



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

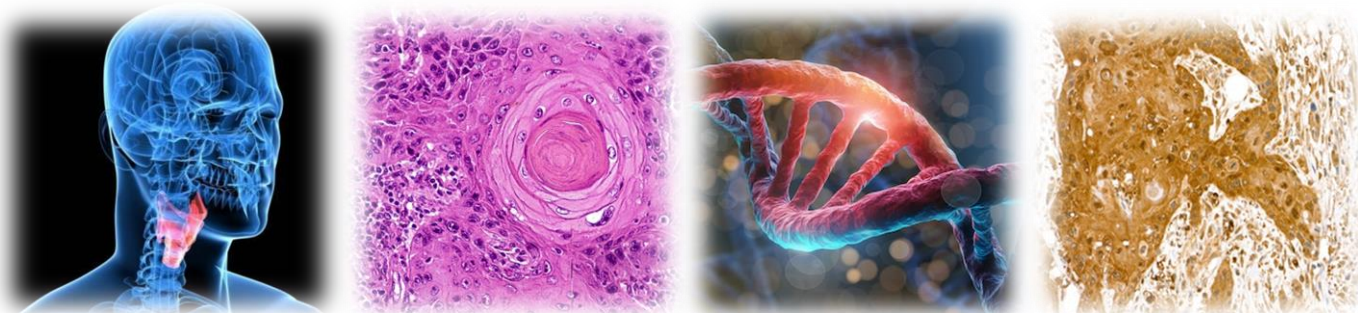
**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

- Tesi Doctoral 2023 -

**CAPACITAT PRONÒSTICA DE L'EXPRESSIÓ DE GENS  
RELACIONATS AMB EL METABOLISME DE LA GLUCOSA EN EL  
CONTROL LOCAL DE PACIENTS AMB CARCINOMA ESCATÓS  
DE CAP I COLL**

---



Sílvia Bagué Rosell

**DIRECTORS**

---

Dr. Xavier León Vintró

Dra. Mercedes Camacho Pérez de Madrid

Dr. Francesc Xavier Avilés-Jurado

**TUTOR**

---

Dr. Xavier León Vintró

Programa de Doctorat en Cirurgia i Ciències Morfològiques

Departament de Cirurgia

Facultat de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

**UAB**  
Universitat  
Autònoma  
de Barcelona

 HOSPITAL DE LA  
SANTA CREU I  
**SANT PAU**  
FUNDACIÓ DE GESTIÓ SANITÀRIA  
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

**CAPACITAT PRONÒSTICA DE L'EXPRESSION DE GENS  
RELACIONATS AMB EL METABOLISME DE LA GLUCOSA EN EL  
CONTROL LOCAL DE PACIENTS AMB CARCINOMA ESCATÓS  
DE CAP I COLL**

Memòria presentada per

Sílvia Bagué Rosell

per a optar al grau de Doctor en Medicina

**DIRECTORS**

---

**Dr. Xavier León Vintro**

Professor Titular d'Universitat  
Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)

**Dra. Mercedes Camacho Pérez de Madrid**

Genomics of Complex Diseases  
Institut de Recerca IIB Sant Pau

**Dr. Francesc Xavier Avilés-Jurado**

Professor Titular d'Universitat  
Universitat Rovira i Virgili (URV-Tarragona)

**TUTOR**

---

**Dr. Xavier León Vintro**

Professor Titular d'Universitat  
Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)





*A l'Oriol, el meu fill, per haver-me retrobat amb la professió*

*Als pacients perquè, al capdavant, són els qui donen sentit al nostre  
esforç i dedicació*



*Un floc de neu mai cau en el lloc equivoccat.*

Anònim



# AGRAÏMENTS

---

Tants anys pensant-hi: en què, com, quan i amb qui. I ara, per fi, aquí.

Infinítament agraïda als directors d'aquesta tesi, els Drs. Xavier León, Mercedes Camacho i Francesc Xavier Avilés-Jurado, per la confiança, l'assessorament i el suport en l'elaboració d'aquest projecte.

I un agraïment especial al tutor-director, el Dr. León, "el Xavi". Per moltes i tantes coses. Pel seu rigor professional, dedicació, entusiasme i generositat. Perquè ens ha fet gaudir de l'especialitat d'Otorrinolaringologia als patòlegs que hem treballat al seu costat i, a més, ens ho ha posat sempre fàcil. I perquè, sense el seu embat, aquest projecte mai no haguera estat possible.



# ÍNDEX

---

ACRÒNIMS.....	16
I. INTRODUCCIÓ .....	21
1. Carcinoma escatós de cap i coll (CECC).....	21
1.1. Definició.....	21
1.2. Epidemiologia .....	22
1.2.1. Incidència, prevalença i mortalitat.....	22
1.2.2. Factors de risc .....	22
1.3. Histologia.....	24
1.4. Factors pronòstics .....	25
1.4.1. Estadi TNM .....	25
1.4.1.1. Associació amb VPH.....	26
1.4.1.2. Profunditat de la invasió (“depth of invasion” / DOI) .....	26
1.4.1.3. Extensió ganglionar extracapsular (EGE) .....	28
1.4.2. Altres factors pronòstics histopatològics .....	28
1.4.3. Cancerització de camp i recidiva local .....	30
1.5. Carcinogènesi i progressió tumoral .....	32
1.5.1. Carcinogènesi en el CECC no associat a VPH (CECC VPH -).....	32
1.5.2. Carcinogènesi en el CECC associat a VPH (CECC VPH +).....	33
1.6. Genètica molecular .....	35
1.6.1. Introducció .....	35
1.6.2. Genètica molecular en el CECC .....	35
1.7. Epigenètica .....	37
1.8. Tractament.....	38
2. Característiques distintives del càncer en general .....	40
3. Metabolisme i càncer.....	42
3.1. Introducció .....	42
3.2. Característiques distintives (“hallmarks”) del metabolisme del càncer.....	42
3.2.1. Reprogramació metabòlica .....	43
3.2.2. Oncometabòlits .....	44
3.3. Metabolisme cel·lular normal .....	44
3.3.1. Glicòlisi .....	46
3.3.2. Fosforilació oxidativa (OxPhos) .....	47
3.3.3. Metabolisme dels carbohidrats en les cèl·lules normals .....	48



3.4. Metabolisme cel·lular en les cèl·lules canceroses .....	49
3.4.1. Metabolisme dels carbohidrats en les cèl·lules canceroses .....	50
3.4.1.1. Glicòlisi aeròbica: l'efecte Warburg .....	50
3.4.1.2. Beneficis de l'efecte Warburg per al càncer .....	54
3.4.1.3. Concepcions "errònies" sobre l'efecte Warburg .....	55
3.4.1.4. Efecte Warburg invers .....	56
4. El càncer com a trastorn metabòlic .....	57
4.1. Aspectes generals .....	57
4.2. Metabolisme i carcinogènesi .....	57
4.3. Efecte Warburg: conseqüència o causa de la carcinogènesi? .....	60
4.4. Consideracions finals .....	62
5. Aspectes moleculars del metabolisme del càncer .....	62
5.1. Gens efectors clau decisius en el metabolisme del càncer .....	63
5.1.1. HIF (Factor induïble per la hipòxia) .....	64
5.1.2. c-Myc (factor de transcripció Myc) .....	65
5.1.3. Gen supressor tumoral TP53 .....	65
5.2. Enzims metabòlics. Bases moleculars de la glicòlisi aeròbica en el càncer .....	65
5.3. ARN no codificants .....	66
6. Biomarcadors i càncer .....	67
6.1. Aspectes generals dels biomarcadors. Rellevància clínica .....	67
6.2. Biomarcadors (metabòlics i altres) en el CECC .....	69
6.3. Gens relacionats amb el metabolisme estudiats en aquest treball .....	72
6.3.1. Gens transportadors de glucosa .....	73
6.3.1.1. SLC2A1 (GLUT1) (Solute carrier family 2 member 1) .....	73
6.3.1.2. SLC2A3 (GLUT3) (Solute carrier family 2 member 3) .....	73
6.3.2. Gens relacionats amb la glicòlisi .....	74
6.3.2.1. HK1 (Hexoquinasa 1) .....	74
6.3.2.2. PFKL (Fosfofructoquinasa L) .....	74
6.3.3. Gens del complex Piruvat Deshidrogenasa (PDH) .....	74
6.3.3.1. Piruvat deshidrogenasa (E1) .....	74
6.3.3.2. Dihidrolipoamida acetiltransferasa (E2 o DLAT) .....	75
6.3.3.3. Dihidrolipoamida deshidrogenasa (E3 o DLD) .....	75
6.3.3.4. PDHX .....	75
6.3.4. PDK1 (Piruvat deshidrogenasa quinasa 1) .....	75
6.3.5. Gens del Complex Lactat Deshidrogenasa (LDH) .....	76

6.3.5.1. LDHA (Lactat deshidrogenasa A) .....	76
6.3.5.2. LDHB (Lactat deshidrogenasa B) .....	76
6.3.6. Gens transportadors de piruvat i àcid làctic .....	77
6.3.6.1. SLC16A3 / Transportador de monocarboxilat 4 (MCT4) .....	77
6.3.6.2. SLC16A7 / Transportador de monocarboxilat 2 (MCT2) .....	78
6.3.7. Gens del Complex Succinat Deshidrogenasa (SDHA, SDHB, SDHC) ...	78
6.3.8. SUCNR-1 (receptor de succinat 1).....	79
6.3.9. HIF1A (Factor induïble per la hipòxia 1, subunitat alfa) .....	79
II. JUSTIFICACIÓ DEL TREBALL. ....	82
III. HIPÒTESI I OBJECTIUS .....	86
1. Hipòtesi de treball .....	86
2. Objectius del treball.....	86
2.1. Objectiu general.....	86
2.2. Objectius específics .....	86
IV. PACIENTS I METODOLOGIA .....	89
1. Pacients.....	89
1.1. Cohort de pacients tractats amb radioteràpia (RT) .....	90
1.2. Cohort de pacients tractats amb cirurgia .....	93
2. Determinació de l'expressió transcripcional dels gens inclosos en l'estudi .....	96
3. Anàlisi immunohistoquímica de l'expressió de LDHA .....	97
4. The Cancer Genome Atlas.....	98
5. Anàlisi estadística de les dades .....	99
6. Suport Financer.....	99
V. RESULTATS .....	102
1. Resultats de la cohort de radioteràpia .....	102
2. Resultats de la cohort de cirurgia .....	120
2.1. Correlació entre l'expressió transcripcional i immunohistoquímica de LDHA .....	154
2.2. Nivells d'expressió transcripcional DLAT/LDHA en tumor i mucosa sana (TCGA) .....	157
VI. DISCUSSIÓ .....	160
1. Expressió SLC2A3/SDHA en la cohort de radioteràpia .....	161
1.1. SLC2A3 .....	162
1.2. SDHA.....	165
2. Expressió DLAT/LDHA en la cohort de cirurgia .....	169

2.1. DLAT .....	169
2.2. LDHA.....	171
3. Expressió immunohistoquímica de LDHA.....	175
4. Altres gens inclosos en l'estudi i relació amb el CECC .....	176
5. Limitacions de l'estudi .....	179
6. Aplicabilitat de l'estudi i futures línies de recerca .....	180
VII. CONCLUSIONS .....	183
VIII. BIBLIOGRAFIA .....	186
IX. ANNEXES.....	206
1. Llista de figures .....	207
2. Llista de taules .....	214
3. Treball publicat relacionat amb aquesta tesi .....	216



# ACRÒNIMS

---

**AJCC:** “American Joint Committee on Cancer”

**ATP:** Trifosfat d'adenosina

**ATC:** Àcid tricarboxílic

**AUC:** Àrea sota la corba, de l'anglès “Area Under Curve”

**CAF:** Fibroblasts associats al càncer, de l'anglès “Cancer-Associated Fibroblasts”

**CE:** Carcinoma escatós

**CECC:** Carcinoma escatós de cap i coll

**CPD:** Complex piruvat deshidrogenasa

**CRT:** Arbre de classificació i regressió, de l'anglès “Classification and Regression Tree”

**CSD:** Complex succinat deshidrogenasa

**DLAT:** Dihidrolipoamida acetiltransferasa

**DLD:** Dihidrolipoamida deshidrogenasa

**DOI:** Profunditat de la invasió, de l'anglès “Depth of Invasion”

**EF:** Efecte Warburg

**EGEmi, ma:** Extensió ganglionar extracapsular, minor i major

**EMT:** Transició epitelial-mesenquimal, de l'anglès “Epithelial-Mesenchymal Transition”

**ETC:** Cadena de transport d'electrons, de l'anglès “Electron Transport Chain”

**FADH<sub>2</sub>:** Dinucleòtid de flavina i adenina + hidrogen

**FDA:** “Food and Drug Administration”

**FDG:** Fluor-18-desoxiglucosa

**FH:** Fumarat hidrogenasa

**GAPDH:** Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa

**GLUT:** Transportadors de glucosa, de l'anglès “GLUcose Transporter”

**GTP:** Trifosfat de guanosina

**HIF1:** Factor induïble per la hipòxia-1

**HK:** Hexoquinasa

**HNSCC:** CECC, de l'anglès “Head&Neck Squamous Cell Carcinoma”

**HR:** Hazard ratio

**IC:** Intèrval de confiança

**IDH:** Isocitrat deshidrogenasa

**IHQ:** Immunohistoquímica

**IMRT:** Radioteràpia d'intensitat modulada, de l'anglès "Intensity-Modulated Radiotherapy"

**LDH:** Lactat deshidrogenasa

**MCT:** Transportador de monocarboxilat, de l'anglès "MonoCarboxylate Tranporter"

**NADPH:** Dinucleòtid de nicotinamida i adenina + hidrogen

**OxPhos:** Fosforilació oxidativa, de l'anglès "Oxidative Phosphorylation"

**PDH:** Piruvat deshidrogenasa

**PK1:** Piruvat quinasa deshidrogenasa 1

**PEP:** Fosfoenolpiruvat

**PET:** Tomografia per emissió de positrons, de l'anglès "Positron Emission Tomography"

**PFKL:** Fosfofructoquinasa L

**PGK1:** Fosfoglicerat quinasa 1

**PK:** Piruvat quinasa

**PKM2:** Piruvat quinasa, isoforma M2

**PPP:** Via de la pentosa fosfat

**QT:** Quimioteràpia

**R-2HG:** 2-Hidroixlutarat

**ROC:** Característica de funcionament del receptor, de l'anglès "Receiving-Operating-Characteristic".

**RT:** Radioteràpia

**RT-PCR:** Reacció en cadena de la polimerasa en temps real

**SDH:** Succinat deshidrogenasa

**SLC2:** Solute Carrier, family 2

**SUCNR1:** Receptor de succinat 1

**TCGA:** "The Cancer Genome Atlas"

**TNM:** "Tumor-Node-Metastasis"

**TORS:** Cirurgia robòtica transoral, de l'anglès "Transoral Robotic Surgery"

**UICC:** “Union for International Cancer Control”

**VEB:** Virus d’Epstein Barr

**VPH:** Virus del Papil·loma Humà

**WPOI:** Pitjor patró d’invasió, de l’anglès “Worst Pattern of Invasion”





# I. INTRODUCCIÓ

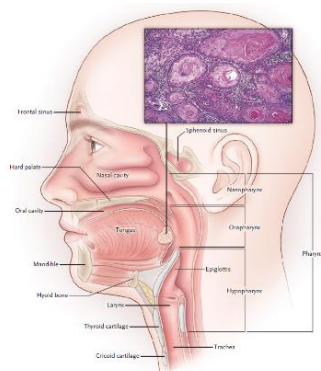
---

## I. INTRODUCCIÓ

### 1. Carcinoma escatós de cap i coll (CECC)

#### 1.1. Definició

El càncer de cap i coll engloba un grup heterogeni i genèticament complex de tumors malignes localitzats a la cavitat oral, nasofaringe, orofaringe, hipofaringe, laringe, sins paranasals i glàndules salivals, amb un perfil d'alta morbiditat i mortalitat (figures 1 i 2). La majoria dels càncers de cap i coll (al voltant del 90%) deriven de l'epiteli de la mucosa de la cavitat oral, faringe i laringe i es coneixen col·lectivament com carcinoma escatós de cap i coll (CECC), el qual es presenta freqüentment com una malaltia localment avançada (Johnson *et al.*, 2020).



**Figura 1.** Principals llocs anatòmics del carcinoma escatós de cap i coll (CECC). Requadre: histologia característica del carcinoma escatós (Font: Chow LQM. N Engl J Med 2020).

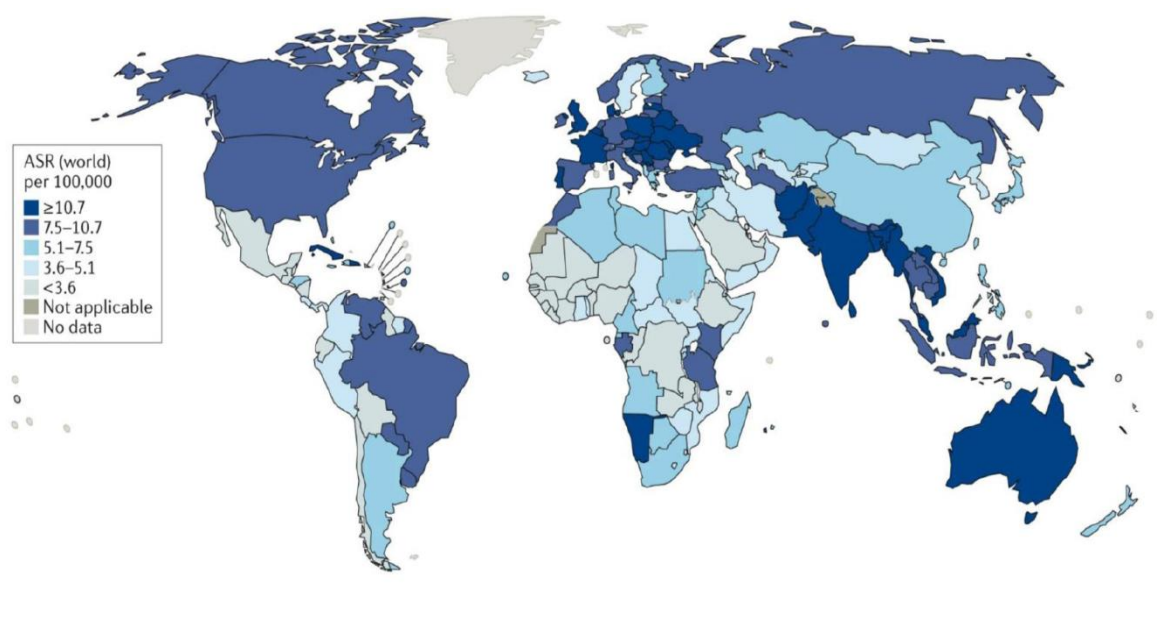


**Figura 2.** Carcinoma escatós exofític de laringe amb afectació transglòtica (Font: arxiu del Servei de Patologia. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona).

## 1.2. Epidemiologia

### 1.2.1. Incidència, prevalença i mortalitat

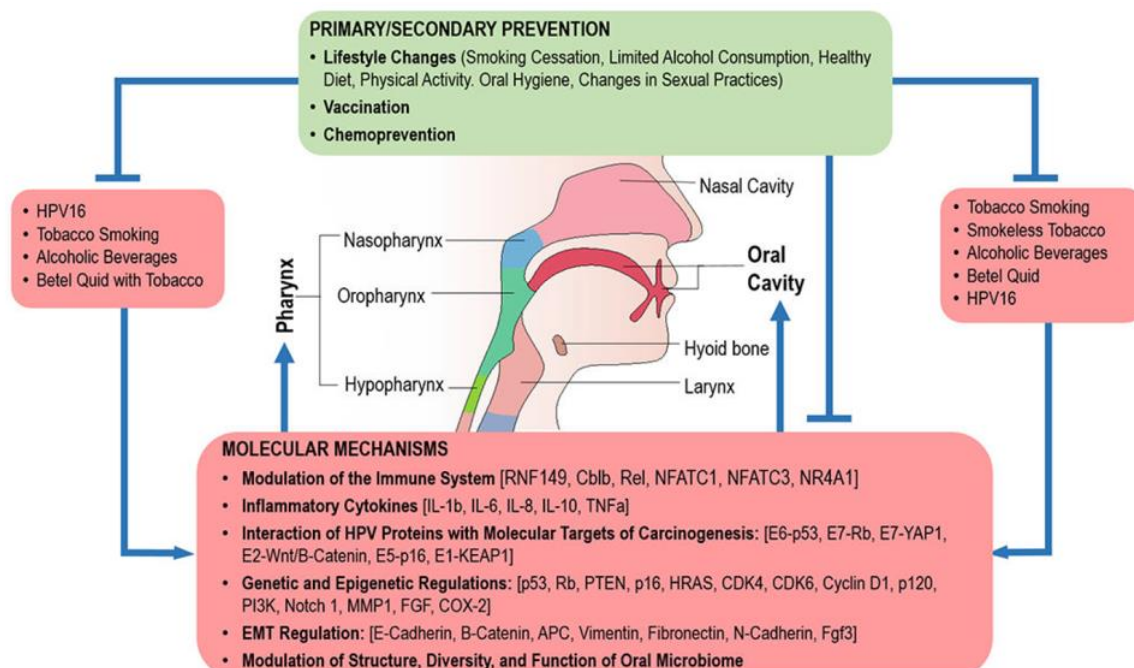
El CECC es troba entre els càncers més freqüents i la incidència anual varia segons els països o regions, amb una alta prevalença al sud-est asiàtic, Brasil, Europa central i Amèrica del Nord (figura 3). Si considerem els càncers originats a la cavitat oral, orofaringe, hipofaringe i laringe en conjunt, aquests van representar més de 700.000 casos nous (3,9% de tots els casos de càncer) i més de 350.000 morts (3,8% de tots els casos de càncer) a tot el món el 2018, fet que el converteix en el sisè tumor maligne més comú a tot el món (Bray *et al.*, 2018; Miranda-Filho *et al.*, 2020; Johnson *et al.*, 2020). El CE de cavitat oral i el CE d'orofaringe són els tipus de CECC més freqüents. Al món desenvolupat, la incidència de CE de cavitat oral està disminuint a conseqüència dels programes per deixar de fumar mentre que el CE d'orofaringe relacionat amb la infecció pel virus del papil·loma humà (VPH) està en augment i actualment es considera el càncer associat a VPH més comú als EUA (El-Bayoumi *et al.*, 2020; Siegel *et al.*, 2022).



**Figura 3.** Incidència global del CECC. Dades modificades de: GLOBOCAN 2018 (Font: Johnson DE *et al.* Nat Rev Dis Primer 2020).

### 1.2.2. Factors de risc

El desenvolupament del CECC és multifactorial (figura 4) i està relacionat amb diversos factors etiològics com la ubicació geogràfica, la dieta, els hàbits tòxics, l'exposició a la llum solar i el fons genètic (Vigneswaran *et al.*, 2014; Miranda-Galvis *et al.*, 2021). Altres factors de risc són l'envelliment, la manca d'higiene bucodental i les dietes mancades de verdures, entre d'altres (Bravi *et al.*, 2021).



**Figura 4.** Factors de risc de càncer oral i d'orofaríngic (Font: El-Bayoumi K. Cancer Prev Res (Phila) 2020).

Els càncers de cavitat oral, hipofaríngic i laringe s'associen generalment amb l'exposició a carcinògens derivats del tabac, el consum excessiu d'alcohol o ambdós i aquest risc està relacionat amb la intensitat i la durada del consum: existeix un risc quaranta vegades més gran de CECC amb el consum de tabac i d'alcohol en comparació amb els no fumadors i els no bevedors (Alfouzan *et al.*, 2018).

La infecció persistent pel virus del papil·loma humà (VPH) i pel virus d'Epstein-Barr (VEB) és un factor de risc etiològic ben conegut del CECC derivat de l'orofaríngic i de la nasofaríngic, respectivament (Tsang *et al.*, 2020).

La infecció pel VPH s'associa amb la majoria de càncers d'orofaríngic (més del 70%) i amb una petita minoria de càncers en altres llocs anatòmics de cap i coll (Stein *et al.*, 2015; Isayeva *et al.*, 2012). El VPH-16 és, amb diferència, el tipus de VPH més comú i representa més del 90% dels CE d'orofaríngic VPH (+). Les altres soques oncogèniques del VPH són principalment el VPH-18 i, amb menys freqüència, els VPH 31 i 33.

El CECC no associat a VPH o VPH negatiu i el CECC associat a VPH o VPH positiu mostren característiques clíniques i biològiques diferents i per això el CECC s'ha

separat en CECC VPH (-) i CECC VPH (+) (taula 1) (Powell *et al.*, 2021). El fet que els VPH oncogènics més comuns (tipus 16 i 18) estiguin coberts per les vacunes contra el VPH aprovades per la FDA fa pensar que el CECC VPH (+) es podria prevenir, eventualment, mitjançant campanyes de vacunació arreu del món (Johnson *et al.*, 2020).

**Taula 1.** Característiques clíniques i biològiques del CECC VPH (-) i VPH (+) (Modificat de: Leemans CR *et al.* Nature Cancer Rev 2011).

Característica	CECC VPH negatiu	CECC VPH positiu
Incidència	Decreixent	Creixent
Etiologia	Tabaquisme, alcohol	Sexe oral
Edat	Més de 60 anys	Menys de 60 anys
Cancerització de camp	Sí	Desconegut
Mutació p53	Freqüent	Infreqüent
Localització preferent	No	Orofaringe
Pronòstic	Dolent	Favorable

### 1.3. Histologia

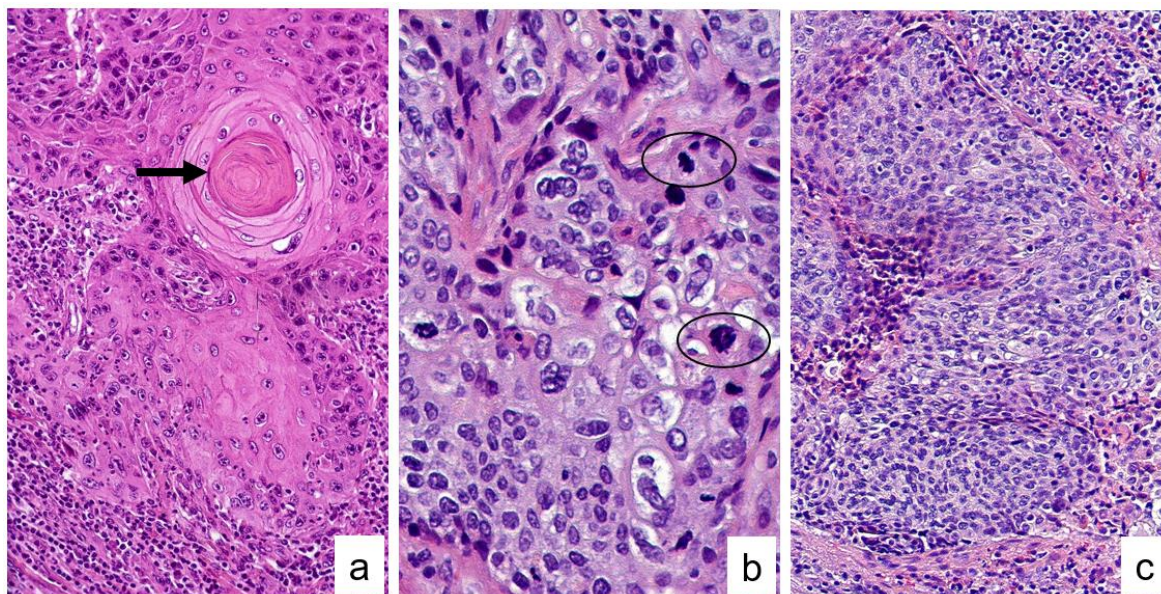
El CECC deriva de l'epiteli estratificat de la mucosa aerodigestiva superior i la gradació histològica es defineix per l'extensió de l'atípia cel·lular i la diferenciació escatosa.

El carcinoma escatós ben diferenciat s'assembla molt a l'epiteli estratificat d'origen, amb cèl·lules madures que s'organitzen en capes amb queratinització irregular i que es manifesten més clàssicament com una acumulació de queratina o "perla còrnia" (figura 5a).

El carcinoma escatós poc diferenciat es caracteritza per cèl·lules immadures amb pleomorfisme nuclear i mitosis atípiques, amb mínima organització arquitectural o queratinització (figura 5b).

Cal destacar que la qualitat de la diferenciació escatosa està estretament associada a l'etiologia: mentre que els CECC VPH (-) són més sovint moderadament o ben diferenciats amb preservació de l'estratificació i la queratinització, els CECC VPH (+) acostumen a ser poc diferenciats i fins i tot mostren una morfologia basaloide (figura 5c).





**Figura 5.** a) Carcinoma escatós ben diferenciat amb una perla còrnia (fletxa) (HEx 200) b) Carcinoma escatós mal diferenciat amb atípia nuclear i mitosis abundants (cercles) (HEx400) c) Carcinoma escatós mal diferenciat de tipus basaloide (HEx 200) (Fotos de l'autor).

#### 1.4. Factors pronòstics

El CECC recidiva en aproximadament la meitat dels pacients. La recidiva locoregional és la més freqüent, seguida successivament de la recaiguda a distància. A més a més, especialment en els pacients amb CECC VPH (-) no orofaringi, poden aparèixer segones neoplàsies primàries a cap i coll, pulmó o altres localitzacions amb una taxa anual d'aproximadament entre el 2 i el 3%. Malauradament, tant el càncer de cap i coll recidivant com el segon càncer primari són notòriament difícils de tractar de manera curativa (Leemans *et al.*, 2018).

Actualment, l'estadi de la malaltia (TNM) i l'estat del VPH es reconeixen com els principals determinants del pronòstic del CECC a Amèrica del Nord i Europa occidental, per bé que el CECC VPH (+) no es va identificar com una malaltia amb etiologia, característiques moleculars i pronòstic diferents fins a l'any 2010 (Ang *et al.*, 2010).

##### 1.4.1. Estadi TNM

El CECC es caracteritza per un mal pronòstic que es relaciona significativament amb l'estadi del tumor en el moment del diagnòstic i que determina la seva gravetat. El sistema d'estadificació més utilitzat per al càncer de cap i coll és el TNM (tumor- "node" o gangli -metàstasi) de "l'American Joint Committee on Cancer" (AJCC) i de la "Union for International Cancer Control" (UICC). El TNM s'estableix en funció de la mida del

tumor original (T), l'afectació locoregional ganglionar (N) i la presència de metàstasis a distància (M).

#### 1.4.1.1. Associació amb VPH

Tot i que solen presentar-se amb un estadi localment avançat, els pacients amb CECC VPH (+) tenen, en general, un pronòstic més favorable i mostren una supervivència significativament millor en comparació amb els pacients amb CECC VPH (-) (O'Rorke *et al.*, 2012).

Fins a l'any 2017 el sistema d'estadificació incorporava la classificació TNM per a cada localització anatòmica clàssica (cavitat oral, orofaringe, hipofaringe o laringe) independentment de l'estat del VPH. La nova edició (vuitena) de la classificació TNM de l'AJCC/UICC - que va entrar en vigor l'1 de gener de 2018 - s'ha complementat amb la incorporació d'informació addicional rellevant com n'és l'estat del VPH (Huang SH *et al.*, 2017; Müller, 2017). Aquest fet implica un nou sistema d'estadificació per als tumors d'orofaringe p16INK4A positius en el que la positivitat per immunohistoquímica de p16INK4A s'utilitza com a marcador subrogat del virus del papil·loma humà (VPH) i on la revisió de l'estadi ganglionar ha millorat la discriminació pronòstica d'aquest tumor en comparació amb la setena edició (Würdemann *et al.*, 2017) (taula 2).

**Taula 2.** Diferències d'estadificació del càncer d'orofaringe considerant l'estat del VPH (Modificat de: Leemans CR *et al.* Nature Cancer Rev 2018).

Setena edició TNM	Vuitena edició TNM
Estadi I (T1N0)	Estadi I (T1-T2N0-N1)
Estadi II (T2N0)	Estadi II (T1-T2N2 o T3N0-N2)
Estadi III (T3N0 o T1-T3N1)	Estadi III (T4 o N3)
Estadi IVa (T4a-N0-N1 o T1-T4aN2)	Estadi IV (M1)
Estadi IVb (T4b o T1-T4bN3)	–
Estadi IVc (M1)	–

#### 1.4.1.2. Profunditat de la invasió (“depth of invasion” / DOI)

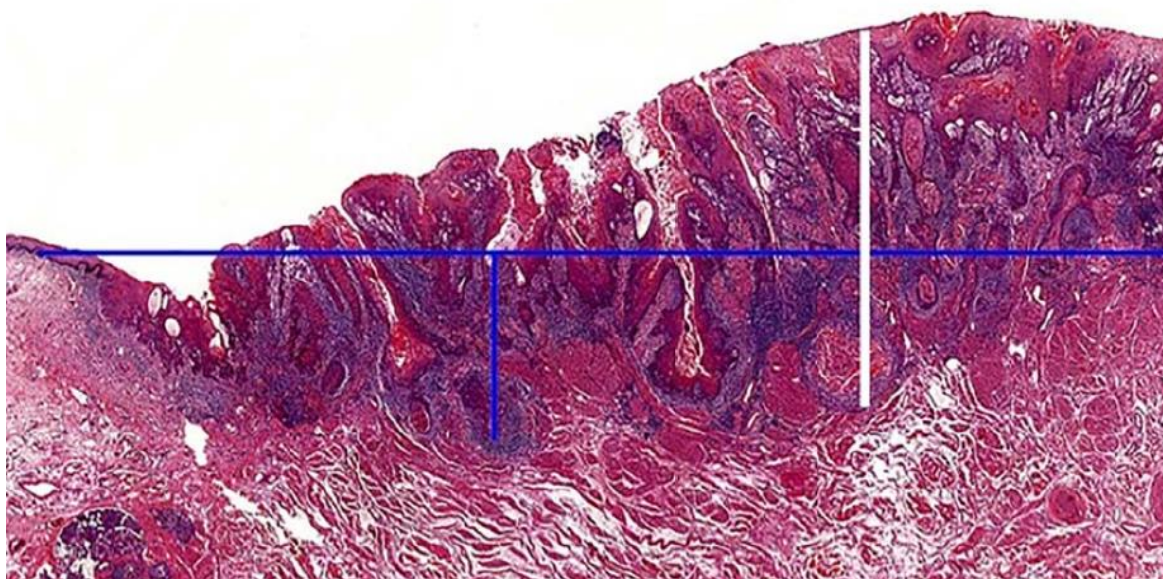
En els tumors de cavitat oral, la classificació TNM de la vuitena edició de l'AJCC/UICC té en consideració la profunditat de la invasió del tumor o DOI\* (de l'anglès “Depth of Invasion”), de manera que per cada augment de 5 mm en la DOI la categoria T augmenta un nivell (Lydiatt *et al.*, 2017) (taula 3; figures 6-7).

**Taula 3.** Profunditat de la invasió (DOI\*) en la definició del tumor primari (T) en el CE de cavitat oral (pTNM AJCC 8ª edició, 2017).

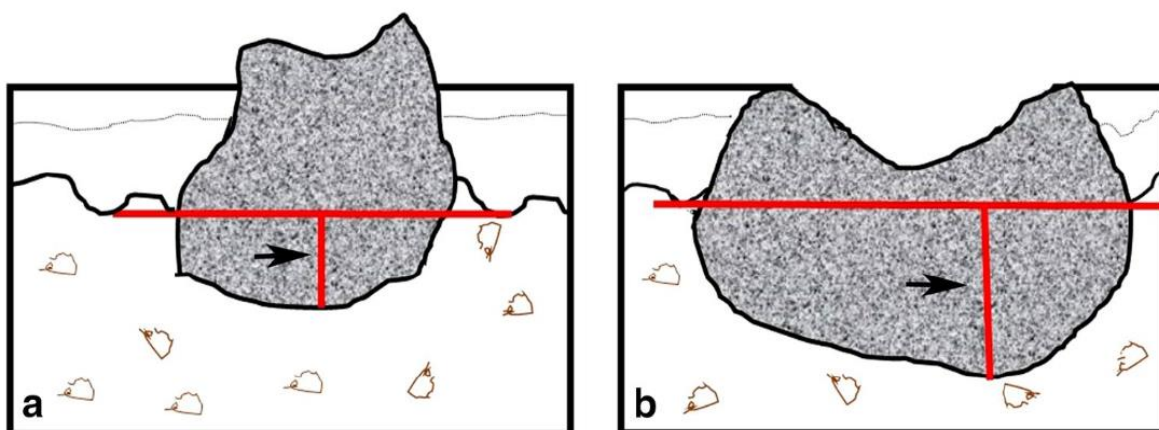
**T1** = tumor  $\leq$  2 cm; profunditat d'invasió  $\leq$  5 mm

**T2** = tumor  $\leq$  2 cm; profunditat d'invasió  $>$  5mm i  $\leq$  10mm o  
tumor  $>$  2 cm i  $\leq$  4 cm; profunditat d'invasió  $\leq$  10mm

**T3** = tumor  $>$  4 cm o qualsevol T amb profunditat d'invasió  $>$  10mm



**Figura 6.** Mesura de la profunditat de la invasió (DOI\*) representada per la línia blava vertical i que es determina amb una línia horitzontal imaginària al llarg de la membrana basal de la mucosa escatosa adjacent. No s'ha de confondre amb el gruix màxim del tumor (línia blanca). En aquest cas el gruix màxim del tumor és més gran que la profunditat de la invasió (Font: Lydiatt W *et al.* CA Cancer J Clin 2017).

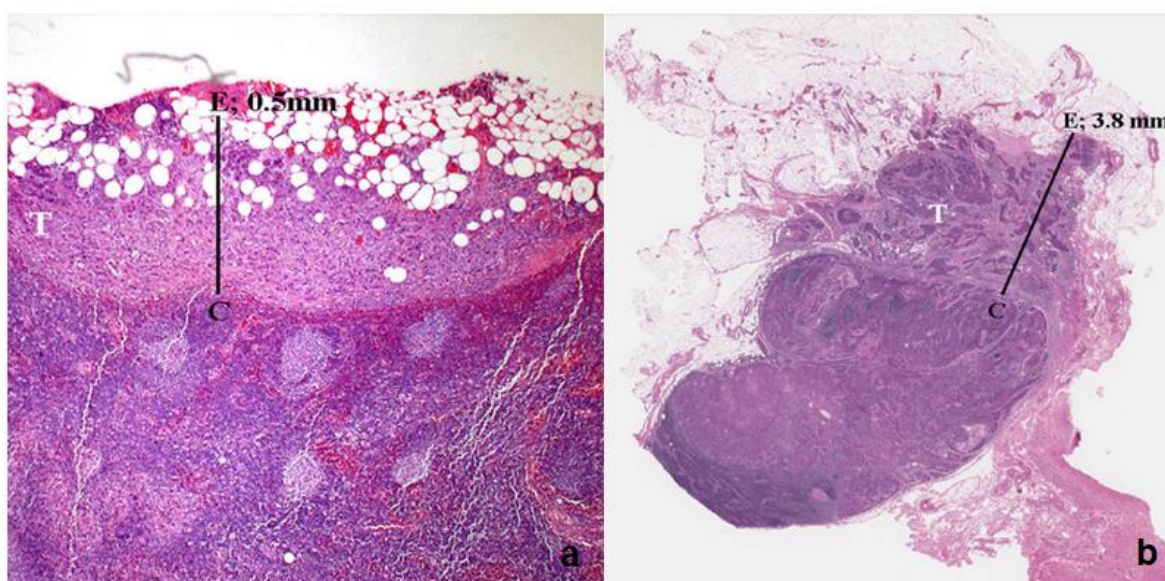


**Figura 7.** Exemples de la profunditat de la invasió (DOI) en un tumor exofític (a) i en un tumor ulcerat (b) (Font: Müller S *et al.* Head and Neck Pathol 2017).



### 1.4.1.3. Extensió ganglionar extracapsular (EGE)

El concepte d'extensió ganglionar extracapsular (EGE) (de l'anglès "Extracapsular Nodal Extension-ENE") s'utilitza per a l'estadiatge en totes les malalties ganglionars de cap i coll excepte la nasofaringe i el càncer orofaríngi VPH (+). Actualment, la propagació extracapsular es classifica com N3b en categories clíniques i patològiques, independentment de la mida dels ganglis limfàtics (Lydiatt *et al.*, 2017). L'EGE patològica se subclassifica en EGE<sub>mi</sub> (afectació microscòpica  $\leq 0,2$  cm més enllà de la càpsula ganglionar) i EGE<sub>ma</sub> (afectació més gran de 0,2 cm més enllà de la càpsula ganglionar) (Wreesmann *et al.*, 2015) (figura 8).

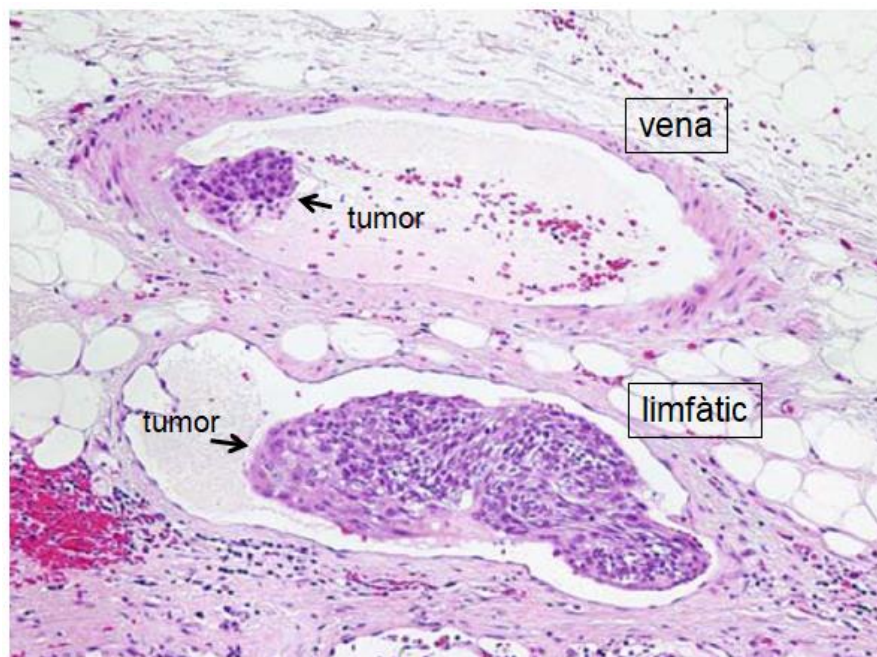


**Figura 8.** a) Extensió ganglionar extracapsular "minor"  $\leq 2$ mm i b) EGE "major"  $> 2$ mm (Font: Wreesmann VB *et al.* Head&Neck 2015).

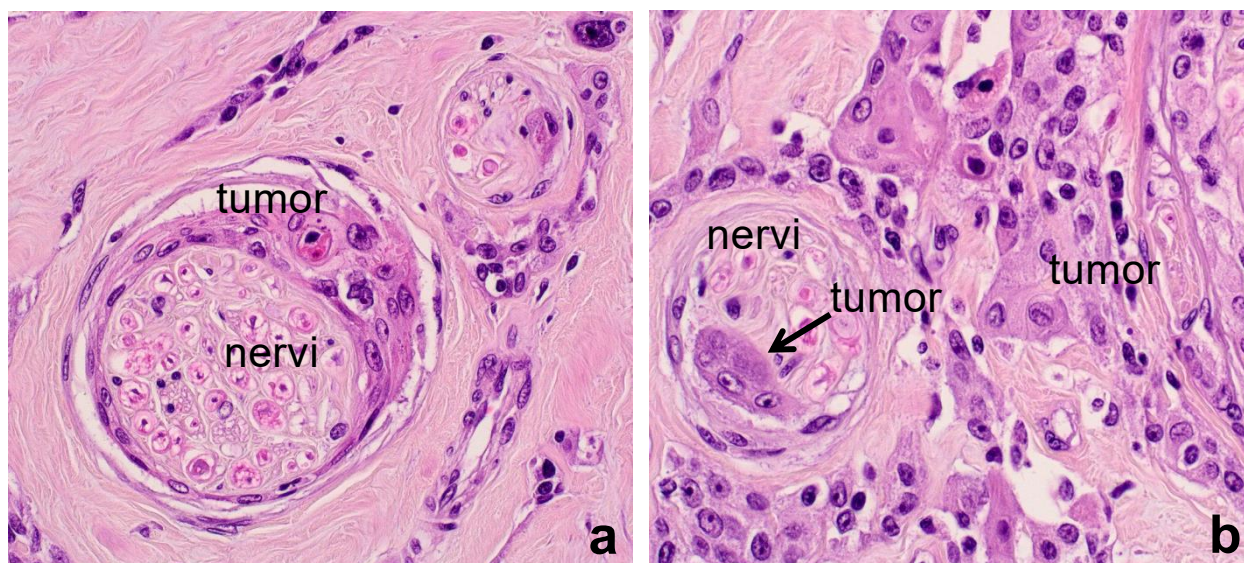
### 1.4.2. Altres factors pronòstics histopatològics

A més de la profunditat de la invasió en el càncer de cavitat oral (DOI\*) i de l'extensió ganglionar extraextracapsular - elements incorporats en el sistema actual d'estadificació TNM -, hi ha altres característiques histològiques que constitueixen factors pronòstics de risc de recidiva local o de metàstasi, com ara la invasió limfovascular (figura 9), la invasió perineural i intraneural (figura 10), el front d'invasió no cohesiu (WPOI\*, de l'anglès "Worst pattern of invasion") (figura 11), les gemmacions tumorals o desdiferenciació tumoral focal ("tumor budding"), que es defineix com la presència de cèl·lules tumorals aïllades o en grups de  $< 5$  cèl·lules en el front d'invasió (figura 12) i la displàsia d'alt grau en els marges quirúrgics (Li Y *et al.*, 2013; Almangush *et al.*, 2014; Mäkitie *et al.*, 2019; Chatterjee *et al.*, 2019). La dispersió del tumor (WPOI)

s'avalua en el front d'avançament del tumor. Per tal de simplificar el pronòstic, el punt de tall recomanat per a l'avaluació del WPOI és si hi ha o no un WPOI-5, que es defineix com una dispersió tumoral  $\geq 1$  mm entre els tumors satèl·lit. En aquest sentit, el fenotip WPOI-5 més comú és la dispersió del tumor a través dels teixits tous, que és predictiu de recidiva locoregional (figura 11).

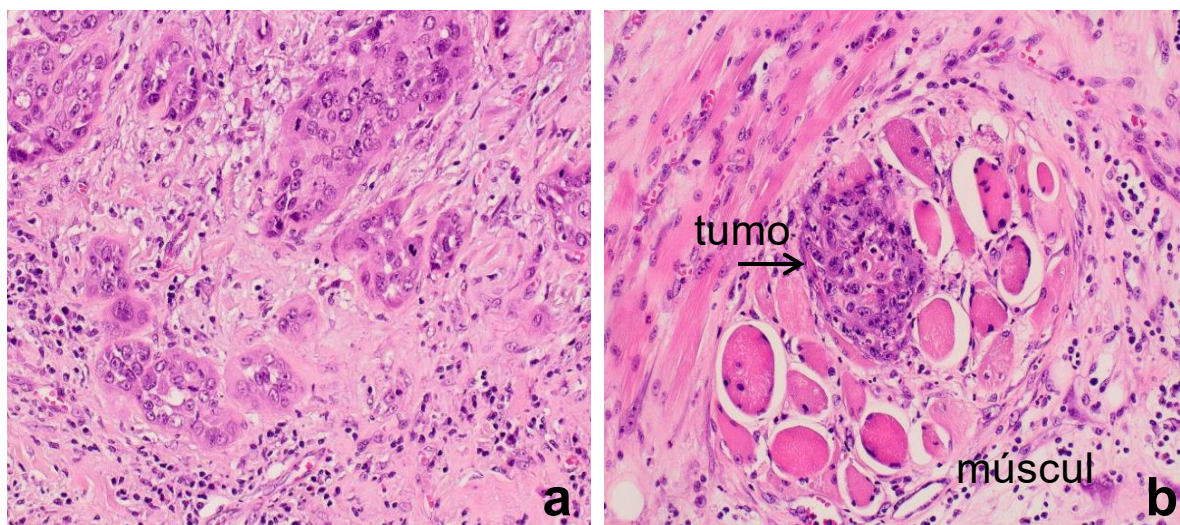


**Figura 9.** Èmbols tumorals en una vena i en un vas limfàtic (Modificat de: Cardesa A et al. (Eds.). Pathology of the Head and Neck. Chapter 1, 2006).

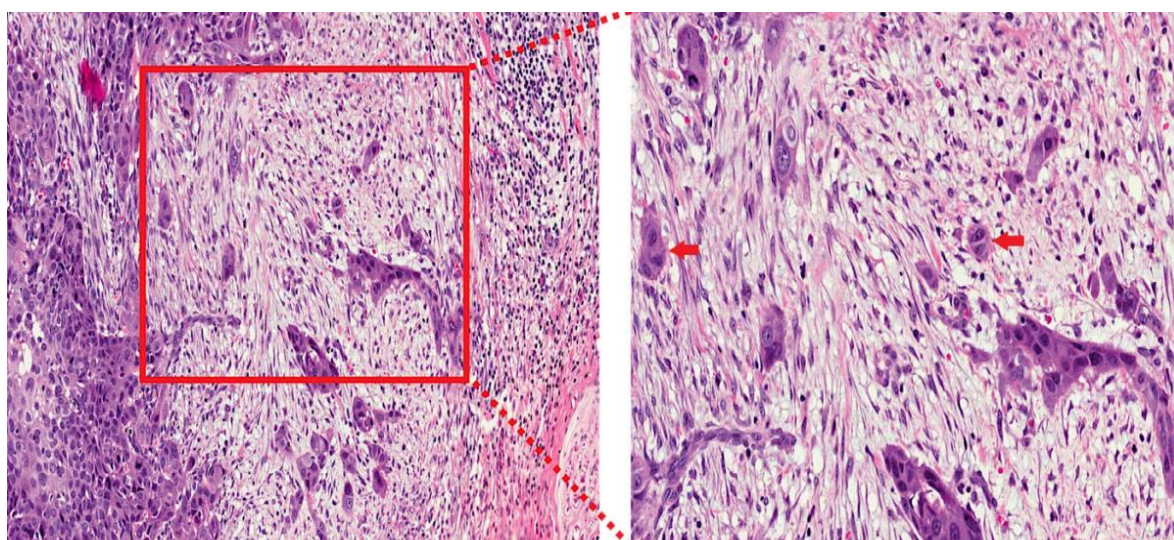


**Figura 10.** a) Invasió perineural; b) Invasió intraneural (fletxa) (HEX400) (Fotos de l'autor).





**Figura 11.** a) Front d'invasió tumoral no cohesiu; b) Front d'invasió amb un focus de tumor a múscul esquelètic (fletxa) que correspon a un WPOI-5 (HEx200) (Fotos de l'autor).



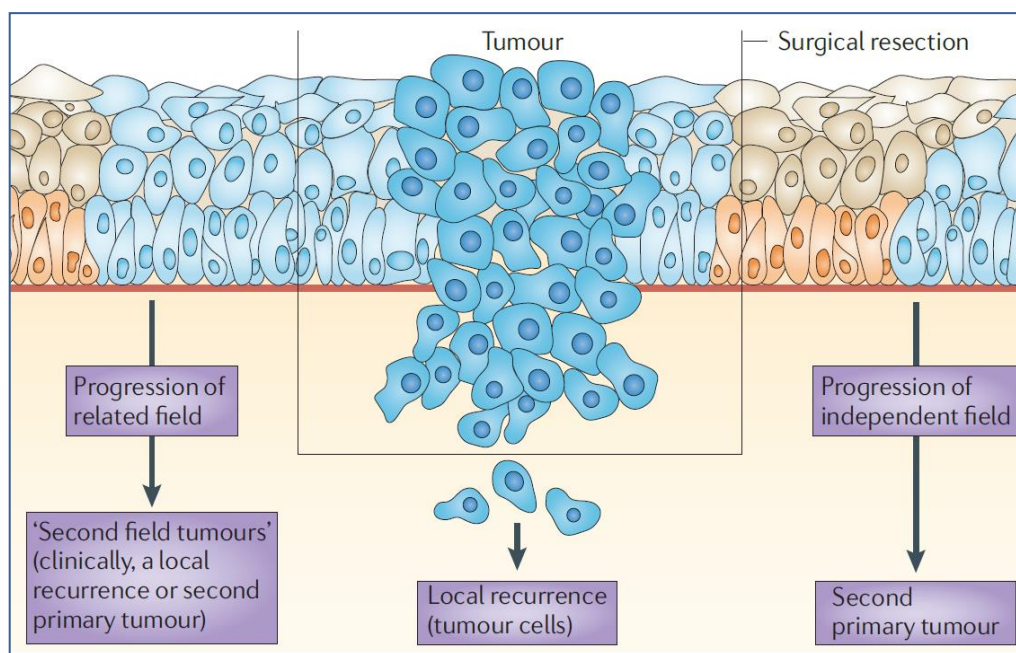
**Figura 12.** CE de llengua amb focus de “tumor budding” (fletxes vermelles) (Font: Mäkitie AA *et al.* Head&Neck 2019).

### 1.4.3. Cancerització de camp i recidiva local

El desenvolupament sincrònic i metacrònic de CECC es coneix com el fenomen de la “cancerització de camp” i afecta negativament a la supervivència dels pacients (Slaughter *et al.*, 1953). La cancerització de camp defineix la presència d'àrees premalignes al voltant del tumor primari i ha estat relacionada amb l'alta taxa de recidiva local en els CECC (Leemans *et al.*, 2011). Aquestes “zones premalignes” poden ser molt més grans que el tumor primari i generalment són difícils de detectar sense anàlisis genòmiques perquè tant el seu aspecte visual (clínic) com morfològic

és normal. Així doncs, la presència de cèl·lules histològicament “normals” però amb danys genètics no només explica el fenomen de la cancerització de camp sinó també certs patrons de comportament del CECC, com ara la recidiva local després d'una extirpació quirúrgica aparentment completa. No és estrany, doncs, que tant la mida com la multiplicitat d'aquestes lesions precanceroses constitueixin un repte pel que fa a l'estratègia sobre l'abast dels marges de l'exèresi quirúrgica.

Segons aquest concepte de “cancerització de camp” existeixen múltiples grups de cèl·lules que experimenten, de forma independent, una transformació neoplàsica sota l'estrès de l'activitat cancerígena regional (figura 13). Els estudis de genètica molecular han demostrat que aquests focus de transformació independents són habituals a l'epiteli dels pacients amb CECC. De fet, quan es compara un CECC primari amb un segon tumor en altres llocs del tracte respiratori sovint mostren patrons genètics idèntics. Probablement, el que succeeix és que una alteració genètica crítica en una sola cèl·lula proporciona un avantatge de creixement respecte a les cèl·lules veïnes. En algun moment després de la transformació, les cèl·lules que contenen aquestes alteracions genètiques inicials migren a zones contigües de la mucosa, acumulen altres alteracions, adquireixen avantatges addicionals de creixement i, finalment, es transformen en subclons agressius separats pel temps i per l'espai del tumor primari o inicial (Califano *et al.*, 1996).



**Figura.13.** Cancerització de camp: impacte en la recaiguda local i en l'aparició de segones neoplàsies (Font: Leemans CR *et al.* Cancer Nature Review 2011).



L'epiteli de les vies respiratòries superiors es pot poblar per aquests clons de cèl·lules danyades genèticament però que no exhibeixen una evidència histològica de displàsia. Aquesta dificultat per reconèixer la presència i l'extensió del procés neoplàsic en pacients amb risc de CECC ha accelerat la recerca de nous biomarcadors per al reconeixement i tractament del CECC (Pai SI *et al.*, 2009).

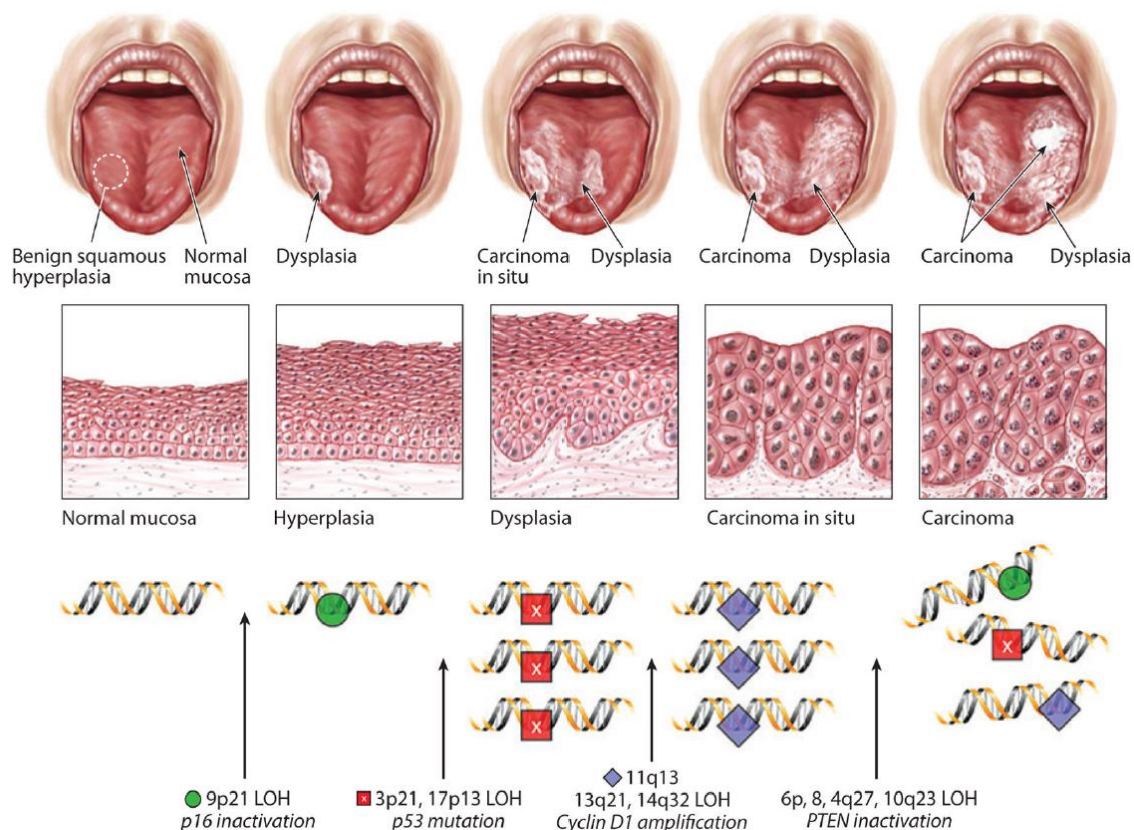
## **1.5. Carcinogènesi i progressió tumoral**

### **1.5.1. Carcinogènesi en el CECC no associat a VPH (CECC VPH -)**

L'epiteli de la mucosa que recobreix el tracte sinonasal, la cavitat oral, la faringe i la laringe és el lloc d'origen del CECC. Histològicament, la progressió cap a un carcinoma escatós invasiu segueix una sèrie ordenada de passos que s'inicien amb la hiperplàsia de cèl·lules epitelials seguida de la displàsia (lleu, moderada i severa), el carcinoma in situ i, finalment, el carcinoma invasiu (Shah *et al.*, 2011).

Malgrat l'evidència d'aquesta progressió histològica - des de l'atípia cel·lular a través de diversos graus de displàsia que finalment condueixen a un CE invasiu -, a molts dels pacients se'ls diagnostica amb un CE en fase tardana, sense antecedents o constatació d'una lesió premaligna clínicament evident (Johnson *et al.*, 2020).

El CECC VPH (-) es caracteritza per una inestabilitat genètica amb pèrdua o guany freqüent de regions cromosòmiques. En aquest tipus de CE es disposa d'un model de progressió histològica seqüencial que ha permès assignar algunes anomalies cromosòmiques a etapes específiques de la progressió (figura 14). La carcinogènesi inicial comença amb una pèrdua d'heterozigositat en els cromosomes 3p, 9p i 17p. La pèrdua de 9p21 es produeix durant la progressió de la mucosa epitelial normal fins a la hiperplàsia. La regió 9p21 inclou els gens supressors tumorals CDKN2A (que codifiquen l'inhibidor de CDK4 i CDK6 p16INK4A) i ARF (codifica per p14, un estabilitzador de p53). La progressió d'hiperplàsia a displàsia està marcada per la pèrdua d'heterozigositat de 3p21 i 17p13, el lloc del gen supresor tumoral TP53. La transició de displàsia a carcinoma in situ implica la pèrdua d'heterozigositat de 11q13, 13q21 i 14q32, mentre que la pèrdua de 6p, 8, 4q27 i 10q23 s'observa en la progressió cap a carcinoma invasiu (Pai SI *et al.*, 2009).



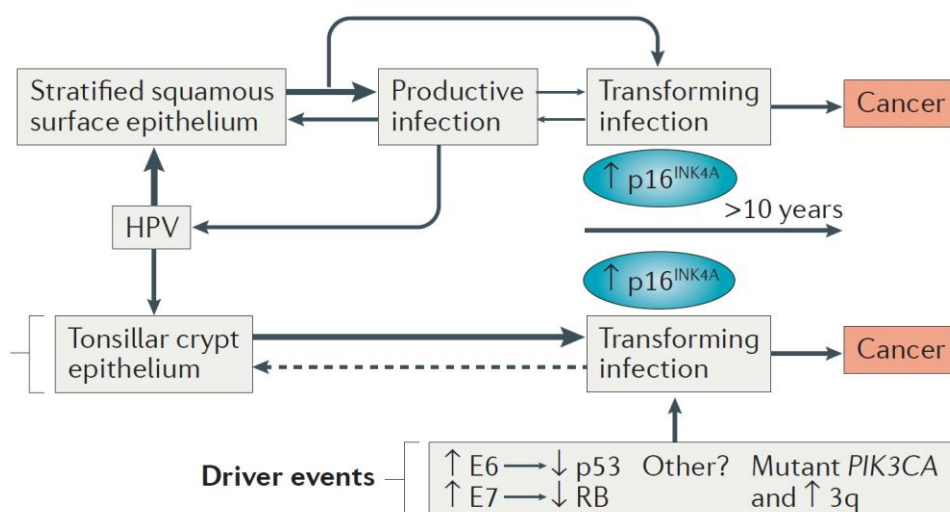
**Figura 14.** Model de progressió genètica de la tumorigènesi en el CECC VPH (-) (Font: Pai SI *et al.* Annu Rev Pathol 2009).

En conjunt, el que revelen els estudis d'aquestes anomalies cromosòmiques és que, per a la transformació completa a CECC invasiu, es requereixen múltiples alteracions genètiques, tot i que encara no se sap ben bé si la progressió del CECC depèn estrictament de la seqüència temporal d'aquestes alteracions o, altrament, de la seva acumulació col·lectiva (Califano *et al.*, 2000).

### 1.5.2. Carcinogènesi en el CECC associat a VPH (CECC VPH +)

La història natural dels tumors de cap i coll induïts pel VPH, en canvi, continua sent un enigma. En contrast amb els CECC HPV (-) dels quals, com hem vist, se'n coneix el desenvolupament a través de lesions precursors displàsiques durant un llarg període de temps, poca cosa se'n sap sobre la patogènesi dels CECC VPH (+). En realitat, en contrast amb els càncers de coll uterí derivats del VPH, poques vegades es troben lesions displàsiques abans de diagnosticar el càncer a les amígdales, que és el lloc a partir del qual es desenvolupen la majoria dels CECC relacionats amb VPH.

L'epiteli escatós de superfície de la regió de cap i coll generalment és permissiu per a una infecció “productiva” pel VPH. Talment com succeeix en el coll uterí, se suposa que aquestes infeccions productives tenen una baixa propensió a transformar-se en una infecció “transformadora” (figura 15). Les infeccions productives poden produir títols virals elevats que augmenten la probabilitat d'una infecció posterior de les cèl·lules epitelials de la cripta amigdalar. Aquestes cèl·lules epitelials no admeten el cicle de vida víric normal però, en canvi, són altament susceptibles a una infecció transformadora pel VPH. Les infeccions “transformadores” es caracteritzen per l'expressió desregulada de les oncoproteïnes E6 i E7 del VPH a les cèl·lules en proliferació. E6 i E7 inactiven p53 i RB respectivament. En conjunt, aquestes característiques provoquen una interrupció de la regulació del cicle cel·lular i la inhibició de les respostes apoptòtiques mediades per p53, impulsant la immortalització de les cèl·lules i l'acumulació d'alteracions epigenètiques i genètiques necessàries per a la progressió cap al càncer. Un d'aquests esdeveniments conductors (“driver”) implica l'activació oncogènica de la via PI3K, sovint per mutació o amplificació del gen PIK3CA (Leemans *et al.*, 2018).



**Figura 15.** Concepte de carcinògens a cap i coll induïda per VPH (Font: Leemans CR *et al.* Cancer Nature Review 2018). ↑ indica sobreexpressió o guany; ↓ indica pèrdua d'expressió; la fletxa puntejada indica una regressió cap a la normalitat. HPV\*: *human papillomavirus*.

De manera similar al càncer de coll uterí, l'evolució del CECC associat a VPH a partir d'una infecció transformadora pot trigar més de 10 anys en desenvolupar-se (Kreimer *et al.*, 2013).

## 1.6. Genètica molecular

### 1.6.1. Introducció

Tots els genomes del càncer contenen mutacions somàtiques. Una petita part d'aquestes mutacions són "motors o conductors" de l'oncogènesi i confereixen un avantatge de creixement clonal selectiu mentre que la resta - la majoria - són mutacions "passatgeres" que no han estat seleccionades positivament durant l'evolució de la neoplàsia.

Els projectes de seqüenciació global han generat catàlegs de mutacions somàtiques a partir de desenes de milers de càncers (Hudson *et al.*, 2010). Les mutacions dins d'aquests catàlegs són el resultat acumulat de tots els mecanismes mutacionals somàtics, inclosos els danys a l'ADN i els processos de reparació de l'ADN (Stratton, 2011).

Els diversos processos mutacionals deixen unes "signatures mutacionals" característiques. En el cas dels tumors de pulmó i de pell, per exemple, l'anàlisi dels gens del càncer mutats han demostrat que les classes de mutacions trobades coincideixen amb les induïdes experimentalment pels carcinògens del tabac i la llum ultraviolada respectivament, que són les principals influències cancerígenes exògenes conegudes en aquests tipus de càncer.

De la mateixa manera, les fonts mutagèniques "endògenes" també poden contribuir a mutacions en el càncer. Per exemple, els processos cel·lulars intrínsecs com el metabolisme energètic i la peroxidació lipídica són fonts de substàncies químiques reactives que causen danys a l'ADN. És conegut que aquests mutàgens endògens generen determinades subclasses de mutacions i que, per tant, també poden donar forma a catàlegs mutacionals dins del genoma del càncer (Ames i Gold, 1991). D'aquest paper del metabolisme energètic en el càncer en tornarem a parlar en l'apartat 4 ("El càncer com a trastorn metabòlic").

### 1.6.2. Genètica molecular en el CECC

Al llarg dels anys, els esforços de la recerca en càncer s'han centrat en la base genètica del desenvolupament i la progressió dels tumors, identificant mutacions i caracteritzant vies que activen oncogens i inactiven gens supressors tumorals. En aquest sentit, durant la darrera dècada s'han fet avenços substancials en la caracterització molecular del CECC. L'any 2015 el consorci "The Cancer Genome Atlas" (TCGA) va publicar les dades genòmiques completes de 279 CECC, inclosos els tumors VPH (-) i VPH (+) (Cancer Genome Atlas Network. Lawrence *et al.*, 2015).



Per la seva banda, Seiwert i cols (2015) van determinar mutacions i aberracions del nombre de còpies en una gran cohort de CECC locoregionalment avançat. La seqüenciació massiva de 617 gens associats al càncer va revelar una càrrega mutacional global comparable en tumors negatius i positius per al VPH. En aquest estudi, els CECC VPH (-) van mostrar un predomini de mutacions a TP53, CDKN2A, MLL2, CUL3, NSD1, PIK3CA i NOTCH1, amb guanys de nombre de còpies d'EGFR, CCND1 i FGFR1. En canvi, els tumors VPH (+) van mostrar mutacions úniques en DDX3X, CYLD i FGFR2/3 i alteracions de PIK3CA, KRAS, MLL2/3 i NOTCH1.

Els CECC HPV (+), tanmateix, es caracteritzen per nombrosos guanys i pèrdues cromosòmiques. Les alteracions genètiques en el CECC derivat del VPH es caracteritzen, principalment, per la inactivació de p53 i pRB per les proteïnes víriques E6 i E7 respectivament. Així doncs, s'ha observat que els tumors VPH (+) tenen un “paisatge” mutacional diferent dels tumors VPH (-), fet que podria explicar les diferències entre el comportament clínic i les característiques pronòstiques d'ambdós tumors.

La realitat és que cal una interpretació biològica acurada per tal de determinar quins són els gens veritablement conductors o “drivers” de càncer en el CECC. Depenent de l'eina d'anàlisi aplicada s'han descrit entre 50 i 100 gens que estan substancialment mutats en el CECC i que es consideren gens candidats a ser conductors del càncer (taula 4). Tot i això, molts gens es muten a freqüències molt baixes i les conseqüències funcionals d'aquestes mutacions sovint no estan clares. Molts d'aquests gens encara no estan vinculats funcionalment a la carcinogènesi i, sense estudis funcionals, continuen sent només “candidats” (Leemans *et al.*, 2018).

**Taula 4.** Gens amb canvis genètics somàtics freqüents i significatius en el CECC VPH (-) (Font: Leemans CR *et al.* Cancer Nature Review 2018).

