linfovascular y las variables clínico-patológicas.</i>	166
<i>Tabla 27: Relación entre la intensidad de los infiltrados inflamatorios peri- e intratumorales y las diversas variables clínico-patológicas.....</i>	170
<i>Tabla 28: Asociaciones de la velocidad de crecimiento de los tumores y del tiempo hasta el diagnóstico de CEC en nuestra cohorte</i>	175
<i>Tabla 29: Relación de los eventos de mal pronóstico en el CEC (recidiva local, progresión ganglionary y metástasis a distancia) con parámetros clínico-patológicos.</i>	193
<i>Tabla 30 : Resumen de resultados estadísticamente significativos (rojo) y/o con tendencia estadística (azul) en las comparaciones de variables clínico-patológicas en nuestra serie de CEC.....</i>	195
<i>Tabla 31: Variables clínico-patológicas incluidas en el modelo de predicción de eventos de mala evolución clínica</i>	198
<i>Tabla 32: Variables clínico-patológicas predictoras independientes del desarrollo de recidiva local en el CEC.</i>	199
<i>Tabla 33: Variables clínico-patológicas que explicaron el riesgo de progresión ganglionar de manera independiente.....</i>	200
<i>Tabla 34: Variables clínico-patológicas que, de una manera independiente, definieron el riesgo de progresión del TNM durante el seguimiento en el CEC.....</i>	202
<i>Tabla 35: Variables que predijeron el desarrollo de eventos de mala evolución clínica considerados de forma global en el CEC cuando incluimos los infiltrados inflamatorios dentro de las variables predictoras</i>	203
<i>Tabla 36: Variables clínico-patológicas que definieron de manera independiente el riesgo de desarrollar metástasis ganglionares cuando se incluyeron los infiltrados inflamatorios dentro de las variables predictoras.....</i>	204
<i>Tabla 37: Variables que explicaron de manera independiente la progresión del TNM cuando se incluyeron los infiltrados inflamatorios dentro de las variables predictoras.</i>	205
<i>Tabla 38: Sistema de estadiaje que mejor explicó el desarrollo de eventos de mala evolución clínica considerados de forma global durante el seguimiento</i>	207
<i>Tabla 39: Sistema de estadiaje que mejor definió el riesgo de recidiva local durante el seguimiento.....</i>	207

<i>Tabla 40: Sistema de estadiaje que mejor explicó el desarrollo de metástasis ganglionares en el CEC.....</i>	<i>208</i>
<i>Tabla 41: Sistemas de estadiaje que mejor definieron la progresión del estadio TNM durante el seguimiento de los pacientes con CEC.....</i>	<i>209</i>
<i>Tabla 42: Resumen de resultados estadísticamente significativos de variables relacionadas con el tiempo de latencia hasta un evento de mala evolución clínica.....</i>	<i>213</i>
<i>Tabla 43: Variables asociadas de manera independiente a la reducción del tiempo hasta la progresión ganglionar (regresión de Cox).....</i>	<i>214</i>
<i>Tabla 44: Relaciones entre la expresión de E-CADHERINA y otros marcadores moleculares en el CEC.....</i>	<i>215</i>
<i>Tabla 45: Relaciones entre la expresión de VIMENTINA y la de otros marcadores en el CEC. ...</i>	<i>217</i>
<i>Tabla 46: Relaciones entre la expresión de P63 y otros marcadores en el CEC.....</i>	<i>218</i>
<i>Tabla 47: Relaciones entre la expresión de CD44 y la de otras proteínas.....</i>	<i>220</i>
<i>Tabla 48: Relación entre los niveles de expresión de CXCR4 y los de otras proteínas.</i>	<i>222</i>
<i>Tabla 49: Relación entre la expresión de EGFR y la de otras proteínas.....</i>	<i>223</i>
<i>Tabla 50: Relación entre la expresión de D2-40 y otras proteínas en el CEC.</i>	<i>226</i>
<i>Tabla 51: Diferencias en la expresión de los diferentes marcadores proteicos entre las zonas diferenciada e indiferenciada de los tumores.....</i>	<i>229</i>
<i>Tabla 52: Resumen de resultados estadísticamente significativos (rojo) y de asociaciones sólo con tendencia estadística (azul) en las comparaciones de la expresión de diferentes proteínas en nuestra serie de CEC.,.....</i>	<i>230</i>
<i>Tabla 53: Relación entre las proteínas analizadas y las variables clínico-patológicas en el CEC.</i>	<i>233</i>
<i>Tabla 54: Relación entre las proteínas evaluadas en el estudio y las variables evolutivas en el CEC.....</i>	<i>237</i>
<i>Tabla 55: Relaciones entre variables clínico-patológicos, evolutivas, y moleculares.....</i>	<i>239</i>
<i>Tabla 56: Variables clínico-patológicas y moleculares que demostraron de manera independiente asociarse a un mayor riesgo de metástasis ganglionares en el CEC.....</i>	<i>241</i>
<i>Tabla 57: Variables clínico-patológicas y moleculares que demostraron de manera independiente su asociación a un mayor riesgo de progresión del estadio TNM durante el seguimiento clínico.</i>	<i>242</i>
<i>Tabla 58: Latencia hasta el desarrollo de eventos de mala evolución clínica considerados de forma global y de metástasis ganglionares en función de la expresión de D2-40.....</i>	<i>244</i>
<i>Tabla 59: Resumen de la regresión de Cox para predecir el desarrollo de eventos de mala evolución clínica considerados de forma global y, específicamente, la recidiva local y la progresión ganglionar en función de las variables clínico-patológicas y moleculares evaluadas en nuestro estudio.....</i>	<i>246</i>
<i>Tabla 60: Datos de los microarrays de miRNAs correspondientes al heatmap de la figura anterior. MiRNAs diferencialmente expresados entre las líneas celulares de CEC con fenotipo escamoso y fusiforme.</i>	<i>249</i>

Tabla 61: Datos de los microarrays de los 44 miRNAs que están representados gráficamente en el anterior heatmap. MiRNAs diferencialmente expresados entre las líneas celulares de CEC con fenotipo benigno y maligno..... 252

Tabla 62: Distribución de frecuencias de la intensidad de expresión para el miR-203 en nuestra serie de CEC. 255

Tabla 63: Distribución de frecuencias de la intensidad de expresión para el miR-205 en nuestra serie de CEC 257

Tabla 64: Relación entre los niveles de expresión global de miR-203 y miR-205, y las variables clínico-patológicas y moleculares evaluadas..... 267

Tabla 65: Relación entre los niveles de expresión de miR-203 y miR-205 en el frente de invasión y las variables clínico-patológicas..... 268

Tabla 66: Resumen de los niveles de expresión de miRNAs en la serie de tumores que fueron evaluados mediante QPCR y ISH. 272

Tabla 67: Tabla que resume las tendencias más importantes encontradas a partir del análisis de la expresión de miR-205 y miR-203 por QPCR..... 274

Tabla 68: Resumen de las características de los clústeres identificados en el estudio..... 279

Tabla 69: Tabla que muestra las diferencias más significativas entre los grupos de CEC típico y bowenoide encontradas en nuestro estudio.. 291

Tabla 70: Datos numéricos de los micro-arrays de miRNAs..... 447

ANEXOS

ANEXO DE TABLAS

Resultados de expresión diferencial de miRNAs de los micro-arrays.

Nº	Name	M/B	Esc/Fus	Esc mal/Fus
1	hsa-let-7a*/mmu-let-7a*/mmu-let-7c-2*	1,047654134	0,967348162	0,992641429
2	hsa-let-7a/mmu-let-7a/rno-let-7a	1,069652204	1,00608307	1,082105435
3	hsa-let-7b*/mmu-let-7b*/rno-let-7b*	1,05441804	0,954078299	0,976133116
4	hsa-let-7b/mmu-let-7b/rno-let-7b	1,065168195	0,927084961	0,939226067
5	hsa-let-7c/mmu-let-7c/rno-let-7c	1,100974606	0,908639292	0,939670376
6	hsa-let-7d*/mmu-let-7d*/rno-let-7d*	1,025356872	0,987013134	1,004270738
7	hsa-let-7d/mmu-let-7d/rno-let-7d	1,081813456	0,937312132	0,972829308
8	hsa-let-7e/mmu-let-7e/rno-let-7e	1,191758164	0,890837875	0,984363043
9	hsa-let-7f-1*/mmu-let-7f*	1,014147447	0,980062575	0,980671784
10	hsa-let-7f/mmu-let-7f/rno-let-7f	1,080817117	0,95207343	0,997899161
11	hsa-let-7g*/mmu-let-7g*	0,83936603	1,139134299	1,031329595
12	hsa-let-7g/mmu-let-7g	1,060575448	0,951235492	0,977132572
13	hsa-let-7i*/mmu-let-7i*/rno-let-7i*	0,980228307	1,017715756	1,008695976
14	hsa-let-7i/mmu-let-7i/rno-let-7i	1,085515416	0,921089919	0,947658612

15	hsa-miR-1/mmu-miR-1	1,079275335	0,952543839	0,997274042
16	hsa-miR-100/mmu-miR-100/rno-miR-100	0,998489052	1,002508324	1,002677214
17	hsa-miR-101*/mmu-miR-101a*/rno-miR-101a*	1,020118694	0,981790853	0,989843405
18	hsa-miR-101/mmu-miR-101a/rno-miR-101 ^a	1,059507926	0,956717555	0,985691972
19	hsa-miR-103/mmu-miR-103/rno-miR-103	1,003258504	1,045448421	1,081486015
20	hsa-miR-106b*/mmu-miR-106b*/rno-miR-106b*	1,039642393	0,967020432	0,984101515
21	hsa-miR-106b/mmu-miR-106b/rno-miR-106b	1,026306364	1,121179266	1,2373718
22	hsa-miR-107/mmu-miR-107/rno-miR-107	1,060862848	0,947732155	0,971278502
23	hsa-miR-10a*/mmu-miR-10a*/rno-miR-10a-3p	1,004786045	1,000209379	1,005471724
24	hsa-miR-10a/mmu-miR-10a/rno-miR-10a-5p	1,021553281	1,020009392	1,057339455
25	hsa-miR-10b*/mmu-miR-10b*	0,99730526	0,997346578	0,99256343
26	hsa-miR-10b/mmu-miR-10b/rno-miR-10b	1,062880224	0,966349006	1,005821528
27	hsa-miR-122/mmu-miR-122/rno-miR-122	0,958420489	1,025255269	0,996861197
28	hsa-miR-124*/mmu-miR-124*/rno-miR-124*	0,975222596	1,022472202	1,011200442
29	hsa-miR-124/mmu-miR-124/rno-miR-124	1,036908477	0,942860717	0,93941396
30	hsa-miR-125a-3p/mmu-miR-125a-3p/rno-miR-125a-3p	1,060960665	0,978004632	1,024355578
31	hsa-miR-125a-5p/mmu-miR-125a-5p/rno-miR-125a-5p	1,052493331	1,014426933	1,079587269
32	hsa-miR-125b-1*/mmu-miR-125b-3p/rno-miR-125b-3p	1,108618258	0,891825272	0,916614371
33	hsa-miR-125b/mmu-miR-125b-5p/rno-miR-125b-5p	1,249606619	0,837512455	0,930508368
34	hsa-miR-126*/mmu-miR-126-5p/rno-miR-126*	0,993791942	1,002747209	0,998020876
35	hsa-miR-126/mmu-miR-126-3p/rno-miR-126	0,992559272	1,018484736	1,023592981
36	hsa-miR-127-3p/mmu-miR-127/rno-miR-127	1,0001372	0,991892675	0,986248034
37	hsa-miR-127-5p/mmu-miR-127*	0,996132169	0,996890188	0,990521841
38	hsa-miR-128a/hsa-miR-128b/mmu-miR-128a/mmu-miR-128b/rno-miR-128a/rno-miR-	0,993280581	1,002937526	0,99779301

