



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

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

PROGRAMA DE DOCTORAT EN MEDICINA

DEPARTAMENT DE MEDICINA



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Mecanismos epigenéticos con valor pronóstico
en el carcinoma escamoso cutáneo

TESIS DOCTORAL

Eugenia Hernández Ruiz

Barcelona, 2019

PROGRAMA DE DOCTORAT EN MEDICINA

DEPARTAMENT DE MEDICINA



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Mecanismos epigenéticos con valor pronóstico
en el carcinoma escamoso cutáneo

Autor: Eugenia Hernández Ruiz

Tutor: Vicente García-Patos Briones

Directores:

Vicente García-Patos Briones

María Inmaculada Hernández-Muñoz

Agustí Toll Abelló

Barcelona, 2019

A mi familia, en especial a mis padres, a mi
marido Jaume y a mi pequeño proyecto en camino

AGRADECIMIENTOS

Todos los grandes caminos empiezan por un primer paso, que puede parecer casual, poco importante y quizás, no tan trascendente, pero sin duda todo tiene un inicio. El mío fue en la Universitat de Lleida. Ahí recibí mis primeras clases de ciencias básicas y más tarde de Medicina. Aún recuerdo que, aunque me gustaban asignaturas como la Biología Molecular, mis ansias por aprender del cuerpo, enfermedades y tratamientos, hacía que lo viera como un peaje previo a asignaturas como Patología General, Cardiología, entre otras. Poco sabía yo, que a mis veintitantos, me recordaría sentada en aquellas clases, aprendiendo de ciclo celular, varios años después. Todo escíclico.

Tras el MIR y por recomendación del Servicio de Dermatología de Lleida decidí emprender la residencia en el Hospital Clínic de Barcelona, una aventura! Aquí aprendí que la Medicina estaba fuera de los libros, la primera biopsia cutánea, la primera agenda de R4 con pacientes propios, creo que aquí crecí, como persona y como dermatóloga incipiente que, el paso de los años y las experiencias acumuladas, han ido remodelando hasta convertirme en la persona que soy hoy.

Pero el debut como adjunta fue en el Hospital del Mar. Fue el gran salto y no pudo ser en mejor compañía. Seguir aprendiendo de mano de profesionales y grandes personas, que me arroparon desde el primer día como una más. Recuerdo ir a trabajar y, desde el autobús, ver el mar y el amanecer. Ya era una forma bonita de empezar el día. Allí conocí, entre otros, a Agustí Toll. Tuve la oportunidad de que me dejaran participar en un estudio sobre transición epitelio-mesénquima en carcinoma escamoso. Así, de su mano y de la Emili Masferrer conocí qué eran los *tissue microarrays*, las técnicas de inmunohistoquímica y lo que significa el esfuerzo.

Gracias a Ramon M. Pujol pude formar parte del Grup de Recerca en Malalties Inflamatòries i Neoplàsiques Dermatològiques. Así conocí a Inma, qué mujer.

Con ella he aprendido la constancia, la resiliencia y a luchar, siempre. Gracias Inma, no sólo por enseñarme cómo se hace una reacción en cadena de la polimerasa o qué es Polycomb, me has ido enseñando más que eso. A no rendirse, jamás. Gracias por tu disponibilidad, siempre e incondicional. Ojalá pueda seguir disfrutando de tu ejemplo más tiempo.

Y entonces llegué a Vall d'Hebron. Tengo la suerte de contar con unos compañeros de trabajo, grandes personas, que siempre me han ayudado y apoyado durante este camino de la tesis doctoral. Gracias a la patóloga, Berta Ferrer, por ayudarme a valorar la inflamación. Del Servicio quiero agradecer, especialmente, a mi jefe, el Dr. Vicente García-Patos. Gracias por estar a mi lado, por estar disponible en el despacho a las 7.30, por estar disponible al teléfono siempre y ayudarme a mantener la calma. Gracias.

Decidí empezar el doctorado y no pude elegir mejores directores. Agustí, Inma y Vicenç; tres grandes profesionales de los que he intentado aprender lo máximo que he podido y, aunque siento que necesitaría más tiempo para aprender, ya que en cada conversación con ellos, en cada comentario durante la elaboración de la tesis, se me abrían otros horizontes para ampliar e investigar, espero no haberles defraudado.

También quiero agradecer al resto de autores y a mi compañera de trincheras, con la que he compartido más de una llamada y miedos, suerte también en tu doctorado, Irene García.

Al acabar el día, y con la lección aprendida uno vuelve a su hogar. Hogar, según la Real Academia Española, puede tener hasta 6 significados. Yo me quedo con el de *familia*, *grupo de personas emparentadas que viven juntas* y me atrevería a añadir que es el refugio al acabar el día.

Quizás os he dejado para el final porque para mí, el final siempre ha sido la mejor parte, el momento más deseado y esperado. Así sois vosotros, mi parte más íntima y la que, realmente hace de mí quien soy.

Gracias a mis padres, no sé ni por dónde empezar. Por cuidarme siempre y ser las personas que me quieren de forma más incondicional. Por confiar en mí, desde el día uno. Por enseñarme que las cosas que valen la pena no se construyen en un día y, es ese esfuerzo y esa entrega, lo que va incrementando el valor del resultado final. Gracias por ser mi orgullo.

Gracias a mi hermano pequeño, que ya no lo es tanto... Guillermo. Siempre habrá un hilo que nos unirá, más allá del tiempo, más allá de las diferencias, más allá de la vida. Gracias a ti, Miriam, por ser mi cuñada y mi hermana en tantas ocasiones, gracias por apoyarme siempre.

Por último, gracias a ti Jaume. Por ser mi marido, mi amigo, mi refugio, mi compañero de batalla, de trayectos de coche, de victorias, de fracasos, de subidas y bajadas. Por estar a punto de ser el padre de nuestro mayor proyecto.

Y finalmente a ti, pequeño proyecto que creces dentro de mí. Gracias, porque aún no te conozco pero presiento que vas a ser mi Doctorado definitivo. Algún día te contaré que, aunque quizás las primeras palabras que oíste desde lo más profundo de mi ser, fueron Polycomb, tinciones inmunohistoquímicas, fibrosis... naciste rodeado de amor y esfuerzo, como la vida. Te esperamos, dispuestos a darte la mejor versión de nosotros.

ABREVIATURAS

CEC: carcinoma/s escamoso cutáneo/s

CCNM: cáncer cutáneo no melanoma

CBC: carcinoma/s basocelular/es

RUV: radiación ultravioleta

VPH: virus del papiloma humano

TOS: trasplantados de órgano sólido

EB: epidermólisis bullosa

EBDR: epidermólisis bullosa distrófica recesiva

QA: queratosis actínica/s

KIN: neoplasia intraepitelial queratinocítica (*“keratinocytic intraepithelial neoplasia”*)

TEM: transición epitelio-mesénquima

CECAR: carcinoma escamoso de alto riesgo

AJCC: American Joint Committee on Cancer

BWH: Brigham and Women’s Hospital

IPN: invasión perineural

FAC: fibroblastos asociados acáncer

PRC2: Polycomb repressive complex 2

PRC1: Polycomb repressive complex 1

PcG: Polycomb group proteins

TMA: tissue microarrays

WB: Western Blot

HE: hematoxilina-eosina

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	8
1. Epidemiología	
2. Factores de riesgo	
3. Clínica del carcinoma escamoso cutáneo (CEC)	
4. Estadificación	
5. Carcinoma escamoso cutáneo de alto riesgo (CECAR)	
6. Factores pronóstico	
7. Biomarcadores de progresión metastásica	
8. Componente no epitelial del carcinoma escamoso cutáneo	
9. Bases moleculares del CEC	
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	27
RESULTADOS	29
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES.....	48
LÍNEAS DE FUTURO.....	50
BIBLIOGRAFÍA	52
ANEXO	66

INTRODUCCIÓN

“Caminando en línea recta no puede uno llegar muy lejos.”

Le petit Prince. Antoine de Saint-Exupery.1943

INTRODUCCIÓN

1. EPIDEMIOLOGÍA

El carcinoma escamoso cutáneo (CEC) es el segundo cáncer cutáneo no melanoma (CCNM) más frecuente, tras el carcinoma basocelular (CBC). Según un reciente meta-análisis ¹ la tasa de incidencia global de CEC en España es de 38,16 (IC 95% 29,82-46,49)/100.000 personas-año y está en aumento debido a factores como el envejecimiento de la población, la práctica de actividades al aire libre y un número creciente de pacientes inmunosuprimidos iatrogénicamente por medicación.



Figura 1: Imagen de un carcinoma escamoso en la mejilla.

2. FACTORES DE RIESGO

Los principales factores de riesgo para el desarrollo de CEC son la exposición a determinados factores ambientales, especialmente a la radiación ultravioleta (RUV), la inmunosupresión, la infección por el virus del papiloma humano (VPH) y determinados síndromes genéticos que predisponen a la aparición de CEC y favorecen un comportamiento metastático.

2.1 La radiación ultravioleta y otros factores ambientales

La RUV se ha clasificado como un carcinógeno clase I por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) ya que es capaz de iniciar, promover y favorecer la progresión del CEC. Induce mutaciones en genes supresores de tumores y en oncogenes, mediante la formación de dímeros de pirimidina^{2,3}. Los pacientes con mayor riesgo de desarrollar CEC son aquellos con fototipos bajos y con mucha radiación solar acumulada.

Los queratinocitos son capaces de reparar el daño producido por la RUV gracias a la activación de la síntesis de la proteína p53 que induce la apoptosis de los queratinocitos con el DNA dañado⁴. Si la expresión de p53 se ve alterada, bien por silenciamiento o por mutación, se pierde este control del ciclo celular y los queratinocitos con el DNA modificado proliferan de forma descontrolada dando lugar a lesiones precancerosas y a CCNM⁵.

La RUV-B tiene un papel fundamental en el inicio del proceso de carcinogénesis, mientras que la RUV-A estaría más implicada en la promoción y progresión tumoral ya que inhibe la reparación del ADN y, mediante la inducción de metaloproteinasas, aumentaría la agresividad del tumor⁶.

Otros factores ambientales que pueden inducir el desarrollo de CEC son las radiaciones ionizantes⁷, el arsénico⁸, presente en pesticidas, y la exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos⁹.

Algunos tratamientos farmacológicos pueden aumentar la fotosensibilidad cutánea y de esta manera favorecer la aparición de CEC, como el voriconazol, antifúngico empleado para tratar infecciones fúngicas invasivas^{10,11}.

2.2. Inmunosupresión y pacientes trasplantados de órgano sólido (TOS)

Los pacientes trasplantados de órgano sólido (TOS) tienen de 65 a 250 veces más riesgo de desarrollar CEC que la población general, y los CEC en estos pacientes presentan una peor diferenciación histológica y mayor agresividad¹², así como una tasa de mortalidad superior a la de la población no trasplantada, llegando a ser dicha tasa de hasta 4.9/100.000 pacientes¹³.

Algunos de los factores de riesgo para el desarrollo de CCNM en pacientes TOS identificados son el sexo masculino y una edad de más de 50 años. La mayoría de los CEC se desarrollaron a los 6 años del trasplante y se localizaban en cabeza y cuello. Los pacientes que habían recibido trasplante hepático desarrollaron menos CCNM debido a una menor necesidad de tratamiento inmunosupresor¹⁴.

Otro factor de riesgo reconocido es la duración del tratamiento inmunosupresor y el tipo de fármaco empleado. En 2012 se publicó el estudio TUMORAPA en el que se observó que la sustitución del tratamiento con inhibidores de la calcineurina por sirolimus, después de haber desarrollado el primer CEC post-trasplante, alargaba el tiempo libre hasta desarrollar el segundo CEC¹⁵.

2.3. La infección por el virus del papiloma humano (VPH)

El virus del papiloma humano (VPH) son grupos diversos de virus ADN que pertenecen a cinco de 18 géneros de la familia Papillomaviridae: alfa, beta, gamma, mu y nu¹⁶ y que replican específicamente en el núcleo de las células epiteliales escamosas. La IARC considera que existen dos tipos de VPH: los de alto y los de bajo riesgo oncológico. El papel patogénico del VPH de alto riesgo que afecta a mucosas, como el VPH16, se ha demostrado en carcinomas escamosos de cérvix¹⁷ así como en carcinomas anogenitales y de orofaringe.

Se ha demostrado que los CEC localizados en pene con infección por VPH tienen mejor pronóstico¹⁸. Aunque se desconocen los mecanismos moleculares, es posible que la sobreexpresión de p16 que se observa en los CEC en los que se detecta VPH sea responsable de la inhibición de la división celular, la linfangiogénesis y las metástasis linfáticas en los dichos tumores.

El papel de los β -VPH, como el VPH5 y 8, en CEC es controvertido, con estudios a favor de su implicación en la patogenia¹⁹ y otros en los que no se encuentra asociación entre los β -VPH y la progresión metastásica del CEC²⁰.

2.4. Síndromes genéticos que predisponen a CCNM

Existen diferentes síndromes genéticos que predisponen a CCNM. Estos síndromes se caracterizan por alteraciones genéticas que afectan los mecanismos de reparación de ADN (xeroderma pigmentosum), la producción de melanina (albinismo) o insuficiencias de la médula ósea (anemia de Fanconi), entre otros²¹.

Los pacientes afectados de epidermólisis bullosa (EB), que presentan una fragilidad cutánea aumentada, tienen un riesgo mayor de desarrollar CEC; en especial, las formas distróficas recesivas (EBDR) y junturales^{22,23}, de hecho, la causa más frecuente de muerte en adultos afectados de EBDR era el CEC metastásico²².

3. CLÍNICA DEL CARCINOMA ESCAMOSO CUTÁNEO

La queratosis actínica (QA) es la lesión precursora más frecuente del CEC. Se presenta como una mácula o pápula eritematosa con una escamo-costra en su superficie, generalmente en zonas de piel fotoexpuesta de pacientes con fototipos bajos²⁴.

El diagnóstico de la QA es clínico. Se ha sugerido una escala para evaluar la gravedad clínica de cada lesión²⁵: Grado I o leve: lesiones ligeramente palpables (casi imperceptibles visualmente); grado II o moderada: lesiones más gruesas que se palpan y se ven con facilidad y grado III o severa: lesiones gruesas e hiperqueratósicas.



Figura 2: Queratosis actínicas grado III en hélix de la oreja de un paciente de edad avanzada

Desde el punto de vista histológico, las lesiones se caracterizan por la presencia de queratinocitos con núcleos atípicos, grandes, irregulares e hiper cromáticos en la capa basal de la epidermis interfolicular que presentan un crecimiento desorganizado.

