Estadios precoces de cancer oral: pronóstico en relación con gradación histológica, linfagiogénesis intratumoral y expresión de factor de crecimiento endotelial vascular Tipo-C (VEGF-C)*

Early stage oral cancer: prognosis with regard to histological grading, intratumoral lymphangiogenesis, and the expression of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C)

M.F. Muñoz-Guerra¹, A.L. Capote Moreno¹, E.M. Gómez Marazuela, C. Gamallo Amat³

Resumen: Objetivos. Los sistemas de gradación histológica se han usado clásicamente como factor pronóstico y marcadores de comportamiento clínico en el carcinoma epidermoide intra-oral (CEI). Sin embargo, su utilidad pronóstica permanece controvertida. Nuestro objetivo ha sido evaluar la presencia de linfangiogénesis intratumoral (LI), un nuevo hallazgo morfológico, en un análisis retrospectivo de muestras de tejido en parafina dentro de un grupo de estadios precoces de CEI, relacionándolo con clásicos sistemas de gradación histológica y teniendo en cuenta su importancia pronóstica. Asimismo, pretendemos determinar si la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular –C (VEGF-C) se correlaciona con la evolución de la enfermedad.

Diseño. Realizamos un estudio retrospectivo basado en 96 casos de CEI. Todos los pacientes presentaban tumores intraorales T1-T2 y fueron tratados primariamente mediante resección local asociada con disección cervical electiva, la cual mostró ausencia de afectación ganglionar regional. En el grupo de 96 muestras analizamos la LI utilizando el marcador específico del endotelio linfático PA2.26. Adicionalmente, estudiamos la expresión del VEGF-C. Todos los casos fueron clasificados de acuerdo con los sis-

Abstract: Objectives. Histological grading systems have been classically used as a prognostic factor and clinical behavior markers in oral squamous cell carcinoma (OSCC). However, their prognostic usefulness remains controversial. Our aim was to evaluate the presence of intratumoral lymphangiogenesis (IL), a new morphological finding, in a retrospective analysis of paraffin embedded tissue samples that corresponded to a group of early stage oral squamous cell carcinoma cases, and to relate this with histological grading systems while keeping in mind their prognostic significance. We also wanted to determine if the expression of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) is correlated with the evolution of the disease.

Design. We performed a retrospective analysis of 96 patients with OSCC. All cases were T1-T2 neoplasms and were treated primarily by local resection and elective neck dissection that showed no neck involvement. In the group of 96 specimens, we analyzed IL using the specific marker PA2.26 for lymphatic endothelium. Also, we studied the expression of (VEGF-C). All cases were classified according to the histological grading systems described by Broders, Anneroth and Bryne. The statistical analysis was based on the univariate analysis of cause-specific survival and disease recurrence free-survival according to the Kaplan-Meier method.

Results. The group of patients without intratumoral lymphangiogenesis showed a better prognosis with regard to survival and disease-free period, but the difference was not statistically significant. The study showed no relationship between VEGF-C expression and the presence of intratumoral lymphangiogenesis. However, no recurrences were observed in the group without VEGF-C expression. The comparative analysis of the histological grading system showed a statistical relationship between the Broders and Anneroth systems ($p < 0.01$) and between the Broders and Bryne systems ($p < 0.001$). Our study demonstrated an inverse relationship between the values

1 Médico Adjunto. Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial (Jefe de Servicio- F.J. Díaz González), Hospital de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid (U.A.M.), Madrid.

2 Departamento de Bioquímica, Facultad de Químicas, Universidad Complutense, Madrid.

3 Profesor. Departamento de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid (U.A.M.), Madrid.

Correspondencia:

Mario Fernando Muñoz Guerra
Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial
Hospital de la Princesa- Universidad Autónoma de Madrid, España
c/ Diego de León, 62
28006 – Madrid, España
e-mail: maxmferm@excite.com

temas de gradación histológica descritos por Broders, Anneroth y Bryne. El estudio estadístico se fundamentó en el análisis univariante de supervivencia causa-específica y supervivencia libre de recidiva según el método de Kaplan-Meier.

Resultados. El grupo de pacientes con ausencia de LI mostró mejor pronóstico en cuanto a supervivencia y periodo libre de enfermedad, aunque la diferencia no mostró valores estadísticamente significativos. El estudio no mostró una relación entre la expresión de VEGF-C y la presencia de LI. Sin embargo, no observamos recidivas entre el grupo con ausencia de expresión de VEGF-C. El análisis comparativo de los sistemas de gradación histológica mostró una relación estadísticamente significativa entre los sistemas de Broders y Anneroth ($p<0,01$) y entre los sistemas de Broders y Bryne ($p<0,001$). Nuestro estudio demostró una relación inversa entre los valores de los sistemas de gradación Anneroth ($p<0,01$) – Bryne ($p<0,001$) y la presencia de LI.

Conclusión. El valor clínico de los sistemas de gradación histológica puede incrementarse si se incluyen nuevos parámetros que consideren el comportamiento biológico del tumor. La expresión de VEGF-C y la presencia de linfáticos intratumorales pueden ser marcadores pronósticos de utilidad en el CEI.

Palabras clave: Cancer oral; Factores pronósticos; Sistemas de gradación; Linfangiogénesis; Factor de crecimiento endotelial vascular.

Recibido: 22.08.2005

Aceptado: 24.02.2006

*** Premio "Gómez Iglesias" 2004**

Introducción

La determinación del pronóstico en el carcinoma epidermoide intraoral (CEI) se ha fundamentado habitualmente en clasificaciones clínicas¹ o anatomopatológicas,²⁻⁴ aunque la mayoría de los profesionales utiliza actualmente como marcador pronóstico la clasificación clínica TNM. Con el propósito de realizar una estimación más precisa acerca del comportamiento biológico de una determinada neoplasia, diversos sistemas de gradación histológica han sido ideados por diferentes autores.^{2,5,6} Sin embargo, la utilidad real de dichos sistemas de gradación es, hoy día, controvertida.⁷

En los pacientes con CEI de pequeño tamaño (T1-T2) cabe prever un buen pronóstico con una tasa de supervivencia del 65-95% de los casos.^{8,9} Sin embargo, se hace preciso considerar que el porcentaje de pacientes con mal pronóstico puede alcanzar el 35% de los casos. Por ello, se hace necesario investigar nuevos factores con capacidad predictiva del posible pronóstico en el caso de tumores de pequeña dimensión, fundamentalmente caracteres independientes del volumen tumoral que expresen la agresividad celular.^{10, 11}

La presencia o ausencia de afectación ganglionar linfática en el momento del diagnóstico es un factor de predicción básico en el curso de los tumores de cabeza y cuello, y afecta de forma decisiva al tratamiento individual de cada paciente. La comprensión de los mecanismos subyacentes a la capacidad para metastatizar por vía linfática del CEI se ha convertido últimamente en un atrayente campo de investigación.¹²⁻¹⁴ Nuestros estudios previos¹⁵ relacionan la presencia de linfáticos en el interior del tejido tumoral con un

of the Anneroth system ($p<0.01$) - Bryne system ($p<0.001$) and the presence of intratumoral lymphangiogenesis.