	128b			
39	hsa-miR-129-3p/mmu-miR-129-3p/rno-miR-129*	1,035251807	0,932461456	0,919727099
40	hsa-miR-129-5p/mmu-miR-129-5p/rno-miR-129	1,009395166	0,982719844	0,980283891
41	hsa-miR-130a/mmu-miR-130a/rno-miR-130 ^a	1,070328806	0,990773428	1,055895797
42	hsa-miR-130b*/mmu-miR-130b*	1,009132658	0,996847674	1,004306368
43	hsa-miR-130b/mmu-miR-130b/rno-miR-130b	0,986787948	0,983178414	0,9570232
44	hsa-miR-132/mmu-miR-132/rno-miR-132	1,042569879	0,996200261	1,037785405
45	hsa-miR-133a/mmu-miR-133a/rno-miR-133 ^a	1,002086167	0,989053246	0,983452359
46	hsa-miR-133b/mmu-miR-133b/rno-miR-133b	0,982627709	1,009157445	0,996776591
47	hsa-miR-134/mmu-miR-134/rno-miR-134	1,020459002	0,983384736	0,99294707
48	hsa-miR-135a*/mmu-miR-135a*	1,001419284	1,006196972	1,012148035
49	hsa-miR-135a/mmu-miR-135a/rno-miR-135 ^a	0,9853985	1,013349844	1,006972267
50	hsa-miR-135b/mmu-miR-135b/rno-miR-135b	0,999299573	1,054350082	1,092397457
51	hsa-miR-136*/mmu-miR-136*/rno-miR-136*	0,989423038	1,000107056	0,988772784
52	hsa-miR-136/mmu-miR-136/rno-miR-136	1,004679981	0,995384771	0,99707422
53	hsa-miR-137/mmu-miR-137/rno-miR-137	0,998294928	0,996027465	0,991365224
54	hsa-miR-138-1*/mmu-miR-138*/rno-miR-138*	1,11470725	0,895185301	0,927922444
55	hsa-miR-138/mmu-miR-138/rno-miR-138	1,053499092	0,964341639	0,993156862
56	hsa-miR-139-3p/mmu-miR-139-3p/rno-miR-139-3p	0,957345957	1,022776442	0,991444532
57	hsa-miR-139-5p/mmu-miR-139-5p/rno-miR-139-5p	1,001978293	1,017706199	1,032491811
58	hsa-miR-140-3p/mmu-miR-140*/rno-miR-140*	0,963070533	1,014554566	0,984084133
59	hsa-miR-140-5p/mmu-miR-140/rno-miR-140	0,941864002	1,000639586	0,936365916
60	hsa-miR-141/mmu-miR-141/rno-miR-141	0,80315814	1,310797067	1,248456624
61	hsa-miR-142-3p/mmu-miR-142-3p/rno-miR-142-3p	1,207526339	0,871189041	0,960918943

62	hsa-miR-142-5p/mmu-miR-142-5p/rno-miR-142-5p	1,15115594	0,90831349	0,982698879
63	hsa-miR-143/mmu-miR-143/rno-miR-143	1,133912002	0,820495117	0,810831542
64	hsa-miR-144/mmu-miR-144/rno-miR-144	0,990515132	1,006817778	1,001423083
65	hsa-miR-145*/mmu-miR-145*	1,079161056	0,937016241	0,969831331
66	hsa-miR-145/mmu-miR-145/rno-miR-145	1,062560107	0,91216737	0,910632871
67	hsa-miR-146a/mmu-miR-146a/rno-miR-146 ^a	1,034561363	1,054475029	1,130738582
68	hsa-miR-146b-5p/mmu-miR-146b	1,020777432	1,053402555	1,114185719
69	hsa-miR-147b/mmu-miR-147/rno-miR-147	1,01434902	1,003046192	1,020481991
70	hsa-miR-148a*/mmu-miR-148a*	1,018860736	0,965924659	0,961162212
71	hsa-miR-148a/mmu-miR-148 ^a	0,96249759	1,059500443	1,059427039
72	hsa-miR-148b/mmu-miR-148b/rno-miR-148b-3p	1,019785541	0,990475905	1,004491604
73	hsa-miR-149/mmu-miR-149	1,085036418	0,928356444	0,960033765
74	hsa-miR-150*/mmu-miR-150*	1,029538427	0,931489639	0,912396308
75	hsa-miR-150/mmu-miR-150/rno-miR-150	1,030731497	0,968546882	0,977788746
76	hsa-miR-151-5p/mmu-miR-151-5p/rno-miR-151	1,044765268	0,975734829	1,004377264
77	hsa-miR-152/mmu-miR-152/rno-miR-152	1,028724858	0,95809208	0,957652812
78	hsa-miR-153/mmu-miR-153/rno-miR-153	0,98109719	1,01182612	0,999632651
79	hsa-miR-154*/mmu-miR-154*	0,995629437	1,016089759	1,022843329
80	hsa-miR-154/mmu-miR-154/rno-miR-154	1,072324653	0,951568298	0,988972817
81	hsa-miR-15a/mmu-miR-15 ^a	1,082700425	0,938767067	0,976219985
82	hsa-miR-15b*/mmu-miR-15b*	1,010253366	0,993438443	0,999624508
83	hsa-miR-15b/mmu-miR-15b/rno-miR-15b	1,130823221	0,935857851	1,014597086
84	hsa-miR-16/mmu-miR-16/rno-miR-16	1,039611357	1,062221036	1,149522985
85	hsa-miR-17/mmu-miR-17/rno-miR-17-5p/rno-miR-17	1,075394491	0,977108931	1,036795938

86	hsa-miR-181a*/mmu-miR-181a-1*/rno-miR-181a*	0,974710234	1,002458011	0,976631066
87	hsa-miR-181a/mmu-miR-181a/rno-miR-181 ^a	1,075734636	0,861648352	0,834085499
88	hsa-miR-181b/mmu-miR-181b/rno-miR-181b	1,072678331	0,902202595	0,902583692
89	hsa-miR-181c/mmu-miR-181c/rno-miR-181c	1,012881553	1,003978322	1,02053941
90	hsa-miR-181d/mmu-miR-181d/rno-miR-181d	1,061222378	0,978768814	1,025949516
91	hsa-miR-182/mmu-miR-182/rno-miR-182	1,01258863	1,084683808	1,159199229
92	hsa-miR-183*/mmu-miR-183*	0,976778744	1,051666552	1,062568601
93	hsa-miR-183/mmu-miR-183/rno-miR-183	0,993336553	1,106444526	1,174870083
94	hsa-miR-184/mmu-miR-184/rno-miR-184	1,069979056	0,922607867	0,93590449
95	hsa-miR-185/mmu-miR-185/rno-miR-185	0,964434135	1,021504116	0,997387067
96	hsa-miR-186/mmu-miR-186/rno-miR-186	1,05095149	0,980621683	1,019054193
97	hsa-miR-187/mmu-miR-187/rno-miR-187	1,016159541	0,980460899	0,983448855
98	hsa-miR-188-3p/mmu-miR-188-3p	1,010609805	0,999615312	1,010628692
99	hsa-miR-188-5p/mmu-miR-188-5p/rno-miR-188	0,995450721	1,007141032	1,007333297
100	hsa-miR-18a*/mmu-miR-18a*	0,947634935	1,039710941	1,008698492
101	hsa-miR-18a/mmu-miR-18a/rno-miR-18 ^a	1,010707996	1,068904991	1,129965906
102	hsa-miR-190/mmu-miR-190/rno-miR-190	0,988790389	0,992312228	0,974776632
103	hsa-miR-190b/mmu-miR-190b	1,025091074	0,99992947	1,026334576
104	hsa-miR-191/mmu-miR-191/rno-miR-191	1,095456648	0,950016252	1,007923021
105	hsa-miR-192/mmu-miR-192/rno-miR-192	0,989456438	1,014915235	1,014098271
106	hsa-miR-193a-3p/mmu-miR-193/rno-miR-193	1,169832726	0,952299935	1,077809511
107	hsa-miR-194/mmu-miR-194/rno-miR-194	0,92650402	1,031819392	0,970394005
108	hsa-miR-195/mmu-miR-195/rno-miR-195	1,074969796	0,932049173	0,957168874
109	hsa-miR-196a*/mmu-miR-196a*/rno-miR-196a*	1,026233251	0,974314653	0,983203194

110	hsa-miR-196a/mmu-miR-196a/rno-miR-196 ^a	0,986709257	0,994604934	0,976432796
111	hsa-miR-196b/mmu-miR-196b/rno-miR-196b	1,00672455	0,972731383	0,960315878
112	hsa-miR-197/mmu-miR-197	1,010761484	0,976591683	0,97116923
113	hsa-miR-199a-3p/hsa-miR-199b-3p/mmu-miR-199a-3p/mmu-miR-199b/rno-miR-199a-3p	1,098417628	0,85306761	0,838962145
114	hsa-miR-199a-5p/mmu-miR-199a-5p/rno-miR-199a-5p	1,048670246	0,895340337	0,868124016
115	hsa-miR-19a*/mmu-miR-19a*	0,836765971	1,167143369	1,072471029
116	hsa-miR-19a/mmu-miR-19a/rno-miR-19 ^a	1,122313686	0,92529396	0,988242933
117	hsa-miR-19b/mmu-miR-19b/rno-miR-19b	1,129720401	0,985213934	1,101856521
118	hsa-miR-200a*/mmu-miR-200a*	1,019778658	1,044531347	1,097797285
119	hsa-miR-200a/mmu-miR-200a/rno-miR-200 ^a	0,811443131	1,294524935	1,236317599
120	hsa-miR-200b*/mmu-miR-200b*	1,086541999	0,962937164	1,022440277
121	hsa-miR-200b/mmu-miR-200b/rno-miR-200b	0,816811101	1,300478417	1,254433549
122	hsa-miR-200c*/mmu-miR-200c*	1,046109707	0,958406161	0,975536875
123	hsa-miR-200c/mmu-miR-200c/rno-miR-200c	0,791126198	1,292948034	1,20041902
124	hsa-miR-202*/mmu-miR-202-5p	0,995221992	1,006860327	1,006605364
125	hsa-miR-203/mmu-miR-203/rno-miR-203	0,869938056	1,092320534	0,998175007
126	hsa-miR-204/mmu-miR-204/rno-miR-204	1,004612529	0,97861114	0,968200545
127	hsa-miR-205/mmu-miR-205/rno-miR-205	0,767284988	1,390224719	1,310375905
128	hsa-miR-206/mmu-miR-206/rno-miR-206	1,052797423	0,970708574	1,003582052
129	hsa-miR-208/mmu-miR-208/rno-miR-208	1,00768024	0,991814992	0,99411866
130	hsa-miR-208b/mmu-miR-208b	1,05519331	0,939390359	0,951229196
131	hsa-miR-20a/mmu-miR-20a/rno-miR-20 ^a	1,028146791	1,090248938	1,185861357
132	hsa-miR-20b/mmu-miR-20b/rno-miR-20b-5p	1,019340918	1,014027918	1,044679854
133	hsa-miR-21/mmu-miR-21/rno-miR-21	1,065482814	1,063594924	1,178792489