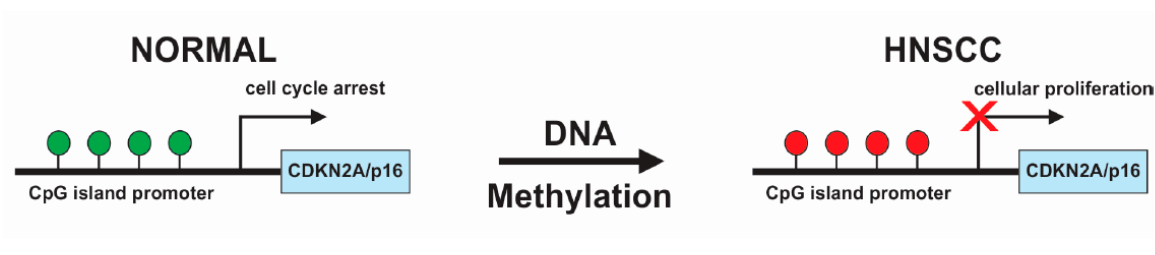
Cellular process	Gene	Protein	Type of gene	Mutation frequency (%)
Cell cycle	CDKN2A	p16 <sup>INK4A</sup>	Tumour suppressor	22
	TP53	p53	Tumour suppressor	72
	CCND1	G1-S-specific cyclin D1	Oncogene	0.6
Growth signals	EGFR	EGFR	Oncogene	4
Survival	PIK3CA	Catalytic p110 $\alpha$ subunit of class 1 PI3Ks	Oncogene	18
	PTEN	PTEN	Tumour suppressor	3
WNT signalling	FAT1	Protocadherin FAT1	Tumour suppressor	23
	AJUBA	LIM domain-containing protein AJUBA	Tumour suppressor	7*
	NOTCH1	NOTCH1	Tumour suppressor	18
Epigenetic regulation	KMT2D	Histone-lysine N-methyltransferase KMT2D	Tumour suppressor	16
	NSD1	Histone-lysine N-methyltransferase NSD1	Tumour suppressor	12*

## 1.7. Epigenètica

Més recentment, s'han assenyalat les alteracions i/o modificacions epigenètiques com canvis crítics implicats en l'inici i la progressió dels càncers humans. El significat d'epigenètica va ser introduït per primera vegada per Conrad Waddington (1942) per definir canvis estables en el fenotip cel·lular sense alteracions genètiques. Actualment, l'epigenètica es refereix a canvis estables i hereditaris en l'expressió gènica sense que es produeixin canvis en la seqüència d'ADN.

Les alteracions epigenètiques es produeixen de manera no sistemàtica, promovent l'avantatge selectiu del tumor a través de diferents mecanismes com: a) silenciament dels gens supressors tumorals i b) disfunció en els gens de reparació de l'ADN (oncogens) (Castilho *et al.*, 2017).

Les modificacions epigenètiques més freqüents inclouen: 1) la metilació de l'ADN (figura 16); 2) les modificacions covalents d'histona; 3) la remodelació de la cromatina i l'efecte dels ARN no codificants i 4) les proteïnes “polycomb” en l'expressió gènica.



**Figura 16.** La hipermetilació de l'ADN del gen supressor tumoral CDKN2A/p16INK4a és la modificació epigenètica més freqüent observada al CECC i condueix a la proliferació cel·lular (Modificat de: Castilho RM *et al.* Int J Mol Sci 2017). *HNSCC\**: carcinoma escatós de cap i coll.

El nombre creixent de gens que mostren alteracions epigenètiques realça l'impacte d'aquestes alteracions tant en la progressió com en la teràpia del CECC (Castilho *et al.*, 2017; Heyn *et al.*, 2012). Els canvis epigenètics són mecanismes fonamentals per a la carcinogènesi i poden servir com a mètodes per a la detecció precoç, el tractament i l'avaluació pronòstica dels pacients amb càncer. Ho veurem més endavant amb els ARN no codificants en els apartats 5.3 (“Aspectes moleculars del metabolisme del càncer”) i 6.2 (“Biomarcadors en el CECC”).

## 1.8. Tractament

Les opcions terapèutiques per als pacients amb CECC poden variar àmpliament en funció de factors epidemiològics, localitzacions anatòmiques i estadi TNM de la malaltia (Chow, 2020).

El CECC és un càncer agressiu, genèticament complex i difícil de tractar. A banda de teràpies dirigides més o menys efectives, la cirurgia i la radioteràpia representen les principals opcions de tractament per a la majoria dels pacients amb CECC. Però aquests tractaments estan associats a una morbiditat important i a una reducció de la qualitat de vida. A més, les recaigudes i la resistència a la radioteràpia i a l'única teràpia dirigida disponible avui en dia són freqüents.

Aproximadament del 30 al 40% dels pacients amb CECC debuten amb una malaltia en estadi I o II (precoç). En general, aquests pacients es curen amb teràpia d'una sola modalitat, sigui cirurgia primària o radioteràpia.

En els pacients que se sotmeten a cirurgia com a teràpia definitiva inicial s'afegeix radiació en aquells casos que presenten alguna característica histopatològica adversa, inclosa l'extensió ganglionar extracapsular (EGE), els marges positius, la invasió perineural, la invasió limfovascular o les metàstasis ganglionars múltiples.

Tanmateix, els pacients que presenten una malaltia en estadi avançat (estadis III o IV) tenen un risc més elevat de recidiva local i metàstasi a distància, cosa que suposa un repte en el tractament. Els pilars del tractament dels tumors avançats són la cirurgia combinada amb la quimioradioteràpia postoperatòria o la quimioradiació inicial, amb rescat quirúrgic si és possible. La quimioteràpia d'inducció no ha trobat un ús generalitzat a causa de la manca de beneficis en alguns estudis (Budach *W et al.*, 2016).

Amb tot, i a pesar dels esforços substancials invertits en el desenvolupament terapèutic, la taxa de supervivència a 5 anys dels pacients amb CECC s'ha mantingut pràcticament sense canvis durant dècades i, com s'ha comentat, varia segons l'estadi de la malaltia (Siegel *et al.*, 2022). Fins i tot amb tractaments combinats que inclouen cirurgia, radioteràpia i quimioteràpia, les taxes de supervivència a 5 anys van des d'aproximadament el 60% en el carcinoma laringi fins al 25% en el carcinoma d'hipofaringe (Gatta *et al.*, 2015). Per altra banda, la supervivència específica de la malaltia també es veu afectada negativament per la tendència d'aquests tumors a envair localment el teixit normal circumdant i fer metàstasi als ganglis limfàtics

cervicals: més del 50% dels pacients amb CECC es diagnostiquen inicialment en una etapa localment avançada (Gatta *et al.*, 2015).

L'aparent millora de la supervivència evidenciada en els darrers anys s'ha atribuït, en part, a un augment significatiu de la incidència de CECC positiu per al VPH (un subgrup amb pronòstic més favorable) més que no pas a les millores en el tractament multimodal "per se" (Johnson *et al.*, 2020). El pronòstic favorable dels pacients amb CE d'orofaringe VPH (+) ha donat lloc a diversos estudis – alguns ja acabats i d'altres en curs - amb l'objectiu de desintensificar el tractament en aquesta població. Fins avui, però, no hi ha cap evidència a favor de la desintensificació del tractament en el CE d'orofaringe VPH (+) fora d'un assaig clínic. A més, és important tenir en consideració que només els pacients amb CE d'orofaringe VPH (+) estadis I-II (T1-3, N0-N2) i un historial de tabaquisme inferior a 10 paquets-anys són considerats com malalts realment de "baix risc" i candidats als assaigs clínics de desescalada (Mehanna *et al.*, 2020).

Però, si bé el tractament dels pacients amb càncer de cap i coll és complex, no hi ha dubte que ha patit una transformació considerable en l'última dècada. Els avenços recents en el tractament inclouen la biòpsia del gangli sentinella (Schilling *et al.*, 2015), la resecció robòtica transoral (TORS, de l'anglès "Transoral Robotic Resection"), la radioteràpia adaptativa i basada en imatges, la teràpia dirigida amb inhibidors de molècules petites o anticossos, la immunoteràpia i els tractaments de modalitat combinada. Aquesta varietat creixent d'opcions terapèutiques fa que es requereixi una selecció optimitzada dels pacients per tal de personalitzar el tractament.

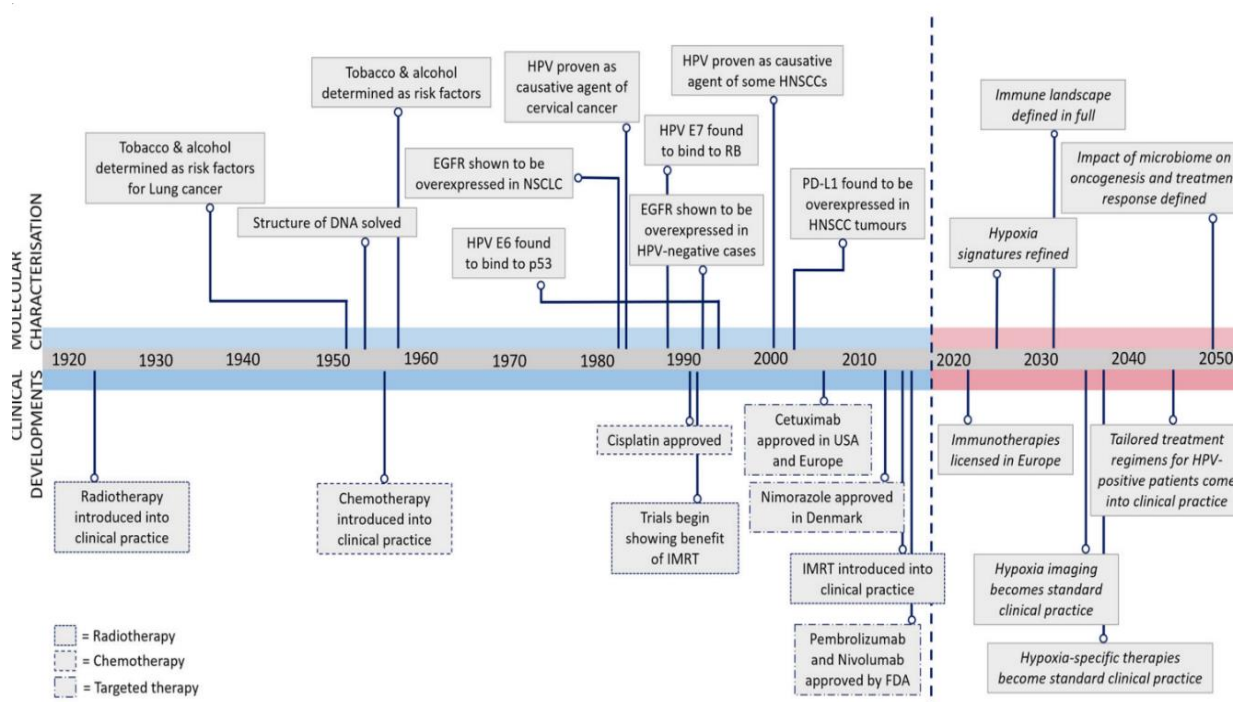
En relació amb les teràpies "dirigides", la FDA (de l'anglès "Food and Drug Administration") ha aprovat el cetuximab (anticòs monoclonal del receptor del factor de creixement epidèrmic-EGFR) en el CECC recurrent o metastàtic com a sensibilitzador de la radiació, sol o en combinació amb quimioteràpia (Bonner *et al.*, 2010; Sacco *et al.*, 2015).

La immunoteràpia amb fàrmacs inhibidors del punt de control immune com pembrolizumab i nivolumab (que són anticossos monoclonals IgG4 selectius dirigits contra el receptor de PD-1 de la superfície de les cèl·lules T), estan aprovats per al tractament del CECC recurrent o metastàtic refractari a cisplatí; el pembrolizumab sol o combinat amb platí i fluorouracil és un estàndard del tractament en primera línia per als pacients que presenten una malaltia metastàtica o irreseccable (Seiwert *et al.*, 2016; Magnes *et al.*, 2021).

Aquests tractaments nous d'immunoteràpia s'han tornat molt valuosos en el tractament del CECC. Però cal una comprensió més detallada de la importància tant del microambient tumoral com del paper de la immunitat tumoral en la patogènesi i la resposta al tractament.

Per altra banda, s'ha reportat també la possible relació entre el microbioma oral i el CECC, la qual cosa justifica més investigacions sobre la influència del microbioma oral en el desenvolupament del CECC i de possibles tractaments (Alsahafi *et al.*, 2019).

En una publicació recent, Alsahafi i cols (2019) mostren, de manera esquemàtica, una revisió i actualització sobre la comprensió de la biologia del CECC, les àrees de recerca en curs i les perspectives de futur (figura 17).



**Figura 17.** Cronologia de la caracterització molecular, les innovacions terapèutiques en càncer de cap i coll i les perspectives de futur (Font: Alsahafi E *et al.* Cell Death Dis 2019).

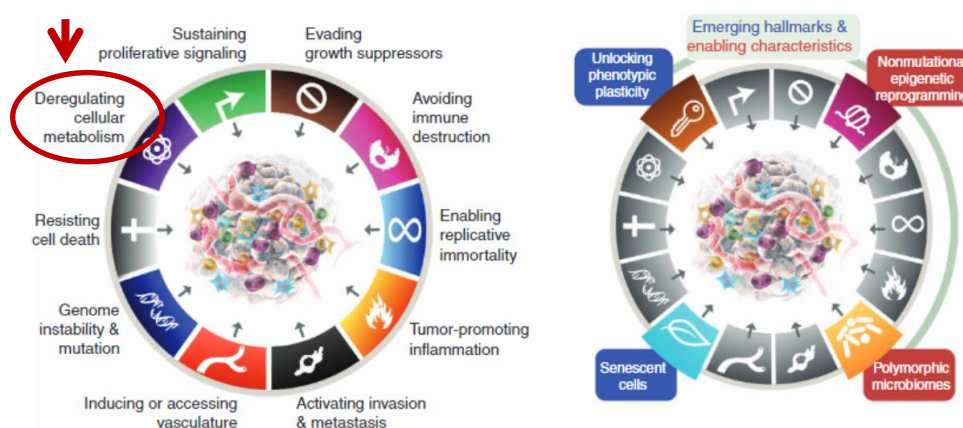
## 2. Característiques distintives del càncer en general

L'any 2000, en una revisió de referència, Hanahan i Weinberg van suggerir que la base del creixement de les cèl·lules malignes rau en sis alteracions essencials en la fisiologia cel·lular. Aquests autors van referir-se a aquestes sis alteracions o capacitats biològiques com el segell distintiu de gairebé tots els càncers i consistien en: 1) l'autosuficiència en els senyals de creixement; 2) la insensibilitat als senyals inhibidors

del creixement o anticreixement; 3) l'evasió de la mort cel·lular programada (apoptosi); 4) un potencial de replicació il·limitat; 5) una vascularització sostinguda (angiogènesi) i 6) la invasió de teixits i la metàstasi.

Segons Hanahan, l'adquisició d'aquestes capacitats biològiques per part de les cèl·lules tumorals és deguda a dues característiques "habilitadores" que ho fan possible: el desenvolupament de la inestabilitat genòmica, que genera mutacions aleatòries que inclouen reordenaments cromosòmics, i l'estat inflamatori de les lesions premalignes i malignes, impulsades per cèl·lules del sistema immunitari. Onze anys més tard els mateixos autors afegeixen dues capacitats biològiques addicionals que també estarien implicades en la patogènesi del càncer: la capacitat de modificar o reprogramar el metabolisme cel·lular per tal de donar un suport més eficaç a la proliferació tumoral, i una segona característica que permet que les cèl·lules canceroses evadeixin la destrucció immunològica, en particular pels limfòcits T i B, macròfags i cèl·lules "natural-killer" (Hanahan *et al.*, 2011). Recentment, els mateixos autors han afegit quatre capacitats distintives més com són: la plasticitat cel·lular, la senescència, la reprogramació epigenètica no mutacional i les variacions polimòrfiques en els microbiomes d'òrgans i teixits (Hanahan *et al.*, 2022) (figura 18).

Aquesta "redirecció" del metabolisme energètic està regulada en gran manera per proteïnes (oncogens i gens supressors) que també estan implicades en la programació de les altres característiques del càncer. Així doncs, avui en dia s'accepta que la desregulació del metabolisme energètic en les cèl·lules canceroses és un fet tan estès i tan rellevant com els altres trets distintius associats al càncer.



**Figura 18.** Segells distintius del càncer. La desregulació del metabolisme cel·lular (fletxa vermella) es considera actualment com un dels segells distintius del càncer (Modificat de: Hanahan D *et al.* Cancer Discovery 2022).

### 3. Metabolisme i càncer

#### 3.1. Introducció

Hem vist com la incorporació del concepte de desregulació del metabolisme cel·lular com a segell distintiu del càncer és relativament recent (Hanahah *et al.*, 2011). El metabolisme del càncer es refereix a les pertorbacions en les vies bioquímiques que tenen lloc en les cèl·lules tumorals en comparació amb la majoria de les cèl·lules normals.

El càncer és una malaltia que implica trastorns en el mecanisme del control cel·lular. Les cèl·lules canceroses necessiten alterar i adaptar el seu metabolisme per sobreviure i multiplicar-se sota unes condicions metabòlicament compromeses proporcionades pel microambient tumoral, procés que s'ha anomenat "reprogramació metabòlica". Però aquesta transformació les deixa dependents d'un subministrament constant de nutrients i d'energia.

Fins fa dues dècades el metabolisme del càncer no es considerava una branca principal de la biologia del càncer. No obstant això, en els darrers 20 anys hi ha hagut un interès creixent pel metabolisme de les cèl·lules canceroses – especialment pel metabolisme de la glucosa - fins al punt que aquests temes s'han convertit en una part integral de la biologia del càncer de manera similar a la transducció i la transcripció de senyals.

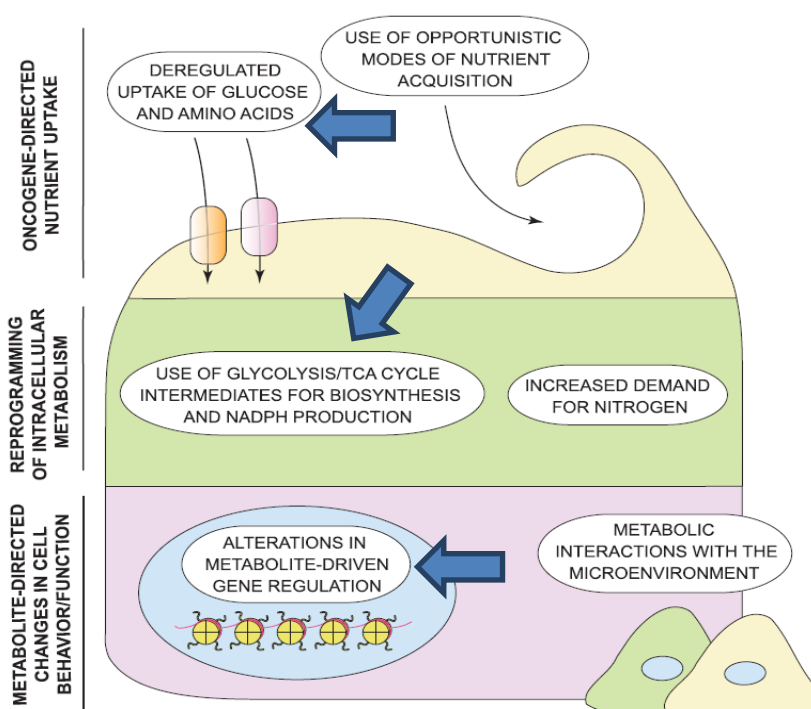
En vista que, durant moltes dècades, s'ha considerat l'increment de la glicòlisi aeròbica per distingir les cèl·lules canceroses de les cèl·lules normals (vegeu l'apartat 3.4.1.1) i que aquesta característica o distinció s'ha aprofitat per detectar i fer imatges de tumors "in vivo" (PET-TC), és sorprenent que tot just recentment s'hagi reconegut el metabolisme cel·lular accelerat de la glucosa com un dels distintius del càncer (Hanahah *et al.*, 2011).

A aquest renovat interès pel metabolisme de la glucosa s'hi afegeix la constatació del fet que una de les conseqüències de certs factors oncogènics és l'augment del metabolisme cel·lular de la glucosa i, fet i fet, del metabolisme en general (Hay, 2016).

#### 3.2. Característiques distintives ("hallmarks") del metabolisme del càncer

Una característica comuna del metabolisme de les cèl·lules canceroses és la capacitat d'obtenir els nutrients necessaris d'un entorn freqüentment pobre en nutrients i utilitzar-los tant per mantenir la viabilitat com per crear nova biomassa.

En una excel·lent revisió, Pavlova *et al.* (2016, 2022) organitzen els canvis metabòlics associats al càncer en sis segells distintius: 1) desregulació en l'absorció de glucosa i aminoàcids; 2) ús de formes oportunistes d'adquisició de nutrients; 3) ús de productes intermedis del cicle de la glicòlisi/Krebs per a la biosíntesi i producció de NADPH; 4) augment de la demanda de nitrogen; 5) alteracions en la regulació gènica impulsada pels metabòlits i 6) interaccions metabòliques amb el microambient (figura 19). Els dos últims representen els efectes a llarg termini de la reprogramació metabòlica sobre la pròpia cèl·lula cancerosa i sobre altres cèl·lules del seu microentorn.



**Figura 19.** Segells distintius del metabolisme del càncer. Paper del metabolisme de la glucosa i de les alteracions en la regulació gènica impulsades pels metabòlits (fletxes) (Modificat de: Pavlova NN *et al.* Cell Metabolism 2016).

Dos termes àmpliament utilitzats en la literatura recent sobre el metabolisme del càncer són els conceptes de "reprogramació metabòlica" i "oncometabòlits" (DeBerardinis *et al.*, 2016).

### 3.2.1. Reprogramació metabòlica

DeBerardinis i cols. (2016) proposen que s'utilitzi el terme de reprogramació metabòlica per a descriure les vies metabòliques convencionals que augmenten o disminueixen la



seva activitat en les cèl·lules tumorals en relació amb els teixits benignes, a conseqüència de mutacions tumorigèniques o altres factors.

La reprogramació metabòlica en les cèl·lules canceroses es caracteritza, fonamentalment, per una expressió alterada, mutació, modificació post-traduccionals o canvis en l'expressió de les isoformes enzimàtiques que veurem en detall més endavant (Ward *et al.*, 2012).

### 3.2.2. Oncometabòlits

El terme d'oncometabòlit és relativament nou i fa referència als productes intermedis del metabolisme que augmenten notablement en els tumors. Aquest terme cal reservar-lo per als metabòlits en els que:

- a) hi ha un mecanisme clar que connecta una mutació específica del tumor amb l'acumulació del metabòlit.
- b) hi ha proves convincents de la implicació del metabòlit en el desenvolupament de la malignitat (tumorigènesi).

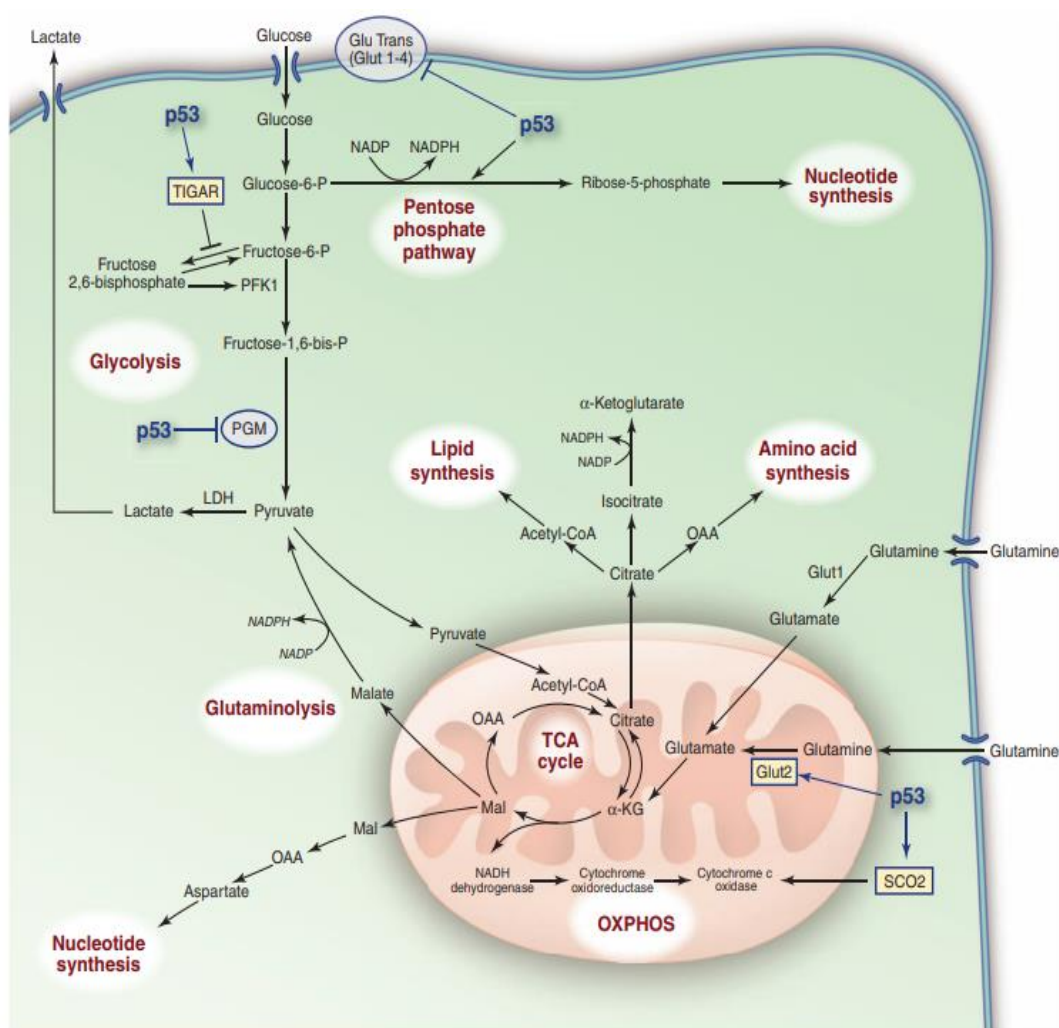
Les alteracions en els metabòlits intracel·lulars i extracel·lulars que poden acompanyar la reprogramació metabòlica associada al càncer tenen efectes profunds en l'expressió gènica, la diferenciació cel·lular i el microambient tumoral. En definitiva, els oncometabòlits s'acumulen a conseqüència de canvis genètics dins d'un tumor i, a la vegada, contribueixen al procés molecular de transformació maligna (Yang *et al.*, 2013). En veurem alguns exemples en l'apartat 4.2 ("Metabolisme i carcinogènesi").

D'ara endavant tractarem àmpliament de la regulació/desregulació del metabolisme del càncer en general i del CECC en particular. En descriurem diverses característiques - principalment les referents al metabolisme de la glucosa -, la relació que aquest coneixement pot tenir en la cerca de biomarcadors, i el possible impacte en el pronòstic i l'abordatge terapèutic del CECC. Abans, però, i per tal de contextualitzar-ho, pot ser avantatjós revisar alguns conceptes generals sobre el metabolisme cel·lular en les cèl·lules no tumorals.

### 3.3. Metabolisme cel·lular normal

El metabolisme cel·lular descriu les reaccions químiques intracel·lulars que converteixen els nutrients i les molècules endògenes en energia i matèria (proteïnes, àcids nucleics i lípids), els quals són necessaris per a la supervivència de tot organisme viu (Kaelin *et al.*, 2010).

La cèl·lula normal realitza diverses reaccions seqüencials o vies metabòliques per tal de proporcionar energia i altres substrats essencials que ajudin en el seu manteniment i desenvolupament (figura 20). Aquestes vies metabòliques inclouen, entre d'altres: la glicòlisi; la fosforilació oxidativa (OxPhos); la via de les pentoses fosfat (PPP), que genera pentoses fosfats per a la síntesi de ribonucleòtids i NADPH; la biosíntesi de lípids; la via de l'hexosamina, que és necessària per a la glicosilació de proteïnes; la glucogènesi, que genera glucogen per a l'emmagatzematge de glucosa; la via de la biosíntesi de la serina, que genera aminoàcids; i la glutaminòlisi (Levine *et al.*, 2010).



**Figura 20.** Vies metabòliques de la glucosa. La figura mostra aspectes del metabolisme en cèl·lules en proliferació, inclosa la glicòlisi; producció de piruvat i lactat; cicle ATC; fosforilació oxidativa; PPP (pentoses fosfat); glutaminòlisi; i la biosíntesi de nucleòtids, lípids i aminoàcids. Glut Trans indica transportadors de glucosa; Glut 1, glutaminasa 1; Glut 2, glutaminasa 2; LDH, lactat deshidrogenasa; Mal, malat; i OXPHOS, fosforilació oxidativa (Font: Levine AJ *et al.* Science 2010). TCA Cycle \*: cicle de l'àcid tricarboxílic.

El flux d'aquestes vies depèn dels requisits de la cèl·lula. A les cèl·lules canceroses, per exemple, aquests fluxos es modifiquen a causa de la hipòxia, cosa que ajuda a la seva millor supervivència.

La glucosa és la principal font d'energia de les cèl·lules. El trifosfat d'adenosina (ATP), la principal molècula que impulsa tots els processos cel·lulars dependents de l'energia, es genera principalment per dues vies metabòliques: la glicòlisi i la fosforilació oxidativa (OxPhos).

### 3.3.1. Glicòlisi

La glicòlisi (del grec glycos, sucre i lysis, ruptura) és la ruta metabòlica encarregada d'oxidar la glucosa amb la finalitat d'obtenir energia per a la cèl·lula. Es produeix al citoplasma i consisteix en una sèrie de reaccions enzimàtiques consecutives que converteixen la glucosa en dues molècules de piruvat (producte) i produeix 4 ATP (guany net de 2 ATP) i 2 NADH (dinucleòtid de nicotinamida i adenina + hidrogen) (figura 21). La fosfoglicerat quinasa 1 (PGK1) és l'enzim clau limitant la velocitat en el procés de glicòlisi aeròbica.

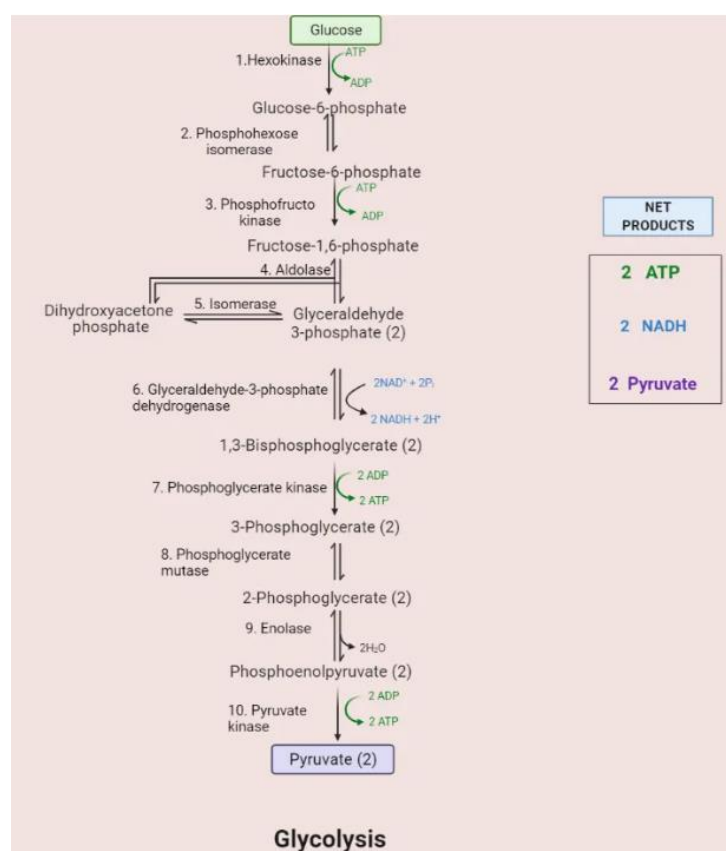


Figura 21. Via de la glicòlisi (Font: Shrestha A. Microbe online, 2022).

A les cèl·lules normals, la glicòlisi pot tenir lloc en presència d'oxigen (oxidació) o en absència d'oxigen (fermentació). En presència d'oxigen, el piruvat es transforma en Acetil CoA i entra al cicle de l'àcid cítric o tricarboxílic (cicle de Krebs), mentre que en condicions anaeròbiques, el piruvat es converteix en lactat o etanol.

### 3.3.2. Fosforilació oxidativa (OxPhos)

El cicle de Krebs és una ruta metabòlica, és a dir, una successió de reaccions químiques, que forma part de la respiració cel·lular en totes les cèl·lules aeròbiques i on s'allibera l'energia emmagatzemada a través de la descomposició (oxidació) de l'acetil-CoA en diòxid de carboni i energia (ATP) (figura 22).

Cada cicle produeix una molècula de  $\text{FADH}_2$  (dinucleòtid de flavina y adenina +  $\text{H}_2$ ), una molècula de GTP (trifosfat de guanosina), tres molècules de NADH (dinucleòtid de nicotinamida i adenina + hidrògen) i dues molècules de diòxid de carboni. La degradació aeròbica del piruvat (producte final de la glicòlisi), la beta oxidació dels àcids grassos i el catabolisme dels aminoàcids donen lloc a la formació d'acetil CoA. El cicle de Krebs es produeix dins de la matriu mitocondrial.

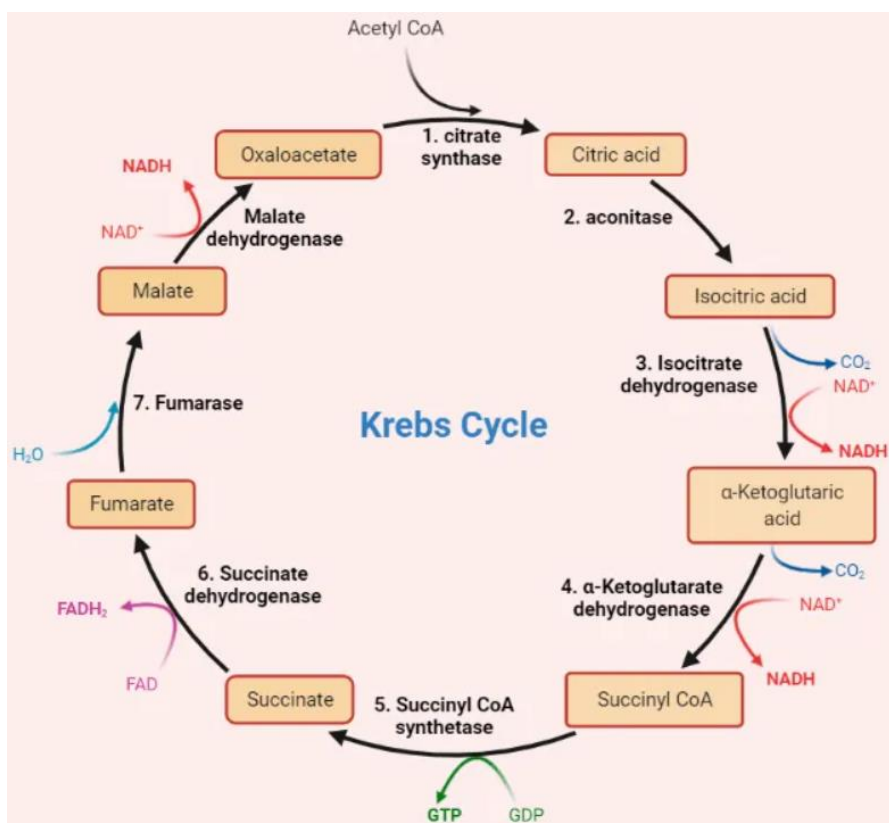
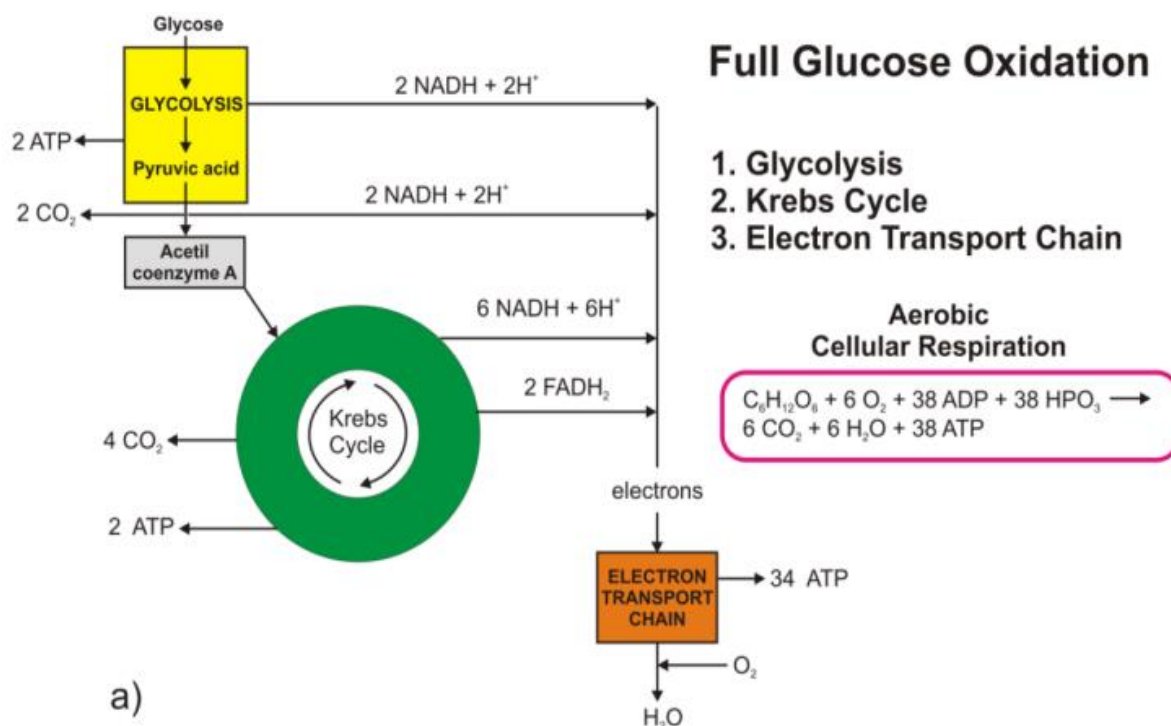


Figura 22. Cicle de l'àcid tricarboxílic (Krebs) (Font: Shrestha A. Microbe online, 2022).

### 3.3.3. Metabolisme dels carbohidrats en les cèl·lules normals

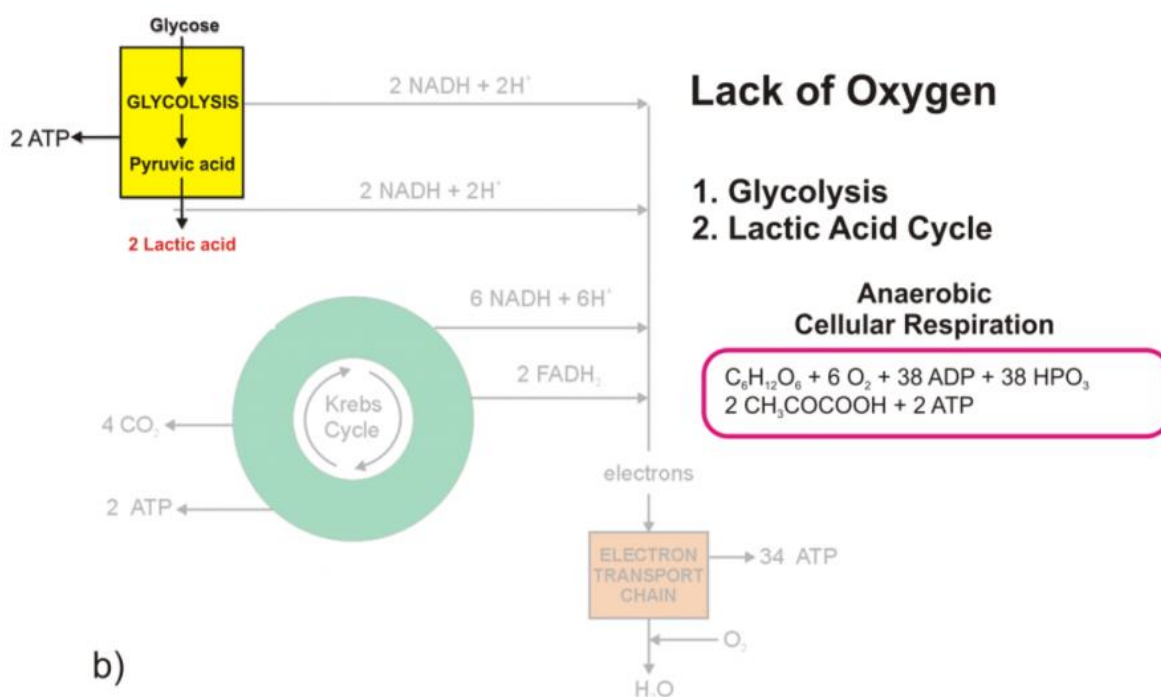
El primer pas de la respiració cel·lular de la glucosa és la glicòlisi (figura 21). En la glicòlisi la glucosa es converteix en dues molècules d'àcid pirúvic (piruvat), que és el producte final, i es generen dues molècules netes d'ATP. Si una cèl·lula determinada té accés a l'oxigen, l'àcid pirúvic es converteix posteriorment en acetil-coenzim A per l'enzim piruvat deshidrogenasa (PDH) i entra al cicle de Krebs (cicle de l'àcid tricarbòxilic/ATC), on es produeixen dues molècules d'ATP, sis de NADH i dues de FADH<sub>2</sub>. A això segueix el procés de la cadena de transport d'electrons (que es produeix a la membrana mitocondrial interna), la qual crea la majoria de les molècules d'ATP (34 ATP). Aquest últim pas dins de la cadena de transport d'electrons necessita oxigen per recollir l'electró terminal de l'últim citocrom (cyt a3) i convertir-se en un O-naixent per recollir 2 H<sup>+</sup> i crear un dels subproductes de la respiració cel·lular aeròbica: una molècula d'aigua (Devic, 2016; Fadaka *et al.*, 2017).

D'aquesta manera, amb l'oxidació completa d'una molècula de glucosa dins d'una cèl·lula en presència d'oxigen es produeixen en total 38 molècules d'ATP (figura 23).



**Figura 23.** Metabolisme cel·lular de la glucosa en cèl·lules normals: oxidació completa de la glucosa amb formació final de 38 ATP (Font: Devic S. Journal of Cancer 2016).

En condicions d'hipòxia (nivells baixos d'oxigen) l'àcid pirúvic (producte final de la glicòlisi) no es converteix en acetil-coenzim A, sinó en àcid làctic a través de l'enzim lactat deshidrogenasa (LDH), procés anomenat respiració cel·lular anaeròbica o glicòlisi anaeròbica (figura 24). En aquest cas, el balanç energètic net és de només dues molècules d'ATP que fan que el metabolisme anaeròbic de la glucosa sigui un procés energèticament molt ineficient (Koppenol *et al.*, 2011; Vander Heiden *et al.*, 2009; Devic, 2016).



**Figura 24.** Metabolisme de la glucosa en cèl·lules normals en condicions de manca d'oxigen (glicòlisi anaeròbica), amb obtenció final de 2 ATP (Font: Devic S. Journal of Cancer 2016).

### 3.4. Metabolisme cel·lular en les cèl·lules canceroses

El teixit tumoral està format per cèl·lules canceroses i cèl·lules estromals circumdants amb fons genètics/epigenètics diversos, una situació coneguda com heterogeneïtat intratumoral. Les cèl·lules canceroses estan envoltades d'un microambient totalment diferent del de les cèl·lules normals; en conseqüència, les cèl·lules tumorals han de mostrar respostes adaptatives ràpides a la hipòxia i a condicions amb pocs nutrients. Aquest fenomen de canvis en la bioenergètica cel·lular tumoral s'ha anomenat "reprogramació metabòlica" que, com s'ha esmentat en l'apartat 2, ha estat reconeguda com un dels segells distintius del càncer (Hanahan *et al.*, 2011; Vogelstein *et al.*, 2004; Ne Simonnet *et al.*, 2002). La reprogramació metabòlica es necessita tant

per a la transformació maligna com per al desenvolupament del tumor, incloses la invasió i la metàstasi (vegeu apartat 4.2. "Metabolisme i carcinogènesi").

Les cèl·lules canceroses alteren els processos metabòlics per mantenir el seu creixement i proliferació incontrolats característics. Aquestes alteracions metabòliques inclouen: 1) canvi de la fosforilació oxidativa a la glicòlisi aeròbica per donar suport a l'augment de la necessitat d'ATP, 2) augment de la glutaminòlisi per a la regeneració de NADPH, 3) un flux alterat a través de la via de la pentosa fosfat i el cicle de l'àcid tricarbòxilic per a la generació de macromolècules, 4) augment de la captació de lípids, lipogènesi i síntesi de colesterol, 5) regulació positiva del metabolisme del carboni per a la producció d'ATP, NADH/NADPH, nucleòtids i glutatió, 6) alteració del metabolisme dels aminoàcids, 7) regulació de l'apoptosi basada en el metabolisme i 8) la utilització de substrats alternatius, com ara el lactat i l'acetat (Schiliro *et al.*, 2021).

La glicòlisi i altres rutes del metabolisme de la glucosa són les vies metabòliques alterades més conegudes de les cèl·lules canceroses. Aquest treball s'ha centrat principalment en la primera de les alteracions metabòliques, és a dir, en el canvi de la fosforilació oxidativa a la glicòlisi aeròbica.

### **3.4.1. Metabolisme dels carbohidrats en les cèl·lules canceroses**

L'interès pels canvis metabòlics en el càncer s'ha revifat, en part, com a resultat de l'aplicació clínica generalitzada de la Tomografia per Emissió de Positrons (PET) mitjançant fluor-18-desoxiglucosa (FDG). Les imatges PET basades en FDG han confirmat que la majoria dels càncers primaris i metastàtics mostren un augment significatiu de la captació de glucosa. En aquest sentit, és ben coneguda la dependència que tenen de la glucosa les cèl·lules tumorals en els pacients amb càncer de cap i coll (Sandulache *et al.*, 2011).

#### **3.4.1.1. Glicòlisi aeròbica: l'efecte Warburg**

Fa més de 90 anys el fisiòleg alemany Otto Warburg (figura 25) va descriure per primer cop que els tumors, en comparació amb els teixits normals no neoplàsics, consumien una gran quantitat de glucosa per a satisfer les seves demandes d'energia i poder sobreviure i proliferar. Fins aleshores es pensava que les reaccions de producció d'energia necessàries per al creixement de les cèl·lules canceroses provenien de la lipòlisi i/o la proteòlisi. Uns anys més tard Warburg va demostrar que privar de glucosa i oxigen les cèl·lules canceroses provocava la mort cel·lular. D'aquesta manera, la primera constatació de que el metabolisme està alterat en el càncer té les seves arrels al treball d'Otto Warburg.





**Figura 25.** Otto Heinrich Warburg (1883-1970)

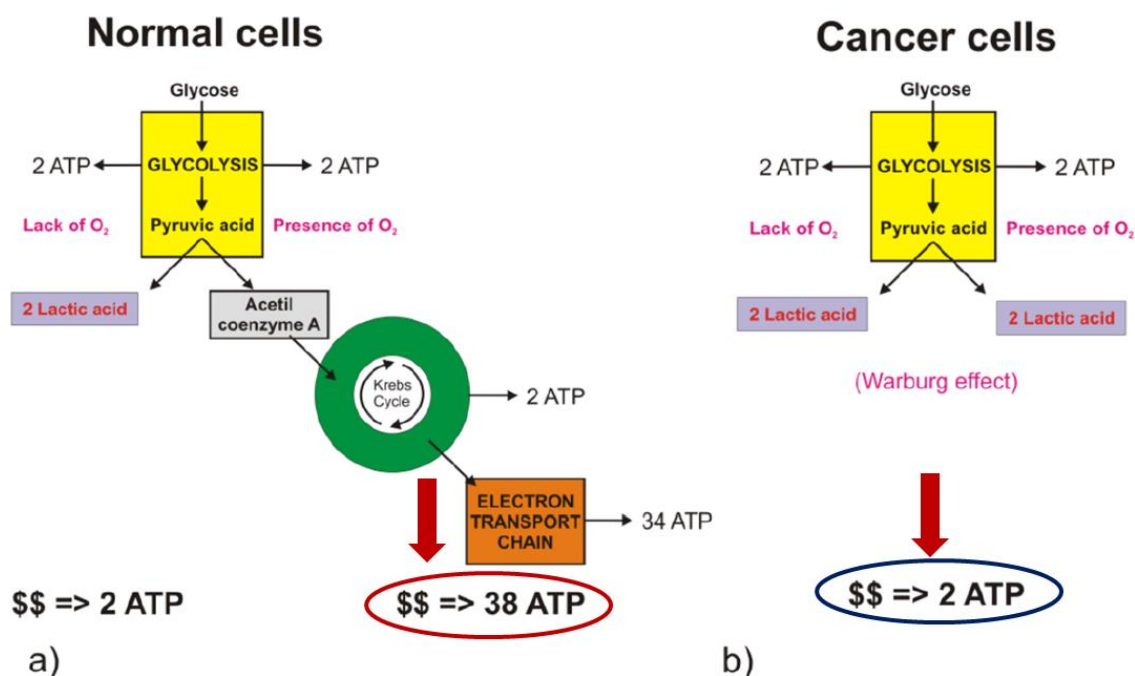
Durant la dècada de 1920 Warburg va comprovar que, a diferència de la majoria dels teixits normals, els teixits cancerosos fermentaven la glucosa a lactat, independentment de la presència d'oxigen.

Per estudiar el metabolisme del càncer 'in vivo' Warburg va utilitzar cèl·lules del sarcoma de Jensen per induir tumors a l'abdomen de les rates. En comparar les concentracions arterials amb les concentracions venoses de glucosa i lactat, Warburg va poder inferir la captació de glucosa i l'excreció de lactat per part del tumor: mentre que els teixits normals van consumir entre el 2 i el 18% de la glucosa arterial, els tumors en van consumir entre el 47 i el 70%. El lactat en sang no va canviar significativament després de la perfusió de teixits normals, però segons els càlculs de Warburg, els tumors van convertir el 66% de la glucosa consumida en lactat. Així, Warburg va suposar que els tumors prenen molta més glucosa que els teixits normals i que en converteixen un percentatge molt més gran en lactat i va descriure l'augment de la taxa de metabolisme de la glucosa i la producció de lactat a les cèl·lules canceroses per a la supervivència i la progressió tumoral (Warburg, 1927).

Warburg també va observar que, a diferència del metabolisme cel·lular normal, en les cèl·lules canceroses la conversió de glucosa a àcid làctic es produeix fins i tot en



presència d'oxigen, el que es coneix com glicòlisi aeròbica o **efecte Warburg (EW)** (Warburg, 1927; Vander Heiden *et al.*, 2009) (figura 26).



**Figura 26.** Diferències en la producció d'ATP segons la presència d'oxigen **a)** en cèl·lules normals i **b)** en cèl·lules canceroses (Efecte Warburg o glicòlisi aeròbica) (Modificat de: Devic S. Journal of Cancer 2016).

La glicòlisi aeròbica constitueix la primera alteració bioquímica específica descrita del càncer. En aquest procés, les cèl·lules tumorals depenen de la via glicolítica per al metabolisme de la glucosa fins i tot en presència d'oxigen, generant alts nivells de lactat i reduint l'ús del cicle de Krebs/àcid tricarboxílic (ATC) i la fosforilació oxidativa (OxPhos) (Levine *et al.*, 2010). El lactat generat és secretat a l'exterior de la cèl·lula, amb la subseqüent acidificació del microambient tumoral.

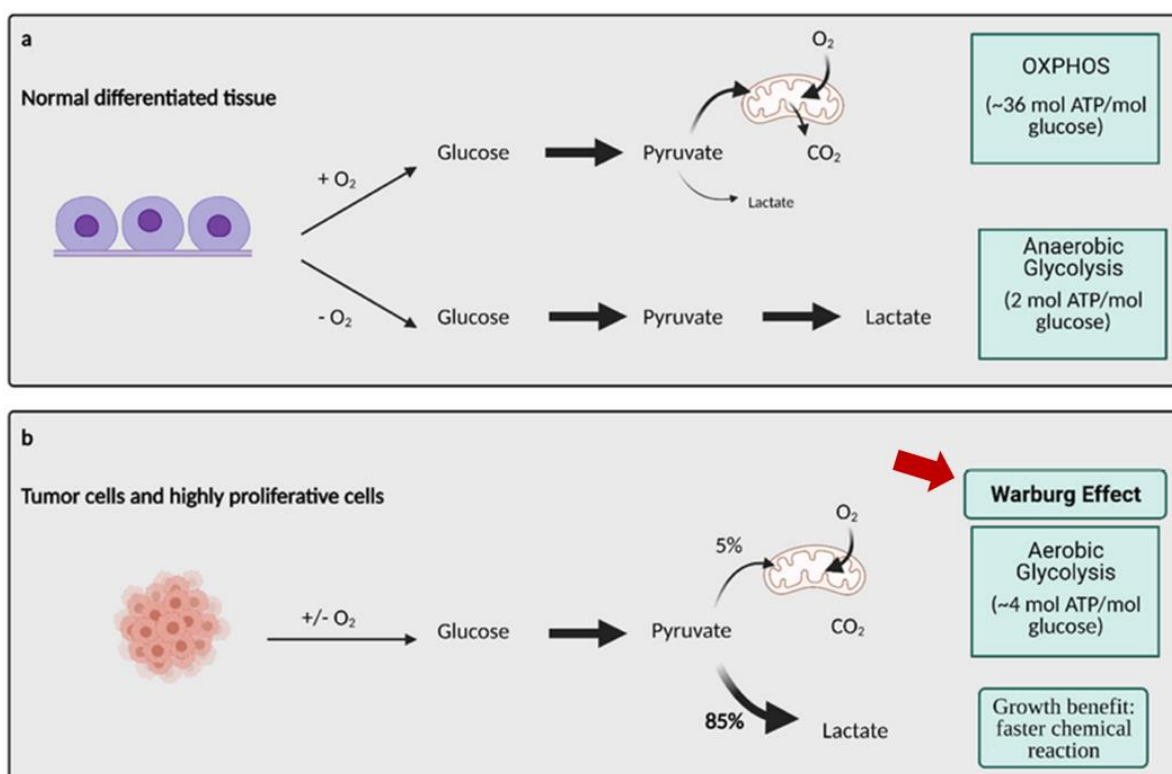
Si bé en aquell moment Warburg va proposar que la presència de la glicòlisi aeròbica era el resultat d'una disfunció permanent dels mitocondris (Warburg, 1956), existeixen nombroses investigacions que han demostrat que el mitocondri, en realitat, és funcional en molts càncers.

Poc després del descobriment de la glicòlisi aeròbica en les cèl·lules canceroses, el bioquímic anglès Herbert Crabtree va ampliar el treball de Warburg i va proporcionar la primera evidència "d'heterogeneïtat glicolítica" en el càncer i va demostrar que la

glicòlisi no augmentava uniformement en els tumors ni, fins i tot, en els tumors del mateix tipus (Crabtree, 1929). Aquest concepte s'ha conegut com "l'efecte Crabtree".

Hem vist, doncs, com a les cèl·lules normals la majoria de la glucosa utilitzada es descompon al citoplasma per la via de la glicòlisi i, en un segon temps, al mitocondri mitjançant la fosforilació oxidativa (OxPhos), amb generació de 38 ATP per molècula de glucosa.

Les cèl·lules canceroses, per contra, se sotmeten a la glicòlisi i esquiven l'OxPhos mitocondrial fins i tot amb disponibilitat d'oxigen adequat (glicòlisi aeròbica o EW), amb formació predominant d'àcid làctic mitjançant l'enzim lactat deshidrogenasa A (LDHA). El més sorprenent d'aquest procés és que els tumors, que són teixits molt demandants d'energia, canvien a una via de producció d'energia molt ineficient, ja que el resultat de la glicòlisi aeròbica és l'obtenció de menys energia en comparació amb les cèl·lules normals (entre 2 i 4 molècules d'ATP) (figura 27).



**Figura 27.** Diferències entre una cèl·lula normal i una cèl·lula cancerosa en el metabolisme de la glucosa (Modificat de: Schiliro C *et al.* Cells 2021). OXPHOS\*: fosforilació oxidativa.

La glicòlisi aeròbica, per tant, és un mitjà del tot ineficient per generar ATP en comparació amb la quantitat d'energia obtinguda amb la respiració mitocondrial o

fosforilació oxidativa (OxPhos). Per compensar aquesta deficiència energètica, les cèl·lules canceroses prenen molta més glucosa en comparació amb una cèl·lula normal; d'aquesta manera, la taxa de metabolisme de la glucosa mitjançant la glicòlisi aeròbica és més alta i la producció de lactat a partir de glucosa es produeix de 10 a 100 vegades més ràpidament que l'oxidació completa de la glucosa als mitocondris, complint així la majoria de les necessitats energètiques (Warburg *et al.*, 1927). Així, la quantitat final d'ATP sintetitzada durant un període de temps determinat és comparable, sigui quina sigui la via metabòlica utilitzada.

Aquest augment de la glicòlisi aeròbica, amb els subseqüents nivells augmentats de metabòlits glicolítics, no només ajuda a la cèl·lula cancerosa a satisfer les demandes d'energia sinó que també ajuda en la producció d'aminoàcids, proteïnes i lípids a través del metabolisme de la glutamina, el metabolisme de la serina i el metabolisme dels lípids, respectivament.

Un aspecte interessant d'aquesta adaptació metabòlica (glicòlisi aeròbica - efecte Warburg) és que no es limita només a les cèl·lules canceroses sinó que també s'ha observat en cèl·lules de creixement ràpid no tumorals, com ara les cèl·lules embrionàries i les cèl·lules implicades en la immunitat, l'angiogènesi, la pluripotència i la infecció per patògens (i.e. la malària). Les cèl·lules embrionàries, per exemple, fan servir aquest mecanisme (efecte Warburg) per augmentar l'angiogènesi i el creixement, però quan deixen de proliferar i comencen a diferenciar-se, els gens responsables reben les indicacions correctes i "s'apaguen". En canvi, en les cèl·lules canceroses, aquests gens estan activats sempre, contribuint a la malignitat (Abdel-Haleem *et al.*, 2017).

#### **3.4.1.2. Beneficis de l'efecte Warburg per al càncer**

El segell metabòlic de la majoria de les cèl·lules canceroses és l'absorció i la metabolització àvida de la glucosa. La "reprogramació" del metabolisme cel·lular cap a la glicòlisi aeròbica o EW és una de les modificacions metabòliques desenvolupades per les cèl·lules tumorals per tal de sobreviure en un microambient desfavorable, alhora que retenen la seva capacitat proliferativa.

Durant diverses dècades els investigadors van considerar que la glicòlisi aeròbica simplement omplia una necessitat de les cèl·lules canceroses que viuen en un entorn hipòxic i que era una manera ineficient d'obtenir energia. Però, malgrat la seva ineficiència energètica, la utilització preferent de la glicòlisi per part de les cèl·lules

canceroses de creixement ràpid confereix molts avantatges potencials que s'han fet evidents recentment. Es poden resumir de la següent manera:

a) A través de la utilització de la glicòlisi aeròbica les cèl·lules canceroses poden viure en entorns amb una concentració d'oxigen fluctuant que seria assolador per a les cèl·lules que es basen principalment en la fosforilació oxidativa per a generar ATP (Pouyssegur *et al.*, 2006). En aquestes condicions, l'ATP es produeix aproximadament 100 vegades més ràpid que amb la fosforilació oxidativa.

b) La producció d'àcid làctic, durant molt temps reconegut només com a "producte de rebuig metabòlic", redueix el pH del microambient cel·lular i tumoral (que oscil·la entre 6,0 i 6,5) i aquest fet promou, per una banda, canvis genètics que perjudiquen la resposta del sistema immunitari antitumoral, amb "immunopermissivitat" (Jiang, 2017; Liberti *et al.*, 2016; Gatenby *et al.*, 2004) i de l'altra, redueix la unió o adherència cel·lular facilitant el "desenganxament" cel·lular, la invasió i les metàstasis (Swietach *et al.*, 2007; Pedersen, 2007; Calorini *et al.*, 2012).

c) Les cèl·lules canceroses utilitzen productes metabòlics intermedis de la via glicolítica per a les reaccions anabòliques necessàries per a la proliferació ràpida (Gatenby *et al.*, 2004; Adekola *et al.*, 2012).

d) El piruvat i el NADPH, els productes finals de les dues vies principals del metabolisme de la glucosa (la via de la glicòlisi i la via de la pentosa fosfat o PPP, respectivament) són emprats per les cèl·lules canceroses per a lluitar contra l'estrès oxidatiu.

#### **3.4.1.3. Concepcions "errònies" sobre l'efecte Warburg**

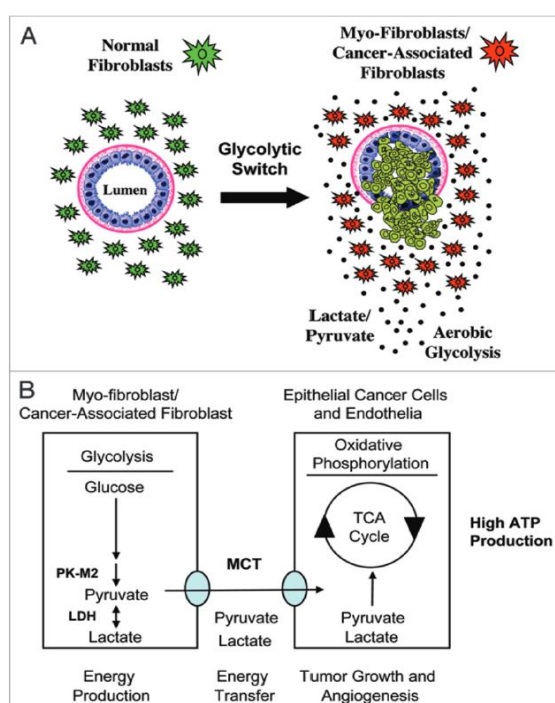
Tradicionalment s'ha atribuït a Otto Warburg l'afirmació que els tumors cancerosos, a diferència dels teixits normals, depenen predominantment o exclusivament de la glicòlisi aeròbica per a la producció d'energia (ATP). Però, tot i que Warburg va demostrar que molts tumors presenten una alta taxa glicolítica fins i tot en presència d'oxigen, també va destacar que a les cèl·lules tumorals de creixement més ràpid la contribució glicolítica en la producció d'energia no és exclusiva i normalment no supera el 50% (Pedersen, 2007).

En l'article que va aparèixer a Science fa més de 50 anys Warburg va resumir els resultats d'un experiment realitzat amb cèl·lules tumorals d'ascites de ratolí afirmant el següent: "Aquesta conversió en equivalents d'energia significa que les cèl·lules canceroses poden obtenir aproximadament la mateixa quantitat d'energia de la

fermentació (de la glicòlisi a l'àcid làctic) que de la respiració (OxPhos als mitocondris), mentre que les cèl·lules normals del cos obtenen molta més energia de la respiració que de la fermentació” (Warburg, 1956). En definitiva, Warburg va observar que, en el teixit normal, la glicòlisi genera aproximadament el 10% de l'ATP i l'OxPhos als mitocondris representa el 90%, mentre que als tumors cancerosos més del 50% de l'energia cel·lular es produeix per la glicòlisi i la resta es genera als mitocondris (Denko *et al.*, 2008).

#### 3.4.1.4. Efecte Warburg invers

L'efecte Warburg invers (o “acoblament metabòlic estromal-epitelial”) és una hipòtesi que dona suport al paper de l'OxPhos a les cèl·lules canceroses. L'efecte Warburg invers proposa que les cèl·lules canceroses indueixen la glicòlisi aeròbica en els fibroblasts estromals veïns. Aquests fibroblasts associats al càncer (CAF, de l'anglès “Cancer-Associated Fibroblasts”) se sotmeten a una diferenciació mio-fibroblàstica, activen la glicòlisi i comencen a segregar lactat i piruvat que, al seu torn, són absorbits per les cèl·lules canceroses epitelials, que els incorpora al seu cicle de Krebs mitocondrial. Tot això afavoreix que a les cèl·lules canceroses hi hagi una alta producció d'ATP a través de la fosforilació oxidativa (respiració mitocondrial) (Pavlidis *et al.*, 2009; Bonuccelli *et al.*, 2010) (figura 28).



**Figura 28.** Efecte Warburg invers (vegeu text) (Font: Pavlidis S *et al.* Cell Cycle, 2009).

Segons aquesta hipòtesi, existeix una simbiosi metabòlica entre les cèl·lules canceroses epitelials i els CAF, els quals "alimentarien" les cèl·lules tumorals. L'existència d'aquesta simbiosi metabòlica no és exclusiva dels teixits cancerosos i aquest procés també es pot observar en el teixit normal.

## **4. El càncer com a trastorn metabòlic**

### **4.1. Aspectes generals**

Es necessita la comprensió de la desregulació metabòlica de les cèl·lules canceroses per entendre el càncer. Durant molt de temps s'ha considerat el càncer com una malaltia genètica caracteritzada per una infinitat de mutacions que impulsen la progressió del càncer. Però hi ha evidències que indiquen que el metabolisme desregulat de les cèl·lules canceroses per si mateix podria ser la causa subjacent dels tumors.

Perquè el càncer es consideri una malaltia metabòlica cal que hi hagi un metabolisme desregulat, el qual es produeix per una respiració (fosforilació oxidativa) danyada o insuficient. És evident que el metabolisme desregulat és una característica clau de tots els tipus de càncer, però queda per respondre si l'alternança genètica provoca un metabolisme alterat en el càncer o si, al contrari, és el metabolisme desregulat el que dona lloc a les alteracions moleculars o genètiques observades en el càncer.

La defensa del càncer com a malaltia metabòlica sosté això últim. És a dir, que el càncer es produeix per un metabolisme desregulat. Es necessita un metabolisme alterat que implica un reencaminament metabòlic de les cèl·lules canceroses per donar suport a la seva alta demanda nutricional, necessària per a la generació d'energia.

Aquesta desregulació metabòlica de les cèl·lules canceroses conduiria a la regulació/activació o supressió/desactivació dels oncogens i dels gens supressors tumorals, respectivament, els quals regulen el metabolisme per mantenir la viabilitat i la proliferació cel·lular (Seyfried *et al.*, 2020).

### **4.2. Metabolisme i carcinogènesi**

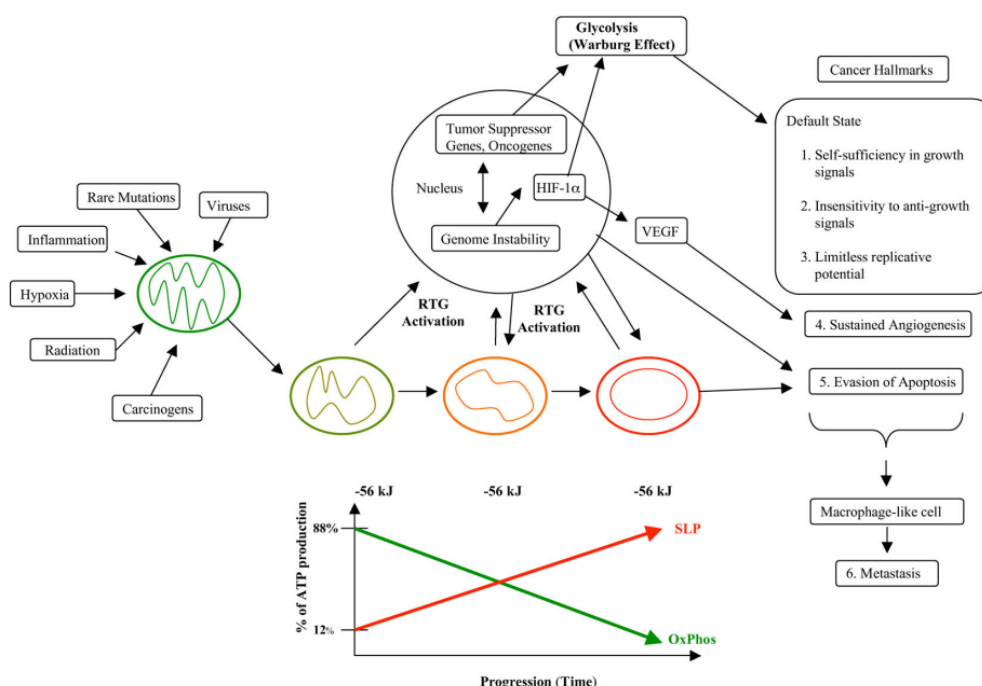
La carcinogènesi és un procés complex i en diversos passos que requereix l'eliminació de diverses barreres imposades per les cèl·lules com són les respostes antiproliferatives, els mecanismes d'inducció de la mort cel·lular programada i la senescència. Tots aquests processos es produeixen, principalment, per alteracions genètiques en oncogens i gens supressors de tumors (Fadaka *et al.*, 2017). En relació

amb això, l'activació d'oncogens i la desactivació de gens supressors tumorals s'han associat tradicionalment a la remodelació metabòlica lligada al càncer.

El recorregut des de la fisiologia cel·lular normal fins al comportament maligne i com es poden relacionar les característiques distintives del càncer amb les cascades de senyalització i amb la reprogramació metabòlica de les cèl·lules canceroses es mostra a la figura 29.

Qualsevol condició que danyi la fosforilació oxidativa mitocondrial d'una cèl·lula, però que no sigui prou greu per a induir l'apoptosi, pot iniciar el camí cap a un tumor maligne. Algunes de les condicions inespecífiques que contribueixen a la carcinogènesi poden incloure infeccions víriques, mutacions rares de la línia germinal, inflamació, hipòxia intermitent, radiació (ionitzant o ultraviolada), carcinògens i altres.

Qualsevol d'aquestes condicions pot danyar l'estructura i la funció dels mitocondris, activant així una resposta específica a la cèl·lula danyada (RTG o “resposta cel·lular retrògrada”). Si el dany mitocondrial persisteix, es requereix una resposta energètica compensatòria contínua que implica la fosforilació a escala de substrat per mantenir el consum energètic d'ATP i, subseqüentment, la viabilitat cel·lular (Seyfried *et al.*, 2010).



**Figura 29.** Vinculació dels segells distintius del càncer (“cancer hallmarks”) amb el metabolisme energètic deteriorat (vegeu text) (Font: Seyfried TN *et al.* Nutrition&Metabolism 2010). RTG\*: *retrograde cellular response*. SLP\*: *fosforilació a escala de substrat* (de l’anglès: “*substrat level phosphorylation*”).