Conclusion. The clinical value of the histological grading systems can increase by including new parameters that take into account the biological behavior of the tumor. Expression of VEGF-C and intratumoral lymphatics may thus be useful prognostic markers for oral squamous cell carcinoma.

Key words: Oral cancer; Prognostic factors; Grading systems; Lymphangiogenesis; Vascular endothelial growth factor.

The prognostic determination of oral squamous cell carcinoma (OSCC) is usually based on clinical¹ or pathological²⁻⁴ classifications, although most professionals currently use the TNM clinical classification system as a prognostic marker. Different authors have devised various histological grading systems with a view to making more precise estimates as to the biologic behavior of certain neoplasms.^{2, 5, 6} However, there is currently controversy as to the real use of these grading systems.⁷

In patients with small SCC (T1-T2) a good prognosis can be expected with a survival rate of 65-95% of cases.^{8,9} However, it should be taken into account that the percentage of patients with a bad prognosis can reach 35% of cases. In small tumors, the investigation of new factors with predictive capacities to facilitate a possible prognosis is therefore necessary. These would express cell aggressiveness independently of tumor volume.^{10, 11}

The presence or absence of lymph node involvement at diagnosis is a basic prediction factor as to the course of head and neck tumors, and it affects the individual treatment of each patient decisively. Understanding the underlying mechanisms of SSC and its capacity for metastasizing via the lymphatics has lately turned into an attractive field for investigation¹²⁻¹⁴ Our previous studies¹⁵ correlate the presence of lymphatics within tumor tissue with poor SCC prognosis. Moreover, a recent study by Kyzas and cols.¹⁶ correlated the presence of neoplastic cell emboli in the interior of intratu-

pobre pronóstico del CEI. Incluso, un estudio reciente de Kyzas y cols.¹⁶ ha relacionado la presencia de émbolos de células neoplásicas en el interior de los linfáticos intratumorales con un elevado índice de mortalidad por causa tumoral. Los mecanismos moleculares que estimulan la linfangiogénesis no han sido absolutamente clarificados aunque ciertos trabajos han sugerido que la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular tipo-C (VEGF-C) dentro del tejido tumoral puede estimular a las células endoteliales a generar nuevos vasos linfáticos.¹⁷

El objetivo del presente trabajo ha sido analizar un grupo de pacientes con estadios precoces de CEI buscando una posible correlación entre linfangiogénesis intratumoral (LI), expresión del VEGF-C y pronóstico de la enfermedad. Asimismo, utilizamos los tres clásicos sistemas de gradación histológica (Broders, Anneroth y Bryne) relacionando los valores obtenidos con la presencia de LI y con el pronóstico de la enfermedad.

Material y métodos

Pacientes

El Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del Hospital de la Princesa dispone de una base de datos que incluye 500 pacientes intervenidos quirúrgicamente por carcinoma epidermoide intraoral en el periodo de tiempo 1985-2004. Del global de pacientes recogidos en dicha base de datos, se obtuvo un subgrupo de 96 casos con estadios precoces tumorales (I-II) y seguimiento mayor de 3 años. Todos los casos de este subgrupo fueron tratados primariamente mediante cirugía local+disección cervical electiva. El análisis anatomopatológico de las piezas procedentes de la disección cervical no mostró afectación nodal metastásica en ninguno de los casos (pN0). De los datos incluidos en la base de datos se recogieron para el propósito de este estudio- edad, sexo, localización primaria del tumor, estadio de la enfermedad, hallazgos anatomopatológicos, presencia de recidivas (con localización de las mismas), periodo libre de enfermedad y supervivencia global. El seguimiento de los pacientes se realizó de forma mensual a lo largo del primer año, cada tres meses durante el segundo año y a partir del tercer año de forma semestral.

Métodos

Analizamos las piezas operatorias obtenidas del archivo del Servicio de Anatomía Patológica de nuestro Hospital, procedentes de los pacientes objeto del estudio. Todas las muestras a examinar fueron fijadas en formol al 10% e incluidas en parafina. Para el propósito del estudio se utilizaron las muestras más representativas de la lesión tumoral, así como muestras de tejido normal como patrón de referencia.

Linfangiogénesis intratumoral (LI)

Tinción inmunohistoquímica

El anticuerpo policlonal frente a PA2.26 humano se obtuvo mediante inmunización en el conejo con un péptido sintético que

moral lymphatics with a high rate of tumor related mortality. The molecular mechanisms that stimulate lymphangiogenesis are not completely clear although certain studies have suggested that the expression of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) within the tumor tissue can stimulate endothelial cells to generate new lymphatic vessels.¹⁷

The purpose of this work was to analyze a group of patients with early stages of SCC and to find a possible correlation between intratumoral lymphangiogenesis (IL), the expression of VEGF-C and the prognosis of the disease. We therefore used the three traditional histological grading systems (Broders, Anneroth and Bryne) correlating the values obtained with the presence of IL and with the prognosis of the disease.

Material and methods

Patients

The Department of Oral and Maxillofacial Surgery of our hospital has a database including 500 patients that were surgically operated of oral squamous cell carcinoma over the period 1985-2004. Of the global group appearing in this database, a subgroup of 96 cases was obtained with early stage tumors (I-II) that had a follow-up of more than 3 years. All the cases in this subgroup were treated primarily by means of local surgery with elective neck dissection. The pathological analysis of the specimens from the neck dissection did not show any metastatic nodal involvement in this group of patients (pN0). The information in the database that was used for this study included age, sex, primary location of the tumor, disease stage, pathological findings, presence of relapses (including the location), disease-free interval and global survival. Patient follow-up was carried out monthly over the first year, every three months during the second year and every six months as from the third year.