134	hsa-miR-210/mmu-miR-210/rno-miR-210	0,998519545	0,980041767	0,964216281
135	hsa-miR-212/mmu-miR-212/rno-miR-212	1,019355788	0,972174254	0,972456494
136	hsa-miR-214*/mmu-miR-214*	0,969260541	1,016765508	0,994819892
137	hsa-miR-214/mmu-miR-214/rno-miR-214	1,1027814	0,93125303	0,981387771
138	hsa-miR-216a/mmu-miR-216a/rno-miR-216 ^a	1,029209735	1,001776208	1,033795415
139	hsa-miR-216b/mmu-miR-216b	0,989688958	0,997307789	0,984280628
140	hsa-miR-217/mmu-miR-217/rno-miR-217	0,999864641	1,013209565	1,022498834
141	hsa-miR-218-2*/mmu-miR-218-2*/rno-miR-218*	1,002041039	0,9915797	0,987738654
142	hsa-miR-218/mmu-miR-218/rno-miR-218	1,065643366	0,930609991	0,945854231
143	hsa-miR-219-5p/mmu-miR-219/rno-miR-219-5p	1,008859082	0,989693085	0,991713537
144	hsa-miR-22*/mmu-miR-22*/rno-miR-22*	1,04368593	0,965883981	0,986155598
145	hsa-miR-22/mmu-miR-22/rno-miR-22	1,077810173	1,056876837	1,179480181
146	hsa-miR-221/mmu-miR-221/rno-miR-221	1,18723529	0,929812865	1,051554725
147	hsa-miR-222/mmu-miR-222/rno-miR-222	1,104283227	1,039992602	1,175663929
148	hsa-miR-223/mmu-miR-223/rno-miR-223	0,991301927	1,004165088	0,997746078
149	hsa-miR-224/mmu-miR-224/rno-miR-224	0,931854624	1,031727827	0,976648202
150	hsa-miR-23a/mmu-miR-23a/rno-miR-23 ^a	1,016373279	1,10443952	1,197435295
151	hsa-miR-23b/mmu-miR-23b/rno-miR-23b	1,049299993	0,963343141	0,987286006
152	hsa-miR-24-1*/mmu-miR-24-1*/rno-miR-24-1*	1,041786741	1,029521257	1,094943653
153	hsa-miR-24-2*/mmu-miR-24-2*/rno-miR-24-2*	0,969871455	1,080364462	1,103337808
154	hsa-miR-24/mmu-miR-24/rno-miR-24	1,027642025	0,984255607	1,001847175
155	hsa-miR-25/mmu-miR-25/rno-miR-25	1,037555564	0,988860696	1,019943502
156	hsa-miR-26a/mmu-miR-26a/rno-miR-26 ^a	1,116673768	0,936419086	1,003064917
157	hsa-miR-26b*/mmu-miR-26b*/rno-miR-26b*	1,010039855	0,977713757	0,972346906

158	hsa-miR-26b/mmu-miR-26b/rno-miR-26b	1,034949478	1,025442524	1,080771242
159	hsa-miR-27a*/mmu-miR-27a*/rno-miR-27a*	0,989405608	1,03615488	1,050314699
160	hsa-miR-27a/mmu-miR-27a/rno-miR-27 ^a	1,061515358	0,955515095	0,985530526
161	hsa-miR-27b*/mmu-miR-27b*	0,959469725	1,02633759	0,9998921
162	hsa-miR-27b/mmu-miR-27b/rno-miR-27b	1,015350541	1,042853354	1,090147997
163	hsa-miR-28-5p/mmu-miR-28/rno-miR-28	1,036286454	0,982840049	1,008202503
164	hsa-miR-296-3p/mmu-miR-296-3p/rno-miR-296	0,948187834	1,013386592	0,965083404
165	hsa-miR-296-5p/mmu-miR-296-5p/rno-miR-296*	1,009919289	0,968269492	0,955973834
166	hsa-miR-297/mmu-miR-297 ^a	1,031515157	0,951846651	0,949636461
167	hsa-miR-299-5p/mmu-miR-299*/rno-miR-299	0,942392691	1,026167344	0,979804101
168	hsa-miR-29a*/mmu-miR-29a*/rno-miR-29a*	1,071886329	0,940311776	0,968785309
169	hsa-miR-29a/mmu-miR-29a/rno-miR-29 ^a	1,247603269	0,886982426	1,020336089
170	hsa-miR-29b-1*/mmu-miR-29b*	0,999146706	1,00234758	1,003108451
171	hsa-miR-29b/mmu-miR-29b/rno-miR-29b	1,229532048	0,917111833	1,062060629
172	hsa-miR-29c*/mmu-miR-29c*/rno-miR-29c*	0,99743562	0,988721932	0,977931819
173	hsa-miR-29c/mmu-miR-29c/rno-miR-29c	1,170053884	0,876023993	0,940079248
174	hsa-miR-301a/mmu-miR-301a/rno-miR-301 ^a	0,968344031	1,086229848	1,111494972
175	hsa-miR-302a/mmu-miR-302 ^a	0,991925813	0,993087479	0,979488261
176	hsa-miR-302b/mmu-miR-302b	0,966517361	1,016298241	0,990934966
177	hsa-miR-302c/mmu-miR-302c	0,974113061	1,015722196	0,998493547
178	hsa-miR-302d/mmu-miR-302d	0,987833026	1,006454421	0,997877452
179	hsa-miR-30a*/mmu-miR-30a*/rno-miR-30a*	1,00030748	1,017907346	1,031031056
180	hsa-miR-30a/mmu-miR-30a/rno-miR-30 ^a	0,997880187	1,080775058	1,136092224
181	hsa-miR-30b/mmu-miR-30b/rno-miR-30b-5p	1,006183119	1,087851866	1,157532995

182	hsa-miR-30c-1*/mmu-miR-30c-1*/rno-miR-30c-1*	1,019945516	0,985851421	0,996674358
183	hsa-miR-30c-2*/mmu-miR-30c-2*/rno-miR-30c-2*	1,079552556	0,953234704	0,998751973
184	hsa-miR-30c/mmu-miR-30c/rno-miR-30c	0,991662571	1,086027237	1,13805267
185	hsa-miR-30d/mmu-miR-30d/rno-miR-30d	1,018190986	1,007165994	1,031628502
186	hsa-miR-30e*/mmu-miR-30e*/rno-miR-30e*	0,987751576	1,007363871	0,999340655
187	hsa-miR-30e/mmu-miR-30e/rno-miR-30e	0,991868959	1,024323216	1,032817612
188	hsa-miR-31*/mmu-miR-31*	0,992627368	1,060892553	1,096174198
189	hsa-miR-31/mmu-miR-31/rno-miR-31	1,005725895	1,112033813	1,198561664
190	hsa-miR-32/mmu-miR-32/rno-miR-32	0,972993524	1,017746873	1,000677846
191	hsa-miR-320/mmu-miR-320/rno-miR-320	0,987206657	1,047694639	1,067564744
192	hsa-miR-323-3p/mmu-miR-323-3p/rno-miR-323	1,026066112	0,991327007	1,012463589
193	hsa-miR-323-5p/mmu-miR-323-5p/rno-miR-323*	1,016303868	0,981854	0,986000559
194	hsa-miR-324-3p/mmu-miR-324-3p/rno-miR-324-3p	1,010648048	0,981108564	0,978823421
195	hsa-miR-324-5p/mmu-miR-324-5p/rno-miR-324-5p	0,979914639	1,022054098	1,015730743
196	hsa-miR-326/mmu-miR-326/rno-miR-326	0,988220306	1,007863428	1,000705614
197	hsa-miR-328/mmu-miR-328/rno-miR-328	1,015833442	0,991562248	1,002247778
198	hsa-miR-330-5p/mmu-miR-330/rno-miR-330	0,972710997	1,015876904	0,997187249
199	hsa-miR-331-3p/mmu-miR-331-3p/rno-miR-331	0,984541899	1,038303005	1,048567664
200	hsa-miR-331-5p/mmu-miR-331-5p	1,01100954	0,975947911	0,970319898
201	hsa-miR-335*/mmu-miR-335-3p	1,006263635	0,993288633	0,995153288
202	hsa-miR-335/mmu-miR-335-5p/rno-miR-335	1,034321098	0,945852446	0,94204117
203	hsa-miR-338-3p/mmu-miR-338-3p/rno-miR-338	0,990856272	0,998825309	0,988138081
204	hsa-miR-338-5p/mmu-miR-338-5p/rno-miR-338*	1,032293487	0,973931766	0,988703144
205	hsa-miR-339-5p/mmu-miR-339-5p/rno-miR-339-5p	0,977469006	1,054474124	1,068126583