La progressió del tumor està relacionada amb una major dependència de la fosforilació, que finalment esdevé irreversible. Com que la integritat del genoma nuclear depèn de l'eficiència de la producció d'energia mitocondrial, el deteriorament continuat de la producció d'energia mitocondrial debilitarà gradualment la integritat del genoma donant lloc a un fenotip mutador i a una gran quantitat de mutacions somàtiques. D'aquesta manera, l'activació d'oncogens i la inactivació de gens supressors tumorals seran la conseqüència d'una disfunció mitocondrial perllongada. I aquestes anomalies gèniques contribueixen encara més a la disfunció mitocondrial, alhora que activen les vies energètiques necessàries per regular i mantenir la fosforilació en l'àmbit de substrat.

Així doncs, aquest escenari metabòlic permet explicar totes les característiques principals adquirides del càncer i fa avinent que, en els mecanismes d'adaptació metabòlica relacionats amb el càncer, existeix una associació considerable entre diverses vies del metabolisme humà i la transformació maligna o carcinogènesi (Seyfried *et al.*, 2010; Hsu PP *et al.*, 2008).

Vegem-ne alguns exemples:

La isocitrat deshidrogenasa IDH1 i IDH2 (enzims del cicle de l'àcid tricarboxílic o cicle de Krebs) es muten amb freqüència en diversos tipus de càncer com ara el glioma, la leucèmia mieloide aguda i el condrosarcoma, desencadenant canvis significatius en el paisatge epigenètic dels càncers que contenen aquestes mutacions. Un dels productes dels enzims IDH1 i IDH2 mutats és el (R)-2-hidroxi-glutarat ((R)-2HG). Les cèl·lules canceroses amb mutació d'IDH poden acumular nivells mil·limolars d'aquest metabòlit normalment indetectable, el qual facilita el desenvolupament i manteniment del tumor maligne (Chowdhury *et al.*, 2011; Hirschey *et al.*, 2015).

A més del (R)-2HG, el succinat i el fumarat (productes metabòlics del cicle de Krebs) també tenen el potencial d'actuar com a oncometabòlits. En alguns tipus específics de càncer s'observen mutacions amb pèrdua de funció de la fumarat hidratasa (FH) i la succinat deshidrogenasa (SDH), donant lloc a l'acumulació de fumarat i succinat, respectivament (vegeu figura 22). El succinat es coneix, des de fa diversos anys, per promoure l'estabilització d'HIF1 mitjançant la inhibició de les prolil-hidroxilases. Més recentment, s'ha identificat que el succinat i el fumarat també inhibeixen les histones-desmetilases i les proteïnes TET (Hirschey *et al.*, 2015).

En atenció a això, el descobriment dels oncometabòlits proporciona proves de l'estat metabòlic del càncer i vincula l'aparició del càncer amb alteracions en la producció

d'energia, fet que planteja la pregunta de si el càncer podria ser una malaltia essencialment metabòlica (Gyamfi *et al.*, 2022).

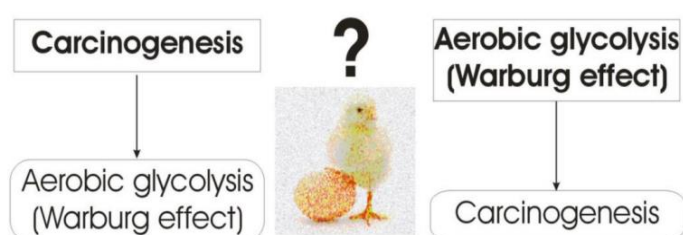
### 4.3. Efecte Warburg: conseqüència o cauda de la carcinogènesi?

Després de l'observació pionera d'Otto Warburg de que el consum elevat de glucosa per part de les cèl·lules canceroses s'associa a una limitació del consum d'oxigen i a la producció d'àcid làctic en aerobiosi (glicòlisi aeròbica), s'han dedicat nombrosos esforços per explicar la gènesi del metabolisme glicolític dels tumors així com la seva implicació en la transformació maligna.

L'efecte Warburg o glicòlisi aeròbica encara és una qüestió sense resoldre. Per que les cèl·lules canceroses agressives s'estimen més utilitzar un mètode energèticament ineficient per cremar la glucosa a nivell cel·lular?

Aquesta característica ha provocat gran part del conflicte sobre l'origen del càncer, és a dir, sobre si el càncer és un trastorn genètic o metabòlic. Tot i que s'ha acceptat la glicòlisi aeròbica com un segell metabòlic clau del càncer, encara no es coneix del tot de quina manera les cèl·lules tumorals estableixen aquest fenotip metabòlic alterat i si és essencial per a la tumorigènesi.

Devic (2016) ho il·lustra d'una manera prou gràfica: davant la disjuntiva sobre si l'efecte Warburg és la conseqüència o bé podria estar en l'arrel de la causa mateixa de la carcinogènesi la resposta és que "no està clar que és primer, si l'ou o la gallina" (figura 30).



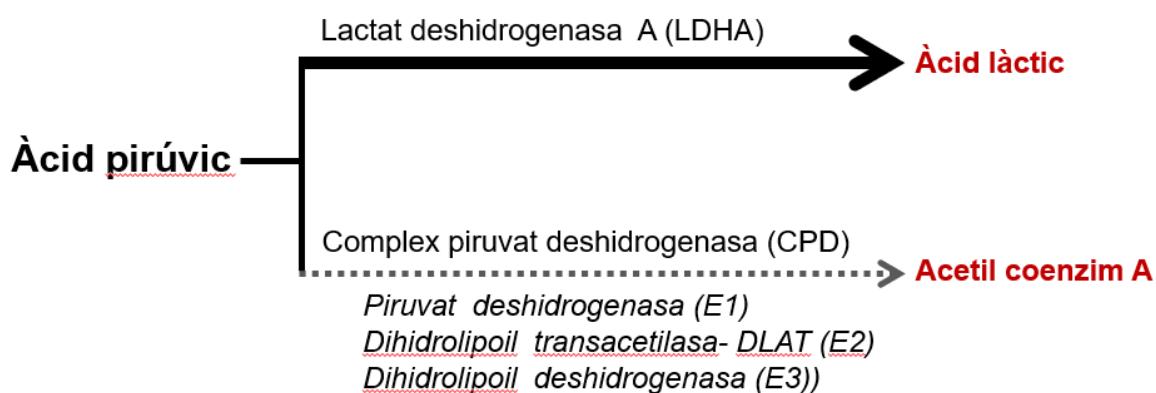
**Figura 30.** Efecte Warburg i carcinogènesi: una qüestió encara pendent (Font: Devic S. Journal of Cancer 2016).

Per molt que al llarg dels darrers 90 anys s'han suggerit diverses hipòtesis, ara com ara no hi ha una explicació clara d'aquest efecte. Tradicionalment s'ha assumit que l'efecte Warburg és una conseqüència de la carcinogènesi, però també s'han plantejat altres hipòtesis: I si el canvi cel·lular cap a una glicòlisi aeròbica representa més aviat

un punt d'inflexió en el temps que indueix que una cèl·lula normal esdevingui cancerosa?

Existeixen algunes teories que recolzen la desregulació del metabolisme de la glucosa com la causa "inicial" de la carcinogènesi. En aquest context, Devic (2016) planteja el següent: en el metabolisme cel·lular de la glucosa hi ha un punt crític on es decideix el destí de l'àcid pirúvic. En presència d'oxigen, l'àcid pirúvic es converteix en Acetil-coenzim A, procés que és intervingut per l'anomenat "complex de la piruvat deshidrogenasa" (CPD). Aquest complex està format per tres enzims: piruvat deshidrogenasa (PDH), dihidrolipoil transacetilasa (DLAT) i dihidrolipoil deshidrogenasa (DLD). Per contra, la conversió d'àcid pirúvic en àcid làctic només requereix un enzim: lactat deshidrogenasa A (LDHA).

Des del punt de vista de la cinètica cel·lular es podria pensar que la probabilitat d'error és més gran en la conversió de piruvat a acetil-coenzim A perquè es necessita la síntesi de tres enzims i que això afavoriria la integritat de la via de la transcripció d'un sol enzim (LDHA), amb la subseqüent formació d'àcid làctic (figura 31).



**Figura 31.** Cruïlla en el metabolisme cel·lular de la glucosa on es decideix el destí de l'àcid pirúvic (Esquema de l'autor, modificat de: Devic S. Journal of Cancer 2016).

Aquest autor proposa que el canvi de respiració cel·lular (OxPhos) a glicòlisi aeròbica (efecte Warburg) amb formació de lactat conduiria a la carcinogènesi. La cèl·lula començaria a desenvolupar el fenotip cancerós en el punt on es decideix el destí de l'àcid pirúvic i aquest canvi metabòlic es podria regir per la manca d'almenys algun dels enzims del CPD. A favor d'aquesta hipòtesi s'ha reportat que molts càncers tenen

nivells més alts de LDHA que els teixits normals (vegeu apartat 5.2 “Enzims metabòlics i bases moleculars de la glicòlisi aeròbica”).

Per la seva banda, Christofk i cols. (2008) van evidenciar que, per al canvi del metabolisme cel·lular normal a la glicòlisi aeròbica, n'hi hauria prou amb una transformació (“interruptor”) d'una isoforma de l'enzim glicolític piruvat-quinasa (PK) i que això afavoriria la tumorigènesi. Les cèl·lules tumorals expressen exclusivament la isoforma embrionària M2 de la piruvat quinasa (PKM2). Quan s'elimina l'expressió de la piruvat quinasa M2 a les línies cel·lulars de càncer humà, canvia l'expressió de la piruvat quinasa a la isoforma M1 (forma adulta) i condueix a la inversió de l'efecte Warburg, tal com es veu per la reducció de la producció de lactat i l'augment del consum d'oxigen.

#### **4.4. Consideracions finals**

Tot i que existeixen diverses línies d'evidència que suggereixen que el “recablejat” metabòlic està orquestrat per l'acció concertada d'oncogens i gens supressors de tumors, hem vist que, en algunes circumstàncies, el metabolisme alterat pot tenir un paper principal en l'oncogènesi. En aquest sentit, s'han associat mutacions d'enzims citosòlics i mitocondrials implicats en vies metabòliques clau amb formes hereditàries i esporàdiques de càncer.

Els avenços recents en l'estudi de les mutacions de la isocitrat deshidrogenasa-1 (IDH1), la fumarat hidrogenasa (FH) i la succinat deshidrogenasa (SDH), així com les alteracions d'enzims com la piruvat kinasa M2 (PKM2) han demostrat que només amb la mutació d'enzims metabòlics clau n'hi ha prou per activar tumors, posant en dubte les creences anteriors. Per tant, els trastorns metabòlics també són causa directa de l'inici dels tumors, o dit d'una altra manera, de la carcinogènesi (Liberti i Locasale 2016).

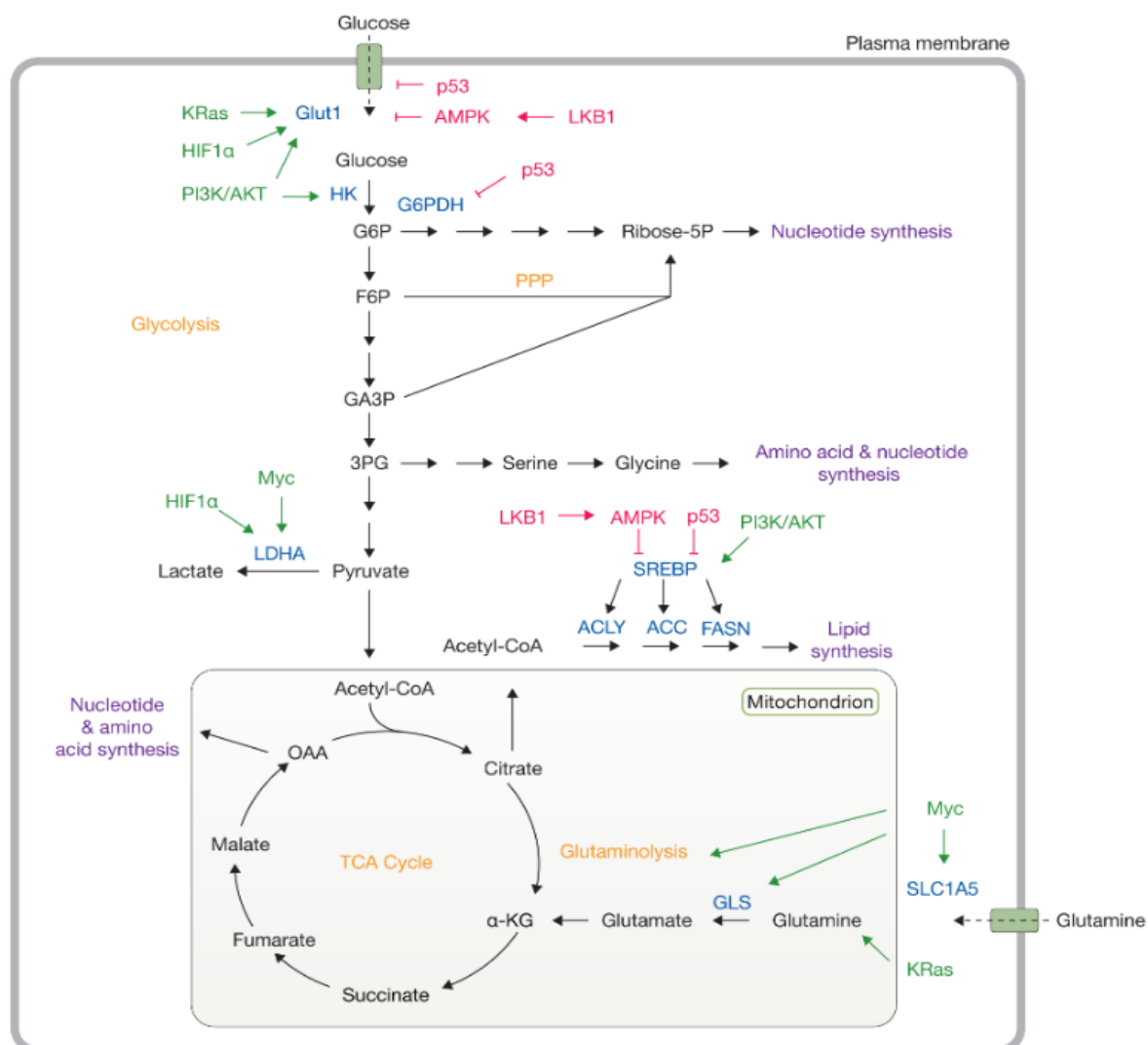
En conjunt, aquests resultats demostren que el metabolisme aberrant, abans vist com un epifenomen de la reprogramació oncogènica, té un paper clau en l'oncogènesi amb el poder de controlar els esdeveniments genètics i epigenètics en les cèl·lules (Hirschey *et al.*, 2015).

### **5. Aspectes moleculars del metabolisme del càncer**

Els mecanismes moleculars subjacents a la reprogramació metabòlica de les cèl·lules canceroses són complexos. Hi intervenen oncogens i gens supressors tumorals, enzims metabòlics i ARN no codificants (ARNnc).

### 5.1. Gens efectors clau decisius en el metabolisme del càncer

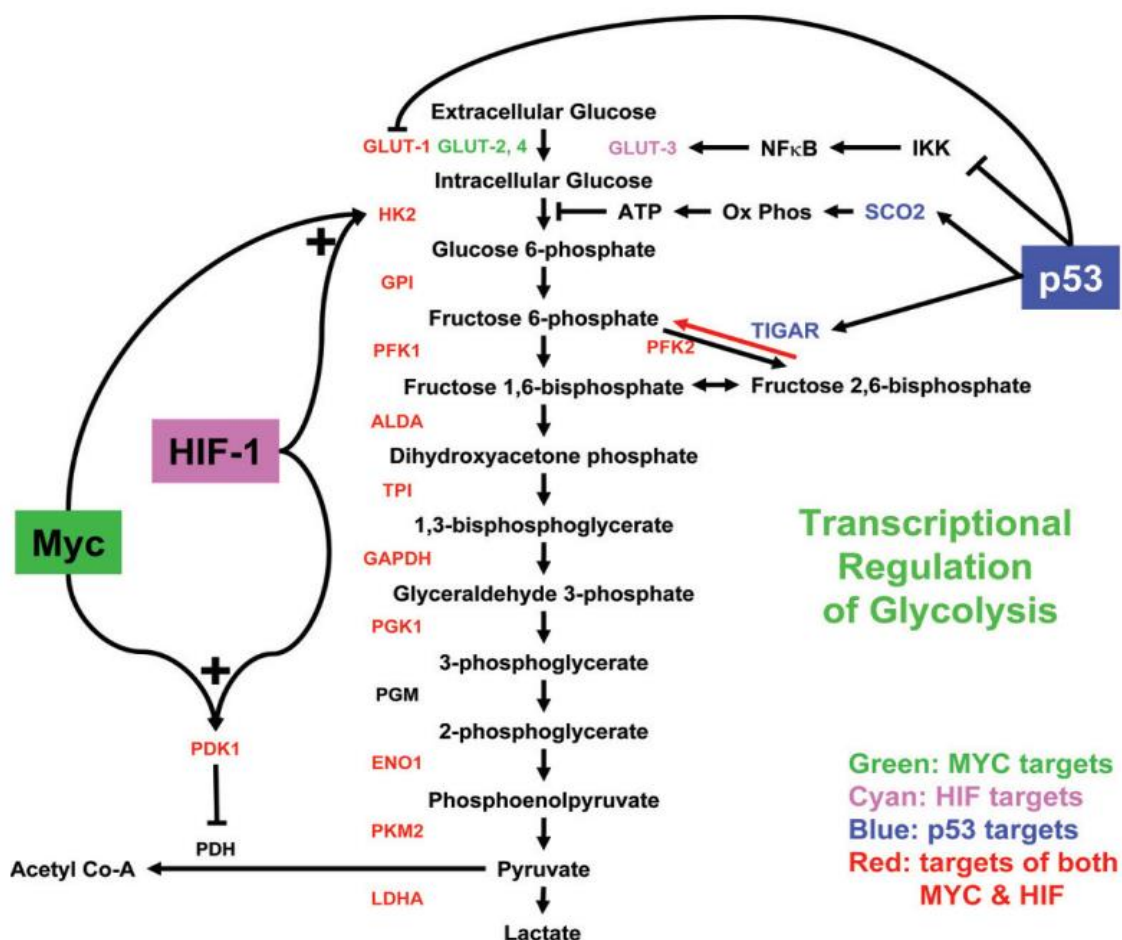
És ben conegut que a les cèl·lules canceroses hi ha diverses oncoproteïnes que augmenten l'expressió i indueixen l'activitat d'enzims metabòlics i transportadors que faciliten una alta taxa de metabolisme de la glucosa. Hi ha diversos estudis que han detallat les funcions dels oncogenes i gens supressors de tumors identificats amb més freqüència i s'ha relacionat la seva funció amb papers clau en el metabolisme cel·lular (Boroughs *et al.*, 2015) (figura 32).



**Figura 32.** Metabolisme cel·lular: senyalització oncogènica i disponibilitat de nutrients. La senyalització oncogènica regula l'adquisició de nutrients abundants, incloent-hi glucosa i glutamina, i la seva utilització per donar suport a les vies biosintètiques (en morat). En blau es destaquen transportadors de nutrients com Glut1 i diferents enzims metabòlics. Les vies metabòliques clàssiques es destaquen en taronja (glicòlisi, cicle de Krebs, glutaminolisi i via de la pentosa-fosfat). HK, hexoquinasa; G6P, glucosa-6-fosfat; G6PDH, glucosa-fosfat deshidrogenasa; Ribosa-5P, ribosa-5-fosfat; F6P, fructosa-6-fosfat; PPP, via de la pentosa fosfat; GA3P, gliceraldehid-3-fosfat; 3PG, 3-fosfoglicerat; LDHA, lactat deshidrogenasa A; SREBP, proteïna d'unió a elements reguladors d'esterols; ACLY, ATP citrat liasa; ACC, acetil-CoA carboxilasa; FASN, àcids grassos sintasa; GLS, glutaminasa, α-KG, alfa-cetoglutarat; OAA, oxaloacetat; TCA, àcid tricarboxílic (Modificat de: Boroughs LK *et al.* Nat Cell Biol, 2015).

### 5.1.1. HIF (Factor induïble per la hipòxia)

En condicions d'hipòxia s'activa el complex del factor de transcripció induïble per la hipòxia HIF-1. HIF1-alfa indueix l'expressió dels transportadors de glucosa (GLUT) i regula l'activació de 9 dels 10 enzims glicolítics (excepte la fosfoglicerat mutasa) que funcionen en la glicòlisi (Levine *et al.*, 2010) (figura 33).



**Figura 33.** Regulació del metabolisme glicolític per HIF-1, c-Myc i p53 (Font: Yeung SL *et al.* Cell Mol Life Sci 2008).

Els gens diana d'HIF-1 implicats en la reprogramació metabòlica inclouen: transportadors de glucosa GLUT1 (SLC2A1) i GLUT3 (SLC2A3), hexoquinasa 1 i 2 (HK 1, 2), els enzims glicolítics aldolasa A (ALDOA), enolasa 1 (ENO1), gliceralhid-3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH), fosfofructoquinasa L (PFKL), fosfoglicerat quinasa 1 (PGK1), piruvat quinasa M2 (PKM2) i lactat deshidrogenasa A (LDHA).

L'activitat enzimàtica de piruvat deshidrogenasa (PDH) és inhibida per la PDH quinasa 1 (PDK1), bloquejant així la conversió del piruvat en acetil coenzim A per entrar al cicle de l'àcid tricarboxílic (ATC) (Semenza *et al.*, 2012).

### 5.1.2. c-Myc (factor de transcripció Myc)

El primer enllaç mecanicista directe documentat entre un oncogen activat i el metabolisme alterat de la glucosa va ser l'activació transcripcional de LDHA (lactat deshidrogenasa A) pel factor de transcripció oncogènic MYC (Shim *et al.*, 1997).

Myc i HIF-1 regulen conjuntament alguns dels gens implicats en el metabolisme de la glucosa (transportador de glucosa GLUT1, hexoquinasa 2 (HK2), piruvat quinasa M2 (PKM2), lactat deshidrogenasa A (LDHA) i piruvat deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1), afavorint la conversió de la glucosa en lactat (figura 33).

Myc també estimula el metabolisme de la glutamina mitjançant la regulació dels transportadors de glucosa (SLC1A5) i la glutaminasa (GLS). La glutamina es converteix en  $\alpha$ -cetoglutarat ( $\alpha$ -KG) i, a través del cicle de l'àcid tricarboxílic (ATC), a malat, que es transporta al citoplasma i es converteix en piruvat i després en lactat (glutaminòlisi) (Dang *et al.*, 2009).

### 5.1.3. Gen supressor tumoral TP53

TP53 és un gen supressor tumoral que codifica un factor de transcripció amb funcions en el manteniment de l'estabilitat genòmica, el cicle cel·lular, la reparació de l'ADN, l'apoptosi i la senescència. p53 també té un paper en el control del metabolisme de la glucosa mitjançant la inhibició de la glicòlisi i l'estimulació concomitant de la fosforilació oxidativa. El p53 funcional disminueix la taxa glicolítica inhibint l'expressió dels transportadors de glucosa GLUT1 i GLUT4 i disminuint els nivells de fosfoglicerat mutasa, l'enzim responsable de convertir el 3-fosfoglicerat en 2-fosfoglicerat (Soga *et al.*, 2013).

## 5.2. Enzims metabòlics. Bases moleculars de la glicòlisi aeròbica en el càncer

El metabolisme desregulat contribueix a l'oncogènesi i la via metabòlica més desregulada en càncer és la via del metabolisme de la glucosa. Per això els canvis en l'expressió dels enzims implicats en el metabolisme de la glucosa són fonamentals per a la reprogramació metabòlica (Gyamfi *et al.*, 2022).

Les cèl·lules canceroses faciliten el primer pas "obligat" en el metabolisme de la glucosa augmentant la captació de glucosa i induint l'expressió d'alts nivells



d'hexoquinasa 2 (HK2). El segon pas obligat de la glicòlisi és catalitzat per la fosfofructoquinasa 1 (PFK1), que catalitza la conversió de fructosa-6-fosfat (F6P) en fructosa-1,6-bisfosfat (F1,6BP). El tercer pas és catalitzat per les piruvat quinases (PKM), que converteixen el fosfoenolpiruvat (PEP) en piruvat (Hay, 2016) (figura 33).

Mentre que en els dos primers passos es consumeix ATP, al tercer pas (de fosfoenolpiruvat/PEP a piruvat) es genera ATP (figura 21). Aquest tercer pas està atenuat o minimitzat en les cèl·lules canceroses per la utilització predominant de la isoforma M2 de la piruvat quinasa (PKM2). A les cèl·lules canceroses, PKM2 està sobreexpressada i aquesta sobreexpressió està controlada per l'oncoproteïna c-Myc. L'expressió i la regulació de PKM2 juga un paper dominant en la glicòlisi per assolir les demandes de nutrients de les cèl·lules canceroses en proliferació. A més, té una funció no metabòlica com a coactivador i proteïna quinasa, que contribueix a la tumorigènesi (Dong *et al.*, 2016).

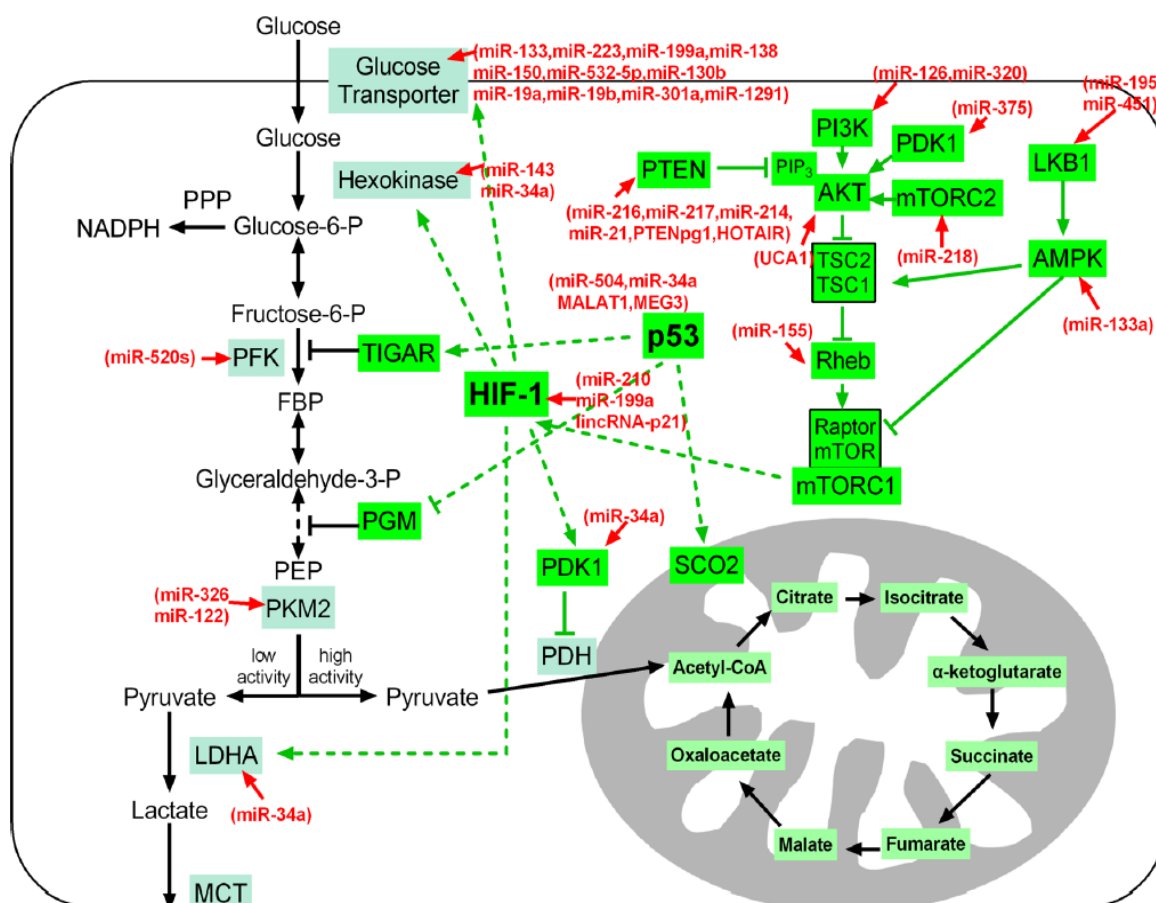
El darrer pas de la glicòlisi (la conversió de PEP a piruvat) disminueix en les cèl·lules canceroses però, en canvi, hi ha un augment notable de la conversió de piruvat en lactat (figura 33). Els enzims que catalitzen la conversió reversible del piruvat en lactat són les lactat deshidrogenases (LDH), que estan codificades per quatre gens separats (LDHA, LDHB, LDHC i LDHD). LDHA té una afinitat més alta pel piruvat mentre que LDHB té una afinitat més alta pel lactat; així, LDHA afavoreix la reacció cap a lactat i LDHB afavoreix la reacció inversa (cap a piruvat). LDHA és la forma més expressada a les cèl·lules canceroses.

### **5.3. ARN no codificants**

Finalment, diverses investigacions recents han posat èmfasi en el paper dels ARN no codificants (ARNnc) en el metabolisme del càncer. Els ARNnc són una classe de molècules d'ARN funcionals que no es tradueixen a proteïnes però que regulen l'expressió gènica.

S'ha demostrat que els ARNnc estan implicats en diversos processos biològics, inclosa la regulació d'enzims clau en la via del metabolisme de la glucosa (Fan *et al.*, 2017).

Així, s'ha observat que els ARNnc regulen el metabolisme de la glucosa dirigint-se als transportadors de glucosa (GLUT) o als enzims de la glicòlisi (com ara HK1/2, PKM2 i LDHA) i influint en les vies de senyalització oncogènica p53, Akt, AMPK i HIF-1 (Yu *et al.*, 2015; Shankaraiah *et al.*, 2018; Taefehshokr *et al.*, 2020) (figura 34).



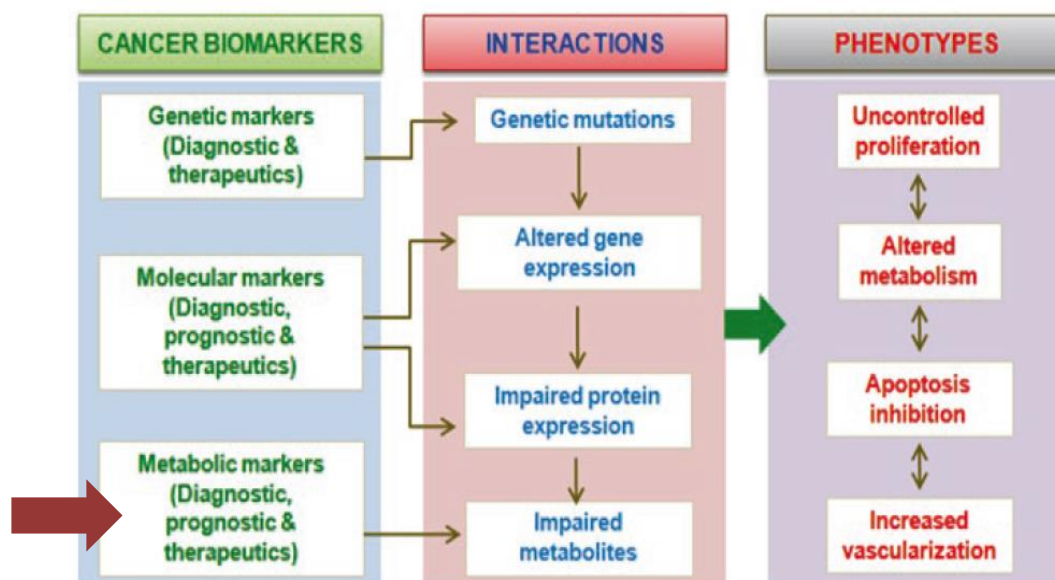
**Figura 34.** Paper dels ARNnc en la regulació del metabolisme de la glucosa (vegeu text) (Font: Yu C *et al.* Tumor Biol 2015).

## 6. Biomarcadors i càncer

### 6.1. Aspectes generals dels biomarcadors. Rellevància clínica

No hi ha dubte que, amb l'aparició actual de les noves tecnologies, el descobriment de biomarcadors s'ha convertit en un gran tema d'investigació. I això és així perquè el gran progrés en el control del càncer es veu potenciat significativament amb la disponibilitat de biomarcadors útils per a la detecció precoç (diagnòstic), per al pronòstic i per al tractament del càncer.

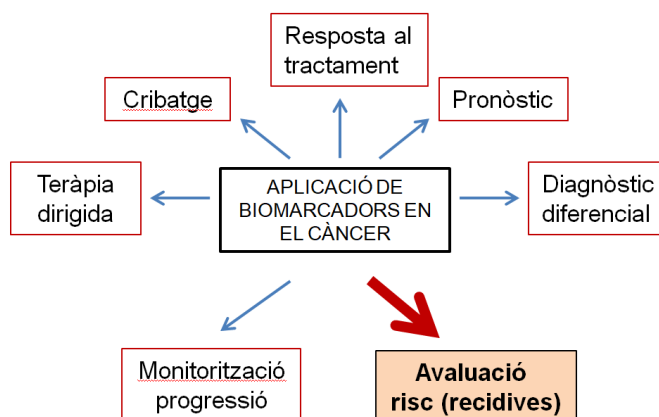
Hi ha diversos tipus de biomarcadors tumorals que es classifiquen en funció de les seves funcionalitats (figura 35). Els marcadors de diagnòstic, per exemple, ajuden a predir l'aparició d'un tumor mentre que els marcadors de pronòstic són indicadors que s'utilitzen per ajudar a detectar el risc d'una conseqüència futura, com ara la reaparició (recidiva) de la malaltia després del tractament primari.



**Figura 35.** Esquema de la identificació de biomarcadors al càncer (Modificat de: Jha NK *et al* dins: Cancer Cell Metabolism: A Potential Target for Cancer Therapy. Capítol 9. Springer Nature 2020. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-1991.8>).

En els darrers anys, el coneixement sobre biomarcadors ha augmentat d'allò més i ha proporcionat grans oportunitats per avançar en la gestió dels pacients amb càncer, millorant l'eficiència de la detecció i l'eficàcia del tractament. D'altra banda, l'avenç tecnològic recent ha permès l'examen de molts biomarcadors potencials i ha renovat l'interès per desenvolupar-ne de nous. Els biomarcadors del càncer conformen una àmplia gamma de substàncies bioquímiques (àcids nucleics, proteïnes, sucres, lípids i petits metabòlits), paràmetres citogenètics i citocinètics i cèl·lules tumorals senceres que es troben als líquids corporals (Bhatt *et al.*, 2010).

La comprensió integral de la rellevància de cada biomarcador és molt important no només per diagnosticar la malaltia de manera fiable, sinó que també ajuda en la valoració del pronòstic, en l'avaluació del risc de recidiva i en l'elecció de les múltiples alternatives terapèutiques disponibles en l'actualitat que poden beneficiar els pacients (figura 36).



**Figura 36.** Aplicacions dels biomarcadors en el càncer (Modificat de Jha NK *et al* dins: Cancer Cell Metabolism: A Potential Target for Cancer Therapy. Capítol 9. Springer Nature 2020. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-1991.8>).

## 6.2. Biomarcadors (metabòlics i altres) en el CECC

Les neoplàsies de cap i coll tenen un mal pronòstic a causa del seu diagnòstic tardà. Per tant, la disponibilitat de biomarcadors per detectar aquests tumors en una fase precoç podria millorar el pronòstic i la taxa de supervivència.

Si bé és cert que existeix un nombre creixent de marcadors moleculars que poden ser utilitzats com eines pronòstiques o predictives en el tractament del CECC, la comprensió d'aquests marcadors biològics no està tan ben definida com en altres tipus de tumors com el càncer de mama, còlon o pulmó.

En una revisió bibliogràfica recent sobre biomarcadors per diagnosticar les neoplàsies de cap i coll en la fase inicial i que engloba una visió dels diferents camps –“òmiques”, Konings H i cols (2020) van concloure que, fins a aquesta data, no s'havia identificat cap biomarcador únic o panell de biomarcadors per a la detecció de tumors de cap i coll amb aplicabilitat clínica i que calien més investigacions sobre biomarcadors per diagnosticar neoplàsies de cap i coll en una fase inicial.

En el CE de laringe, els biomarcadors més estudiats a la literatura han estat els ARN no codificants (lncRNAs) (Cossu *et al.*, 2019; Huang GJ *et al.*, 2021), els reguladors del cicle cel·lular (Ki-67, ciclina D1, p27, p16, PCNA), les proteïnes reguladores de l'apoptosi (Bcl2), els oncogens i gens supressors tumorals (p53), les molècules implicades en les vies dels factors de creixement (EGFR, TGF- $\beta$ ), angiogèniques (VEGF, angiogenina, CD105), estructurals (E-cadherina, CD44, osteopontina, FAK i

cortactina), els marcadors immunològics (PD-L1) i les hormones sexuals (ER, PR, AR i PRLR) (Cavaliere *et al.*, 2021).

Els microARN són ARN monocatenaris no codificants de 17 a 25 nucleòtids que circulen en fluids corporals lliures de cèl·lules, com el plasma sanguini, el sèrum, la saliva i l'orina. La investigació actual té com a objectiu analitzar l'expressió d'aquests ARNnc en pacients amb càncer. Alguns autors han estudiat el valor pronòstic dels microRna circulants (miR-26b, miR-124, miR-155 i miR-375) com a factors de risc de recidiva local en pacients amb CECC no tractats en el moment del diagnòstic (Avilés-Jurado *et al.*, 2020). Per la seva banda, Wang H i cols (2020) proposen que es puguin utilitzar terapèutiques basades en ARNnc per inhibir el procés de reprogramació del metabolisme de la glucosa en el CECC.

A diferència de les alteracions genètiques o epigenètiques, que no es produeixen en tots els tipus de càncer, les alteracions metabòliques són freqüents entre tots els subtipus de càncer i entre tots els càncers en general. La metabolòmica es defineix com l'estudi científic dels processos químics que impliquen metabòlits, substrats de molècules i productes del metabolisme cel·lular. El metaboloma representa el conjunt complet de metabòlits en una cèl·lula, teixit, òrgan o organisme biològic.

El fet de reconèixer el càncer com un trastorn metabòlic ha empès a intentar destriar biomarcadors metabòlics claus de diagnòstic, pronòstic i tractament que permetin modificar els enfocaments utilitzats fins ara en la gestió dels pacients amb CECC (Gyamfi *et al.*, 2022).

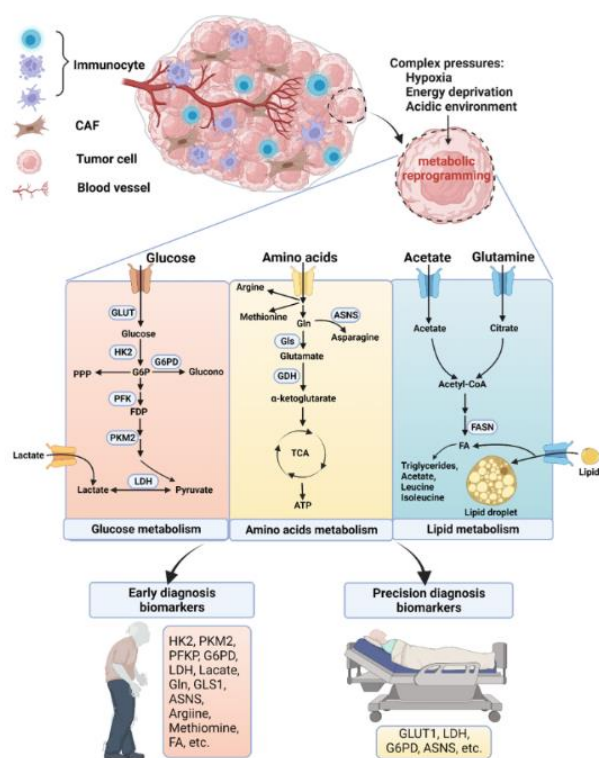
En aquest sentit, ja fa temps que s'està investigant en la identificació de dianes metabòliques potencials en les cèl·lules canceroses amb l'objectiu de desenvolupar agents terapèutics específics (Singleterry *et al.*, 2014). Existeixen múltiples estudis sobre fàrmacs o substàncies que han demostrat la capacitat de bloquejar l'activitat de diversos reguladors implicats en la via glicolítica i que s'han proposat com a possibles teràpies "dirigides" en les alteracions de les vies metabòliques en el CECC (Wigfield *et al.*, 2008; Shiah *et al.*, 2021; Wang H *et al.*, 2020).

Altres treballs han explorat el potencial de la desregulació metabòlica des del punt de vista de la predicció diagnòstica o pronòstica i el seu paper en la tumorigènesi, amb la finalitat d'identificar "signatures" o biomarcadors associats al metabolisme amb capacitat diagnòstica i pronòstica al CECC (Blatt *et al.*, 2016; Sandulache *et al.*, 2012). Terra i cols (2021), per exemple, van avaluar el valor potencial del succinat circulant i

l'expressió dels gens relacionats com factor pronòstic i predictiu de control local i regional en el CECC.

La majoria dels estudis publicats sobre biomarcadors en el CECC fan referència al CE de cavitat oral (Almangush *et al.*, 2017; Konings *et al.*, 2020). Botha i cols. (2021) van fer una revisió sistemàtica per esbrinar el paper dels transportadors de la glucosa (GLUT) en la fisiopatologia del CE de cavitat oral i veure si la sobreexpressió dels gens transportadors de glucosa està relacionada amb la taxa de progressió de la malaltia, els factors clínics, el pronòstic del pacient, la resistència al tractament i si existeixen estratègies de tractament efectives dirigides al transport de la glucosa en el CE de cavitat oral.

Wang Y i cols. (2022) han analitzat els treballs sobre l'estudi del metabolisme cel·lular alterat de la glucosa i també dels aminoàcids i dels lípids per a la identificació de nous biomarcadors associats al metabolisme a saliva, sèrum, orina i teixit tumoral que podrien ser útils per al diagnòstic precoç del CE de cavitat oral (figura 37).



**Figura 37.** Detecció del metabolisme cel·lular alterat per diagnosticar CE de cavitat oral. El CE de cavitat oral pateix una reprogramació metabòlica en resposta a pressions complexes. CAF, fibroblast associat al càncer; LDH, lactat deshidrogenasa; Gln, glutamina; ASNS, asparagina sintetasa; Gln, glutaminasa; GDH, glutamat deshidrogenasa; TCA, àcid tricarbòxic; ATP, trifosfat d'adenosina; FA, àcid gras; FASN, àcids grassos sintetasa (Font: Wang Y *et al.* Biomolecules 2022).

Recentment s'ha explorat la metabolòmica per identificar nous biomarcadors a la saliva, els quals es podrien fer servir de manera fiable i poc invasiva per al diagnòstic precoç i el control de l'estadi en pacients amb CE de cavitat oral (Nijakowski K *et al.*, 2022; Ishikawa S *et al.*, 2022).

### 6.3. Gens relacionats amb el metabolisme estudiats en aquest treball

Aquesta tesi doctoral s'ha fet a partir de la determinació de l'expressió transcripcional d'una sèrie de gens que codifiquen proteïnes relacionades amb el metabolisme cel·lular. Els gens estudiats, la seva funció i la localització en el genoma es troben representats a la taula 5.

**Taula 5.** Llista de gens relacionats amb el metabolisme analitzats en aquest estudi.

GEN	FUNCIÓ	LOCALITZACIÓ
SLC2A1	Transportador de glucosa GLUT1	Crom 1 (1p34.2)
SLC2A3	Transportador de glucosa GLUT3	Crom 12 (12p13.31)
Hexoquinasa 1 (HK1)	Glicòlisi (conversió glucosa a glucosa 6P)	Crom 10 (10q22.1)
Fosfofructoquinasa L (PFKL)	Glicòlisi (conversió Fructosa 6P a Fructosa 1,6 biP)	Crom 21 (21q22.3)
PDHA1	Conversió piruvat a Acetil CoA	Crom X (Xp22,12)
PDHB	Conversió piruvat a Acetil CoA	Crom 3 (3p14.3)
DLAT	Conversió piruvat a Acetil CoA	Crom 11 (11q23.1)
DLD	Conversió piruvat a Acetil CoA	Crom 7 (7q31.1)
PDHX	Ancoratge DLD a nucli DLAT	Crom 11 (11p13)
PDK1	Inhibició formació Acetil Coa	Crom 2 (2q31.1)
LDHA	Conversió piruvat a lactat	Crom 11 (11p15.1)
LDHB	Interconversió piruvat a lactat	Crom 12 (12p12.1)
SLC16A3 (MCT4)	Transport transmembrana de piruvat i lactat	Crom 17 (17q25.3)
SLC16A7 (MCT2)	Transport transmembrana de piruvat i lactat	Crom 12 (12q14.1)
SDHA	Cicle àcid tricarbòxilic (succinat a fumarat)	Crom 5 (5p15.33)
SDHB	Cicle àcid tricarbòxilic (succinat a fumarat)	Crom 1 (1p36.13)
SDHC	Cicle àcid tricarbòxilic	Crom 1 (1q23.3)
SUCNR-1	Cicle àcid tricarbòxilic	Crom 3 (3q25.1)
HIF1A	Regulació resposta/adaptació a la hipòxia	Crom 14 (14q23.2)



Tot seguit es realitza una descripció de la funció de les proteïnes, els gens de les quals han estat avaluats en aquest estudi.

### **6.3.1. Gens transportadors de glucosa**

Són gens facilitadors de la difusió o transportadors de glucosa a través de la membrana plasmàtica de les cèl·lules i responsables de la captació de glucosa constitutiva o basal. També s'anomenen transportadors de glucosa isoformes 1 i 3 (GLUT1 i GLUT3 respectivament, de l'anglès "Glucose transporter").

#### 6.3.1.1. SLC2A1 (GLUT1) (Solute carrier family 2 member 1)

El transportador de glucosa 1 (o GLUT1), també conegut com a transportador de glucosa facilitat (SLC2A1), és una proteïna uniportadora que en els humans està codificada pel gen SLC2A1. GLUT1 facilita el transport de glucosa a través de les membranes plasmàtiques de les cèl·lules de mamífers. La proteïna codificada es troba principalment a la membrana cel·lular i a la superfície de les cèl·lules, on també pot funcionar com a receptor del virus de la leucèmia de cèl·lules T humanes (HTLV) I i II. GLUT1 va ser el primer transportador de glucosa que es va caracteritzar.

L'expressió de GLUT1 apareix gairebé en tots els teixits i el grau d'expressió sol estar en correlació amb la taxa de metabolisme cel·lular de la glucosa. A l'adult, els nivells més alts s'expressen en els eritròcits, on representa el 2% de les proteïnes contingudes a la membrana plasmàtica, i també a les cèl·lules endotelials dels teixits de barrera, com la barrera hematoencefàlica.

GLUT1 és responsable del nivell de captació basal de glucosa necessari per a mantenir la respiració en totes les cèl·lules. Els nivells d'expressió de GLUT1 a les membranes cel·lulars augmenten amb la reducció dels nivells de glucosa i disminueixen amb el seu increment.

#### 6.3.1.2. SLC2A3 (GLUT3) (Solute carrier family 2 member 3)

GLUT3 va ser el tercer transportador de glucosa que es va descobrir, es va clonar per primer cop el 1988 a partir d'una línia cel·lular de múscul esquelètic fetal, utilitzant una sonda d'ADNc de GLUT1 i es va demostrar que compartia un 64,4% d'identitat amb GLUT1. Encara que es va descobrir que GLUT3 s'expressava en diversos teixits, s'expressa més específicament a les neurones, trobant-se predominantment als axons i les dendrites i també, encara que de forma menys prominent, al cos cel·lular. GLUT3 té una capacitat de transport almenys cinc vegades més gran que GLUT1 o GLUT4, així com una major afinitat per la glucosa que GLUT1, GLUT2 o GLUT4.

### 6.3.2. Gens relacionats amb la glicòlisi

#### 6.3.2.1 HK1 (Hexoquinasa 1)

Les hexoquinases fosforilen la glucosa per produir glucosa-6-fosfat (G6P), el primer pas en la majoria de les vies del metabolisme de la glucosa. Aquest gen codifica una forma ubiqua de l'hexoquinasa que es localitza a la membrana externa dels mitocondris.

Els nivells fisiològics de G6P poden regular aquest procés inhibint HK1 com a retroalimentació negativa, encara que el fosfat inorgànic (Pi) pot alleujar la inhibició de la G6P. No obstant això, a diferència de HK2 i HK3, HK1 no està regulada directament pel Pi, cosa que s'ajusta millor al paper catabòlic. En fosforilar la glucosa, HK1 impedeix efectivament que la glucosa surti de la cèl·lula i, per tant, compromet la glucosa en el metabolisme energètic. A més, promou l'acoblament de la glicòlisi a la fosforilació oxidativa mitocondrial, cosa que augmenta sobre manera la producció d'ATP mitjançant el reciclatge directe de l'ATP/ADP mitocondrial per satisfer les demandes d'energia de la cèl·lula. Una altra funció crítica de HK1 unida a la membrana mitocondrial externa és la supervivència cel·lular i la protecció contra el dany oxidatiu.

HK1 és la isoforma més ubiqua de les quatre hexoquinases i s'expressa de forma constitutiva a la majoria dels teixits. Cal destacar que HK1 és l'única isoforma de l'hexoquinasa que es troba a les cèl·lules i teixits que més depenen del metabolisme de la glucosa per al seu funcionament, com el cervell, els eritròcits, les plaquetes, els leucòcits i els fibroblasts.

#### 6.3.2.2. PFKL (Fosfofructoquinasa L)

Aquest gen codifica la subunitat hepàtica (L) d'un enzim que catalitza la conversió de la D-fructosa 6-fosfat en D-fructosa 1,6-bisfosfat, que és un pas clau en el metabolisme de la glucosa (vegeu esquema de la glicòlisi, figures 21 i 33).

### 6.3.3. Gens del complex Piruvat Deshidrogenasa (PDH)

El complex piruvat deshidrogenasa (PDH) és un complex multienzim de la membrana mitocondrial que catalitza la conversió del piruvat en acetil-CoA i CO<sub>2</sub> i proporciona l'enllaç principal entre la glicòlisi i el cicle de l'àcid tricarboxílic (cicle de Krebs). El complex PDH està format per tres components enzimàtics:

#### 6.3.3.1. Piruvat deshidrogenasa (E1)

Heterotetràmer de dues subunitats alfa (PDHA1) i dues beta (PDHB)

6.3.3.2. Dihidrolipoamida acetiltransferasa (E2 o DLAT)6.3.3.3. Dihidrolipoamida deshidrogenasa (E3 o DLD)6.3.3.4. PDHX

El complex piruvat deshidrogenasa (PDH) es localitza a la matriu mitocondrial i catalitza la conversió de piruvat en acetil-coenzim A. El complex PDH enllaça així la glicòlisi amb el cicle de Krebs. Conté tres subunitats catalítiques E1, E2 i E3, dues subunitats reguladores, E1 quinasa i E1 fosfatasa, i una subunitat no catalítica, la proteïna d'unió E3 (E3BP). Aquest gen codifica la subunitat de la proteïna d'unió E3, també coneguda com a component X del complex piruvat deshidrogenasa. Aquesta proteïna lliga els dímers E3 al nucli E2 del complex PDH. Els defectes en aquest gen són una de les causes de la deficiència de piruvat deshidrogenasa, que provoca disfunció neurològica i acidosi làctica en la infància i la infantesa primerenca. Aquesta proteïna és també un antigen menor per als anticossos antimitocondrials. Aquests autoanticossos són presents en gairebé el 95% dels pacients amb la malaltia hepàtica autoimmune cirrosi biliar primària (CBP). A la CBP, els limfòcits T activats ataquen i destrueixen les cèl·lules epitelials del conducte biliar, on aquesta proteïna està anormalment distribuïda i sobreexpressada.

PDHX és necessària per a l'ancoratge de la dihidrolipoamida deshidrogenasa (E3) al nucli de la dihidrolipoamida transetilasa (E2) dels complexos de piruvat deshidrogenasa dels eucariotes. Aquesta unió específica és essencial per a un complex PDH funcional.

**6.3.4. PDK1 (Piruvat deshidrogenasa quinasa 1)**

Piruvat deshidrogenasa (PDH) és un complex multienzimàtic mitocondrial que catalitza la descarboxilació oxidativa del piruvat i és un dels principals enzims responsables de la regulació de l'homeòstasi dels carbohidrats als mamífers. La seva activitat enzimàtica està regulada per un cicle de fosforilació/desfosforilació. La fosforilació de PDH per una piruvat deshidrogenasa quinasa (PDK) específica provoca la seva inactivació (figura 33).

PDK1 és una quinasa que exerceix un paper clau en la regulació del metabolisme i l'homeòstasi de la glucosa i els àcids grassos per mitjà de la fosforilació de les subunitats de la piruvat deshidrogenasa PDHA1 i PDHA2. Aquesta fosforilació inhibeix l'activitat de la PDH i, per tant, controla el flux de metabòlits a través del cicle de l'àcid tricarbòxilic, regula a la baixa la respiració aeròbica i inhibeix la formació d'acetil-

coenzim A a partir del piruvat. Exerceix un paper en les respostes cel·lulars a la hipòxia, i és important per a la proliferació cel·lular en condicions d'hipòxia. Protegeix les cèl·lules contra l'apoptosi en resposta a la hipòxia i l'estrès oxidatiu.

El paper ubic d'aquest gen el presta a estar involucrat en una varietat de patologies, incloent-hi el càncer. L'expressió transcripcional de PDK1 està associada significativament a la progressió tumoral.

### **6.3.5. Gens del Complex Lactat Deshidrogenasa (LDH)**

Lactat deshidrogenasa (LDH) catalitza la interconversió de piruvat a lactat amb la interconversió concomitant de NADH i NAD<sup>+</sup>. Converteix el piruvat, el producte final de la glicòlisi, en lactat quan l'oxigen és absent o escàs. A altes concentracions de lactat, l'enzim presenta una inhibició de la retroalimentació i es redueix la velocitat de conversió de piruvat a lactat.

La lactat deshidrogenasa enzimàticament activa està formada per quatre subunitats (tetràmer). Les dues subunitats més comunes són els pèptids LDH-M i LDH-H, anomenats pel seu descobriment al teixit muscular i cardíac, i estan codificats pels gens LDHA i LDHB.

#### 6.3.5.1. LDHA (Lactat deshidrogenasa A)

LDHA és una de les cinc isoformes de la família lactat deshidrogenasa. Catalitza la conversió de piruvat a lactat en condicions anaeròbiques i és clau en el metabolisme glicolític alterat, el qual és una característica de les cèl·lules canceroses. La proteïna codificada per aquest gen catalitza la conversió de L-lactat i NAD en piruvat i NADH en el pas final de la glicòlisi anaeròbica. La proteïna es troba predominantment en el teixit muscular i pertany a la família de la lactat deshidrogenasa. Les mutacions en aquest gen han estat relacionades amb la mioglobínúria d'esforç. S'han trobat múltiples variants de transcripció que codifiquen diferents isoformes per a aquest gen. El genoma humà conté diversos pseudogens no transcrits d'aquest gen.

#### 6.3.5.2. LDHB (Lactat deshidrogenasa B)

Aquest gen codifica la subunitat B de l'enzim lactat deshidrogenasa, que catalitza la interconversió de piruvat i lactat amb la interconversió concomitant de NADH i NAD<sup>+</sup> en un procés postglicòlisi. S'han trobat variants de transcripció empalmades alternativament per a aquest gen.

### 6.3.6. Gens transportadors de piruvat i àcid làctic

En el càncer, l'augment de la conversió de glucosa a lactat està associada a una taxa glicolítica elevada que genera concentracions mil·limolars d'àcid làctic que s'allibera al compartiment extracel·lular. Com que l'àcid làctic és hidròfil i un àcid feble, el seu transport a través de les membranes necessita transportadors.

El transport d'àcid làctic i piruvat a través de les membranes plasmàtiques és catalitzat per membres de la família de transportadors de monocarboxilats lligats a protons (MCT) que ha estat designada com a família de transportadors de soluts-16. Cada MCT sembla tenir especificitat per un substrat i una cinètica de transport lleugerament diferents, que estan relacionades amb els requisits metabòlics dels teixits en què es troben.

Els MCT estan codificats per la família de gens portadors de solut 16 (SLC16). Entre els 14 membres de la família, els MCT1/SLC16A1, MCT2/SLC16A7, MCT3/SLC16A8 i MCT4/SLC16A3 transmeten ions monocarboxilats juntament amb protons (figura 38).

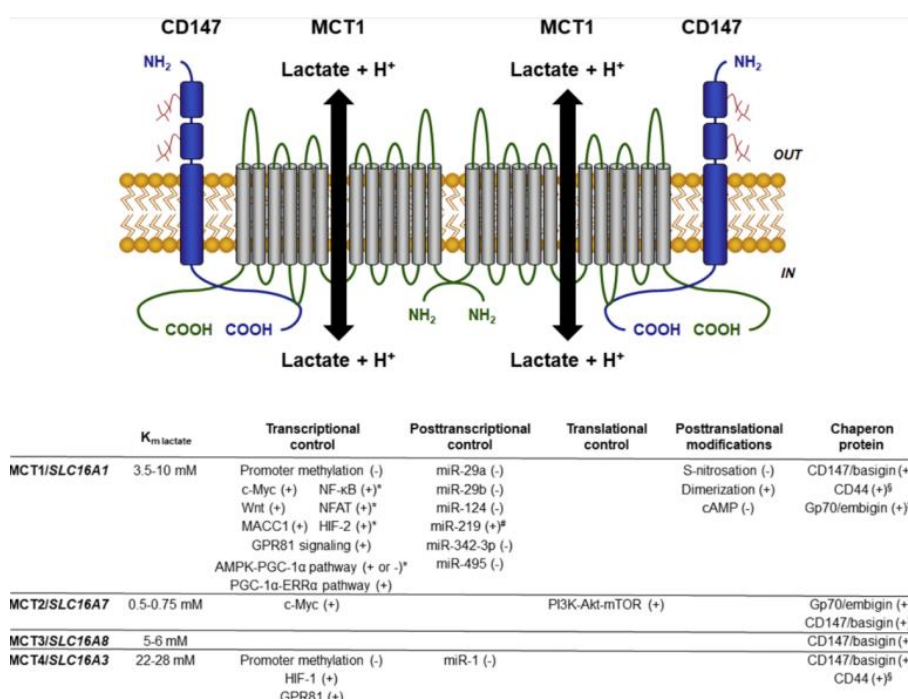


Figura 38. Transportadors de monocarboxilats (MCT).

#### 6.3.6.1. SLC16A3 / Transportador de monocarboxilat 4 (MCT4)

SLC16A3 és un MCT que catalitza el transport ràpid a través de la membrana plasmàtica de molts monocarboxilats com el lactat, el piruvat, els oxoàcids de cadena

ramificada derivats de la leucina, la valina i la isoleucina, i els cossos cetònics acetoacetat, beta-hidroxibut i acetat.

#### 6.3.6.2. SLC16A7 / Transportador de monocarboxilat 2 (MCT2)

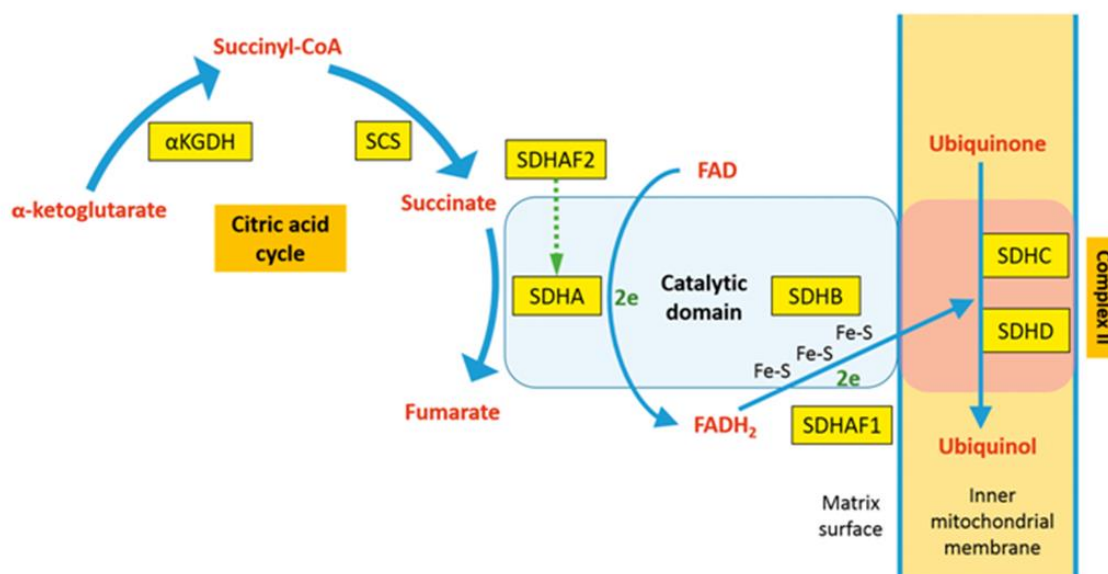
Dels quatre transportadors de lactat coneguts en mamífers (MCTs 1-4), MCT2 és el que té més afinitat pel lactat. Paral·lelament, s'ha demostrat que la transcripció del gen MCT2 respon amb alta sensibilitat a la hipòxia, al pH intracel·lular i al lactat.

L'expressió de MCT1, MCT2 i MCT4 (SLC16A1, SLC16A7 i SLC16A3) s'ha caracteritzat àmpliament en línies cel·lulars de càncer i en múltiples tipus de tumors, incloent-hi el CE de cavitat oral (Payen *et al.*, 2020). De la mateixa manera, també s'ha observat la sobreexpressió de MCT4 (SLC16A3) durant la progressió d'epiteli normal a epiteli tumoral en el càncer de cavitat oral (Zhu *et al.*, 2014).

#### **6.3.7. Gens del Complex Succinat Deshidrogenasa (SDHA, SDHB, SDHC)**

El complex SDH es localitza a la membrana mitocondrial interna i té una funció en els processos essencials de producció d'energia d'una cèl·lula. Està implicat en l'oxidació de succinat a fumarat en el cicle de l'àcid cítric o tricarboxílic (Krebs) i en la cadena respiratòria, amb la reducció d'ubiquinona (coenzim Q) a la cadena aeròbica de transferència d'electrons, contribuint a la generació d'ATP per fosforilació oxidativa (Rizwan *et al.*, 2018). Estructuralment, és un heterooligòmer format per proteïnes de 4 subunitats (SDHA, SDHB, SDHC i SDHD). SDHA actua com a intermediari en l'acció bàsica de l'enzim SDH:

1. SDHA converteix el succinat en fumarat com a part del cicle de l'àcid cítric. Aquesta reacció també converteix FAD en FADH<sub>2</sub>.
2. Els electrons de FADH<sub>2</sub> es transfereixen als grups de ferro de la subunitat SDHB. Aquesta funció forma part de la cadena respiratòria
3. Finalment, els electrons es transfereixen al pool d'Ubiquinona (Q) mitjançant les subunitats SDHC/SDHD (figura 39).



**Figura 39.** Paper del complex Succinat Deshidrogenasa (SDH) en el cicle de Krebs. (Font: Arch Pathol Lab Med. 2018;142(12):1564-1570. doi:10.5858/arpa.2017-0285-RS). Vegeu text.

### 6.3.8. SUCNR-1 (receptor de succinat 1)

Aquest gen codifica un receptor acoblat a la proteïna G per al succinat, una molècula intermèdia del cicle de l'àcid tricarboxílic (ATC). Està implicat en la promoció del desenvolupament de les cèl·lules progenitores hematopoètiques i té un paper potencial en la hipertensió renovascular, que té correlacions conegudes amb la insuficiència renal, la diabetis i l'ateroesclerosi.

### 6.3.9. HIF1A (Factor induïble per la hipòxia 1, subunitat alfa)

Aquest gen codifica la subunitat alfa del factor de transcripció induïble per hipòxia-factor-1 (HIF-1), que és un heterodímer compost per una subunitat alfa i una beta. HIF-1 funciona com a regulador mestre de la resposta homeostàtica cel·lular i sistèmica a la hipòxia. En condicions hipòxiques activa la transcripció de més de 40 gens, englobant eritropoietina, transportadors de glucosa (GLUT), enzims glicolítics, factor de creixement endotelial vascular, HILPDA i altres gens, els productes proteics dels quals augmenten el lliurament d'oxigen o faciliten l'adaptació metabòlica a la hipòxia.





## II. JUSTIFICACIÓ DEL TREBALL

---

## II. JUSTIFICACIÓ DEL TREBALL.

El carcinoma escatós de cap i coll (CECC) és un tumor que compta amb una elevada incidència al nostre entorn. Els algoritmes actuals per al maneig clínic dels pacients amb CECC es basen en una estratègia que depèn de la localització i l'estadi del tumor i on tots els pacients en la mateixa etapa TNM es tracten de manera uniforme, amb un èxit limitat. Així, la classificació actual basada en el lloc anatòmic i l'estadi del tumor no aconsegueix reflectir l'alt nivell d'heterogeneïtat biològica del CECC i, en conseqüència, la gestió clínic adequada dels pacients continua sent un repte important.

Malgrat el desenvolupament d'estratègies de tractament curatiu adaptades a cada nivell de risc, la realitat és que s'observen diferències evolutives per a un mateix estadi. Per tant, és necessari modificar l'enfocament actual de tractar de manera idèntica a tots els pacients amb les mateixes característiques clíniques i histològiques: alguns pacients amb característiques clíniques similars tenen un pronòstic diferent com a resultat de l'heterogeneïtat molecular. Per això cal fer la selecció de tractaments guiats per biomarcadors i basats en les diferents característiques biològiques i genètiques dels tumors (Budach V *et al.*, 2019; Alshafi *et al.*, 2019).

En els darrers anys ha augmentat considerablement el coneixement dels processos biològics involucrats en la transformació neoplàsica i la progressió del CECC gràcies als diferents tipus d'estudis mitjançant anàlisis moleculars d'alt rendiment de grans cohorts de pacients (genòmica, transcriptòmica, proteòmica, metabolòmica i radiòmica). El discerniment del paisatge genètic, el microambient tumoral, les vies de senyalització aberrants, l'epigenètica i la desregulació metabòlica han generat noves idees sobre la patogènesi molecular del CECC. És per això que la investigació científica s'ha centrat en la comprensió de la biologia i la immunobiologia del CECC per tal d'identificar biomarcadors predictius i/o pronòstics que són clau per desenvolupar teràpies més efectives per al maneig del CECC, amb menys toxicitat i més especificitat (Bhat GR *et al.*, 2021).

Atès que els règims altament agressius de radioteràpia i quimioteràpia s'han associat amb morbiditats substancials agudes i a llarg termini, la identificació de biomarcadors metabòlics amb capacitat pronòstica en relació amb el control local de la malaltia en pacients amb CECC tractats amb cirurgia o radioteràpia permetria modular els tractaments adjuvants (per exemple disminuint la intensitat del tractament i reduir els efectes secundaris) (Rosenberg AJ *et al.*, 2021) i, alhora, optimitzar la periodicitat dels

controls de seguiment en funció del risc de recidiva. Tot plegat redundaria en una millora de les estratègies terapèutiques i, subseqüentment, en un important benefici clínic per als pacients.



### III. HIPÒTESI I OBJECTIUS

---

### III. HIPÒTESI I OBJECTIUS

#### 1. Hipòtesi de treball

La desregulació del metabolisme de la glucosa és un factor clau en el desenvolupament del carcinoma escatós de cap i coll (CECC).

En els pacients amb carcinoma escatós de cap i coll (CECC) tractats de manera quirúrgica o amb radioteràpia, l'expressió de gens implicats en el metabolisme de la glucosa es relaciona amb el control local de la malaltia.

#### 2. Objectius del treball

##### 2.1. Objectiu general

- Valorar la importància del metabolisme de la glucosa en l'àmbit del microambient tumoral en relació amb el pronòstic dels pacients amb carcinoma escatós de cap i coll (CECC)

##### 2.2. Objectius específics

- Identificar una signatura metabòlica amb capacitat pronòstica de control local de la malaltia mitjançant l'expressió a nivell transcripcional d'un panell de gens relacionats amb el metabolisme de la glucosa en mostres tumorals prèvies al tractament d'una cohort de pacients amb carcinoma escatós de cap i coll tractats amb radioteràpia i avaluar la relació amb el control local de la malaltia.
- Identificar una signatura metabòlica amb capacitat pronòstica de control local de la malaltia mitjançant l'expressió a nivell transcripcional d'un panell de gens relacionats amb el metabolisme de la glucosa en mostres tumorals prèvies al tractament d'una cohort de pacients amb carcinoma escatós de cap i coll tractats de manera quirúrgica i avaluar la relació amb el control local de la malaltia.
- Analitzar la correlació entre els nivell d'expressió transcripcional i l'expressió immunohistoquímica en el teixit tumoral dels gens associats amb el control local de la malaltia





## IV. PACIENTS I METODOLOGIA

---

## IV. PACIENTS I METODOLOGIA

### 1. Pacients

Aquest treball s'ha realitzat amb mostres de biòpsia obtingudes de la localització primària del tumor i de forma prèvia a qualsevol mena de tractament en pacients amb carcinomes escamosos de cap i coll (CECC) localitzats a cavitat oral, orofaringe, hipofaringe o laringe, confirmats histològicament, i que van seguir un tractament amb intenció radical al Servei d'Otorrinolaringologia de l'Hospital de Sant Pau durant el període 2008-2016. Cap dels pacients comptava amb l'antecedent d'un tumor previ a cap i coll.

L'estudi va ser revisat i aprovat pel Comitè d'Ètica de la institució (C.P. PI15/02047) i s'ajustava als principis esbossats a la Declaració d'Hèlsinki.

La informació clínica dels pacients inclosos en l'estudi es va obtenir de forma retrospectiva d'una base de dades que, de manera prospectiva, recull informació relativa a les característiques clíniques, oncològiques, de tractament i de seguiment de tots els pacients amb CECC tractats a l'Hospital de Sant Pau des de 1985 (León *et al.*, 2002).

Tots els pacients van ser avaluats per un Comitè Oncològic que va proposar el tractament adequat per a cada cas d'acord amb els protocols terapèutics institucionals. La categoria d'extensió local i regional de la malaltia (estadi clínic) es va definir segons el sistema de classificació TNM de la Unió per al Control Internacional del Càncer (UICC) vigent en el moment del diagnòstic.