La clasificación histológica de las lesiones se realiza en función del porcentaje de queratinocitos displásicos respecto el espesor total de la epidermis²⁶: KIN I (del inglés “*keratinocyte intraepithelial neoplasia*”; neoplasia intraepitelial queratinocítica) o QA grado I cuando sólo afectan al tercio basal y no hay afectación del epitelio folicular; KIN II: existe afectación de los dos tercios basales y KIN III o CEC in situ: existe afectación del espesor de la epidermis.

Las tasas de regresión de las QA son variables según los estudios publicados, oscilando desde un 21%²⁷ hasta un 76%²⁸.

Las dos vías descritas para la transformación de una QA en CEC son:

-Vía clásica: La transformación se produce mediante la desdiferenciación completa de la epidermis, es decir, por el paso secuencial desde KIN I hacia KIN III.

-Vía diferenciada: El CEC se origina a partir de los queratinocitos atípicos del tercio basal de la epidermis, estando respetados los otros 2/3, es decir, CEC originados a partir de lesiones de bajo grado o KIN I. Fernández-Figueras y colaboradores han demostrado que el desarrollo de CEC a partir de QA grado I no es infrecuente y conduciría a CEC más agresivos²⁹ debido a la inducción de la expresión de proteínas implicadas en la transición epitelio-mesénquima (TEM)³⁰.

A pesar de que se ha propuesto que la extensión de los queratinocitos atípicos al epitelio folicular puede estar asociado con un riesgo mayor de desarrollo de CEC como en el caso de las QA proliferativas³¹, clínicamente es imposible predecir la progresión de una determinada QA hacia CEC, por lo que se recomienda el tratamiento de estas lesiones y del campo de cancerización³².

De forma similar, los factores que favorecen la transformación a CEC con elevado poder invasivo y metastásico o a carcinoma escamoso cutáneo de alto riesgo (CECAR) todavía son desconocidos, por lo que la predicción de una posible evolución metastática del CEC es igualmente difícil de establecer³³.

4. ESTADIFICACIÓN

Se han descrito diferentes sistemas de clasificación que ayudan a predecir el riesgo metastásico pero los más empleados son la clasificación de la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) y la escala de Brigham and Women's Hospital (BWH) (Tabla 1).

La AJCC ha publicado recientemente la nueva clasificación AJCC8³⁴ pero sólo para CEC localizados en cabeza y cuello. Los tumores con un diámetro >4cm, erosión ósea mínima, invasión perineural de nervios grandes o subdérmicos y la profundidad tumoral >6mm pasan a ser un estadio T3. La diferenciación no se incluye en la clasificación AJCC8 y ponen de manifiesto la necesidad de homogeneizar su definición para que sea reproducible y se incluya en futuras clasificaciones.

Roscher y colaboradores creen que el sistema Breuninger es el mejor sistema para estadiar por su sencillez, ya que sólo se basa en el diámetro y la profundidad tumoral³⁵.

AJCC8		BWH	
Categoría T	Criterio	Categoría T	Criterios
Tx	El tumor primario no se puede identificar	T1	0 factores de riesgo*
Tis	Carcinoma in situ	T2a	1 factor de riesgo
T1	Tumor con un diámetro <2 cm	T2b	2-3 factores de riesgo
T2	Tumor con un diámetro ≥2cm pero <4cm	T3	≥4 factores de riesgo
T3	Tumor con un diámetro ≥4cm o erosión ósea mínima o invasión perineural, de nervios > 0.1mm o en dermis profunda, invasión profunda>6mm o más allá del tejido celular subcutáneo		
T4	Tumor con invasión ósea, invasión de la base del cráneo o del foramen oval		
T4a	Tumor con invasión ósea cortical		
T4b	Tumor con invasión de la base del cráneo o del foramen oval		

*Factores de riesgo:
 Diámetro tumoral ≥2 cm, mala diferenciación histológica, invasión perineural de nervios ≥0.1 mm, invasión más allá del tejido graso (excluyendo la invasión ósea, que conlleva clasificación en estadio T3)

Tabla 1. Sistema de clasificación AJCC8 Y Brigham and Women's Hospital.

5. CARCINOMA ESCAMOSO CUTÁNEO DE ALTO RIESGO

El término de carcinoma escamoso de alto riesgo o CECAR³³ se está utilizando en la actualidad para definir aquellos CEC en los que los queratinocitos tumorales son capaces de invadir la membrana basal y presentan un alto riesgo de desarrollar metástasis subclínicas, siendo clínicamente N0.

Los criterios mayores diagnósticos de CECAR son: presentar síndromes genéticos que predispongan a padecer CEC (Xeroderma pigmentosum, albinismo), trasplantados (corazón o pulmón) o afectados de enfermedades hematológicas, ciertas localizaciones (anogenital, labio, oreja), recurrencia tumoral, diámetro > 5cm, profundidad >6mm, invasión perineural (nervios de diámetro ≥ 0.1 mm) e invasión ósea.

Como criterios menores estarían: aparición en pacientes trasplantados, diámetro tumoral de 2 a 5 cm, pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana, espesor tumoral de 2 a 6mm, mala diferenciación histológica, CEC acantolítico y basoescamoso e invasión linfo-vascular.

Se considera CECAR cuando el tumor cumple: a) 3 criterios mayores, b) 2 mayores y 2 menores y c) 1 mayor y 4 menores³³.

6. FACTORES PRONÓSTICO

6.1. Tamaño tumoral

El tamaño tumoral es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de metástasis. Dos cm es el punto de corte establecido entre los estadios T1 y T2, al igual que diámetros iguales o superiores a 4cm determinan el estadio T3 en la nueva clasificación AJCC8³⁴.

6.2. Espesor tumoral

En un estudio prospectivo con 615 pacientes afectados de CEC se halló que un espesor tumoral igual o superior a 6mm era un factor de riesgo independiente para el desarrollo de metástasis³⁶.

6.3. Localización

Los CEC que se presentan en determinadas localizaciones como el pabellón auricular, sien y zonas no fotoexpuestas (periné, zona sacra y plantas) tienen un mayor riesgo de desarrollar metástasis³⁷. Asimismo, se han descrito tasas del 3% y del 7% de recurrencia local y metástasis, respectivamente, para CEC localizados en los labios³⁸. Los CEC localizados en bermellón labial tienen un riesgo mayor de desarrollar metástasis³⁹, probablemente debido a la ausencia de tejido celular subcutáneo y un acceso más rápido a la red linfocelular.

6.4. Invasión perineural

La invasión perineural (IPN) consiste en la presencia de células tumorales en la vaina nerviosa lo que favorece la diseminación tumoral⁴⁰. La IPN se ha asociado a otros factores de riesgo como desmoplasia, mala diferenciación histológica, recurrencia, tumores de mayor diámetro y de localización centrofacial; así como la necesidad de un mayor número de etapas de cirugía de Mohs para asegurar la exéresis completa⁴¹.

Se ha clasificado la IPN en función del diámetro del nervio afecto, diferenciando nervios de pequeño calibre (menor a 0.1mm) y de gran calibre (mayor o igual a 0.1mm). La afectación de nervios de gran calibre se ha asociado a recurrencia, metástasis locales y a distancia, muerte específica por enfermedad, dolor, diámetro tumoral mayor de 2 cm, profundidad tumoral mayor de 4mm e invasión vascular y/o linfática⁴²⁻⁴⁴.

A nivel terapéutico, la radioterapia adyuvante puede ser útil en casos de CEC con IPN extensa (>2 nervios) y cuando hay afectación de nervios con un diámetro ≥ 0.1 mm o profundos⁴⁵.

7. BIOMARCADORES DE PROGRESIÓN METASTÁTICA DEL CEC

El CEC es un tumor poco metastásico, y sólo un 5% de los CEC desarrolla metástasis. Sin embargo, una vez se ha generado la metástasis, el pronóstico empeora con una tasa de supervivencia a los 10 años menor al 20%⁴⁶. Esto ha llevado a la búsqueda de nuevos biomarcadores que permitan la identificación de aquellos CEC con capacidad para diseminarse.

7.1. Gemación tumoral o “tumor budding”

El “*tumor budding*” o gemación tumoral se describió por primera vez en carcinoma colorrectal. La definición más aceptada es la presencia de grupos de células tumorales aisladas o menores de 5 células en el frente de avance del tumor⁴⁷. Las células que forman estas gemas tumorales tienen un perfil de expresión génica diferente y expresan genes implicados en supervivencia y migración celular y algunos autores han demostrado que han sufrido el fenómeno de transición epitelio-mesénquima⁴⁸.

La presencia de gemación tumoral se ha visto asociada a factores de mal pronóstico como recurrencias, invasión linfovascular y menor supervivencia a corto y largo plazo en carcinoma colorrectal⁴⁹ y al desarrollo de metástasis en carcinomas escamosos de lengua⁵⁰, de cabeza y cuello⁵¹ y carcinomas escamosos cutáneos, tanto en pacientes inmunocompetentes⁴⁷ como en pacientes trasplantados⁵².

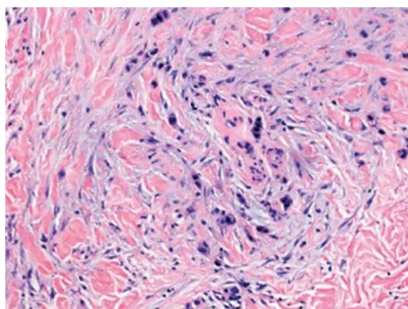


Figura 3: Imagen de gemación tumoral o “tumor budding”. Pequeños nidos de células tumorales rodeados por reacción estromal

7.2. Podoplanina

La podoplanina es una glicoproteína de membrana implicada en la formación de conexiones linfáticas durante el desarrollo embrionario y en procesos de migración celular. Su expresión se encuentra elevada en diferentes procesos tumorales, incluyendo carcinoma escamoso de esófago⁵³, mesotelioma pleural⁵⁴ y melanoma⁵⁵. En CEC la expresión de podoplanina se ha visto asociada al desarrollo de metástasis^{56,57} así como con otros factores de riesgo como desmoplasia, la invasión linfovascular, la ulceración y la mala diferenciación histológica, pero no con IPN⁵⁷.

7.3. Transición epitelio-mesénquima (TEM)

La transición epitelio-mesénquima (TEM) es un proceso fisiológico esencial en embriogénesis y en cicatrización, pero también en el desarrollo de metástasis⁵⁸. A nivel molecular, la TEM está mediada por factores de transcripción como Snail, Twist y ZEB, Las células tumorales que sufren la TEM pierden la adhesión intercelular, debido a la reducción de E-cadherina, y adquieren un fenotipo mesenquimal, por la inducción de vimentina, proceso que les ayuda a migrar e invadir, favoreciendo la implantación de estas células a distancia y el desarrollo de metástasis⁵⁸. La TEM se ha visto implicada en el desarrollo de CEC invasivos a partir de queratosis actínicas mediante la vía diferenciada³⁰ y en el desarrollo de metástasis en CEC⁵⁹.

8. COMPONENTE NO EPITELIAL DEL CARCINOMA ESCAMOSO CUTANEO

8.1. Fibroblastos asociados a cáncer

El papel de los fibroblastos asociados a cáncer (FAC) ha sido ampliamente estudiado en diferentes tumores sólidos y su presencia y función están asociadas a mal pronóstico en cáncer de mama⁶⁰, pulmón⁶¹, colangiocarcinoma⁶² y carcinoma papilar de tiroides⁶³, entre otros.

Los FAC asociados a CEC expresan podoplanina, factores de transcripción implicados en TEM y α -SMA, lo que aumenta su capacidad contráctil⁶⁴. Son más fusiformes e indiferenciados que los fibroblastos aislados de piel sana y al cultivar líneas celulares de CEC, SCC12 y SCC13, con FAC, las células tumorales aumentan su invasividad⁶⁵.

8.2. Infiltrado inflamatorio

La noción del control del crecimiento tumoral por parte del sistema inmunitario no es reciente, aunque en el caso del CEC son relativamente novedosos los estudios que abordan esta posibilidad. Huang y colaboradores demuestran en una serie de CEC que el tratamiento con imiquimod, previo a la cirugía, aumenta el número de linfocitos CD8+ en el estroma tumoral, lo que se traduce en un mayor número de células tumorales en apoptosis (evaluada por la tinción TUNEL)⁶⁶.

Algunos autores han observado que los CEC invasivos tienen mayor intensidad de infiltrado tumoral pero con mayor proporción de linfocitos CD3+, respecto las QA⁶⁷.

En pacientes trasplantados se ha observado una reducción en el infiltrado inflamatorio en el frente de avance del tumor⁶⁸.

8.3. PD-1/PD-L1

PD-1 o CD279 se expresa en diferentes células del sistema inmune (como linfocitos activados, linfocitos B, monocitos, células natural Killer y algunas células dendríticas) mientras que PD-L1 o CD274 es expresado por las células tumorales. La interacción entre PD-1 y PD-L1 inhibe la respuesta inmune antitumoral y favorecería su diseminación⁶⁹. En CEC, la expresión de PD-L1 en las células tumorales se ha visto asociado a metástasis⁷⁰ y a otros factores de mal pronóstico como la gemación tumoral, recurrencia e IPN^{71,72}.

9. BASES MOLECULARES DEL CEC

La carcinogénesis se define generalmente como un proceso multietapas: las alteraciones en la expresión de un gen, generalmente un gen supresor tumoral, permiten o favorecen el desarrollo de lesiones precancerosas y es la acumulación de otras alteraciones en la expresión génica, de entre 4-6 genes, las que desencadenan el desarrollo de CEC invasivo⁷³. Los cambios en la expresión génica pueden deberse a alteraciones en el ADN o a modificaciones en la expresión de los genes mediante mecanismos que no afectan la secuencia del ADN, o mecanismos epigenéticos.

9.1. Modificaciones genéticas

Se han descrito diferentes mutaciones tanto en QA como en CEC en genes reguladores del ciclo celular, tales como p53, MYC y el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), entre otros^{74,75}.

Las mutaciones en p53, inducidas por RUV-B, están presentes en piel fotoexpuesta⁷⁶ y se han visto asociadas al desarrollo de QA y CEC⁷⁷.

En CEC se han observado ganancias en el número de copias del gen MYC, sobretodo en CEC moderado y pobremente diferenciados⁷⁸, así como, aberraciones numéricas del gen EGFR, éstas últimas sin implicación pronóstica⁷⁹.