206	hsa-miR-33a*/mmu-miR-33*	0,986606666	1,008219365	0,999547728
207	hsa-miR-33a/mmu-miR-33/rno-miR-33	1,025116659	0,980774825	0,993234717
208	hsa-miR-340*/mmu-miR-340-3p/rno-miR-340-3p	1,003920822	1,007375875	1,016852337
209	hsa-miR-340/mmu-miR-340-5p/rno-miR-340-5p	1,063663086	0,947405187	0,973396662
210	hsa-miR-342-3p/mmu-miR-342-3p/rno-miR-342-3p	1,018587243	1,009709018	1,036432965
211	hsa-miR-342-5p/mmu-miR-342-5p/rno-miR-342-5p	0,993820161	1,001295718	0,995568644
212	hsa-miR-34a/mmu-miR-34a/rno-miR-34 ^a	0,997620842	1,057336268	1,095654098
213	hsa-miR-34b/mmu-miR-34b-3p	1,038517394	1,028199663	1,089262686
214	hsa-miR-34c-5p/mmu-miR-34c/rno-miR-34c	0,968282671	0,982098769	0,934976856
215	hsa-miR-361-5p/mmu-miR-361/rno-miR-361	1,08716308	0,930539343	0,965848261
216	hsa-miR-363/mmu-miR-363/rno-miR-363	0,950873537	1,030026942	0,99619017
217	hsa-miR-365/mmu-miR-365/rno-miR-365	1,140502443	0,92302846	1,000043706
218	hsa-miR-367/mmu-miR-367	0,994485827	1,014263527	1,018474376
219	hsa-miR-369-3p/mmu-miR-369-3p/rno-miR-369-3p	1,024711835	0,967344426	0,969595598
220	hsa-miR-369-5p/mmu-miR-369-5p/rno-miR-369-5p	0,990711113	0,993923831	0,979606307
221	hsa-miR-370/mmu-miR-370/rno-miR-370	0,976221857	1,036234004	1,03570769
222	hsa-miR-374b/mmu-miR-374/rno-miR-374	1,05466118	0,993480792	1,045190906
223	hsa-miR-375/mmu-miR-375/rno-miR-375	1,013547668	0,967498515	0,958405946
224	hsa-miR-377/mmu-miR-377/rno-miR-377	1,008515025	0,989928727	0,991756315
225	hsa-miR-378*/mmu-miR-378*/rno-miR-378*	0,991393621	0,996321395	0,98444089
226	hsa-miR-378/mmu-miR-378/rno-miR-378	0,981406208	1,029462961	1,030005539
227	hsa-miR-379/mmu-miR-379/rno-miR-379	0,993276294	1,006522249	1,003918788
228	hsa-miR-380*/mmu-miR-380-5p/rno-miR-380	0,978501991	1,043865164	1,051255608
229	hsa-miR-381/mmu-miR-381/rno-miR-381	1,004569098	0,998191445	1,0017757

230	hsa-miR-382/mmu-miR-382/rno-miR-382	1,022687474	0,974894938	0,980577624
231	hsa-miR-409-3p/mmu-miR-409-3p/rno-miR-409-3p	0,992141512	1,008322409	1,005764182
232	hsa-miR-409-5p/mmu-miR-409-5p	0,994539911	0,995022095	0,985612446
233	hsa-miR-409-5p/mmu-miR-409-5p/rno-miR-409-5p	1,019035302	0,961417762	0,953563219
234	hsa-miR-410/mmu-miR-410/rno-miR-410	0,989981628	0,98760463	0,968023768
235	hsa-miR-411*/mmu-miR-411*	0,962128418	1,044134765	1,033021495
236	hsa-miR-411/mmu-miR-411/rno-miR-411	0,997197704	1,005815051	1,006950785
237	hsa-miR-412/mmu-miR-412/rno-miR-412	0,961468599	1,0218318	0,994565615
238	hsa-miR-421/mmu-miR-421	1,012006994	0,986326934	0,989226812
239	hsa-miR-423-3p/mmu-miR-423-3p/rno-miR-423	1,040490048	0,968737416	0,987933299
240	hsa-miR-423-5p/mmu-miR-423-5p	1,00952727	1,0135259	1,033411324
241	hsa-miR-425*/mmu-miR-425*	1,020506651	0,981174516	0,989179996
242	hsa-miR-425/mmu-miR-425/rno-miR-425	0,970232902	1,040093949	1,035471989
243	hsa-miR-431*/mmu-miR-431*	0,98662068	1,009130335	1,001117212
244	hsa-miR-431/mmu-miR-431/rno-miR-431	0,973584908	1,01563783	0,997759652
245	hsa-miR-433/mmu-miR-433/rno-miR-433	0,98717354	0,998084884	0,982875214
246	hsa-miR-448/mmu-miR-448/rno-miR-448	0,984034361	1,009499757	0,998908042
247	hsa-miR-449a/mmu-miR-449a/rno-miR-449 ^a	1,040589895	0,949898094	0,955280847
248	hsa-miR-450a/mmu-miR-450a-5p	1,048130825	0,925602413	0,920355768
249	hsa-miR-451/mmu-miR-451/rno-miR-451	1,004100494	0,993588341	0,993374366
250	hsa-miR-455-5p/mmu-miR-455*/rno-miR-455	0,994533364	0,985958269	0,970097857
251	hsa-miR-484/mmu-miR-484/rno-miR-484	0,983174095	1,037607141	1,045852849
252	hsa-miR-485-3p/mmu-miR-485*	0,967495571	1,016706962	0,99273151
253	hsa-miR-485-5p/mmu-miR-485/rno-miR-485	0,98753602	1,013758488	1,01001801

254	hsa-miR-486-5p/mmu-miR-486	0,94661818	1,033297863	0,996727809
255	hsa-miR-487b/mmu-miR-487b/rno-miR-487b	1,090784062	0,895349005	0,907007282
256	hsa-miR-490-3p/mmu-miR-490	1,005759671	1,001246405	1,008289384
257	hsa-miR-491-5p/mmu-miR-491	0,983446385	1,009510888	0,998280164
258	hsa-miR-494/mmu-miR-494/rno-miR-494	1,069963343	0,929999542	0,948864189
259	hsa-miR-495/mmu-miR-495/rno-miR-495	1,017444086	0,970572598	0,967725048
260	hsa-miR-496/mmu-miR-496	0,999781242	1,000655708	1,000889567
261	hsa-miR-497/mmu-miR-497/rno-miR-497	0,979807883	1,007148661	0,990246377
262	hsa-miR-499-5p/mmu-miR-499/rno-miR-499	0,991239091	0,983116587	0,961708226
263	hsa-miR-501-3p/mmu-miR-501-3p	1,002808896	1,003129583	1,008374479
264	hsa-miR-504/mmu-miR-504	1,012391624	0,99156395	0,998646516
265	hsa-miR-532-3p/mmu-miR-532-3p/rno-miR-532-3p	1,002595456	1,00664553	1,014179093
266	hsa-miR-532-5p/mmu-miR-532-5p/rno-miR-532-5p	1,032351534	1,011462494	1,05382856
267	hsa-miR-539/mmu-miR-539/rno-miR-539	1,014135923	0,983601789	0,986757375
268	hsa-miR-542-3p/mmu-miR-542-3p/rno-miR-542-3p	1,149464514	0,880747458	0,931713424
269	hsa-miR-542-5p/mmu-miR-542-5p/rno-miR-542-5p	0,992212711	1,004592014	0,999464518
270	hsa-miR-543/mmu-miR-543/rno-miR-543*	1,008925986	0,987953495	0,988792384
271	hsa-miR-551b/mmu-miR-551b	1,021720264	0,991518912	1,008301004
272	hsa-miR-568/mmu-miR-568	1,009490599	0,984084593	0,982731363
273	hsa-miR-574-3p/mmu-miR-574-3p	1,063488132	0,951732375	0,980808484
274	hsa-miR-574-5p/mmu-miR-574-5p	1,066585389	0,986444042	1,044644344
275	hsa-miR-582-5p/mmu-miR-582-5p	0,986871431	1,001764222	0,988824028
276	hsa-miR-590-3p/mmu-miR-590-3p	0,902894866	1,104249278	1,061134163
277	hsa-miR-590-5p/mmu-miR-590-5p	1,028559753	1,012988682	1,052537388

278	hsa-miR-592/mmu-miR-592	0,996517422	1,004137162	1,003343731
279	hsa-miR-615-3p/mmu-miR-615-3p	0,981298882	0,997229668	0,975002235
280	hsa-miR-615-5p/mmu-miR-615-5p	0,99497561	1,024293061	1,036169557
281	hsa-miR-652/mmu-miR-652/rno-miR-652	0,952128614	1,047433723	1,026961241
282	hsa-miR-653/mmu-miR-653	0,968070775	1,006531773	0,976140174
283	hsa-miR-654-3p/mmu-miR-654-3p	0,99316822	1,026748874	1,038390782
284	hsa-miR-668/mmu-miR-668	1,176982861	0,906648742	1,001141228
285	hsa-miR-671-3p/mmu-miR-671-3p/rno-miR-671	0,8542968	1,08082591	0,958359358
286	hsa-miR-671-5p/mmu-miR-671-5p	1,016520465	0,974893533	0,974223559
287	hsa-miR-672/mmu-miR-672/rno-miR-672	0,988951437	0,996627447	0,982319031
288	hsa-miR-674/mmu-miR-674/rno-miR-674-5p	1,012063313	1,01979367	1,046902587
289	hsa-miR-7-1*/mmu-miR-7a*/rno-miR-7a*	0,964633123	1,017479375	0,990802696
290	hsa-miR-7/mmu-miR-7a/rno-miR-7 ^a	1,022050846	1,011871799	1,043805369
291	hsa-miR-708*/mmu-miR-708*/rno-miR-708*	0,969226389	1,016145822	0,993731038
292	hsa-miR-708/mmu-miR-708/rno-miR-708	0,939589382	1,047487126	1,012238301
293	hsa-miR-744*/mmu-miR-744*	0,933600624	1,053446426	1,015038506
294	hsa-miR-744/mmu-miR-744	1,025063448	1,007224174	1,038921278
295	hsa-miR-758/mmu-miR-758/rno-miR-758	0,991011884	1,007517032	1,003158644
296	hsa-miR-760/mmu-miR-760/rno-miR-760-3p	1,000011909	0,990438413	0,983621397
297	hsa-miR-801/mmu-miR-801	1,146252111	0,922623076	1,004252901
298	hsa-miR-802/mmu-miR-802	0,994483564	1,007712103	1,007263106
299	hsa-miR-871/mmu-miR-871	0,99796461	1,001992335	1,001229313
300	hsa-miR-872/mmu-miR-872/rno-miR-872	0,98357022	1,005881276	0,992231149
301	hsa-miR-873/mmu-miR-873/rno-miR-873	1,009637533	0,995913335	1,003232671

302	hsa-miR-874/mmu-miR-874/rno-miR-874	1,043132355	0,947449637	0,953529789
303	hsa-miR-875-5p/mmu-miR-875-5p	0,946112756	1,084160325	1,081590373
304	hsa-miR-877*/mmu-miR-877*	1,006373069	0,976569827	0,966543368
305	hsa-miR-877/mmu-miR-877/rno-miR-877	0,980670233	0,98385013	0,951536983
306	hsa-miR-9*/mmu-miR-9*/rno-miR-9*	1,15321527	0,938649958	1,039029597
307	hsa-miR-9/mmu-miR-9/rno-miR-9	1,06503819	0,915973083	0,919629446
308	hsa-miR-92a/mmu-miR-92a/rno-miR-92 ^a	1,034041617	1,014573117	1,060971791
309	hsa-miR-92b/mmu-miR-92b/rno-miR-92b	1,020844997	1,002658262	1,026629098
310	hsa-miR-93*/mmu-miR-93*	1,016253403	1,015673061	1,044256741
311	hsa-miR-93/mmu-miR-93/rno-miR-93	1,024303849	1,022408056	1,064381365
312	hsa-miR-96/mmu-miR-96/rno-miR-96	1,008110991	1,043922887	1,084158632
313	hsa-miR-98/mmu-miR-98/rno-miR-98	1,03702543	0,971259973	0,988842857
314	hsa-miR-99a/mmu-miR-99a/rno-miR-99 ^a	0,984742208	1,005408465	0,99271106
315	hsa-miR-99b*/mmu-miR-99b*/rno-miR-99b*	1,009950488	0,954008712	0,931472861
316	hsa-miR-99b/mmu-miR-99b/rno-miR-99b	1,004187225	1,048046984	1,086963371
317	miRPlus_11239/mmu-miR-383/rno-miR-383	0,964218337	1,028286487	1,008616737
318	miRPlus_17653/mmu-miR-133a*	0,995296481	1,002629928	0,999446083
319	mmu-let-7c-1*	1,012585879	0,986025995	0,989314389
320	mmu-let-7d/mo-let-7d	1,08212435	0,986405549	1,059623914
321	mmu-let-7f/rno-let-7f	1,079444968	0,972958346	1,033375121
322	mmu-let-7g	1,07591217	1,00598253	1,088070853
323	mmu-let-7i/rno-let-7i	1,106874613	0,913223516	0,953074233
324	mmu-miR-101b/rno-miR-101b	1,075492562	0,968249073	1,021311393
325	mmu-miR-105	1,011653892	0,984470296	0,985661133