Donada la interacció entre el consum de tabac i alcohol, es va crear una variable combinada de consum de tòxics en tres categories: no consum; consum moderat (< 20 cigarretes/dia i/o < 80 g alcohol/dia); i consum sever ( $\geq 20$  cigarretes/dia o  $\geq 80$  g alcohol/dia).

Per als pacients amb carcinomes localitzats a l'orofaringe, en els casos diagnosticats fins a l'any 2012 es va avaluar l'estat en relació amb el VPH mitjançant la detecció de l'ADN viral amb SPF-10 RT-PCR utilitzant, per al genotipat, l'assaig d'hibridació reversa LiPA25 –vl. A partir de l'any 2013 es va fer servir l'assaig CLART HPV-2 PCR. En totes les mostres d'ADN-VPH positives es va avaluar l'expressió immunohistoquímica de p16INK4a, amb determinació de la intensitat de tinció nuclear i citoplasmàtica. Es van considerar p16INK4a positives les mostres amb una tinció

intensa i difusa de més del 70% de les cèl·lules tumorals. Finalment, es van considerar tumors relacionats amb VPH (VPH-positius) els que van comptar amb presència d'ADN viral juntament amb una immunopositivitat enfront p16INK4a.

Els **criteris d'inclusió** per als pacients considerats en aquest estudi van ser:

1. Diagnòstic de CECC confirmat histològicament entre 2008 i 2016 a l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.
2. Localització del tumor a cavitat oral, orofaringe, hipofaringe i laringe.
3. Absència d'antecedents d'un tumor previ a cap i coll.
4. Tractament inicial amb intenció radical.
5. Seguiment mínim de 3 anys.

Així doncs, es van analitzar dues cohorts de pacients diferenciades en funció del tipus de tractament realitzat:

- **120 pacients** tractats amb radioteràpia (RT), incloent-hi pacients tractats amb quimio-radioteràpia (QT-RT).
- **110 pacients** tractats amb cirurgia, incloent-hi pacients que van seguir un tractament adjuvant amb radioteràpia o quimio-radioteràpia.

### **1.1. Cohort de pacients tractats amb radioteràpia (RT)**

Es van analitzar un total de 120 pacients que van rebre tractament amb RT o QT-RT, sense cirurgia prèvia. Cap pacient havia rebut un tractament oncològic previ.

En general, el tractament va consistir en radioteràpia als pacients amb estadis inicials (I-II) i quimio-radioteràpia als estadis més avançats (III-IV), en funció de les característiques clíniques dels pacients. Les característiques clinicopatològiques dels pacients inclosos en aquesta cohort es mostren a la taula 6.

La planificació del tractament es va realitzar amb una tècnica de radioteràpia conformada 3D fins a l'any 2010 i d'IMRT (radioteràpia d'intensitat modulada, de l'anglès "Intensity-Modulated Radiotherapy") a partir de l'any 2011, amb l'ús d'un accelerador lineal com a font d'irradiació. El tractament amb radioteràpia va consistir en l'administració de 70 Gy al tumor primari i als ganglis morfològicament o metabòlicament positius, i 50 Gy a les àrees ganglionars amb risc de malaltia microscòpica, d'acord amb les guies de consens internacionals. La majoria dels pacients van ser tractats amb un fraccionament estàndard (2 Gy/fracció, 1 fracció/dia,

5 dies/setmana). Onze pacients van ser tractats en règim d'hiperfraccionament (1,2 Gy/fracció, 2 fraccions/dia, cinc dies/setmana).

Dels 120 pacients, 54 pacients (45%) van rebre tractament només amb radioteràpia i 66 pacients (55%) amb quimio-radioteràpia. El tractament de quimioteràpia va consistir en l'administració de dos a tres cicles de cisplatí en dosis de 100 mg/m<sup>2</sup> cada vint-i-un dies (n=58) o carboplatí administrat de forma setmanal en dosis d'1,5 AUC (n=8), ambdós iniciats de forma concomitant amb la radioteràpia. Noranta-un pacients van començar el tractament amb quimioteràpia d'inducció. Es va incloure un buidament cervical dins de l'esquema de tractament inicial en 16 pacients que havien estat tractats amb quimio-radioteràpia.

**Taula 6.** Característiques clinicopatològiques dels pacients tractats amb radioteràpia inclosos en l'estudi.

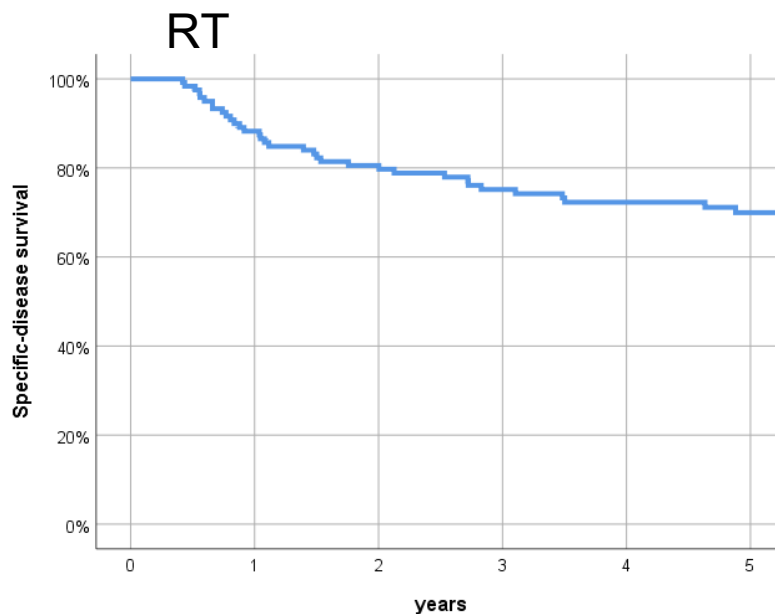
		<b>N (%)</b>
<b>Estat</b>	Mitja 62,59 anys (rang 38,1 – 98,7)	
<b>Gènere</b>	Home	106 (88,3%)
	Dona	14 (11,7%)
<b>Hàbits tòxics</b>	No	13 (10,8%)
	Moderat	17 (14,2%)
	Sever	90 (75,0%)
<b>Localització</b>	Cavitat oral	6 (5,0%)
	Orofaringe	50 (41,7%)
	Hipofaringe	15 (12,5%)
	Laringe	49 (40,8%)
<b>Extensió local</b>	cT1	23 (19,2%)
	cT2	47 (39,2%)
	cT3	35 (29,2%)
	cT4	15 (12,5%)
<b>Extensió regional</b>	cN0	71 (59,2%)
	cN1	14 (11,7%)
	cN2	33 (27,5%)
	cN3	2 (1,7%)
<b>Grau histològic</b>	Ben diferenciat	11 (9,2%)

	Moderadament diferenciat	97 (80,8%)
	Mal diferenciat	12 (10,0%)
<b>Tractament</b>	Radioteràpia	54 (45,0%)
	Quimio-radioteràpia	66 (55,0%)

El període mitjà de seguiment dels pacients va ser de 5,37 anys (desviació estàndard 3,85 anys). Durant el període de seguiment, 39 pacients (32,5%) van presentar recidiva local de la malaltia (rT), 14 pacients (11,7%) recidiva regional (rN) i 15 pacients (12,5%) aparició de metàstasi a distància (rM). Fins al moment del tancament de l'estudi, 35 pacients (29,2%) havien mort a conseqüència de l'evolució del tumor.

La supervivència lliure de recidiva local a 5 anys va ser del 66,3% (IC 95%: 57,7-74,9%); la supervivència lliure de recidiva regional va ser del 87,7% (IC 95%: 81,6-93,8%) i la supervivència lliure de metàstasi a distància del 86,4% (IC 95%: 79,9-92,9%).

La supervivència específica a 5 anys va ser del 70,0% (IC 95%: 61,4-78,6%) (figura 40). La supervivència global a 5 anys, incloent-hi totes les causes de mort, va ser del 55,2% (IC 95%: 46,2-64,2%).



**Figura 40.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència específica a 5 anys dels pacients tractats amb radioteràpia.

## 1.2. Cohort de pacients tractats amb cirurgia

Es van analitzar un total de 110 pacients que van rebre un tractament inicial amb cirurgia, complementada amb radioteràpia adjuvant en 46 pacients (41,8%) i quimio-radioteràpia adjuvant en 26 pacients (23,7%). Les característiques clinicopatològiques dels pacients inclosos en aquesta part de l'estudi es detallen a la taula 7. Els diferents procediments quirúrgics realitzats es detallen a la taula 8.

**Taula 7.** Característiques clinicopatològiques dels pacients tractats amb cirurgia inclosos en l'estudi.

		<b>N (%)</b>
<b>Edat mitja</b>	(desviació estàndard) anys	65,8 (13,4)
<b>Gènere</b>	Home	90 (81,8%)
	Dona	20 (18,2%)
<b>Hàbits tòxics</b>	No	14 (12,7%)
	Moderat	20 (18,2%)
	Sever	76 (69,1%)
<b>Localització</b>	Cavitat oral	39 (35,5%)
	Orofaringe	6 (5,4%)
	Hipofaringe	10 (9,1%)
	Laringe	55 (50,0%)
<b>Categoria pT</b>	pT1-2	20 (18,2%)
	pT3-4	90 (81,8%)
<b>Categoria pN</b>	pN0	46 (41,8%)
	pN1	17 (15,5%)
	pN2	23 (20,9%)
	pN3	24 (21,8%)
<b>Grau histològic</b>	Ben diferenciat	8 (7,3%)
	Moderadament diferenciat	93 (84,5%)
	Mal diferenciat	9 (8,2%)
<b>Marges resecció</b>	Negatius	88 (80%)
	Propers	15 (13,6%)
	Positius	7 (6,4%)
<b>Tractament adjuvant</b>	No	38 (34,5%)

	Radioteràpia	46 (41,8%)
	Quimio-radioteràpia	26 (23,7%)

**Taula 8.** Procediments quirúrgics realitzats en els pacients tractats amb cirurgia.

Laringectomia total	40
Laringo-faringectomia	16
Laringectomia supraglòtica/supracricoidea	9
Hemiglosectomia/pelviglosectomia	18
Mandibulectomia	20
Bucofaringectomia	5
Palatectomia	2

En tots els casos el tractament quirúrgic va incloure un buidament cervical de manera simultània a l'exèresi del tumor primari, llevat d'una pacient d'edat avançada amb un tumor localitzat a la mucosa jugal que es va tractar només amb cirurgia del tumor primari.

Les indicacions de tractament adjuvant es van mantenir de manera estable al llarg del període de seguiment. En general, es van considerar candidats a tractament adjuvant els pacients amb: tumors localment avançats (pT3-4); marges de resecció positius o propers; factors histopatològics de mal pronòstic en l'estudi de la peça de resecció com ara invasió limfovascular o perineural, presència de dues o més metàstasis ganglionars o metàstasi ganglionar amb trencament capsular.

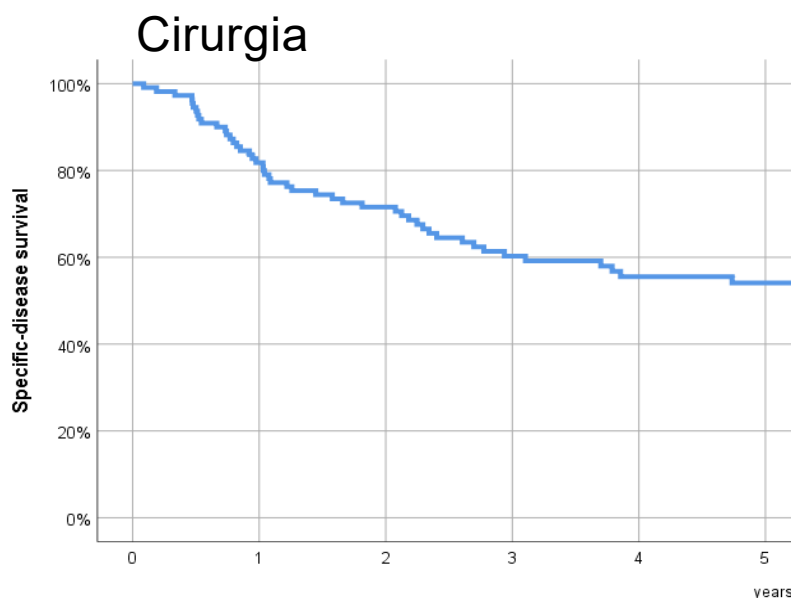
El tractament de radioteràpia postoperatòria va consistir, habitualment, en l'administració de 60 Gy sobre les zones de risc, assolint una dosi de 70 Gy en els casos amb marges de resecció positius o amb trencament capsular ganglionar. La planificació del tractament es va realitzar amb una tècnica de radioteràpia conformada 3D fins a l'any 2010 i d'IMRT a partir de l'any 2011, utilitzant un accelerador lineal com a font d'irradiació. Els pacients van ser tractats amb un fraccionament estàndard (2 Gy/fracció, 1 fracció/dia, 5 dies/setmana). En funció de l'edat, de les característiques del pacient i de la indicació del tractament adjuvant, la radioteràpia es va complementar amb quimioteràpia concomitant amb l'administració de dos a tres cicles de cisplatí en dosis de 100 mg/m<sup>2</sup> cada vint-i-un dies (n=21) o carboplatí setmanal a dosi 1,5 AUC (n=5).

Un total de 16 pacients (14,5%) van iniciar la seqüència terapèutica amb quimioteràpia d'inducció, que va consistir en l'administració de tres cicles de cisplatí-5 fluorouracil (14 pacients) o cisplatí-5-fluorouracil-docetaxel (2 pacients).

El període mitjà de seguiment dels pacients inclosos en aquesta part de l'estudi fou de 4,52 anys (desviació estàndard 3,94 anys). Durant el període de seguiment, 20 pacients (18,2%) van presentar recidiva local de la malaltia (rT), 15 pacients (13,6%) recidiva regional (rN) i 31 pacients (28,2%) van desenvolupar metàstasis a distància (rM). Fins al moment del tancament de l'estudi, 48 pacients (43,6%) havien mort a conseqüència de l'evolució del tumor.

La supervivència lliure de recidiva local a 5 anys va ser del 80,7% (IC 95%: 73,6-87,8%); la supervivència lliure de recidiva regional va ser del 85,1% (IC 95%: 78,0-92,2%) i la supervivència lliure de metàstasis a distància del 67,2% (IC 95%: 57,6-76,8%).

La figura 41 mostra la supervivència específica a 5 anys, que va ser del 54,1% (IC 95%: 44,3-63,9%). La supervivència global a 5 anys, incloent-hi totes les causes de mort, va ser del 35,9% (IC 95%: 26,9-44,9%).



**Figura 41.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència específica a 5 anys en el pacients tractats amb cirurgia.



## 2. Determinació de l'expressió transcripcional dels gens inclosos en l'estudi

Les mostres de biòpsia obtingudes de cada pacient es van incloure immediatament en RNA-làter (Quiagen GmbH, Hilden, Alemanya) per a evitar la degradació de l'ARNm, i es van emmagatzemar a -80 °C fins al seu processament. L'ARN total es va extreure utilitzant Trizol (Invitrogen, Carlsbad, USA) d'acord amb les instruccions del fabricant.

Es va obtenir l'ADNc per transcripció inversa d'1 µg d'ARN amb High-Capacity Cdna Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) i es va avaluar l'expressió transcripcional dels gens relacionats amb el metabolisme de la glucosa - amb la Beta-actina com a control endogen- amb la tècnica de RT-PCR en un ABI Prism 7000 mitjançant assajos validats predissenyats (TaqMan Expression Assays; Applied Biosystems).

La taula 9 mostra els gens analitzats a cadascuna de les cohorts de tractament incloses en l'estudi.

**Taula 9.** Gens analitzats a cadascuna de les cohorts de l'estudi.

Gen	Cohort radioteràpia n=120	Cohort cirurgia n=110
SLC2A1		+
SLC2A3	+	+
HK1	+	+
PFKL		+
PDHA1		+
PDHB	+	+
DLAT	+	+
DLD		+
PDHX		+
PDK1		+
LDHA		+
LDHB		+
SLC16A3	+	+
SLC16A7		+
SDHA	+	+
SDHB		+
SDHC		+
SUCNR-1	+	+
HIF1A		+

### 3. Anàlisi immunohistoquímica de l'expressió de LDHA

En el grup de pacients tractats amb cirurgia es va dur a terme una anàlisi de la correlació entre l'expressió transcripcional i l'expressió immunohistoquímica de LDHA.

Per fer-ho es van fer servir mostres de teixit tumoral fixades en formaldehid al 10% i incloses en blocs de parafina de 14 pacients amb CECC que corresponien a set mostres amb una expressió transcripcional elevada de LDHA i set mostres amb una expressió baixa de LDHA.

A continuació es van tallar seccions de 2 µm de gruix i es van tenyir amb Hematoxilina i Eosina per confirmar la presència de teixit representatiu vàlid per a l'estudi. Per a l'anàlisi immunohistoquímica es van fer talls de 4 µm de gruix. Cada preparació (vidre o lamineta) es va desparafinar en xilè durant 20 minuts, es va rehidratar amb una sèrie d'etanol decreixent i es va rentar amb solució salina tamponada amb fosfat. A continuació, les seccions es van escalfar a 96 °C durant 20 minuts per a la recuperació antigènica i després es van incubar durant 30 minuts amb un anticòs monoclonal primari contra l'antigen LDHA (Clone E-9, Santa Cruz Biotechnology, Ref sc-137243), a una dilució de 1:500. La immunodetecció automàtica es va realitzar amb el mètode END-VISION™ High FLEX (DAKO, Carpenteria, CA, EUA) fent servir el cromogen 3,3'-diaminobenzidina com a substrat, seguit d'una contratacció amb hematoxilina. Seguidament, les preparacions obtingudes es van escanejar amb Pannoramic 300 Flash III DX (3D Histech, Hongria) amb un objectiu de 20x. Posteriorment, aquestes preparacions digitalitzades van ser examinades per dos observadors a doble cec i es va catalogar la localització de la tinció de LDHA (cèl·lula tumoral versus cèl·lula estromal). La intensitat i homogeneïtat (focal/extensa/difusa) de la immunoexpressió de la proteïna en les cèl·lules tumorals i en les cèl·lules estromals es va puntuar semiquantitativament com 0+, 1+, 2+, 3+ i 4+. Es va assignar la puntuació com segueix (Taula 10):

**Taula 10.** Puntuació per a l'avaluació de l'expressió immunohistoquímica de LDHA.

0+:	absència d'expressió
1+:	expressió feble i heterogènia o focal
2+:	expressió moderada i focal
3+:	expressió moderada i extensa
4+:	expressió intensa i difusa

Les puntuacions 0+, 1+ i 2+ es van considerar com a expressió baixa i les puntuacions 3+ i 4+ es van considerar com a expressió elevada.

#### 4. The Cancer Genome Atlas

Per comparar els nivells d'expressió de DLAT i LDHA entre les mostres de mucosa sana i les mostres de tumor es van analitzar les dades incloses en el "The Cancer Genome Atlas" (TCGA). El TCGA és una base de dades d'accés lliure que ofereix informació relacionada amb l'expressió transcripcional del genoma de tumors de diferents localitzacions.

El TCGA inclou dades relatives a l'expressió transcripcional de mostres aparellades de tumor i de mucosa sana de 43 pacients amb CECC. Les característiques dels pacients dels quals es va disposar d'informació de mostres de tumor i de mucosa sana es mostren a la taula 11.

**Taula 11.** Distribució dels pacients en els que es va estudiar l'expressió transcripcional de DLAT i LDHA en mostra de tumor i de mucosa sana (TCGA).

		<b>N (%)</b>
<b>Edat mitjana</b> (desviació estàndard /anys)		62,6 (13,7)
<b>Gènere</b>	Home	29 (67,4%)
	Dona	14 (32,6%)
<b>Tabaquisme</b>	No	11 (25,6%)
	Ex-fumador	20 (46,5%)
	Fumador actiu	12 (27,8%)
<b>Localització</b>	Cavitat oral	30 (69,7%)
	Orofaringe	2 (4,7%)
	Laringe	11 (25,6%)
<b>Categoria cT</b>	cT1-2	19 (44,2%)
	cT3-4	24 (55,8%)
<b>Categoria cN</b>	cN0	33 (76,7%)
	cN+	10 (23,3%)

Es va procedir a extreure de la base de dades els valors de l'expressió transcripcional corresponents a DLAT i LDHA, tant de les mostres de tumor com de les mostres de mucosa sana.

## 5. Anàlisi estadística de les dades

Els valors de l'expressió transcripcional dels diferents gens analitzats i les dades corresponents a la immunopositivitat en la valoració immunohistoquímica de LDHA no van seguir una distribució normal (test de Kolmogorov-Smirnov  $p < 0,05$ ), així que els valors de tendència central es van expressar en forma de mediana i en les comparacions entre variables qualitatives i contínues es van utilitzar els tests no paramètrics U de Mann-Whitney i H de Kruskal-Wallis.

En l'anàlisi de l'existència de relació entre variables qualitatives es van emprar els tests de Chi-quadrat o el test exacte de Fisher, en funció de les condicions d'aplicació.

Els valors transcripcionals dels resultats obtinguts al TCGA sí que van complir els criteris de normalitat, de manera que les comparacions es van dur a terme fent servir l'Student-t test. A l'estudi de correlacions es va utilitzar el test de Pearson.

Es van fer servir corbes ROC (de l'anglès "Receiving-Operating-Characteristic") i l'àrea sota la corba (AUC, de l'anglès "Area Under Curve") per valorar i comparar la capacitat pronòstica dels valors transcripcionals dels diferents gens analitzats.

Per a la valoració de l'existència de relació entre els valors de l'expressió transcripcional de cada gen i el control local de la malaltia es van emprar arbres de classificació i regressió (CRT, de l'anglès "Classification and Regression Tree"). Els punts de tall i nodes terminals específics aconseguits amb aquesta anàlisi de partició recursiva (RPA, de l'anglès "Recursive Partition Analysis") es van fer servir per classificar els pacients en funció del risc de recidiva local.

Els càlculs de supervivència es van fer amb el mètode de Kaplan-Meier, usant el test log-rank en la comparació de les corbes de supervivència. Per a l'anàlisi multivariant es va utilitzar el model de riscos proporcionals de Cox.

L'anàlisi estadística es va fer amb la versió 17.0 del programari SPSS per a Windows (de l'anglès "Statistical Package for the Social Sciences") (SPS, Inc., Chicago, IL, USA). En totes les anàlisis es va considerar estadísticament significativa una  $p$  amb un valor inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## 6. Suport Financer

Aquesta recerca ha estat finançada amb subvencions del Pla Estatal d'I+D+I de l'Institut de Salut Carlos III (FIS PI18/0844 a FX A-J, i FIS PI19/01661 a XL). Fons Europeu de Desenvolupament Regional (FEDER), "A Way to Build Europe".



## V. RESULTATS

---

## V. RESULTATS

### 1. Resultats de la cohort de radioteràpia

En aquesta part de l'estudi es van analitzar un total de 120 pacients tractats amb radioteràpia, incloent-hi pacients tractats amb radioteràpia exclusiva (n=54) i amb quimio-radioteràpia (n=66).

En primer lloc, es va dur a terme una anàlisi de la relació entre els nivells d'expressió transcripcional dels diferents gens analitzats i variables com el sexe, l'antecedent de consum de tòxics, la localització del tumor primari, l'extensió local (cT) i regional (cN) del tumor o l'estat del VPH (virus del papil·loma humà) en el cas dels pacients amb carcinomes d'orofaringe.

Les taules següents (taules 12-15) mostren la mediana de l'expressió transcripcional de cadascun dels gens estudiats en funció de les diferents variables clíniques analitzades. S'assenyalen en vermell aquelles determinacions en què van aparèixer diferències estadísticament significatives.

**Taula 12.** Expressió transcripcional d'HK1 i SUCNR1 segons les diferents variables clíniques.

		<b>HK1</b>	<b>p</b>	<b>SUCNR1</b>	<b>p</b>
<b>Gènere</b>	Home	1,80	0,373	0,85	0,086
	Dona	2,24		1,35	
<b>Tòxics</b>	No	1,97	0,537	2,40	0,073
	Moderat	1,75		0,87	
	Sever	1,96		0,83	
<b>Localització</b>	Cavitat oral	1,84	0,279	1,33	0,136
	Orofaringe	1,75		0,71	
	Hipofaringe	1,67		1,49	
	Laringe	2,19		0,84	
<b>cT</b>	cT1-2	2,09	0,766	0,86	0,970
	cT3-4	1,76		0,93	
<b>cN</b>	cN0	1,97	0,277	0,87	0,599
	cN+	1,69		1,10	
<b>VPH</b>	Negatiu	1,69	0,815	0,63	<b>0,016</b>
	Positiu	1,65		1,20	

**Taula 13.** Expressió transcripcional de SLC2A3 i SLC16A3 segons les diferents variables clíniques.

		<b>SLC2A3</b>	<b>p</b>	<b>SLC16A3</b>	<b>p</b>
<b>Gènere</b>	Home	15,56	<b>0,011</b>	44,15	0,177
	Dona	35,18		58,63	
<b>Tòxics</b>	No	28,56	0,425	53,85	0,109
	Moderat	12,61		40,07	
	Sever	18,59		46,48	
<b>Localització</b>	Cavitat oral	43,11	0,288	75,68	0,211
	Orofaringe	15,73		41,70	
	Hipofaringe	16,72		58,94	
	Laringe	17,69		43,78	
<b>cT</b>	cT1-2	15,40	0,066	46,48	0,132
	cT3-4	22,15		44,55	
<b>cN</b>	cN0	17,69	0,723	43,78	0,723
	cN+	18,51		47,69	
<b>VPH</b>	Negatiu	15,64	0,223	43,52	0,883
	Positiu	10,48		37,05	

**Taula 14.** Expressió transcripcional de SDHA i DLAT segons les diferents variables clíniques.

		<b>SDHA</b>	<b>p</b>	<b>DLAT</b>	<b>p</b>
<b>Gènere</b>	Home	32,15	0,689	13,89	0,725
	Dona	39,14		16,05	
<b>Tòxics</b>	No	32,50	0,867	14,62	0,761
	Moderat	32,23		13,87	
	Sever	32,15		14,48	
<b>Localització</b>	Cavitat oral	29,11	0,999	18,62	<b>0,018</b>
	Orofaringe	32,20		12,63	
	Hipofaringe	32,50		11,32	
	Laringe	32,13		18,00	
<b>cT</b>	cT1-2	30,57	0,551	15,57	0,225
	cT3-4	36,00		13,39	
<b>cN</b>	cN0	31,29	0,434	15,04	0,112
	cN+	33,13		13,52	
<b>VPH</b>	Negatiu	32,18	0,698	13,57	0,779
	Positiu	34,62		12,56	



**Taula 15.** Expressió transcripcional de PDHB segons les diferents variables clíniques.

		<b>PDHB</b>	<b>p</b>
<b>Gènere</b>	Home	1,46	0,391
	Dona	1,91	
<b>Tòxics</b>	No	2,37	0,122
	Moderat	1,17	
	Sever	1,54	
<b>Localització</b>	Cavitat oral	2,91	<b>0,020</b>
	Orofaringe	1,51	
	Hipofaringe	1,07	
	Laringe	1,93	
<b>cT</b>	cT1-2	1,54	0,782
	cT3-4	1,56	
<b>cN</b>	cN0	1,56	0,723
	cN+	1,55	
<b>VPH</b>	Negatiu	1,33	0,288
	Positiu	2,37	

Es van observar diferències significatives en funció del gènere en l'expressió de SLC2A3 i en funció de la localització del tumor primari en l'expressió de DLAT i PDHB. L'expressió de SLC2A3 va ser superior per a les dones (taula 13). Els pacients amb tumors localitzats a cavitat oral o laringe van tenir uns nivells d'expressió de DLAT superiors als dels pacients amb tumors d'orofaringe o hipofaringe (taula 14). En el cas de PDHB, els pacients amb tumors localitzats a cavitat oral van tenir uns nivells d'expressió superiors (taula 15).

En el cas dels pacients amb carcinomes d'orofaringe, l'expressió de SUCNR1 va ser superior per als pacients amb tumors VPH-positius (taula 12).

No van aparèixer diferències significatives en els valors d'expressió dels gens analitzats segons l'antecedent en el consum de tòxics, l'extensió local (cT) o l'extensió regional (cN) del tumor.

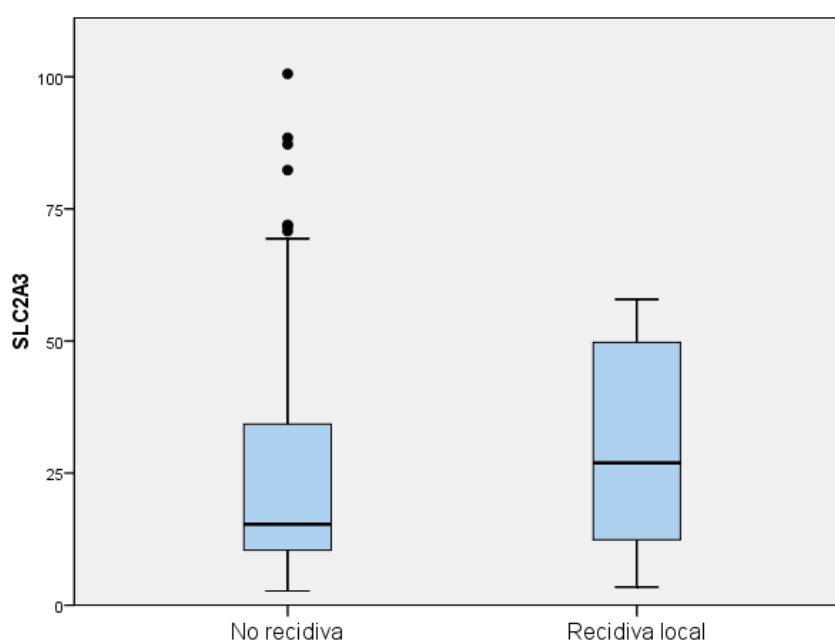
A continuació es van analitzar els nivells d'expressió dels diferents gens en funció del control local de la malaltia (és a dir, si havia aparegut recidiva local o no) després del tractament amb radioteràpia o quimio-radioteràpia (taula 16).

**Taula 16.** Expressió transcripcional dels gens estudiats en funció del control local de la malaltia en els pacients tractats amb RT o QT-RT.

	No rT	rT	p
HK1	1,79	2,14	0,154
SUCNR1	0,85	0,93	0,525
SLC2A3	15,32	26,95	<b>0,043</b>
SLC 16A3	42,24	52,50	0,217
SDHA	32,18	34,62	0,085
DLAT	14,30	13,60	0,485
PDHB	1,43	1,85	0,202

\*No rT: no recidiva tumoral local; rT: recidiva tumoral local

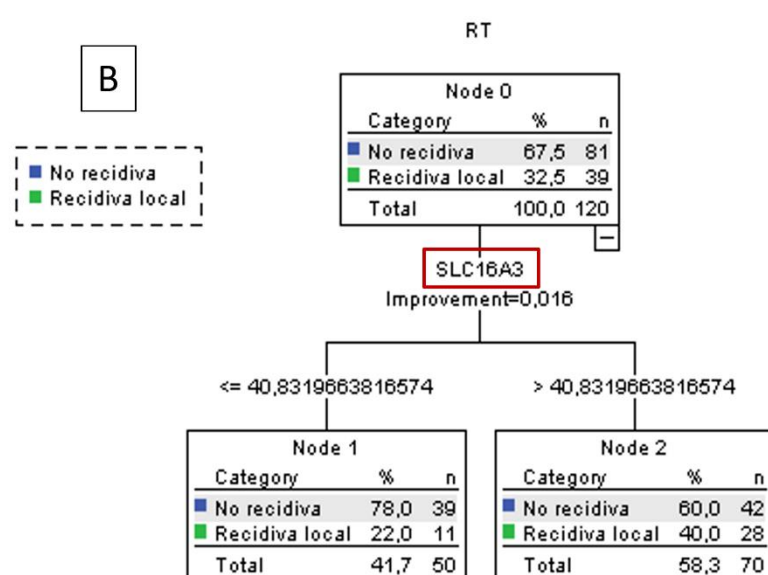
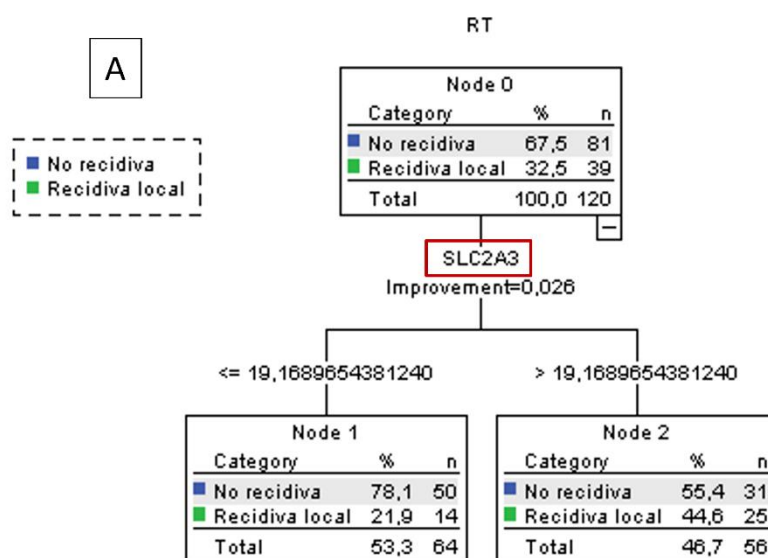
Van aparèixer diferències significatives en el valor de l'expressió transcripcional de SLC2A3 segons el control local de la malaltia després del tractament amb radioteràpia. Els pacients amb recidiva local del tumor (rT) van mostrar uns valors d'expressió transcripcional de SLC2A3 significativament superiors als dels pacients que van aconseguir un control local del tumor després del tractament amb radioteràpia ( $p=0,043$ ). La figura 42 mostra la distribució dels valors d'expressió de SLC2A3 en funció del control local del tumor.

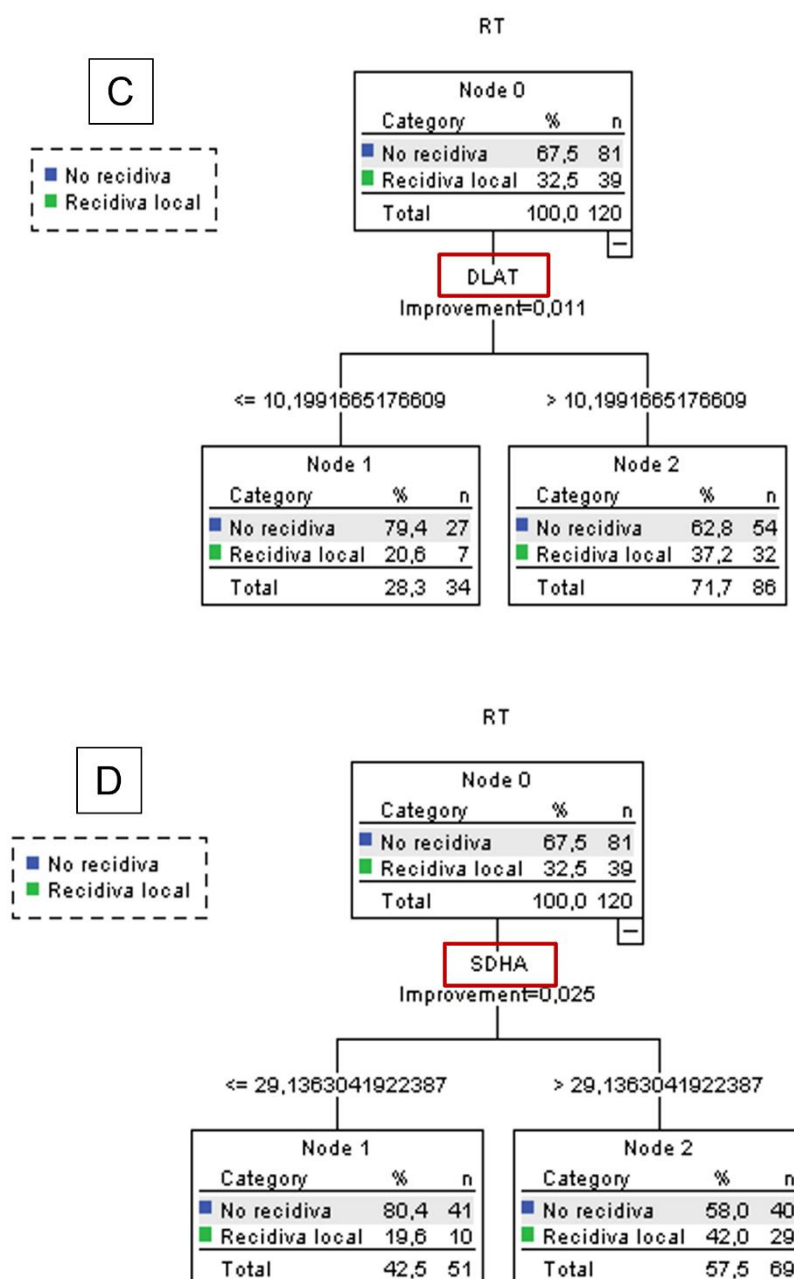


**Figura 42.** Distribució dels valors d'expressió de SLC2A3 en funció del control local del tumor.

Al mateix temps, els pacients amb recidiva local (rT) van mostrar una tendència a tenir una expressió de SDHA més elevada, però sense que les diferències arribessin a la significació estadística ( $p=0,085$ )

Tot seguit, per mitjà d'una anàlisi de partició recursiva (RPA, de l'anglès "Recursive Partition Analysis"), es va determinar la capacitat de l'expressió transcripcional de cadascun dels gens analitzats de discriminar l'aparició de recidiva local després del tractament amb radioteràpia. Les determinacions que van comptar amb capacitat pronòstica en relació amb el control local de la malaltia van ser les corresponents als gens SLC2A3, SLC16A3, DLAT i SDHA, tal com mostren els arbres de classificació següents (figura 43 A-D).





**Figura 43.** Arbres de classificació i regressió obtinguts amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basats en l'expressió dels gens SLC2A3 (A), SLC16A3 (B), DLAT (C) i SDHA (D).

Els valors de l'expressió transcripcional de HK1, SUCNR1 i PDHB no van tenir capacitat pronòstica en relació amb el control local de la malaltia després del tractament amb radioteràpia.

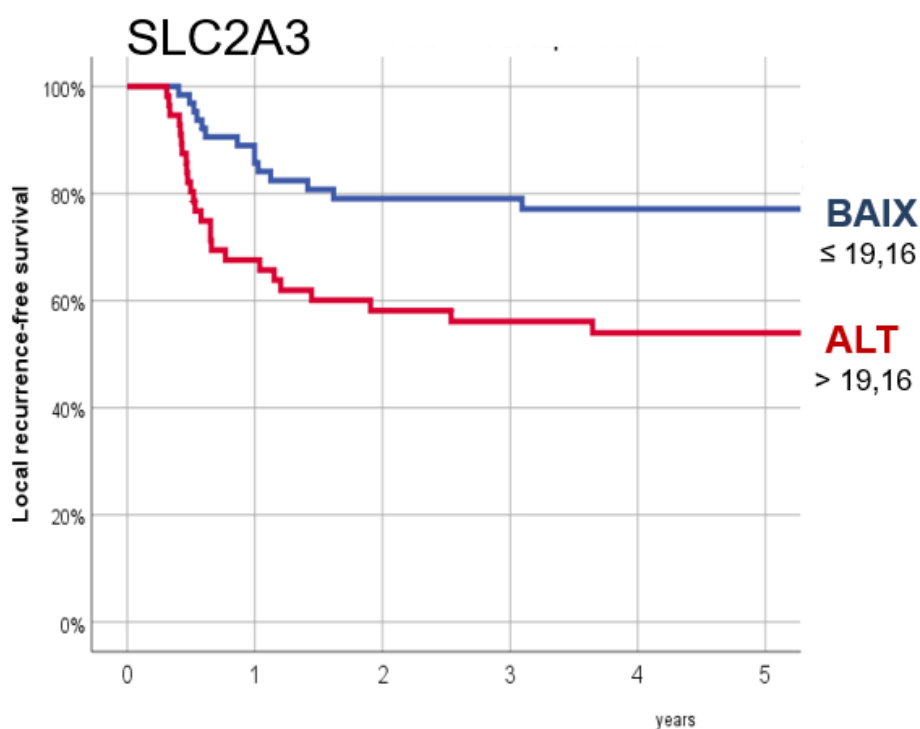
La taula següent (taula 17) mostra la distribució dels pacients d'acord amb els punts de tall obtinguts amb els arbres de classificació i regressió (CRT, de l'anglès "Classification and Regression Tree") corresponents a cadascun dels gens que es

van relacionar amb el control local de la malaltia, així com la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys per a cadascuna de les categories obtingudes amb aquests punts de tall.

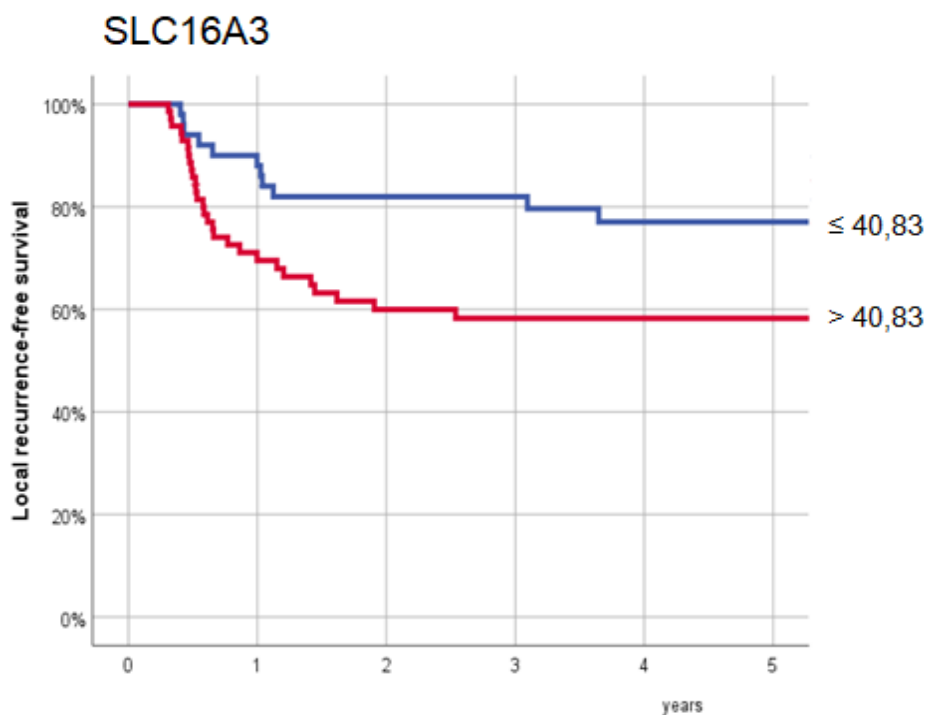
**Taula 17.** Distribució dels pacients segons els punts de tall dels CRT en el control local i la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys.

	Punts de tall	N	Sup 5 anys lliure rT (IC 95%)	p
<b>SLC2A3</b>	Baix ( $\leq 19.16$ )	64	77,2% (66,6-87,8%)	0,005
	Alt ( $> 19.16$ )	56	54,0% (40,7-67,3%)	
<b>SLC16A3</b>	Baix ( $\leq 40.83$ )	50	77,0% (65,0-89,0%)	0,025
	Alt ( $> 40.83$ )	70	5,2% (46,2-70,2%)	
<b>DLAT</b>	Baix ( $\leq 10.19$ )	34	79,0% (65,1-92,9%)	0,100
	Alt ( $> 10.19$ )	86	61,4% (50,8-72,0%)	
<b>SDHA</b>	Baix ( $\leq 29.13$ )	51	79,5% (68,1-90,9%)	0,009
	Alt ( $> 29.13$ )	69	56,5% (44,58-68,5%)	

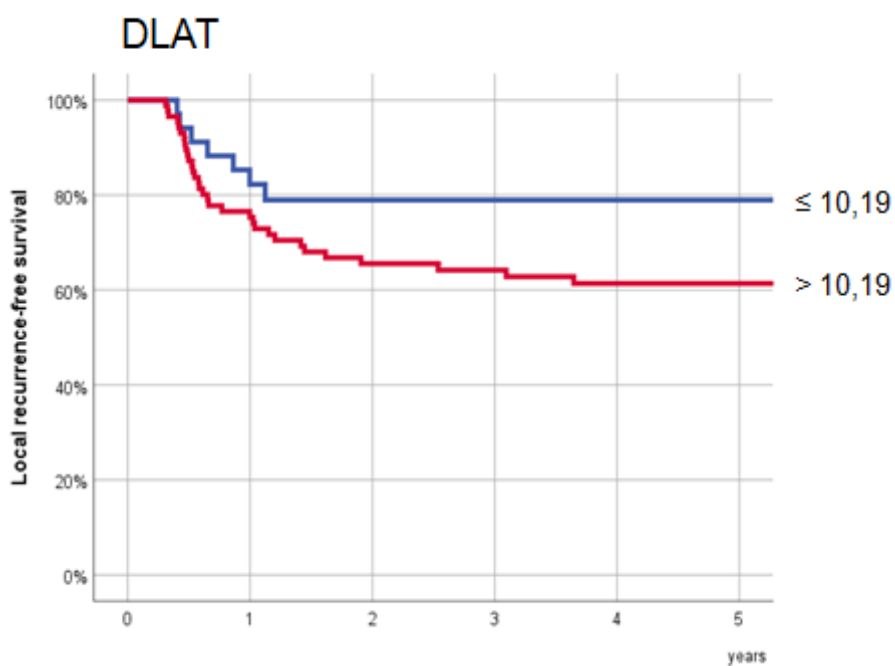
Les figures 44-47 mostren les corbes de supervivència lliure de recidiva local a 5 anys per a cadascuna de les categories obtingudes en l'anàlisi de partició recursiva.



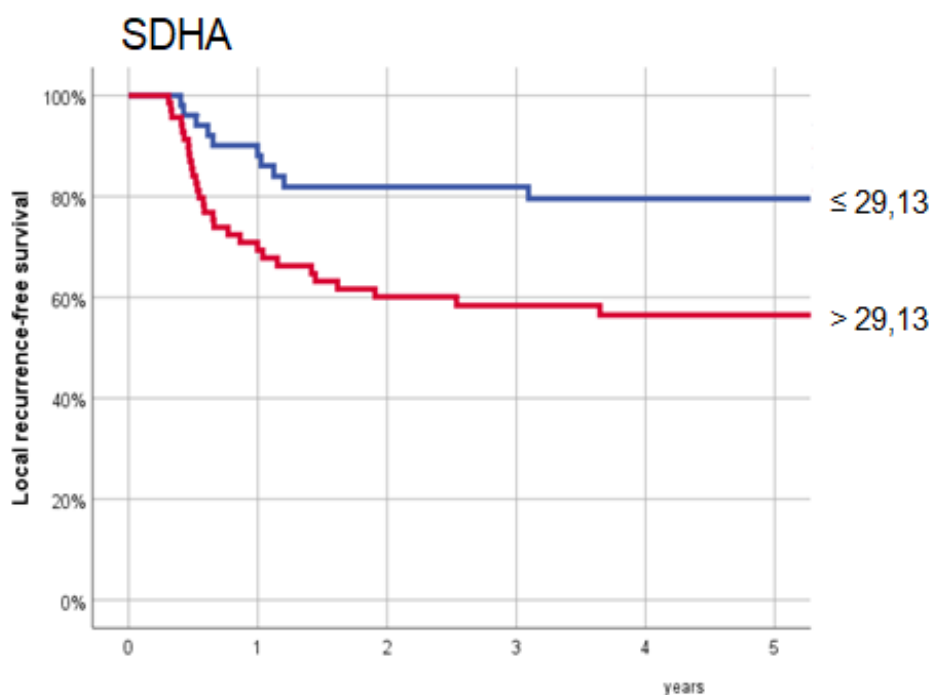
**Figura 44.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de SLC2A3 ( $p = 0,005$ ).



**Figura 45.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de SLC16A3 ( $p = 0,025$ ).



**Figura 46.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de DLAT ( $p = 0,100$ ).



**Figura 47.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de SDHA ( $p = 0,009$ ).

Per als quatre gens amb capacitat pronòstica, els nivells d'expressió transcripcional alts (en vermell) es van associar a una pitjor supervivència lliure de recidiva local.

En analitzar conjuntament els valors d'expressió transcripcional dels diferents gens cal tenir en compte l'existència d'una correlació altament significativa entre alguns d'ells. La taula 18 mostra els nivells de correlació en l'expressió transcripcional existent entre els gens estudiats i s'assenyalen en vermell aquells amb un coeficient de correlació de Pearson per sobre de 0,5.

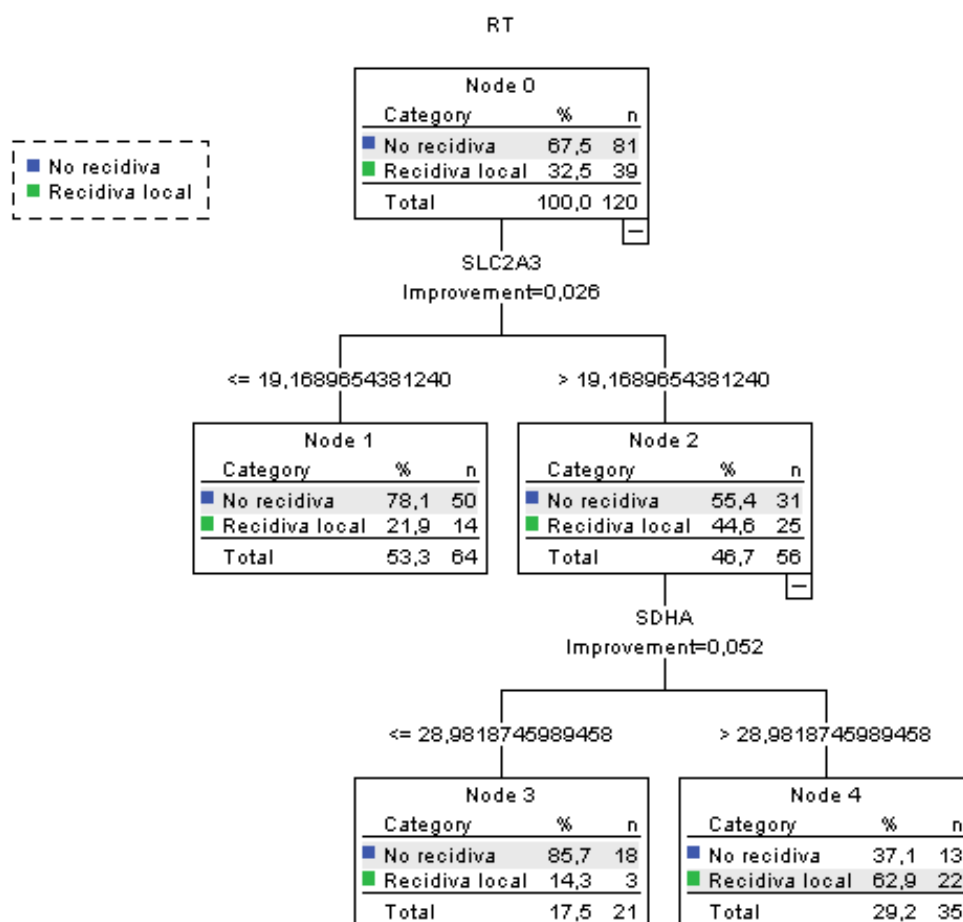
	SUCNR-1	SLC2A3	DLAT	SDHA	SLC16A3	PDHB
HK1	<b>0,577</b>	0,316	<b>0,760</b>	0,460	0,104	<b>0,725</b>
	0,000	0,000	0,000	0,000	0,257	0,000
	120	120	120	120	120	120
SUCNR-1		0,297	<b>0,563</b>	0,288	0,080	<b>0,570</b>
		0,001	0,000	0,001	0,385	0,000
		120	120	120	120	120
SLC2A3			0,291	0,161	0,163	0,435**
			0,001	0,079	0,076	0,000
			120	120	120	120
DLAT				<b>0,535</b>	0,057	<b>0,681</b>
				0,000	0,534	0,000
				120	120	120
SDHA					<b>0,504</b>	0,381
					0,000	0,000
					120	120
SLC16A3						0,157
						0,087
						120

Finalment, en l'anàlisi de partició recursiva (RPA) es van incloure de manera conjunta els valors d'expressió transcripcional d'aquells gens que van comptar amb capacitat pronòstica en relació amb el control local de la malaltia després del tractament amb radioteràpia.

El model de partició recursiva va classificar els pacients en tres categories, amb una primera partició dependent de l'expressió de l'SLC2A3 i una segona partició per als pacients amb una expressió elevada de SLC2A3 dependent de l'expressió de SDHA. Es va obtenir un arbre de classificació amb tres nodes terminals (figura 48): pacients amb expressió de SLC2A3 baixa (n=64, percentatge de recidiva local 21,9%); pacients amb expressió elevada de SLC2A3 i baixa de SDHA (n=21, percentatge de recidiva local 14,3%) i pacients amb expressió elevada de SLC2A3 i de SDHA (n=35, percentatge de recidiva local 62,9%). De manera conjunta, aquestes variables van



discriminar adequadament el 75,0% dels pacients d'acord amb el control local de la malaltia aconseguit després del tractament amb radioteràpia.

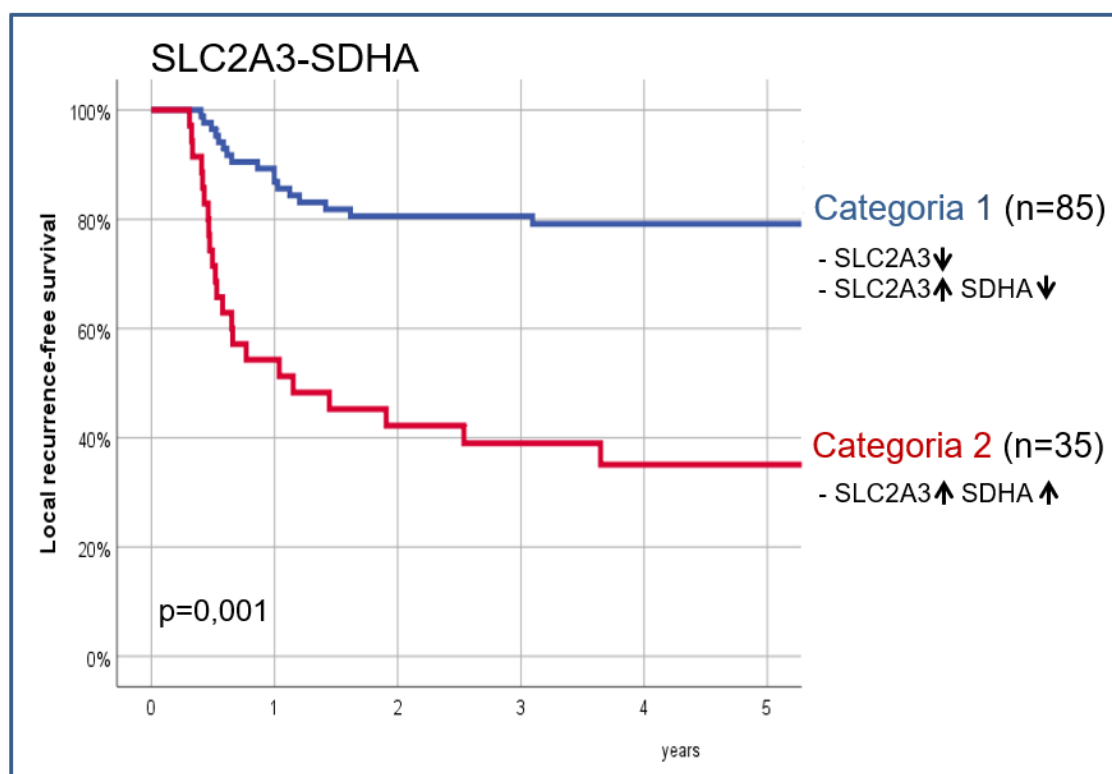


**Figura 48.** Arbre de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basat en l'expressió dels gens SLC2A3 i SDHA.

A continuació es va procedir a agrupar els dos nodes terminals amb els percentatges més baixos de recidiva local i es van classificar els pacients en dues categories:

- **Categoria 1:** pacients amb expressió de baixa de SLC2A3 i pacients amb expressió elevada de SLC2A3 i baixa de SDHA (n= 85, percentatge de recidiva local 20%).
- **Categoria 2:** pacients amb expressió elevada de SLC2A3 i expressió elevada de SDHA (n=35, percentatge de recidiva local 62,9%).

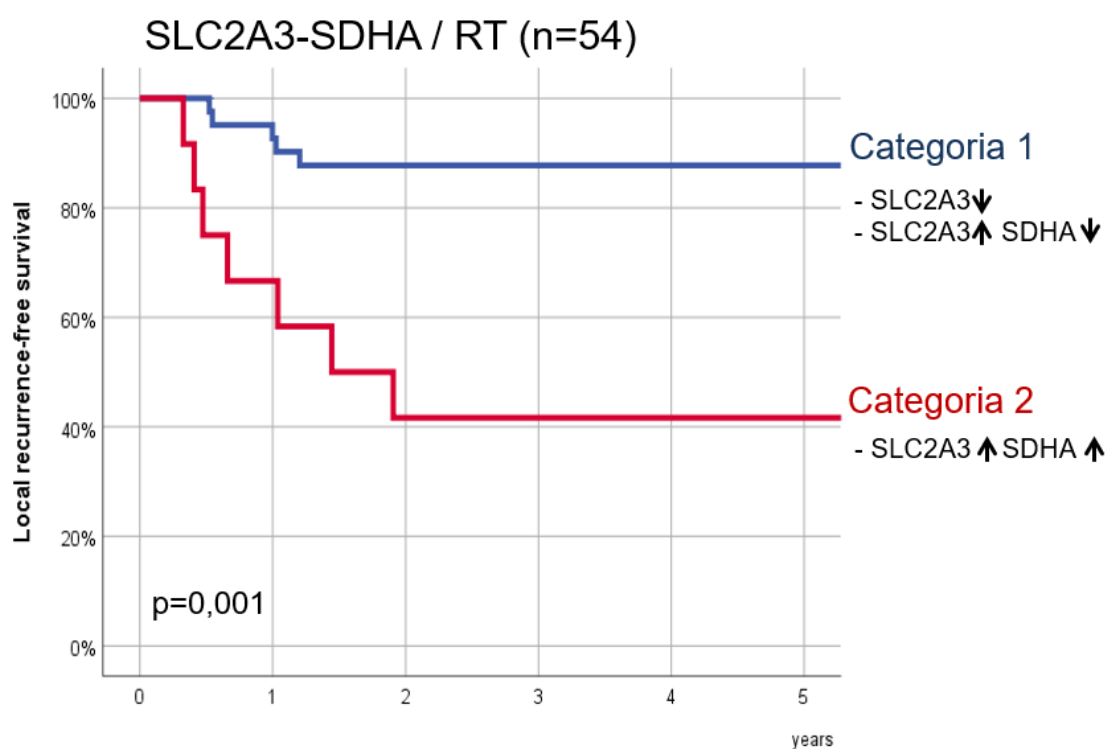
La supervivència lliure de recidiva local en funció del patró transcripcional de SLC2A3-SDHA es mostra a la figura 49. La supervivència lliure de recidiva local a 5 anys per als pacients de la Categoria 1 va ser del 79,1% (IC 95%: 70,3-87,9%) i per als pacients de la Categoria 2 del 35,1% (IC 95%: 18,6-51,6 %)( $p=0,0001$ ). D'aquesta manera, l'expressió conjunta elevada de SLC2A3 i SDHA comportava una disminució molt important de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys.



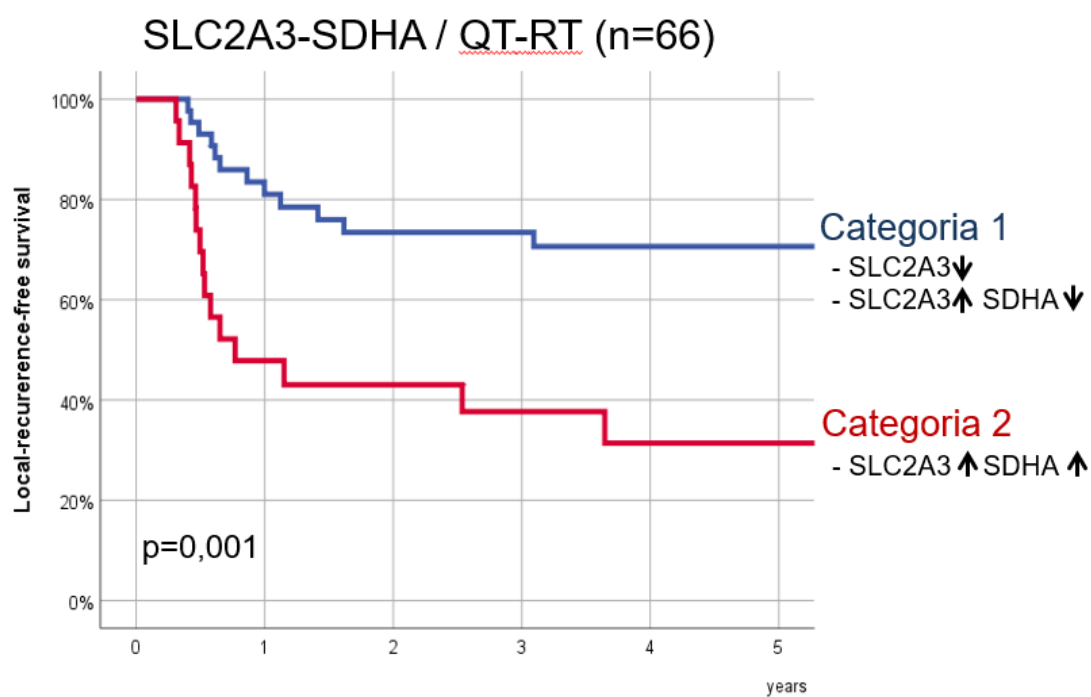
**Figura 49.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de SLC2A3-SDHA.

Aquestes diferències en el control local de la malaltia es van mantenir tant per als pacients tractats amb radioteràpia ( $p=0,0001$ ) com per als pacients tractats amb quimio-radioteràpia ( $p=0,001$ ).

En les figures següents (50-51) es mostren les corbes de supervivència lliure de recidiva local a 5 anys en funció del patró transcripcional de SLC2A3-SDHA i del tipus de tractament realitzat.

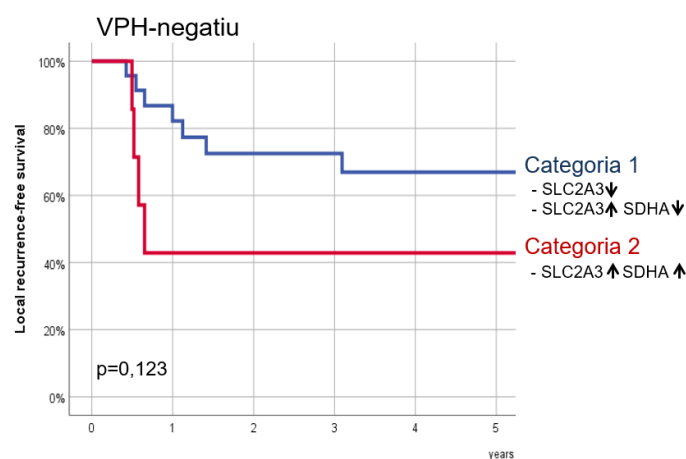


**Figura 50.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de SLC2A3-SDHA en els pacients tractats amb RT.



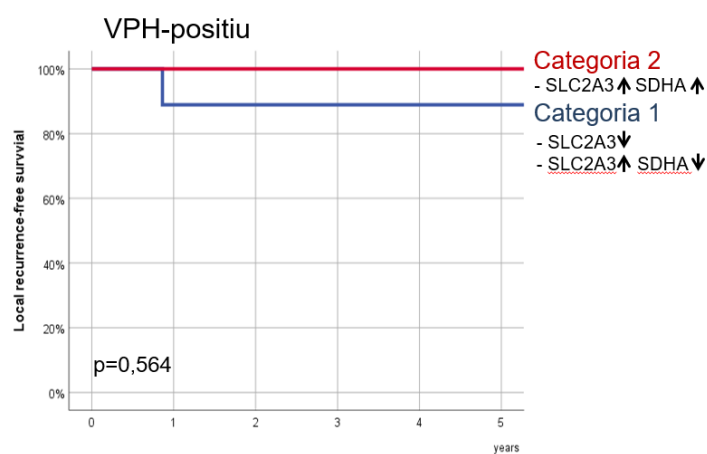
**Figura 51.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de SLC2A3-SDHA en els pacients tractats amb RT-QT.

En analitzar de forma separada els pacients amb CE d'orofaringe en funció de l'estat del VPH, s'observa que en els pacients amb tumors VPH-negatius, es va mantenir l'avantatge en la supervivència lliure de recidiva local per als pacients de la categoria 1 (supervivència lliure de recidiva local a 5 anys dels pacients de la categoria 1: 66,9% versus 42% en els pacients de la categoria 2), si bé les diferències no van assolir la significació estadística ( $p=0,123$ ) (figura 52).



**Figura 52.** Anàlisi de Kaplan-Meier entre la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de SLC2A3-SDHA en els pacients amb CE d'orofaringe VPH negatiu.

Per als pacients amb tumors d'orofaringe VPH-positius, la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys per als pacients de la categoria 1 ( $n=9$ ) va ser del 88,9% i la de la categoria 2 del 100% ( $n=3$ ), sense que s'estimessin diferències sinificatives en la supervivència ( $p=0,564$ ) (figura 53).



**Figura 53.** Anàlisi de Kaplan-Meier entre la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de SLC2A3-SDHA en els pacients amb CE d'orofaringe VPH positiu.

Es va dur a terme una anàlisi multivariant en què es va considerar la supervivència lliure de recidiva local com a variable dependent i en la que es van incloure, com a variables independents, l'edat i el gènere dels pacients, l'antecedent de consum de tòxics, la localització del tumor, l'extensió local i regional, el grau histològic, el tipus de tractament realitzat i la categoria d'acord amb el patró d'expressió transcripcional de SLC2A3-SDHA (taula 19).

**Taula 19.** Anàlisi multivariant amb la categoria d'expressió SLC2A3-SDHA com a variable independent.

		HR (IC 95%)	p
<b>Edat</b>		1,02 (0,98-1,06)	0,234
<b>Gènere</b>	Home	1	
	Dona	0,74 (0,25-2,22)	0,602
<b>Tòxics</b>	No	1	
	Moderat	0,44 (0,07-2,57)	0,367
	Sever	0,45 (0,10-1,99)	0,296
<b>Localització</b>	Cavitat oral	1	
	Orofaringe	0,84 (0,12-5,86)	0,865
	Hipofaringe	2,14 (0,25-17,99)	0,481
	Laringe	1,50 (0,19-11,33)	0,693
<b>Extensió local</b>	cT1-2	1	
	cT3-4	2,29 (0,94-5,58)	0,066
<b>Extensió regional</b>	cN0	1	
	cN+	1,04 (0,38-2,88)	0,929
<b>Grau histològic</b>	Ben diferenciat	1	
	Mod. diferenciat	2,99 (0,47-19,01)	0,244
	Mal diferenciat	0,89 (0,08-8,95)	0,925
<b>Tractament</b>	Radioteràpia	1	
	Quimio-radioteràpia	2,20(0,56-8,55)	0,253
<b>SLC2A3-SDHA</b>	Categoria 1	1	
	Categoria 2	4,24 (2,07-8,69)	<b>0,0001</b>

HR\*: hazard ratio

L'única variable que es va relacionar de manera significativa amb el control local de la malaltia va ser la categoria d'expressió de SLC2A3-SDHA. En comparació amb els pacients de la categoria 1, els pacients de la categoria 2 (expressió elevada de

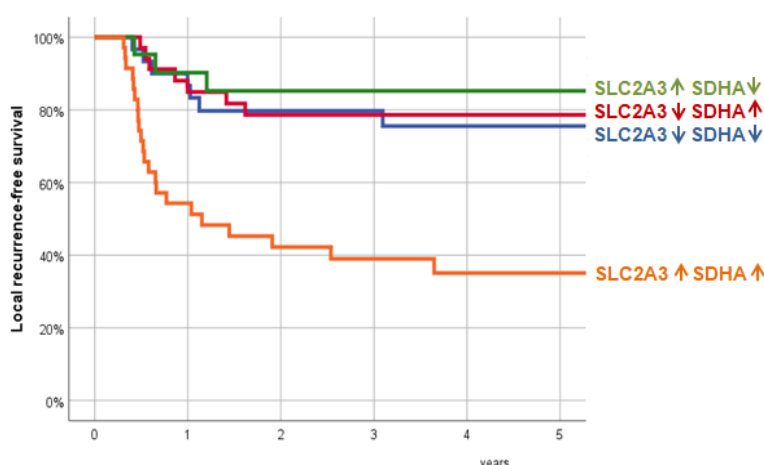
SLC2A3 i elevada de SDHA) van tenir un risc de recidiva local 4,24 vegades superior (IC 95%: 2,07-8,69%; p=0,0001).

La taula 20 mostra els valors de supervivència lliure de recidiva local per als pacients en funció que comptessin amb una expressió elevada o baixa de SLC2A3 i SDHA d'acord amb els punts de tall obtinguts en l'anàlisi individual de cadascun dels gens amb el model de partició recursiva.