Ras es una familia de receptores transmembrana que activan la vía Ras/Raf/Mek/Erk y actúan como factores de transcripción. Están mutados en diferentes tipo de cáncer y, en algunos tumores como el melanoma, pueden coexistir mutaciones en más de un componente de la vía, por ejemplo Ras y Raf⁸⁰. Los pacientes con melanoma con mutaciones en BRAF y en tratamiento con inhibidores de BRAF (vemurafenib) pueden desarrollar CEC, que suelen ser bien diferenciados, no desarrollan metástasis y con tasas de mutación en Ras superiores a las que se encuentran en CEC

esporádicos^{81,82}. Algunos autores han visto asociación entre la presencia de mutaciones en la vía Ras/Raf/Mek/Erk y menor tiempo libre de enfermedad⁸³.

Las mutaciones en el gen NOTCH, que codifica por un receptor transmembrana implicado en diferentes vías de señalización celular implicadas en el desarrollo, es uno de los genes más frecuentemente mutados tanto en CEC esporádicos⁸³⁻⁸⁵ como en los CEC originados en pacientes con melanoma con mutación en BRAF en tratamiento con vemurafenib, aunque en este grupo de pacientes aumenta el porcentaje de mutaciones en RAS⁸⁴ y se producen ya de forma precoz en el proceso de carcinogénesis⁸⁵.

Pickering y colaboradores demuestran la asociación entre mutaciones en NOTCH2 e IPN, mutaciones en el gen AJUBA y una mayor profundidad tumoral y mutaciones en KMT2C y menos supervivencia y menos tiempo libre de recurrencias⁸⁶; Yilmaz demuestra que las mutaciones en el gen KMT2D, implicado en el remodelado de la cromatina, se asocia al desarrollo de metástasis⁸⁵ y Purdie asocia las mutaciones en el gen PTPRD, implicado en la reorganización del citoesqueleto, con mal pronóstico en CEC⁸⁷.

Purdie y colaboradores realizan un estudio de SNP (*"single nucleotide polymorphism"*) en 60 CEC. La aberración cromosómica más frecuente es la pérdida de heterocigosidad en 9p, que contiene el locus del gen PTPRD, seguido de 3p. Observan que los CEC bien diferenciados tienen menos alteraciones alélicas⁸⁸.

9.2. Modificaciones epigenéticas: Polycomb

La secuencia de ADN se enrolla alrededor de unas proteínas llamadas histonas para formar el nucleosoma o unidad de cromatina. Las histonas tienen una forma globular pero sus extremos N-terminal libres pueden ser modificados mediante procesos de acetilación, metilación o fosforilación, lo que se conoce como modificaciones

epigenéticas. La transcripción de la cromatina depende de su conformación, que la hará más o menos accesible a factores de transcripción.

La familia Polycomb engloba un grupo de proteínas que producen modificaciones epigenéticas de la cromatina resultando, generalmente, en una represión de la transcripción. Se han identificado dos grandes complejos en mamíferos: el complejo Polycomb repressive complex 2 (PRC2) o iniciador, ya que es el que establece la silenciamiento de genes, y el complejo Polycomb repressive complex 1 o PRC1, que mantendría dicho estado.

EZH2 es la proteína central de PRC2. Es una metiltransferasa que trimetila la lisina 27 de la histona 3. En modelos experimentales, se ha visto que EZH2 favorece la detención de las células en la fase S del ciclo y aumenta la proliferación⁸⁹. El complejo PRC1 reconoce la trimetilación H3K27me3 impuesta por EZH2. RING1A y RING1B presentan actividad enzimática, ya que monoubiquitinan la lisina 119 en la histona 2A, lo cuál contribuye a mantener cromatina más cerrada.

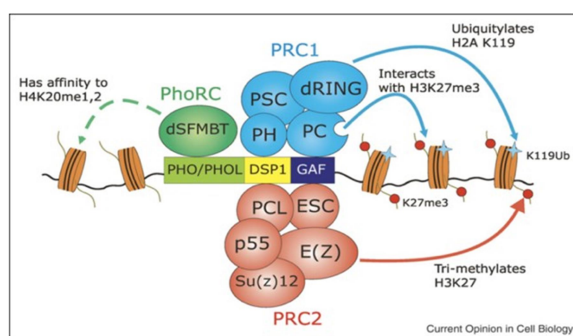


Figura 4: Esquema simplificado de la interacción de los dos complejos Polycomb, PRC1 y PRC2. Imagen extraída del artículo: Schwartz YB, Pirrotta V. Polycomb complexes and epigenetic states. *Curr Opin Cell Biol.* 2008 Jun;20(3):266-73.

BMI1 (“B-lymphoma Moloney Murine leukemia virus insertion region-1”) fue el primer miembro de la familia de proteínas Polycomb identificado en mamíferos. Inhibe p16^{INK4a} y p14^{ARF}, dos represores del ciclo celular. Se ha visto implicado en la auto-renovación de las células madre^{90,91} y está sobreexpresado en leucemias y meduloblastomas⁹². RING1B se ha visto sobreexpresado en adenocarcinoma de páncreas⁹³ y en cáncer de mama, sobretudo en las células que invaden el estroma⁹⁴.

La expresión de proteínas PRC1 no se ha estudiado en CEC, pero sí en melanoma con resultados contradictorios, algunos autores ven asociación entre la sobreexpresión de BMI1 y el desarrollo de metástasis⁹⁵ y otros observan una reducción significativa en la expresión de BMI1 en melanoma versus nevus⁹⁶.

Respecto a las proteínas del complejo PRC2, el papel de EZH2 en cáncer se demostró por primera vez en el linfoma de Hodgkin⁹⁷. En carcinoma renal, la sobreexpresión de EZH2 se asocia al desarrollo de metástasis y mortalidad.

En tumores cutáneos se ha descrito un aumento secuencial en la expresión de EZH2, paralelo al grado de displasia, tanto en lesiones melanocíticas⁹⁸ como en lesiones queratinocíticas⁹⁹.

En melanoma se ha demostrado que la expresión de EZH2 es máxima en melanoma metastásicos¹⁰⁰ pero en lesiones queratinocíticas sólo se ha descrito un aumento de la expresión en el paso de QA a CEC pero se desconoce si hay diferencias en la expresión de EZH2 entre CEC que desarrollan metástasis versus los que no.

HIPÓTESIS

“Los baobabs comienzan por ser muy pequeños.”

Le petit Prince. Antoine de Saint-Exupery.1943

HIPÓTESIS

1. Proteínas de la familia de represores epigenéticos Polycomb están implicadas en el desarrollo de metástasis en CEC, tal como se ha demostrado en otros tumores sólidos.
2. El estroma tumoral, que participa activamente en el proceso de tumorigénesis, tiene características morfológicas diferenciadas en carcinomas escamosos cutáneos.

OBJETIVOS

“Será necesario que soporte dos o tres orugas si quiero conocer las mariposas.”

Le petit Prince. Antoine de Saint-Exupery.1943

OBJETIVOS

Objetivo principal:

Evaluar la implicación de los represores epigenéticos de la familia Polycomb y del estroma tumoral en el pronóstico del CEC.

Objetivos secundarios:

1. Correlacionar la expresión de Polycomb, mediante técnicas inmunohistoquímicas, con variables clínico-patológicas con valor pronóstico en una serie de CEC.
2. Explorar las vías de señalización en las que actúan los represores epigenéticos de la familia Polycomb en CEC.
3. Definir patrones de fibrosis y/o de tipos de estroma tumoral con valor pronóstico en CEC.

RESULTADOS

“El tiempo que perdiste en tu rosa hace que tu rosa sea tan importante.”

Le petit Prince. Antoine de Saint-Exupery.1943

RESULTADOS

Los resultados de esta tesis se muestran en los siguientes artículos:

- 1) Hernández-Ruiz Eugenia, Toll Agustí, García-Diez Irene, Andrades Evelyn, Ferrandiz-Pulido Carla, Masferrer Emili, Yébenes Mireia, Jaka Ane, Gimeno Javier, Gimeno Ramon, García-Patos Vicente, Pujol Ramon M, Hernández- Muñoz Inmaculada. The Polycomb proteins RING1B and EZH2 repress the pro- inflammatory function in metastasizing primary cutaneous squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*. Març 2018 doi: 10.1093/carcin/bgy016. Q1. IF 5.072

- 2) Hernández-Ruiz Eugenia, Hernández-Muñoz Inmaculada, Masferrer Emili, Ferrándiz-Pulido Carla, Andrades Evelyn, Gimeno Javier, Duran Xavier, García- Patos Vicente, Pujol Ramon M, Toll Agustí. A myxoid fibrotic reaction pattern is associated with metastatic risk in cutaneous squamous cell carcinoma. *Acta Derm Venereol*. January 2019, doi: 10.2340/00015555-3025. Q1. IF 3.127

Hernández-Ruiz Eugenia, Toll Agustí, García-Diez Irene, Andrades Evelyn, Ferrandiz-Pulido Carla, Masferrer Emili, Yébenes Mireia, Jaka Ane, Gimeno Javier, Gimeno Ramon, García-Patos Vicente, Pujol Ramon M, Hernández-Muñoz Inmaculada.

The Polycomb proteins RING1B and EZH2 repress the pro-inflammatory function in metastasizing primary cutaneous squamous cell carcinoma.

Carcinogenesis. 2018 Mar 8;39 (3): 503-513

Abstract

Cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC) is the second most common malignancy in humans and approximately 5% metastasize, usually to regional lymph nodes. Epigenetic regulation of gene expression may allow tumoral cells to acquire new functions in order to escape from the primary tumor. The aim of this study was to investigate the expression and function of proteins of the Polycomb family of epigenetic regulators in the metastatic process of cSCC. A higher expression of RING1B and EZH2 was detected by immunohistochemistry in a series of primary cSCC tumors that metastasized (MSCCs) when compared with non-metastasizing cSCCs (non-MSCCs). Stable downregulation of RING1B and EZH2 in cSCC cells results in enhanced expression of inflammatory cytokines and activation of the NF- κ B signaling pathway. Accordingly, non-MSCCs display higher levels of membranous pS176-inhibitor of NF- κ B kinase, and their stroma is enriched in neutrophils and eosinophils when compared with MSCCs. In vitro, hematopoietic cells exhibit a substantial migratory response to supernatants from Polycomb-depleted cSCC cells. Altogether, these data indicate that RING1B and EZH2 repress the innate inflammatory cSCC function and impair tumor immunosurveillance and suggest that patients with high-risk cSCCs could benefit from clinical therapies addressed to harness the immune response.

A Myxoid Fibrotic Reaction Pattern is Associated with Metastatic Risk in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma

Eugenia HERNÁNDEZ-RUIZ^{1,2#}, Inmaculada HERNÁNDEZ-MUÑOZ^{3#}, Emili MASFERRER⁴, Carla FERRÁNDIZ-PULIDO², Evelyn ANDRADES³, Javier GIMENO⁵, Xavier DURAN⁶, Vicente GARCÍA-PATOS², Ramon M. PUJOL¹ and Agusti TOLL¹

Departments of ¹Dermatology and ⁵Pathology, Hospital del Mar, Parc de Salut Mar, ²Department of Dermatology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, ³Group of Inflammatory and Neoplastic Dermatological Diseases and ⁶Methodological and biostatistical advisory service, IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), and ⁴Department of Dermatology, Hospital Universitari Mútua de Terrassa, Barcelona, Spain

[#]Both authors contributed equally to this work.

Although desmoplasia has been associated with poor prognoses in cutaneous squamous cell carcinoma, little attention has been paid to the patterns of fibrosis. This study aimed to examine the different stromal fibrotic patterns as markers of metastatic risk. We performed a multicenter retrospective study that included 102 cutaneous squamous cell carcinomas (52 non-metastatic and 50 metastatic carcinomas). Clinical and histopathological data were registered. The fibrotic reaction pattern was classified as mature, intermediate or immature depending on the presence of keloid-like collagen and myxoid stroma. The immature pattern (areas characterized by myxoid changes with no inflammation) was observed in 18 samples and its presence was significantly associated with immunosuppression, budding, desmoplasia, perineural invasion, anatomic level, tumoural depth and metastatic risk in the multivariate analysis. Our findings suggest that the presence of an immature myxoid fibrotic pattern, which can be easily identified by routine hematoxylin-eosin staining, is strongly associated with metastatic risk.

Key words: metastasis; fibrosis; cutaneous squamous cell carcinoma.

Accepted Aug 31, 2018; Epub ahead of print Sep 3, 2018

Acta Derm Venereol 2019; 99: 89–94.

Corr: Agustí Toll, Department of Dermatology, Hospital del Mar, Parc de Salut Mar, Universitat Autònoma de Barcelona, ES-08003 Barcelona, Spain. E-mail: atoll@parcdesalutmar.cat, atoll@clinic.cat

Metastatic cutaneous squamous cell carcinomas (MSCCs) usually involve the regional lymph nodes, and occur in approximately 4–5% of patients (1). Active research in cutaneous SCC (cSCC) is aimed at the identification of prognostic markers of clinical value that could help identify those patients at higher metastatic risk. Prominent clinical factors linked to an aggressive clinical behaviour and metastatic risk include tumoural size, immunosuppression and certain tumour locations such as the ears, lips and areas of chronic injury. Some histological parameters of the primary tumour, including depth, poor histological differentiation and perineural invasion have also been associated with poor prognosis (2–4).

Epithelial to mesenchymal transition (EMT), a mechanism by which epithelial cells lose adhesion and

SIGNIFICANCE

Cutaneous squamous cell carcinomas are the second most frequent non-melanoma skin cancers. Despite their generally good prognosis, approximately 2–5% metastasize, usually to regional lymph nodes. Recent works have elucidated the relevance of the tumour microenvironment, consisting of a stromal reaction, a vascular and lymphatic network and the presence of specific inflammatory cell subpopulations, in the development of metastases. In this study we have characterized different types of stromal reaction patterns in cutaneous squamous cell carcinoma, including desmoplasia, and have found that the presence of a myxoid peritumoral infiltration, easily recognisable by hematoxylin eosin stains, is associated with an increased metastatic risk.

acquire mesenchymal traits that allow them to invade and disseminate (5), has been shown to be involved in the metastasis of a variety of epithelial tumours. Indeed, we have previously reported that the presence of EMT markers is associated with an increased metastatic risk in cSCC (6). Tumour budding, pathologically characterized by clusters or single tumoural cells that may reflect cells undergoing EMT, has also been recently linked to nodal metastasis in cSCC (7, 8).