326	mmu-miR-106 ^a	1,116346268	0,97984276	1,080090761
327	mmu-miR-125b*	0,973321083	1,002327106	0,974867296
328	mmu-miR-138/rno-miR-138	1,004288353	0,990196602	0,98775054
329	mmu-miR-141*	0,939828779	1,062542121	1,037755061
330	mmu-miR-146b*	0,996416893	0,994283876	0,986365591
331	mmu-miR-151-3p/rno-miR-151*	1,011714888	1,012013805	1,033138464
332	mmu-miR-155	1,068772802	0,904561297	0,903107786
333	mmu-miR-15a*	1,011501593	1,000482556	1,0130633
334	mmu-miR-16*	0,97619547	1,022045584	1,011564923
335	mmu-miR-17*	1,023766146	0,994543825	1,015648902
336	mmu-miR-181a-2*	1,004346956	0,998817013	1,002613358
337	mmu-miR-186*	0,99173324	1,033119553	1,047703288
338	mmu-miR-18b	1,022465536	0,988325787	1,003556318
339	mmu-miR-191*	1,006275518	0,987484449	0,98519363
340	mmu-miR-193*/rno-miR-193*	0,990344546	1,00743692	1,002295024
341	mmu-miR-193b	1,020799897	0,962042834	0,956445126
342	mmu-miR-199b*	1,069686244	0,883324949	0,86668356
343	mmu-miR-201	0,991172248	1,008995	1,005858819
344	mmu-miR-202-3p	1,019211443	0,975940527	0,97880823
345	mmu-miR-203*	0,932255687	1,050431939	1,008379676
346	mmu-miR-207/rno-miR-207	1,201939854	0,899492984	1,008207165
347	mmu-miR-20a*/rno-miR-20a*	1,005136531	0,992024257	0,991787611
348	mmu-miR-20b	0,9888545	1,067996288	1,104069939
349	mmu-miR-20b*/rno-miR-20b-3p	0,994388135	1,061293981	1,098829555

350	mmu-miR-21*/rno-miR-21*	1,032894851	0,980523235	1,000741741
351	mmu-miR-211/rno-miR-211	0,948839844	1,024966437	0,985312466
352	mmu-miR-215/rno-miR-215	1,028528451	0,958819386	0,958714057
353	mmu-miR-218-1*	1,000946994	1,003054603	1,006252252
354	mmu-miR-220	0,990589159	1,013062705	1,012173071
355	mmu-miR-28*	1,018329299	0,973629414	0,973910622
356	mmu-miR-290-3p	0,970934625	1,034574147	1,026908573
357	mmu-miR-290-5p/rno-miR-290	1,037933595	0,949536471	0,952022607
358	mmu-miR-291a-3p/rno-miR-291a-3p	0,953892306	1,017147365	0,977986531
359	mmu-miR-291a-5p/rno-miR-291a-5p	1,012983069	0,980467676	0,980157335
360	mmu-miR-291b-3p	1,009303419	0,998347345	1,007066208
361	mmu-miR-291b-5p	0,994036253	1,018240186	1,024787714
362	mmu-miR-292-3p/rno-miR-292-3p	0,975829206	1,018971921	1,005932075
363	mmu-miR-292-5p/rno-miR-292-5p	1,012188065	0,98213548	0,982199959
364	mmu-miR-293	1,000051791	1,010374372	1,017840455
365	mmu-miR-293*	0,964169591	1,018622088	0,992210601
366	mmu-miR-294	1,005738736	0,981018575	0,973520014
367	mmu-miR-294*	1,01640517	0,997059725	1,012323836
368	mmu-miR-295	0,995714898	1,006752278	1,006953707
369	mmu-miR-295*	0,989747253	1,003691655	0,995247255
370	mmu-miR-297b-3p/mmu-miR-297a*/mmu-miR-297c*	1,000856163	1,048934069	1,084829424
371	mmu-miR-297b-5p	0,993171969	1,018485529	1,02426386
372	mmu-miR-297c	1,031151715	0,975112367	0,989591689
373	mmu-miR-298/rno-miR-298	0,935684916	1,048822156	1,009808796

374	mmu-miR-299	1,014125171	0,98240883	0,984690871
375	mmu-miR-300*/rno-miR-300-5p	1,080375163	0,93418548	0,965980798
376	mmu-miR-300/rno-miR-300-3p	1,013735874	1,005338819	1,023784957
377	mmu-miR-301b/rno-miR-301b	1,02500825	0,956156468	0,950549585
378	mmu-miR-302a*	1,003017637	0,991300326	0,988297153
379	mmu-miR-302b*	1,00226904	0,996096687	0,995730765
380	mmu-miR-302c*	0,989614058	1,011115487	1,007781373
381	mmu-miR-30b*/rno-miR-30b-3p	0,984382806	1,036826973	1,045873857
382	mmu-miR-322*/rno-miR-322*	0,973815555	1,000601469	0,972486192
383	mmu-miR-322/rno-miR-322	1,020651239	0,932508959	0,905295353
384	mmu-miR-325*/rno-miR-325-5p	1,020114978	1,008416502	1,03580725
385	mmu-miR-325/rno-miR-325-3p	1,068454157	0,91936117	0,928777035
386	mmu-miR-327	1,035193914	0,972126569	0,988503181
387	mmu-miR-329/rno-miR-329	1,039968326	0,968798479	0,987517763
388	mmu-miR-330*/rno-miR-330*	1,008655498	0,986168102	0,985437713
389	mmu-miR-337-3p/rno-miR-337	1,069425958	0,920009013	0,930824707
390	mmu-miR-337-5p	1,000455805	1,006492264	1,011619626
391	mmu-miR-339-3p	0,973890088	1,018824405	1,003511871
392	mmu-miR-341/rno-miR-341	1,005755351	1,027987039	1,054219751
393	mmu-miR-343	0,983952708	1,000727152	0,983866581
394	mmu-miR-344	1,002814024	0,990082867	0,985991727
395	mmu-miR-345-3p/rno-miR-345-3p	0,984247437	1,00742937	0,995613268
396	mmu-miR-345-5p/rno-miR-345-5p	1,019855861	1,000777995	1,02234905
397	mmu-miR-346	1,002793218	0,992222847	0,989641831

398	mmu-miR-34b-5p/rno-miR-34b	0,970976635	0,956299338	0,89418819
399	mmu-miR-34c*/rno-miR-34c*	1,002402939	1,000586662	1,003577175
400	mmu-miR-350/rno-miR-350	1,072343584	0,950080608	0,986377535
401	mmu-miR-351/rno-miR-351	1,043596453	0,954903151	0,966957273
402	mmu-miR-362-3p	0,989145178	1,051434318	1,076116999
403	mmu-miR-362-5p	1,001075604	1,039395253	1,068712281
404	mmu-miR-374*	0,963349518	1,020047495	0,99369053
405	mmu-miR-376a*/rno-miR-376a*	0,967710782	1,021577509	1,001225484
406	mmu-miR-376a/rno-miR-376 ^a	0,994259845	0,995758681	0,986571183
407	mmu-miR-376b*/rno-miR-376b-5p	0,996580005	0,987888957	0,975591274
408	mmu-miR-376b/rno-miR-376b-3p	1,0226475	0,976913478	0,984024555
409	mmu-miR-376c*	1,003513156	0,998915299	1,001893798
410	mmu-miR-376c/rno-miR-376c	1,030377611	0,987707329	1,010626617
411	mmu-miR-380-3p	0,969979191	1,016767732	0,9956323
412	mmu-miR-382*	1,082805456	0,89172318	0,893406772
413	mmu-miR-384-3p/rno-miR-384-3p	1,017497913	1,014995304	1,044404317
414	mmu-miR-384-5p/rno-miR-384-5p	0,983491907	1,011480971	1,001687423
415	mmu-miR-429/rno-miR-429	0,876523181	1,139901503	1,084639477
416	mmu-miR-433*	1,06741408	0,887047238	0,871127483
417	mmu-miR-434-3p/rno-miR-434	1,035773533	0,979949025	1,002664756
418	mmu-miR-434-5p	0,996264067	0,999887307	0,995794648
419	mmu-miR-449b	1,001038062	0,987147608	0,979070633
420	mmu-miR-449c	0,996238614	0,999193001	0,99457861
421	mmu-miR-450a-3p	1,017694979	1,003983663	1,025617477

422	mmu-miR-450b-3p	1,025814776	0,961559693	0,960711881
423	mmu-miR-450b-5p	0,998712923	0,988364732	0,97868285
424	mmu-miR-452	1,050421278	0,950066498	0,965233348
425	mmu-miR-453	1,00319949	0,999419127	1,002424071
426	mmu-miR-455	1,075966232	0,894442741	0,891966463
427	mmu-miR-463	0,990632144	1,005345609	0,999035257
428	mmu-miR-463*	0,951176403	1,033510225	1,002405891
429	mmu-miR-464	0,980944011	1,037424998	1,043044741
430	mmu-miR-465a-3p/mmu-miR-465b-3p/mmu-miR-465c-3p	1,058107881	0,991932981	1,045910688
431	mmu-miR-465a-5p	1,017470799	0,971724392	0,969739256
432	mmu-miR-465b-5p	1,034768223	0,986959682	1,013810911
433	mmu-miR-465c-5p	0,959259908	1,024026091	0,995748144
434	mmu-miR-466a-3p/mmu-miR-466b-3p/mmu-miR-466c-3p/mmu-miR-466e-3p	0,936357128	1,051969518	1,015881598
435	mmu-miR-466a-5p	0,959340469	1,072994149	1,078533943
436	mmu-miR-466b-3-3p	0,995849373	1,015719666	1,022448947
437	mmu-miR-466b-5p	1,037713445	0,994043213	1,029104882
438	mmu-miR-466c-5p	0,925401204	1,074014568	1,039378009
439	mmu-miR-466d-3p	0,965938574	1,05170282	1,050219682
440	mmu-miR-466d-5p	0,971605186	1,018339237	1,000125267
441	mmu-miR-466e-5p	0,947166804	1,09413336	1,099622299
442	mmu-miR-466f-3p	0,913669099	1,17598484	1,193907441
443	mmu-miR-466f-5p	0,968420023	1,02403203	1,00618665
444	mmu-miR-466g	0,98825634	1,029465612	1,037620801
445	mmu-miR-466h	0,989379986	1,004549622	0,996312764