**Taula 20.** Supervivència lliure de recidiva local a 5 anys segons patró d'expressió SLC2A3/ SDHA.

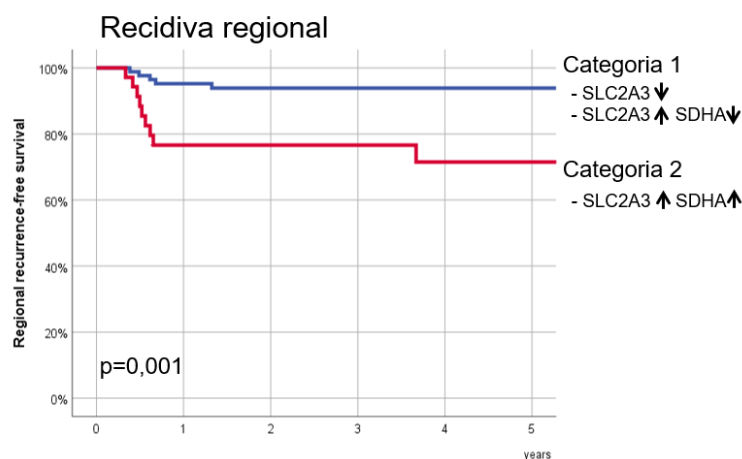
	<b>Sup. 5 anys (IC 95%)</b>
Expressió elevada de SLC2A3 / baixa de SDHA (n=21)	85,2% (69,7-100%)
Expressió elevada de SLC2A3 / elevada de SDHA (n=35)	37,1% (18,6-51,6%)
Expressió baixa de SLC2A3 / baixa de SDHA (n=30)	75,5% (59,6-61,4%)
Expressió baixa de SLC2A3 / elevada de SDHA (n=34)	78,6% (64,5-92,7%)

L'única combinació en què es va observar un deteriorament significatiu de la supervivència lliure de recidiva local va ser una expressió elevada de SLC2A3 i elevada de SDHA. Cal destacar que, per als pacients amb una expressió baixa de SLC2A3 (n=64), no van aparèixer diferències en la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys en funció de la categoria d'expressió de SDHA (75,8% per als pacients amb SDHA baixa versus 78,6% per als d'expressió de SDHA elevada, p=0,826). La figura 54 mostra la supervivència lliure de recidiva local dels pacients en funció que comptessin amb una expressió elevada o baixa de SLC2A3 i SDHA.



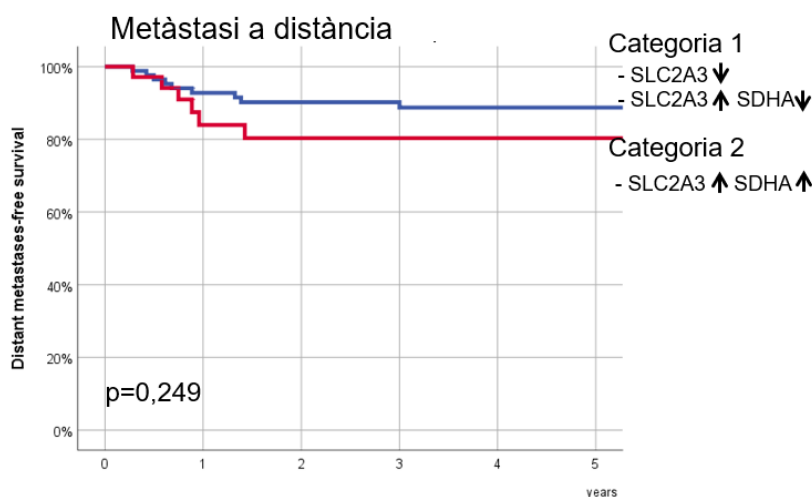
**Figura 54.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i els diferents nivells d'expressió de SLC2A3 i SDHA.

La supervivència lliure de recidiva regional per als pacients de la categoria 1 va ser significativament més elevada que la dels pacients de la categoria 2 (supervivència lliure de recidiva regional a 5 anys: 93,9% (IC 95%: 88,8-99,0%) versus 71,5% (IC 95%: 55,0-88,0%) ( $p=0,001$ ) (figura 55).



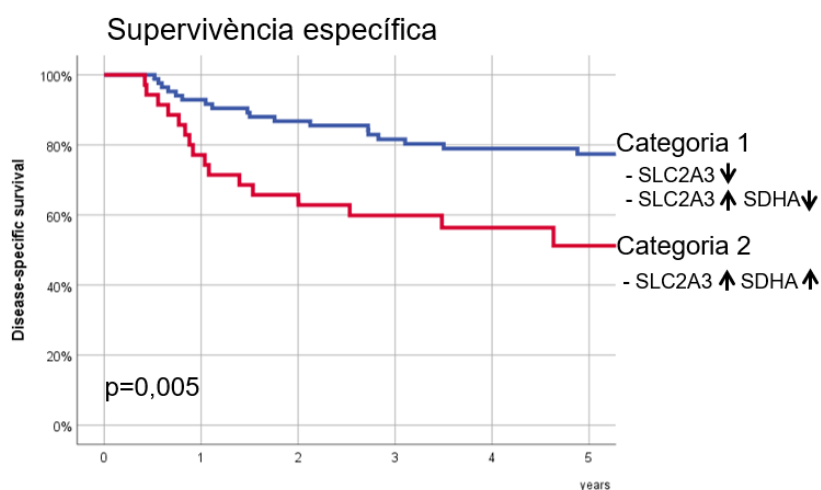
**Figura 55.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva regional a 5 anys i la categoria d'expressió de SLC2A3 i SDHA.

La supervivència lliure de metàstasi a distància per als pacients de la categoria 1 va ser també més elevada, si bé en aquest cas les diferències no van assolir la significació estadística (supervivència lliure de metàstasi a distància a 5 anys: 88,7% (IC 95%: 81,6-95,8%) versus 80,3% (IC 95%: 66,0-94,6%) ( $p=0,249$ ) (figura 56).



**Figura 56.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de metàstasi a distància a 5 anys i la categoria d'expressió de SLC2A3 i SDHA.

Finalment, es va analitzar la supervivència específica en funció de la categoria en l'expressió de SLC2A3-SDHA. Els pacients de la categoria 1 van tenir una supervivència específica significativament superior. La supervivència específica a 5 anys dels pacients de la categoria 1 va ser del 75,6% (IC 95%: 65,8-85,4%), i la dels pacients de la categoria 2 del 51,2% (IC 95%: 33,2-69,2%) ( $p=0,005$ ) (figura 57).



**Figura 57.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència específica a 5 anys i la categoria d'expressió de SLC2A3 i SDHA.



## 2. Resultats de la cohort de cirurgia

La cohort de pacients tractats amb cirurgia va incloure un total de **110** pacients tractats amb intenció radical.

Primerament es va fer un estudi avaluant la relació entre els nivells d'expressió dels diferents gens analitzats i variables com: el gènere dels pacients, els antecedents de consum de tòxics, la localització del tumor primari i l'extensió local (pT) i regional (pN) del tumor. Les taules que apareixen a continuació (taules 21-25) mostren els valors de la mediana de l'expressió transcripcional per al panell de gens analitzats en funció de les característiques clíniques dels pacients. S'assenyalen en vermell aquelles determinacions en què van aparèixer diferències estadísticament significatives.

**Taula 21.** Valors de la mediana de l'expressió transcripcional dels gens analitzats segons el gènere.

	<b>Homes</b>	<b>Dones</b>	<b>p</b>
<b>HIF1A</b>	1,80	1,38	0,425
<b>LDHA</b>	8,34	11,50	0,104
<b>LDHB</b>	1,53	1,42	0,633
<b>PDK1</b>	6,19	3,92	<b>0,021</b>
<b>HK1</b>	5,31	4,75	0,110
<b>SUCNR1</b>	3,22	6,44	0,091
<b>SLC2A1</b>	2,52	2,19	0,546
<b>SLC2A3</b>	1,84	1,29	0,264
<b>SLC16A3</b>	2,41	1,64	0,102
<b>SLC16A7</b>	2,73	1,65	0,090
<b>PFKL</b>	3,46	3,40	0,664
<b>DLD</b>	3,26	2,44	<b>0,026</b>
<b>DLAT</b>	10,34	7,43	<b>0,045</b>
<b>PDHA1</b>	5,06	4,50	0,582
<b>PDHB</b>	1,96	1,49	0,053
<b>PDHX</b>	14,57	9,95	0,161
<b>SDHA</b>	1,64	1,68	0,510
<b>SDHB</b>	6,23	7,18	0,481
<b>SDHC</b>	1,36	1,27	0,394

**Taula 22.** Valors de la mediana de l'expressió transcripcional dels gens analitzats segons el consum de tòxics.

	No	Moderat	Sever	p
HIF1A	1,67	1,38	1,80	0,543
LDHA	1,02	1,00	0,82	0,308
LDHB	1,54	1,21	1,58	0,488
PDK1	3,92	3,48	6,68	<b>0,026</b>
HK1	4,42	4,77	5,56	0,146
SUCNR1	6,44	4,03	3,28	0,215
SLC2A1	2,46	1,81	2,59	0,762
SLC2A3	1,40	1,31	1,84	0,364
SLC16A3	1,72	1,57	2,69	0,071
SLC16A7	2,38	1,53	2,84	0,162
PFKL	3,23	3,43	3,61	0,364
DLD	2,39	2,58	3,39	0,057
DLAT	7,43	8,59	10,51	0,145
PDHA1	4,80	4,83	5,06	0,871
PDHB	1,49	1,77	1,95	0,114
PDHX	9,95	12,95	15,40	0,235
SDHA	1,57	1,38	1,71	0,289
SDHB	7,70	5,42	6,27	0,571
SDHC	0,90	1,55	1,36	0,419

**Taula 23.** Valors de la mediana de l'expressió transcripcional dels gens analitzats segons la localització del tumor primari.

	Cav oral	Orofaringe	Hipofaringe	Laringe	p
HIF1A	1,60	1,44	1,74	1,88	0,503
LDHA	1,00	1,55	0,64	0,83	0,110
LDHB	1,23	2,97	3,94	1,50	0,011
PDK1	3,79	4,95	7,85	8,20	0,027
HK1	4,81	6,15	5,00	5,68	0,182
SUCNR1	4,65	2,23	3,84	3,32	0,570
SLC2A1	1,82	3,53	2,16	3,03	0,037
SLC2A3	1,19	1,13	2,99	1,91	0,268
SLC16A3	1,67	1,38	1,57	2,89	<b>0,010</b>
SLC16A7	1,57	4,60	2,79	3,39	0,123
PFKL	3,34	4,26	4,07	3,62	0,268
DLD	2,46	2,67	5,16	3,50	<b>0,012</b>
DLAT	8,54	13,39	10,01	10,64	0,088
PDHA1	3,30	7,53	6,12	5,51	0,090
PDHB	1,68	1,85	1,84	2,22	0,168
PDHX	9,80	11,63	15,20	1,67	<b>0,034</b>
SDHA	1,17	2,11	2,64	1,78	<b>0,004</b>
SDHB	5,31	6,76	9,10	6,62	0,145
SDHC	1,19	2,67	2,13	1,36	<b>0,015</b>

Taula 24. Valors de la mediana de l'expressió transcripcional dels gens analitzats segons l'extensió local del tumor.

	pT1-2	pT3-4	p
HIF1A	1,43	1,77	0,203
LDHA	0,92	0,87	0,707
LDHB	1,23	1,59	0,639
PDK1	6,23	5,19	0,458
HK1	5,12	5,28	0,991
SUCNR1	4,65	3,10	0,150
SLC2A1	1,78	2,63	0,289
SLC2A3	1,30	1,78	0,161
SLC16A3	1,49	2,52	<b>0,039</b>
SLC16A7	2,37	2,58	0,811
PFKL	3,44	3,45	0,741
DLD	3,19	2,67	0,587
DLAT	10,64	9,92	0,613
PDHA1	4,70	5,00	0,729
PDHB	2,08	1,81	0,525
PDHX	1,41	1,33	0,741
SDHA	1,37	1,78	<b>0,026</b>
SDHB	5,49	6,62	0,104
SDHC	1,24	1,36	0,906

Taula 25. Valors de la mediana de l'expressió transcripcional dels gens analitzats segons l'extensió regional del tumor.

	pN0	pN+	p
HIF1A	1,84	1,49	<b>0,036</b>
LDHA	0,92	0,86	0,112
LDHB	1,44	1,59	0,460
PDK1	6,15	4,87	0,333
HK1	5,55	4,95	0,499
SUCNR1	4,44	3,11	0,261
SLC2A1	2,65	2,06	0,074
SLC2A3	1,76	1,28	<b>0,016</b>
SLC16A3	2,14	2,12	0,676
SLC16A7	2,31	2,56	0,811
PFKL	3,45	3,40	0,298
DLD	2,63	2,73	0,990
DLAT	1,04	0,94	0,171
PDHA1	5,33	4,78	0,492
PDHB	1,84	1,81	0,650
PDHX	1,52	1,10	0,180
SDHA	1,62	1,62	0,530
SDHB	6,00	6,10	0,830
SDHC	1,27	1,42	0,611

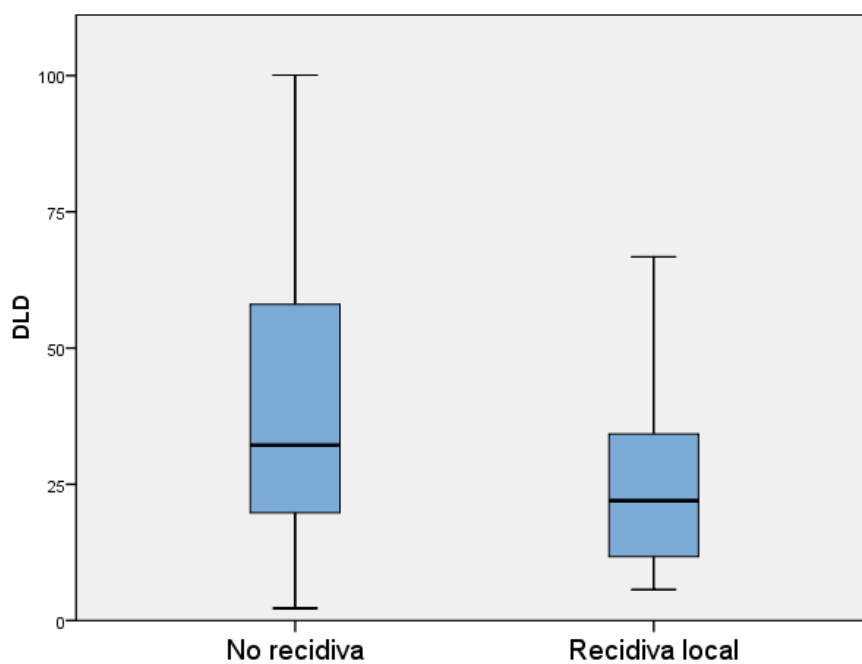
En la majoria dels gens estudiats no van aparèixer diferències significatives en els nivells d'expressió transcripcional per a les diferents variables analitzades. La variable en què un nombre més gran de gens va mostrar una diferència significativa va ser la localització del tumor primari, on va destacar la SDHA, que va comptar amb uns nivells d'expressió més elevats en el cas dels tumors localitzats a orofaringe i hipofaringe (taula 23).

Seguidament es van analitzar els nivells d'expressió dels diferents gens avaluats en funció del control local de la malaltia després del tractament quirúrgic (taula 26).

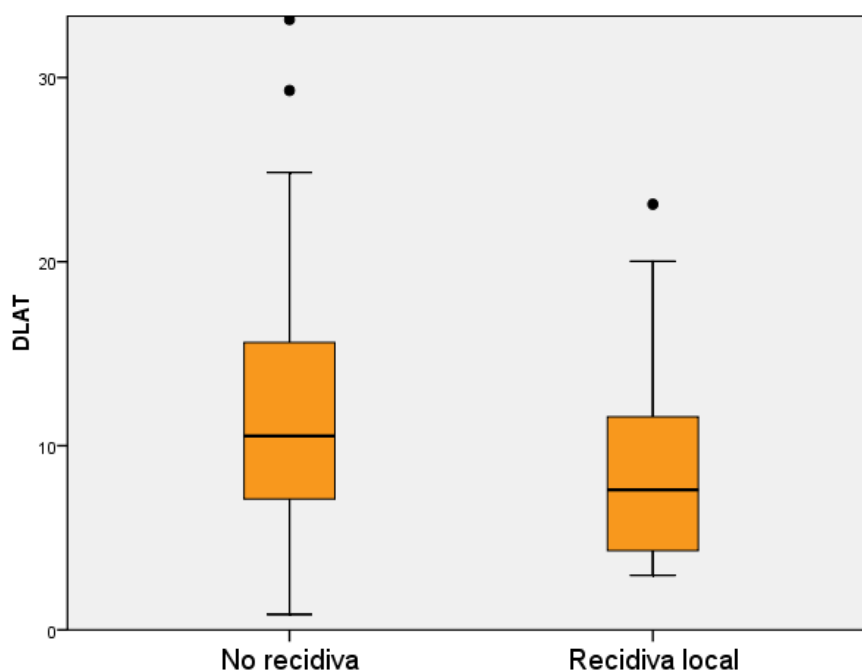
**Taula 26.** Nivell d'expressió transcripcional dels gens en funció del control local després de la cirurgia.

	no rT	rT	p
HIF1A	1,71	1,66	0,733
LDHA	0,84	1,13	<b>0,044</b>
LDHB	1,58	1,24	0,178
PDK1	5,82	5,11	0,476
HK1	5,13	5,47	0,822
SUCNR1	3,42	3,34	0,877
SLC2A1	2,34	2,87	0,443
SLC2A3	1,69	1,73	0,751
SLC16A3	2,24	2,02	0,664
SLC16A7	2,73	1,71	0,196
PFKL	3,53	3,34	0,416
DLD	3,21	2,19	<b>0,028</b>
DLAT	1,05	0,76	<b>0,031</b>
PDHA1	5,48	4,54	0,137
PDHB	1,95	1,60	0,131
PDHX	1,42	1,14	0,530
SDHA	1,77	1,36	0,139
SDHB	6,35	5,50	0,452
SDHC	1,34	1,35	0,218

De nou, no van aparèixer diferències per a la majoria dels gens analitzats. Les diferències en funció del control local de la malaltia només van assolir el nivell de significació estadística en les determinacions de LDHA ( $p=0,044$ ), DLD ( $p=0,028$ ) i DLAT ( $p=0,031$ ). Els pacients sense recidiva local del tumor van mostrar uns nivells d'expressió de DLD i DLAT significativament més elevats i, per contra, uns nivells més baixos de LDHA. En les figures següents (figures 58 i 59) es mostra la distribució dels valors de DLD i DLAT en funció del control local del tumor després del tractament quirúrgic.



**Figura 58.** Distribució dels valors de DLD segons el control local després de la cirurgia.



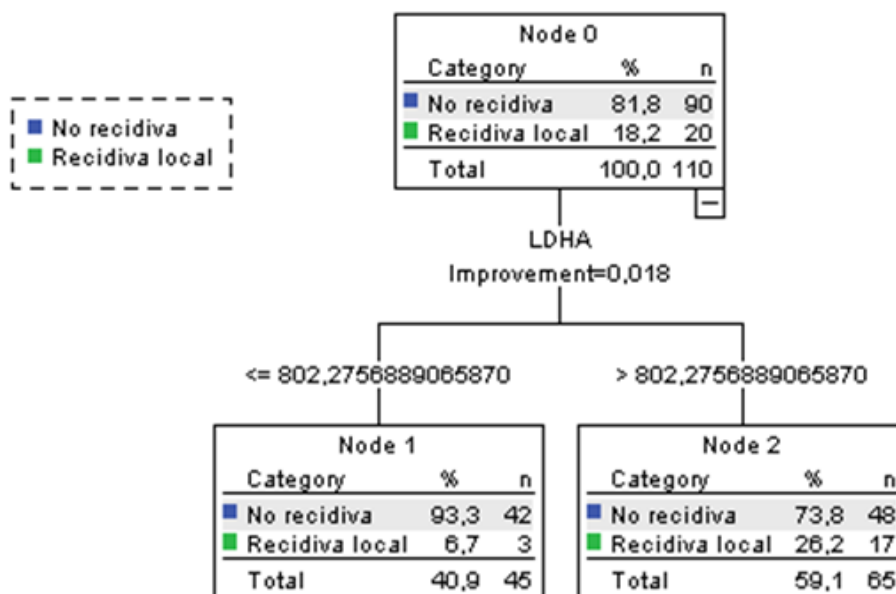
**Figura 59.** Distribució dels valors de DLAT segons el control local després de la cirurgia.

A continuació, de manera univariant i a través d'una anàlisi de partició recursiva, es va determinar la capacitat de l'expressió transcripcional de cadascun dels gens analitzats de discriminar l'aparició de recidiva local després del tractament quirúrgic.

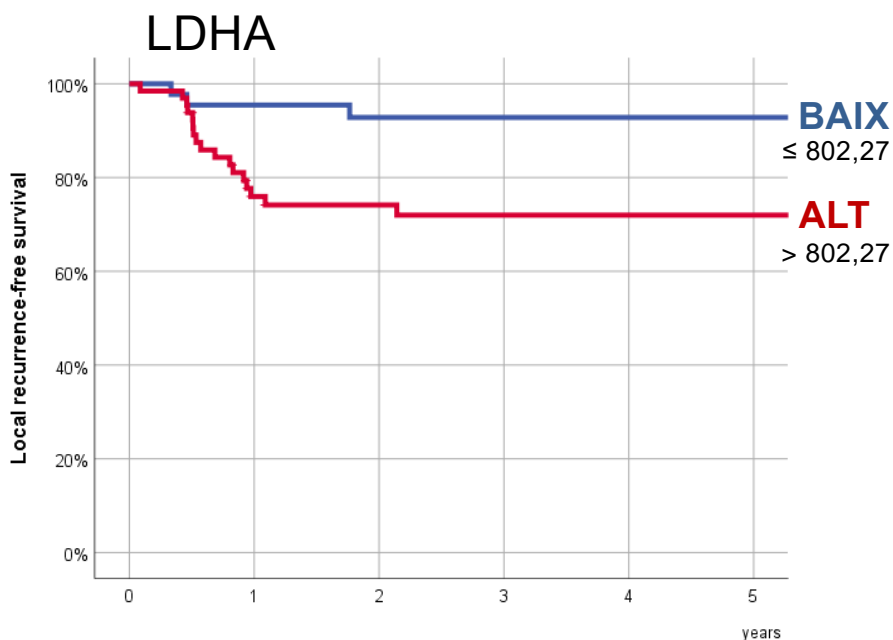
Les determinacions que van tenir capacitat pronòstica significativa en relació amb el control local de la malaltia van ser les corresponents als valors d'expressió transcripcional de LDHA, SLC16A3, DLAT, DLD, PDHA1, PDHB, SDHA i SDHC. Per a alguns gens com LDHB, SLC2A1, SLC2A3, PFKL, PDHX i SDHB, l'anàlisi de partició recursiva va determinar l'existència d'un punt de tall però sense que la diferència en la supervivència lliure de recidiva local per a cadascun dels grups assolís una significació estadística.

A les figures següents (figures 60-87) es mostren els arbres de classificació i regressió i les corbes de supervivència lliure de recidiva local de la malaltia per a cada gen, obtingudes en aplicar les categories generades a partir de les anàlisis de partició recursiva.

# LDHA

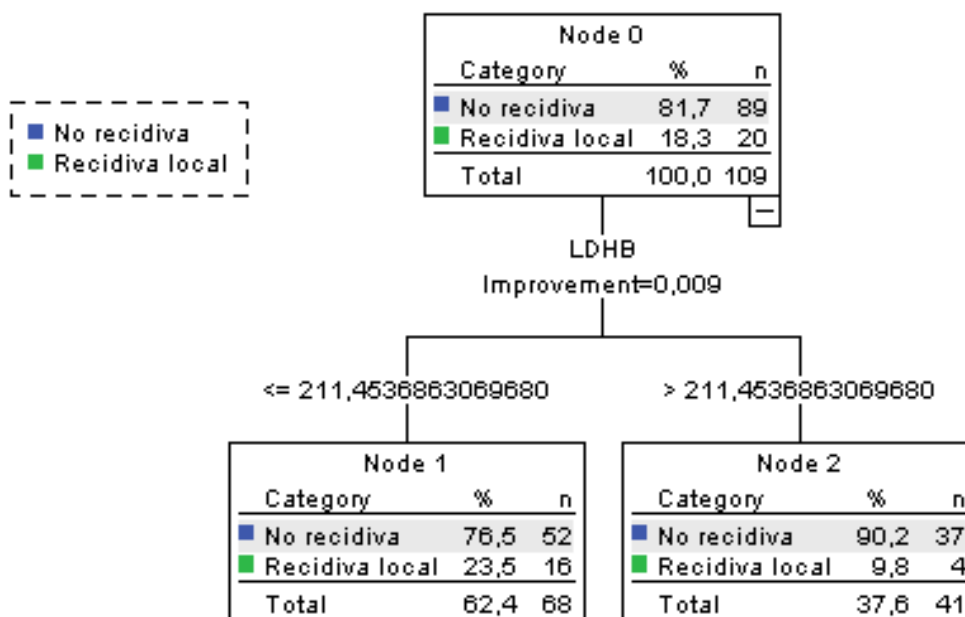


**Figura 60.** Arbre de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basat en l'expressió del gen LDHA.

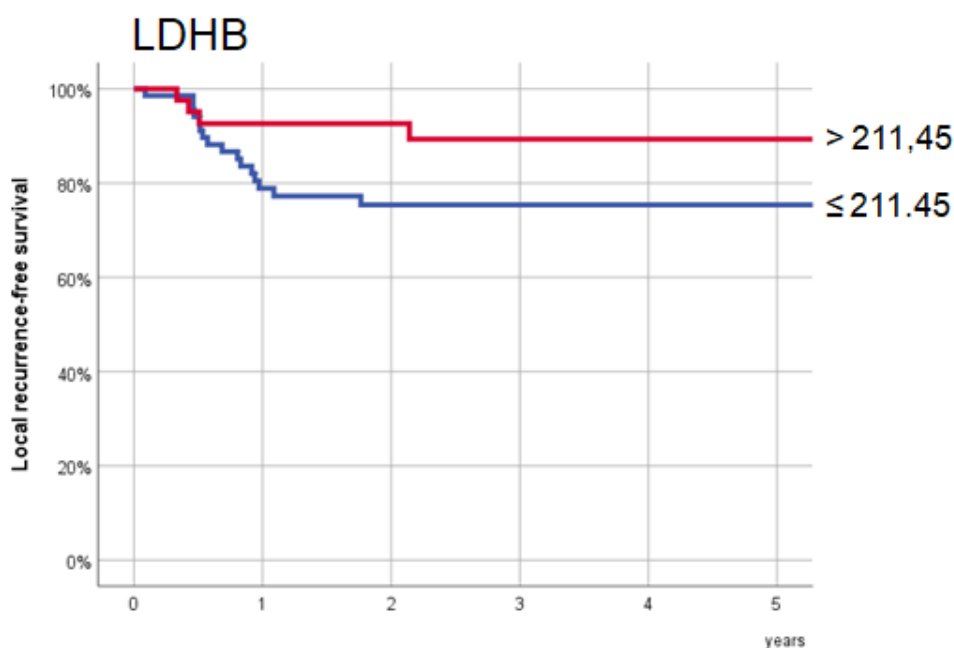


**Figura 61.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de LDHA (p = 0,009).

## LDHB



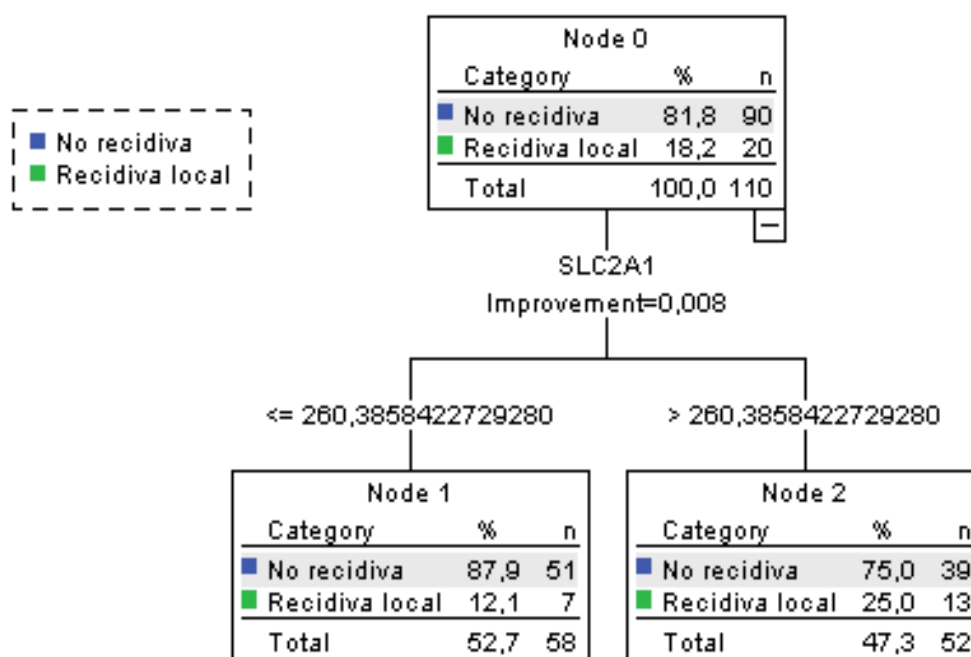
**Figura 62.** Arbre de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basat en l'expressió del gen LDHB.



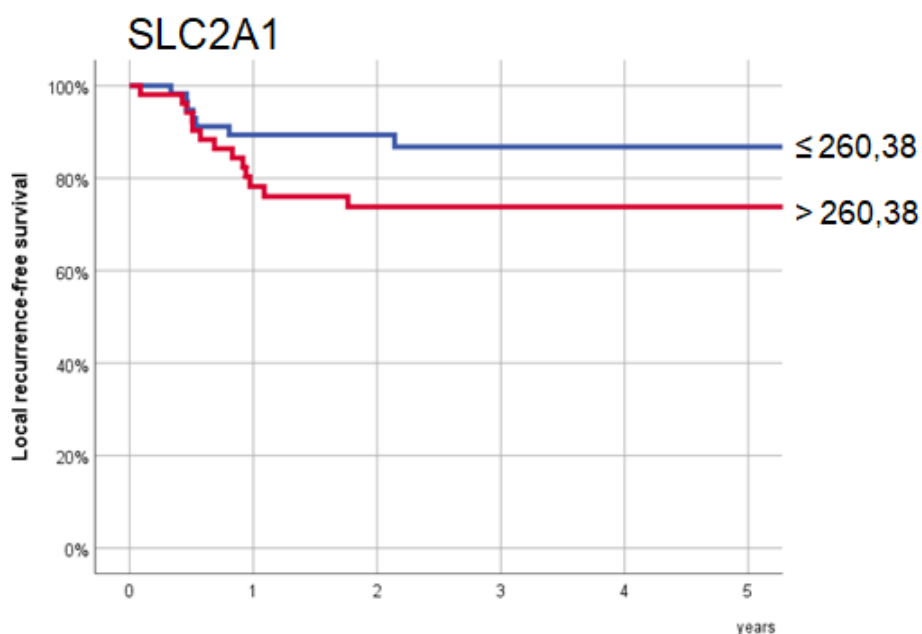
**Figura 63.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de LDHB ( $p = 0,083$ ).



## SLC2A1

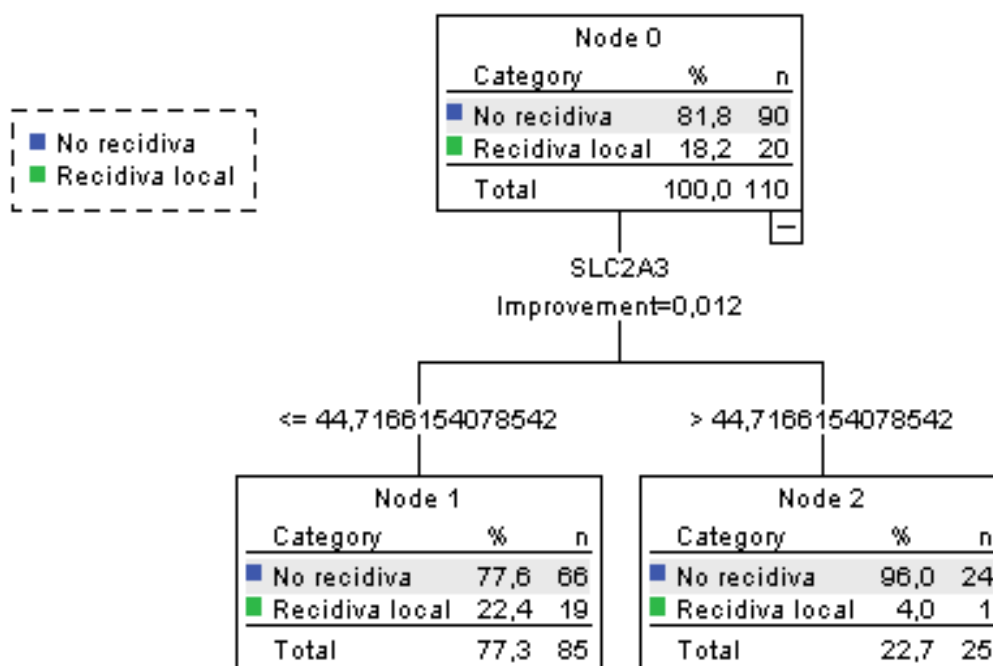


**Figura 64.** Arbre de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de de recidiva local basat en l'expressió del gen SLC2A1.

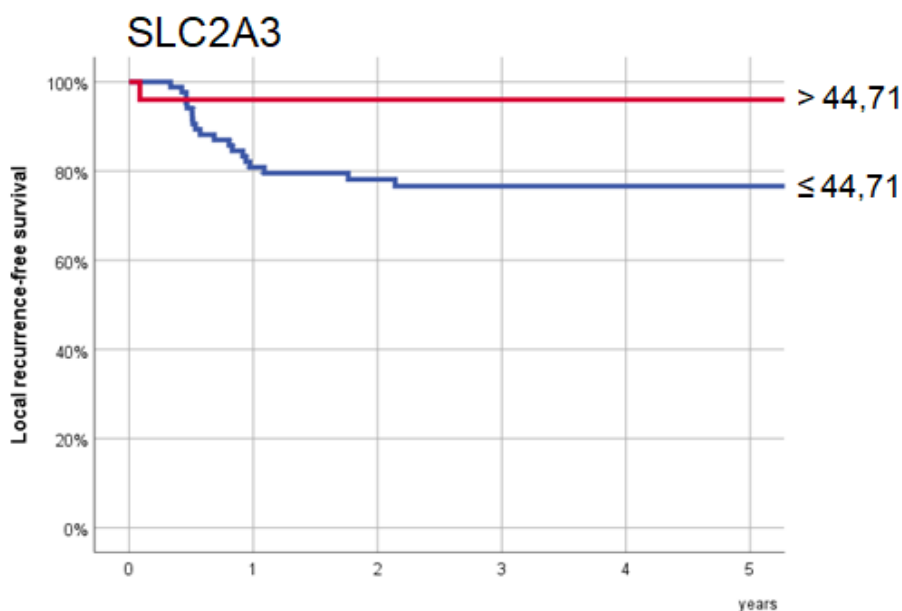


**Figura 65.** Anàlisi de Kaplan-Meier de supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de SLC2A1 ( $p = 0,101$ ).

## SLC2A3

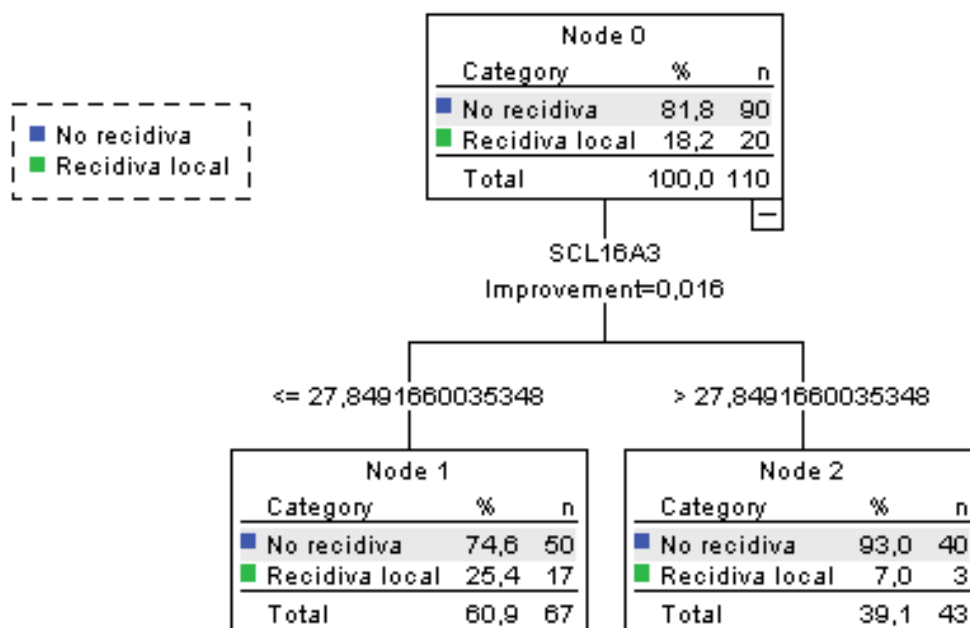


**Figura 66.** Arbre de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basat en l'expressió del gen SLC2A3.

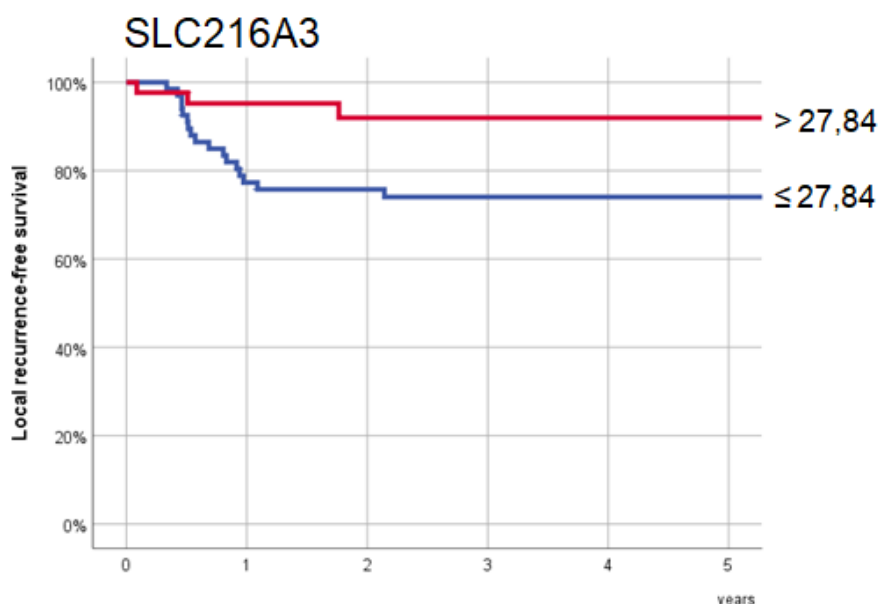


**Figura 67.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de SLC2A3 ( $p = 0,061$ ).

### SLC16A3

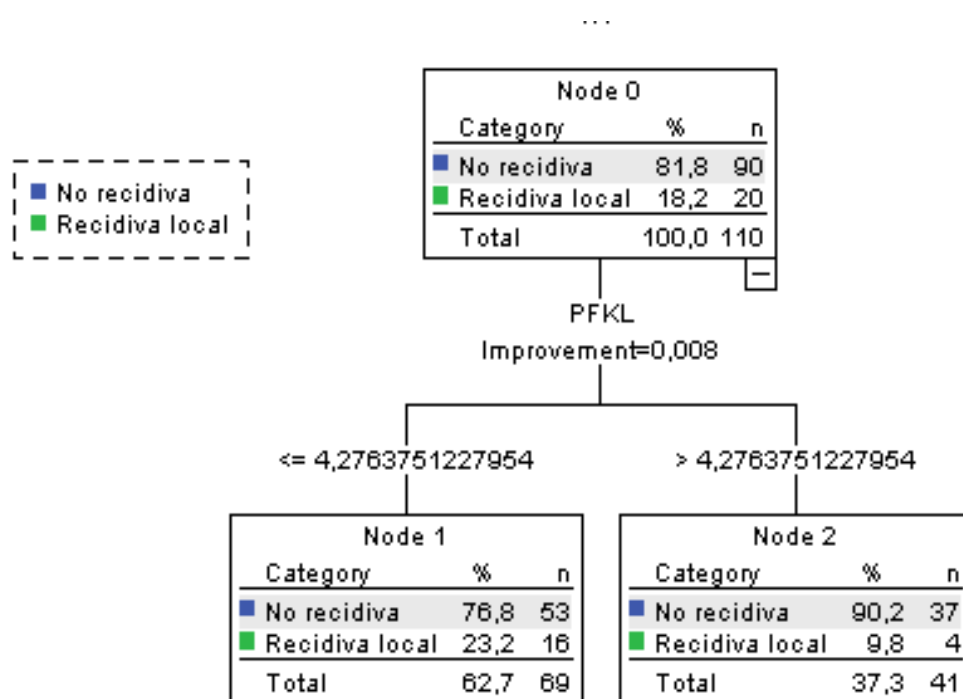


**Figura 68.** Arbre de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basat en l'expressió del gen SLC16A3.

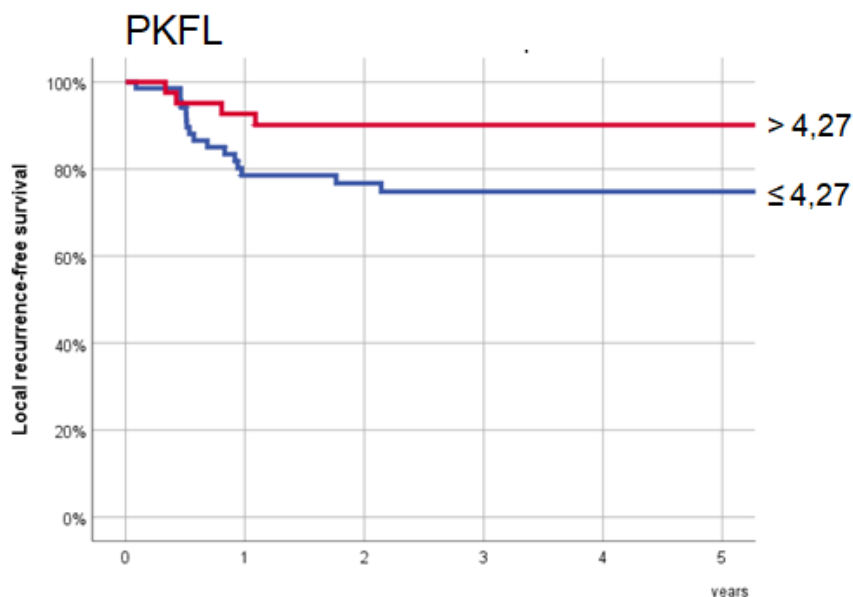


**Figura 69.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de SLC16A3 (p = 0,026).

PKFL

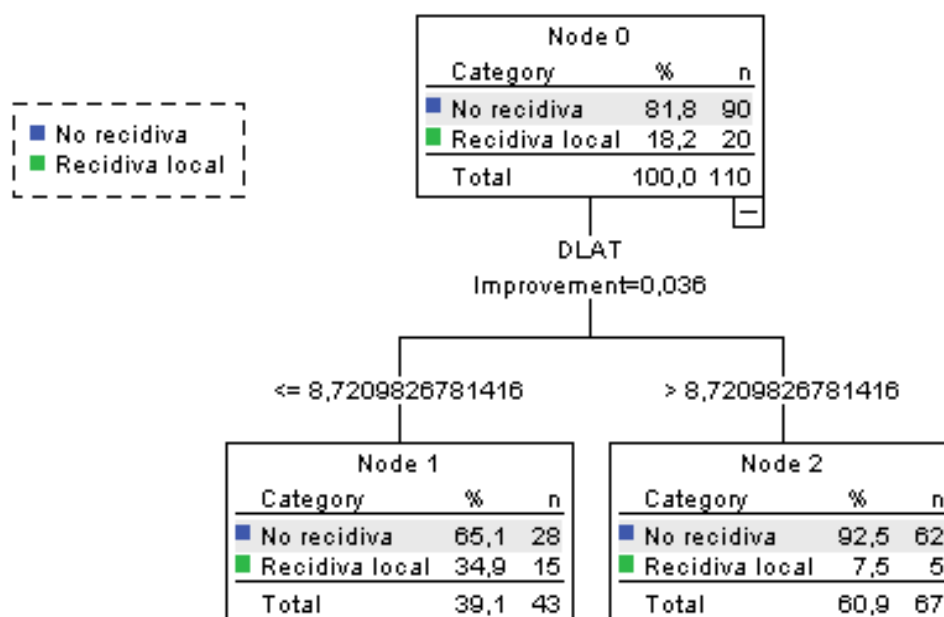


**Figura 70.** Arbre de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basat en l'expressió del gen PKFL.

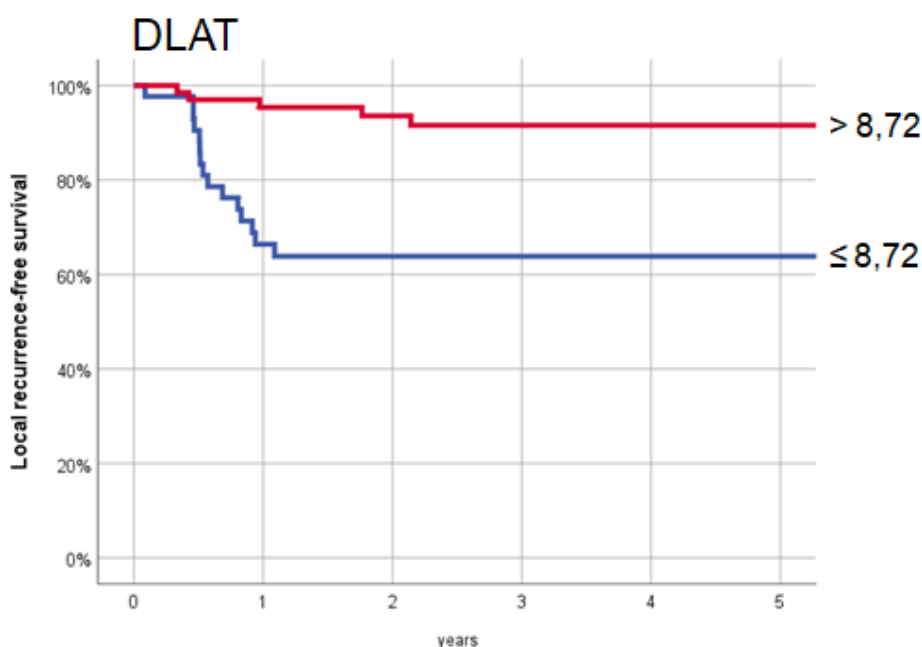


**Figura 71.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de PKFL (p = 0.068).

# DLAT

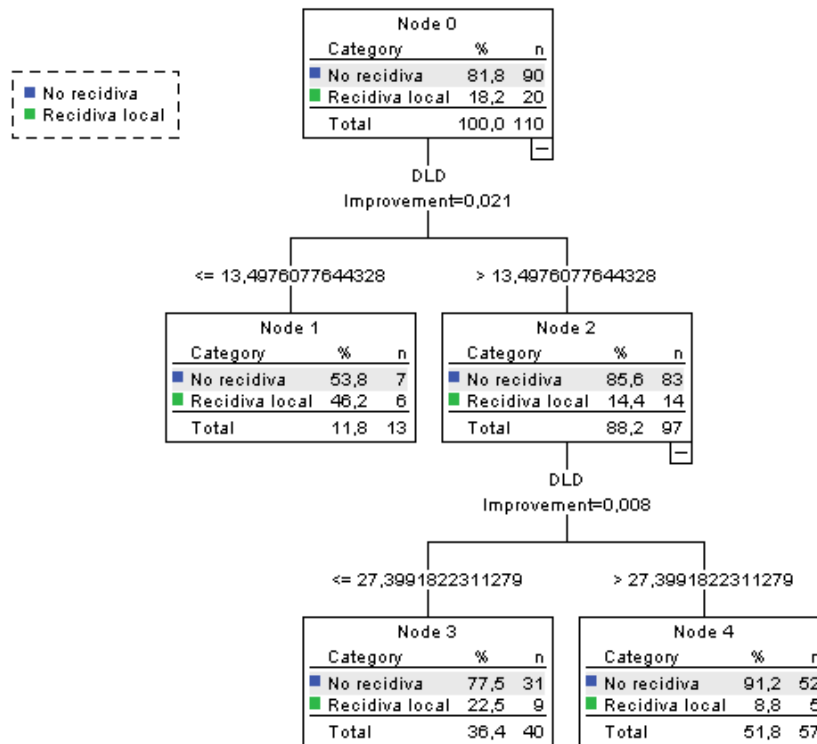


**Figura 72.** Arbre de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basat en l'expressió del gen DLAT.

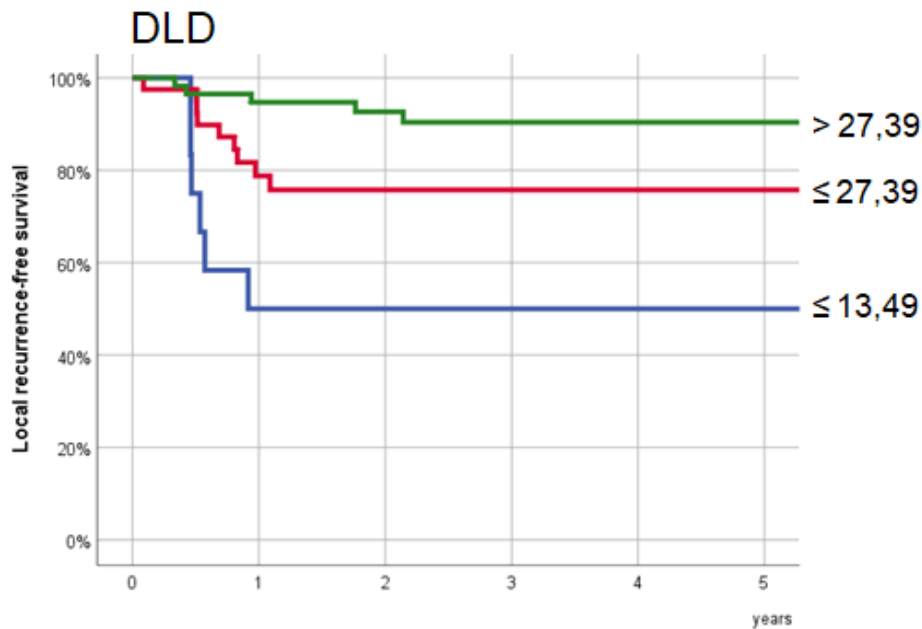


**Figura 73.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de DLAT ( $p = 0,0001$ ).

DLD

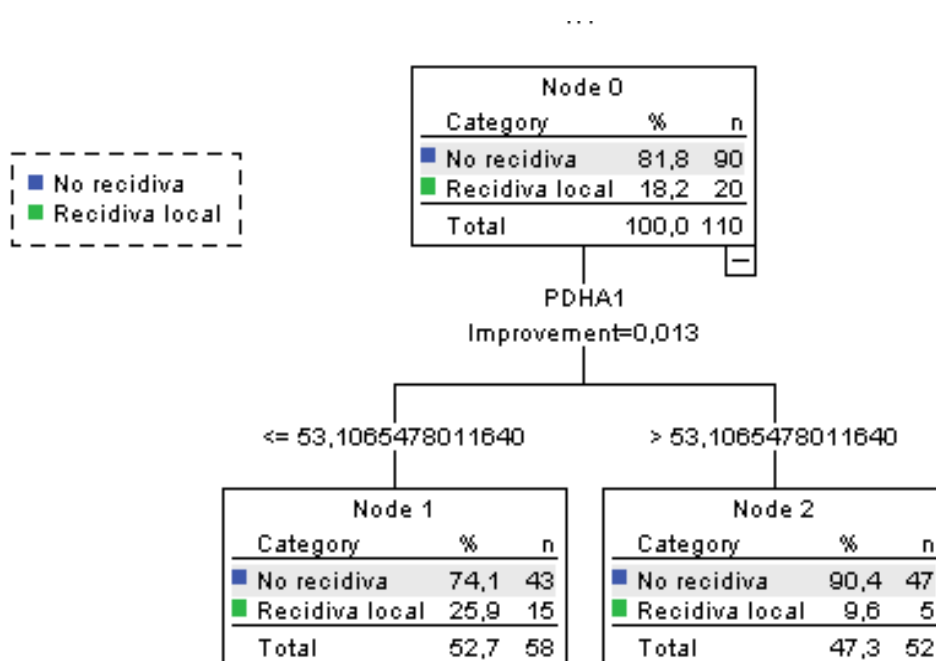


**Figura 74.** Arbre de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basat en l'expressió del gen DLD.

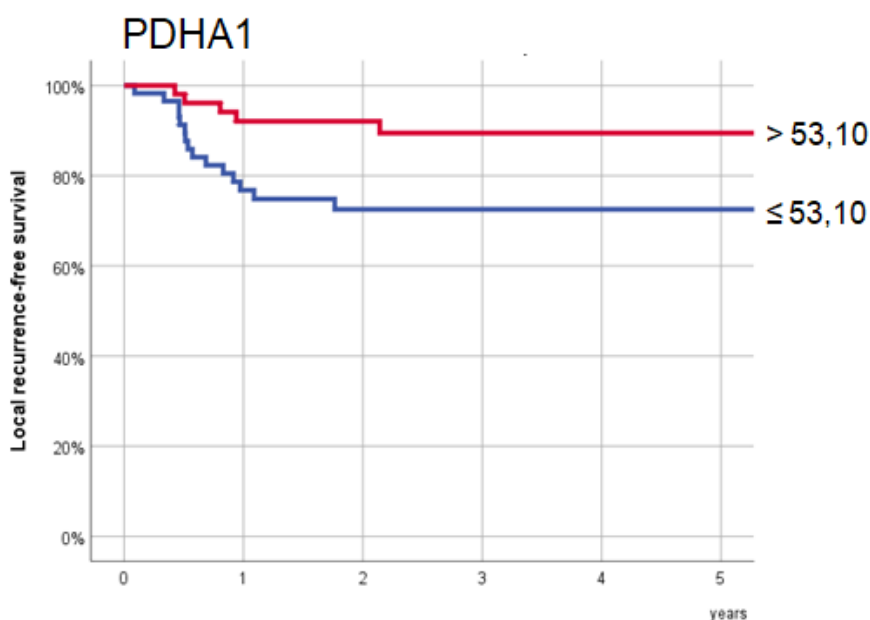


**Figura 75.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de DLD (p = 0,001).

# PDHA1

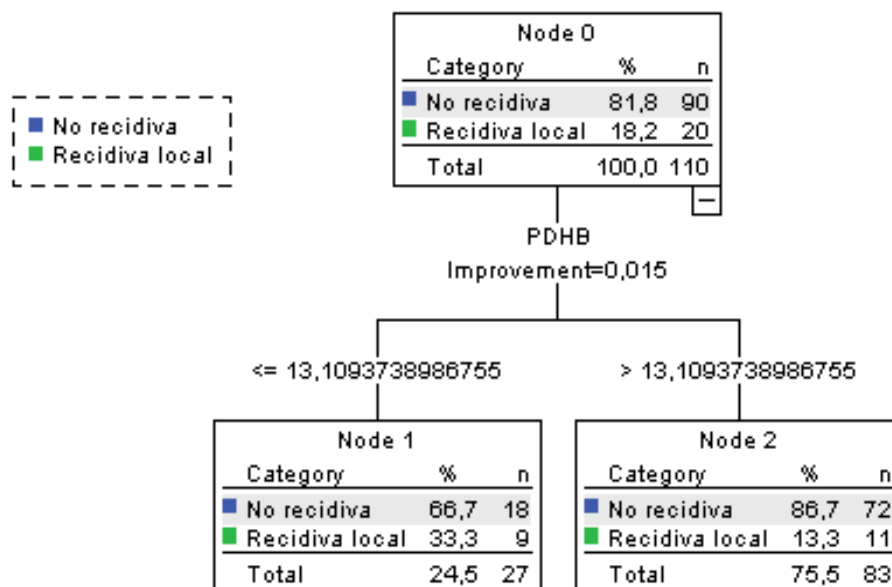


**Figura 76.** Arbre de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basat en l'expressió del gen PDHA1.

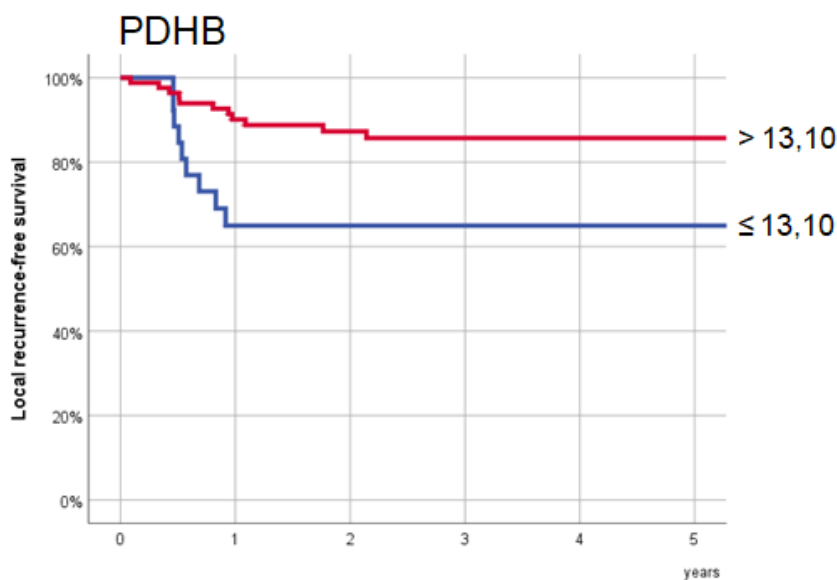


**Figura 77.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de PDHA1 ( $p = 0,024$ ).

## PDHB



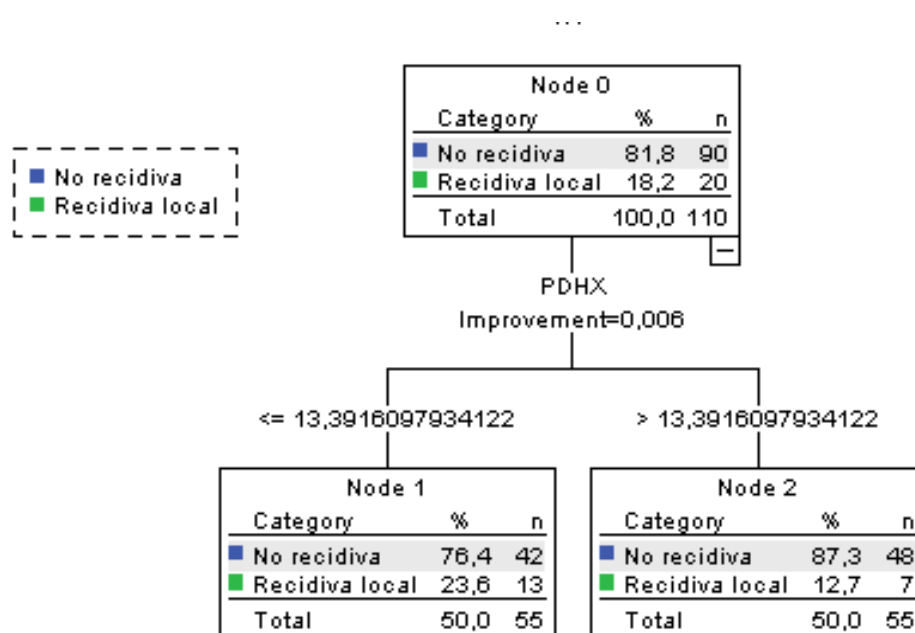
**Figura 78.** Arbre de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basat en l'expressió del gen PDHB.



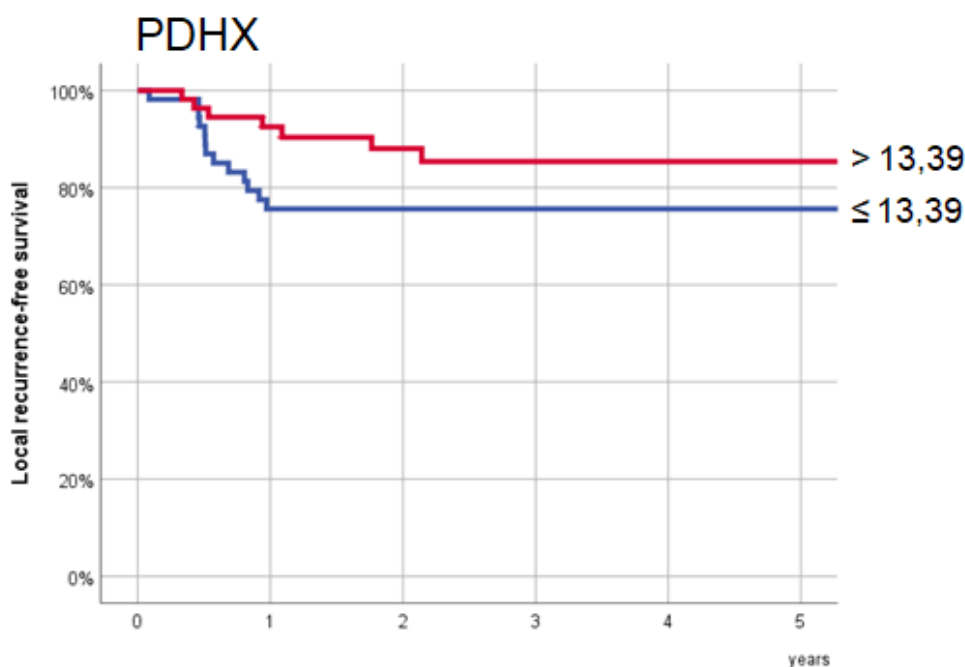
**Figura 79.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de PDHB ( $p = 0,009$ ).



PDHX

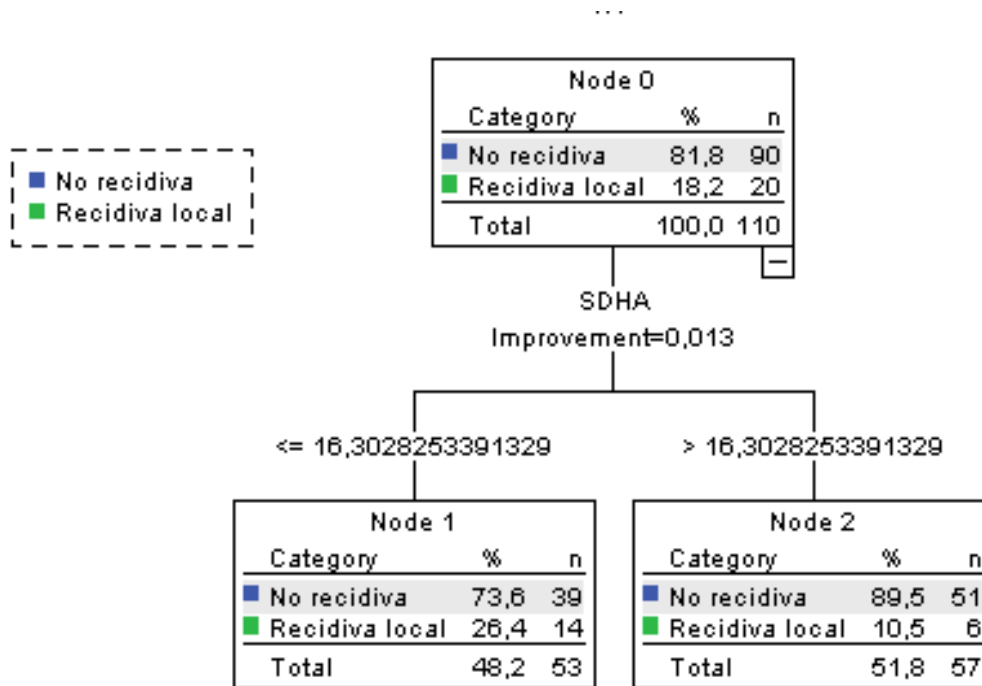


**Figura 80.** Arbre de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basat en l'expressió del gen PDHX.

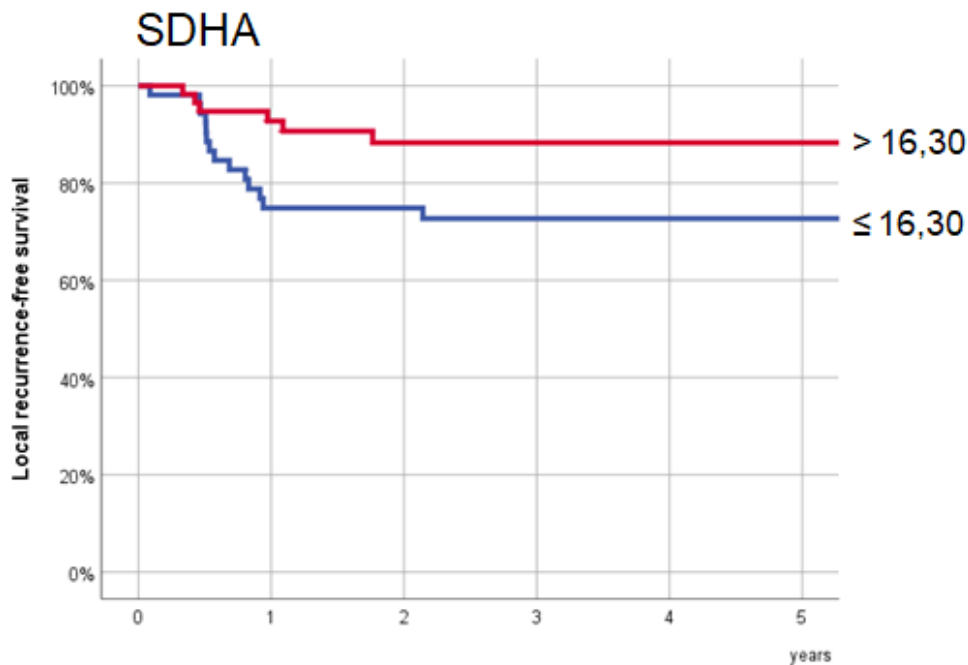


**Figura 81.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de PDHX ( $p = 0,131$ ).

SDHA

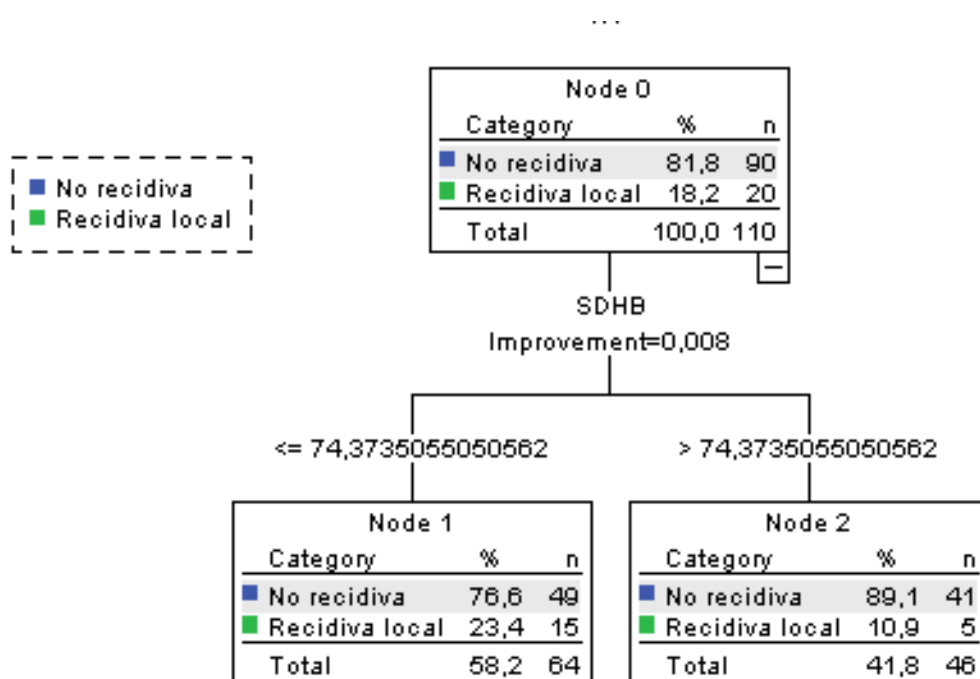


**Figura 82.** Arbre de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basat en l'expressió del gen SDHA.

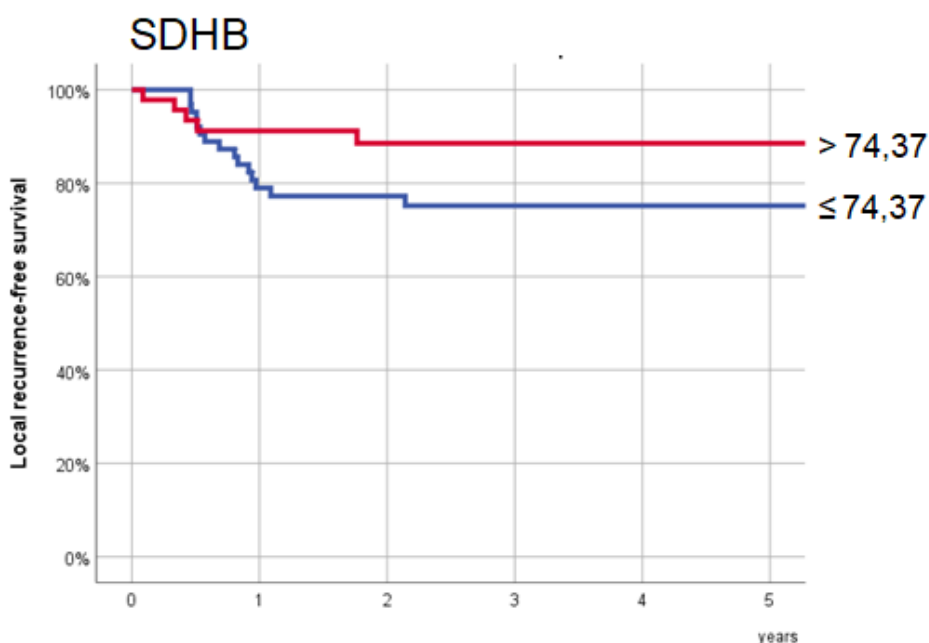


**Figura 83.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de SDHA ( $p = 0,039$ ).

## SDHB

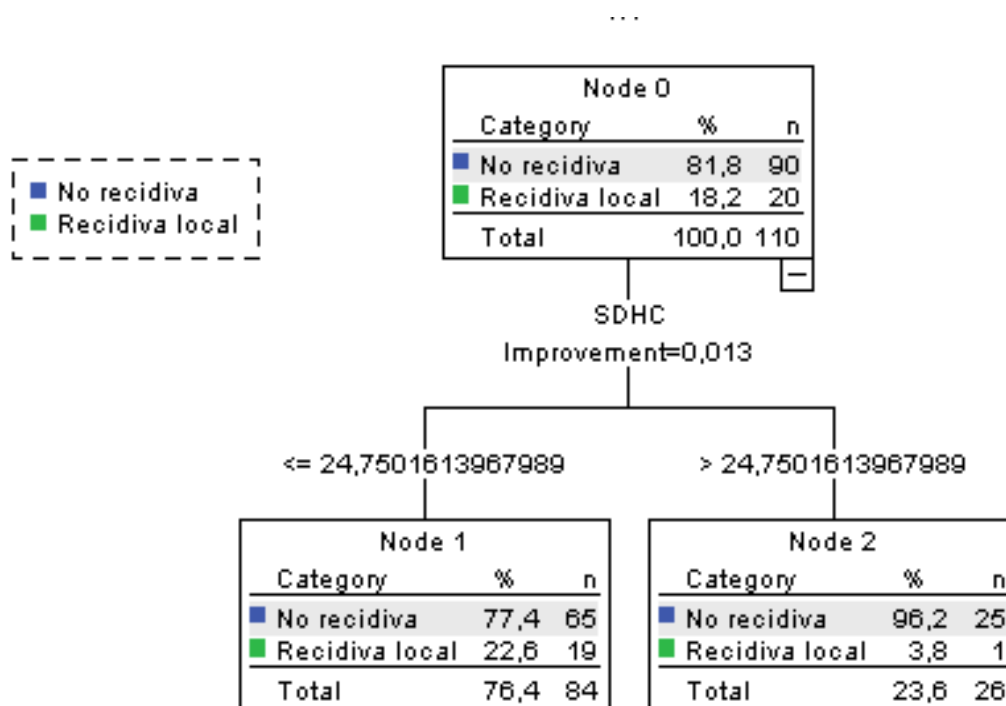


**Figura 84.** Arbre de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basat en l'expressió del gen SDHB.

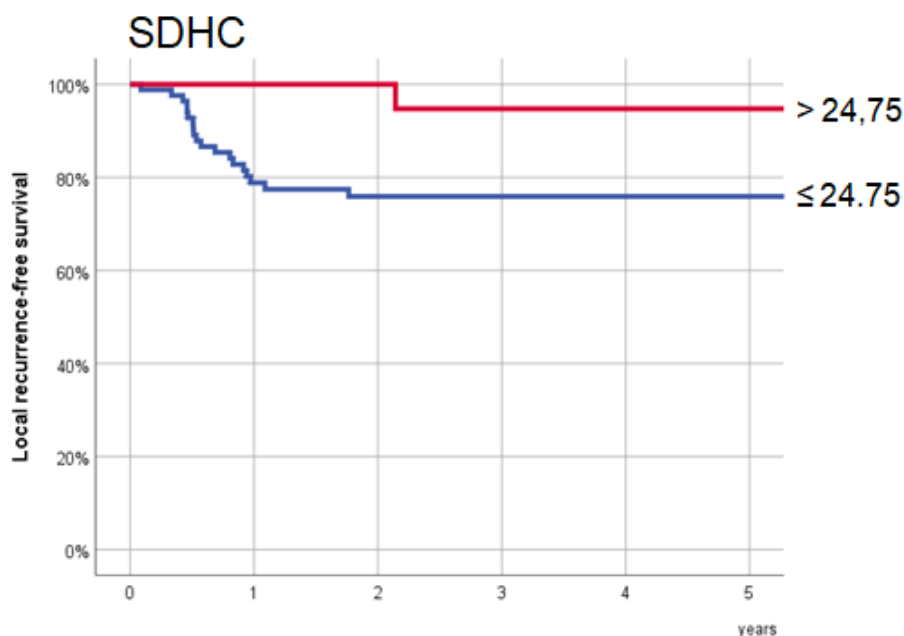


**Figura 85.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de SDHB ( $p = 0,115$ ).

## SDHC



**Figura 86.** Arbre de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basat en l'expressió del gen SDHC.



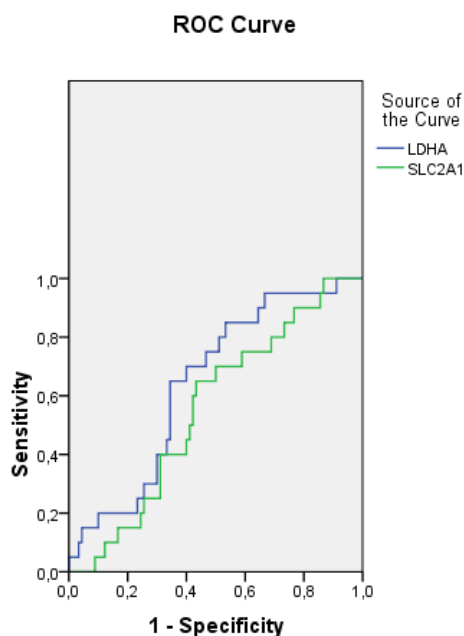
**Figura 87.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de SDHC ( $p = 0,026$ ).