The EMT process can be induced by the tumoural microenvironment through the release of cytokines and extracellular matrix proteins by cancer-associated fibroblasts (CAFs). In addition to their effect on epithelial tumoural cells, CAFs may also generate a fibrotic stroma. The role of the fibrotic reaction in cancer development and progression remains controversial. While some studies suggest that the host may favour a desmoplastic response to limit tumour aggressiveness (9), others have shown that the fibrotic stroma induced by CAFs might benefit the tumour by inhibiting access to immune cells (10–13). In this sense, the association between desmoplastic reaction and poor outcome has been observed in several cancers such as cholangiocarcinoma, breast, pulmonary, pancreatic, tongue, rectal and colorectal carcinomas (11, 14–18). cSCC with a desmoplastic phenotype, characterized by strands and nests of tumour cells surrounded by a prominent fibrous stromal response, may also pose an increased risk of

recurrence and metastases (3, 19). Indeed, the presence of desmoplasia is considered to be a high-risk factor by the NCCN and the European Dermatology Forum, the European Association of Dermato-Oncology, and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EDF-EADO-EORTC) guidelines (20, 21). Unlike other carcinomas, such as rectal and colorectal cancers (17, 18), little attention has been given to the study of fibrotic patterns and their correlation with biological behaviour in cSCC. In this study, we aimed to study the association between different fibrotic patterns and lymphatic metastatic risk in cSCC.

PATIENTS AND METHODS

Patients

Cutaneous biopsies from patients presenting cSCC from 3 tertiary hospitals in Spain between 2001 to 2011 were included in the study. Selected biopsies corresponded either to primary cSCC tumours of patients who had developed metastatic spread (MSCC) or to cSCC without an aggressive clinical behaviour after a long follow-up period (NMSCC). Fifty primary MSCC with lymph node ($n=40$) and/or cutaneous in-transit metastases ($n=10$) were included in the study. Additionally, 52 cutaneous SCCs that had not developed metastatic spread after at least a 5-year follow-up period (NMSCC) were also evaluated as a control group.

A set of clinical data were retrospectively collected from each patient including sex, age, immunosuppression status and cause of immunosuppression, year of diagnosis, recurrences, tumour size and location. TNM staging evaluation by two systems (AJCC-8 and Brigham and Women's Hospital – BWH) (22, 23) was recorded from each patient.

Ethics approval was obtained from all the participating centers, in accordance with the guidelines of the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983.

Histologic parameters

Following a systematized protocol, the following histopathological data were evaluated in all samples in H&E-stained glass slides: thickness (in mm), level of invasion, degree of differentiation (well, moderate, poor), presence of vascular or perineural invasion and, when present, the diameter of the affected nerve (in mm).

Tumoural budding and fibrotic stroma were simultaneously evaluated by two of the authors (AT and MEH), who were blind to the aggressiveness of the tumours.

Fibrotic stroma. Desmoplasia was defined as the presence of small tumoural nests surrounded by stromal fibrosis in at least one third of the tumoural sample.

The fibrotic reaction pattern (FRP) was evaluated at the advancing edge of the tumour by H&E and classified into one of 3 categories (mature, intermediate, or immature) as previously reported (18), depending on the presence of keloid-like collagen and myxoid stroma. Keloid-like collagen was defined as the presence of bundles of hypocellular collagen and bright eosinophilic hyalinization. Myxoid stroma showed an amorphous stromal substance with an extracellular amphophilic or basophilic material. The presence of a myxoid or keloidal stroma was considered when observed with the 40x objective lens in areas with scarce or no inflammatory infiltrate.

FRP was considered mature (mFR) when the fibrotic stroma lacked a keloid-like collagen or myxoid stroma and contained mature collagen fibres stratified into an onion-like pattern (Fig. 1).

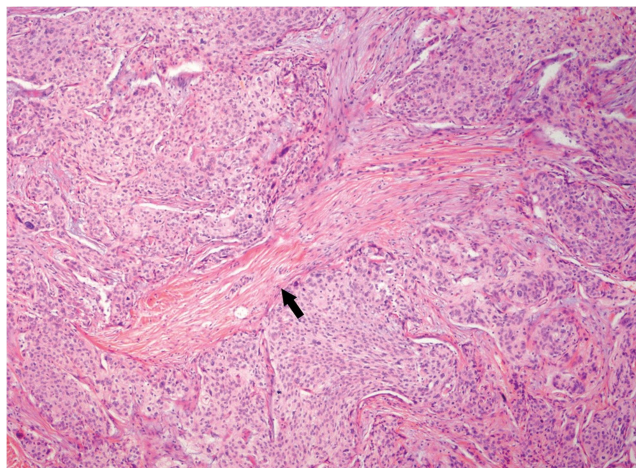


Fig. 1. Mature fibrotic reaction pattern (arrow) (H&E 40x).

Intermediate fibrotic reaction was designated for tumours showing keloid-like fibrosis intermingled in mature stroma, while immature fibrosis (iFR) was assigned to tumours showing areas of myxoid changes with or without keloidal fibrosis (Fig. 2). The more immature fibrotic areas were considered for analysis.

A quantitative evaluation of the FRP was also performed. The area of fibrosis (percentage) surrounding the advancing edge of the tumour was recorded. The width of the fibrotic reaction was also categorised from 0 to 3 as follows: 1: 0–100 μm ; 2: 100–200 μm ; 3: > 200 μm . A fibrosis burden score (area \times width: 0–300) for fibrosis was calculated.

Tumour budding. Tumour budding was defined based on the number of foci of isolated cancer cells or on the presence of a cluster comprising < 5 cells in the invasive frontal region, as previously reported (24). Cases with 5 or more foci, identified using a 40x objective lens, were regarded as positive for budding.

Stainings and immunohistochemistry. Alcian blue stainings were performed in cases showing a myxoid pattern in the H&E stain, in order to detect mucin deposition. To this end, slides were deparaffinized and hydrated. They then were stained with Alcian blue solution (1% Alcian Blue in 3% acetic acid solution, pH 2.5) for 30 min and rinsed with water. Slides were counterstained with hematoxylin for 5 min, dehydrated and mounted with DPX.

For immunohistochemistry, slides were deparaffinized, hydrated and antigen retrieval was performed in 10 mM citrate (pH 6) for 10 min in a pressure cooker (for α -SMA) or with Proteinase K 15 min at 37°C (for fibronectin). Tissues were then quenched for

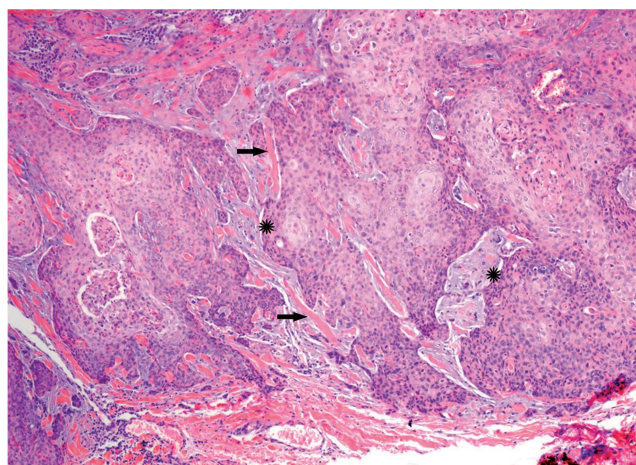


Fig. 2. Immature fibrotic reaction pattern with myxoid (asterisks) and keloidal areas (arrow) (H&E 40x).

endogenous peroxidase activity with 4% (vol/vol) H₂O₂ for 10 min at room temperature, blocked and incubated with primary antibodies overnight at 4°C. After washing, Envision+System-HRP antibody reagent was applied Dako (Agilent Technologies). Immunohistochemical reactions were developed using diaminobenzidine (DAB) as a chromogenic substrate. Sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated and mounted. The following antibodies were used: α -SMA from Sigma (A2547) and Fibronectin from Dako (A0245).

Statistical analyses

Correlations between categorical variables were evaluated using χ^2 test or Fisher's exact test when appropriate. Continuous data were compared using a Student's *t*-test if the sample distribution was normal, or otherwise via a Mann-Whitney *U*-test.

A multivariate logistic regression analysis was performed to determine which clinico-pathological features were predictive of lymphatic metastases. $p < 0.05$ was considered statistically significant. Analysis was conducted with SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

Biopsy specimens ($n = 102$) from a total number of 102 patients were included in the study (Table I). Fifty patients presented MSCC, 40 of them to the regional lymph-nodes and 10 showing cutaneous in-transit satellitosis.

More than half of the patients were men (69.6%), and the median age was 79 years (Q1: 72; Q3: 85). Most of the cSCC were excised from sun-exposed areas, mainly the head and neck (85 cSCC), followed by extremities (14 cSCC) and trunk (3 cases). Twelve patients were immunosuppressed (8 kidney recipients, 1 hepatic recipient, 1 Crohn's disease, 1 chronic lymphatic leukemia and 1 patient undertaking mycophenolate to treat glomerulonephritis). Twelve cases involved recurrences.

In the whole data set, 36 patients had mFR whereas 18 had iFR. Only 3 cases showed an intermediate fibrotic pattern. Recurrent cSCC presented mFR and iFR equally.

Budding was observed in 34 of 50 MSCC (68%) and 18 of 52 NMSCC (34.6%; $p < 0.01$). The iFR pattern

Table I. Clinical and histopathological variables. Univariate analysis for metastatic risk

	NMSCC ($n = 52$)	MSCC ($n = 50$)	<i>p</i>
<i>Clinical variables, n (%)</i>			
<i>Area</i>			
Head	42 (80.8)	43 (86)	NS
Trunk	1 (1.9)	2 (4)	
Extremities	9 (17.3)	5 (10)	
Sun exposure, Yes	47 (94)	45 (90)	NS
Horizontal size > 20 mm	20 (38.5)	19 (41.3)	NS
Recurrent case, Yes	2 (3.8)	10 (20.4)	0.013
Immunosuppression, Yes	6 (11.5)	6 (13)	NS
<i>Pathological variables</i>			
<i>Differentiation, n (%)</i>			
Good	21 (40.4)	7 (14)	< 0.01
Moderate	28 (53.8)	35 (70)	
Poor	3 (5.8)	8 (16)	
Tumour thickness > 6 mm, <i>n (%)</i>	10 (19.2)	22 (47.8)	< 0.01
Clark level ≥ 4 , <i>n (%)</i>	35 (67.3)	44 (93.6)	< 0.01
Perineural invasion, Yes, <i>n (%)</i>	1 (1.9)	8 (16)	0.015
Nerve diameter ≥ 0.1 mm, <i>n (%)</i>	0 (0)	7 (14)	< 0.01
Vascular invasion, Yes, <i>n (%)</i>	0 (0)	2 (4)	NS
Desmoplasia, Yes, <i>n (%)</i>	1 (1.9)	3 (6)	NS
Budding, Yes, <i>n (%)</i>	18 (34.6)	34 (68)	< 0.01
Mature fibrosis, <i>n (%)</i>	18 (34.6)	18 (36)	NS
Intermediate fibrosis pattern, Yes, <i>n (%)</i>	0 (0)	3 (6)	NS
Myxoid fibrosis, Yes, <i>n (%)</i>	2 (3.8)	16 (32)	< 0.01
Fibrosis burden, median (IQR)	0 (0;135)	40 (0;160)	0.036
<i>Staging systems, n (%)</i>			
<i>TNM (AJCC-8)</i>			
pT1	25 (48.1)	12 (25.5)	< 0.01
pT2	14 (26.9)	6 (12.8)	
pT3	13 (25)	26 (55.3)	
pT4	0 (0)	3 (6.4)	
<i>TNM (Brigham)</i>			
1	25 (48.1)	10 (21.7)	< 0.01
2a	23 (44.2)	23 (50)	
2b	4 (7.7)	9 (19.6)	
3	0 (0)	4 (8.7)	

NMSCC: Nonmetastatic cutaneous squamous cell carcinoma; MSCC: Metastatic cutaneous squamous cell carcinoma; IQR: interquartile range.

was observed in 16 of 50 MSCC (32%) and in 2 of 52 NMSCC (3.8%; $p < 0.01$). Unlike mFR, iFR was mostly observed in isolated foci and in surrounding budding areas (Figs 3a and 4).

Although iFR mostly surrounded the budding areas (89% of the cases with myxoid changes), only 30.7% of tumours with budding had an associated iFR pattern. Interestingly, while budding showed a sensitivity superior

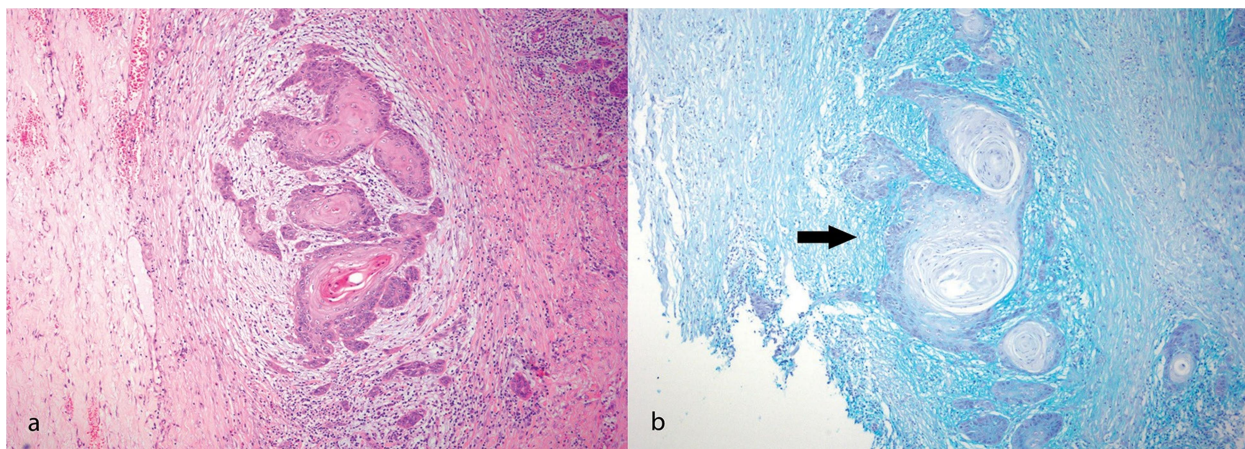


Fig. 3. a) Immature fibrotic reaction pattern with myxoid peritumoral areas segregating an inflammatory infiltrate (H&E 40x). b) Alcian blue showing a larger stain around the tumour (arrow) (40x).