446	mmu-miR-467 ^a	1,000701594	0,997717364	0,996837298
447	mmu-miR-467a*/mmu-miR-467d*	0,896651726	1,098483383	1,043543139
448	mmu-miR-467b	0,961448492	0,99991094	0,957494609
449	mmu-miR-467b*	0,94896537	1,062810854	1,049111856
450	mmu-miR-467c	0,985990256	1,006142163	0,995329404
451	mmu-miR-467d	0,963423827	1,015829176	0,986640323
452	mmu-miR-467e	1,073413804	0,949716153	0,986753591
453	mmu-miR-467e*	1,027117007	1,005073347	1,037336086
454	mmu-miR-468	1,007449776	1,012114941	1,028767323
455	mmu-miR-469	1,031247618	1,027038774	1,079679585
456	mmu-miR-470	1,07164803	0,925388444	0,94235131
457	mmu-miR-470*	0,97355925	1,007583264	0,984055765
458	mmu-miR-471/rno-miR-471	1,038232168	0,96523901	0,979595991
459	mmu-miR-483	1,088488412	0,946028692	0,994417204
460	mmu-miR-483*/rno-miR-483	0,997857398	0,969000317	0,944599595
461	mmu-miR-488*	1,010512644	0,985949015	0,987010705
462	mmu-miR-488/rno-miR-488	1,000484132	0,995948259	0,993571509
463	mmu-miR-489	1,031920656	0,953786256	0,953404434
464	mmu-miR-493	1,003384957	0,988403846	0,983715764
465	mmu-miR-500/rno-miR-500	1,025604738	1,003359485	1,032800327
466	mmu-miR-501-5p/rno-miR-501	1,000615057	1,010835519	1,019237984
467	mmu-miR-503*	1,10300442	0,927109654	0,974241732
468	mmu-miR-503/rno-miR-503	1,070345317	0,903801271	0,903233074
469	mmu-miR-505	0,993143035	0,996461761	0,986570091

470	mmu-miR-509-3p	0,987128488	1,005937531	0,996225472
471	mmu-miR-509-5p	0,997952264	1,007039401	1,009861812
472	mmu-miR-511	0,999996907	1,000453361	1,000773876
473	mmu-miR-540-3p/rno-miR-540	1,006478298	0,997982509	1,003445723
474	mmu-miR-540-5p	0,993124494	1,01489014	1,018063678
475	mmu-miR-541/rno-miR-541	1,003697361	0,988255557	0,983792211
476	mmu-miR-544	1,003630517	1,006595439	1,015201876
477	mmu-miR-546	0,955444539	1,03232694	1,005364103
478	mmu-miR-547	0,996758723	1,005870678	1,006572297
479	mmu-miR-568	0,988842597	0,991128428	0,972811906
480	mmu-miR-582-3p	1,111632988	0,923693789	0,975921325
481	mmu-miR-598/rno-miR-598-3p	1,01129693	0,992604886	0,999288467
482	mmu-miR-654-5p	1,004324897	1,006995332	1,016631439
483	mmu-miR-665	1,034419227	0,956286386	0,960240567
484	mmu-miR-666-3p	0,938749367	1,048233508	1,012487463
485	mmu-miR-666-5p	1,020884906	0,949865575	0,935502948
486	mmu-miR-667	1,043901475	0,978107825	1,007644507
487	mmu-miR-669 ^a	1,034899302	0,97487236	0,992970542
488	mmu-miR-669b	1,013438182	1,001126083	1,01621435
489	mmu-miR-669c	0,974099267	1,044661876	1,047622322
490	mmu-miR-670	0,963264218	1,04159422	1,030034479
491	mmu-miR-673-3p	1,005528941	0,987478801	0,984395737
492	mmu-miR-673-5p	0,998052452	0,992078841	0,984341053
493	mmu-miR-674*/rno-miR-674-3p	1,089630309	0,936843925	0,979256114

494	mmu-miR-675-3p	1,003624752	0,998622378	1,001509948
495	mmu-miR-675-5p	1,006732577	1,021186681	1,043589369
496	mmu-miR-676	0,979619596	1,012655493	0,999409086
497	mmu-miR-676*	0,995914865	0,999259842	0,994344558
498	mmu-miR-677	1,026354222	0,98524918	1,002245087
499	mmu-miR-678	1,02765295	0,996689948	1,023381227
500	mmu-miR-679	1,009065987	0,984930451	0,9837406
501	mmu-miR-680	0,973620715	1,005043875	0,979812692
502	mmu-miR-681	0,990231612	1,01301535	1,011701427
503	mmu-miR-682	0,973412012	1,037131987	1,034057369
504	mmu-miR-683	0,997593042	0,980661763	0,964294398
505	mmu-miR-684	1,024400421	0,987757173	1,004571782
506	mmu-miR-685	1,173493564	0,894478352	0,976255931
507	mmu-miR-686	0,998923234	0,985673682	0,974295571
508	mmu-miR-687	0,998077285	1,007742187	1,011200593
509	mmu-miR-688	0,961959024	1,02451407	0,999658954
510	mmu-miR-689	0,934156366	1,04282143	0,997940791
511	mmu-miR-690	1,180921831	0,909529701	1,009579229
512	mmu-miR-691	1,091061288	0,960227149	1,021893272
513	mmu-miR-692	0,990724281	1,002574597	0,994400999
514	mmu-miR-693-3p	0,942332697	1,020831773	0,970782682
515	mmu-miR-693-5p	1,035907707	0,978990756	1,001137199
516	mmu-miR-694	1,0097317	0,984423507	0,983567205
517	mmu-miR-695	1,008304942	0,988904348	0,989773662

518	mmu-miR-696	0,964877802	1,03380532	1,01870805
519	mmu-miR-697	1,025025837	0,95056361	0,940895286
520	mmu-miR-698	1,050070506	0,99500518	1,043263129
521	mmu-miR-699	1,018177601	1,025568178	1,063363469
522	mmu-miR-700	1,015672678	0,992162485	1,003114462
523	mmu-miR-701	0,981396825	1,004115986	0,986835301
524	mmu-miR-702	0,973244486	1,008129857	0,984633076
525	mmu-miR-703	0,985505776	1,005626062	0,993918695
526	mmu-miR-704	1,008685215	0,988623804	0,989691714
527	mmu-miR-705	0,978408965	1,028480659	1,024983343
528	mmu-miR-706	1,066639345	1,009023904	1,08428883
529	mmu-miR-707	0,988865073	1,001152257	0,989951093
530	mmu-miR-709	1,142374223	0,884117824	0,931843398
531	mmu-miR-710	0,988671947	1,040212572	1,05642866
532	mmu-miR-711	0,99925257	0,985876587	0,974993697
533	mmu-miR-712	1,037437246	0,967420286	0,98258853
534	mmu-miR-712*	1,005338208	0,981193196	0,973398458
535	mmu-miR-713	1,082393368	0,930600629	0,961542856
536	mmu-miR-714	0,968286265	1,027826177	1,012464323
537	mmu-miR-715	0,998314791	0,980232411	0,964325583
538	mmu-miR-717	1,00558523	0,990999961	0,990503461
539	mmu-miR-718	0,986498249	0,995896176	0,978406271
540	mmu-miR-719	0,984743855	1,008956807	0,998762266
541	mmu-miR-720	1,086253764	0,96747166	1,03016927

542	mmu-miR-721	1,026044651	0,982757931	0,997617221
543	mmu-miR-741	0,991407126	1,00847051	1,005218273
544	mmu-miR-742	1,044084937	0,971646398	0,99658176
545	mmu-miR-742*	1,014028796	1,012852859	1,037039388
546	mmu-miR-743 ^a	0,977163626	1,027531805	1,021974619
547	mmu-miR-743b-3p	1,006175736	0,989099635	0,987863302
548	mmu-miR-743b-5p	0,987262036	1,002213806	0,990017189
549	mmu-miR-759	0,983062539	1,005207324	0,990525198
550	mmu-miR-761	0,996997037	1,011561448	1,016574645
551	mmu-miR-762	0,963833957	1,028985594	1,009360818
552	mmu-miR-763	0,992017013	0,998989654	0,989675622
553	mmu-miR-764-3p	1,009578929	1,010149597	1,027658794
554	mmu-miR-764-5p	0,946036828	1,02532318	0,98264896
555	mmu-miR-770-3p	1,034130632	0,977142589	0,996131893
556	mmu-miR-770-5p/rno-miR-770	1,005762314	1,017307379	1,035881749
557	mmu-miR-7b/rno-miR-7b	1,009014923	0,994033786	0,999342658
558	mmu-miR-804	1,101217303	0,907063677	0,937094942
559	mmu-miR-805	1,095422249	0,941781958	0,993322046
560	mmu-miR-872*/rno-miR-872*	1,035686176	0,966707616	0,979593962
561	mmu-miR-875-3p	1,084632244	0,947513932	0,993443143
562	mmu-miR-876-3p	0,969589846	1,014857497	0,991955883
563	mmu-miR-876-5p	0,997235427	0,992659173	0,984460856
564	mmu-miR-878-3p	1,000792362	0,995259286	0,99271929
565	mmu-miR-878-5p	0,984233881	1,019961786	1,016960312

566	mmu-miR-879*	1,002649364	0,999284352	1,001605794
567	mmu-miR-879/rno-miR-879	0,990211307	1,008916535	1,004677412
568	mmu-miR-880	0,993084651	1,008558818	1,007193472
569	mmu-miR-881	0,954858838	1,019416375	0,982921545
570	mmu-miR-881*	1,073185235	0,927944296	0,94828177
571	mmu-miR-882	1,020506905	1,003655276	1,027997282
572	mmu-miR-883a-3p	1,001037453	1,007825528	1,014530975
573	mmu-miR-883a-5p	1,072620247	0,966309262	1,015150349
574	mmu-miR-883b-3p/rno-miR-883	1,018705683	0,984135416	0,992427703
575	mmu-miR-883b-5p	1,052144586	0,961344797	0,986597009
576	mmu-miR-92a*	0,997989888	0,992999897	0,985851972

Tabla 70: Datos numéricos del microarray de expresión de miRNAs.