Methods

The surgical specimens from the patients in our study archived in the Department of Pathology in our hospital, were analyzed. All the samples were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. For study purposes, the most representative samples of the tumor were used, as well as normal tissue as a control.

Intratumoral lymphangiogenesis (IL)

Immunohistochemical staining

The polyclonal antibody against human PA2.26 was obtained by means of immunization in a rabbit with a synthetic peptide comprising amino acids 37-51 (P₃₇₋₅₁) of the protein ectodomain PA2.26. The method of antibody production has been described in detail previously.^{15,18} The anti-PA2.26 antiserum has been optimized, and its expression

comprendía los aminoácidos 37-51 (P₃₇₋₅₁) del ectodominio de la proteína PA2.26. El método de producción del anticuerpo ha sido descrito en detalle previamente.^{15,18} El antisuero anti-PA2.26 ha sido optimado y analizada su expresión en una gran mayoría de tejidos humanos, demostrándose su especificidad para endotelio linfático. El epítipo que reconoce este antisuero no se enmascara con el formol por lo que no es necesario emplear técnicas de calentamiento, lo cual facilita la normalización de la técnica y, por lo tanto, la reproducibilidad de los resultados. Una vez de-parafinadas secciones de tejido con un espesor de 5 µm., se utilizó el método Envision+-peroxidasa (Dako A/S; Glostrup, Dinamarca) para el estudio inmunohistoquímico, realizando incubación durante una hora con el antisuero anti-PA2.26 a una dilución 1/400 temperatura ambiente antes y después de preincubación con P₃₇₋₅₁ y Pcontrol como control negativo. Las secciones fueron posteriormente deshidratadas en alcoholes progresivos, lavadas en xylol y montadas en Permount (Fischer Sc.; Pittsburg, U.S.A.), realizándose contratinción con hematoxilina. Gracias a este marcador pudimos realizar un análisis descriptivo de los capilares linfáticos, determinando los casos con LI.

Evaluación de LI

En el análisis descriptivo de la arquitectura de la microcirculación se valoró la presencia de capilares linfáticos peritumorales o intratumorales, aunque de cara al estudio sólo se consideraron los casos con linfáticos en el interior del tejido tumoral. Como muestra control se utilizaron muestras de tejido obtenido de mucosa oral sana.

Un determinado caso se incluyó dentro del grupo con linfangiogénesis intratumoral LI (+) si se observaron vasos linfáticos en el interior del tejido tumoral en íntimo contacto con células tumorales (Fig. 1A). Por el contrario, el caso se consideró dentro del grupo LI (-) si no se observaron linfáticos en el interior del tejido tumoral (Fig. 1B).

Factor de crecimiento vascular endotelial-C (VEGF-C)

Técnica inmunohistoquímica

La inmunotinción de VEGF-C se llevó a cabo mediante el método Envision-peroxidasa (HRP; Dako A/S, Glostrup, Dinamarca) con recuperación antigénica inducida por calor, utilizando buffer-citrato pH8. Brevemente, los cortes incluidos en parafina fueron inicialmente desparafinados en xylol, rehidratándose en alcoholes de gradación decreciente y lavándose posteriormente en PBS (fosfato buffer salino). A continuación, se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena y se procedió a la recuperación antigénica en olla a presión durante 2 minutos. El proceso continuó con la incubación en suero de conejo anti-VEGF-C (Zymed Lab.; San Francisco, California, U.S.A.) a dilución 1/100 durante toda una noche. El complejo Envision+-peroxidasa anticonejo fue utilizado como anticuerpo secundario. El producto de la reacción antígeno-anticuerpo se reveló con una solución de aminobencidina y H₂O₂. Los núcleos celulares se tiñeron con hematoxilina de Harris (15 segundos) y las muestras se deshidrataron en alcoholes de concentraciones crecientes, montándose en un medio permanente (Eukitt)(O. Kindler GMBH&Co.; Freiburg, Alemania).

analyzed in large amounts of human tissue, and the specificity for lymphatic endothelium has been demonstrated. The epitope that recognizes this antiserum is not masked by formalin and, for that reason, heating techniques are not required. This facilitates the normalization of the technique and, therefore, the reproduction of the results. Once the sections of tissue with a thickness of 5 µm. had been deparaffinized, the Envision+-peroxidase method (Dako A/S; Glostrup, Denmark) was used for the immunohistochemical study. Incubation was carried out during an hour with the anti-PA2.26 antiserum with a 1:400 dilution at room temperature before and after preincubation with P₃₇₋₅₁ and P control as a negative control. The sections were then dehydrated in graded alcohols, cleared with xylol and mounted in Permount (Fischer Sc.; Pittsburg, U.S.A.) after counterstaining with hematoxylin. Using this marker we were able to carry out a descriptive analysis of the lymphatic capillaries, and the IL cases were identified.

IL evaluation

In the descriptive analysis of the microcirculation architecture, the presence of peritumoral or intratumoral lymphatic capillaries was assessed, although by the study only cases with lymphatics inside the tumor tissue were considered. Tissue specimens obtained from healthy oral mucosa were used as control specimen.

Cases were included in the intratumoral lymphangiogenesis group IL(+) if lymphatic vessels were observed within the tumor tissue, in intimate contact with the tumor cells (Fig. 1A). Cases were considered to be in the IL(-) group if lymphatics were not observed on the inside of the tumoral tissue (Fig. 1B).

Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C)

Immunohistochemical technique

Immuno-staining with VEGF-C was carried out using the Envision+-peroxidase method (HRP, Dako A/S, Glostrup, Denmark) with antigen retrieval by heat and citrate buffer pH8. Briefly, the paraffin-embedded samples were initially deparaffinized with xylol. They were re-hydrated through descending concentrations of alcohol and later washed in PBS (phosphate buffer saline). Next, endogenous peroxidase was blocked and antigen retrieval was carried out using a pressure cooker for two minutes. The process was then continued with overnight incubation with rabbit anti-VEGF-C serum (Zymed Lab.; San Francisco, California, U.S.A.) using a 1/100 dilution. The anti-rabbit Envision+-peroxidase complex was used as a secondary antibody. The antigen-antibody reaction produced was detected using amino-benzidine and H₂O₂. The nuclear cells were stained with Harris' hematoxylin stain (15 seconds) and the samples were dehydrated in increasing concentrations of alcohol and mounted in a permanent medium (Eukitt)(O. Kindler GMBH&Co; Freiburg, Germany).