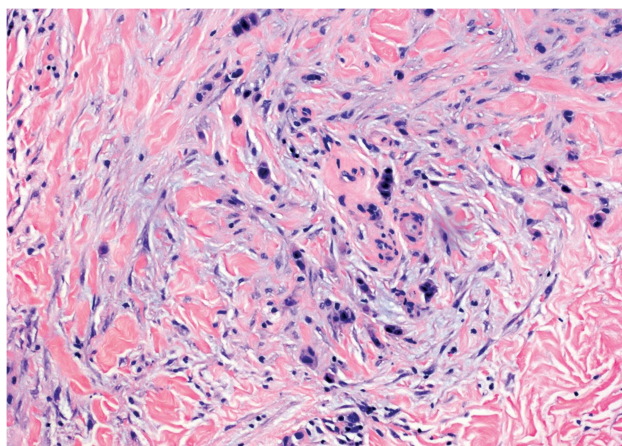


Fig. 4. Immature fibrotic reaction pattern surrounding an area of tumoral budding. H&E 40x.

to iFR in predicting aggressiveness (68% vs 32%), iFR showed a better specificity (96.2% vs 65.4%).

In an attempt to better characterize the stromal fibroblasts, we carried out α -SMA staining, though positivity was only detected in 2 cases with iFR (**Fig. 5**). In contrast, increased expression of mucopolysaccharides (stained with Alcian blue) and fibronectin was frequently observed in areas with a myxoid reaction pattern, although this was not restricted only to this pattern (data not shown) (Fig. 3b).

Univariate analysis (Table I) revealed that previous recurrence, anatomic level (Clark ≥ 4), tumour thickness, budding, histological differentiation, myxoid stroma, peritumoural fibrosis burden and perineural invasion (and nerve diameter > 0.1) were significantly associated with metastasis development. Conversely, age, vascular invasion, desmoplasia and tumour size were not significantly associated with metastatic risk. Both the AJCC and Brigham's staging systems adequately classified both the MSCC and NMSCC groups, although the later proved to be more accurate.

Multivariate analysis, adjusted by age and sex, revealed that the myxoid stroma was the only independent factor associated with lymphatic metastases, with an odds

Table II. Univariate and multivariate analyses for metastatic risk

	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	OR _{row}	CI 95%	<i>p</i>	OR _{adj}	CI 95%	<i>p</i>
<i>Clinical variables</i>						
Area	0.77	0.43–1.36	0.37			
Sun exposure	0.57	0.13–2.55	0.47			
Horizontal size > 2 cm	1.13	0.50–2.53	0.77	1.42	0.93–2.17	0.10
Recurrent case	6.41	1.33–30.96	0.02	3.88	0.38–39.42	0.25
Immunosuppression	1.15	0.34–3.85	0.82			
<i>Pathological variables</i>						
Differentiation	3.10	1.47–6.57	0.003	2.38	0.84–6.70	0.10
Tumour thickness ≥ 6 mm	3.85	1.57–9.47	0.003	1.03	0.88–1.22	0.71
Clark level ≥ 4	7.12	1.93–26.28	0.003	2.55	0.49–13.22	0.26
Perineural invasion	9.71	1.17–80.82	0.035	6.45	0.39–107.49	0.19
Desmoplasia	3.26	0.33–32.39	0.31			
Budding	4.01	1.76–9.15	0.001	2.77	0.68–11.3	0.16
Myxoid fibrosis	11.77	2.54–54.50	0.002	13.81	1.70–112.02	0.014
Fibrosis burden score	1.01	1.00–1.01	0.05	0.99	0.98–1.00	1.10
<i>Staging systems</i>						
TNM (AJCC-8)	2.23	1.06–4.68	0.034			
TNM (Brigham)	2	1.24–3.22	0.004			

OR: odds ratio; CI: confidence interval; adj: adjusted. Bold: significant value.

ratio of 13.81 (95% confidence interval 1.70–112.01) (**Table II**). This pattern was associated with immunosuppression, budding, desmoplasia, perineural invasion, anatomic level (Clark ≥ 4) and tumoural depth (**Table III**).

DISCUSSION

Analysis of fibrosis in cSCC has attracted little attention in the literature, with the exception of desmoplasia. This is in striking contrast with the widely reported association between fibrosis and poor prognosis in several cancers (11, 14–18, 25, 26). Fibrosis in cancer is induced by cancer-associated fibroblasts (CAFs) or myofibroblasts, which can induce EMT and cancer cell migration (27, 28). Peritumoural fibrosis may favour tumoural progression by several mechanisms: driving integrin-dependent cell adhesion and migration, regulating tumour plasticity or by impairing tumour immunosurveillance.

In the present work, we observed an association between fibrosis burden and metastatic risk in the uni-

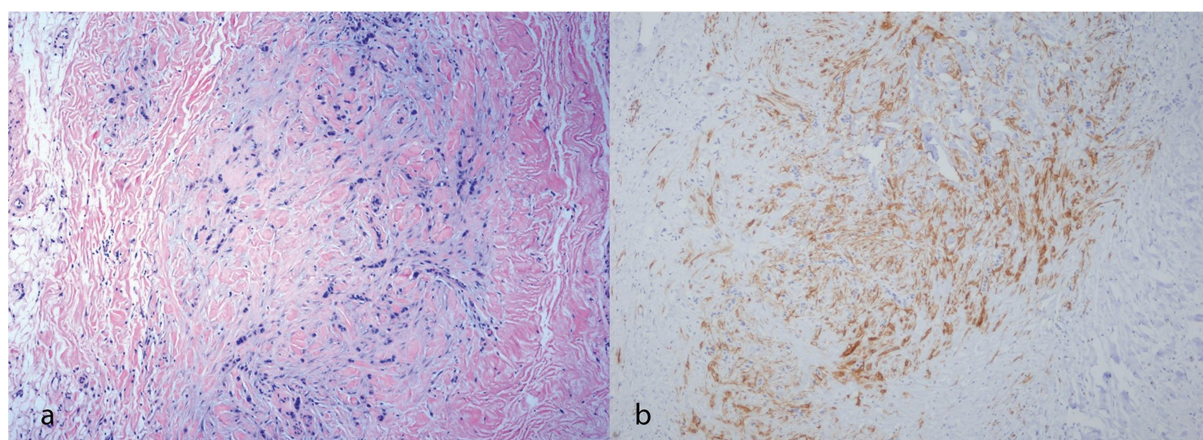


Fig. 5. a) Cutaneous squamous cell carcinoma with a myxoid reaction (H&E 40x) and b) α -SMA-expressing cells.

Table III. Univariate analysis for the presence of myxoid fibrosis

	Myxoid fibrosis		p
	Absence	Presence	
<i>Clinical variables, n (%)</i>			
Total	84 (82.3)	18 (17.6)	
<i>Area</i>			
Head	70 (83.3)	15 (83.3)	NS
Trunk	2 (2.4)	1 (5.6)	
Extremities	12 (14.3)	2 (11.1)	
Sun exposure, Yes	76 (92.7)	16 (88.9)	NS
Horizontal size > 20 mm	31 (38.8)	8 (44.4)	NS
Recurrent case, Yes	8 (9.5)	4 (23.5)	NS
Immunosuppression, Yes	7 (8.5)	5 (31.2)	< 0.01
<i>Pathological variables</i>			
<i>Differentiation, n (%)</i>			
Good	26 (31)	2 (11.1)	NS
Moderate	50 (59.5)	13 (72.2)	
Poor	8 (9.5)	3 (16.7)	
Tumour thickness, > 6 mm, n (%)	23 (28)	9 (56.3)	0.041
Clark level ≥ 4 , n (%)	63 (75.9)	16 (100)	0.037
Perineural invasion, Yes, n (%)	5 (6)	4 (22.2)	0.049
Nerve diameter ≥ 0.1 mm, n (%)	3 (3.6)	4 (22.2)	0.017
Vascular invasion, Yes, n (%)	1 (1.2)	1 (5.6)	NS
Desmoplasia, Yes, n (%)	1 (1.2)	3 (16.7)	0.02
Budding, Yes, n (%)	36 (42.9)	16 (88.9)	< 0.01
Fibrosis burden, median (IQR)	0 (0;125)	155 (100;200)	< 0.01
<i>Staging systems, n (%)</i>			
<i>TNM (AJCC-8)</i>			
pT1	33 (40.2)	4 (23.5)	0.02
pT2	19 (23.2)	1 (5.9)	
pT3	29 (35.4)	10 (58.8)	
pT4	1 (1.2)	2 (11.8)	
<i>TNM (Brigham)</i>			
1	32 (39.5)	3 (17.6)	NS
2a	38 (46.9)	8 (47.1)	
2b	9 (11.1)	4 (23.5)	
3	2 (2.5)	2 (11.8)	

AJCC-8 and Brigham's staging could not be performed in 3 and 4 cases, respectively due to missing values.
IQR: interquartile range.

variate analysis, as well as a strong correlation between the myxoid fibrotic pattern and the risk of metastasis in the multivariate analysis. The pattern of fibrosis may be relevant to the prognosis of epithelial tumours. In this regard, most oral SCC (OSCCs) exhibit two main patterns: "spindle" (arranged in rows of few cells around the neoplastic islands) and "network" (occupying the entire tumour stroma). The latter has apparently been linked to aggressive forms of OSCC (29, 30). Similarly, a myxoid reaction pattern, or so-called immature fibrotic reaction pattern, has been associated with bad prognoses in colorectal cancer (17, 18, 25, 26). Although a myxoid pattern surrounded by an intense inflammatory infiltrate can be found in NMSCC, we have observed that myxoid stromal changes in the invasive tumoural front, together with the absence of inflammatory cells, is highly specific for metastasizing cSCC. The relatively low sensitivity of this pattern in MSCC may be due to its presence in small, unnoticed areas. These foci may correspond to areas where a fibrotic/myxoid reaction inhibits the immune response ("immune response sanctuary"), thus favouring the metastatic process. We found this pattern to be strongly associated with budding, which is also linked to a higher metastatic risk (7, 8, 31). Both budding and a myxoid stroma are transitory phenotypes that appear in the tumour invasive front. CAFs-secreted TGF β

may not only trigger EMT, but also induce an excess of type 1 collagen deposition, as observed in the keloidal pattern (25). These observations suggest that a mucopolysaccharide-rich microenvironment may play a role in favouring EMT (budding), as well as in blocking the host immunological response, and therefore increasing the metastatic risk.

We found areas of myxoid stroma to be easily detected by routine H&E staining in the advancing tumoural invasive front, even in poorly differentiated tumours. Conversely, we did not find α -SMA or fibronectin to increase the detection of this fibrotic pattern compared with H&E. Unlike previous studies, most areas of myxoid stroma in cSCC were devoid of α -SMA positivity, which may be due to several reasons: (i) fibrosis-inducing myofibroblasts are immature and do not express α -SMA; (ii) CAFs produce a mucopolysaccharide-rich stroma and thereby become nonessential; or (iii) myxoid-rich stroma is produced by a different cell.

In contrast to the myxoid pattern, we did not find any association between desmoplasia and metastatic risk in our series. Although there is some controversy about the definition of desmoplasia, many authors suggest that it confers tumoural growth and invasive advantages in cSCC (3, 19, 32). In the prospective study by Brantsch et al. (3), the local recurrence rate, but not the metastatic risk, was found to be higher in desmoplastic cSCC. In contrast, other authors have found this pattern to be associated with metastatic risk in cSCC (19, 24, 32). These heterogeneous results may reflect the lack of a common consensus in defining desmoplasia.

There are several limitations in our report that should be stated. First, there are potential errors due to the retrospective nature of our study. Second, all of the centers that participated in the study are reference university hospitals that are more likely to receive previously treated and aggressive tumours. This may account for the high number of recurrent tumours among MSCC samples in our series (20.4%).

In conclusion, we studied desmoplasia, the fibrotic burden and fibrosis patterns in a series of MSCC and NMSCC samples. Although fibrosis is a frequent finding in both aggressive and indolent tumours, our findings suggest that a myxoid pattern, together with an inflammatory exclusion (immature fibrotic pattern), is strongly associated with metastatic risk. Although it is perhaps premature to recommend the study of fibrotic patterns during routine examinations by pathologists, it is true that we all commonly observe that cSCC ending with small clusters or single tumoural cells, often surrounded by a stromal reaction, have a worse prognosis. This is due to the fact that these cells that can migrate and produce vascular or neural invasions. Our work has focused on this aspect and we have found that is not only the presence of isolated tumoural cells that increases the metastatic risk, also known as tumour budding, but also the microenvi-

ronment surrounding these cells that plays a role in bad prognoses. If our results are confirmed in further studies, the pattern of peritumoural fibrosis should be weighed as an additional factor to consider in histopathological assessments of cSCC with a prognostic value.

ACKNOWLEDGEMENT

This work has been supported by grant PI15/00236 from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad, and the “Xarxa de Bancs de Tumours”.