ANEXO DE FIGURAS

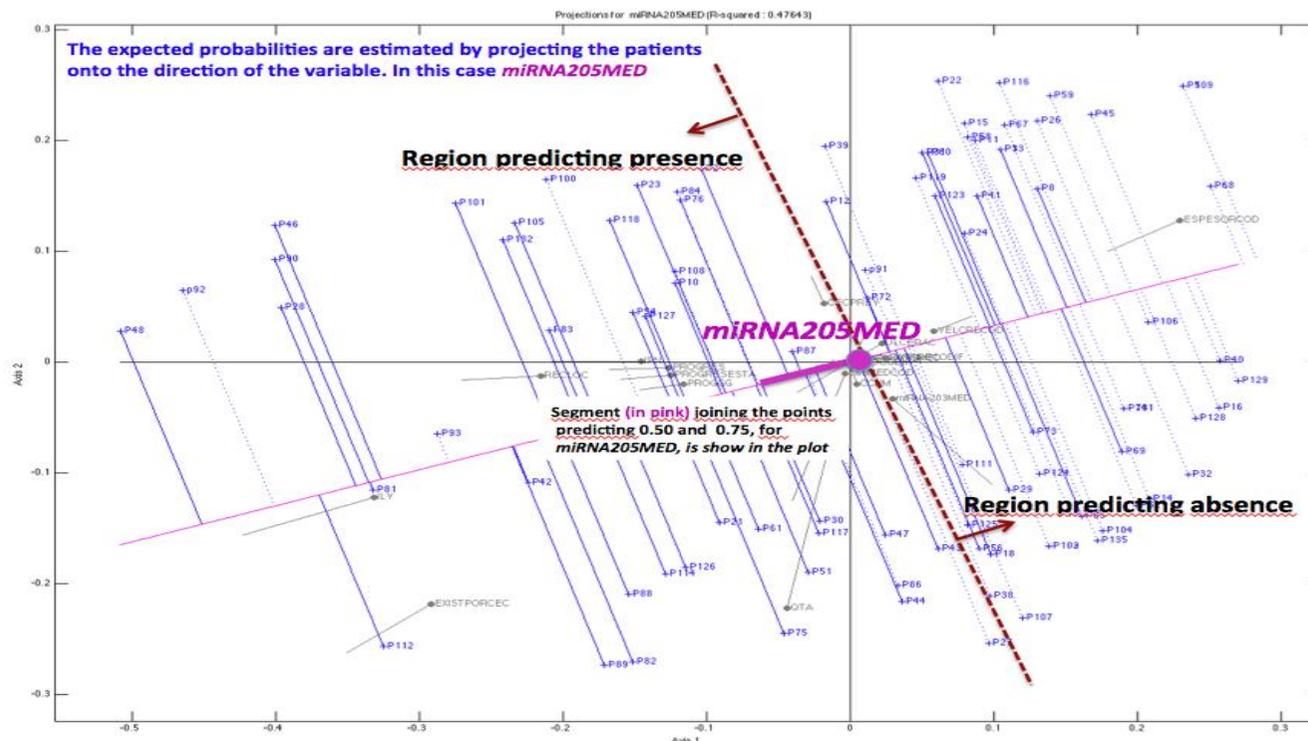


Figura 139: Predicción de la expresión de miRNA-205. En el gráfico se muestra la variable miRNA205 con la dirección materializada más allá del intervalo de probabilidad 0.5-0.75, para facilitar la interpretación. Se proyectó cada paciente sobre esa dirección para obtener una predicción de la probabilidad. Desde el punto grueso del vector hacia la izquierda, la predicción es mayor de 0.50 y hacia la derecha del punto la predicción es menor de 0.50. Para todos aquellos puntos que se proyecten hacia derecha del gráfico el modelo logístico predice ausencia de esa característica y para todos los puntos que se proyecten hacia la izquierda, el modelo predice presencia de esa característica. La predicción será correcta si aparece representada una línea continua en los pacientes, en los que el valor original fue una presencia de esa característica y en línea discontinua en los que se dio ausencia de esta característica. Se observa que todas las líneas discontinuas están a la derecha del punto. Luego se predice la ausencia correctamente.

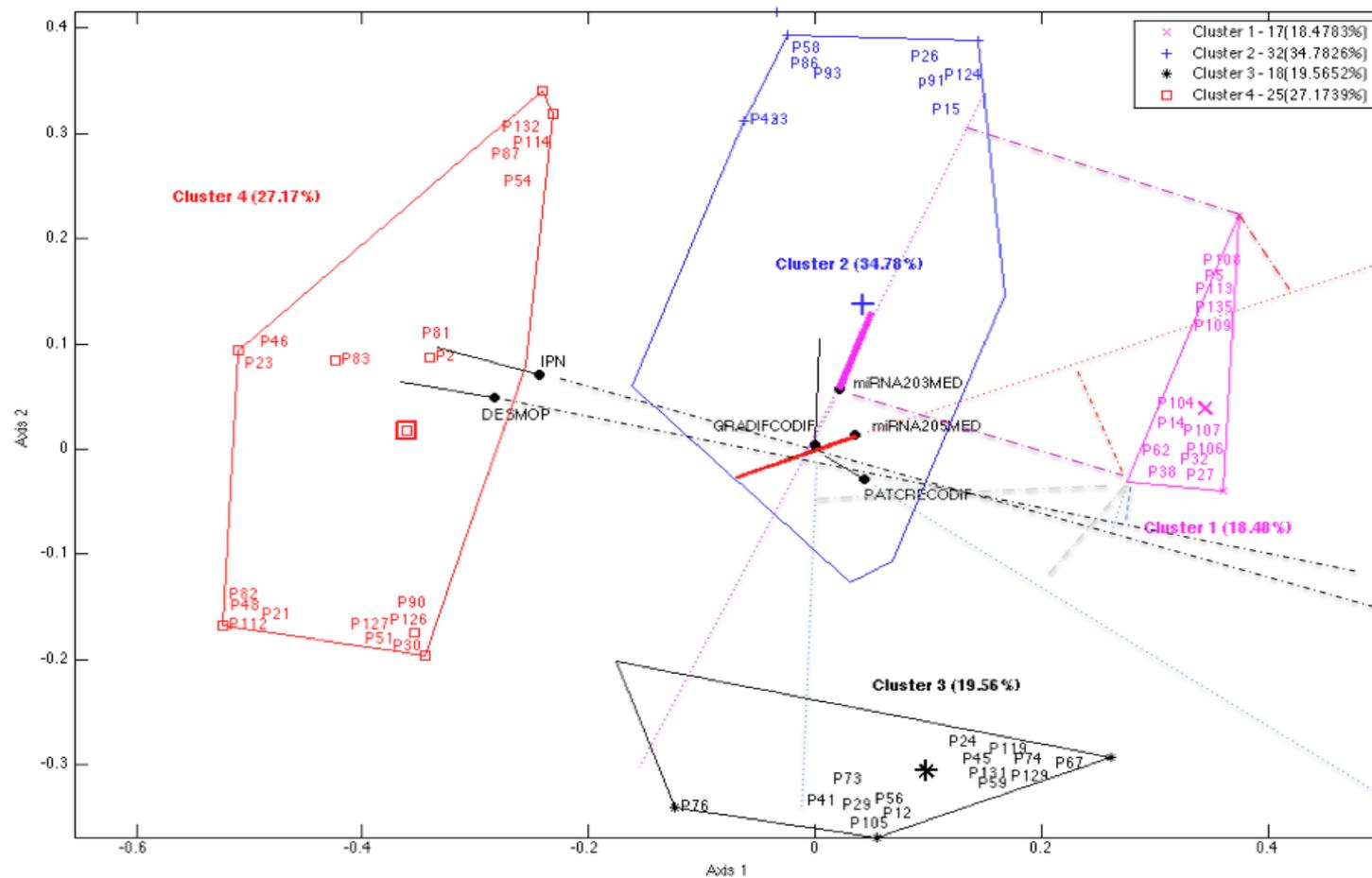


Figura 140: Biplot logístico bidimensional en que se visualizan las direcciones de las variables y las proyecciones del cluster 1. En el gráfico se representa la Figura 127 en la que se han visualizado las direcciones sobre las que aparecen las diferentes variables así como las proyecciones del cluster 1 sobre las variables.



Figura 141. Invasión perineural de carcinoma epidermoide cutáneo. CEC localizado en región temporal derecha (se observa injerto colocado para la reconstrucción tras su extirpación*). Continuas recidivas locales, muy dolorosas, condicionadas por infiltración perineural.



Figura 142. Carcinoma epidermoide infiltrativo. Tumor de muy rápido crecimiento. Entre la primera y la última imagen han transcurrido dos semanas.



Fig 143. Carcinoma epidermoide en paciente inmunosuprimida. Tumor cutáneo indiferenciado, infiltrante, de crecimiento rápido (mayor de 5mm/mes) en los últimos 2 meses, concidiendo con la progresión de su leucemia linfática crónica.



Figura 144. Carcinoma epidermoide de gran tamaño. Tumoración exofítica de gran tamaño en dorso de mano.

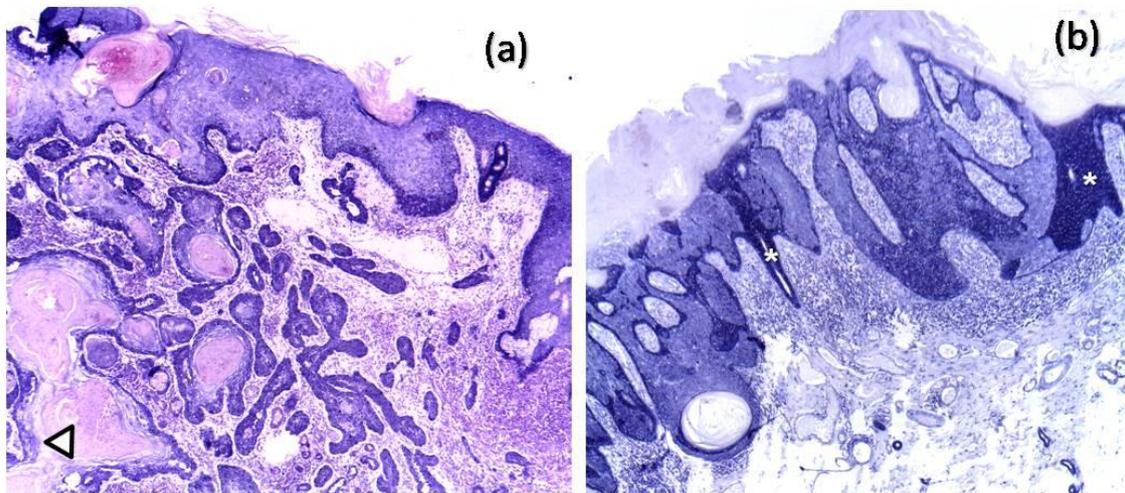


Figura 145: Expresión de miRNA-205 en un CEC moderadamente diferenciado. (a) Pérdida de expresión de miRNA-205 en las zonas diferenciadas de un CEC moderadamente diferenciado. (b) Pérdida de expresión del miRNA-205 en el componente epitelial no invasivo de un CEC. Dicha pérdida no afecta a los acrosiringios (*).