La taula 27 mostra la distribució dels pacients en funció de les categories obtingudes en aplicar els arbres de classificació i els valors de supervivència lliure de recidiva local a 5 anys en aplicar els punts de tall obtinguts en cadascuna de les determinacions.

**Taula 27.** Distribució dels pacients en funció dels punts de tall obtinguts en els CRT i supervivència lliure de recidiva local (rT) a 5 anys per a cadascuna de les categories.

	<b>Punts de tall</b>	<b>N</b>	<b>Sup 5 anys lliure rT (IC 95%)</b>	<b>p</b>
<b>LDHA</b>	≤ 802,27	45	92,8% (85,0-100%)	0,009
	> 802,27	65	72,0% (60,6-83,4%)	
<b>LDHB</b>	≤ 211,45	68	75,4% (64,8-86,0%)	0,083
	> 211,45	41	89,3% (79,3-99,3%)	
<b>SLC2A1</b>	≤ 260,38	58	86,8% (77,6-96,0%)	0,101
	> 260,38	52	73,8% (61,5-86,1%)	
<b>SLC2A3</b>	≤ 44,71	85	76,6% (67,4-85,8%)	0,061
	> 44,71	25	96,0% (88,4-100%)	
<b>SLC16A3</b>	≤ 27,84	67	74,0% (63,4-84,6%)	0,026
	> 27,84	43	91,9% (83,1-100%)	
<b>PFKL</b>	≤ 4,27	69	74,8% (64,0-85,6%)	0,068
	> 4,27	41	90,1% (80,9-99,3%)	
<b>DLAT</b>	≤ 8,72	43	63,8% (49,1-78,5%)	0,00001
	> 8,72	67	91,6% (84,5-98,7%)	
<b>DLD</b>	≤ 13,49	13	50,0% (21,8-78,2%)	0,001
	>13,49- ≤27,39	40	75,7% (61,8-89,6%)	
	> 27,39	57	90,4% (82,4-98,4%)	
<b>PDHA1</b>	≤ 53,10	58	72,5% (60,5-84,5%)	0,024
	> 53,10	52	89,4% (80,6-98,2%)	
<b>PDHB</b>	≤ 13,10	27	65,0% (46,6-83,4%)	0,009
	> 13,10	83	85,7% (77,9-93,5%)	
<b>PDHX</b>	≤ 13,36	55	75,6% (64,0-87,2%)	0,131
	> 13,39	55	85,4% (75,2-95,6%)	
<b>SDHA</b>	≤ 16,30	53	72,7% (60,5-84,9%)	0,039
	> 16,30	57	88,3% (79,3-97,3%)	
<b>SDHB</b>	≤ 74,37	64	75,2% (64,2-86,2%)	0,115
	> 74,37	46	88,5% (78,9-98,1%)	
<b>SDHC</b>	≤ 24,75	84	75,9% (66,3-85,5%)	0,026
	> 24,75	26	94,7% (84,7-100%)	

A la figura 88 es mostren les corbes ROC (de l'anglès "Receiver-Operating Characteristics") obtingudes en incloure els valors d'expressió dels gens en què una expressió elevada es va relacionar amb una disminució en la supervivència lliure de recidiva local, juntament amb els valors d'AUC corresponents (àrea sota la corba, de l'anglès "Area Under the Curve") (taula 28).



**Figura 88.** Corbes ROC dels gens que van mostrar nivells d'expressió elevats i disminució de la supervivència lliure de recidiva local.

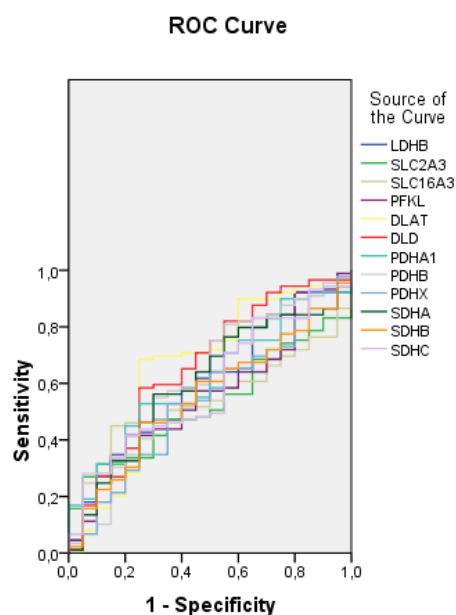
**Taula 28.** Valors AUC dels gens amb nivells d'expressió elevats i disminució de la supervivència lliure de recidiva local.

Test Result Variable(s)	Area	Asymptotic Sig. <sup>b</sup>	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
<b>LDHA</b>	<b>0,644</b>	<b>0,044</b>	0,525	0,764
SLC2A1	0,555	0,443	0,431	0,679

a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

De la mateixa manera, es presenten les corbes ROC (figura 89) i els valors de l'AUC (taula 29) per a aquells gens on un nivell d'expressió elevat es va relacionar amb un increment en la supervivència lliure de recidiva local.



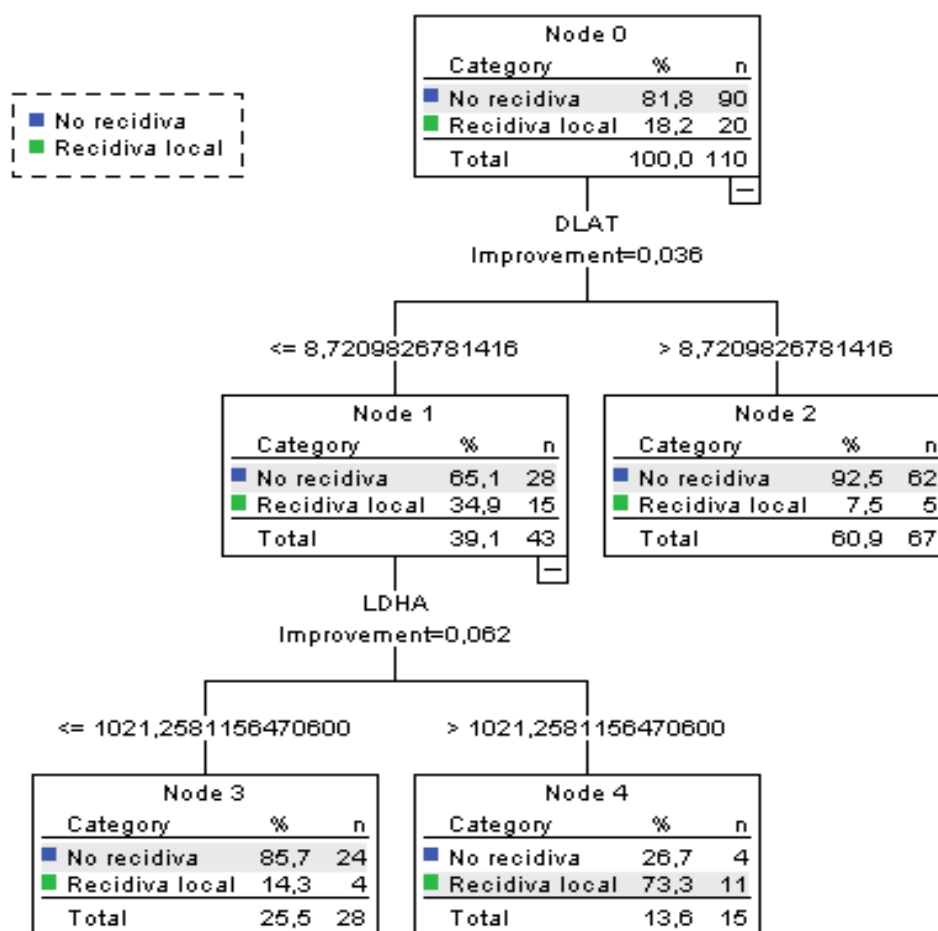
**Figura 89.** Corbes ROC dels gens que van mostrar nivells d'expressió elevats i augment de la supervivència lliure de recidiva local.

**Taula 29.** Valors AUC dels gens amb nivells d'expressió elevats i augment de la supervivència lliure de recidiva local.

	Area	p	IC 95%	
			Lower Bound	Upper Bound
LDHB	0,597	0,178	0,466	0,727
SLC2A3	0,526	0,719	0,409	0,642
SLC16A3	0,536	0,616	0,419	0,653
PFKL	0,558	0,420	0,427	0,689
<b>DLD</b>	<b>0,660</b>	<b>0,026</b>	0,522	0,798
<b>DLAT</b>	<b>0,654</b>	<b>0,032</b>	0,507	0,801
PDHA1	0,611	0,123	0,487	0,735
PDHB	0,612	0,119	0,469	0,755
PDHX	0,544	0,541	0,407	0,681
SDHA	0,603	0,150	0,471	0,736
SDHB	0,553	0,462	0,423	0,682
SDHC	0,589	0,216	0,459	0,719

De totes les determinacions realitzades, les que van aconseguir una AUC més elevada i amb un valor que va assolir la significació estadística van ser les corresponents a LDHA, DLD i DLAT.

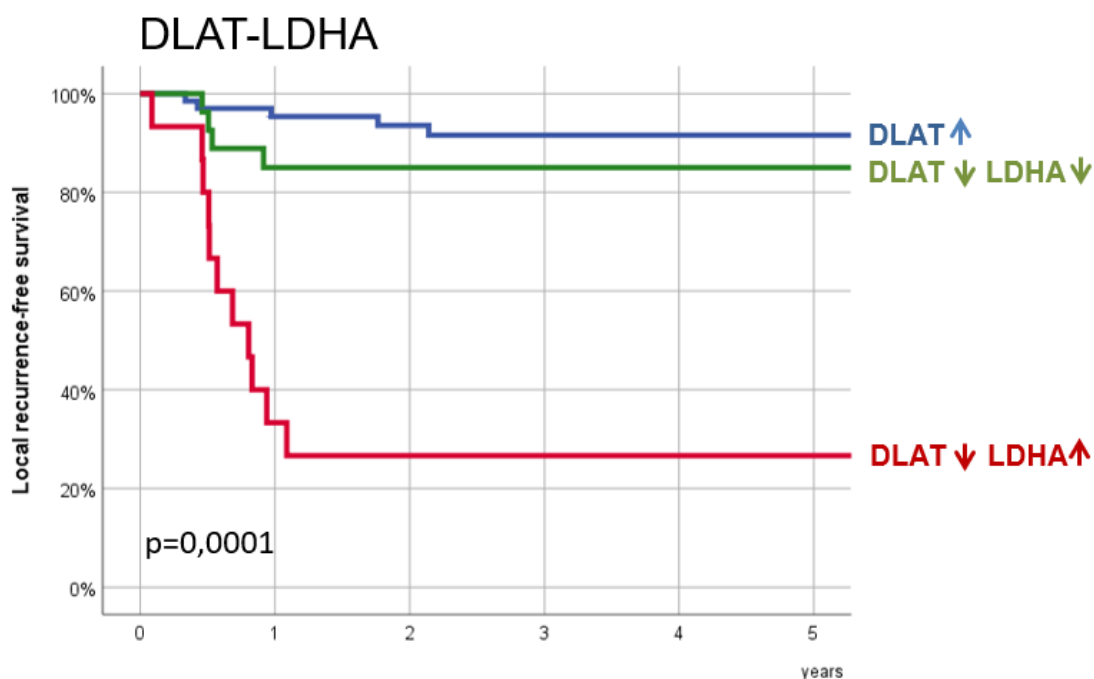
En incloure la totalitat de les determinacions efectuades en l'anàlisi de partició recursiva, es va obtenir un arbre de classificació basat en els valors transcripcionals de DLAT i de LDHA, amb una primera partició en funció de l'expressió de DLAT, i una segona partició que afectava als pacients amb una expressió baixa de DLAT en funció de l'expressió de LDHA, tal com es mostra a la figura 90.



**Figura 90.** Arbre de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basat en l'expressió dels gens DLAT i LDHA.



Quan es van aplicar les regles de l'anàlisi de partició recursiva es va aconseguir una classificació adequada del 88,2% dels pacients. En la figura següent es mostren les corbes de supervivència lliure de recidiva local en funció dels nodes terminals obtinguts amb l'anàlisi de partició recursiva (figura 91).

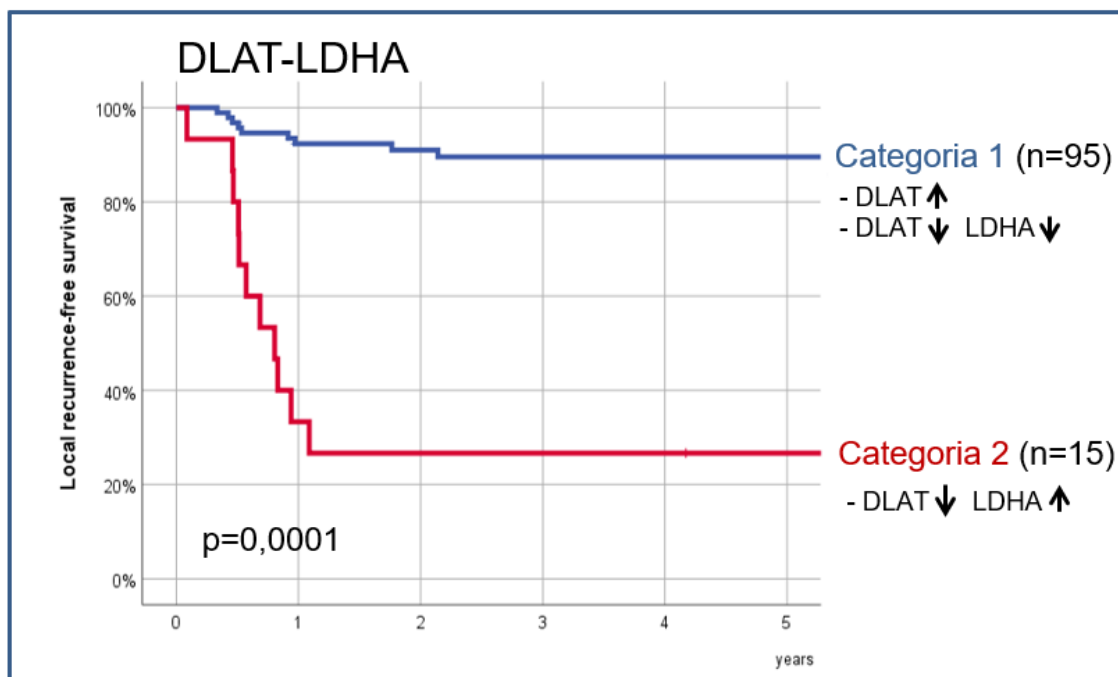


**Figura 91.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de DLAT-LDHA obtinguda amb l'anàlisi de partició recursiva.

En acabar es va procedir a agrupar els pacients amb un risc més baix de recidiva local, i es van classificar els pacients en dues categories:

- **Categoria 1:** pacients amb una expressió elevada de DLAT o pacients amb expressió baixa de DLAT i baixa de LDHA.
- **Categoria 2:** pacients amb expressió baixa de DLAT i elevada de LDHA.

Els pacients de la Categoria 1 (n=95) van tenir una supervivència lliure de recidiva local a 5 anys del 89,6% (IC 95%: 83,1-96,1%), mentre que per als pacients inclosos a la categoria 2 (n=15) va ser del 26,7% (IC 95%: 4,4-49,0%) (p=0,0001). Les corbes de supervivència lliure de recidiva local en funció de la categoria de l'expressió de DLAT-LDHA es mostren a la figura 92.



**Figura 92.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de DLAT-LDHA.

Es va dur a terme una anàlisi multivariant considerant la supervivència lliure de recidiva local com la variable dependent incloent-hi, en el model, la categoria en l'expressió de DLAT-LDHA com a variable independent (taula 30).

**Taula 30.** Anàlisi multivariant amb la categoria de l'expressió DLAT-LDHA com a variable independent.

		HR*	CI 95% HR	p
<b>Localització</b>	Cavitat oral	1		
	Orofaringe	0	0	0,987
	Hipofaringe	0,74	0,07-7,78	0,807
	Laringe	0,51	0,15-1,72	0,280
<b>Categoria pT</b>	pT1-2	1		
	pT3-4	4,83	0,97-24,01	0,054
<b>Categoria pN</b>	pN0	1		

	pN+	1,22	0,44-2,23	0,414
<b>Marges resecció</b>	Negatiu	1		
	Proper	0,56	0,14-2,23	0,414
	Positiu	8,21	1,85-34,49	<b>0,006</b>
<b>Tractament adjuvant</b>	No	1		
	Radioteràpia	0,61	0,19-1,91	0,397
	Quimioteràpia	0,75	0,13-4,08	0,741
<b>Expressió</b>	Categoria 1	1		
<b>DLAT-LDHA</b>	Categoria 2	16,82	5,10-55,37	<b>0,0001</b>

HR\*: Hazard ratio

Les variables que es van relacionar de manera significativa amb la recidiva local del tumor van ser l'estat dels marges de resecció i la categoria de l'expressió de DLAT-LDHA.

En comparació amb els pacients amb marges negatius, els pacients amb marges positius van tenir un risc 8,21 vegades superior de recidiva local (IC 95%: 1,85-34,49%; p=0.006).

Comparat amb els pacients inclosos en la Categoria 1, els pacients de la Categoria 2 (expressió baixa de DLAT i elevada de LDHA) van tenir un risc 16,82 vegades superior de recidiva local (IC 95%: 5,10-55,37%; p=0,0001).

Els pacients amb tumors localment avançats (pT3-4) van tenir una tendència a presentar un risc més gran de recidiva local, però sense que les diferències assolissin la significació estadística (HR 4,83; IC 95%: 0,97-24,01%; p=0,054).

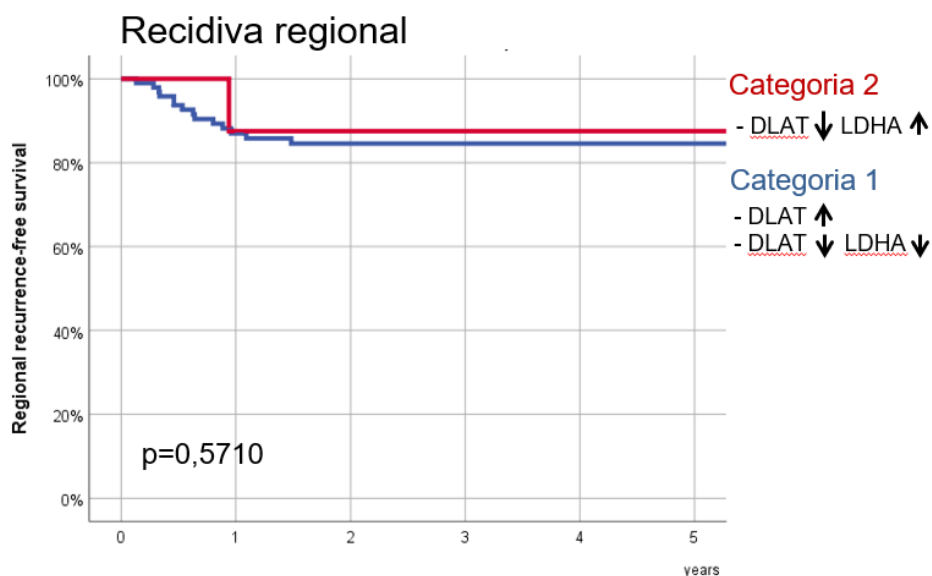
Es va analitzar si hi havia relació entre l'estat dels marges de resecció i la categoria en l'expressió de DLAT-LDHA. Tal com mostra la taula següent (Taula 31), no van aparèixer diferències significatives en l'estat dels marges de resecció en funció de la categoria d'expressió transcripcional de DLAT-LDHA (p=0,218).

**Taula 31.** Relació entre l'estat dels marges de resecció i la categoria d'expressió transcripcional de DLAT-LDHA.

		Categoria DLAT_LDHA		Total
		Categoria 1	Categoria 2	
Marges	Negatius	78 82,1%	10 66,7%	88 80,0%
	Propers	11 11,6%	4 26,7%	15 13,6%
	Positius	6 6,3%	1 6,7%	7 6,4%
Total		95 100,0%	15 100,0%	110 100,0%

Seguidament, es va analitzar la supervivència lliure de recidiva regional, a distància i la supervivència específica en funció de la categoria d'expressió transcripcional de DLAT-LDHA.

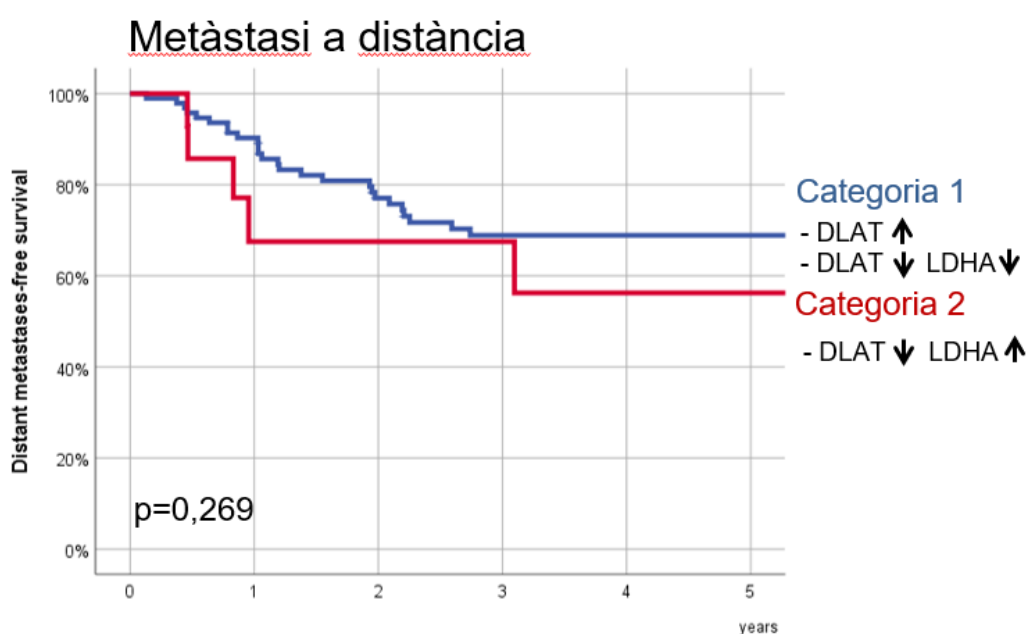
La figura següent (figura 93) mostra la supervivència lliure de recidiva regional en funció de l'expressió de DLAT-LDHA.



**Figura 93.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva regional a 5 anys i la categoria d'expressió de DLAT-LDHA.

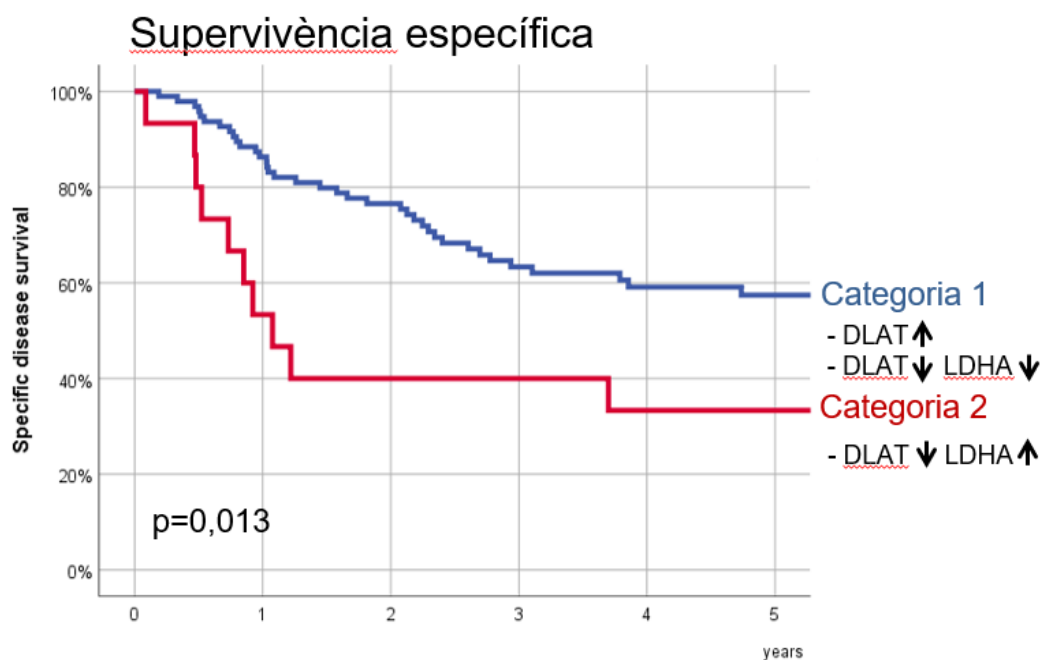
No van aparèixer diferències en el control regional de la malaltia en funció de la categoria d'expressió de DLAT-LDHA ( $p=0,5710$ ). La supervivència lliure de recidiva regional a 5 anys per als pacients de la Categoria 1 va ser del 84,5% (IC 95%: 77,1-91,9%), i per als pacients de la Categoria 2 del 87,5% (IC 95%: 64,6- 100%).

Igualment, tampoc van aparèixer diferències en el control a distància del tumor en funció de l'expressió de DLAT-LDHA ( $p=0,269$ ) (Figura 94). La supervivència a 5 anys lliure de metàstasi a distància per als pacients de la Categoria 1 va ser del 68,9% (IC 95%: 58,9-78,9%) i per als pacients de la Categoria 2 del 56,3% (IC 95%: 26,3 -86,3%).



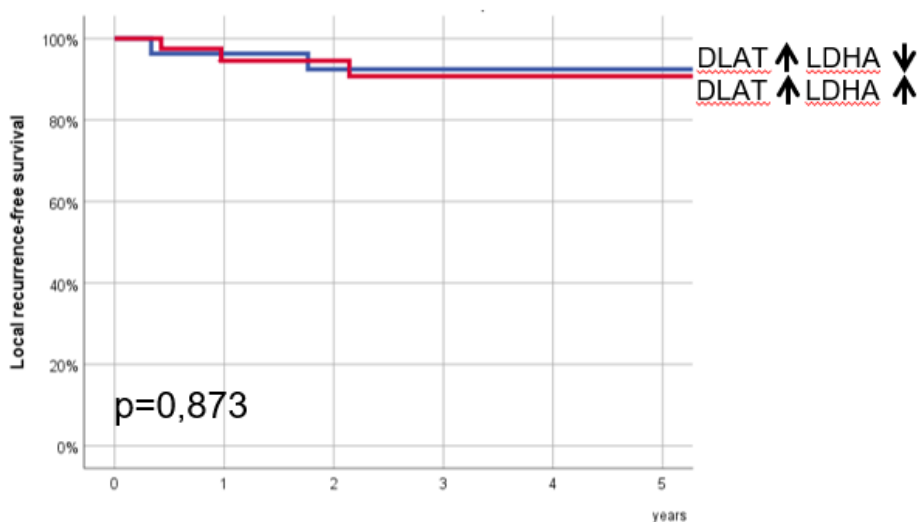
**Figura 94.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de metàstasi a distància a 5 anys i la categoria d'expressió de DLAT-LDHA.

En canvi, sí que van aparèixer diferències estadísticament significatives en la supervivència específica dels pacients segons l'expressió transcripcional de DLAT-LDHA ( $p=0,013$ ) (figura 95). La supervivència específica a 5 anys per als pacients de la Categoria 1 va ser del 57,4% (IC 95%: 46,8-68,0%) i la dels pacients de la Categoria 2 del 33,3% (IC 95%: 9,4-57,2%).



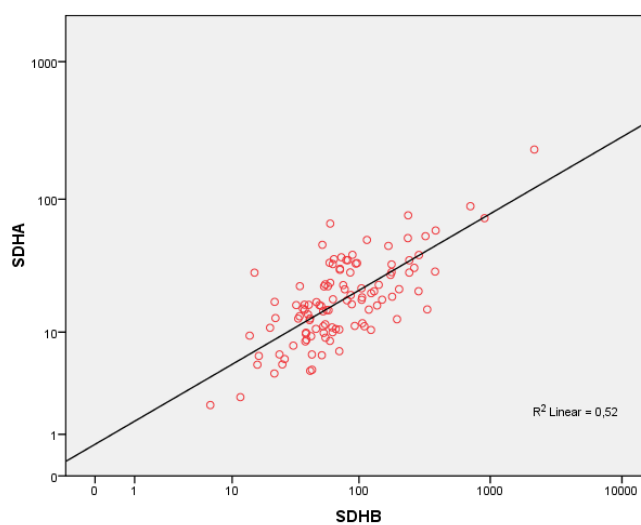
**Figura 95.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència específica a 5 anys i la categoria d'expressió de DLAT-LDHA.

Per als pacients amb una expressió elevada de DLAT (n=67), el control local de la malaltia no va diferir en funció de l'expressió de LDHA ( $p=0,873$ ). No van existir diferències en la supervivència lliure de recidiva local entre els pacients amb una expressió transcripcional baixa (n=27) o elevada (n=40) de LDHA (figura 96).

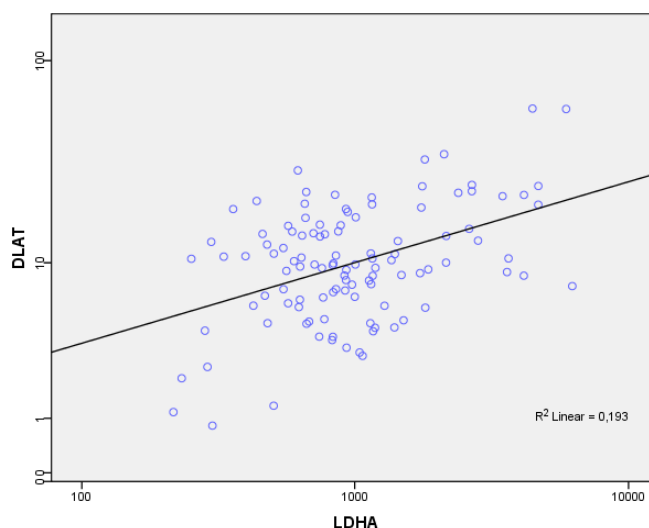


**Figura 96.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys en pacients amb DLAT elevada en funció de l'expressió de LDHA.

Hi va haver un grau de correlació significatiu entre els valors transcripcionals d'alguns dels diferents gens analitzats. La taula 32 mostra els coeficients de correlació de Pearson existents entre les diferents determinacions realitzades. S'assenyalen en vermell les correlacions amb un coeficient superior a 0,5. La correlació més elevada entre totes les determinacions dutes a terme va correspondre als valors d'expressió transcripcional de SDHA i SDHB (coeficient  $r=0,884$ ) (figura 97). La correlació entre els valors d'expressió de DLAT i LDHA va ser de 0,502 (figura 98).



**Figura 97.** Correlació entre els valors d'expressió transcripcional de SDHA i SDHB.



**Figura 98.** Correlació entre els valors d'expressió transcripcional de DLAT i LDHA

**Taula 32.** Correlacions entre els valors d'expressió transcripcional dels gens analitzats.

	LDHA	LDHB	PK1	HK1	SUCNR	SLC2A1	SLC2A3	SLC16A3	SLC16A7	PFKL	DLD	DLAT	PDHA1	PDHB	PDHX	SDHA	SDHB	SDHC
HIF1A	0,438 0,000 110	<b>0,538</b> 0,000 109	0,393 0,000 110	0,463 0,000 110	0,204 0,033 110	0,349 0,000 110	0,418 0,000 110	0,266 0,005 110	0,400 0,000 110	<b>0,503</b> 0,000 110	<b>0,637</b> 0,000 110	<b>0,668</b> 0,000 110	0,109 0,255 110	<b>0,542</b> 0,000 110	0,466 0,000 110	<b>0,618</b> 0,000 110	<b>0,584</b> 0,000 110	0,216 0,024 110
LDHA		0,353 0,000 109	0,383 0,000 110	0,474 0,000 110	0,211 0,027 110	0,396 0,000 110	-0,014 0,885 110	0,168 0,079 110	0,180 0,060 110	0,459 0,000 110	0,485 0,000 110	<b>0,502</b> 0,000 110	0,217 0,023 110	0,412 0,000 110	0,459 0,000 110	0,481 0,000 110	<b>0,541</b> 0,000 110	0,343 0,000 110
LDHB			0,453 0,000 109	<b>0,526</b> 0,000 109	0,227 0,018 109	0,305 0,001 109	0,063 0,517 109	0,167 0,082 109	0,341 0,000 109	<b>0,528</b> 0,000 109	<b>0,736</b> 0,000 109	<b>0,648</b> 0,000 109	0,189 0,049 109	<b>0,661</b> 0,000 109	<b>0,667</b> 0,000 109	<b>0,728</b> 0,000 109	<b>0,697</b> 0,000 109	0,407 0,000 109
PK1				<b>0,616</b> 0,000 110	0,383 0,000 110	0,389 0,000 110	0,153 0,111 110	0,246 0,010 110	0,263 0,006 110	<b>0,567</b> 0,000 110	<b>0,649</b> 0,000 110	<b>0,587</b> 0,000 110	0,291 0,002 110	<b>0,574</b> 0,000 110	<b>0,588</b> 0,000 110	0,475 0,000 110	0,454 0,000 110	<b>0,545</b> 0,000 110
HK1					0,214 0,025 110	<b>0,618</b> 0,000 110	0,015 0,877 110	0,338 0,000 110	0,211 0,027 110	<b>0,744</b> 0,000 110	<b>0,686</b> 0,000 110	<b>0,615</b> 0,000 110	0,328 0,000 110	<b>0,599</b> 0,000 110	<b>0,727</b> 0,000 110	<b>0,681</b> 0,000 110	<b>0,614</b> 0,000 110	<b>0,587</b> 0,000 110
SUCNR-1						0,146 0,128 110	0,155 0,106 110	0,302 0,001 110	0,128 0,183 110	0,304 0,001 110	0,335 0,000 110	0,356 0,000 110	0,032 0,742 110	0,303 0,001 110	0,367 0,000 110	0,291 0,002 110	0,328 0,000 110	0,111 0,248 110



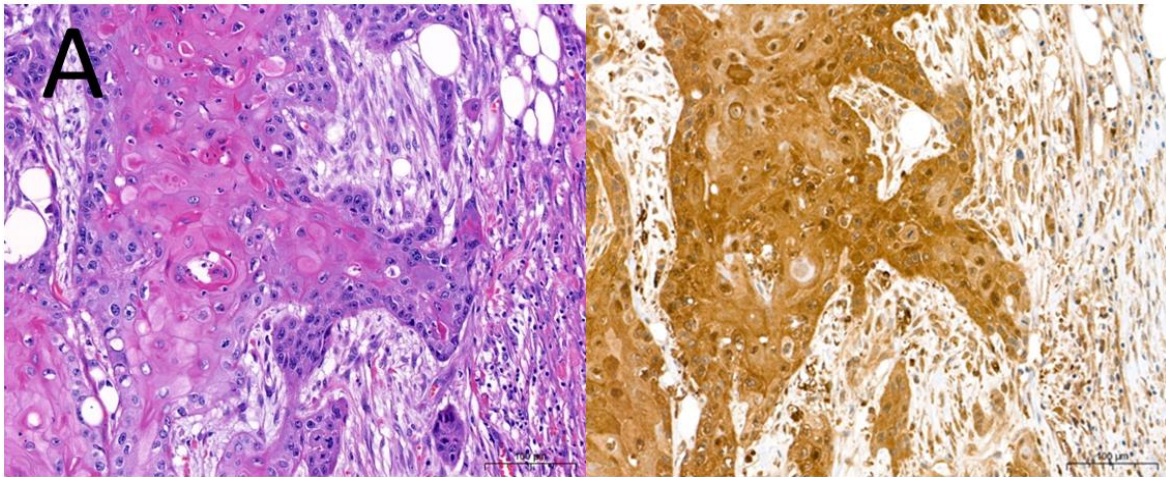


PDHA1														0,328	0,123	0,147	0,153	<b>0,641</b>
														0,000	0,201	0,126	0,111	0,000
														110	110	110	110	110
PDHB															<b>0,603</b>	<b>0,662</b>	<b>0,648</b>	<b>0,505</b>
														0,000	0,000	,000	0,000	
														110	110	110	110	
PDHX																<b>0,814</b>	<b>0,853</b>	<b>0,535</b>
															0,000	0,000	0,000	
															110	110	110	
SDHA																	<b>0,884</b>	0,449
																	0,000	0,000
																	110	110
SDHB																		0,439
																		0,000
																		110

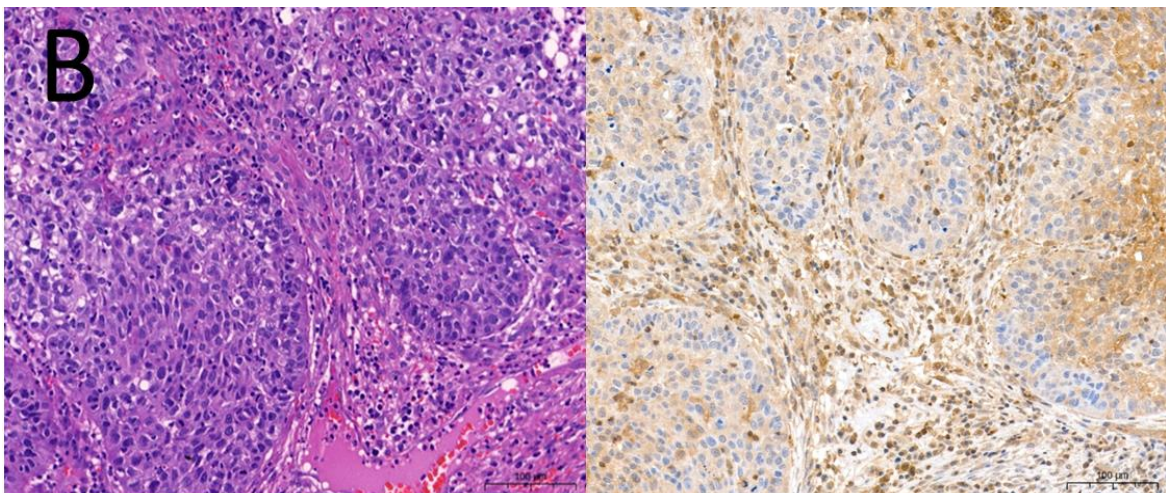
## 2.1. Correlació entre l'expressió transcripcional i immunohistoquímica de LDHA

Amb l'objectiu de determinar la correlació entre l'expressió transcripcional i l'expressió immunohistoquímica de LDHA, es va dur a terme un estudi en 14 pacients: set amb una expressió transcripcional elevada de LDHA i 7 amb una expressió baixa. En l'àmbit immunohistoquímic, LDHA va mostrar una expressió predominantment citoplasmàtica.

En les figures següents (figures 99 A-D) es mostren exemples que es corresponen amb diversos patrons immunohistoquímics d'expressió de LDHA, tant a les cèl·lules tumorals com estromals.

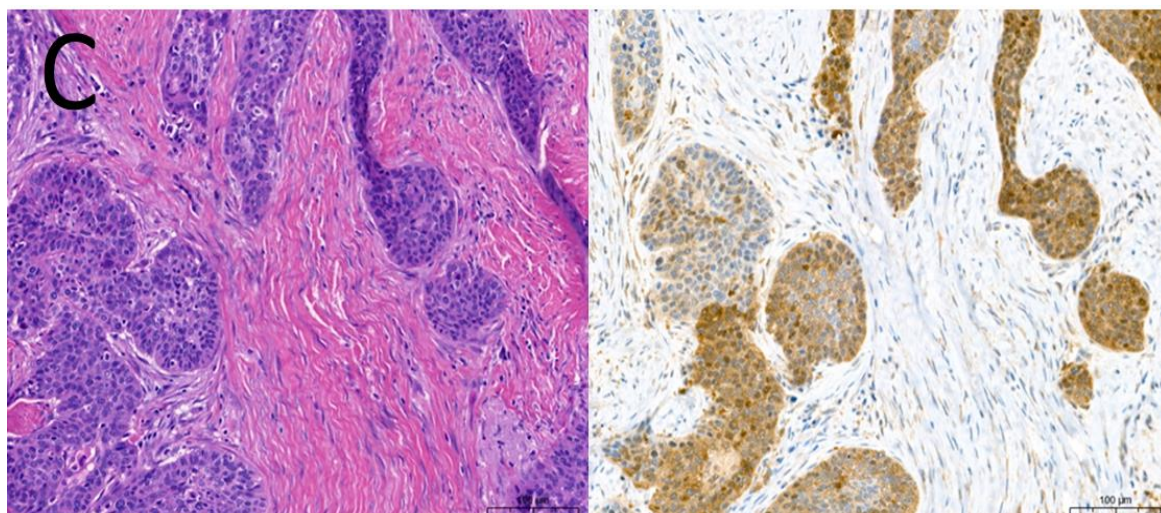


**Figura 99 A.** Expressió IHQ de LDHA. **Esquerra:** CE queratinitzant (HEx200). **Dreta:** expressió elevada al tumor (puntuació 4+) i a l'estroma (puntuació 3+) (Cortesia: Dra. Lejeune).

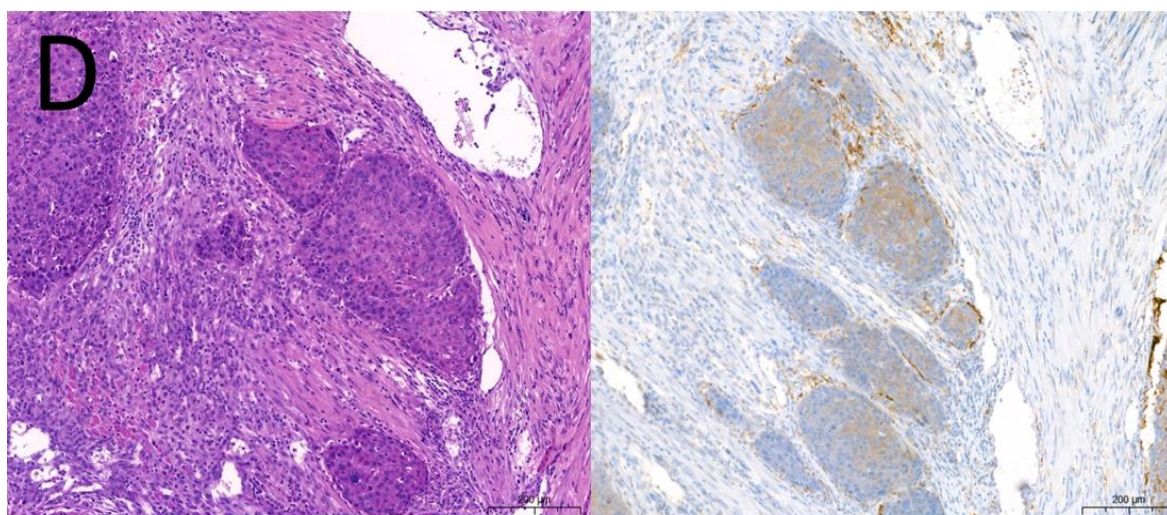


**Figura 99 B.** Expressió IHQ de LDHA. **Esquerra:** CE mal diferenciat (HEx200). **Dreta:** expressió elevada a l'estroma (puntuació 3+) i reduïda al tumor (puntuació 2+) (Cortesia: Dra. Lejeune).





**Figura 99 C.** Expressió IHQ de LDHA. **Esquerra:** carcinoma escatós (HEx200). **Dreta:** expressió elevada al tumor (puntuació 3+) i reduïda a l'estroma (puntuació 1+) (Cortesia: Dra. Lejeune).



**Figura 99 D.** Expressió IHQ de LDHA. **Esquerra:** carcinoma escatós (HEx100). **Dreta:** expressió reduïda al tumor (puntuació 1+) i a l'estroma (puntuació 2+) (Cortesia: Dra. Lejeune).

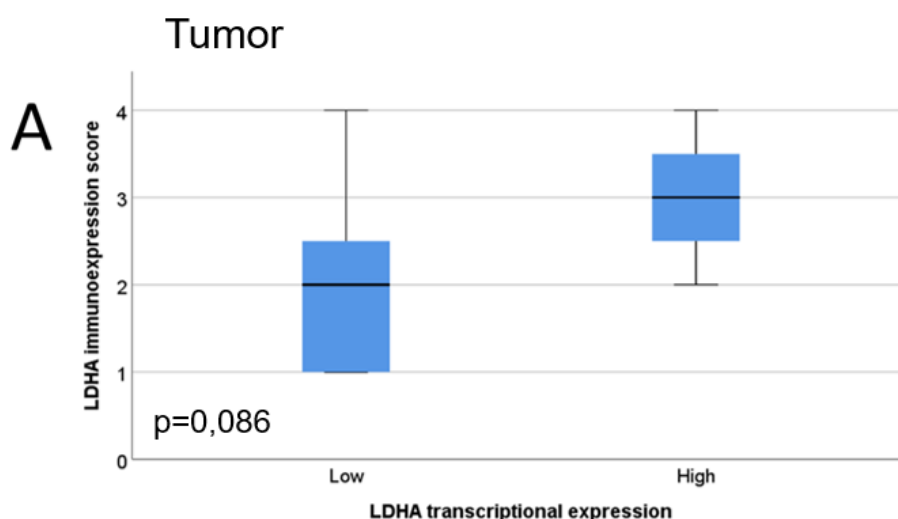
Les puntuacions obtingudes en la valoració immunohistoquímica de les mostres analitzades en funció de l'expressió de LDHA es mostren a la taula següent (taula 33).

**Taula 33.** Relació entre l'expressió transcripcional i l'expressió immunohistoquímica de LDHA.

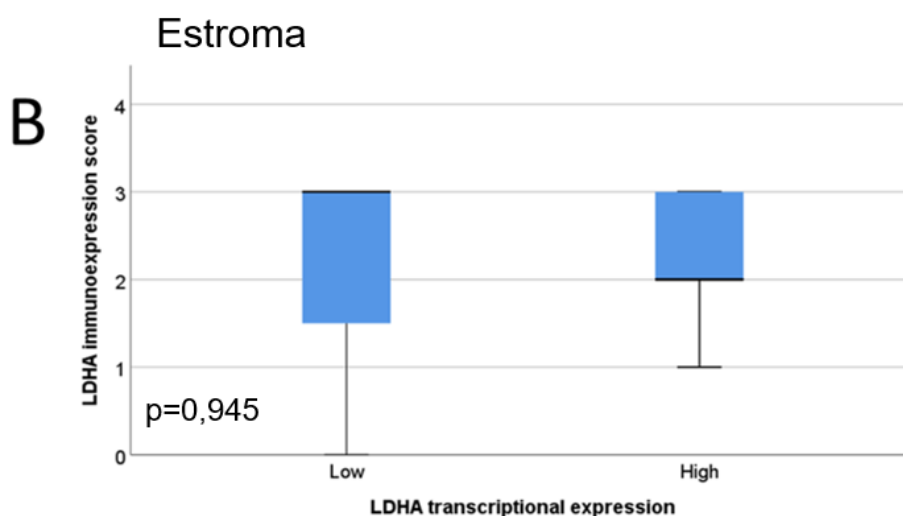
Cas	Expressió transcripcional LDHA	Puntuació tumor	Puntuació estroma
1	Elevada	3	3
2	Elevada	4	2

3	Elevada	2	2
4	Elevada	2	1
5	Elevada	4	3
6	Elevada	3	2
7	Elevada	3	3
8	Baixa	1	2
9	Baixa	1	3
10	Baixa	4	3
11	Baixa	1	3
12	Baixa	2	3
13	Baixa	3	1
14	Baixa	2	0

En els pacients amb una expressió transcripcional elevada de LDHA, les cèl·lules tumorals van tenir una tendència a mostrar uns nivells d'immunopositivitat més elevats de LDHA però sense que les diferències arribessin a la significació estadística ( $p=0,086$ ). Respecte a l'estroma, no van aparèixer diferències entre els nivells d'immunopositivitat de LDHA en funció de l'expressió transcripcional de LDHA ( $p=0,945$ ). A la figura 100 (A-B) es mostren els nivells d'immunopositivitat al tumor (A) i a l'estroma (B) en funció de l'expressió transcripcional de LDHA.



**Figura 100-A.** Relació entre els valors de l'expressió immunohistoquímica i l'expressió transcripcional de LDHA en les cèl·lules tumorals.



**Figura 100-B.** Relació entre els valors de l'expressió immunohistoquímica i l'expressió transcripcional de LDHA en les cèl·lules estromals.

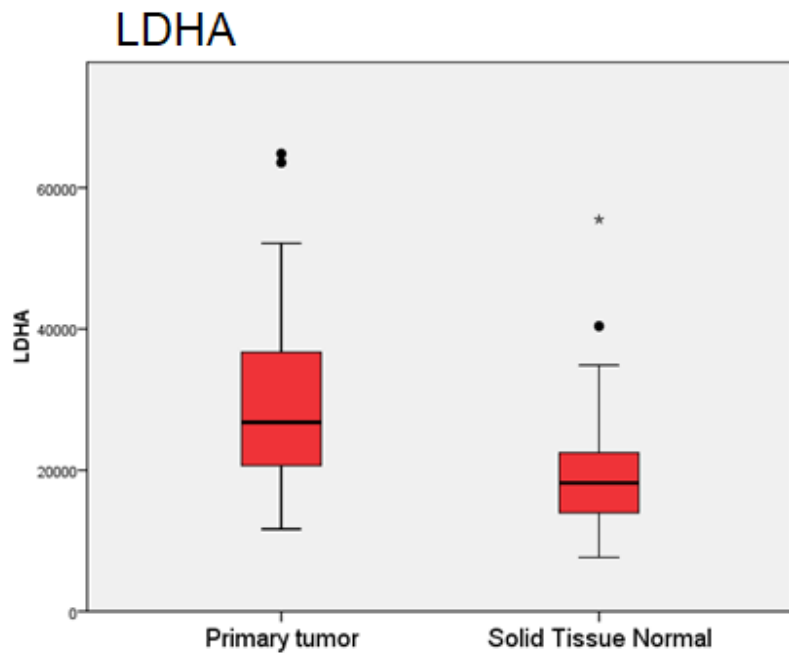
## 2.2. Nivells d'expressió transcripcional DLAT/LDHA en tumor i mucosa sana (TCGA)

Es van comparar els nivells d'expressió transcripcional de LDHA i DLAT en 43 mostres aparellades de tumor i mucosa sana de pacients amb CECC inclosos al TCGA. La taula següent mostra els valors promig corresponents a cadascun dels tipus de teixit (taula 34).

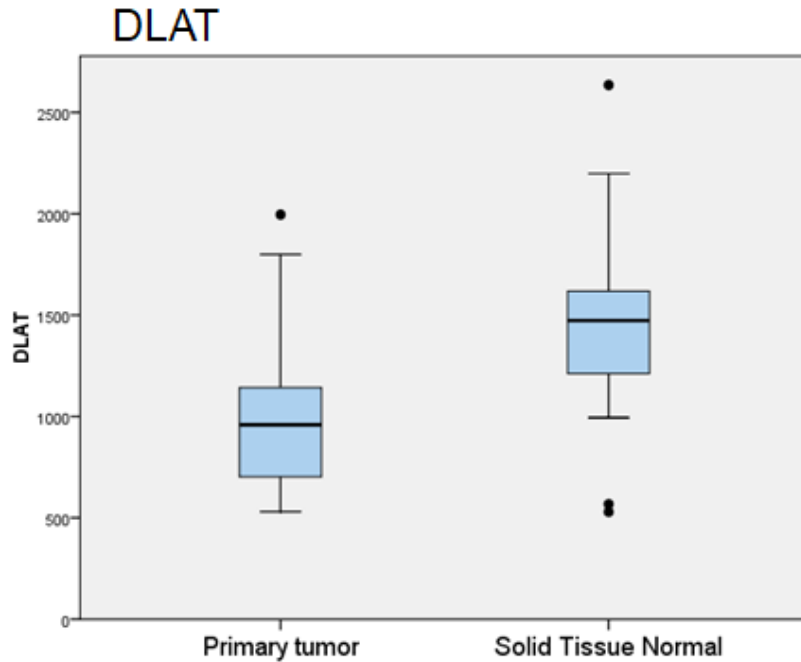
**Taula 34.** Comparació dels nivells transcripcionals de LDHA i DLAT entre tumor i mucosa sana en pacients amb CECC (TCGA).

	Mean	N	Std. Deviation
LDHA tumor	29730,07	43	13611,99
LDHA sana	19766,26	43	9021,70
DLAT tumor	988,91	43	346,96
DLAT sana	1531,22	43	548,45

Hi va haver diferències significatives en l'expressió dels dos gens en funció del tipus de teixit analitzat ( $p=0,0001$ ). En el cas de LDHA, les mostres de tumor van comptar amb uns nivells d'expressió transcripcional significativament superiors (figura 101). Per contra, en el cas de DLAT les mostres de tumor van mostrar uns valors d'expressió transcripcional significativament inferiors respecte al teixit normal (figura 102).



**Figura 101.** Nivells d'expressió transcripcional de LDHA en teixit tumoral i mucosa sana.



**Figura 102.** Nivells d'expressió transcripcional de DLAT en teixit tumoral i mucosa sana.





## VI. DISCUSSIÓ

---

## VI. DISCUSSIÓ

Malgrat el coneixement, des de fa molts anys, que les alteracions del metabolisme cel·lular estan implicades en el desenvolupament del càncer (Warburg, 1927) tradicionalment, la recerca s'ha centrat sobretot en l'estudi de l'activació o pèrdua de funció d'oncogens i gens supressors tumorals. Això no obstant, la desregulació del metabolisme ja es considera un segell distintiu del càncer (Hanahan *et al.*, 2011) i, en la darrera dècada, l'estudi del metabolisme i la seva relació amb la patogènesi del càncer ha esdevingut una línia de gran interès, principalment en la cerca de biomarcadors de diagnòstic, pronòstic i, amb més entusiasme, de tractament (dianes terapèutiques) en el càncer en general i també en el CECC.

En aquest treball s'han estudiat una sèrie de gens relacionats amb el metabolisme amb el propòsit de trobar biomarcadors amb capacitat pronòstica - més concretament amb capacitat de predir la recidiva local - en dues cohorts de pacients amb CECC tractats amb radioteràpia i cirurgia, respectivament. La discussió sobre les troballes en cadascun d'aquests grups es farà de forma separada.

### 1. Expressió SLC2A3/SDHA en la cohort de radioteràpia

La radioteràpia és un pilar del tractament del càncer de cap i coll. Amb tot i amb això, la morbiditat d'aquest tractament continua sent un repte clínic. El coneixement del perfil molecular ha proporcionat més informació sobre la biologia del tumor i la sensibilitat del tumor a la RT. Així, la identificació de biomarcadors pot permetre una millor estratificació dels pacients en funció de la previsió de la seva resposta al tractament.

En el CECC la mortalitat relacionada amb la malaltia es deu principalment a un fracàs locoregional, per la qual cosa és imprescindible comprendre els mecanismes de la radioresistència. S'ha vist que l'augment de l'activitat glicolítica en el CECC és un factor important per a l'avanç de la malaltia i la metastasi i condueix a una disminució de la sensibilitat a la quimioteràpia i la radioteràpia. Per altra part, se sap també que la RT afecta diversos processos cel·lulars per promoure el dany cel·lular i, consegüentment, desencadenar la mort del tumor. Alguns d'aquests mecanismes cel·lulars alterats per la irradiació inclouen la reparació de l'ADN, la regulació del cicle cel·lular i la reoxigenació dels tumors. En una revisió recent sobre diversos biomarcadors de sensibilitat a la radioteràpia en el CECC, Pardo-Reoyo *et al.* (2016) apunten a l'expressió de microRNAs, a signatures o perfils d'expressió de gens relacionats amb la transició epitelial-mesenquimal (EMT) i a algunes vies de

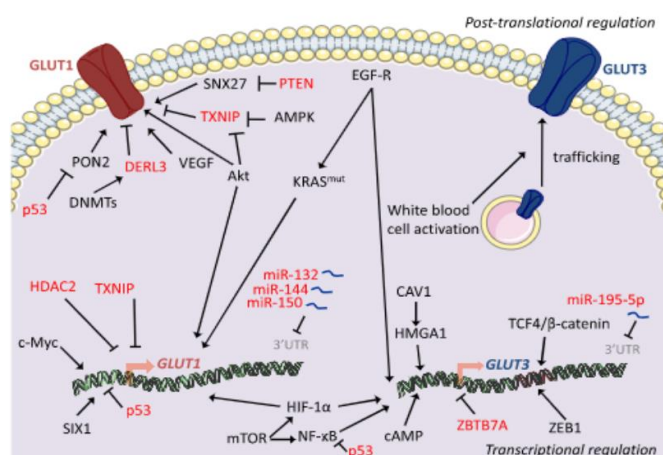
senyalització com EGFR-PI3K/AKT, però no es fa cap esment a biomarcadors relacionats amb el metabolisme cel·lular.

Segons els resultats del nostre estudi, l'avaluació de l'expressió transcripcional del gen SLC2A3 conjuntament amb SDHA en 120 pacients amb CECC tractats amb RT o QT-RT ha permès definir un grup de pacients amb un risc elevat de recidiva local del tumor després del tractament. Els pacients amb una expressió elevada tant de SLC2A3 com de SDHA van mostrar un risc de recidiva local 4,24 vegades superior a la resta de pacients.

### 1.1. SLC2A3

SLC2A3 és un gen facilitador de la difusió o transport de glucosa a través de la membrana plasmàtica de les cèl·lules i és responsable de la captació de glucosa constitutiva o basal (figura 103).

Els portadors de soluts de la família dels transportadors de glucosa (SLC, de l'anglès "Solut Carrier Family") intervenen en el primer pas per a l'ús de la glucosa cel·lular. L'augment de la captació de glucosa és una característica reconeguda de les cèl·lules canceroses: les cèl·lules tumorals tenen un metabolisme accelerat i una alta demanda de glucosa en un entorn pobre en nutrients. La combinació d'aquests factors pot provocar una dependència metabòlica d'un subministrament continu d'energia i nutrients i això sovint s'associa amb una expressió desregulada dels transportadors de glucosa, especialment GLUT1 i GLUT3, codificats pels gens SLC2A1 i SLC2A3, respectivament (Ancey *et al.*, 2018).

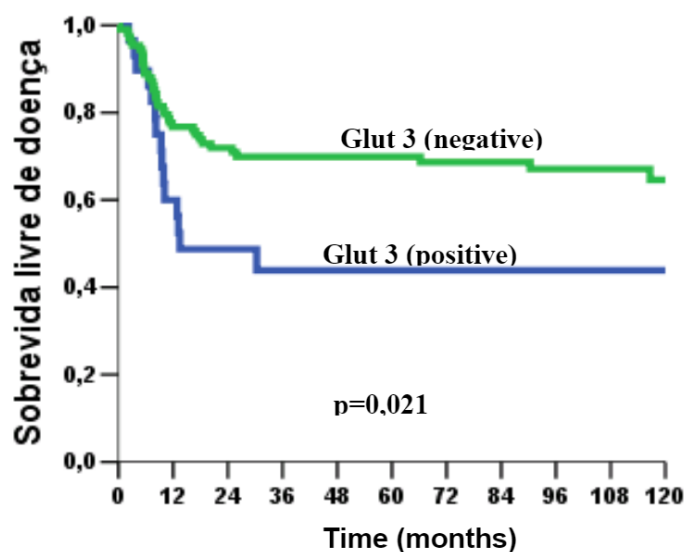


**Figura 103.** Mecanismes de desregulació de GLUT1 i GLUT3 en el càncer (Font: Ancey P *et al.* The FEBS journal 2018).

L'expressió elevada dels transportadors de glucosa (o, si és el cas, dels gens que codifiquen aquests transportadors) s'ha relacionat amb una disminució de la supervivència i amb la resistència al tractament en la majoria de models de càncer, inclòs el CECC (Ancey *et al.*, 2018; Chen X *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2008).

Baer *et al.* (2002), per exemple, van trobar una associació significativa entre l'expressió immunohistoquímica de GLUT3 i una pitjor supervivència en pacients amb carcinomes de laringe tractats amb cirurgia i/o radioteràpia.

En un altre estudi en pacients amb CE de cavitat oral tractats amb cirurgia, Ayala *et al.* (2010) van comprovar que l'expressió immunohistoquímica elevada de SLC2A3 constituïa un indicador de mal pronòstic, amb un risc significativament augmentat de recidiva local i una supervivència disminuïda, tant en les anàlisis univariants com multivariants (figura 104). Segons aquests autors, l'augment del metabolisme glicolític en les cèl·lules tumorals més agressives d'aquests pacients indicaria un valor pronòstic potencial per a estratificar els pacients segons el risc.



**Figura 104.** Anàlisi de Kaplan Meier de la supervivència lliure de malaltia i el patró de tinció immunohistoquímica de GLUT3 ( $p = 0,021$ ) (Font: Ayala F *et al.* Molecules 2010).

En un estudi realitzat en pacients amb CE de llengua tractats amb cirurgia, Estilo *et al.* (2009) van trobar una associació significativa entre l'expressió transcripcional elevada

de SLC2A3 i la profunditat de la invasió, la mida del tumor, l'estadi patològic i el risc de recidiva.

Per la seva banda, Starska *et al.* (2015) van trobar un augment de l'expressió transcripcional i immunohistoquímica de SLC2A3 en el teixit tumoral en relació amb el teixit laringi normal adjacent en pacients amb carcinomes de laringe localment avançats tractats amb cirurgia. Els tumors amb una expressió elevada de SLC2A3 mostraven una tendència a tenir una supervivència pitjor, però les diferències no van assolir significació estadística.

Més recentment, Botha *et al.* (2021) han revisat el paper dels transportadors de glucosa en el CE de cavitat oral (meta-anàlisi) i han conclòs que SLC2A1 i SLC2A3 tindrien un paper en la fisiopatologia del CE de cavitat oral i podrien representar biomarcadors valuosos per ajudar en el diagnòstic i el pronòstic d'aquest tipus de tumor.

A més a més, l'expressió transcripcional de SLC2A3 apareix en les signatures genètiques associades amb el pronòstic i la resposta al tractament en pacients amb CECC. Han Y *et al.* (2021) van construir un model pronòstic de gens relacionats amb la hipòxia en el CE de cavitat oral que inclou SLC2A3. Altrament, Lu W *et al.* (2021) van desenvolupar una signatura genètica pronòstica i de resposta a la quimioteràpia relacionada amb la ferroptosi. La ferroptosi és una forma de mort cel·lular descoberta recentment que està impulsada per la peroxidació lipídica depenent del ferro i està controlada per nombroses vies metabòliques. L'evidència acumulada indica que la ferroptosi està relacionada amb la supressió del tumor i té propietats antitumorals, especialment en casos amb resistència adquirida als fàrmacs. SLC2A3 codifica el transportador de glucosa 3 (GLUT3), que pot inhibir la ferroptosi i, d'aquesta manera, facilitar el desenvolupament del tumor.

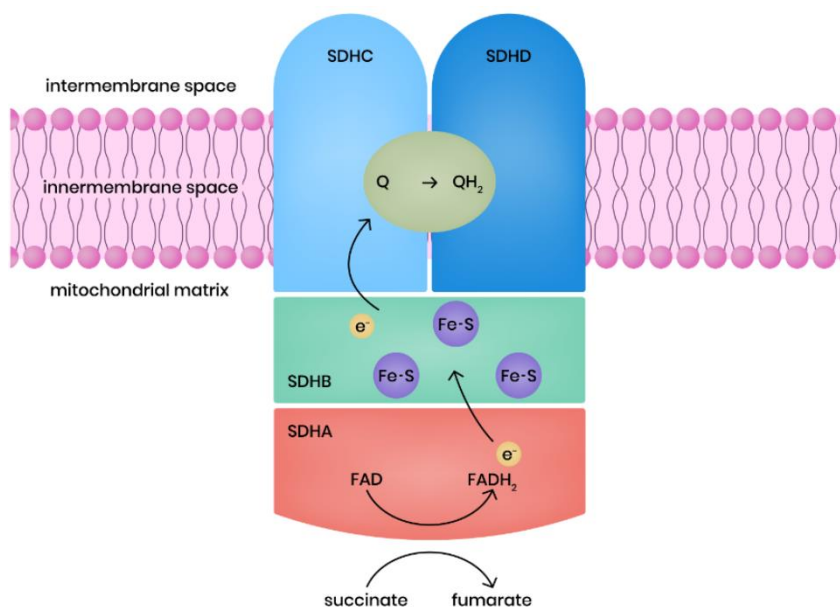
D'acord amb el nostre coneixement, no hi ha estudis que hagin analitzat la relació entre l'expressió de SLC2A3 i la resposta a la RT. Per contra, sí que s'ha trobat relació entre l'expressió de SLC2A1 (que codifica per GLUT1) i la resposta a la RT en pacients amb CECC. Kunkel *et al.* (2007) van detectar que els pacients amb CE de cavitat oral amb una expressió immunohistoquímica elevada de SLC2A1 a les biòpsies pretractament tenien una major resistència a la RT. Segons els seus resultats, els tumors amb >65% de cèl·lules GLUT-1+ eren més resistents a la radiació ( $p=0,023$ ). Per la seva banda, Chen RY *et al.* (2017) van analitzar l'expressió immunohistoquímica de SLC2A1 en mostres de biòpsia pretractament de 60 pacients amb càncer d'orofaringe o hipofaringe

p16 negatius tractats amb RT o QT-RT i van observar una disminució significativa de la supervivència lliure de malaltia i de la supervivència específica en els tumors amb una expressió immunohistoquímica de SLC2A1 elevada. En un treball amb xenoempelts, Bao *et al.* (2015) van trobar que la sobreexpressió de GLUT-1 podria estar implicada en la radioresistència del carcinoma de laringe in vivo i que es podia afavorir la radiosensibilitat a costa de la supressió de l'expressió de GLUT-1.