REFERENCES

- Alam M, Ratner D. Cutaneous squamous-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2001; 344: 975–983.
- Skulsky SL, O’Sullivan B, McArdle O, Leader M, Roche M, Conlon PJ, et al. Review of high-risk features of cutaneous squamous cell carcinoma and discrepancies between the American Joint Committee on Cancer and NCCN Clinical Practice Guidelines In Oncology. *Head Neck* 2017; 39: 578–594.
- Brantsch KD, Meisner C, Schönfisch B, Trilling B, Wehner-Caroli J, Röcken M, et al. Analysis of risk factors determining prognosis of cutaneous squamous-cell carcinoma: a prospective study. *Lancet Oncol* 2008; 9: 713–720.
- Schmults CD, Karia PS, Carter JB, Han J, Qureshi AA. Factors predictive of recurrence and death from cutaneous squamous cell carcinoma: a 10-year, single-institution cohort study. *JAMA Dermatol* 2013; 149: 541–547.
- Nieto MA, Huang RY-J, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell* 2016; 166: 21–45.
- Toll A, Masferrer E, Hernández-Ruiz ME, Ferrandiz-Pulido C, Yébenes M, Jaka A, et al. 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* 2013; 72: 93–102.
- Fujimoto M, Yamamoto Y, Matsuzaki I, Warigaya K, Iwahashi Y, Kojima F, et al. Tumor budding is an independent risk factor for lymph node metastasis in cutaneous squamous cell carcinoma: a single center retrospective study. *J Cutan Pathol* 2016; 43: 766–771.
- Gonzalez-Guerrero M, Martínez-Cambor P, Vivanco B, Fernández-Vega I, Munquía-Calzada P, Gonzalez-Gutiérrez MP, et al. The adverse prognostic effect of tumor budding on the evolution of cutaneous head and neck squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 2017; 76: 1139–1145.
- Nakanishi H, Oguri K, Takenaga K, Hosoda S, Okayama M. Differential fibrotic stromal responses of host tissue to low- and high-metastatic cloned Lewis lung carcinoma cells. *Lab Invest* 1994; 70: 324–332.
- Ene-Obong A, Clear AJ, Watt J, Wang J, Fatah R, Riches JC, et al. Activated pancreatic stellate cells sequester CD8+ T cells to reduce their infiltration of the juxtatumoral compartment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterology* 2013; 145: 1121–1132.
- Watt J, Kocher HM. The desmoplastic stroma of pancreatic cancer is a barrier to immune cell infiltration. *Oncoimmunology* 2013; 2: e26788.
- Liao D, Luo Y, Markowitz D, Xiang R, Reisfeld RA. Cancer associated fibroblasts promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune microenvironment in a 4T1 murine breast cancer model. *PLoS One* 2009; 4: e7965.
- Balsamo M, Scordamaglia F, Pietra G, Manzini C, Cantoni C, Boitano M, et al. Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 20847–20852.
- Lagacé R, Grimaud JA, Schürch W, Seemayer TA. Myofibroblastic stromal reaction in carcinoma of the breast: variations of collagenous matrix and structural glycoproteins. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1985; 408: 49–59.
- Lao XM, Liang YJ, Su YX, Zhang SE, Zhou X, Liao GQ. Distribution and significance of interstitial fibrosis and stroma-infiltrating B cells in tongue squamous cell carcinoma. *Oncol Lett* 2016; 11: 2027–2034.
- Clapéron A, Mergey M, Aoudjehane L, Ho-Boulidoires TH, Wendum D, Prignon A, et al. Hepatic myofibroblasts promote the progression of human cholangiocarcinoma through activation of epidermal growth factor receptor. *Hepatology* 2013; 58:2001–2011.
- Ueno H, Jones AM, Wilkinson KH, Jass JR, Talbot IC. Histological categorisation of fibrotic cancer stroma in advanced rectal cancer. *Gut* 2004; 53: 581–586.
- Ueno H, Shinto E, Kajiwara Y, Fukazawa S, Shimazaki H, Yamamoto J, et al. Histologic Categorization of Desmoplastic Reaction: Its Relevance to the Colorectal Cancer Microenvironment and Prognosis. *Ann Surg Oncol* 2015; 22: 1504–1512.
- Breuninger H, Schaumburg-Lever G, Holzschuh J, Horny HP. Desmoplastic squamous cell carcinoma of skin and vermilion surface: a highly malignant subtype of skin cancer. *Cancer* 1997; 79: 915–919.
- NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Squamous Cell Skin Cancer 1.2017. National Comprehensive Cancer Network, Inc.; 2016. Available at: <http://NCCN.org>. Accessed July 1, 2017.
- Stratigos A, Garbe C, Lebbe C, Malvehy J, del Marmol V, Pehamberger H, et al. Diagnosis and treatment of invasive squamous cell carcinoma of the skin: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer* 2015; 51: 1989–2007.
- 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 Dermatology* 2013; 149: 402–410.
- Edge S, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. AJCC cancer staging manual. 7th ed. New York: Springer.
- Gonzalez-Guerrero M, Martínez-Cambor P, Vivanco B, Fernández-Vega I, Munquía-Calzada P, González-Gutiérrez MP, et al. The adverse prognostic effect of tumor budding on the evolution of cutaneous head and neck squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 2017; 76: 1139–1145.
- Ueno H, Jones A, Jass JR, Talbot IC. Clinicopathological significance of the “keloid-like” collagen and myxoid stroma in advanced rectal cancer. *Histopathology* 2002; 40: 327–334.
- Ueno H, Shinto E, Hashiguchi Y, Shimazaki H, Kajiwara Y, Sueyama T, et al. In rectal cancer, the type of desmoplastic response after preoperative chemoradiotherapy is associated with prognosis. *Virchows Arch* 2015; 466: 655–663.
- Tsujino T, Seshimo I, Yamamoto H, Ngan CY, Ezumi K, Takemasa I, et al. Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2082–2090.
- Watt J, Kocher HM. The desmoplastic stroma of pancreatic cancer is a barrier to immune cell infiltration. *Oncoimmunology* 2013; 2: e26788.
- Seifi S, Shafaei S, Shafiq E, Sahabi SM, Ghasemi H. Myofibroblast stromal presence and distribution in squamous epithelial carcinomas, oral dysplasia and hyperkeratosis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2010; 11: 359–364.
- Kawashiri S, Tanaka A, Noguchi N, Hase T, Nakaya H, Ohara T, et al. Significance of stromal desmoplasia and myofibroblast appearance at the invasive front in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck* 2009; 31: 1346–1353.
- Agar NJM, Kirton C, Patel RS, Martin RCW, Angelo N, Emanuel PO. Predicting lymph node metastases in cutaneous squamous cell carcinoma: Use of a morphological scoring system. *N Z Med J* 2015; 128: 59–67.
- Breuninger H, Brantsch K, Eigentler T, Häfner HM. Comparison and evaluation of the current staging of cutaneous carcinomas. *J Dtsch Dermatol Ges* 2012; 10: 579–586.

DISCUSIÓN

“Es mucho más difícil juzgarse a sí mismo que juzgar a los demás. Si logras juzgarte bien a ti mismo, eres un verdadero sabio.”

Le petit Prince. Antoine de Saint-Exupery. 1943

DISCUSIÓN

El papel de proteínas de la familia Polycomb en numerosos tipos de tumor, tanto sólidos como hematológicos, ha sido ampliamente descrito. Sin embargo, únicamente algunos estudios descriptivos han analizado la expresión de BMI1 y EZH2 en el inicio del proceso de carcinogénesis de lesiones cutáneas de estirpe queratinocítica y melanocítica, viéndose un aumento progresivo en la expresión de algunas proteínas Polycomb en paralelo al grado de displasia, tanto en el paso de queratosis actínica a CEC⁹⁹ como en el desarrollo de melanomas¹⁰⁰.

En otros tumores sólidos como carcinoma de células renales^{101,102}, carcinoma de células de Merkel¹⁰³ y carcinoma de próstata¹⁰⁴, se ha visto una asociación entre la sobreexpresión de EZH2 y el desarrollo de metástasis y una supervivencia disminuída. No obstante se han realizado pocos trabajos que estudien el papel de Polycomb en el desarrollo de metástasis en carcinoma cutáneo.

En el presente trabajo profundizamos en el papel de dichas proteínas en el proceso metastásico en CEC. Con ese objetivo, inicialmente se evaluó la expresión de diferentes proteínas de la familia Polycomb en una serie de CEC. Esta serie se utilizó en trabajos previos de nuestro grupo, obteniéndose muestras de seis hospitales terciarios de España, e incluye 56 CEC primarios que dieron lugar a metástasis (metastásicos) y 51 CEC primarios no metastásicos (grupo control) que no habían desarrollado metástasis en un período mínimo de seguimiento de 5 años. También incluía 39 metástasis (35 linfáticas y 4 cutáneas en tránsito).

Se registraron una serie de variables clínicas (sexo, edad, inmunosupresión, recurrencias, diámetro tumoral) así como histológicas (profundidad tumoral, invasión vascular y/o linfática, budding).

Para poder evaluar la expresión de los represores epigenéticos Polycomb (PcG) en nuestra serie, se construyeron TMAs (*tissue microarrays*) que permiten trabajar con muestras de numerosos tumores en una sola laminilla. Se realizaron tinciones de IHQ en los TMAs para valorar la expresión de tres proteínas representativas de la familia Polycomb; EZH2 (PRC2), RING1B y BMI1 (PRC1).

No observamos diferencias en cuanto a la expresión de BMI1 entre el grupo de CEC control y metastásico. Por el contrario la expresión de EZH2 y de RING1B estaba significativamente aumentada en los CEC metastásicos respecto a los controles. Xie y colaboradores⁹⁹ habían demostrado previamente un aumento secuencial de la expresión de EZH2 desde la lesión precursora, queratosis actínica, al tumor invasivo, o CEC. En nuestro trabajo hemos podido comprobar que este aumento en la expresión se mantiene más allá del inicio del proceso de carcinogénesis y niveles altos de expresión de miembros de la familia de Polycomb se correlacionan con el desarrollo de metástasis. En cuanto a RING1B, éste es el primer estudio en el que se valora su expresión en cáncer cutáneo.

Para estudiar el papel de las proteínas Polycomb empleamos una línea celular de CEC, SCC13, con capacidad invasiva. Mediante RNA de interferencia (shRNA) realizamos la depleción estable de las tres proteínas Polycomb (BMI1, RING1B, EZH2). En estas células con depleción de Polycomb realizamos un análisis de expresión génica para ver las secuencias reguladas por éstas.

La representación de las secuencias génicas reguladas por cada proteína mediante el diagrama de Venn nos permitió identificar las secuencias correguladas por las tres proteínas. Utilizamos un programa informático, el IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*), para identificar en que vía/s celulares están implicados estos genes.

Dado que la sobreexpresión de EZH2 y RING1B se asociaba al desarrollo de metástasis en nuestra serie de CEC, centramos nuestro estudio en la identificación de los transcritos corregulados por estas dos proteínas. El IPA identificó un enriquecimiento en la expresión de genes relacionados con la vía de NF- κ B en aquellas células con depleción de RING1B o con depleción de EZH2.

La vía NF- κ B es una vía formada por diversos componentes. Dos de los componentes, p105 y p100, se producen como proteínas precursoras inactivas citoplasmáticas inhibidas por su unión a I κ B. Una vez I κ B es fosforilado se degrada por ubiquitinización y ambos precursores, p105 y p100, son procesados mediante proteólisis a p50 y p52, respectivamente. Los otros componentes de la vía como c-Rel, RelA y RelB no son procesados. Todos los componentes comparten una región de 300 aminoácidos en el extremo aminoterminal llamada NF- κ B/Rel/Dorsal (NRD) que les permite la dimerización, la unión al ADN y la unión al inhibidor I κ B.

Cuando los componente procesados por proteólisis, p50 y p52, son traslocados al núcleo e inducen la expresión de genes implicados en respuesta inmune, tales como TNF α , IL-1, IL-6, IL-8; reactantes de fase aguda y factores de crecimiento hematopoyético como el factor estimulante de colonias granulocíticas o GM-CSF¹⁰⁵.

El array de expresión reveló que las células con niveles bajos de Polycomb presentaban enriquecimiento en transcritos que codifican proteínas implicadas en inflamación y respuesta inmune.

Este resultado a nivel transcripcional fue validado a nivel de proteína. Para ello se obtuvieron extractos proteicos de las líneas estables SCC13 con niveles bajos de EZH2 y RING1B (shEZH2 y shRING1B) y valoramos mediante western blot (WB) la expresión de proteínas de la vía NF- κ B.

En el análisis por western blot (WB) observamos incrementos en los niveles de expresión de p100 en las células SCC13 con depleción de RING1B y EZH2. Al preparar fracciones nucleares y citoplasmáticas de células SCC13 shRING1B y shEZH2, el análisis por WB reveló que estas células presentaban un aumento en las fracciones nucleares de p100/ NF- κ B2 y p52/ NF- κ B2; así como de p50/ NF- κ B1, sugiriendo una activación de las vías clásica y alternativa de NF- κ B.

NIK es una quinasa imprescindible para la activación de la vía alternativa NF- κ B. Mediante WB se observó que en los extractos proteicos de células SCC13 shEZH2 y shRING1B presentaban aumentos de NIK, sugiriendo una activación de la vía alternativa cuando los niveles de RING1B o de EZH2 son bajos.

Los niveles bajos de RING1B y EZH2 en los CEC no metastásicos permitirían, por tanto, la activación de la vía alternativa (y posiblemente también de la canónica) de NF- κ B.

Ya que esta vía está implicada en inflamación y regulación de la respuesta inmune, nos planteamos si la activación de la vía $\text{NF-}\kappa\beta$ favorecería una mayor respuesta inmune antitumoral que evite el desarrollo de enfermedad a distancia.

Para analizar dicha posibilidad, valoramos el infiltrado inflamatorio en el frente de avance tumoral, cualitativa y semicuantitativamente, mediante una tinción hematoxilina/eosina de los mismos TMAs utilizados para el estudio de la expresión de Polycomb. El análisis estadístico permitió constatar que los CEC no metastásicos presentaban una densidad de neutrófilos, eosinófilos y linfocitos CD8^+ superior a la que presentaban los CEC metastásicos.

Con el fin de investigar la relación directa entre la respuesta inmune, la célula tumoral y las proteínas del grupo Polycomb, realizamos estudios in vitro de quimiotaxis. Estos estudios nos permitieron observar que las células hematopoyéticas tienen más actividad quimiotáctica hacia células SCC13 con depleción de Polycomb. En concreto, en el caso de las células con depleción de BMI1 la quimiotaxis de neutrófilos era significativamente superior versus células controles.

Aunque inicialmente habíamos realizado una valoración del infiltrado inflamatorio en TMAs, este estudio en los cilindros tumorales de sólo 2mm tenía limitaciones, ya que dichas muestras se habían seleccionado para generar un TMA con representación del frente de avance tumoral, fundamentalmente del componente epitelial del tumor.

En nuestro segundo trabajo decidimos valorar todo el estroma tumoral en su totalidad y para ello utilizamos cortes-laminillas completos teñidos por HE, en las que quedaba representado todo el tumor y el estroma acompañante; un total de 102 laminillas (50 de CEC metastásicos y 52 CEC control).

El papel del estroma en la progresión tumoral cada vez gana más importancia, y ha pasado de ser considerado un simple espectador de la célula tumoral a ser una parte activa y crítica en el proceso de metástasis¹⁰⁶. Buena muestra de esta importancia creciente es el desarrollo de nuevos fármacos empleados en oncología cuya diana terapéutica no es la célula tumoral sino puntos de regulación del sistema inmune como los fármacos anti PD-L1¹⁰⁷.

En CEC son escasos los estudios centrados en el estudio del estroma tumoral y sus implicaciones pronósticas. Se ha estudiado el papel de algunos marcadores vasculares, sobretodo de estirpe linfática como D2-40 o podoplanina, cuya expresión se ha visto aumentada en CEC metastásicos, sobretodo en el frente de avance tumoral⁵⁶.

El papel de PD-L1 también ha sido estudiado en CEC. García-Díez y colaboradores⁷² han demostrado una asociación entre la expresión de PD-L1 y el riesgo de desarrollo de metástasis, así como con recurrencia, mala diferenciación histológica e invasión perineural.

En 2018, la *US Food and Drug Administration* (FDA) aprobó cemiplimab, un inhibidor de PD-1, para el tratamiento de pacientes afectos de CEC localmente avanzado o metastásico, no candidatos a cirugía y/o radioterapia con intención curativa. La dosis aprobada fue de 350mg de administración endovenosa cada 3 semanas¹⁰⁸. Su aprobación fue en base a un estudio multicéntrico en el que demostraron tasas de respuesta a cemiplimab de hasta un 50%, tanto en pacientes con CEC localmente avanzado como en CEC metastásicos¹⁰⁹. En el estudio sólo se incluyeron pacientes inmunocompetentes, no se incluyeron pacientes con enfermedades autoinmunes que precisaban tratamiento inmunosupresor, pacientes trasplantados o pacientes con infección por VIH, hepatitis B o C.