Evaluación de VEGF-C

La inmunoreactividad para VEGF-C fue examinada por dos de los autores (A.L.C. y C.G.A.) sin conocimiento previo del resultado clínico de cada caso. Únicamente resultaron valorables 62 casos del grupo global. Para evaluar la intensidad de tinción VEGF-C en CEI, se utilizó una región de epitelio no tumoral como control interno. La expresión de VEGF-C en el tejido neoplásico se definió como negativa si las células positivas constituían sólo 0-25% del tejido, y positiva si las células positivas comprendían >25%. De este modo, la expresión fue considerada como presente o ausente, sin considerar la intensidad de inmunotinción.

Dependiendo de la morfología en la expresión del factor otras dos variables fueron recogidas:

- Distribución de la expresión (Fig. 2): Considerada como homogénea o heterogénea, dependiendo si la morfología de la expresión fue uniforme o no.
- Localización de la expresión (Fig. 3): Considerada como central, periférica o difusa dependiendo de la situación predominante de la expresión en los nidos tumorales.

Sistemas de gradación histológica

En cada caso, se utilizaron los cortes principales que incluían el espesor completo del tejido tumoral (incluyendo márgenes de invasión). Se analizó la gradación histológica siguiendo los siguientes sistemas de clasificación:

- Clasificación de Broders:⁵ Se fundamenta en el grado de diferenciación y en la queratinización de las células tumorales. De acuerdo con ello, considera a los tumores como bien, moderadamente o pobremente diferenciados.
- Clasificación de Anneroth:² Sistema de puntuación sumatorio que considera los parámetros: grado de queratinización, polimorfismo nuclear, número de mitosis por campo, patrón y estadio de invasión así como grado de infiltración linfoplasmocitaria (Tabla 1).
- Clasificación de Bryne:⁶ Sistema idéntico al de Anneroth, con la salvedad de que omite el parámetro «número de mitosis».

Análisis estadístico de los resultados

Con el propósito de facilitar el análisis estadístico de los resultados y considerando la puntuación original según los sistemas

Figura 1. Muestras carcinoma epidermoide intraoral. Marcaje con PA2.26 para demostrar linfáticos intratumorales. A) Linfangiogenesis intratumoral. B) Ausencia de linfáticos en el interior del tejido tumoral.

Figure 1. Oral squamous cell carcinoma specimens. Intratumoral lymphatics are shown with the PA2.26 marker. A) Intratumoral lymphangiogenesis. B) Absence of lymphatics inside the tumor tissue.

Figura 2. Distribución de la expresión de VEGF-C. A) Distribución homogénea. B) Distribución heterogénea.

Figure 2. Expression and distribution of VEGF-C. A) Homogeneous distribution. B) Heterogeneous distribution.

Figura 3. Localización de la expresión de VEGF-C. A) Central. B) Periférica. C) Difusa.

Figure 3. VEGF-C expression location. A) Central. B) Peripheral. C) Diffuse.

VEGF-C evaluation

VEGF-C immunoreactivity was examined by two of the authors (A.L.C. and C.G.A.) who were not aware of the clinical results of each case. Only 62 cases out of the global group could be evaluated. In order to evaluate the intensity of the VEGF-C stain in the SSC, a tumor free region of the epithelium was used as internal control. VEGF-C expression in neoplastic tissue was defined as negative if positive cells made up 0-25% of the tissue, and positive if positive cells made up >25%. Thus, the expression was considered as present or absent without taking into account immunostaining intensity.

According to the morphology of the expression factor, another two variables were obtained:

- Expression distribution (Fig. 2): This was considered homogeneous or heterogeneous depending on if the morphology of the expression was uniform or not.
- Expression location (Fig. 3): This was considered as central, peripheral or diffuse depending on the predominant location of the expression in the tumor nests.

Histological grading systems In all cases, the main section that included the full thick-

ness of the tumor tissue (with the invasion margins) was used. The histological grading was analyzed using the following classification systems:

- Broders' classification:⁵ this system is based on the degree of differentiation and keratinization of tumor cells. According to this, tumors were considered well, moderately or poorly differentiated.
- Anneroth classification:² This is a point system that takes into account the following parameters: degree of keratinization, nuclear polymorphism, number of mitoses per high powered field, pattern and stage of invasion as well as the degree of lymphoplasmacytic infiltration (Table 1).

Tabla 1. Sistema de gradación histológica de malignidad (Anneroth 1987)

Parámetros morfológicos	Puntos			
	1	2	3	4
Grado de queratinización	Alta (>50% de las células)	Moderada (20-50 % de cels.)	Mínima (5-20% de cels.)	Sin queratin (0-5% de cels.)
Polimorfismo nuclear	Escaso (>75% céls maduras)	Moderado (50-75% cl. mad.)	Abundante (25-50% cl. mad.)	Extremo (0-25% cl. mad.)
Número de mitosis por campo	0-1	2-3	4-5	>5
Patrón de invasión	Expansivo, bordes infiltrativos bien delimitados	Infiltrante, cordones sólidos, bandas y/o nidos	Pequeños grupos de cordones de células infiltrando (n>15)	Marcada diseminación celular en pequeños grupos (n>15)
Estadio de invasión (profundidad)	Carcinoma <i>in situ</i>	Invasión exclusivamente de la lámina propia	Invasión musculatura subyacente	Invasión profunda afectando estroma o hueso subyacente.
Infiltración linfoplasmocitaria	Marcada	Moderada	Leve	Nula

La puntuación del sistema se obtiene sumando los puntos considerados para cada uno de los parámetros morfológicos.