Tots aquests treballs (siguin sobre SLC2A1 o SLC2A3 ) estan en consonància amb les nostres troballes en el sentit que, en el CECC, l'expressió elevada -a nivell transcripcional o immunohistoquímic- d'aquests gens es correlaciona amb un pitjor pronòstic.

## 1.2. SDHA

SDH és un enzim mitocondrial heterotetramèric que té un paper en el cicle de l'àcid tricarboxílic (ATC) i en la cadena de transport d'electrons mitocondrials com a complex II. La subunitat succinat-deshidrogenasa A (SDHA) és un enzim metabòlic essencial que converteix el succinat en fumarat i acobla funcionalment el flux del cicle ATC amb la transferència d'electrons (ETC, de l'anglès "Electron Transport Chain") associada a la fosforilació oxidativa (OxPhos).



**Figura 105.** Complex succinat deshidrogenasa (CSD) simplificat (Font: Eijkelenkamp K *et al.* Clin Genet. 2020).

Generalment, les mutacions dels gens que codifiquen el complex succinat deshidrogenasa (SDH) condueixen a una inactivació de SDHA (“SDHA-deficient”). Quan es produeix una inactivació de SDHA, l'excés de succinat acumulat als mitocondris es trasllada al citoplasma on actua com a oncometabòlit i, juntament amb altres metabòlits intermedis del cicle ATC pertorba la regulació metabòlica de la cèl·lula i pot donar lloc al desenvolupament i progressió del càncer. El succinat competeix amb l' $\alpha$ -cetoglutarat i inhibeix una família d'enzims prolil hidroxilasa (PHD). Això condueix a l'estabilització de l'HIF $\alpha$  fins i tot en presència d'oxigen, una condició coneguda com a “pseudohipòxia”, que probablement afavoreix la resistència a la radioteràpia. La inactivació o pèrdua de funció del complex enzimàtic succinat deshidrogenasa (SDH) és causada, amb més freqüència, per una mutació hereditària en un dels quatre gens SDHx (SDHA, SDHB, SDHC i SDHD) i s'ha associat amb l'aparició de tumors com ara paragangliomes i feocromocitomes, tumors de l'estroma gastrointestinal, carcinomes de cèl·lules renals i adenomes hipofisaris (MacFarlane *et al.*, 2020).

El nombre d'estudis que han analitzat la implicació de SDHA en el procés de la carcinogènesi és limitat. Chattopadhyay *et al.* (2019) van observar que l'expressió elevada de SDHA es va associar amb el risc de propagació metastàtica i un mal resultat clínic en pacients amb melanoma uveal. Olszewski i cols. (2022) van trobar una inhibició del creixement del tumor en un model de xenoempelt derivat del pacient de càncer amb deficiència de SDHA. Per altra banda, s'ha descrit la SDHA funcionant com un supressor de tumors perquè redueix la secreció i l'acumulació de succinat (King A *et al.*, 2006). Li J *et al.* (2019) van trobar una expressió reduïda de SDHA en el carcinoma hepatocel·lular i que això s'associava a un mal pronòstic en aquests pacients.

En analitzar les dades incloses en el The Cancer Genome Atlas (TCGA), es pot observar que la capacitat pronòstica de l'expressió transcripcional de SDHA depèn del tipus de tumor (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga>). L'expressió elevada de SDHA es va associar amb una supervivència global significativament reduïda en pacients amb càncer de mama, mentre que es va associar amb una supervivència augmentada en pacients amb càncer renal. En els pacients amb CECC, l'expressió elevada de SDHA es va associar amb una disminució de la supervivència global, però les diferències no van assolir una significació estadística ( $p=0,16$ ). Cal tenir en compte que les característiques dels pacients inclosos en el TCGA són molt diferents de les dels pacients analitzats en aquest estudi, amb una gran proporció de pacients amb CE de cavitat oral i una gran majoria de pacients tractats amb cirurgia.

Pràcticament no hi ha referències sobre la relació entre SDHA i el CECC. En el present treball s'ha constatat la relació entre un augment de l'expressió transcripcional de SDHA i un risc augmentat de recidiva local en pacients tractats amb RT. Igualment, Terra *et al.* (2021) van estudiar una cohort de 41 pacients amb CECC i van demostrar que l'expressió transcripcional elevada SDHA estava associada amb un mal control locoregional de la malaltia en pacients tractats amb RT o QT-RT, i van identificar els nivells sèrics de succinat circulant com un biomarcador no invasiu potencialment valuós per al diagnòstic i pronòstic del CECC. Aquests autors suposen que el succinat plasmàtic s'origina a partir de la secreció extracel·lular de succinat a partir de cèl·lules del microentorn tumoral de les cèl·lules tumorals. S'han proposat diverses explicacions per a l'acumulació de succinat. Una explicació és que en el teixit hipòxic, la inducció relacionada amb la hipòxia dels oncometabòlits es podria propagar i amplificar pels mateixos oncometabòlits a través de l'estabilització de l'expressió HIF-1 $\alpha$ .

Els mecanismes pels quals l'expressió transcripcional augmentada de SLC2A3 i SDHA té capacitat pronòstica i condueix a un augment del risc de recidiva local en pacients amb CECC tractats amb radioteràpia (fenotip radioresistent) poden ser diversos.

El subministrament de nutrients a les cèl·lules tumorals pot originar-se del metabolisme cel·lular o pot ser importat del microambient extern a través de la membrana plasmàtica mercès a transportadors de glucosa com GLUT3, codificat pel gen SLC2A3, alimentant així l'ATC per a la síntesi de precursors metabòlics i l'OxPhos per a la producció d'ATP als mitocondris. De fet, les cèl·lules canceroses amb una alta expressió dels transportadors de glucosa mostren un comportament agressiu i això és degut al fet que transporten activament la glucosa extracel·lular i obtenen una gran energia per a una proliferació ràpida, amb un augment de la glicòlisi aeròbica i de la producció de lactat.

Al seu torn, aquest augment de l'àcid làctic es transporta des de les cèl·lules tumorals a l'espai extracel·lular i genera una acidosi del microambient del tumor que pot impulsar el creixement del tumor per diversos mecanismes com la immunopermissivitat i l'angiogènesi, entre d'altres. Al mateix temps, l'augment dels nivells de lactat també estimulen la producció d'àcid hialurònic per part dels fibroblasts, cosa que pot contribuir a la invasivitat local del tumor.

La desregulació de SDH, per altra part, pot exercir efectes sobre moltes vies metabòliques i bioenergètiques, principalment a través del succinat, el qual pot esdevenir una diana terapèutica (Sant'Anna-Silva *et al.*, 2021). L'expressió augmentada de SDH podria afavorir, i) la conversió de succinat a fumarat com a part



del cicle de l'àcid tricarboxílic, i ii) la fosforilació oxidativa, lliurant equivalents reductors a l'ETC mitjançant FADH<sub>2</sub> i finalment produint ATP. Aquest canvi sembla un entorn ideal per al desenvolupament del càncer perquè permet estalviar bio-precursors per a altres necessitats, que d'altra manera s'utilitzen per a la producció de NADH, mentre que es manté una oxidació elevada de succinat per a una producció eficient d'ATP utilitzant FADH<sub>2</sub> com a donant d'electrons. Aquesta hipòtesi coincideix amb el fet que en els nostres resultats, quan l'expressió de SLC2A3 és baixa, SDHA no afecta el resultat quant a la supervivència lliure de recidiva local (tant fa si els nivells d'expressió són alts o baixos). En canvi, quan SLC2A3 està elevat, l'afluència potencial de glucosa no és suficient per induir un fenotip radioresistent si els nivells de SDHA són baixos. Recentment, Olszewski *et al.* (2022) van demostrar que per reduir el creixement del tumor es necessita tant l'entrada reduïda de glucosa a la cèl·lula com una expressió disminuïda dels enzims del cicle d'àcid tricarboxílic (ATC). Van demostrar que la inhibició dels transportadors de glucosa de classe I era eficaç per inhibir el creixement del tumor en models de xenograft derivats de pacients de càncer amb deficiència de SDHA.

Ja hem vist que l'alteració de la funció de SDHA pot produir-se per dèficit de funció o per augment de l'activitat. Quan es produeix un augment de l'expressió transcripcional de SDHA s'incrementa la conversió de succinat a fumarat, el qual actua com a oncometabòlit. Schöpf *et al.* (2020) van estudiar la readaptació del metabolisme energètic i l'adaptació dels mitocondris en el desenvolupament i la progressió del càncer de pròstata. Els seus resultats revelen un canvi cap a una oxidació més alta del succinat, que s'associa amb mutacions nocives en els gens del Complex I mitocondrial i una expressió reconnectada dels enzims metabòlics mitocondrials en el càncer de pròstata primari. El canvi en la preferència del substrat estava present principalment en els tumors d'alt grau, cosa que indica que aquest recablejat metabòlic és un pas definitiu durant la tumorigènesi, amb importància pronòstica. El seu estudi sobre les capacitats de fosforilació oxidativa en teixits de càncer de pròstata va descobrir un augment de l'oxidació del succinat a través del Complex II (SDH) com a compensació d'una disminució de la capacitat d'oxidar substrats mitjançant el Complex I en tumors de pròstata d'alt grau.

En la nostra cohort de pacients amb CECC tractats amb RT, l'augment de l'expressió de SDHA també podria estar associada a una capacitat de fosforilació oxidativa augmentada que podria conferir resistència a la radiació. En qualsevol cas, els enzims SDH es caracteritzen per altres mecanismes reguladors que inclouen la regulació de

l'expressió de l'ARNm, la modificació post-traducciona i la inhibició endògena (Dalla Pozza *et al.*, 2019). La realitat actual és que es necessiten més estudis per dilucidar el paper d'aquest enzim tant en la carcinogènesi com en la progressió del CECC.

Per últim, comentar que en aquest treball l'expressió augmentada de SLC2A3 i SDHA no només va impactar en la recidiva local, sinó també en la recidiva regional de la malaltia (disminució de la supervivència lliure de recidiva regional, amb significació estadística).

## 2. Expressió DLAT/LDHA en la cohort de cirurgia

En aquest treball, l'avaluació conjunta de l'expressió transcripcional dels gens DLAT i LDHA ha permès definir un grup de pacients amb una reducció del control del tumor com a resultat d'un risc elevat de recidiva local del tumor després del tractament amb cirurgia. Així, els pacients amb una expressió col·lectiva baixa de DLAT i elevada de LDHA van mostrar un risc de recidiva local 16,82 vegades superior a la resta de pacients.

### 2.1. DLAT

DLAT (Dihidrolipoamida S-acetiltransferasa) és una proteïna implicada en el metabolisme de la glucosa i constitueix la subunitat catalítica E2 del complex piruvat deshidrogenasa (PDH), que és un complex multienzim de la membrana mitocondrial que proporciona l'enllaç principal entre la glicòlisi i el cicle de l'àcid tricarbòxilic (cicle de Krebs). En condicions normals, el complex PDH actua com un node metabòlic central que intervé en l'oxidació del piruvat a acetil-CoA i CO<sub>2</sub> i alimenta el cicle de l'àcid tricarbòxilic per satisfer la demanda d'energia.

El piruvat és un metabòlit glicolític principal que es pot convertir principalment en lactat per acció de lactat deshidrogenasa A (LDHA) o en acetil-CoA a través del complex piruvat deshidrogenasa E1 (PDHA1).

En general, en les cèl·lules canceroses es produeix l'acumulació de lactat, mentre que la conversió de piruvat en acetil-CoA mitocondrial és menys activa en comparació amb els seus homòlegs normals. Chen T *et al.* (2019) van analitzar els canvis cel·lulars i moleculars en les cèl·lules de CECC en resposta a la pèrdua de LDHA i PDHA1 in vitro, in vivo i en clínica. Mitjançant l'ús de diverses bases de dades de càncer humà i mostres clíniques van observar que els nivells de LDHA i PDHA1 presenten un significat pronòstic invertit. L'anàlisi in vitro va demostrar una disminució del creixement i la motilitat cel·lular i una major sensibilitat als agents quimioteràpics a les cèl·lules

amb pèrdua de LDHA, mentre que el silenciament de PDHA1 presentava un fenotip oposat.

No s'han trobat referències a la literatura que relacionin directament DLAT amb el CECC, però sí amb altres tipus de càncer. Quan *et al.* (2015) van descriure per primer cop l'associació entre DLAT i el metabolisme energètic alterat del càncer. Aquests autors van trobar una sobreexpressió de DLAT en algunes línies cel·lulars de càncer gàstric, amb augment de la conversió de piruvat en acetil CoA, presumiblement per facilitar la fosforilació oxidativa, la generació d'ATP i les reaccions catabòliques, que probablement són tan importants com les reaccions anabòliques en el creixement del càncer. Per contra, quan es neutralitza l'activitat de DLAT es produeix un bloqueig en la conversió de piruvat en acetil CoA, generant l'acumulació de piruvat a les cèl·lules. No obstant i això, en aquest estudi també van observar que, en algunes línies cel·lulars, DLAT estava infraexpressat en comparació amb les cèl·lules epitelials de càncer no gàstric.

Mitjançant l'anàlisi de diverses bases de dades bioinformàtiques, Chen S *et al.* (2020) van identificar diversos gens relacionats amb la glicòlisi (incloent-hi DLAT) que afecten el pronòstic dels pacients amb adenocarcinoma de colon i constitueixen un model de predicció de la supervivència en aquests pacients.

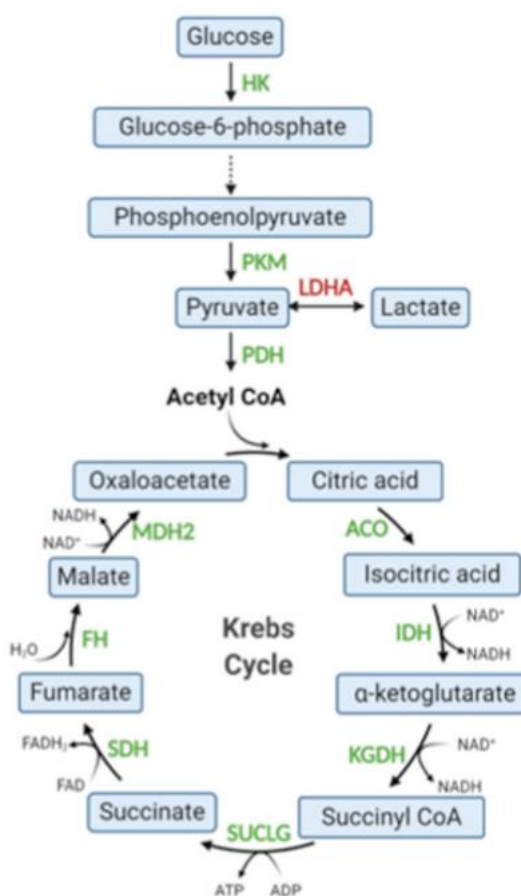
PM2.5 (matèria particulada 2,5, de l'anglès "particulate matter") són partícules molt petites suspeses a l'aire (contaminants atmosfèrics). Segons Chen Q *et al.* (2020) aquestes partícules indueixen la carcinogènesi i l'aparició de carcinoma no de cèl·lula petita de pulmó a través de la reprogramació de la glicòlisi a causa de l'activació de l'activitat transcripcional de DLAT.

En un estudi recent, Tsvetkov *et al.* (2022) van proposar una nova forma de mort cel·lular molt lligada al metabolisme mitocondrial i induïda per coure. Aquests autors van comprovar que l'excés de coure intracel·lular indueix l'agregació de DLAT, que s'associa amb el cicle de l'àcid tricarbòxilic mitocondrial (TCA), donant lloc a estrès proteotòxic i conduint a la mort cel·lular. D'aquesta manera, Bian Z *et al.* (2022) van avaluar les alteracions genètiques dels gens relacionats amb la cuproptosi en un total de 524 pacients amb carcinoma de cèl·lules clares renal (ccRCC) de la base de dades The Cancer Genome Atlas (TCGA) (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) i van trobar una disminució (i no un increment) de l'expressió de DLAT en el teixit tumoral respecte el teixit normal, establint DLAT com a part d'un nou model o signatura pronòstica basada

en el gens relacionats amb la cuproptosi i, a més, va revelar el paper de DLAT com a gen supressor tumoral.

## 2.2. LDHA

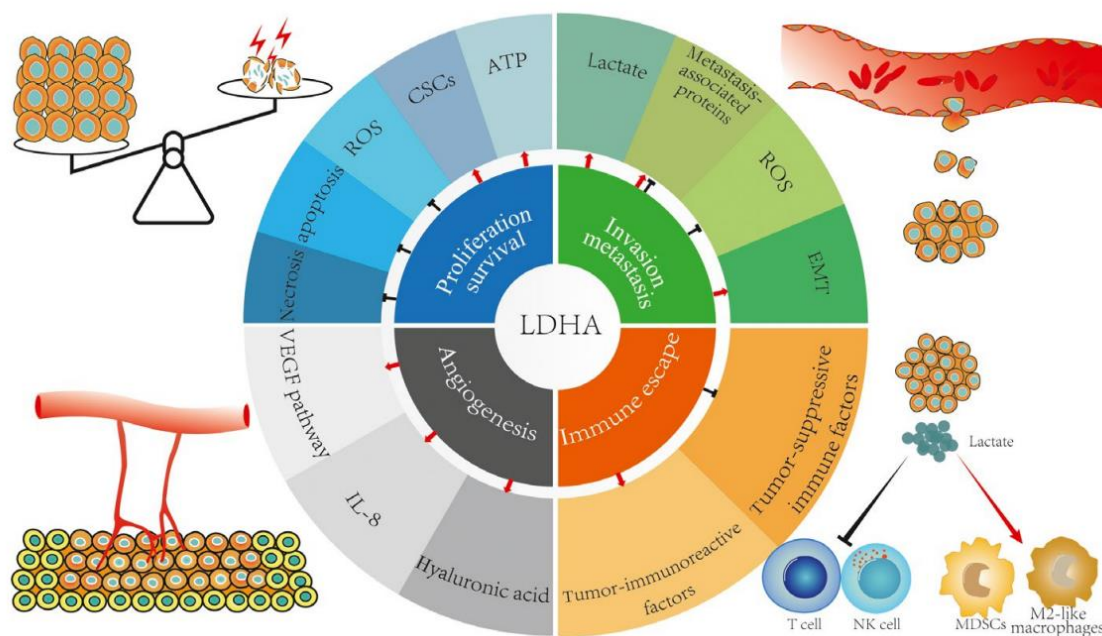
LDHA es localitza principalment al citoplasma i és clau en el metabolisme glicolític alterat del càncer. La seva funció principal és convertir el piruvat en lactat, i transformar NADH en NAD<sup>+</sup> en condicions anaeròbiques. En les cèl·lules canceroses existeix un augment de la glicòlisi aeròbica (efecte Warburg), amb un augment notable de la conversió de piruvat en lactat a expenses de l'activitat de la LDHA (figura 106).



**Figura 106.** Paper i ubicació de LDHA en el metabolisme cel·lular (Modificat de: Hou X *et al.* Cell death&Disease 2021).

LDHA està estretament relacionada amb les característiques biològiques de malignitat del càncer a través de diversos mecanismes (Feng Y *et al.*, 2018). Pot promoure la proliferació de cèl·lules canceroses i mantenir la supervivència cel·lular, afavoreix la

invasió tumoral i les metàstasis, pot desencadenar angiogènesi i pot ajudar les cèl·lules canceroses a escapar del sistema immunitari (figura 107).



**Figura 107.** Paper crític de LDHA en els diferents segells distintius del càncer (vegeu text) (Font: Feng Y *et al.* Cancer Medicine 2018).

L'associació entre una expressió alta de LDHA i una disminució del control del tumor i de la supervivència s'ha descrit en diversos models de tumor (Hou *et al.*, 2021; He *et al.*, 2018; Huang X *et al.*, 2016; Zhang J *et al.*, 2015; Yao *et al.*, 2013). En una metaanàlisi de Lv *et al.* (2019) en què es van analitzar els resultats obtinguts en 4.176 pacients inclosos en 17 estudis, es va trobar que l'expressió elevada de LDHA es va associar amb una disminució significativa de la supervivència global (HR: 1,74;  $p = 0,001$ ). De la mateixa manera, existeixen nombrosos estudis en diferents tipus de tumors que han demostrat que silenciar l'expressió de LDHA provoca la inhibició de la proliferació i la migració cel·lular sense un impacte significatiu en les cèl·lules no tumorals, i és per això que s'ha considerat LDHA com un objectiu prometedori en la prevenció i el tractament del càncer.

Els models *in vitro* desenvolupats amb línies cel·lulars de CECC han demostrat la relació entre l'expressió de LDHA i la progressió del tumor. Cai *et al.* (2019) van trobar evidències convincents *in vitro* i *in vivo* que demostren que LDHA pot promoure la

proliferació, migració i invasió de cèl·lules del CE de cavitat oral facilitant la glicòlisi i la transició epitelial-mesenquimal (EMT).

En un estudi in vivo amb un model ortotòpic de CECC, Chen Y *et al.* (2021) van trobar que la supressió de l'expressió de LDHA va disminuir la proliferació cel·lular i augmentava la sensibilitat a la radioteràpia. En estudis realitzats per Cai *et al.* (2019) i Chen Y *et al.* (2021) a partir dels resultats inclosos en les bases de dades de "The Cancer Genome Atlas" (TCGA), els pacients amb una alta expressió transcripcional de LDHA tenien pitjor supervivència global.

En un treball publicat recentment pel nostre grup vam estudiar l'expressió transcripcional de LDHA en 110 pacients amb CECC tractats amb cirurgia, que són els que hem fet servir en aquest treball (Bagué *et al.*, 2022). Segons els nostres resultats, els pacients amb una expressió elevada de LDHA tenien un risc 3,4 vegades més gran de recidiva del tumor en relació als pacients amb tumors amb una expressió transcripcional baixa de LDHA (IC; 1,8-6,3%;  $p = 0,0001$ ). No es van trobar diferències en l'expressió transcripcional de LDHA segons variables com la localització del tumor, l'extensió local o regional o el grau histològic. Tenint en compte el nombre limitat de pacients amb CE orofaringis inclosos en aquest estudi ( $n = 6$ ), no es va realitzar una determinació de l'expressió de LDHA en funció de l'estat del VPH. A partir dels resultats obtinguts a les bases de dades de "The Cancer Genome Atlas" (TCGA), Chen Y *et al.* (2021) no van trobar diferències en l'expressió transcripcional de LDHA en pacients amb CECC en funció de l'estat del VPH.

Un dels metabòlits derivats de l'activitat enzimàtica de LDHA és el lactat. Estudis in vitro realitzats en línies cel·lulars de CECC han demostrat que la reducció de l'expressió de LDHA condueix a una disminució del consum de glucosa per part de les cèl·lules tumorals i una reducció dels nivells de lactat (Cai *et al.*, 2019; Chen T *et al.*, 2019). En un estudi de mostres de CECC de pacients tractats amb cirurgia i radioteràpia adjuvant, Blatt *et al.* (2016) van trobar que els pacients amb uns nivells elevats de lactat al teixit tumoral tenien un augment significatiu del risc de recidiva i una disminució de la supervivència global.

$^{18}\text{F}$ -FDG-PET és una tècnica d'imatge útil per reflectir el metabolisme de la glucosa. A partir de l'augment de la glicòlisi aeròbica acompanyada de la captació de glucosa en els tumors malignes, el valor de captació estandarditzat (SUV, de l'anglès "Standardized Uptake Value" ) a les exploracions  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET es pot utilitzar per mesurar el grau de captació de glucosa per les cèl·lules canceroses. Diversos autors

han trobat una relació significativa entre l'expressió de LDHA del tumor i el valor SUV en pacients amb carcinoma de mama i GIST (Kim *et al.*, 2020; Cho *et al.*, 2015). Zhou X *et al.* (2014) van elaborar una anàlisi retrospectiva de 51 pacients amb adenocarcinoma de pulmó que es van sotmetre a PET 18F-FDG. Van examinar la relació entre el valor màxim d'absorció normalitzat i l'expressió de LDHA, transportador de glucosa 1 (GLUT1) i hexoquinasa 2 (HK2) i van trobar que el SUV va ser significativament més alt al grup amb expressió transcripcional elevada de LDHA que al grup amb baixa expressió LDHA ( $p=0,018$ ). Malauradament, la majoria dels pacients inclosos en el nostre estudi no tenien una exploració de 18F-FDG-PET abans del tractament, de manera que no es va poder analitzar la relació entre l'expressió de LDHA i l'activitat metabòlica del tumor.

Generalment, l'augment de l'expressió de LDHA al tumor es correlaciona amb un augment de la concentració sèrica de LDHA, fet que s'ha utilitzat com a biomarcador amb capacitat pronòstica (Zhang JP *et al.*, 2015). En pacients amb carcinomes de la cavitat oral, Grimm *et al.* (2016) van trobar una correlació significativa entre l'expressió immunohistoquímica de LDHA i la concentració sèrica prèvia al tractament, i una reducció de la concentració després de la resecció del tumor. A més, els valors sèrics elevats de LDHA s'han associat amb la progressió de lesions pre-malignes de la cavitat oral fins a un carcinoma infiltrant (Grimm *et al.*, 2016). Diversos autors han analitzat la correlació entre la concentració sèrica de LDHA i la supervivència en pacients amb carcinoma de nasofaringe, i tots ells conclouen que tant les concentracions sèriques elevades de LDHA pretractament (Li G *et al.*, 2012) com posttractament (Wang J *et al.*, 2016) es van associar significativament amb un pitjor pronòstic.

Uehara *et al.* (2021), en un estudi de 101 pacients amb CE d'orofaringe, van suggerir que el nivell sèric de LDHA prediu una mala supervivència després del tractament amb RT, tant en els casos VPH (+) com en els VPH (-). Tanmateix, els nivells de LDHA en els teixits cancerosos no sempre es correlacionen completament amb el nivell sèric de LDHA, cosa que pot indicar que l'expressió de LDHA en el tumor i a nivell sèric són dos predictors independents de diagnòstic de càncer (Koukourakis *et al.*, 2011).

En resum, l'expressió baixa de DLAT – que és un component del complex piruvat deshidrogenasa que transforma el piruvat en acetil- CoA - comportaria un augment de la concentració del piruvat al citoplasma fet que, al seu torn, conduiria a una activació de la via alternativa de la metabolització del piruvat, això és, a un augment de l'activitat de LDHA i, conseqüentment, a un increment de la producció de lactat. És conegut que

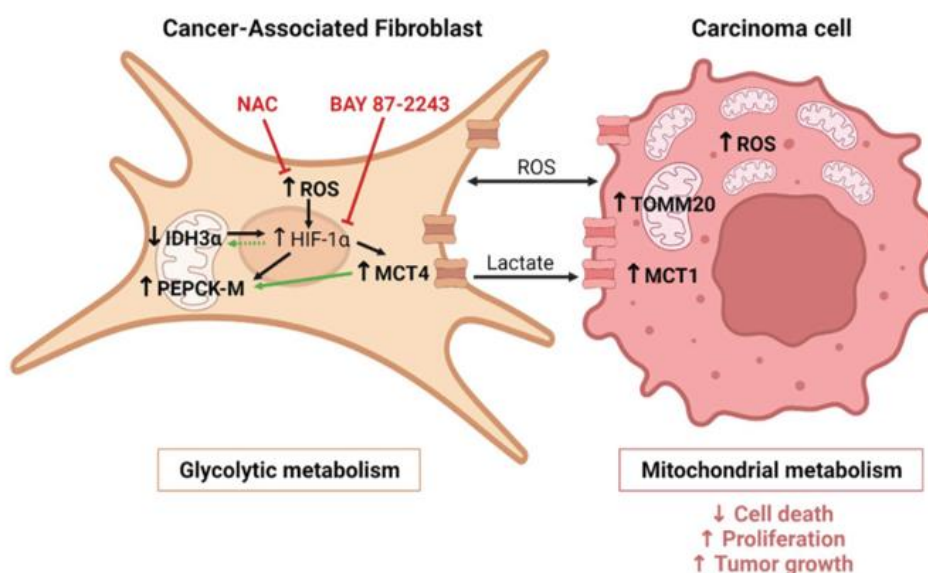
el lactat redueix el pH del microambient cel·lular i tumoral, fet que promou canvis genètics que perjudiquen la resposta del sistema immunitari antitumoral i redueix la unió o adherència cel·lular facilitant la descohesió cel·lular, la invasió i les metàstasis (de la Cruz-López *et al.*, 2019).

L'expressió de DLAT i LDHA no va influir ni en el control regional de la malaltia ni en el control a distància del tumor.

### 3. Expressió immunohistoquímica de LDHA

En el treball actual es va analitzar la correlació entre l'expressió transcripcional i l'expressió immunohistoquímica de LDHA i vam observar que els tumors amb una expressió transcripcional elevada de LDHA tendien a exhibir puntuacions d'immunoexpressió més elevades independentment del grau de diferenciació tumoral (Figura 99) però, donada la limitació en la mida de la mostra, les diferències no van assolir una significació estadística. Cai *et al.* (2019) van trobar que els pacients amb tumors en estadis precoços (T1-2) i histològicament ben diferenciats tenien una expressió immunohistoquímica significativament menor de LDHA.

Crida l'atenció l'expressió de LDHA en les cèl·lules estromals. Els fibroblasts associats al càncer (CAF) són un component cel·lular important del microambient tumoral en el CECC i són determinants clau per regular la progressió maligna del càncer (figura 108).



**Figura 108.** Modulació del metabolisme dels CAF i l'agressivitat de les cèl·lules canceroses (Font: Domingo-Vidal M *et al.* *Frontiers in Oncology* 2022).



De fet, ja s'ha demostrat que els CAF promouen la transició epitelial-mesenquimal (EMT), la invasió i les metàstasis en el CECC. Creiem que l'expressió de LDHA en les cèl·lules estromals es pot explicar per l'efecte Warburg invers proposat per Pavlides *et al.* (2009). Segons aquests autors, i en contrast amb l'efecte Warburg clàssic, les cèl·lules canceroses epitelials indueixen la glicòlisi aeròbica als CAF circumdants els quals, a la vegada, augmenten la producció de metabòlits rics en energia, com ara el lactat, per alimentar directament les cèl·lules canceroses epitelials (vegeu figura 28). La producció de lactat a les cèl·lules estromals implicaria un augment de l'activitat de LDHA i podria explicar, d'alguna manera, aquesta expressió IHQ de LDHA en les cèl·lules estromals.

#### **4. Altres gens inclosos en l'estudi i relació amb el CECC**

A continuació es descriuen breument els estudis trobats a la literatura del gens que en aquest treball no han mostrat capacitat pronòstica en relació amb la recidiva local i la supervivència lliure de malaltia en el CECC.

##### **Hexoquinasa 1**

És un enzim de la glicòlisi que converteix la glucosa a la glucosa-6-fosfat. En fosforilar la glucosa, la HK1 impedeix efectivament que la glucosa surti de la cèl·lula i, per tant, compromet la glucosa en el metabolisme energètic. Clatot *et al.* (2014) van estudiar una cohort de 61 pacients amb CECC i van trobar un perfil d'expressió gènica (incloent-hi HK-1) amb capacitat pronòstica de propagació metastàtica. Liu *et al.* (2020) van obtenir les dades transcripcionals i clíniques de 544 mostres de CECC de la base de dades TCGA i van identificar vuit gens relacionats amb la glicòlisi d'importància pronòstica en el CECC, entre ells HK-1, i es van agrupar els pacients en dos grups (alt i baix risc) en funció de l'expressió d'aquests gens.

##### **Piruvat deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1)**

PDK1 fosforila les subunitats piruvat deshidrogenasa PDHA1 i PDHA2, amb la subsegüent inhibició de l'activitat de la PDH i la inhibició de la formació d'acetil-coenzim A a partir del piruvat. Exerceix un paper en les respostes cel·lulars a la hipòxia i és important per a la proliferació cel·lular en condicions d'hipòxia. Jing *et al.* (2019) van trobar que PDK1 induïa la transició epitelial-mesenquimal i que la sobreexpressió de PDK1 en el CE d'hipofaringe es correlacionava amb les metàstasis ganglionars i a distància. Hi ha diversos estudis que han posat en relleu la relació entre la inhibició de PDK1 i la millora de la resposta al tractament. Pai S *et al.* (2021) van analitzar

l'expressió de PDK1 en 22 mostres de 62 pacients amb CE de cavitat oral. L'anàlisi immunohistoquímica va revelar que una expressió més alta de PDK1 s'associa amb un mal pronòstic en el CE de cavitat oral i, d'altra banda, que la supressió de PDK1 sensibilitza les cèl·lules tumorals al cisplatí i la RT.

### **Lactat deshidrogenasa B (LDHB)**

LDHB codifica la subunitat B de l'enzim lactat deshidrogenasa, que catalitza la interconversió de piruvat i lactat amb la interconversió concomitant de NADH i NAD<sup>+</sup> en un procés postglicòlisi. Quan existeixen més cadenes A que cadenes B, els isoenzims LDH es tornen més eficients en la conversió catalítica de piruvat en lactat. Per contra, un nombre més gran de cadenes B facilita la conversió del piruvat en acetil coenzim A. Mohajertehran *et al.* (2019) van evidenciar la sobreexpressió de lactat deshidrogenasa a la saliva i en el teixit (avaluat per immunohistoquímica) de pacients amb CECC. Mohtasham *et al.* (2019) van trobar elevació sèrica de LDHA i B i sobreexpressió en el teixit (avaluat amb RT-PCR). L'associació de LDHA i LDHB mesurada per IHQ juntament amb la LDH sèrica podria ser un biomarcador útil per minitoritzar els pacients de CE de cavitat oral tractats quirúrgicament (Grimm *et al.*, 2016). Per la seva banda, Sun *et al.* (2015) van avaluar l'expressió immunohistoquímica de LDHB en 107 mostres de pacients amb CE de cavitat oral i van concloure que l'expressió elevada de LDHB es va associar significativament amb la recidiva del tumor i a una mala supervivència global. De la mateixa manera, l'expressió elevada de LDHB es va correlacionar amb una resposta desfavorable a la QT neoadjuvant i amb resistència a la RT.

### **SLC16A3/SLC16A7**

Són gens que codifiquen els transportadors de monocarboxilats MCT4 i MCT2, respectivament, que són els responsables del transport de monocarboxilats com L-lactat, piruvat, i cossos cetònics a través de la membrana plasmàtica (vegeu figura 38). Les cèl·lules canceroses de cap i coll mantenen una gran activitat glicolítica i generen una quantitat important d'àcid làctic a l'entorn extracel·lular. L'acumulació de lactat intracel·lular és perjudicial per a les cèl·lules, ja que redueix dràsticament el pH intracel·lular. Els MCT faciliten l'exportació de lactat fora de la cèl·lula, el que és crucial per a la supervivència de les cèl·lules canceroses (Chandel *et al.*, 2020). S'ha demostrat que una expressió elevada de MCT4 està associada a un mal pronòstic en pacients amb CE de cavitat oral (Bisetto *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2014). Simoes-Sousa *et al.* (2016) van avaluar l'expressió immunohistoquímica de MCT4 i MCT2 en 135

mostres humanes de CE de cavitat oral i van investigar la correlació amb paràmetres clinicopatològics i la possible associació amb el pronòstic. Van trobar que MCT4 es va associar significativament amb l'estadi T avançat. Curiosament, els tumors que expressaven tant MCT1 com MCT4 però que eren negatius per a MCT2 es van associar amb una supervivència global més curta.

### **SDHB / SDHC/ SUCNR1**

El complex SDH es localitza a la membrana mitocondrial interna i té una funció en els processos essencials de producció d'energia d'una cèl·lula. Està implicat en l'oxidació del succinat a fumarat en el cicle de l'àcid cítric o tricarboxílic (Krebs) i en la cadena respiratòria, amb la reducció d'ubiquinona (coenzim Q) a la cadena aeròbica de transferència d'electrons, contribuint a la generació d'ATP per fosforilació oxidativa. Estructuralment, és un heterooligòmer format per proteïnes de 4 subunitats (SDHA, SDHB, SDHC i SDHD) (vegeu figura 39). El succinat, oncometabòlit important en la progressió tumoral, s'acumula en situacions de dèficit de funció del complex SDH. Terra *et al.* (2021) van estudiar la contribució de l'eix succinat-SUCNR1 en la progressió del CECC. Els seus resultats van mostrar que els nivells circulants de succinat eren més alts en pacients amb CECC que en els controls sans i que l'expressió de SUCNR1, succinat deshidrogenasa (SDH) A i SDHB era més alta en el teixit tumoral que en la mucosa normal. Així mateix, els nivells alts d'expressió de SUCNR1 i SDHA es van associar amb un pitjor control locoregional de la malaltia. Prusinkiewicz *et al.* (2020) van estudiar els gens metabòlics associats a la supervivència en CECC HPV+, incloent-hi SDHC. Els CECC VPH+ van mostrar nivells d'expressió més baixos dels gens implicats en la glicòlisi i nivells més alts de gens implicats en el cicle de l'àcid tricarboxílic, la fosforilació oxidativa i l'oxidació  $\beta$  que els CECC VPH (-). La reducció de l'expressió de SDHC es va correlacionar amb una millora de la supervivència només en el grup de pacients VPH+.

### **HIF-1 $\alpha$**

HIF-1 $\alpha$  funciona com a regulador de la resposta homeostàtica cel·lular i sistèmica a la hipòxia. En condicions hipòxiques activa la transcripció de més de 40 gens, incloent-hi els transportadors de glucosa (GLUT) i enzims glicolítics, els productes proteics dels quals augmenten el lliurament d'oxigen o faciliten l'adaptació metabòlica a la hipòxia. De Souza *et al.* (2018) van investigar l'efecte de la RT sobre els nivells de marcadors hipòxics en el CE de cavitat oral i van demostrar que la RT redueix els nivells de HIF-1 $\alpha$  in vivo i in vitro.

No s'han trobat treballs a la literatura que relacionin els gens PKFL, PDHB o DLD amb el pronòstic del CECC.

## 5. Limitacions de l'estudi

Hi ha diverses limitacions en el nostre estudi que cal tenir en compte a l'hora d'analitzar els resultats. En primer lloc, es tracta d'un estudi retrospectiu en el qual es van estudiar un nombre limitat de gens relacionats amb el metabolisme de la glucosa. D'altra banda, s'han estudiat dues poblacions amb un cert grau d'heterogeneïtat on s'han inclòs pacients amb tumors de diverses localitzacions (cavitat oral, orofaringe, hipofaringe i laringe) i diferents categories d'extensió locoregional (estadi TN). Per exemple, en la cohort de pacients tractats amb RT, hi havia un predomini de carcinomes d'orofaringe (41,7%) mentre que en els pacients tractats amb cirurgia el percentatge era del 5,4%. En el primer cas, un 41,7% dels pacients es van presentar amb tumors cT3-T4, mentre que en els pacients tractats amb cirurgia el percentatge de pT3-T4 va ser del 81,8%, amb una incidència de c/pN+ del 40,9% i 58,2%, respectivament.

Si bé la mida de la mostra (inclusió de 120 pacients tractats amb RT i de 110 pacients tractats amb cirurgia) gaudeix d'una potència estadística raonable, fóra desitjable ampliar la casuística de forma prospectiva per millorar la confiança en els resultats.

La relació entre l'expressió dels gens relacionats amb el metabolisme i el control de la malaltia es va dur a terme a través d'una anàlisi de l'expressió transcripcional, sense aportar informació sobre les vies de senyalització activades, la concentració local de substrats o l'existència de mecanismes reguladors post-traduccionals. Així doncs, calen estudis de validació independents abans de poder considerar l'expressió transcripcional d'aquests gens com biomarcadors amb capacitat predictiva de resposta a la RT o QT-RT o de recidiva local en pacients amb CECC.

El nombre de gens estudiats en aquest estudi és limitat si ho comparem amb altres estudis a la literatura. Addicionalment, en la cohort de pacients tractats amb RT el nombre de gens és substancialment inferior al que es va analitzar en la cohort de pacients tractats amb cirurgia (7 versus 19), fet que podria implicar una certa distorsió en la interpretació dels resultats. LDHA per exemple, que hem identificat com un dels gens amb significat pronòstic en els pacients amb CECC tractats amb cirurgia, no es va incloure en l'anàlisi dels pacients tractats amb RT, per bé que la relació entre la sobreexpressió de LDHA i la resistència a la radioteràpia es troba sobradament documentada a la literatura.

Un factor limitant destacable rau en el canvi en el sistema d'estadificació TNM introduït l'any 2018. Vist que els casos inclosos en aquest treball corresponen a pacients diagnosticats i tractats durant el període 2008-2016, els exàmens histopatològics no van reflectir de manera uniforme alguns dels factors pronòstics considerats en l'actualitat determinants en l'estadificació, com l'extensió ganglionar extracapsular (trencament capsular), l'estat del VPH en els carcinomes d'orofaringe o la profunditat de la invasió (DOI) en el carcinoma de cavitat oral, ni tampoc altres factors histopatològics que comporten un risc de recidiva local "per se" com ara el front d'invasió no cohesiu (WPOI), la presència de displàsia d'alt grau en els marges quirúrgics o la desdiferenciació tumoral focal ("tumor budding"). En aquest sentit, l'absència d'aquesta informació o els canvis introduïts en la nova estadificació TNM des del 2018 són un factor que pot influir en la interpretació dels resultats.

En últim lloc, cal fer esment que existeixen pocs estudis científics sobre alguns dels gens estudiats en aquest treball (llevat del cas de LDHA), fet que implica que no es pugui fer un estudi comparatiu i contrastar els nostres resultats amb la literatura.

## **6. Aplicabilitat de l'estudi i futures línies de recerca**

Avui i ara estem vivint l'esclat de la "medicina de precisió". Conèixer les dades moleculars inherents als diferents tipus de tumors és clau per al desenvolupament de biomarcadors que permetin una millor aproximació al maneig i tractament del càncer. En aquest context, la raó de ser i el fruit d'aquest treball tenen per objectiu contribuir en l'intent de millorar l'estratificació dels pacients amb CECC segons el risc de recidiva local i, per tant, optimitzar i individualitzar les decisions medico-terapèutiques més adients i amb menys morbiditat per a cada pacient.

Malgrat les limitacions mencionades en l'apartat anterior (i quin estudi no en té?), aquesta tesi obre una línia de treball i recerca amb continuïtat. A mitjà termini amb la validació dels resultats a través d'estudis prospectius dels pacients que es tractin a l'Hospital de Sant Pau incloent-hi, com ja és pràctica habitual avui en dia, el refinament i la uniformitat en el diagnòstic patològic.

Un altre aspecte a considerar és la correlació entre l'expressió transcripcional i l'expressió immunohistoquímica dels altres gens, a banda de la LDHA, per tal d'establir la seva rellevància clínica. La cerca i incorporació de marcadors immunohistoquímics a la pràctica assistencial que, de manera senzilla, sensible i reproduïble, permetin l'avaluació de l'expressió dels gens relacionats amb el metabolisme implicats en l'evolució i pronòstic dels pacients amb CECC és un dels reptes, talment com es fa

amb altres biomarcadors pronòstics i predictius de resposta al CECC, particularment p16 en el carcinoma d'orofaringe associat a HPV i PDL-1 en el CE localment avançat o metastàtic. En aquest sentit, al nostre centre disposem d'un raonable flux de pacients, dels medis tècnics necessaris i, el que és tant o més rellevant, de l'esperit col·laboratiu entre els equips investigadors i assistencials involucrats en aquest tipus de càncer.



## VII. CONCLUSIONS

---



## VII. CONCLUSIONS

1. Els pacients amb CECC i una expressió transcripcional conjunta elevada dels gens SLC2A3 i SDHA tenen un risc significativament més alt de recidiva local de la malaltia després del tractament amb radioteràpia o quimio-radioteràpia.
2. En l'anàlisi multivariant, l'única variable que es va relacionar de manera significativa amb el control local de la malaltia va ser els nivells elevats de SLC2A3-SDHA, que va comportar un risc 4,24 vegades superior de recidiva local després del tractament amb radioteràpia o quimio-radioteràpia.
3. Els nivells d'expressió dels gens DLAT i LDHA van tenir capacitat pronòstica en relació amb el control local de la malaltia després del tractament amb cirurgia. Una expressió baixa de DLAT i elevada de LDHA es va associar a un increment del risc de recidiva local.
4. En l'anàlisi multivariant, les variables que es van relacionar de manera significativa amb el control local de la malaltia van ser l'estat dels marges de resecció i la categoria d'expressió de DLAT-LDHA. Els pacients amb una expressió baixa de DLAT i elevada de LDHA van mostrar un risc 16,82 vegades superior de recidiva local després de la cirurgia.
5. Es va trobar una tendència a la correlació entre l'expressió transcripcional i l'expressió immunohistoquímica de LDHA en el teixit tumoral.
6. D'acord amb els nostres resultats, la desregulació de determinats gens relacionats amb el metabolisme de la glucosa té un paper en el CECC. En aquest sentit, l'expressió transcripcional dels gens relacionats amb el metabolisme ha mostrat capacitat pronòstica en el control local de la malaltia en funció del tractament.



## VIII. BIBLIOGRAFIA

---

1. Abdel-Haleem AM, Lewis NE, Jamshidi N, Mineta K, Gao X, Gojobori T. The Emerging Facets of Non-Cancerous Warburg Effect. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 23 octubre 2017 [citat 25 setembre 2022];8(OCT). Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29109698/>
2. Adekola K, Rosen ST, Shanmugam M. Glucose transporters in cancer metabolism. *Curr Opin Oncol* [Internet]. novembre 2012 [citat 6 abril 2022];24(6):650-4. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22913968/>
3. Alfouzan AF. Head and neck cancer pathology: Old world versus new world disease. *Niger J Clin Pract* [Internet]. 1 gener 2019 [citat 19 març 2022];22(1):1-8. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30666013/>
4. Almangush A, Bello IO, Keski-Säntti H, Mäkinen LK, Kauppila JH, Pukkila M, et al. Depth of invasion, tumor budding, and worst pattern of invasion: prognostic indicators in early-stage oral tongue cancer. *Head Neck* [Internet]. 2014 [citat 21 març 2022];36(6):811-8. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23696499/>
5. Almangush A, Heikkinen I, Mäkitie AA, Coletta RD, Läärä E, Leivo I, et al. Prognostic biomarkers for oral tongue squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer* [Internet]. 5 setembre 2017 [citat 19 març 2022];117(6):856-66. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28751758/>
6. Alshafi E, Begg K, Amelio I, Raulf N, Lucarelli P, Sauter T, et al. Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges. Disponible a: <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1769-9>.
7. Ames BN, Gold LS. Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. *Mutat Res* [Internet]. 1991 [citat 25 maig 2022];250(1-2):3-16. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1944345/>
8. Ancy PB, Contat C, Meylan E. Glucose transporters in cancer - from tumor cells to the tumor microenvironment. *FEBS J* [Internet]. 1 agost 2018 [citat 24 setembre 2022];285(16):2926-43. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29893496/>
9. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* [Internet]. juliol 2010 [citat 6 juny 2022];363(1):24-35. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20530316/>
10. Avilés-Jurado FX, Muñoz C, Meler C, Flores JC, Gumà J, Benaiges E, et al. Circulating microRNAs modulating glycolysis as non-invasive prognostic biomarkers of HNSCC. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*. 1 maig 2021;278(5):1585-94.
11. Ayala FRR, Rocha RM, Carvalho KC, Carvalho AL, Da Cunha IW, Lourenço SV, et al. GLUT1 and GLUT3 as potential prognostic markers for Oral Squamous Cell Carcinoma. *Molecules* [Internet]. abril 2010 [citat 22 setembre 2022];15(4):2374-87. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20428049/>
12. Baer S, Casaubon L, Schwartz MR, Marcogliese A, Younes M. Glut3 expression in biopsy specimens of laryngeal carcinoma is associated with poor survival. *Laryngoscope*

- [Internet]. 2002 [citat 14 setembre 2022];112(2):393-6. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11889403/>
13. Bagué S, León X, Terra X, Lejeune M, Camacho M, Avilés-Jurado FX. Prognostic capacity of the transcriptional expression of lactate dehydrogenase A in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2022 Nov;44(11):2505-2512. doi: 10.1002/hed.27161.
  14. Bao YY, Zhou SH, Lu ZJ, Fan J, Huang YP. Inhibiting GLUT-1 expression and PI3K/Akt signaling using apigenin improves the radiosensitivity of laryngeal carcinoma in vivo. *Oncol Rep [Internet]*. 1 octubre 2015 [citat 16 setembre 2022];34(4):1805-14. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26238658/>
  15. Bhat GR, Hyole RG, Li J. Head and neck cancer: Current challenges and future perspectives. *Adv Cancer Res [Internet]*. 1 gener 2021 [citat 1 abril 2022];152:67-102. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34353444/>
  16. Bhatt AN, Mathur R, Farooque A, Verma A, Dwarakanath BS. Cancer biomarkers - current perspectives. *Indian J Med Res [Internet]*. 2010 [citat 6 juny 2022];132(8):129-49. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20716813/>
  17. Bian Z, Fan R, Xie L. A Novel Cuproptosis-Related Prognostic Gene Signature and Validation of Differential Expression in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Genes (Basel) [Internet]*. 1 maig 2022 [citat 19 setembre 2022];13(5). Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35627236/>
  18. Bisetto S, Whitaker-Menezes D, Wilski NA, Tuluc M, Curry J, Zhan T, et al. Monocarboxylate Transporter 4 (MCT4) Knockout Mice Have Attenuated 4NQO Induced Carcinogenesis; A Role for MCT4 in Driving Oral Squamous Cell Cancer. *Front Oncol [Internet]*. 28 agost 2018 [citat 24 setembre 2022];8(AUG). Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30211114/>
  19. Blatt S, Voelxen N, Sagheb K, Pabst AM, Walenta S, Schroeder T, et al. Lactate as a predictive marker for tumor recurrence in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) post radiation: a prospective study over 15 years. *Clin Oral Investig [Internet]*. 1 novembre 2016 [citat 21 setembre 2022];20(8):2097-104. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26728026/>
  20. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Cohen RB, Jones CU, Sur RK, et al. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol [Internet]*. 2010 [citat 1 abril 2022];11(1):21-8. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19897418/>
  21. Bonuccelli G, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, Pavlides S, Pestell RG, Fatatis A, et al. Cell Cycle The reverse Warburg Effect: Glycolysis inhibitors prevent the tumor promoting effects of caveolin-1 deficient cancer associated fibroblasts. 2010 [citat 13 abril 2022]; Disponible a: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kccy20>

22. Boroughs LK, Deberardinis RJ, Cell N, Author B. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth HHS Public Access Author manuscript. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2015;17(4):351-9. Disponible a: [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).
23. Bossi P, Fuereder T, Mercante G, Ledeganck KJ, Konings H, Stappers S, et al. A Literature Review of the Potential Diagnostic Biomarkers of Head and Neck Neoplasms. *Front Oncol* | [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org) [Internet]. 2020;1:1020. Disponible a: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org).
24. Botha H, Farah CS, Koo K, Cirillo N, McCullough M, Paolini R, Celentano A. The Role of Glucose Transporters in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Biomolecules*. 2021 Jul 21;11(8):1070. doi: 10.3390/biom11081070. PMID: 34439735; PMCID: PMC8392467.
25. Bravi F, Amy Lee Y-C, Hashibe M, Boffetta P, Conway DI, Ferraroni M, et al. Lessons learned from the INHANCE consortium: An overview of recent results on head and neck cancer Correspondence. *Oral Dis*. 2021;27:73-93.
26. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. 394 CA: A Cancer Journal for Clinicians Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA CANCER J CLIN*. 2018;68:394-424.
27. Budach V, Tinhofer I. Novel prognostic clinical factors and biomarkers for outcome prediction in head and neck cancer: a systematic review. *Lancet Oncol* [Internet]. 1 juny 2019 [citat 19 març 2022];20(6):e313-26. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31162105/>
28. Budach W, Bölke E, Kammers K, Gerber PA, Orth K, Gripp S, et al. Induction chemotherapy followed by concurrent radio-chemotherapy versus concurrent radio-chemotherapy alone as treatment of locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC): A meta-analysis of randomized trials. *Radiother Oncol* [Internet]. 1 febrer 2016 [citat 1 abril 2022];118(2):238-43. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26589131/>
29. Cai H, Li J, Zhang Y, Liao Y, Zhu Y, Wang C, et al. LDHA Promotes Oral Squamous Cell Carcinoma Progression Through Facilitating Glycolysis and Epithelial-Mesenchymal Transition. *Front Oncol* [Internet]. 19 desembre 2019 [citat 21 setembre 2022];9. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31921691/>
30. Califano J, Van Der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* [Internet]. 1 juny 1996 [citat 5 juny 2022];56(11):2488-92. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8653682/>
31. Califano J, Westra WH, Meininger G, Corio R, Koch WM, Sidransky D. Genetic progression and clonal relationship of recurrent premalignant head and neck lesions. *Clin Cancer Res* [Internet]. febrer 2000 [citat 5 juny 2022];6(2):347-52. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10690509/>

32. Calorini L, Peppicelli S, Bianchini F. Extracellular acidity as favouring factor of tumor progression and metastatic dissemination. *Exp Oncol* [Internet]. juny 2012 [citad 6 abril 2022];34(2):79-84. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23013757/>
33. Cancer Genome Atlas Network. Participants are arranged by area of contribution T, by institution then. ARTICLE Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*. 2014;517.
34. Castilho RM, Squarize CH, Almeida LO. Molecular Sciences Epigenetic Modifications and Head and Neck Cancer: Implications for Tumor Progression and Resistance to Therapy. Disponible a: [www.mdpi.com/journal/ijms](http://www.mdpi.com/journal/ijms)
35. Cavaliere M, Bisogno A, Scarpa A, D'Urso A, Marra P, Colacurcio V, et al. Biomarkers of laryngeal squamous cell carcinoma: a review. *Ann Diagn Pathol* [Internet]. 1 octubre 2021 [citad 26 abril 2022];54. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34242969/>
36. Chandel V, Maru S, Kumar A, Kumar A, Sharma A, Rathi B, et al. Role of monocarboxylate transporters in head and neck squamous cell carcinoma. *Life Sci* [Internet]. 15 agost 2021 [citad 24 setembre 2022];279. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34102188/>
37. Chatterjee D, Bansal V, Malik V, Bhagat R, Punia RS, Handa U, Gupta A, Dass A. Tumor Budding and Worse Pattern of Invasion Can Predict Nodal Metastasis in Oral Cancers and Associated With Poor Survival in Early-Stage Tumors. *Ear Nose Throat J*. 2019 Aug;98(7):E112-E119. doi: 10.1177/0145561319848669. Epub 2019 May 9. PMID: 31072197.
38. Chattopadhyay C, Oba J, Roszik J, Marszalek JR, Chen K, Qi Y, et al. Elevated Endogenous SDHA Drives Pathological Metabolism in Highly Metastatic Uveal Melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 1 octubre 2019 [citad 16 setembre 2022];60(13):4187-95. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31596927/>
39. Chen Q, Wang Y, Yang L, Sun L, Wen Y, Huang Y, et al. PM2.5 promotes NSCLC carcinogenesis through translationally and transcriptionally activating DLAT-mediated glycolysis reprogramming. *J Exp Clin Cancer Res* [Internet]. 1 desembre 2022 [citad 19 setembre 2022];41(1). Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35869499/>
40. Chen R-Y, Lin Y-C, Chen S-W, Lin T-Y, Hsieh T-C, Yen K-Y, et al. Immunohistochemical biomarkers and volumetric parameters for predicting radiotherapy-based outcomes in patients with p16-negative pharyngeal cancer [Internet]. Vol. 8, *Oncotarget*. 2017. Disponible a: [www.impactjournals.com/oncotarget/](http://www.impactjournals.com/oncotarget/)
41. Chen S, Cao G, Wu W, Lu Y, He X, Yang L, et al. Mining novel cell glycolysis related gene markers that can predict the survival of colon adenocarcinoma patients. *Biosci Rep* [Internet]. 1 agost 2020 [citad 19 setembre 2022];40(8). Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32744303/>
42. Chen TY, Hsieh YT, Huang JM, Liu CJ, Chuang L Te, Huang PC, et al. Determination of Pyruvate Metabolic Fates Modulates Head and Neck Tumorigenesis. *Neoplasia (United States)*. 1 juliol 2019;21(7):641-52.

43. Chen X, Lu P, Zhou S, Zhang L, Zhao JH, Tang JH. Predictive value of glucose transporter-1 and glucose transporter-3 for survival of cancer patients: A meta-analysis. *Oncotarget* [Internet]. 2 febrer 2017 [citat 14 setembre 2022];8(8):13206. Disponible a: [/pmc/articles/PMC5355089/](http://pmc/articles/PMC5355089/)
44. Chen Y, Maniakas A, Tan L, Cui M, Le X, Niedzielski JS, et al. Development of a rational strategy for integration of lactate dehydrogenase A suppression into therapeutic algorithms for head and neck cancer. *Transl Ther Br J Cancer* [Internet]. 2021 [citat 21 setembre 2022];124:1670-9. Disponible a: <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01297-x>
45. Cho M-H, Park CK, Park M, Kim WK, Cho A, Kim H. Clinicopathologic Features and Molecular Characteristics of Glucose Metabolism Contributing to <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose Uptake in Gastrointestinal Stromal Tumors. 2015; Disponible a: <http://rndhospital.khidi.or.kr/rdh>
46. Chow LQM. Head and Neck Cancer. Longo DL, editor. *N Engl J Med* [Internet]. 2 gener 2020 [citat 21 març 2022];382(1):60-72. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31893516/>
47. Chowdhury R, Kheng Yeoh K, Tian Y-M, Hillringhaus L, Bagg EA, Rose NR, et al. The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases. *EMBO Rep*. 2011;12:463-9.
48. Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* [Internet]. 13 març 2008 [citat 7 abril 2022];452(7184):230-3. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18337823/>
49. Clatot F, Gouéran S, Mareschal S, Cornic M, Berghian A, Choussy O, et al. The gene expression profile of inflammatory, hypoxic and metabolic genes predicts the metastatic spread of human head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* [Internet]. març 2014 [citat 23 setembre 2022];50(3):200-7. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24387976/>
50. Cossu AM, Mosca L, Zappavigna S, Misso G, Bocchetti M, De Micco F, et al. Molecular Sciences Long Non-coding RNAs as Important Biomarkers in Laryngeal Cancer and Other Head and Neck Tumours. Disponible a: [www.mdpi.com/journal/ijms](http://www.mdpi.com/journal/ijms)
51. Crabtree HG. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem J* [Internet]. 1 gener 1929 [citat 8 abril 2022];23(3):536-45. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16744238/>
52. Dalla Pozza E, Dando I, Pacchiana R, Liboi E, Scupoli MT, Donadelli M, et al. Regulation of succinate dehydrogenase and role of succinate in cancer. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 1 febrer 2020 [citat 17 setembre 2022];98:4-14. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31039394/>
53. Dang C V, Le A, Gao P. MYC-Induced Cancer Cell Energy Metabolism and Therapeutic Opportunities. Disponible a: <http://aacrjournals.org/clincancerres/article-pdf/15/21/6479/1984507/6479.pdf>



54. de la Cruz-López KG, Castro-Muñoz LJ, Reyes-Hernández DO, García-Carrancá A, Manzo-Merino J. Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. *Front Oncol* [Internet]. 1 novembre 2019 [citat 21 setembre 2022];9. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31737570/>
55. de Souza MG, de Jesus SF, Santos EM, Gomes ESB, de Paulo Santiago Filho A, Santos EMS, et al. Radiation Therapy Reduced Blood Levels of LDH, HIF-1 $\alpha$ , and miR-210 in OSCC. *Pathol Oncol Res* [Internet]. 1 gener 2020 [citat 23 setembre 2022];26(1):433-42. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30406875/>
56. DeBerardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv*. 2016 May 27;2(5):e1600200. doi: 10.1126/sciadv.1600200. PMID: 27386546; PMCID: PMC4928883.
57. Denko NC. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer*. setembre 2008;8(9):705-13.
58. Devic S. Warburg Effect-a Consequence or the Cause of Carcinogenesis? *J Cancer* [Internet]. 2016;7(7):817-22. Disponible a: <http://www.jcancer.org>
59. Domingo-Vidal M, Whitaker-Menezes D, Mollaei M, Lin Z, Tuluc M, Philp N, et al. Monocarboxylate Transporter 4 in Cancer-Associated Fibroblasts Is a Driver of Aggressiveness in Aerodigestive Tract Cancers. *Front Oncol* [Internet]. 22 juny 2022 [citat 25 setembre 2022];12. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35814364/>
60. Dong G, Mao Q, Xia W, Xu Y, Wang J, Xu L, et al. PKM2 and cancer: The function of PKM2 beyond glycolysis (Review). *Oncol Lett*. 2016;11(3):1980-6.
61. Eijkelenkamp K, Osinga TE, Links TP, van der Horst-Schrivers AN, Anouk A van der Horst-Schrivers CN. Clinical implications of the oncometabolite succinate in SDHx-mutation carriers. 2019; Disponible a: <https://publons.com/publon/10.1111/cge.13553/>
62. El-Bayoumy K, Christensen ND, Hu J, Viscidi R, Stairs DB, Walter V, Chen KM, Sun YW, Muscat JE, Richie JP Jr. An Integrated Approach for Preventing Oral Cavity and Oropharyngeal Cancers: Two Etiologies with Distinct and Shared Mechanisms of Carcinogenesis. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2020 Aug;13(8):649-660. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-20-0096. Epub 2020 May 20. PMID: 32434808; PMCID: PMC7415541.
63. Estilo CL, O-charoenrat P, Talbot S, Socci ND, Carlson DL, Ghossein R, et al. Oral tongue cancer gene expression profiling: Identification of novel potential prognosticators by oligonucleotide microarray analysis. 2009; Disponible a: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/9/11>
64. Fadaka A, Ajiboye B, Ojo O, Adewale O, Olayide I, Emuowhochere R. Biology of glucose metabolism in cancer cells. *J Oncol Sci* [Internet]. 2017;3(2):45-51. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jons.2017.06.002>
65. Fan C, Tang Y, Wang J, Xiong F, Guo C, Wang Y, Zhang S, Gong Z, Wei F, Yang L, He Y, Zhou M, Li X, Li G, Xiong W, Zeng Z. Role of long non-coding RNAs in glucose metabolism in cancer. *Mol Cancer*. 2017 Jul 24;16(1):130. doi: 10.1186/s12943-017-0699-3. PMID: 28738810; PMCID: PMC5525357.