Entre los efectos secundarios más frecuentes constaban diarrea, fatiga, náuseas y, menos frecuentes, efectos secundarios autoinmunes.

Recientemente, algunos autores han visto asociación entre las alteraciones cromosómicas y la respuesta a los tratamientos con inhibidores de punto de control inmunitario, como por ejemplo, la ganancia en el número de copias del brazo largo del cromosoma 3, 3q, que se asocia a una mayor respuesta a cemiplimab¹¹⁰.

Otro componente relevante del estroma tumoral es el “esqueleto” sobre el que se sostienen tanto las células tumorales como las células inflamatorias, la matriz extracelular.

En 2009 Martins¹¹¹ demostró que la depleción del colágeno VII, presente en la membrana basal, favorece el desarrollo de CEC más invasivos.

El colágeno presente en el estroma tumoral tampoco ha pasado desapercibido. La desmoplasia se ha visto asociada a mal pronóstico en diversos tipos de tumores sólidos y resistencia al tratamiento quimioterápico, quizás el caso mejor estudiado es el adenocarcinoma de páncreas¹¹².

Aunque la definición de desmoplasia en el CEC pueda ser controvertida, se acepta comúnmente como la presencia de nidos o cordones de células tumorales rodeados por estroma en mínimo un tercio del tumor. Algunos autores como Brantsch³⁶ han observado una asociación entre desmoplasia y recurrencia tumoral.

En un trabajo reciente de CEC esclerosante observaron que este tipo de tumor es más frecuente en varones mayores de 50 años, en cuero cabelludo y en 9 de los 16 casos (56.25%) presentaban invasión perineural asociada¹¹³.

Con el fin de estudiar los diferentes patrones de fibrosis en nuestra serie de CEC tomamos como referencia un artículo realizado en pacientes con carcinoma colorrectal en el que Ueno y colaboradores¹¹⁴ identifican 3 tipos de reacción fibrótica con implicaciones pronósticas.

Realizamos un estudio descriptivo de los tipos de reacción fibrótica en laminillas teñidas por HE. Definimos 3 patrones de reacción fibrótica siguiendo el modelo de Ueno. Un hallazgo importante fue observar que en las zonas con cambios mixoides estos solían estar rodeando pequeños nidos de células tumorales o gemas tumorales junto con la ausencia de infiltrado inflamatorio.

La presencia de gemas tumorales se ha asociado a mal pronóstico en CEC^{47,51}. Algunos autores han demostrado que estas células tumorales presentes en las gemas sufren TEM⁴⁸ y podrían desarrollar metástasis.

Este tipo de reacción inmadura caracterizada por áreas de fibrosis mixoide, rodeando gemas tumorales, con ausencia de inflamación podrían equivaler a santuarios exentos de respuesta inmune antitumoral y que se asociarían a un mayor riesgo de desarrollo de metástasis en nuestra serie de CEC.

Este hallazgo iría en concordancia a los resultados del primer estudio en el que vimos que los CEC metastásicos sobreexpresan los represores PcG que inhiben la vía NF- κ B y por lo tanto la respuesta inmune antitumoral.

La determinación mediante técnicas de inmunohistoquímica de dos represores epigenéticos de la familia Polycomb, EZH2 y RING1B, pueden tener valor pronóstico en CEC. Hemos demostrado la asociación entre la sobreexpresión de estos dos

marcadores y el desarrollo de metástasis en nuestra serie de CEC, tal como se ha visto asociado previamente en otros tumores sólidos.

Su depleción en líneas celulares de CEC se asocia a la activación de la vía NF- κ B y a un aumento de citoquinas implicadas en la respuesta inmune antitumoral.

En nuestro segundo trabajo hemos observado que un tipo de reacción fibrótica inmadura, caracterizada por gemas tumorales rodeadas por un estroma mixoide y ausencia de infiltrado inflamatorio se asocia al desarrollo de metástasis. No pensamos que sean dos conceptos independientes, ambos se asocian al desarrollo de metástasis y en ambos hay una disminución del infiltrado inflamatorio lo que favorecería el escape de la célula tumoral y el desarrollo de enfermedad a distancia.

CONCLUSIONES

“Lo hermoso del desierto es que en cualquier parte esconde un pozo.”

Le petit Prince. Antoine de Saint-Exupery. 1943

CONCLUSIONES

1. Los niveles altos de expresión de EZH2 y RING1B en CEC se asocian al desarrollo de metástasis; sin embargo, los niveles altos de BMI1 se asocian a recurrencia.
2. EZH2 y RING1B regulan la vía $\text{NF-}\kappa\beta$ implicada en la respuesta inmune. La depleción de las proteínas Polycomb se asocia a una activación de la vía alternativa $\text{NF-}\kappa\beta$.
3. Identificamos un patrón de fibrosis mixoide caracterizado por la presencia de gemas tumorales, depósito de material mixoide y ausencia de inflamación peritumoral, que se asocia al desarrollo de metástasis.
4. El patrón de fibrosis mixoide es más específico pero menos sensible que la presencia de gemas tumorales como marcador de mal pronóstico en CEC.

LÍNEAS DE FUTURO

“Cuando el misterio es demasiado impresionante, es imposible desobedecer.”

Le petit Prince. Antoine de Saint-Exupery.1943

LÍNEAS DE FUTURO

1. Teniendo en cuenta que tanto la sobreexpresión de Polycomb como el patrón de fibrosis inmadura se asocian ha una disminución o ausencia del infiltrado inflamatorio así como a un mayor riesgo de metástasis, sería de interés estudiar la expresión de Polycomb en áreas con gemas tumorales (budding) y/o áreas de fibrosis inmadura.
2. Nuestro grupo ha demostrado que la sobreexpresión de PD-L1 en las células tumorales se asocia al desarrollo de metástasis y a la gemación tumoral pero no se ha valorado su asociación con la expresión de Polycomb.
3. Los inhibidores de Polycomb, en concreto EZH2, se han empleado en otros tumores sólidos. En futuros trabajos se podría evaluar si el tratamiento con inhibidores de EZH2 disminuye las características tumorales asociadas a mal pronóstico como la invasividad tumoral, la proliferación celular, y/o aumenta la quimiotaxis de celularidad inflamatoria hacia medios celulares en los que se ha inhibido EZH2.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tejera-Vaquero A, Descalzo-Gallego MA, Otero-Rivas MM, et al. Incidencia y mortalidad del cáncer cutáneo en España: revisión sistemática y metaanálisis. *Actas Dermosifiliogr* 2016; 107: 318–328.
2. Harwood CA, Proby CM, Inman GJ, et al. The Promise of Genomics and the Development of Targeted Therapies for Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Acta Derm Venereol* 2016; 96: 3–16.
3. Ratushny V, Gober MD, Hick R, et al. From keratinocyte to cancer: the pathogenesis and modeling of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Clin Invest* 2012; 122: 464–472.
4. Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15–16.
5. McGREGOR JM, YU C.-W, DUBLIN EA, et al. Aberrant expression of p53 tumour-suppressor protein in non-melanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 1992; 127: 463–469.
6. de Gruijl FR. Photocarcinogenesis: UVA vs UVB. *Methods Enzymol* 2000; 319: 359–66.
7. Cuperus E, Leguit R, Albregts M, et al. Post radiation skin tumors: Basal cell carcinomas, squamous cell carcinomas and angiosarcomas. A review of this late effect of radiotherapy. *Eur J Dermatology* 2013; 23: 749–757.
8. Sieftring ML, Lu D, States JC, et al. Rapid onset of multiple concurrent squamous cell carcinomas associated with the use of an arsenic-containing traditional medicine for chronic plaque psoriasis. *BMJ Case Rep* 2018; 2018: 1–4.
9. Stenehjem JS, Robsahm TE, Bråtveit M, et al. Aromatic hydrocarbons and risk

of skin cancer by anatomical site in 25 000 male offshore petroleum workers.
Am J Ind Med 2017; 60: 679–688.

10. Tang H, Shi W, Song Y, et al. Voriconazole exposure and risk of cutaneous squamous cell carcinoma among lung or hematopoietic cell transplant patients: A systematic review and meta-analysis. *J Am Acad Dermatol* 2019; 80: 500-507.e10.
11. Kolaitis NA, Duffy E, Zhang A, et al. Voriconazole increases the risk for cutaneous squamous cell carcinoma after lung transplantation. *Transpl Int* 2017; 30: 41–48.
12. Geissler EK. Skin cancer in solid organ transplant recipients: Are mTOR inhibitors a game changer? *Transplant Res* 2015; 4: 4–9.
13. Madeleine MM, Patel NS, Plasmeijer EI, et al. Epidemiology of keratinocyte carcinomas after organ transplantation. *Br J Dermatol* 2017; 177: 1208–1216.
14. Albayati A, Ozkan B, Eyuboglu AA, et al. Nonmelanoma skin cancers in solid-organ transplant recipients: A single center experience. *Exp Clin Transplant* 2018; 16: 95–100.
15. Euvrard S, Morelon E, Rostaing L, et al. Sirolimus and Secondary Skin-Cancer Prevention in Kidney Transplantation. *N Engl J Med* 2012; 367: 329–339.
16. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324: 17–27.
17. Small W, Bacon MA, Bajaj A, et al. Cervical cancer: A global health crisis. *Cancer* 2017; 123: 2404–2412.
18. Ferrándiz-Pulido C, Masferrer E, De Torres I, et al. Identification and genotyping of human papillomavirus in a Spanish cohort of penile squamous cell

- carcinomas: Correlation with pathologic subtypes, p16INK4a expression, and prognosis. *J Am Acad Dermatol* 2013; 68: 73–82.
19. Chahoud J, Semaan A, Chen Y, et al. Association between β -genus human papillomavirus and cutaneous squamous cell carcinoma in immunocompetent individuals—a meta-analysis. *JAMA Dermatology* 2016; 152: 1354–1364.
 20. Toll A, Lloveras B, Masferrer E, et al. Human beta papillomavirus DNA study in primary cutaneous squamous cell carcinomas and their corresponding metastases. *Arch Dermatol Res* 2014; 306: 93–5.
 21. Nikolaou V, Stratigos AJ, Tsao H. Hereditary nonmelanoma skin cancer. *Semin Cutan Med Surg* 2012; 31: 204–10.
 22. Fine JD, Johnson LB, Weiner M, et al. Epidermolysis bullosa and the risk of life-threatening cancers: The National EB Registry experience, 1986–2006. *J Am Acad Dermatol* 2009; 60: 203–211.
 23. Montaudié H, Chiaverini C, Sbidian E, et al. Inherited epidermolysis bullosa and squamous cell carcinoma: A systematic review of 117 cases. *Orphanet J Rare Dis* 2016; 11: 1–12.
 24. Ferrándiz C, Malvehy J, Guillén C, et al. Precáncer cutáneo PALABRAS CLAVE. *Actas Dermosifiliogr* 2017; 108: 31–41.
 25. Olsen EA, Lisa Abernethy M, Kulp-Shorten C, et al. A double-blind, vehicle-controlled study evaluating masoprocol cream in the treatment of actinic keratoses on the head and neck. *J Am Acad Dermatol* 1991; 24: 738–743.
 26. Rówert-Huber J, Patel MJ, Forschner T, et al. Actinic keratosis is an early in situ squamous cell carcinoma: A proposal for reclassification. *Br J Dermatol* 2007; 156: 8–12.

27. Harvey I, Frankel S, Marks R, et al. Non-melanoma skin cancer and solar keratoses. I. Methods and descriptive results of the South Wales skin cancer study. *Br J Cancer* 1996; 74: 1302–1307.
28. FROST CA, GREEN AC. Epidemiology of solar keratoses. *Br J Dermatol* 1994; 131: 455–464.
29. Fernández-Figueras MT, Carrato C, Sáenz X, et al. Actinic keratosis with atypical basal cells (AK I) is the most common lesion associated with invasive squamous cell carcinoma of the skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015; 29: 991–7.
30. Saenz-Sardà X, Carrato C, Pérez-Roca L, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition contributes to invasion in squamous cell carcinomas originated from actinic keratosis through the differentiated pathway, whereas proliferation plays a more significant role in the classical pathway. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2018; 32: 581–586.
31. Goldberg LH, Chang JR, Baer SC, et al. Proliferative actinic keratosis: three representative cases. *Dermatol Surg* 2000; 26: 65–9.
32. Fernandez Figueras MT. From actinic keratosis to squamous cell carcinoma: pathophysiology revisited. *J Eur Acad Dermatology Venereol* 2017; 31:5–7.
33. Martorell-Calatayud A, Sanmartín Jimenez O, Cruz Mojarrieta J, et al. Carcinoma epidermoide cutáneo: definiendo la variante de alto riesgo PALABRAS CLAVE. *Actas Dermosifiliogr* 2013; 104: 367–379.
34. Karia PS, Morgan FC, Califano JA, et al. Comparison of tumor classifications for cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck in the 7th vs 8th edition of the AJCC cancer staging manual. *JAMA Dermatology* 2018; 154: 175–181.

35. Roscher I, Falk RS, Vos L, et al. Validating 4 staging systems for cutaneous squamous cell carcinoma using population-based data a nested case-control study. *JAMA Dermatology* 2018; 154: 428–434.
36. Brantsch KD, Meisner C, Schönfisch B, et al. Analysis of risk factors determining prognosis of cutaneous squamous-cell carcinoma: a prospective study. *Lancet Oncol* 2008; 9: 713–720.
37. Schmults CD, Karia PS, Carter JB, et al. Factors Predictive of Recurrence and Death From Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *JAMA Dermatology* 2013; 149: 541.
38. Kristensen RN, Stemann Andersen P, Lock-Andersen J. Lip carcinoma: clinical presentation, surgical treatment, and outcome: a series of 108 cases from Denmark. *J Plast Surg Hand Surg* 2017; 51: 342–347.
39. Wang DM, Kraft S, Rohani P, et al. Association of Nodal Metastasis and Mortality With Vermilion vs Cutaneous Lip Location in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma of the Lip. *JAMA Dermatol* 2018; 02130: 701–707.
40. Feasel AM, Brown TJ, Bogle MA, et al. Perineural invasion of cutaneous malignancies. *Dermatologic Surg* 2001; 27: 531–542.
41. Leibovitch I, Huilgol SC, Selva D, et al. Cutaneous squamous cell carcinoma treated with Mohs micrographic surgery in Australia II. Perineural invasion. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53: 261–6.
42. Ross AS, Whalen FM, Elenitsas R, et al. Diameter of involved nerves predicts outcomes in cutaneous squamous cell carcinoma with perineural invasion: an investigator-blinded retrospective cohort study. *Dermatol Surg* 2009; 35: 1859–66.