Table 1. Histological grading system of malignancy (Anneroth 1987)

Morphological parameters	Points			
	1	2	3	4
Degree of keratinization	High (>50% of cells)	Moderate (20-50% of cels.)	Poor (5-20% of cells)	No keratinization (0-5% of cells)
Nuclear polymorphism	Scarce (>75% of mature cells)	Moderate (50-75% of mat. cells)	Abundant (25-50% of mat.cells.)	Extreme (0-25% of mat.cells.)
Number of mitoses per high powered field	0-1	2-3	4-5	>5
Pattern of invasion	Pushing, well-delineated infiltrating borders	Infiltrating, solid cords, bands and/or nests	Small groups of cords of infiltrating cells (n>15)	Marked cellular dissemination in small groups (n>15)
Stage of invasion (depth)	Carcinoma <i>in situ</i>	Invasion of lamina propria only	Invasion of underlying muscle groups	Deep invasion affecting stroma and underlying bone
Lymphoplasmacytic infiltration	Marked	Moderate	Slight	None

The point system is obtained by adding the points in each of the morphological parameters.

Anneroth y Bryne, analizamos las siguientes variables dicotómicas:

- Anneroth-Transformado (Annertras).
 - Valor I- Anneroth <=13.
 - Valor II-Anneroth >13.
- Bryne-Trnsformado (Brynetrans).
 - Valor I- Bryne <=9.
 - Valor II- Bryne >9.

A continuación, por el elevado grado de subjetividad que implican algunas de las variables de estos sistemas de gradación y, para facilitar el análisis estadístico, consideramos indicado transformar en dicotómicas 4 de las variables analizadas, del siguiente modo:

- Queratinización-Transformada (Queratrans).
 - Valor I- Queratinización alta o moderada.

Figura 4. Alta queratinización. Presencia de globos córneos (flechas).
Figure 4. High keratinization. Presence of keratin pearls (arrows).

- Bryne’s classification:⁶ an identical system to that of Anneroth with the exception that the «number of mitoses» is omitted.

Statistical analysis of the results

With the aim of facilitating statistical analysis of the results, and taking into account the original score according to the Anneroth and Bryne systems, we analyzed the following dichotomic variables:

- Anneroth-Transformed (Annertras).
 - Value I- Anneroth <=13
 - Value II-Anneroth >13

- Valor II-Queratinización mínima o nula.
- Polimorfismo-Transformado (Politrans).
 - Valor I- Polimorfismo escaso o moderado.
 - Valor II-Polimorfismo abundante o extremo.
- Índice de Mitosis-Transformado (Mitosestrans).
 - Valor I- Índice de mitosis 0-3.
 - Valor II- Índice de mitosis >3.
- Infiltración Linfoplasm-Transformada (Infiltrans).
 - Valor I- Infiltración linfoplasmocitaria marcada o moderada.
 - Valor II-Infiltración linfoplasmocitaria leve o nula.

Método estadístico

La correlación entre los diferentes parámetros clínicos y anatómo-patológicos fue estudiada mediante test χ^2 con corrección de Yates. Consideramos supervivencia causa-específica como el periodo desde la intervención quirúrgica hasta la muerte del paciente por causa tumoral. Como medida de pronóstico, utilizamos la supervivencia libre de recidiva, considerada como el tiempo desde la cirugía hasta la fecha de recidiva o hasta el último día de seguimiento. El análisis univariante de supervivencia causa-específica y supervivencia libre de recidiva se basó en el método de Kaplan-Meier, utilizándose el test «log-rank» para estudio comparativo. Los valores $p < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos. Para el estudio estadístico se utilizó en todos los casos el programa SPSS 8.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A.).

Resultados

El grupo global (96 casos) incluyó 49 pT1 (51%) y 47 pT2 (49%). La edad media observada fue de $57,25 \pm 14,06$ años. El estudio incluyó 69 varones (71,9%) y 27 mujeres (28,1%). En el seguimiento, 16 casos (16,7%) mostraron recidivas: 6 casos a nivel local (6,3%), 8 casos a nivel cervical (8,3%) y 2 casos a nivel loco-cervical (2%).

Figura 5. Imágenes del polimorfismo nuclear. A) Escaso polimorfismo. B) Polimorfismo intenso con imágenes de disqueratosis.
Figure 5. Nuclear polymorphism view. A) Scarce polymorphism. B) Intense polymorphism with dyskeratosis features.

Figura 6. Presencia abundantes mitosis (flechas) acompañadas de polimorfismo.
Figure 6. Abundant mitoses (arrows) together with polymorphism.

Figura 7. Frente de invasión. A) Crecimiento infiltrativo en forma de cordones sólidos (flecha). B) Invasión mediante cordones pequeños.
Figure 7. Invasion front. A) Infiltrative growth in the shape of solid cords (arrows). B) Invasion by means of small cords.

Figura 8. Profundidad de invasión. Afectación tejido muscular (flechas).
Figure 8. Depth of invasion. Muscular tissue involvement (arrows).

- Transformed Bryne (Bryne-trans).

- Value I- Bryne ≤ 9 .
- Value II- Bryne > 9 .

Next, as a result of the high degree of subjectivity of some the variables in these grading systems, and in order to facilitate the statistical analysis, we considered appropriate transforming into dichotomies four of the variables analyzed, as follows:

- Transformed-Keratinization (Keratrans).
 - Value I- High or moderate keratinization.
 - Value II-Poor or no keratinization.
- Transformed Polymorphism- (Politrans).
 - Value I- Scarce or moderate polymorphism.
 - Valor II-Abundant or extreme polymorphism.
- Transformed Mitoses rate (Mitosestrans).
 - Value I- Mitoses rate 0-3.
 - Value II- Mitoses rate > 3 .
- Transformed lymphoplasmacytic infiltration (Infiltrans).
 - Value I- Marked or moderate lymphoplasmacytic infiltration.
 - Value II-Slight or no lymphoplasmacytic infiltration.