66. Feng Y, Xiong Y, Qiao T, Li X, Jia L, Han Y. Lactate dehydrogenase A: A key player in carcinogenesis and potential target in cancer therapy. *Cancer Med* [Internet]. 1 desembre 2018 [citat 21 setembre 2022];7(12):6124-36. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30403008/>
67. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*. novembre 2004;4(11):891-9.
68. Gatta G, Botta L, Sánchez MJ, Anderson LA, Pierannunzio D, Licitra L, et al. Prognoses and improvement for head and neck cancers diagnosed in Europe in early 2000s: The EURO CARE-5 population-based study. *Eur J Cancer*. 1 octubre 2015;51(15):2130-43.
69. Grimm M, Krimmel M, Hoefert S, Kraut W, Calg eer B, Biegner T, et al. Monitoring a «metabolic shift» after surgical resection of oral squamous cell carcinomas by serum lactate dehydrogenase. *J Oral Pathol Med* [Internet]. 1 maig 2016 [citat 22 setembre 2022];45(5):346-55. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26403591/>
70. Gruszczyński GG, Kopała D; Citation: Nijakowski, K. 2022; Disponible a: <https://doi.org/10.3390/metabo12040294>.
71. Gyamfi J, Kim J, Choi J. Cancer as a Metabolic Disorder. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan 21;23(3):1155. doi: 10.3390/ijms23031155. PMID: 35163079; PMCID: PMC8835572.
72. Han Y, Wang X, Xia K, Su T. A novel defined hypoxia-related gene signature to predict the prognosis of oral squamous cell carcinoma. Disponible a: <https://dx.doi.org/10.21037/atm-21-4990>
73. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022 Jan;12(1):31-46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059. PMID: 35022204.
74. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9. PMID: 10647931.
75. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 4 març 2011;144(5):646-74.
76. Haque S, Karivedu V, Riaz MK, Choi D, Roof L, Hassan SZ, et al. High-risk pathological features at the time of salvage surgery predict poor survival after definitive therapy in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 1 gener 2019;88:9-15.
77. Hay N. Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nat Rev Cancer* [Internet]. 23 setembre 2016 [citat 11 abril 2022];16(10):635-49. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27634447/>
78. He Y, Chen X, Yu Y, Li J, Hu Q, Xue C, et al. LDHA is a direct target of miR-30d-5p and contributes to aggressive progression of gallbladder carcinoma. *Mol Carcinog* [Internet]. 1 juny 2018 [citat 21 setembre 2022];57(6):772-83. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29569755/>

79. Heyn H, Esteller M. DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2012 [citat 8 abril 2022];13(10):679-92. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22945394/>
80. Hirschey MD, DeBerardinis RJ, Diehl AME, Drew JE, Frezza C, Green MF, et al. Dysregulated metabolism contributes to oncogenesis. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 1 desembre 2015 [citat 19 març 2022];35:S129-50. Disponible a: <http://dx>.
81. Hou X, Shi X, Zhang W, Li D, Hu L, Yang J, et al. LDHA induces EMT gene transcription and regulates autophagy to promote the metastasis and tumorigenesis of papillary thyroid carcinoma. *Cell Death Dis* [Internet]. 1 abril 2021 [citat 21 setembre 2022];12(4). Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33795650/>
82. Hsieh Y-T, Chen Y-F, Lin S-C, Chang K-W, Li W-C. Molecular Sciences Targeting Cellular Metabolism Modulates Head and Neck Oncogenesis. 2019; Disponible a: [www.mdpi.com/journal/ijms](http://www.mdpi.com/journal/ijms)
83. Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*. 5 setembre 2008;134(5):703-7.
84. Huang GJ, Yang BB. Identification of core miRNA prognostic markers in patients with laryngeal cancer using bioinformatics analysis. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*. 1 maig 2021;278(5):1613-26.
85. Huang SH, O'Sullivan B. Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options Oncol* [Internet]. 1 juliol 2017 [citat 19 març 2022];18(7). Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28555375/>
86. Huang X, Li X, Xie X, Ye F, Chen B, Song C, et al. High expressions of LDHA and AMPK as prognostic biomarkers for breast cancer. *Breast* [Internet]. 1 desembre 2016 [citat 21 setembre 2022];30:39-46. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27598996/>
87. Hudson TJ, Anderson W, Aretz A, Barker AD, Bell C, Bernabé RR, et al. International network of cancer genome projects. *Nature*. 15 abril 2010;464(7291):993-8.
88. Isayeva T, Li Y, Maswahu D, Brandwein-Gensler M. Human papillomavirus in non-oropharyngeal head and neck cancers: a systematic literature review. *Head Neck Pathol*. 2012 Jul;6 Suppl 1(Suppl 1):S104-20. doi: 10.1007/s12105-012-0368-1. Epub 2012 Jul 3. PMID: 22782230; PMCID: PMC3394168.
89. Ishikawa S, Sugimoto M, Konta T, Kitabatake K, Ueda S, Edamatsu K, et al. Salivary Metabolomics for Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Front Oncol*. 5 gener 2022;11.
90. Jha NK, Jha SK, Sharma A, Yadav R, et al. Clinical Relevance of "Biomarkers" in Cancer Metabolism. Dins: Kumar D editor. *Cancer Cell Metabolism: A Potential Target for Cancer Therapy*. Singapore: Springer Nature; 2020. p.127-46.
91. Jiang B. Aerobic glycolysis and high level of lactate in cancer metabolism and microenvironment. *Genes Dis* [Internet]. 1 març 2017 [citat 6 abril 2022];4(1):25-7. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gendis.2017.02.003>

92. Jing P, Zhou S, Xu P, Cui P, Liu X, Liu X, et al. PDK1 promotes metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in hypopharyngeal carcinoma via the Notch1 signaling pathway. *Exp Cell Res* [Internet]. 15 gener 2020 [citat 23 setembre 2022];386(2). Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31778670/>
93. Johnson DE, Burtneess B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2020 Nov 26;6(1):92. doi: 10.1038/s41572-020-00224-3. PMID: 33243986; PMCID: PMC7944998.
94. Kaelin WG, Thompson CB. Q&A: Cancer: clues from cell metabolism. *Nature* [Internet]. 3 juny 2010 [citat 6 juny 2022];465(7298):562-4. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20520704/>
95. Kim SK, Ahn SG, Mun JY, Jeong MS, Bae SJ, Lee JS, et al. Genomic Signature of the Standardized Uptake Value in 18 F-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography in Breast Cancer. *Cancers (Basel)* [Internet]. 1 febrer 2020 [citat 21 setembre 2022];12(2). Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32093417/>
96. King A, Selak MA, Gottlieb E. Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene*. 2006 Aug 7;25(34):4675-82. doi: 10.1038/sj.onc.1209594. PMID: 16892081
97. Konings H, Stappers S, Geens M, De Winter BY, Lamote K, van Meerbeeck JP, et al. A Literature Review of the Potential Diagnostic Biomarkers of Head and Neck Neoplasms. *Front Oncol* [Internet]. 26 juny 2020 [citat 21 juliol 2022];10. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32670885/>
98. Koppenol WH, Bounds PL, Dang C V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer*. maig 2011;11(5):325-37.
99. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Gatter KC, Trarbach T, Folprecht G, et al. Prognostic and predictive role of lactate dehydrogenase 5 expression in colorectal cancer patients treated with PTK787/ZK 222584 (vatalanib) antiangiogenic therapy. *Clin Cancer Res* [Internet]. 15 juliol 2011 [citat 21 setembre 2022];17(14):4892-900. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21632858/>
100. Kreimer AR, Johansson M, Waterboer T, Kaaks R, Chang-Claude J, Drogen D, et al. Evaluation of human papillomavirus antibodies and risk of subsequent head and neck cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 20 juliol 2013 [citat 8 abril 2022];31(21):2708-15. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23775966/>
101. Kunkel M, Moergel M, Stockinger M, Jeong JH, Fritz G, Lehr HA, Whiteside TL. Overexpression of GLUT-1 is associated with resistance to radiotherapy and adverse prognosis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncol*. 2007 Sep;43(8):796-803. doi: 10.1016/j.oraloncology.2006.10.009. Epub 2007 Jan 4. PMID: 17207657.
102. Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. gener 2011 [citat 25 març 2022];11(1):9-22. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21160525/>

103. Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 1 maig 2018 [citat 6 juny 2022];18(5):269-82. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29497144/>
104. León X, Orús C, Quer M. Diseño, mantenimiento y explotación de una base de datos oncológica para pacientes con tumores malignos de cabeza y cuello. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 1 març 2002;53(3):185-90.
105. Levine AJ, Puzio-Kuter AM. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science* [Internet]. 3 desembre 2010 [citat 5 abril 2022];330(6009):1340-4. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21127244/>
106. Li G, Gao J, Tao YL, Xu BQ, Tu ZW, Liu ZG, Zeng MS, Xia YF. Increased pretreatment levels of serum LDH and ALP as poor prognostic factors for nasopharyngeal carcinoma. *Chin J Cancer*. 2012 Apr;31(4):197-206. doi: 10.5732/cjc.011.10283. Epub 2012 Jan 9. PMID: 22237040; PMCID: PMC3777475.
107. Li J, Liang N, Long X, Zhao J, Yang J, Du X, et al. SDHC-related deficiency of SDH complex activity promotes growth and metastasis of hepatocellular carcinoma via ROS/NFκB signaling. *Cancer Lett* [Internet]. 1 octubre 2019 [citat 16 setembre 2022];461:44-55. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31278950/>
108. Li Y, Bai S, Carroll W, Dayan D, Dort JC, Heller K, et al. Validation of the Risk Model: High-Risk Classification and Tumor Pattern of Invasion Predict Outcome for Patients with Low-Stage Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. 2013;7:211-23. Disponible a: <http://www.vendian.org/mn>
109. Liberti M V, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? HHS Public Access. *Trends Biochem Sci*. 2016;41(3):211-8.
110. Liu Y, Yin S. A Novel Prognostic Index Based on the Analysis of Glycolysis-Related Genes in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *J Oncol* [Internet]. 2020 [citat 23 setembre 2022];2020. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33029143/>
111. Lu W, Wu Y, Huang S, Zhang D. A Ferroptosis-Related Gene Signature for Predicting the Prognosis and Drug Sensitivity of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Front Genet* [Internet]. 21 octubre 2021 [citat 15 setembre 2022];12. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34745224/>
112. Lv J, Zhou Z, Wang J, Yu H, Lu H, Yuan B, et al. Prognostic Value of Lactate Dehydrogenase Expression in Different Cancers: A Meta-Analysis. *Am J Med Sci* [Internet]. 1 desembre 2019 [citat 21 setembre 2022];358(6):412-21. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31813468/>
113. Lydiatt WM, Patel SG, O'Sullivan B, Brandwein MS, Ridge JA, Migliacci JC, et al. Head and neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. març 2017;67(2):122-37.
114. MacFarlane J, Seong KC, Bisambar C, Madhu B, Allinson K, Marker A, et al. A review of the tumour spectrum of germline succinate dehydrogenase gene mutations: Beyond pheochromocytoma and paraganglioma. *Clin Endocrinol (Oxf)* [Internet]. 1 novembre

- 2020 [citat 15 setembre 2022];93(5):528-38. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32686200/>
115. Magnes T, Wagner S, Kiem D, Weiss L, Rinnerthaler G, Greil R, et al. Molecular Sciences Prognostic and Predictive Factors in Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Mol Sci* [Internet]. 2021;22. Disponible a: <https://doi.org/10.3390/ijms22094981>
  116. Mäkitie AA, Almangush A, Rodrigo JP, Ferlito A, Leivo I. Hallmarks of cancer: Tumor budding as a sign of invasion and metastasis in head and neck cancer. *Head Neck* [Internet]. 1 octubre 2019 [citat 21 març 2022];41(10):3712-8. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31328847/>
  117. Mehanna H, Rischin D, Wong SJ, Gregoire V, Ferris R, Waldron J, Le QT, Forster M, Gillison M, Laskar S, Tahara M, Psyrri A, Vermorken J, Porceddu S. De-Escalation After DE-ESCALATE and RTOG 1016: A Head and Neck Cancer InterGroup Framework for Future De-Escalation Studies. *J Clin Oncol*. 2020 Aug 1;38(22):2552-2557. doi: 10.1200/JCO.20.00056. Epub 2020 Jun 4. PMID: 32496903; PMCID: PMC7392745.
  118. Miranda-Filho A, Bray F. Global patterns and trends in cancers of the lip, tongue and mouth. *Oral Oncol* [Internet]. 1 març 2020 [citat 21 març 2022];102. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31986342/>
  119. Miranda-Galvis M, Loveless R, Paulo Kowalski L, Teng Y. Impacts of Environmental Factors on Head and Neck Cancer Pathogenesis and Progression. 2021;10:389.
  120. Mohajertehran F, Ayatollahi H, Jafarian AH, Khazaeni K, Soukhtanloo M, Shakeri M-T, et al. Overexpression of Lactate Dehydrogenase in the Saliva and Tissues of Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma [Internet]. Vol. 7, Reports of Biochemistry & Molecular Biology. 2019. Disponible a: [www.RBMB.net](http://www.RBMB.net)
  121. Mohtasham N, Ayatollahi H, Saghravanian N, Zare R, Shakeri M-T, Sahebkar A, et al. Evaluation of Tissue and Serum Expression Levels of Lactate Dehydrogenase Isoenzymes in Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Agents Med Chem* [Internet]. 14 octubre 2019 [citat 24 setembre 2022];19(17):2072-8. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31660843/>
  122. Müller S. Update from the 4th Edition of the World Health Organization of Head and Neck Tumours: Tumours of the Oral Cavity and Mobile Tongue. *Head Neck Pathol*. 2017 Mar;11(1):33-40. doi: 10.1007/s12105-017-0792-3. Epub 2017 Feb 28. PMID: 28247230; PMCID: PMC5340733.
  123. Ne Simonnet H, Alazard N, Pfeiffer K, Gallou C, Bérout C, Demont J, et al. Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma. Vol. 23, *Carcinogenesis*. 2002.
  124. Nijakowski K, Gruszczynski D, Kopała D, Surdacka A. Salivary Metabolomics for Oral Squamous Cell Carcinoma Diagnosis: A Systematic Review. *Metabolites* [Internet]. 1 abril 2022 [citat 25 setembre 2022];12(4). Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35448481/>

125. Olszewski K, Barsotti A, Feng XJ, Momcilovic M, Liu KG, Kim JI, et al. Inhibition of glucose transport synergizes with chemical or genetic disruption of mitochondrial metabolism and suppresses TCA cycle-deficient tumors. *Cell Chem Biol.* 17 març 2022;29(3):423-435.e10.
126. O'Rorke MA, Ellison M V., Murray LJ, Moran M, James J, Anderson LA. Human papillomavirus related head and neck cancer survival: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol [Internet].* desembre 2012 [citat 6 abril 2022];48(12):1191-201. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22841677/>
127. Pai SI, Westra WH. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. *Annu Rev Pathol [Internet].* febrer 2009 [citat 28 març 2022];4:49-70. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18729723/>
128. Pai S, Yadav VK, Kuo KT, Pikatan NW, Lin CS, Chien MH, et al. PDK1 Inhibitor BX795 Improves Cisplatin and Radio-Efficacy in Oral Squamous Cell Carcinoma by Downregulating the PDK1/CD47/Akt-Mediated Glycolysis Signaling Pathway. *Int J Mol Sci [Internet].* 1 novembre 2021 [citat 23 setembre 2022];22(21). Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34768921/>
129. Pardo-Reoyo S, Roig-Lopez JL, Yang ES. Potential biomarkers for radiosensitivity in head and neck cancers. *Ann Transl Med [Internet].* 1 desembre 2016 [citat 24 setembre 2022];4(24). Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28149885/>
130. Pascale RM, Calvisi DF, Simile MM, Feo CF, Feo F. The Warburg Effect 97 Years after Its Discovery. *Cancers (Basel).* 2020 Sep 30;12(10):2819. doi: 10.3390/cancers12102819. PMID: 33008042; PMCID: PMC7599761.
131. Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, Flomenberg N, Witkiewicz AK, Frank PG, et al. Cell Cycle The reverse Warburg effect: Aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. 2009; Disponible a: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kccy20>
132. Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab [Internet].* 12 gener 2016 [citat 19 març 2022];23(1):27-47. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>
133. Pavlova NN, Zhu J, Thompson CB. The hallmarks of cancer metabolism: Still emerging. *Cell Metab [Internet].* 1 març 2022 [citat 19 març 2022];34(3):355-77. Disponible a: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.01.007>
134. Payen VL, Mina E, Van Hée VF, Porporato PE, Sonveaux P. Monocarboxylate transporters in cancer. *Mol Metab [Internet].* 1 març 2020 [citat 3 juliol 2022];33:48-66. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31395464/>
135. Pedersen PL. Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the «Warburg Effect», i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. *J Bioenerg Biomembr.* juny 2007;39(3):211-22.

136. Pouysségur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*. 25 maig 2006;441(7092):437-43.
137. Powell SF, Vu L, Spanos WC, Pyeon D. cancers The Key Differences between Human Papillomavirus-Positive and-Negative Head and Neck Cancers: Biological and Clinical Implications. 2021; Disponible a: <https://doi.org/10.3390/cancers13205206>
138. Prusinkiewicz MA, Gameiro SF, Ghasemi F, Dodge MJ, Zeng PYF, Maekebay H, et al. Survival-Associated Metabolic Genes in Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Cancers. *Cancers (Basel)* [Internet]. 1 gener 2020 [citat 24 setembre 2022];12(1). Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31968678/>
139. Qiang W, Dai Y, Xing X, Sun | Xiaobo. Identification of a metabolic reprogramming-related signature associated with prognosis and immune microenvironment of head and neck squamous cell carcinoma by in silico analysis. *Cancer Med*. 2022;00:1-14.
140. Quan W, Goh J, Ow GS, Kuznetsov VA, Chong S, Lim YP. DLAT subunit of the pyruvate dehydrogenase complex is upregulated in gastric cancer-implications in cancer therapy. *Am J Transl Res* [Internet]. 2015 [citat 17 setembre 2022];7(6):1140. Disponible a: </pmc/articles/PMC4532746/>
141. Rizwan M, Al Rasheed H, Tarjan G. Succinate Dehydrogenase Complex An Updated Review. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2018;142:1564-70. Disponible a: <http://meridian.allenpress.com/doi/pdf/10.5858/arpa.2017-0285-RS>
142. Rosenberg AJ, Vokes EE. Optimizing Treatment De-Escalation in Head and Neck Cancer: Current and Future Perspectives. *Oncologist*. 1 gener 2021;26(1):40-8.
143. Sacco AG, Cohen EE. Current Treatment Options for Recurrent or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* [Internet]. 10 octubre 2015 [citat 25 març 2022];33(29):3305-15. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26351341/>
144. Sandulache VC, Myers JN. Altered metabolism in head and neck squamous cell carcinoma: an opportunity for identification of novel biomarkers and drug targets NIH Public Access. *Head Neck*. 2012;34(2).
145. Sandulache VC, Ow TJ, Pickering CR, Frederick MJ, Zhou G, Fokt I, et al. Glucose, Not Glutamine, Is the Dominant Energy Source Required for Proliferation and Survival of Head and Neck Squamous Carcinoma Cells. Disponible a: <http://cran.r-project.org/>
146. Sant'anna-Silva ACB, Perez-Valencia JA, Sciacovelli M, Lalou C, Sarlak S, Tronci L, et al. Succinate Anaplerosis Has an Onco-Driving Potential in Prostate Cancer Cells. *Cancers (Basel)* [Internet]. 1 abril 2021 [citat 17 setembre 2022];13(7). Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33917317/>
147. Schiliro C, Firestein BL. cells Mechanisms of Metabolic Reprogramming in Cancer Cells Supporting Enhanced Growth and Proliferation. 2021; Disponible a: <https://doi.org/10.3390/cells10051056>
148. Schilling C, Stoeckli SJ, Haerle SK, Broglie MA, Huber GF, Sorensen JA, et al. Sentinel European Node Trial (SENT): 3-year results of sentinel node biopsy in oral cancer. *Eur*



- J Cancer [Internet]. 1 desembre 2015 [citat 1 abril 2022];51(18):2777-84. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26597442/>
149. Schöpf B, Weissensteiner H, Schäfer G, Fazzini F, Charoentong P, Naschberger A, et al. OXPPOS remodeling in high-grade prostate cancer involves mtDNA mutations and increased succinate oxidation. Disponible a: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15237-5>
  150. Seiwert TY, Burtness B, Mehra R, Weiss J, Berger R, Eder JP, et al. Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 1 juliol 2016 [citat 1 abril 2022];17(7):956-65. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27247226/>
  151. Seiwert TY, Zuo Z, Keck MK, Khattri A, Pedamallu CS, Stricker T, et al. Biology of Human Tumors Integrative and Comparative Genomic Analysis of HPV-Positive and HPV-Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Clin Cancer Res* [Internet]. 21(3). Disponible a: <http://clincancerres.aacrjournals.org/>
  152. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci*. 2012 Apr;33(4):207-14. doi: 10.1016/j.tips.2012.01.005. Epub 2012 Mar 6. PMID: 22398146; PMCID: PMC3437546.
  153. Seyfried TN, Arismendi-Morillo G, Mukherjee P, Chinopoulos C. On the Origin of ATP Synthesis in Cancer. *iScience* [Internet]. 20 novembre 2020 [citat 11 abril 2022];23(11). Disponible a: <https://doi.org/10.1016/j.isci>.
  154. Seyfried TN, Shelton LM. Cancer as a metabolic disease [Internet]. 2010. Disponible a: <http://www.nutritionandmetabolism.com/content/7/1/7>
  155. Shah FD, Begum R, Vajaria BN, Patel KR, Patel JB, Shukla SN, et al. A review on salivary genomics and proteomics biomarkers in oral cancer. *Indian J Clin Biochem* [Internet]. octubre 2011 [citat 24 març 2022];26(4):326-34. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23024467/>
  156. Shankaraiah RC, Veronese A, Sabbioni S, Negrini M. Non-coding RNAs in the reprogramming of glucose metabolism in cancer. *Cancer Lett* [Internet]. 10 abril 2018 [citat 19 març 2022];419:167-74. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29366802/>
  157. Shiah S-G, Chou S-T, Chang J-Y. cancers MicroRNAs: Their Role in Metabolism, Tumor Microenvironment, and Therapeutic Implications in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. 2021; Disponible a: <https://doi.org/10.3390/cancers13225604>
  158. Shim H, Dolde C, Lewis BC, Wu C-S, Dang G, Jungmann RA, et al. c-Myc transactivation of LDH-A: Implications for tumor metabolism and growth (oncogenelactate dehydrogenasehypoxiatumorigenicity) [Internet]. Vol. 94, National Institutes of Health. 1997. Disponible a: <https://www.pnas.org>
  159. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*. 2022;72(1):7-33.

160. Simões-Sousa S, Granja S, Pinheiro C, Fernandes D, Longatto-Filho A, Laus AC, et al. Prognostic significance of monocarboxylate transporter expression in oral cavity tumors. *Cell Cycle* [Internet]. 17 juliol 2016 [citad 24 setembre 2022];15(14):1865-73. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27232157/>
161. Singleterry J, Sreedhar A, Zhao Y. Components of cancer metabolism and therapeutic interventions. *Mitochondrion*. 2014 Jul;17:50-5. doi: 10.1016/j.mito.2014.05.010. Epub 2014 Jun 6. PMID: 24910195; PMCID: PMC4134411.
162. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. «FIELD CANCERIZATION» IN ORAL STRATIFIED SQUAMOUS EPITHELIUM Clinical Implications of Multicentric Origin. *Cancer* 1953;(6): 963-68.
163. Soga T. Cancer metabolism: Key players in metabolic reprogramming. *Cancer Sci*. 2013;104(3):275-81.
164. Starska K, Forma E, Józwiak P, Bryś M, Lewy-Trenda I, Brzezińska-Błaszczuk E, Krześlak A. Gene and protein expression of glucose transporter 1 and glucose transporter 3 in human laryngeal cancer-the relationship with regulatory hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression, tumor invasiveness, and patient prognosis. *Tumour Biol*. 2015 Apr;36(4):2309-21. doi: 10.1007/s13277-014-2838-4. Epub 2014 Nov 21. PMID: 25412955; PMCID: PMC4428538.
165. Stein AP, Saha S, Kraninger JL, Swick AD, Yu M, Lambert PF, et al. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal cancer. *Cancer J (United States)*. 9 maig 2015;21(3):138-46.
166. Stratton MR. Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. *Science* [Internet]. 25 març 2011 [citad 25 maig 2022];331(6024):1553-8. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21436442/>
167. Sun W, Zhang X, Ding X, Li H, Geng M, Xie Z, Wu H, Huang M. Lactate dehydrogenase B is associated with the response to neoadjuvant chemotherapy in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2015 May 14;10(5):e0125976. doi: 10.1371/journal.pone.0125976. PMID: 25973606; PMCID: PMC4431727.
168. Swietach P, Vaughan-Jones RD, Harris AL. Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. juny 2007 [citad 14 abril 2022];26(2):299-310. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17415526/>
169. Taefehshokr S, Taefehshokr N, Hemmat N, Hajazimian S, Isazadeh A, Dadebighlu P, Baradaran B. The pivotal role of MicroRNAs in glucose metabolism in cancer. *Pathol Res Pract*. 2021 Jan;217:153314. doi: 10.1016/j.prp.2020.153314. Epub 2020 Dec 4. PMID: 33341548.
170. Terra X, Ceperuelo-Mallafre V, Merma C, Benaiges E, Bosch R, Castillo P, Flores JC, León X, Valduvieto I, Basté N, Cámara M, Lejeune M, Gumà J, Vendrell J, Vilaseca I, Fernández-Veledo S, Avilés-Jurado FX. Succinate Pathway in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Potential as a Diagnostic and Prognostic Marker. *Cancers (Basel)*. 2021 Apr 1;13(7):1653. doi: 10.3390/cancers13071653. PMID: 33916314; PMCID: PMC8037494.

171. Tsang CM, Lui VWY, Bruce JP, Pugh TJ, Lo KW. Translational genomics of nasopharyngeal cancer. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 1 abril 2020 [citat 24 març 2022];61:84-100. Disponible a: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.09.006>
172. Tsvetkov P, Coy S, Petrova B, Dreishpoon M, Verma A, Abdusamad M, et al. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins. *Science* [Internet]. 18 març 2022 [citat 17 setembre 2022];375(6586):1254-61. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35298263/>
173. Uehara T, Doi H, Ishikawa K, Inada M, Tatsuno S, Wada Y, et al. Serum lactate dehydrogenase is a predictive biomarker in patients with oropharyngeal cancer undergoing radiotherapy: Retrospective study on predictive factors. *Head Neck* [Internet]. 1 octubre 2021 [citat 21 setembre 2022];43(10):3132-41. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34268826/>
174. Vander Heiden MG, DeBerardinis RJ. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell*. 9 febrer 2017;168(4):657-69.
175. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation NIH Public Access. *Science* (80- ). 2009;324(5930):1029-33.
176. Vigneswaran N, Williams MD. Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2014 May;26(2):123-41. doi: 10.1016/j.coms.2014.01.001. PMID: 24794262; PMCID: PMC4040236.
177. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* [Internet]. agost 2004 [citat 5 juny 2022];10(8):789-99. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15286780/>
178. Waddington CH. The Epigenotype. *Int J Epidemiol* [Internet]. 1 febrer 2012 [citat 25 setembre 2022];41(1):10-3. Disponible a: <https://academic.oup.com/ije/article/41/1/10/648029>
179. Wang H, Xue W, Ouyang W, Jiang X, Jiang X. MiR-23a-3p/SIX1 regulates glucose uptake and proliferation through GLUT3 in head and neck squamous cell carcinomas. *J Cancer*. 2020;11(9):2529-39.
180. Wang J, Li L, Dong BQ, Xu YJ, Zheng YD, Sun ZW, Yang Y, Chen YY, Chen XZ, Chen M. Post-treatment serum lactic dehydrogenase as a predictive indicator for distant metastasis and survival of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget*. 2016 May 10;7(19):27458-67. doi: 10.18632/oncotarget.8480. PMID: 27050275; PMCID: PMC5053663.
181. Wang Y, Zhang X, Wang S, Li Z, Hu X, Yang X, et al. Identification of Metabolism-Associated Biomarkers for Early and Precise Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. 2022; Disponible a: <https://doi.org/10.3390/biom12030400>
182. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* [Internet]. 1956 [citat 6 juny 2022];123(3191):309-14. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13298683/>

183. Warburg O, Wind F, Negelein E. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J Gen Physiol* [Internet]. 7 març 1927 [citat 6 abril 2022];8(6):519-30. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19872213/>
184. Ward PS, Thompson CB. Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. *Cancer Cell*. 20 març 2012;21(3):297-308.
185. Wigfield SM, Winter SC, Giatromanolaki A, Taylor J, Koukourakis ML, Harris AL. PDK-1 regulates lactate production in hypoxia and is associated with poor prognosis in head and neck squamous cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 2008;98:1975-84. Disponible a: [www.bjcancer.com](http://www.bjcancer.com)
186. Wreesmann VB, Katabi N, Palmer FL, Montero PH, Migliacci JC, Gönen M, et al. Influence of extracapsular nodal spread extent on prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* [Internet]. 1 abril 2016 [citat 1 abril 2022];38 Suppl 1(Suppl 1):E1192-9. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26514096/>
187. Würdemann N, Wagner S, Sharma SJ, Prigge E-S, Reuschenbach M, Gattenlöhner S, et al. prognostic impact of aJCC/UiCC 8th edition new staging rules in oropharyngeal squamous Cell Carcinoma. 2017;7:129. Disponible a: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
188. Yang M, Soga T, Pollard PJ. Oncometabolites: linking altered metabolism with cancer. *J Clin Invest*. 2013 Sep;123(9):3652-8. doi: 10.1172/JCI67228. Epub 2013 Sep 3. PMID: 23999438; PMCID: PMC3754247.
189. Yao F, Zhao T, Zhong C, Zhu J, Zhao H. LDHA is necessary for the tumorigenicity of esophageal squamous cell carcinoma. *Tumour Biol* [Internet]. 2013 [citat 21 setembre 2022];34(1):25-31. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22961700/>
190. Yeung SJ, Pan J, Lee MH. Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - the seventh hallmark of cancer. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. desembre 2008 [citat 5 juny 2022];65(24):3981-99. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18766298/>
191. Yu C, Xue J, Zhu W, Jiao Y, Zhang S, Cao J. Warburg meets non-coding RNAs: the emerging role of ncRNA in regulating the glucose metabolism of cancer cells. *Tumour Biol* [Internet]. 1 gener 2015 [citat 19 març 2022];36(1):81-94. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25431262/>
192. Zhang JP, Wang HB, Lin YH, Xu J, Wang J, Wang K, et al. Lactate dehydrogenase is an important prognostic indicator for hepatocellular carcinoma after partial hepatectomy. *Transl Oncol*. 2015;8(6):497-503.
193. Zhang LF, Jiang S, Liu MF. MicroRNA regulation and analytical methods in cancer cell metabolism. *Cell Mol Life Sci*. 1 agost 2017;74(16):2929-41.
194. Zhou S, Wang S, Wu Q, Fan J, Wang Q. Expression of glucose transporter-1 and -3 in the head and neck carcinoma--the correlation of the expression with the biological behaviors. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* [Internet]. abril 2008 [citat 14 setembre 2022];70(3):189-94. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18401196/>

195. Zhou X, Chen R, Xie W, Ni Y, Liu J, Huang G. Relationship Between 18 F-FDG Accumulation and Lactate Dehydrogenase A Expression in Lung Adenocarcinomas. *J Nucl Med*. 2014;55:1766-71.
196. Zhu J, Wu Y-N, Zhang W, Zhang X-M, Ding X. Monocarboxylate Transporter 4 Facilitates Cell Proliferation and Migration and Is Associated with Poor Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. *PLoS One* [Internet]. 2014;9(1):87904. Disponible a: [www.plosone.org](http://www.plosone.org)



## IX. ANNEXES

---

## 1. Llista de figures

**Figura 1.** Principals llocs anatòmics del carcinoma escatós de cap i coll (CECC).

**Figura 2.** Carcinoma escatós exofític de laringe amb afectació transglòtica. Font: arxiu del Servei de Patologia. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

**Figura 3.** Incidència global del CECC.

**Figura 4.** Factors de risc de càncer oral i d'orofaringe.

**Figura 5.** Histologia. a) Carcinoma escatós ben diferenciat amb una perla còrnia (fletxa) (HEx 200) b) Carcinoma escatós mal diferenciat amb atípia nuclear i mitosis abundants (cercles) (HEx400) c) Carcinoma escatós mal diferenciat de tipus basaloide (HEx 200).

**Figura 6.** Mesura de la profunditat de la invasió (DOI\*).

**Figura 7.** Profunditat de la invasió (DOI) en un tumor exofític (a) i en un tumor ulcerat (b).

**Figura 8.** a) Extensió ganglionar extracapsular “minor”  $\leq 2\text{mm}$  i b) “major”  $>2\text{mm}$ .

**Figura 9.** Èmbols tumorals en una vena i en un vas limfàtic.

**Figura 10.** a) Invasió perineural; b) Invasió intraneural (fletxa) (HEx400).

**Figura 11.** a) Front d'invasió tumoral no cohesiu; b) Front d'invasió amb un focus de tumor a múscul esquelètic (fletxa) que correspon a un WPOI-5 (HEx200).

**Figura 12.** CE de llengua amb focus de “tumor budding”.

**Figura 13.** Cancerització de camp: impacte en la recaiguda local i en l'aparició de segones neoplàsies.

**Figura 14.** Model de progressió genètica de la tumorigènesi en el CECC VPH (-).

**Figura 15.** Concepte de carcinogènes a cap i coll induïda per VPH.

**Figura 16.** Hipermetilació de l'ADN del gen supressor tumoral CDKN2A/p16INK4a.

**Figura 17.** Cronologia de la caracterització molecular, les innovacions terapèutiques en càncer de cap i coll, i perspectives de futur.

**Figura 18.** Segells distintius del càncer.

**Figura 19.** Segells distintius del metabolisme del càncer. Paper del metabolisme de la glucosa i de les alteracions en la regulació gènica impulsades pels metabòlits.



**Figura 20.** Vies metabòliques de la glucosa.

**Figura 21.** Via de la glicòlisi.

**Figura 22.** Cicle de l'àcid tricarboxílic (Krebs).

**Figura 23.** Metabolisme cel·lular de la glucosa en cèl·lules normals.

**Figura 24.** Metabolisme de la glucosa en cèl·lules normals en condicions de manca d'oxigen (glicòlisi anaeròbica).

**Figura 25.** Otto Heinrich Warburg (1883-1970).

**Figura 26.** Diferències en la producció d'ATP segons la presència d'oxigen a) en cèl·lules normals i b) en cèl·lules canceroses (Efecte Warburg o glicòlisi aeròbica).

**Figura 27.** Diferència entre una cèl·lula normal i una cèl·lula cancerosa en el metabolisme de la glucosa.

**Figura 28.** Efecte Warburg invers.

**Figura 29.** Vinculació dels segells distintius del càncer amb el metabolisme energètic deteriorat.

**Figura 30.** Efecte Warburg i carcinogènesi: una qüestió encara pendent.

**Figura 31.** Cruïlla en el metabolisme cel·lular de la glucosa del destí de l'àcid pirúvic.

**Figura 32.** Metabolisme cel·lular: senyalització oncogènica i disponibilitat de nutrients.

**Figura 33.** Regulació del metabolisme glicolític per HIF-1, c-Myc i p53.

**Figura 34.** Paper dels ARNnc en la regulació del metabolisme de la glucosa.

**Figura 35.** Esquema de la identificació de biomarcadors en el càncer.

**Figura 36.** Aplicacions dels biomarcadors en el càncer.

**Figura 37.** Detecció del metabolisme cel·lular alterat per diagnosticar CE de cavitat oral.

**Figura 38.** Transportadors de monocarboxilats (MCT).

**Figura 39.** Paper del complex Succinat Deshidrogenasa (SDH) en el cicle de Krebs.

**Figura 40.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència específica a 5 anys en els pacients tractats amb radioteràpia.

**Figura 41.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència específica a 5 anys en els pacients tractats amb cirurgia.

**Figura 42.** Distribució dels valors d'expressió de SLC2A3 en funció del control local del tumor.

**Figura 43.** Arbres de classificació i regressió obtinguts amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basats en l'expressió dels gens SLC2A3 (A), SLC16A3 (B), DLAT (C) i SDHA (D).

**Figura 44.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de SLC2A3.

**Figura 45.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de SLC16A3.

**Figura 46.** Anàlisi de Kaplan-Meier de supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de DLAT.

**Figura 47.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de SDHA.

**Figura 48.** arbre de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basat en l'expressió dels gens SLC2A3 i SDHA.

**Figura 49.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de SLC2A3-SDHA.

**Figura 50.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de SLC2A3-SDHA en els pacients tractats amb RT.

**Figura 51.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de SLC2A3-SDHA en els pacients tractats amb RT-QT.

**Figura 52.** Anàlisi de Kaplan-Meier entre la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de SLC2A3-SDHA en els pacients amb CE d'orofaringe VPH negatiu.

**Figura 53.** Anàlisi de Kaplan-Meier entre la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de SLC2A3-SDHA en els pacients amb CE d'orofaringe VPH positiu.

**Figura 54.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i els nivells d'expressió de SLC2A3 i SDHA.

**Figura 55.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva regional a 5 anys i la categoria d'expressió de SLC2A3 i SDHA.

**Figura 56.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de metàstasi a distància a 5 anys i la categoria d'expressió de SLC2A3 i SDHA.

**Figura 57.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència específica a 5 anys i la categoria d'expressió de SLC2A3 i SDHA.

**Figura 58.** Distribució dels valors de DLD segons el control local després de la cirurgia.

**Figura 59.** Distribució dels valors de DLAT segons el control local després de la cirurgia.

**Figura 60.** Arbre de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basat en l'expressió del gen LDHA.

**Figura 61.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de LDHA ( $p = 0,009$ ).

**Figura 62.** Arbre de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basat en l'expressió del gen LDHB.

**Figura 63.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de LDHB ( $p = 0,083$ ).

**Figura 64.** Arbre de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basat en l'expressió del gen SLC2A1.

**Figura 65.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de SLC2A1 ( $p = 0,101$ ).

**Figura 66.** Arbre de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basat en l'expressió del gen SLC2A3.

**Figura 67.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de SLC2A3 ( $p = 0,061$ ).

**Figura 68.** Arbre de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basat en l'expressió del gen SLC16A3.

**Figura 69.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de SLC16A3 ( $p = 0,026$ ).

**Figura 70.** Arbre de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basat en l'expressió del gen PKFL.

**Figura 71.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de PKFL ( $p = 0,068$ ).

**Figura 72.** Arbre de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basat en l'expressió del gen DLAT.

**Figura 73.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de DLAT ( $p = 0,0001$ ).

**Figura 74.** Arbre de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basat en l'expressió del gen DLD.

**Figura 75.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de DLD ( $p = 0,001$ ).

**Figura 76.** Arbre de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basat en l'expressió del gen PDHA1.

**Figura 77.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de PDHA1 ( $p = 0,024$ ).

**Figura 78.** Arbre de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basat en l'expressió del gen PDHB.

**Figura 79.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de PDHB ( $p = 0,009$ ).

**Figura 80.** Arbre de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basat en l'expressió del gen PDHX.

**Figura 81.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de PDHX ( $p = 0,131$ ).

**Figura 82.** Arbre de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basat en l'expressió del gen SDHA.

**Figura 83.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de SDHA ( $p = 0,039$ ).

**Figura 84.** Arbre de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basat en l'expressió del gen SDHB.

**Figura 85.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de SDHB ( $p = 0,115$ ).

**Figura 86.** Arbre de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basat en l'expressió del gen SDHC.

**Figura 87.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de SDHC ( $p = 0,026$ ).

**Figura 88.** Corbes ROC dels gens amb nivells d'expressió elevats i disminució de la supervivència lliure de recidiva local.

**Figura 89.** Corbes ROC dels gens amb nivells d'expressió elevats i augment de la supervivència lliure de recidiva local.

**Figura 90.** Arbore de classificació i regressió obtingut amb l'anàlisi de partició recursiva per a les taxes de recidiva local basat en l'expressió dels gens DLAT i LDHA.

**Figura 91.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i les categories d'expressió de DLAT-LDHA obtingudes amb l'anàlisi de partició recursiva.

**Figura 92.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys i la categoria d'expressió de DLAT-LDHA.

**Figura 93.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva regional a 5 anys i la categoria d'expressió de DLAT-LDHA.

**Figura 94.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de metàstasi a distància a 5 anys i la categoria d'expressió de DLAT-LDHA.

**Figura 95.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència específica a 5 anys i la categoria d'expressió de DLAT-LDHA.

**Figura 96.** Anàlisi de Kaplan-Meier de la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys en pacients amb DLAT elevada en funció de l'expressió de LDHA.

**Figura 97.** Correlació entre els valors d'expressió transcripcional de SDHA i SDHB.

**Figura 98.** Correlació entre els valors d'expressió transcripcional de DLAT i LDHA.

**Figura 99 A.** Expressió IHQ de LDHA. Esquerra: CE queratinitzant (HEX200). Dreta: expressió elevada al tumor (puntuació 4+) i a l'estroma (puntuació 3+).

**Figura 99 B.** Expressió IHQ de LDHA. Esquerra: CE mal diferenciat (HEX200). Dreta: expressió elevada a l'estroma (puntuació 3+) i reduïda al tumor (puntuació 2+).

**Figura 99 C.** Expressió IHQ de LDHA. Esquerra: CE (HEX200). Dreta: expressió elevada al tumor (puntuació 3+) i reduïda a l'estroma (puntuació 1+).

**Figura 99 D.** Expressió IHQ de LDHA. Esquerra: CE (HEX100). Dreta: expressió reduïda al tumor (puntuació 1+) i a l'estroma (puntuació 2+).

**Figura 100-A.** Relació entre els valors de l'expressió immunohistoquímica i l'expressió transcripcional de LDHA en les cèl·lules tumorals.

**Figura 100-B.** Relació entre els valors de l'expressió immunohistoquímica i l'expressió transcripcional de LDHA en les cèl·lules estromals.

**Figura 101.** Nivells d'expressió transcripcional de LDHA en teixit tumoral i mucosa sana.

**Figura 102.** Nivells d'expressió transcripcional de DLAT en teixit tumoral i mucosa sana.

**Figura 103.** Mecanismes de desregulació de GLUT1 i GLUT3 en el càncer.

**Figura 104.** Anàlisi de Kaplan Meier de la supervivència lliure de malaltia i el patró de tinció immunohistoquímica de GLUT3.

**Figura 105.** Complex succinat deshidrogenasa (CSD) simplificat.

**Figura 106.** Paper i ubicació de LDHA en el metabolisme cel·lular.

**Figura 107.** Paper crític de LDHA en els diferents segells distintius del càncer.

**Figura 108.** Modulació del metabolisme dels CAF i l'agressivitat de les cèl·lules canceroses.

## 2. Llista de taules

**Taula 1.** Característiques clíniques i biològiques del CECC VPH (-) i VPH (+).

**Taula 2.** Estadificació del càncer d'orofaringe considerant l'estat del VPH.

**Taula 3.** Profunditat de la invasió (DOI\*) en la definició de tumor primari (T) del càncer de cavitat oral (AJCC 8<sup>a</sup> edició, 2017).

**Taula 4.** Gens amb canvis genètics somàtics freqüents i significatius en el CECC VPH -.

**Taula 5.** Llista de gens relacionats amb el metabolisme analitzats en aquest estudi.

**Taula 6.** Característiques clinicopatològiques dels pacients tractats amb radioteràpia inclosos en l'estudi.

**Taula 7.** Característiques clinicopatològiques dels pacients tractats amb cirurgia inclosos en l'estudi.

**Taula 8.** Procediments quirúrgics realitzats en els pacients tractats amb cirurgia.

**Taula 9.** Gens analitzats a cadascuna de les cohorts de l'estudi.

**Taula 10.** Puntuació per a l'avaluació de l'expressió immunohistoquímica de LDHA.

**Taula 11.** Distribució dels pacients en els que es va estudiar l'expressió transcripcional de DLAT i LDHA en mostra de tumor i de mucosa sana (TCGA).

**Taula 12.** Expressió transcripcional d'HK1 i SUCNR1 segons les diferents variables clíniques.

**Taula 13.** Expressió transcripcional de SLC2A3 i SLC16A3 segons les diferents variables clíniques.

**Taula 14.** Expressió transcripcional de SDHA i DLAT segons les diferents variables clíniques.

**Taula 15.** Expressió transcripcional de PDHB segons les diferents variables clíniques.

**Taula 16.** Expressió transcripcional dels gens estudiats en funció del control local de la malaltia en els pacients tractats amb RT o QT-RT.

**Taula 17.** Distribució dels pacients segons els punts de tall dels CRT en el control local i la supervivència lliure de recidiva local a 5 anys.

**Taula 18.** Nivells de correlació en l'expressió transcripcional entre els gens estudiats.

**Taula 19.** Anàlisi multivariant amb la categoria d'expressió SLC2A3-SDHA com a variable independent.

**Taula 20.** Supervivència lliure de recidiva local a 5 anys segons el patró d'expressió SLC2A3 / SDHA.

**Taula 21.** Valors de la mediana de l'expressió transcripcional dels gens analitzats segons el gènere.

**Taula 22.** Valors de la mediana de l'expressió transcripcional dels gens analitzats segons el consum de tòxics.

**Taula 23.** Valors de la mediana de l'expressió transcripcional dels gens analitzats segons la localització del tumor primari.

**Taula 24.** Valors de la mediana de l'expressió transcripcional dels gens analitzats segons l'extensió local del tumor.

**Taula 25.** Valors de la mediana de l'expressió transcripcional dels gens analitzats segons l'extensió regional del tumor.

**Taula 26.** Nivell d'expressió transcripcional dels gens en funció del control local després de la cirurgia.

**Taula 27.** Distribució dels pacients en funció dels punts de tall obtinguts en els CRT i supervivència lliure de recidiva local (rT) a 5 anys per a cadascuna de les categories.

**Taula 28.** Valors AUC dels gens amb nivells d'expressió elevats i disminució de la supervivència lliure de recidiva local.

**Taula 29.** Valors AUC dels gens amb nivells d'expressió elevats i augment de la supervivència lliure de recidiva local.

**Taula 30.** Anàlisi multivariant amb la categoria de l'expressió DLAT-LDHA com a variable independent.

**Taula 31.** Relació entre l'estat dels marges de resecció i la categoria d'expressió transcripcional de DLAT-LDHA.

**Taula 32 .** Correlacions entre els valors d'expressió transcripcional dels gens analitzats.



**Taula 33.** Relació entre l'expressió transcripcional i l'expressió immunohistoquímica de LDHA.

**Taula 34.** Comparació dels nivells transcripcionals de LDHA i DLAT entre tumor i mucosa sana en pacients amb CECC (TCGA).



### **3. Treball publicat relacionat amb aquesta tesi**

# Prognostic capacity of the transcriptional expression of lactate dehydrogenase A in patients with head and neck squamous cell carcinoma

Silvia Bagué MD<sup>1</sup> | Xavier León MD, PhD<sup>2,3</sup>  | Ximena Terra PhD<sup>4</sup> |  
Marylène Lejeune MD, PhD<sup>5</sup> | Mercedes Camacho PhD<sup>6</sup> |  
Francesc-Xavier Avilés-Jurado MD, PhD<sup>7</sup> 

<sup>1</sup>Pathology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Otorhinolaryngology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Bioingeniería Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Madrid, Spain

<sup>4</sup>MoBioFood Research Group, Biochemistry and Biotechnology Department, Universitat Rovira i Virgili, Campus Sescel·lades, Tarragona, Spain

<sup>5</sup>Pathology Department, Plataforma de Estudios Histológicos, Citológicos y de Digitalización, Hospital de Tortosa Verge de la Cinta, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), URV, Tortosa, Spain

<sup>6</sup>Genomics of Complex Diseases, Research Institute Hospital Sant Pau, Barcelona, Spain

<sup>7</sup>Otorhinolaryngology Department, Hospital Universitari Joan XXIII, Institut d'investigació Sanitària Pere Virgili IISPV, Universitat Rovira i Virgili URV, Tarragona, Spain

## Correspondence

Xavier León, Otorhinolaryngology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, C/ Mas Casanovas, 90, 08041 Barcelona, Spain.  
Email: [xleon@santpau.cat](mailto:xleon@santpau.cat)

## Funding information

Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), A Way to Build Europe; Plan Estatal de I + D + I of the Instituto de Salud Carlos III, Grant/Award Numbers: FIS PI19/01661 to XL, FIS PI18/0844 to FX A-J

## Abstract

**Background:** To analyze the relationship between the transcriptional expression of lactate dehydrogenase A (LDHA) and the disease control in patients with a head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC).

**Methods:** We determined the transcriptional expression of LDHA in 110 HNSCC patients treated with surgery.

**Results:** Five-year disease-free survival for patients with a high transcriptional expression of LDHA ( $n = 51$ ) was 39.2% (95% confidence interval [CI]: 25.3%–53.1%), and for patients with a low expression ( $n = 59$ ), it was 63.6% (95% CI: 51.1%–76.1%) ( $p = 0.004$ ). According to the results of a multivariate analysis, patients with a high transcriptional expression of LDHA had a 3.4-fold increased risk of tumor recurrence. Patients with a high transcriptional expression of LDHA tended to show a higher intensity of immunohistochemical expression of LDHA at the tumor cells ( $p = 0.086$ ).

**Conclusion:** In HNSCC patients treated with surgery, a high transcriptional expression of LDHA was associated with a significant decrease in disease-free survival.

## KEYWORDS

biomarker, lactate dehydrogenase A, LDHA: head and neck squamous cell carcinoma, Warburg effect

Mercedes Camacho and Francesc-Xavier Avilés-Jurado contributed equally to this study.

## 1 | INTRODUCTION

Relative to nontumor cells, cancer cells exhibit changes in metabolism aimed at obtaining biomaterials and energy to sustain indefinite proliferation. This ability to adjust cellular metabolism is now recognized as one of the hallmarks of cancer.<sup>1</sup>

One of the mechanisms activated by cancer cells is aerobic glycolysis, which involves the utilization of glucose as a primary energy source with lactate production even in the presence of oxygen, a mechanism described by Warburg in 1956 and known as the “Warburg effect.”<sup>2</sup> The process of glycolysis is less efficient in energy production than oxidative phosphorylation, which justifies the increased glucose uptake by tumor cells. This elevated glucose utilization results in an accumulation of lactate, which acts as an oncometabolite, inducing acidification of the tumor microenvironment, leading to increased invasiveness and metastasis, inhibition of the immune response against the tumor, and increased resistance to treatments.<sup>3</sup> The Warburg phenotype is present in different tumor models, including head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC).<sup>4</sup>

Lactate dehydrogenase A (LDHA) is one of the enzymes involved in the process of glycolysis, catalyzing the conversion of pyruvate to lactate. LDHA expression contributes to the process of carcinogenesis by inducing proliferation and survival of tumor cells, promoting a cancer stem cell phenotype, enhancing angiogenesis, invasiveness and metastasis, and favoring the tumor immune escape.<sup>5</sup> Several studies have found an association between LDHA tumor expression and a decrease in survival in patients with bladder,<sup>6</sup> esophageal,<sup>7</sup> breast,<sup>8</sup> gastric,<sup>9</sup> papillary thyroid,<sup>10</sup> nonsmall-cell lung cancer,<sup>11</sup> or clear cell renal cell carcinoma.<sup>12</sup>

In patients with HNSCC, increased transcriptional and immunohistochemical expression of LDHA has been observed in tumor tissue relative to healthy mucosa.<sup>13–15</sup> Likewise, HNSCC cell lines have higher levels of LDHA at both the transcriptional and protein levels than those corresponding to normal keratinocytes.<sup>13,14</sup> The aim of the present study is to analyze the relationship between LDHA transcriptional expression and disease control in a cohort of HNSCC patients treated with surgery.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Patients

The present study was performed retrospectively from biopsies obtained from the primary location of the tumor in a cohort of 110 patients with squamous cell carcinoma

TABLE 1 Characteristics of the patients included in the study

		No of patients (%)
Mean age (SD) years		65.8 (13.4)
Sex	Men	90 (81.8%)
	Women	20 (18.2%)
Toxic consumption	No	14 (12.7%)
	Moderate	20 (18.2%)
	Severe	76 (69.1%)
Location	Oral cavity	39 (35.5%)
	Oropharynx	6 (5.4%)
	Hypopharynx	10 (9.1%)
	Larynx	55 (50.0%)
pT classification	pT1-2	20 (18.2%)
	pT3-4	90 (81.8%)
pN classification	pN0	46 (41.8%)
	pN1	17 (15.5%)
	pN2	23 (20.9%)
	pN3	24 (21.8%)
Histologic grade	Well differentiated	8 (7.3%)
	Moderately differentiated	93 (84.5%)
	Poorly differentiated	9 (8.2%)
Resection margin	Negative	88 (80%)
	Close	15 (13.6%)
	Positive	7 (6.4%)
Adjuvant treatment	No	38 (34.5%)
	Radiotherapy	46 (41.8%)
	Chemoradiotherapy	26 (23.7%)

located at the oral cavity, oropharynx, hypopharynx, or larynx, and treated surgically at our center during the period 2008–2016. The clinical information was obtained from a database that prospectively collects information on all patients with malignant head and neck tumors treated at our center since 1985.<sup>16</sup> All patients were evaluated by the Oncology Committee of our center, which indicated the treatment according to institutional protocols. Table 1 shows the characteristics of the patients included in the study. The patients were restaged according to the classification proposed in the 8th edition of the TNM. Given the interaction in tobacco and alcohol consumption, a combined variable of toxics consumption was created with three categories: no consumption; moderate consumption (<20 cigarettes/day and/or < 80 g alcohol/day); and severe consumption ( $\geq$ 20 cigarettes/day or  $\geq$  80 g alcohol/day). Seventy-two patients (65.5%) received an adjuvant treatment with radiotherapy

( $n = 46$ , 41.8%) or chemo-radiotherapy (23.7%). Indications for adjuvant treatment were pT4 local extension category, the presence of lymph node metastases with extracapsular spread and close or positive resection margins.

All the patients included in the study had a follow-up of more than 2 years. The mean follow-up of the patients was 4.3 years (SD of 3.7 years).

The design of the study was approved by the Institutional Review Board of our center (IIBSP-CCC-14-93) and was performed by the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Written informed consent was acquired from all the patients involved in this study.

## 2.2 | Transcriptional analysis

Samples obtained from each patient were immediately included in RNA-later (Quiagen GmbH, Hilden, Germany) to prevent mRNA degradation, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until processing. Total RNA was extracted using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, USA) according to the manufacturer's instructions. The cDNA was obtained by reverse transcription of 1 g of RNA with high-capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) and transcriptional expression of LDHA and beta-actin as an endogenous control was assessed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) on an ABI Prism 7000 using predesigned validated assays (TaqMan Gene Expression Assays; Applied Biosystems).

## 2.3 | Immunohistochemical study

In order to analyze the correlation between transcriptional and immunohistochemical expression of LDHA, we studied formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues from 14 HNSCC tumors. In this part of the study, we included seven tumor samples with a high transcriptional expression of LDHA and seven tumor samples with a low expression. Sections of 4- $\mu\text{m}$  thickness were used for immunohistochemistry analysis and each slide was deparaffinized in xylene for 20 min, rehydrated with a decreasing ethanol series and washed with phosphate-buffered saline. Sections were then heated at  $96^{\circ}\text{C}$  for 20 min for antigen retrieval and then incubated for 30 min with a primary monoclonal antibody against LDHA antigen (Clone E-9, Santa Cruz Biotechnology, Ref sc-137 243), at a 1:500 dilution. Automatic immunodetection was performed using the ENDVISIONTM High FLEX method (DAKO, Carpinteria, CA, USA) using 3,3'-diaminobenzidine chromogen as substrate, followed by counterstaining with hematoxylin. The slides were scanned using Panoramic

300 Flash III DX (3DHitech, Hungary) with  $\times 20$  objective. The digitalized slides were examined by two blinded observers and the localization of LDHA was recorded. Intensity and homogeneity protein immunoeexpression of tumor cells and stromal cells were scored semi-quantitatively as 0+, 1+, 2+, 3+, and 4+. Score 0+ was assigned to no expression, score 1+ to a weak and heterogeneous or focal expression, score 2+ to a moderate and focal expression, score 3+ to a moderate and extensive expression, and score 4+ to an intense and diffuse expression. Scores of 0+, 1+, and 2+ were considered as low, and scores 3+ and 4+ considered high.

## 2.4 | Statistical study

We compared the LDHA transcriptional expression values according to sex, history of toxic consumption, location of the primary tumor, local (pT), and regional (pN) pathological extension category, histological grade, and tumor control with the Student's *t*-test or the analysis of variance (ANOVA) test.

Disease-free survival was considered as the interval between tumor diagnosis and the appearance of local, regional, and/or distant recurrence of the tumor. The continuous value of LDHA expression was categorized according to the disease-free survival with a recursive partitioning analysis, using the CRT (Classification and Regression Tree) model. We estimated the disease-free survival according to the categories obtained with recursive partitioning analysis using the Kaplan–Meier method. Differences between survival curves were analyzed with the log–rank test. A multivariate analysis was performed with the Cox proportional hazards model, considering the disease-free survival as the dependent variable, and tumor location, local, and regional pathologic extension category, status of resection margins, use of adjuvant treatment, and LDHA expression category as independent variables.

In addition, we assessed the local, regional, and distant recurrence-free survival, as well as the disease-specific survival according to the LDHA expression category.

We compared the immunohistochemical staining intensity of tumor and stromal cells according to the transcriptional expression of LDHA with the nonparametric Mann–Whitney test.

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Transcriptional expression study

There were no significant differences in LDHA transcriptional expression values as a function of sex ( $p = 0.928$ ),



toxics consumption ( $p = 0.497$ ), location of the primary tumor ( $p = 0.497$ ), local ( $p = 0.875$ ) or regional ( $p = 0.954$ ) pathologic extension category, or histologic grade ( $p = 0.758$ ).

During the follow-up period 51 patients (46.4%) had local ( $n = 20$ , 18.2%), regional ( $n = 15$ , 13.6%), and/or distant ( $n = 31$ , 28.2%) recurrence. The transcriptional expression values of patients with tumor recurrence were significantly higher than that of patients in whom treatment achieved disease control ( $p = 0.012$ ). Table S1 shows the mean LDHA expression values depending on the variables analyzed. Figure S1 shows the distribution in LDHA transcriptional expression values depending on the disease control.

Considering the disease-free survival as the dependent variable, recursive partitioning analysis classified patients according to LDHA transcriptional expression into two categories with a cut-off value for LDHA expression of 930.2: tumors with high ( $n = 51$ , 46.4%) or low ( $n = 59$ , 53.6%) LDHA expression. Figure S2 shows the classification tree obtained with the recursive partitioning

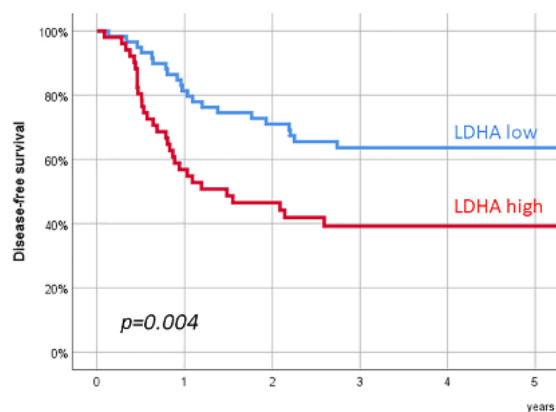


FIGURE 1 Disease-free survival according to the lactate dehydrogenase A (LDHA) expression category [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

analysis. The 5-year disease-free survival for patients with high LDHA expression was 39.2% (95% CI: 25.3%–53.1%), and that of patients with low expression was 63.6% (95% CI: 51.1%–76.1%). Figure 1 shows disease-free survival according to the LDHA expression category. Patients with elevated LDHA expression had significantly lower disease-free survival ( $p = 0.004$ ). This decrease in disease-free survival was a consequence of a higher local and distant recurrence of the tumor of patients with a high LDHA expression. Table 2 shows the 5-year local, regional, and distant metastases recurrence-free survival according to LDHA transcriptional expression category. Patients with elevated LDHA expression levels had significantly lower local and distant recurrence-free survival ( $p = 0.013$  and  $p = 0.014$ , respectively). Patients with elevated LDHA values also had a lower regional recurrence-free survival, but the differences did not reach statistical significance ( $p = 0.375$ ). Differences in disease control after treatment with surgery had an impact on disease-specific survival. Five-year disease-specific survival for patients with high transcriptional expression of LDHA was 41.1% (95% CI: 26.6%–55.6%), and that of patients with low expression was 65.1% (95% CI: 52.2%–78.0%) ( $p = 0.007$ ).

Table 3 shows the result of a multivariate analysis considering the disease-free survival as the dependent variable. The variables that were significantly related to a decrease in disease-free survival were an advanced local extension category, presence of nodal involvement, positive resection margins, and a high transcriptional expression of LDHA. Relative to patients with low LDHA transcriptional expression, patients with a high expression had a 3.38 higher risk of tumor recurrence (95% CI: 1.82–6.28,  $p = 0.0001$ ). The supplementary material includes the results of multivariate analyses in which local, regional, and distant recurrence-free survival were considered as dependent variables. According to the results of these multivariate analyses, a high LDHA expression was significantly associated with a decreased local (OR 4.34, 95% CI: 1.41–13.37,  $p = 0.010$ ), regional (OR 4.24, 95% CI: 1.07–16.77,  $p = 0.039$ ), and distant

		5-year survival (%)	95% CI	p-Value
rT	LDHA low	89.4	81.4%–97.4%	0.013
	LDH high	70.0	56.5%–83.5%	
rN	LDHA low	87.9	79.5%–96.3%	0.375
	LDH high	81.1	68.9%–93.3%	
rM	LDHA low	76.7	65.1%–88.3%	0.014
	LDH high	55.3	39.8%–70.8%	

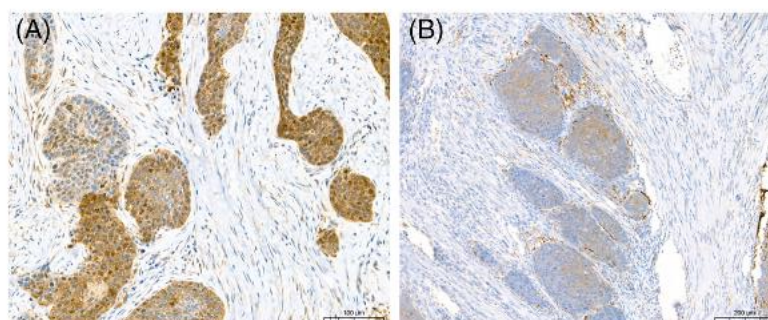
TABLE 2 Five-year local (rT), regional (rN), and distant metastases (rM) recurrence-free survival according to LDHA transcriptional expression category

Abbreviations: CI, confidence interval; LDHA, lactate dehydrogenase A.

**TABLE 3** Results of a multivariate analysis considering the disease-free survival as the dependent variable

		HR	95% CI HR	p-Value
Location	Oral cavity	1		
	Oropharynx	0.35	0.04–3.05	0.345
	Hypopharynx	0.30	0.09–1.00	0.050
	Larynx	0.66	0.33–1.30	0.233
pT classification	pT1-2	1		
	pT3-4	2.54	1.03–6.28	0.043
pN classification	pN0	1		
	pN1	4.49	1.72–11.70	0.002
	pN2	3.44	1.46–8.09	0.005
	pN3	6.09	2.46–15.11	0.0001
Resection margin	Negative	1		
	Close	0.55	0.20–1.44	0.226
	Positive	4.66	1.69–12.85	0.003
Adjuvant treatment	No	1		
	Radiotherapy	0.57	0.27–1.20	0.141
	Chemoradiotherapy	0.47	0.18–1.19	0.113
LDHA expression	Low	1		
	High	3.38	1.82–6.28	0.0001

**FIGURE 2** Histologic sections of a representative case with (A) a high (score 4+) and (B) low (score 1+) lactate dehydrogenase A (LDHA) immunohistochemical expression in the tumor cells [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]



(OR 4.48, 95% CI: 1.93–10.41,  $p = 0.0001$ ) recurrence-free survival.

### 3.2 | Immunohistochemical study

HNSCC tumors present a dominantly cytoplasmic expression pattern of LDHA. Figure 2 shows the images corresponding to two tumors with high (Figure 2A) and low (Figure 2B) immunohistochemical expression of LDHA of the tumor cells. Patients with a high transcriptional expression of LDHA tended to show a higher intensity of immunohistochemical expression of LDHA at the tumor cells than patients with a low transcriptional expression, but the

differences did not reach statistical significance ( $p = 0.086$ ). There were no differences in immunohistochemical expression in the stromal cells as a function of LDHA transcriptional expression ( $p = 0.945$ ). Table S5 shows the immunoexpression score of the analyzed samples. Figure S3 shows the distribution in immunohistochemical staining intensity of the tumor and stromal cells as a function of LDHA transcriptional expression.

## 4 | DISCUSSION

HNSCC patients treated surgically with a high transcriptional expression of LDHA had a significant decrease in

disease-free survival. This reduction in tumor control came primarily as a result of an increased risk of local recurrence and the appearance of distant metastases.

When analyzing the relationship between gene and protein expression of LDHA we could observe a trend whereby patients with elevated mRNA values had a marked tendency to have higher protein expression scores ( $p = 0.086$ ), with no differences appearing at the stromal cells ( $p = 0.945$ ).

Studies in several tumor models have shown that silencing LDHA expression results in inhibition of cell proliferation and migration without significant impact on nontumor cells, postulating LDHA as a potential antitumor target.<sup>5</sup> In vitro models developed with HNSCC cell lines have shown that LDHA expression promotes cell proliferation, invasion, and migration capacity, induces epithelial-mesenchymal transition and the expression of stemness markers, reducing the sensitivity of tumor cells to drugs.<sup>13,14</sup> Similarly, in in vivo models the knockdown of LDHA resulted in a significant reduction in tumor volume compared to that obtained with parental cell lines with active LDHA.<sup>13,14</sup> In an in vivo study with an orthotopic model of HNSCC, Chen et al.<sup>17</sup> found that suppression of LDHA expression decreased cell proliferation and increased sensitivity to radiotherapy without significant off-target toxicity.

The association between high LDHA expression and a decrease in tumor control and survival has been described in other tumor models.<sup>6–12</sup> In a meta-analysis by Lv et al.<sup>18</sup> in which results obtained in 4176 patients included in 17 studies were analyzed, it was found that elevated LDHA expression was associated with a significant decrease in overall survival (HR: 1.74,  $p = 0.001$ ).

According to our results, relative to patients with tumors with low LDHA transcriptional expression, patients with a high expression had a 3.4-fold higher risk of recurrence of the tumor (95% CI 1.8–6.3,  $p = 0.0001$ ). In studies conducted by Cai et al.<sup>13</sup> and Chen et al.<sup>14</sup> from the results included in The Cancer Genomic Atlas (TCGA) databases, patients with a high transcriptional expression of LDHA had worse overall survival.

There were no differences in LDHA transcriptional expression according to variables, such as tumor location, local or regional extension, or histologic grade. This result contrasts with that obtained by Cai et al.,<sup>13</sup> who found that patients with early (T1–2) and well-differentiated tumors had a significantly lower immunohistochemical expression of LDHA. Given the limited number of patients with oropharyngeal carcinomas included in our study ( $n = 6$ ), we did not perform a determination of LDHA expression as a function of HPV status. From the results obtained in TCGA databases, Chen et al.<sup>14</sup> found no differences in LDHA transcriptional

expression in HNSCC patients depending on the HPV status.

One of the metabolites resulting from LDHA enzymatic activity is lactate. In vitro studies performed in HNSCC lines have shown that the reduction in LDHA expression leads to a decrease in glucose consumption by tumor cells, and a reduction in lactate levels.<sup>13,14</sup> In a study of HNSCC samples in patients treated with surgery and adjuvant radiotherapy, Blatt et al.<sup>19</sup> found that patients with high tumor lactate had a significant increase in the risk of recurrence and a decrease in overall survival.

<sup>18</sup>F-FDG-PET is a useful imaging technique for reflecting glucose metabolism. Based on the increased aerobic glycolysis accompanied by glucose uptake in malignant tumors, the standardized uptake value (SUV) in <sup>18</sup>F-FDG-PET scans can be used to measure the degree of glucose uptake by cancer cells. Several authors have found a significant relationship between LDHA tumor expression and the SUV value in patients with breast carcinomas,<sup>20</sup> lung adenocarcinomas<sup>21</sup> or gastrointestinal stroma tumors.<sup>22</sup> Unfortunately, most of the patients included in our study did not have an <sup>18</sup>F-FDG-PET scan prior to treatment, so we could not analyze the relationship between LDHA expression and the metabolic activity of the tumor.

Increased LDHA expression at the tumor correlates with an increase in serum concentration, which has been used as a biomarker with prognostic capacity.<sup>23</sup> In patients with oral cavity carcinomas, Grimm et al.<sup>24</sup> found a significant correlation between the immunohistochemical expression of LDHA and the serum concentration previous to treatment, and a reduction of the concentration after tumor resection. In addition, elevated serum LDHA values have been associated with the progression of pre-malignant oral cavity lesions to infiltrating carcinoma.<sup>25</sup> Several authors have analyzed the correlation between the serum LDHA concentration and survival in patients with nasopharyngeal carcinoma, all of them concluding that elevated pretreatment<sup>26–32</sup> or post-treatment<sup>33</sup> serum LDHA concentrations were significantly associated with a poorer prognosis.

This study has limitations associated with its retrospective nature, including patients with tumors of various locations and loco-regional extension categories. The relationship between the expression of LDHA and disease control was analyzed at the transcriptional level, lacking information on possible post-transcriptional regulation processes. When analyzing the correlation between transcriptional and immunohistochemical expression of LDHA we observed that tumors with elevated LDHA transcriptional expression tended to have higher immunoeexpression scores, but the differences did not reach



statistical significance. Before considering the transcriptional expression of LDHA as a biomarker with prognostic capacity in patients with HNSCC, validation of the present results should be observed in future prospective studies.

## 5 | CONCLUSION

According to our results, a high transcriptional expression of LDHA was associated with a significant decrease in disease-free survival and disease-specific survival in patients with HNSCC treated with surgery. Relative to patients with a low LDHA expression, patients with a high expression had a 3.4-fold increased risk of tumor recurrence.

### FUNDING INFORMATION

This research was funded by grants from Plan Estatal de I + D + I of the Instituto de Salud Carlos III (FIS PI18/0844 to FX A-J and FIS PI19/01661 to XL). Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), A Way to Build Europe.

### DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

### ORCID

Xavier León  <https://orcid.org/0000-0001-6286-630X>  
Francisc-Xavier Avilés-Jurado  <https://orcid.org/0000-0001-5560-8097>

### REFERENCES

- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646-674.
- Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123:309-314.
- Yamamoto M, Inohara H, Nakagawa T. Targeting metabolic pathways for head and neck cancers therapeutics. *Cancer Metastasis Rev*. 2017;36:503-514.
- de la Cruz-López KG, Castro-Muñoz LJ, Reyes-Hernández DO, García-Carrancá A, Manzo-Merino J. Lactate in the regulation of tumor microenvironment and therapeutic approaches. *Front Oncol*. 2019;9:1143.
- Feng Y, Xiong Y, Qiao T, Li X, Jia L, Han Y. Lactate dehydrogenase A: a key player in carcinogenesis and potential target in cancer therapy. *Cancer Med*. 2018;7:6124-6136.
- He Y, Chen X, Yu Y, et al. LDHA is a direct target of miR-30d-5p and contributes to aggressive progression of gallbladder carcinoma. *Mol Carcinog*. 2018;57:772-783.
- Yao F, Zhao T, Zhong C, Zhu J, Zhao H. LDHA is necessary for the tumorigenicity of esophageal squamous cell carcinoma. *Tumour Biol*. 2013;34:25-31.
- Huang X, Li X, Xie X, et al. High expressions of LDHA and AMPK as prognostic biomarkers for breast cancer. *Breast*. 2016;30:39-46.
- Sun X, Sun Z, Zhu Z, et al. Clinicopathological significance and prognostic value of lactate dehydrogenase A expression in gastric cancer patients. *PLoS One*. 2014;9:e91068.
- Hou X, Shi X, Zhang W, et al. LDHA induces EMT gene transcription and regulates autophagy to promote the metastasis and tumorigenesis of papillary thyroid carcinoma. *Cell Death Dis*. 2021;12:347.
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, et al. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. *Br J Cancer*. 2003;89:877-885.
- Girgis H, Masui O, White NM, et al. Lactate dehydrogenase A is a potential prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma. *Mol Cancer*. 2014;13:101.
- Cai H, Li J, Zhang Y, et al. LDHA promotes oral squamous cell carcinoma progression through facilitating glycolysis and epithelial-mesenchymal transition. *Front Oncol*. 2019;9:1446.
- Chen TY, Hsieh YT, Huang JM, et al. Determination of pyruvate metabolic fates modulates head and neck tumorigenesis. *Neoplasia*. 2019;21:641-652.
- Ohashi T, Aoki M, Tomita H, et al. M2-like macrophage polarization in high lactic acid-producing head and neck cancer. *Cancer Sci*. 2017;108:1128-1134.
- León X, Orús C, Quer M. Design, maintenance, and exploitation of an oncologic database for patients with malignant tumors of the head and neck. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2002;53:185-190.
- Chen Y, Maniakas A, Tan L, et al. Development of a rational strategy for integration of lactate dehydrogenase A suppression into therapeutic algorithms for head and neck cancer. *Br J Cancer*. 2021;124:1670-1679.
- Lv J, Zhou Z, Wang J, et al. Prognostic value of lactate dehydrogenase expression in different cancers: a meta-analysis. *Am J Med Sci*. 2019;358:412-421.
- Blatt S, Voelxen N, Sagheb K, et al. Lactate as a predictive marker for tumor recurrence in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) post radiation: a prospective study over 15 years. *Clin Oral Investig*. 2016;20:2097-2104.
- Kim SK, Ahn SG, Mun JY, et al. Genomic signature of the standardized uptake value in 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in breast cancer. *Cancers (Basel)*. 2020;12:497.
- Zhou X, Chen R, Xie W, Ni Y, Liu J, Huang G. Relationship between 18F-FDG accumulation and lactate dehydrogenase A expression in lung adenocarcinomas. *J Nucl Med*. 2014;55:1766-1771.
- Cho MH, Park CK, Park M, Kim WK, Cho A, Kim H. Clinicopathologic features and molecular characteristics of glucose metabolism contributing to <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose uptake in gastrointestinal stromal tumors. *PLoS One*. 2015;10:e0141413.
- Zhang J, Yao YH, Li BG, Yang Q, Zhang PY, Wang HT. Prognostic value of pretreatment serum lactate dehydrogenase level in patients with solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2015;5:9800.



24. Grimm M, Krimmel M, Hoefert S, et al. Monitoring a 'metabolic shift' after surgical resection of oral squamous cell carcinomas by serum lactate dehydrogenase. *J Oral Pathol Med*. 2016;45:346-355.
25. Grimm M, Hoefert S, Krimmel M, et al. Monitoring carcinogenesis in a case of oral squamous cell carcinoma using a panel of new metabolic blood biomarkers as liquid biopsies. *Oral Maxillofac Surg*. 2016;20:295-302.
26. Li G, Gao J, Tao YL, et al. Increased pretreatment levels of serum LDH and ALP as poor prognostic factors for nasopharyngeal carcinoma. *Chin J Cancer*. 2012;31:197-206.
27. Zhou GQ, Tang LL, Mao YP, et al. Baseline serum lactate dehydrogenase levels for patients treated with intensity-modulated radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma: a predictor of poor prognosis and subsequent liver metastasis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012;82:e359-e365.
28. Jin Y, Ye X, Shao L, et al. Serum lactic dehydrogenase strongly predicts survival in metastatic nasopharyngeal carcinoma treated with palliative chemotherapy. *Eur J Cancer*. 2013;49:1619-1626.
29. Wan XB, Wei L, Li H, et al. High pretreatment serum lactate dehydrogenase level correlates with disease relapse and predicts an inferior outcome in locally advanced nasopharyngeal carcinoma. *Eur J Cancer*. 2013;49:2356-2364.
30. Wei Z, Zeng X, Xu J, Duan X, Xie Y. Prognostic value of pretreatment serum levels of lactate dehydrogenase in nonmetastatic nasopharyngeal carcinoma: single-site analysis of 601 patients in a highly endemic area. *Onco Targets Ther*. 2014;7:739-749.
31. Oei RW, Ye L, Kong F, et al. Pre-treatment serum lactate dehydrogenase is predictive of survival in patients with nasopharyngeal carcinoma undergoing intensity-modulated radiotherapy. *J Cancer*. 2018;9:54-63.
32. Long G, Tang W, Fu X, et al. Pre-treatment serum lactate dehydrogenase predicts distant metastasis and poor survival in nasopharyngeal carcinoma. *J Cancer*. 2019;10:3657-3664.
33. Wang J, Li L, Dong BQ, et al. Post-treatment serum lactic dehydrogenase as a predictive indicator for distant metastasis and survival of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7:27458-22767.

### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

**How to cite this article:** Bagué S, León X, Terra X, Lejeune M, Camacho M, Avilés-Jurado F-X. Prognostic capacity of the transcriptional expression of lactate dehydrogenase A in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head & Neck*. 2022;44(11):2505-2512. doi:10.1002/hed.27161