43. Carter JB, Johnson MM, Chua TL, et al. Outcomes of primary cutaneous squamous cell carcinoma with perineural invasion: an 11-year cohort study. *JAMA dermatology* 2013; 149: 35–41.
44. Campoli M, Brodland DG, Zitelli J. A prospective evaluation of the clinical, histologic, and therapeutic variables associated with incidental perineural invasion in cutaneous squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 2014; 70: 630–636.
45. NCCN.org. Squamous Cell Skin Cancer. *NCCN Clin Pract Guidel Oncol (NCCN Guidel; Version 2*. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.1016/j.applanim.2007.06.006.
46. Murad Alam,M.D. Desiree Ratner MD. C s -c c. *N Engl J Med* 2001; 344: 975–983.
47. Fujimoto M, Yamamoto Y, Matsuzaki I, et al. Tumor budding is an independent risk factor for lymph node metastasis in cutaneous squamous cell carcinoma: a single center retrospective study. *J Cutan Pathol* 2016; 43: 766–71.
48. De Smedt L, Palmans S, Andel D, et al. Expression profiling of budding cells in colorectal cancer reveals an EMT-like phenotype and molecular subtype switching. *Br J Cancer* 2017; 116: 58–65.
49. Hase K, Shatney C, Johnson D, et al. Prognostic value of tumor "budding" in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1993; 36: 627–35.
50. Wang C, Huang H, Huang Z, et al. Tumor budding correlates with poor prognosis and epithelial- mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2011; 40: 545–551.

51. Gonzalez-Guerrero M, Martínez-Cambor P, Vivanco B, et al. The adverse prognostic effect of tumor budding on the evolution of cutaneous head and neck squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 2017; 76: 1139–1145.
52. KARAYANNOPOULOU G, EUVRARD S, KANITAKIS J. Tumour Budding Correlates with Aggressiveness of Cutaneous Squamous-cell Carcinoma. *Anticancer Res* 2016; 36: 4781–4786.
53. Chuang W-Y, Yeh C-J, Chao Y-K, et al. Concordant podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts and tumor cells is an adverse prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7:4847–56.
54. Takeuchi S, Fukuda K, Yamada T, et al. Podoplanin promotes progression of malignant pleural mesothelioma by regulating motility and focus formation. *Cancer Sci* 2017; 108: 696–703.
55. Kan S, Konishi E, Arita T, et al. Podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts predicts aggressive behavior in melanoma. *J Cutan Pathol* 2014; 41: 561–567.
56. Toll A, Gimeno-Beltrán J, Ferrandiz-Pulido C, et al. D2-40 immunohistochemical overexpression in cutaneous squamous cell carcinomas: a marker of metastatic risk. *J Am Acad Dermatol* 2012; 67: 1310–8.
57. Cañueto J, Cardeñoso-Álvarez E, Cosano-Quero A, et al. The expression of podoplanin is associated with poor outcome in cutaneous squamous cell carcinoma. *J Cutan Pathol* 2017; 44: 144–151.
58. Chaffer CL, San Juan BP, Lim E, et al. EMT, cell plasticity and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2016; 35: 645–654.
59. Toll A, Masferrer E, Hernández-Ruiz ME, et al. 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* 2013; 72: 93–102.

60. Zhou J, Wang XH, Zhao YX, et al. Cancer-associated fibroblasts correlate with tumor-associated macrophages infiltration and lymphatic metastasis in triple negative breast cancer patients. *J Cancer* 2018; 9: 4635–4641.
61. Hu G, Zhong K, Chen W, et al. Podoplanin-positive cancer-associated fibroblasts predict poor prognosis in lung cancer patients. *Onco Targets Ther* 2018; 11: 5607–5619.
62. Sha M, Jeong S, Qiu B jun, et al. Isolation of cancer-associated fibroblasts and its promotion to the progression of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Med* 2018; 7: 4665–4677.
63. Cho JG, Byeon HK, Oh KH, et al. Clinicopathological significance of cancer-associated fibroblasts in papillary thyroid carcinoma: a predictive marker of cervical lymph node metastasis. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology* 2018; 275: 2355–2361.
64. Sasaki K, Sugai T, Ishida K, et al. Analysis of cancer-associated fibroblasts and the epithelial-mesenchymal transition in cutaneous basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, and malignant melanoma. *Hum Pathol* 2018; 79: 1–8.
65. Commandeur S, Ho SH, de Gruijl FR, et al. Functional characterization of cancer-associated fibroblasts of human cutaneous squamous cell carcinoma. *Exp Dermatol* 2011; 20: 737–742.
66. Huang SJ, Hijnen D, Murphy GF, et al. Imiquimod enhances ifn- γ production and effector function of T cells infiltrating human squamous cell carcinomas of the skin. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 2676–2685.

67. Bauer C, Abdul Pari AA, Umansky V, et al. T-lymphocyte profiles differ between keratoacanthomas and invasive squamous cell carcinomas of the human skin. *Cancer Immunol Immunother* 2018; 67: 1147–1157.
68. Strobel SB, Safferling K, Lahrmann B, et al. Altered density, composition and microanatomical distribution of infiltrating immune cells in cutaneous squamous cell carcinoma of organ transplant recipients. *Br J Dermatol* 2018; 179:405–412.
69. Tumei PC, Harview CL, Yearley JH, et al. Immune Resistance. *Nature* 2015; 515: 568–571.
70. Kamiya S, Kato J, Kamiya T, et al. Association between PD-L1 expression and lymph node metastasis in cutaneous squamous cell carcinoma. *Asia Pac J Clin Oncol* 2018; 1: 1–5.
71. García-Pedrero JM, Martínez-Cambor P, Diaz-Coto S, et al. Tumor programmed cell death ligand 1 expression correlates with nodal metastasis in patients with cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Am Acad Dermatol* 2017; 77: 527–533.
72. García-Díez I, Hernández-Ruiz E, Andrades E, et al. PD-L1 Expression is Increased in Metastasizing Squamous Cell Carcinomas and Their Metastases. *Am J Dermatopathol* 2018; 40: 647–654.
73. Rogers GS, Gilchrist BA. The senile epidermis: environmental influences on skin ageing and cutaneous carcinogenesis. *Br J Dermatol* 1990; 122 Suppl 35: 55–60.
74. Jacobs MS, Persons DL, Fraga GR. EGFR and MYC gene copy number aberrations are more common in squamous cell carcinoma than keratoacanthoma: a FISH study. *J Cutan Pathol* 2013; 40: 447–54.

75. Shimizu T, Izumi H, Oga A, et al. Epidermal Growth Factor Receptor Overexpression and Genetic Aberrations in Metastatic Squamous-Cell Carcinoma of the Skin. *Dermatology* 2001; 202: 203–206.
76. Nakazawa H, English D, Randell PL, et al. UV and skin cancer: specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 360–4.
77. Jiang W, Ananthaswamy HN, Muller HK, et al. p53 protects against skin cancer induction by UV-B radiation. *Oncogene* 1999; 18: 4247–4253.
78. Toll A, Salgado R, Yébenes M, et al. MYC gene numerical aberrations in actinic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2009; 161: 1112–8.
79. Toll A, Salgado R, Yébenes M, et al. Epidermal growth factor receptor gene numerical aberrations are frequent events in actinic keratoses and invasive cutaneous squamous cell carcinomas. *Exp Dermatol* 2010; 19: 151–3.
80. Helen Davies, Graham R. Bignell E al. 6-Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 949–54.
81. Su F, Viros A, Milagre C, et al. RAS mutations in cutaneous squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors. *N Engl J Med* 2012; 366: 207–15.
82. Oberholzer PA, Kee D, Dziunycz P, et al. RAS mutations are associated with the development of cutaneous squamous cell tumors in patients treated with RAF inhibitors. *J Clin Oncol* 2012; 30: 316–321.
83. Li YY, Hanna GJ, Laga AC, et al. Genomic analysis of metastatic cutaneous squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. Epub ahead of print 2015. DOI:

10.1158/1078-0432.CCR-14-1773.

84. South AP, Purdie KJ, Watt SA, et al. NOTCH1 Mutations Occur Early during Cutaneous Squamous Cell Carcinogenesis. *J Invest Dermatol* 2014; 134: 2630–2638.
85. Yilmaz AS, Ozer HG, Gillespie JL, et al. Differential mutation frequencies in metastatic cutaneous squamous cell carcinomas versus primary tumors. *Cancer* 2017; 123: 1184–1193.
86. Pickering CR, Zhou JH, Lee JJ, et al. Mutational landscape of aggressive cutaneous squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2014; 20: 6582–92.
87. Purdie KJ, Lambert SR, Teh MT, et al. Allelic imbalances and microdeletions affecting the PTPRD gene in cutaneous squamous cell carcinomas detected using single nucleotide polymorphism microarray analysis. *Genes Chromosom Cancer* 2007; 46: 661–669.
88. Purdie KJ, Harwood CA, Gulati A, et al. Single nucleotide polymorphism array analysis defines a specific genetic fingerprint for well-differentiated cutaneous SCCs. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 1562–1568.
89. Bracken AP, Pasini D, Capra M, et al. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J* 2003; 22: 5323–5335.
90. Park I, Qian D, Kiel M, et al. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 2003; 423: 302–305.
91. Lessard J, Sauvageau G. Polycomb group genes as epigenetic regulators of normal and leukemic hemopoiesis. *Exp Hematol* 2003; 31: 567–85.
92. Leung C, Lingbeek M, Shakhova O, et al. Bmi1 is essential for cerebellar

development and is overexpressed in human medulloblastomas. *Nature* 2004; 428: 337–41.

93. Martínez-Romero C, Rooman I, Skoudy A, et al. The epigenetic regulators Bmi1 and Ring1B are differentially regulated in pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Pathol* 2009; 219: 205–13.
94. Bosch A, Panoutsopoulou K, Corominas JM, et al. The Polycomb group protein RING1B is overexpressed in ductal breast carcinoma and is required to sustain FAK steady state levels in breast cancer epithelial cells. *Oncotarget* 2014; 5: 2065.
95. Mihic-Probst D, Kuster A, Kilgus S, et al. Consistent expression of the stem cell renewal factor BMI-1 in primary and metastatic melanoma. *Int J cancer* 2007; 121: 1764–70.
96. Bachmann IM, Puntervoll HE, Otte AP, et al. Loss of BMI-1 expression is associated with clinical progress of malignant melanoma. *Mod Pathol* 2008; 21: 583–90.
97. Van Kemenade FJ, Raaphorst FM, Blokzijl T, et al. Coexpression of BMI-1 and EZH2 polycomb-group proteins is associated with cycling cells and degree of malignancy in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2001; 97: 3896–3901.
98. Bachmann IM, Halvorsen OJ, Collett K, et al. EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J Clin Oncol* 2006; 24: 268–273.
99. Xie Q, Wang H, Heilman ER, et al. Increased expression of enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) differentiates squamous cell carcinoma from normal skin and actinic keratosis. *Eur J Dermatol*; 24: 41–5.

100. McHugh JB, Fullen DR, Ma L, et al. Expression of polycomb group protein EZH2 in nevi and melanoma. *J Cutan Pathol* 2007; 34: 597–600.
101. Wang Y, Chen Y, Geng H, et al. Overexpression of YB1 and EZH2 are associated with cancer metastasis and poor prognosis in renal cell carcinomas. *Tumor Biol* 2015; 36: 7159–7166.
102. Xu B, Abourbih S, Sircar K, et al. Enhancer of zeste homolog 2 expression is associated with metastasis and adverse clinical outcome in clear cell renal cell carcinoma: A comparative study and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med* 2013; 137: 1326–1336.
103. Harms KL, Chubb H, Zhao L, et al. Increased expression of EZH2 in Merkel cell carcinoma is associated with disease progression and poorer prognosis. *Hum Pathol* 2017; 67: 78–84.
104. Wu X, Scott H, Carlsson S V., et al. Increased EZH2 expression in prostate cancer is associated with metastatic recurrence following external beam radiotherapy. *Prostate* 2019; 1079–1089.
105. Beauparlant P, Hiscott J. Biological and biochemical inhibitors of the NF- κ B/Rel proteins and cytokine synthesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7: 175–190.
106. Nissinen L, Farshchian M, Riihilä P, et al. New perspectives on role of tumor microenvironment in progression of cutaneous squamous cell carcinoma. *Cell and Tissue Research*. Epub ahead of print 2016. DOI: 10.1007/s00441-016-2457-z.
107. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQM, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012; 366:2455–65.
108. Patel R, Chang ALS. Immune Checkpoint Inhibitors for Treating Advanced

Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Am J Clin Dermatol*. Epub ahead of print 8 February 2019. DOI: 10.1007/s40257-019-00426-w.

109. Migden MR, Rischin D, Schmults CD, et al. PD-1 Blockade with Cemiplimab in Advanced Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 2018; 379: 341–351.
110. Kacew AJ, Harris EJ, Lorch JH, et al. Chromosome 3q arm gain linked to immunotherapy response in advanced cutaneous squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 2019; 113: 1–9.
111. Martins VL, Vyas JJ, Chen M, et al. Increased invasive behaviour in cutaneous squamous cell carcinoma with loss of basement-membrane type VII collagen. *J Cell Sci* 2009; 122: 1788–1799.
112. Watt J, Kocher HM. The desmoplastic stroma of pancreatic cancer is a barrier to immune cell infiltration. *Oncoimmunology* 2013; 2: e26788.
113. Ronen S, Gru AA, Noland MM, et al. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma With Sclerosing Features: An Uncommon and Potentially Aggressive Variant. *Am J Dermatopathol* 2018; 40: 575–579.
114. Ueno H, Shinto E, Shimazaki H, et al. Histologic categorization of desmoplastic reaction: its relevance to the colorectal cancer microenvironment and prognosis. *Ann Surg Oncol* 2015; 22: 1504–12.

ANEXO

FUENTES DE FINANCIACIÓN

- Regulación epigenética de la función inflamatoria del componente epitelial en la progresión metastásica del carcinoma escamoso cutánea (CEC). PI15/00236. Fondos FEDER.

- Mecanismos epigenéticos implicados en la progresión metastásica del carcinoma escamoso cutáneo (CEC): papel de la disqueratina y de los RNAs no codificantes de pequeño tamaño. PI18/00065. Fondos FEDER.