Statistical method

The correlation between the different clinical and pathological parameters was studied by means of a χ^2 test with Yates' correction. Cause-specific survival was considered as the period between the surgical intervention and the death of the patient through tumor disease. Relapse-free survival was used for measuring prognosis and this was considered as the period between the surgery and the relapse date,

Linfangiogénesis intratumoral

El análisis de las muestras con inmunotinción PA2.26 mostró marcaje constante del endotelio linfático. Los hallazgos de linfangiogénesis peritumoral fueron prácticamente constantes mientras que, del grupo de 96 casos, 57 casos (59,4%) mostraron datos típicos de LI. El análisis de este grupo mostró un mayor índice de recidiva entre los casos LI (+), aunque la diferencia no pudo considerarse como estadísticamente significativa (Tabla 2). El análisis univariante mediante log-rank test mostró mejor periodo libre de enfermedad para el grupo LI (-) (Fig. 10). En el grupo global, se apreciaron 6 fallecimientos en el seguimiento, 5 de ellos pertenecían al grupo LI (+) y uno al LI (-). El análisis por sexo mostró un mayor índice de LI (+) en el sexo femenino, con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$) (Tabla 3). Como dato llamativo, cabe destacar que observamos sólo 1 fallecimiento dentro del grupo de mujeres, caso el cual pertenecía al grupo con LI (+) (1/22 casos- 4,5%). Del conjunto de pacientes varones con LI (+) observamos 4 fallecimientos (4/35- 11,4%).

Con respecto a la expresión de VEGF-C, 51 casos mostraron expresión positiva mientras que el grupo VEGF-C (-) resultó constituido por 11 casos. Dentro de estos 62 casos analizados, 11 mostraron recidiva en el seguimiento perteneciendo todos ellos al grupo VEGF-C (+). El análisis de periodo libre de enfermedad mostró mejores resultados para el grupo VEGF-C, aunque la diferencia no mostró valores estadísticamente significativos. Tanto la localización como la distribución en la expresión de este factor de crecimiento vascular no mostraron importancia estadística en cuanto a la presencia de recidivas en el seguimiento. La expresión de VEGF-C no presentó una relación significativa con la presencia de linfáticos intratumorales (Tabla 4). Dentro del subgrupo LI (+) VEGF-C(+), 15 casos (46,9%) mostraron expresión difusa de este factor, 12 (37,5%) expresión central y 5 (15,6%) expresión periférica. En cuanto a la distribución, en 19 casos (59,4%) se consideró homogénea y en 13 (40,6%) heterogénea.

Figura 9. Infiltrado linfoplasmocitario intenso.
Figure 9. Intense lymphoplasmacytic infiltration.

Figura 10. Análisis univariante periodo libre de enfermedad. Linfangiogénesis intratumoral.

Figure 10. Univariate analysis of disease-free period. Intratumoral lymphangiogenesis.

Tabla 2.

		Recidiva	
		Sí	No
Linfangiogénesis intratumoral	Sí	12	45
	No	4	35
χ^2 - 1,94; $p=0,16$			

Tabla 2.

		Recurrence	
		Sí	No
Intratumoral lymphangiogenesis	Yes	12	45
	No	4	35
χ^2 - 1,94; $p=0,16$			

or the date of the last follow-up. The univariate analysis of cause-specific survival and relapse-free survival was based on the Kaplan-Meier method, using the log-rank test for comparative study. The $p < 0.05$ values were considered as statistically significant. For the statistical study the SPSS 8.0 program (SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A.) was used in all cases.

Results

The global group (96 cases) included 49 pT1 (51%) and 47 pT2 (49%). The mean age observed was 57.25 ± 14.06 years. The study included 69 males (71.9%) and 27 females (28.1%). In the follow-up, there were 16 cases (16.7%) of relapse: 6 cases at a local level (6.3%) 8 neck cases (8.3%) and 2 local neck cases (2%).

Intratumoral lymphangiogenesis

The analysis of the samples with PA2.26 immuno-staining was found to be a constant marker for lymphatic endothelium. The findings as to peritumoral lymphangiogenesis were practically constant, while in the group with 96 cases, 57 cases (59.4%) had typical IL. The analysis of this group showed a greater rate of relapse in the IL(+) group, although the difference could not be considered as statistically significant (Table 2). The univariate analysis by means of the log-rank test showed a better disease-free

interval for the IL(-) group (Fig. 10). In the global group, 6 deaths occurred during the follow-up, 5 cases of the IL(+) group and one case of the IL(-).

Correlación sistemas gradación histológica con linfangiogenesis intratumoral

En cuanto al sistema de gradación de Broders, de los 96 casos analizados, 38 se consideraron bien diferenciados, 52 moderadamente diferenciados y 6 pobremente diferenciados. No se observó una relación estadísticamente significativa entre linfangiogenesis y grado histológico de Broders. En cuanto a las recidivas, 8 de ellas se produjeron en pacientes con tumores bien diferenciados (8/38- 21% de los casos) y otras 8 en tumores moderadamente diferenciados (8/52-15,4% de los casos). Ninguno de los pacientes con tumores pobremente diferenciados sufrieron recidivas en el seguimiento.

El estudio comparativo de los diferentes sistemas de gradación histológica mostró una relación estadísticamente significativa entre los sistemas de Broders y Anneroth ($p<0,01$) y entre los sistemas de Broders y Bryne ($p<0,001$) (Tabla 5). Al relacionar el sistema de gradación de Anneroth con la presencia de recidivas en el seguimiento observamos 8 casos de recidiva en el grupo *Annertrans* valor II (8/44- 18,1%) (4 a nivel local, 3 cervical y 1 caso loco-cervical). En el grupo *Annertrans* valor I se observaron también 8 recidivas (8/52- 15,3%) (2 a nivel local, 5 cervical y 1 caso loco-cervical). Igualmente, se observaron 8 recidivas tanto en el grupo *Brynetrans* valor I como en el *Brynetrans* valor II. En cuanto a la curva de supervivencia por periodo libre de enfermedad, no observamos valores log-rank significativos ni para la variable *Annertrans* ($p=0,73$), ni para *Brynetrans* ($p=0,91$). En referencia a la supervivencia, se observaron 3 fallecimientos tanto para el valor I como para el valor II de las variables *Annertrans* y *Brynetrans*.

El análisis estadístico no consiguió establecer una relación entre las variables *Queratrans* ($p=0,85$), *Politrans* ($p=1$), *Mitosistrans* ($p=0,63$), *Infiltrans* ($p=0,7$) y la presencia de recidivas en el seguimiento. Asimismo, no conseguimos establecer una relación entre el modo de invasión ($p=0,57$) o el grado de invasión ($p=0,85$) y la presencia de recurrencias.

El análisis correspondiente a la relación entre las diferentes variables de la clasificación de Anneroth y la LI mostró los siguientes datos:

Tabla 3.