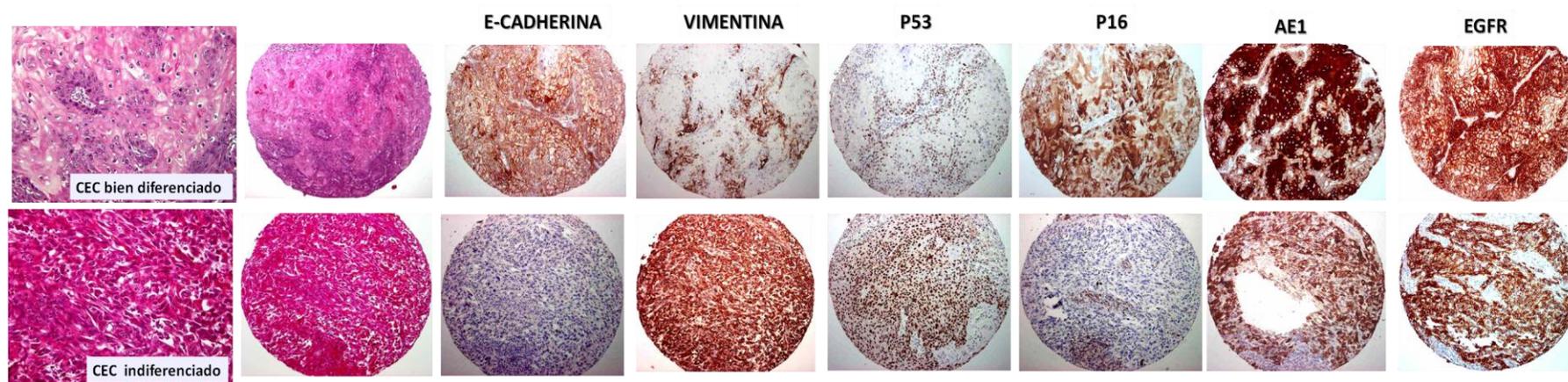


Figura 146. Expresión de marcadores proteicos y proliferativos en un CEC bien diferenciado y en un CEC indiferenciado (tipo fusocelular). En la

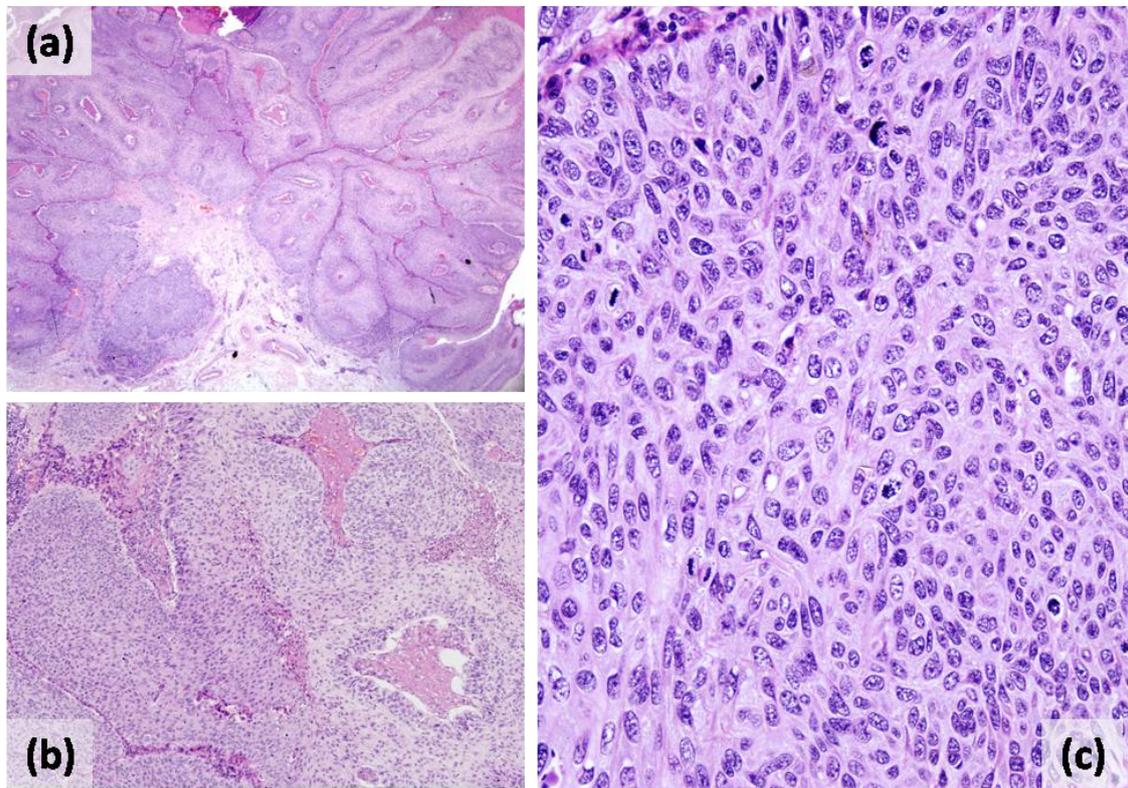


Figura 147: Histopatología del carcinoma bowenoide: (a) imagen panorámica en la que se observan los lóbulos tumorales que adoptan un patrón expansivo; (b) lóbulos tumorales a mayor aumento con ausencia de diferenciación queratósica; (c) celularidad del carcinoma bowenoide con pobre grado de diferenciación y sin diferenciación queratósica.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

µg (microgramo)

µl (microlitro)

5FU (5-Fluoruracilo)

ACoP (análisis de coordenadas principales)

AJCC (American Joint Committee on Cancer)

AKT ("Ak" "t" por 'timoma') También conocida como PKB: Potein kinasa B)

BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato)

BMI-1 (B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog)

BWH (Brigham and Women's Hospital)

CB (Carcinoma Bowenoide)

CBC (Carcinoma basocelular)

CC (cabeza y cuello)

CCD (charge-coupled device –dispositivo de carga acoplada-)

CCNM (cáncer cutáneo no melanoma)

CDK (cyclin dependent kinase)

CEC (carcinoma epidermoide cutáneo)

CECAR (Carcinoma epidermoide cutáneo de alto riesgo)

CEP7 (centrómero del cromosoma 7)

CIC (Centro de Investigación del Cáncer)

CIP (fosfatasa alcalina de origen intestinal)

cm (centímetro)

CNIO (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas)

Ct (thershold cycle)

CXCL12 (C-X-C motif chemokine 12)

CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4)

DAB (diaminobencidina)

DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol)

DEPC (dietilpirocarbonato)

DESMO (desmoplasia),

DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8)

DIG (digoxigenina)

DMBA (7,12-dimetilbenza-antraceno)

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium)

DMSO (dimetilsulfato sódico)

dNTP (dinucleótido fosfato)

DS (desviación estándar)

EB (enfermedad de Bowen)

EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)

EGFR (Factor de crecimiento epitelial)

ERK (extracelular signal regulated kinases)

ESC (exposición solar crónica)

ESPES (espesor),

EVEN (eventos de mala evolución clínica considerados de forma global durante el seguimiento),

EXT.INC (extirpación incompleta del tumor primario),

FFPE (Formalin Fixed Parafin embeded tissue sections)

FISH (Hibridación in situ de fluorescencia)

FR (factor de riesgo)

FYN o SYN (src/yes-related novel gene)

GBD (grado de diferenciación bueno),

H&E (Hematoxilina y eosina)

HIF-1 (Hypoxia-inducible factor-1)

HIS (Hibridación in situ)

HPV (virus de papiloma humano)

H-ras (Harvey rat sarcoma viral oncogen homolog)

hsa (Homo sapiens)

Hsp70 (The 70 kilodalton heat shock response protein)

IC (intervalo de confianza)

IH (inmunohistoquímica)

IIIT (infiltrado inflamatorio intratumoral intenso),

IIPT (infiltrado inflamatorio peritumoral intenso),
ILE (Intervalo libre de enfermedad)
ILV (infiltración linfovascular),
INK4 (INHibitor Kinase 4)
IPN (infiltración perineural),
ISH (in situ hybridization)
IUAC (International Union Against Cancer),
JAG1 (Jagged 1 protein)
LAT (latencia)
LNA (Locked nucleic acid)
LOC (localización de alto riesgo),
LOH (Loss of heterozigosity)
LOWESS (locally weighted scatterplot smoothing)
M (en referencia a concentración, molar; en referencia al sexo, mujer)
MAPK (Mitogen activated protein kinases)
Me (mediana)
MEC (matriz extracelular)
MEK o MAKK (Mitogen-activated protein kinase kinase)
mM (milimolar)
MM (en referencia al método de QPCR, Master Mix; en otro context, miembros)
mm (milímetros)
MM-9 (metaloproteinasa 9)
mmu (Mus musculus)
mTOR (mammalian target of rapamycin)
N (tamaño de la muestra/número de pacientes)
N.S. (no significativo)
N+ (desarrollo de metástasis ganglionares durante el seguimiento),
NaCl (Cloruro sódico)
NBT (4-nitro azul de tetrazolio)
NCCN (National Comprehensive Cancer Network)
NF-kB nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

ng (nanogramo)
nt (nucleótido)
OMS (Organización Mundial de la Salud)
OR (Odds ratio)
P (brazo corto del cromosoma)
P (p valor)
Pab.EGFR (patrón aberrante de expresión de EGFR)
PBS (phosphate buffered saline)
PCEXT (patrón de crecimiento expansivo),
PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular)
PDK-1 (Phosphoinositide-dependent kinase-1)
PG.TNM (progresión del TNM durante el seguimiento),
PI3K (Fosfoinositol 3-quinasa)
PILA (angioendotelioma papilar intralinfático)
PKC (Protein kinase C)
PTEN (Phosphatase and tensin homolog
q (brazo largo del cromosoma)
QA (queratosis actínica)
QPCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction)
R.I. (Rango intercuartílico)
RAF (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma protein)
RAS (Rat sarcoma protein)
RECLOC (recidiva local),
RISC RNA-induced silencing complex
rpm (revoluciones por minuto)
RQ (Relative Quantity)
SDF-1 (stem derived factor-1)
SEX (sexo mujer),
SHH (Sonic hedgehog)
SHIP2 (SH2-containing inositol phosphatase)
SMAD (mothers against decapentaplegic' (Mad))

SNAI2 (snail family zinc finger 2)
SRC (sarcoma protein)
SRCASM (SRC-Activating and Signaling Molecule)
STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription)
T-AJCC (estadio T2 según la clasificación de la AJCC),
TAM (tamaño),
T-BWH (estadio T2b según la clasificación del Brigham and Women's Hospital),
TEM (transición epitelio mesénquima)
TGF (tumor growth factor)
TI-DX (tiempo hasta el diagnóstico menor de 2 meses),
TIFF (Tagged Image File Format)
TMA (Tissue microarray)
TNM (Tumor Nodes Metastases)
TOS (trasplante de órgano sólido)
TPA (12-O-tetradecanoforbol-13-acetato)
TRBP (TAR RNA binding protein)
TSG (Tumor necrosis factor-inducible gene)
UCSF (University of California, San Francisco)
ULC (ulceración),
UTR (untranslated region)
UV (ultravioleta)
V.CTO (velocidad de crecimiento rápida –más de 5 mm / mes -),
vs (versus)
WNT (Wingless iNTEGRation site 1 gene)
ZD (zona diferenciada)
ZEB (Zinc finger E-box-binding)
ZI (zona indiferenciada)