		Sexo	
		Mujer	Varón
Linfangiogenesis intratumoral	Sí	22	35
	No	5	34

χ^2 - 7,61; $p=0,005$

Tabla 3.

		Sex	
		Female	Male
Intratumoral lymphangiogenesis	Yes	22	35
	No	5	34

χ^2 - 7,61; $p=0,005$

Tabla 4.

		VEGF-C	
		+	-
Linfangiogenesis intratumoral	Sí	32	7
	No	19	4

χ^2 - 0,003; $p=0,95$

Tabla 4.

		VEGF-C	
		+	-
Intratumoral lymphangiogenesis	Yes	32	7
	No	19	4

χ^2 - 0,003; $p=0,95$

Tabla 5.

			Clasificación Bryne	
			≤ 9	> 9
Clasificación Broders	I	30	8	
	II	17		34
	III	2		4

χ^2 - 18,99; $p=0,00008$

Tabla 5.

			Bryne Clasification	
			≤ 9	> 9
Broders Clasification	I	30	8	
	II	17		34
	III	2		4

χ^2 - 18,99; $p=0,00008$

a greater rate of IL(+) in the female sex with a difference that was statistically significant ($p<0.01$) (Table 3). It should be pointed out that only 1 death was observed in the female group, which was a case of the IL(+) group (1/22 cases-4.5%). Of the male patient group with IL(+) we observed 4 deaths (4/35- 11.4%). With regard to VEGF-C expression, 51 cases showed positive expression while the VEGF-C(-) was made up of 11 cases. Within the 62 cases analyzed, 11 showed relapse during the follow-up period, and they all were included in the VEGF-C(+) group. The analysis of the disease-free interval showed better results for the VEGF-C group, although the difference did not result in statistically significant values. The differences in relation to the site and the distribution of this vascular growth factor expression were not statistically significant with regard to the existence of relapses during the follow-up period. VEGF-C expression did bear a significant relationship with the presence of intratumoral lymphatics (Table 4). Within the IL(+) VEGF-C(+) subgroup, 15 cases (46.9%) showed a diffuse expression of this factor, 12 (37.5%) had central expression and 5 (15.6%) showed peripheral expression. With regard to distribution, 19 cases (59.4) were considered homogeneous and 13 cases (40.6%) were heterogeneous.

Correlation of histological grading systems with intratumoral lymphangiogenesis

With regard to Broders' classification, of the 96 cases analyzed, 38 were considered well-differentiated, 52 mod-

- Se apreció una relación inversa entre la variable *Queratrans* y la presencia de LI ($p<0,01$) (Tabla 6).
- No hubo una relación entre las variables *Politrans* ($p=0,36$), *Mitosistrans* ($p=0,8$), modo de invasión ($p=0,25$) y la LI.
- Las variables grado de invasión y LI no presentaron una relación estadísticamente significativa aunque los casos con invasión de la muscular mostraron un elevado porcentaje de LI (34/52- 65,4% de los casos).
- Observamos una relación estadísticamente significativa entre la presencia de LI y la variable *infiltrans* ($p<0,01$) (Tabla 7).
- Apreciamos una relación estadísticamente significativa entre los valores menores de *Annertrans* ($p<0,01$)–*Brynetrans* ($p<0,001$) y la presencia de LI (Tablas 8 y 9).

Discusión

Un porcentaje significativo de pacientes con estadios precoces de CEI tienen un mal pronóstico a pesar del pequeño tamaño tumoral. De hecho, Bundgaard y cols.¹⁹ demostraron que hasta un 25% de los pacientes con T1 pueden cursar con mala evolución en el seguimiento. El actual estándar de tratamiento en los tumores intraorales en los cuales se considera una probabilidad mayor del 20% de afectación cervical es la resección local y disección cervical electiva incluso en cuellos clínicamente negativos. Sin embargo, hay gran controversia acerca de la indicación de disección electiva en estadios I-II de cáncer oral. De ahí la importancia de encontrar factores pronósticos especialmente en los estadios precoces del CEI. En un estudio de Beenken y cols. 20 sobre 169 pacientes con estadios precoces de carcinoma lingual, los autores encontraron un índice de recidiva local o cervical superior al 20% de los casos tratados primariamente sólo con resección local. El porcentaje de falsos negativos, es decir, cuellos N0 y pN+ oscila según las series entre el 15 y el 60% de los casos electiva.^{21,22}

El objetivo de los sistemas de gradación tumoral es clasificar los pacientes en grupos para los cuales podemos asumir un similar curso clínico. Hoy día, el sistema de clasificación TNM es el único de

Tabla 6.

		LI	
		+	-
Queratrans	I	29	9
	II	28	30

χ^2 - 7,48; $p=0,006$

Tabla 6.

		LI	
		+	-
Keratrans	I	29	9
	II	28	30

χ^2 - 7,48; $p=0,006$

Tabla 7.

		LI	
		+	-
Infiltrans	I	44	18
	II	13	21

χ^2 - 9,75; $p=0,001$

Tabla 7.

		LI	
		+	-
Infiltrans	I	44	18
	II	13	21

χ^2 - 9,75; $p=0,001$

Tabla 8.

		Anneroth	
		≤ 13	> 13
Linfangiogénesis intratumoral	Sí	37	19
	No	14	25

χ^2 - 8,41; $p=0,003$

Tabla 8.

		Anneroth	
		≤ 13	> 13
Intratumoral Lymphangiogenesis	Yes	37	19
	No	14	25

χ^2 - 8,41; $p=0,003$

erately differentiated and 6 poorly differentiated. A statistically significant correlation was not observed between lymphangiogenesis and Broders' histological grading. With regard to relapse, there were 8 occurrences in patients with well-differentiated tumors (8/38- 21% of cases) and another 8 with moderately differentiated tumors (8/52- 15.4% of cases). None of the patients with poorly differentiated tumors suffered a relapse during the follow-up period.

The comparative study of the different histological grading systems showed a statistically significant relationship between the Broders' and Anneroth systems ($p<0.01$), and between the Broders' and Bryne systems ($p<0.001$)(Table 5). On correlating the Anneroth grading system with the occurrence of relapse at follow-up, 8 relapse cases were observed in the Annertrans value II group (8/44- 18.1%) (4 local, 3 neck and 1 local neck case). In the Annertra value I group 8 relapses were also observed (8/52- 15.3%) (2 local, 5 neck and 1 local neck case). Eight relapses were also observed in the Brynetrans value I group as well as in the Brynetrans value II group. With regard to the survival curve during the disease-free interval, no log-rank values were observed that were of signif-

icance for either the ANNERTANS variable ($p=0.73$), nor for the Brynetrans variable ($p=0.91$). With regard to survival, 3 deaths were observed in the value I group as well as in the value II of the Annertrans and Brynetrans variables.

The statistical analysis did not establish a link between the Keratrans ($p=0.85$), Polytrans ($p=1$), Mitosetrans ($p=0.63$), Infiltrans ($p=0.7$) variables and the presence of relapse at follow-up. Also, no relation was established between

uso general en la predicción del resultado clínico en el carcinoma intraoral. El sistema TNM incluye aceptables parámetros pronósticos pero no puede predecir las propiedades biológicas del tumor. Con el objetivo de valorar dichas propiedades biológicas surgieron los sistemas de gradación histológica.

En 1920, Broders⁵ ideó un sistema de clasificación histológica, aplicándolo al carcinoma epidermoide de labio y considerando 4 categorías en función de la proporción de neoplasia con semejanzas con respecto al epitelio normal. El sistema de clasificación fue posteriormente modificado por un grupo de patólogos distinguiendo sólo 3 tipos tumorales. El sistema desarrollado por Broders considera tres tipos tumorales en función del grado de diferenciación: bien diferenciados, moderadamente diferenciados y pobremente diferenciados. Dicho autor mostró un incremento en la tasa de metástasis en un grupo de carcinoma epidermoide de labio desde los tumores bien diferenciados hasta los pobremente diferenciados. Este sistema ha sido ampliamente usado pero se ha demostrado como escasamente predictivo en cuanto a metástasis o supervivencia.²³ Los resultados de nuestro estudio muestran de manera semejante el escaso valor de dicho sistema de clasificación. La ausencia de correlación entre grado de Broders y pronóstico puede explicarse por el hecho de que el CEI habitualmente se compone de una población celular heterogénea, con grados diferentes de invasividad en función de la zona del tumor analizada.

La escasa utilidad que mostró el sistema de Broders animó a diferentes autores al desarrollo de nuevos sistemas de clasificación multifactorial.^{24, 25} En 1966, Arthur y Fenner²⁶ observaron una relación significativa entre el grado de queratinización, la actividad mitótica, hiperchromatismo y pronóstico en el cáncer de lengua, sugiriendo la utilidad de la valoración de diferentes parámetros incluidos en un sistema de clasificación de malignidad. En 1973, Jakobsson y cols. publicaron un sistema de gradación multifactorial cuyo propósito era conseguir una evaluación morfológica del tejido tumoral.²⁴ Anneroth y cols. modificaron dicho sistema evaluando criterios morfológicos más precisos.²⁵ Bryne y cols.²⁷ introdujeron en 1991 un sistema de gradación multifactorial considerando los márgenes de invasión tumoral y eliminando el factor «cuenta de mitosis» debido a lo controvertida que resulta la utilidad de dicho factor por la heterogeneidad celular y el grado de subjetividad que puede suponer por parte del observador.

Al-Rajhi y cols.²⁸ en su serie de 85 pacientes con tumores de lengua libre apreciaron que ni el grado de diferenciación ni el tamaño tumoral parece afectar el control loco-regional o la supervivencia. Umeda y cols.²⁹ estudiaron un grupo de 60 casos de CEI observando resultados sorprendentes: la presencia de metástasis cervicales no se correlacionaba ni con la localización del primario ni con el tamaño del mismo, pero sí encontró una relación entre el grado histológico de malignidad (gradación WHO) y la prevalencia de metástasis cervicales. Okamoto y cols.³⁰ estudiaron el desarrollo de reci-

Tabla 9.

		Bryne	
		<=9	>9
Linfangiogénesis intratumoral	Sí	37	19
	No	12	27

χ^2 - 11,47; $p=0,0007$

Tabla 9.

		Bryne	
		<=9	>9
Intratumoral Lymphangiogenesis	Yes	37	19
	No	12	27

χ^2 - 11,47; $p=0,0007$

the invasion mode ($p=0.57$) or degree of invasion ($p=0.85$) and the presence of recurrence.

The analysis that corresponded to the relationship between the different variables of the Anneroth classification and IL resulted in the following data:

- An inverse relationship was appreciated between the Keratrans variable and the presence of IL ($p<0.01$) (Table 6).

- There was no relationship

between Polytrans ($p=0.36$) and Mitosestrans ($p=0.8$), mode of invasion ($p=0.25$) variables and IL.

- The degree of invasion and the IL variables did not show a relationship that was statistically significant, although the cases of muscular invasion showed a high percentage of IL (34/52-65.4% of cases).
- A relationship that was statistically significant was observed between the presence of IL and the Infiltrans variable ($p<0.01$) (Table 7).
- A relationship that was statistically significant was appreciated between the lower values of Annertrans ($p<0.01$) – Brynetrans ($p<0.001$) and the presence of IL (Tables 8 and 9)

Discussion

A significant percentage of patients with early stages of SCC have a poor prognosis despite the small size of the tumor. In fact, Bundgaard and cols.¹⁹ demonstrated that up to 25% of patients with T1 could show poor prognosis at follow-up. The current standard treatment for oral tumors when the probability of neck involvement is greater than 20%, is local resection and even elective neck dissection for clinically negative necks. However, there is great controversy as to the indication of elective dissection for stage I-II oral cancer, which shows the importance of finding prognostic factors for early stage SCC in particular. In a study carried out by Beenken and cols.²⁰ based on 169 patients with early stage lingual carcinoma, the authors found a rate of local or cervical relapse of more than 20% regarding the cases treated primarily with local resection only. The percentage of false negatives, that is to say, N0 and pN+ necks, varies between 15 and 60% depending on the series.^{21, 22}

The objective of the tumor grading systems is to classify patients into groups so that a similar clinical course can be expected. The current TNM classification is the only widely used system for predicting the clinical result of SCC. The TNM system includes acceptable prognostic parameters but

divas cervicales en un grupo de 59 pacientes T1-T2 tratados mediante cirugía local exclusivamente. Dichos autores no encontraron una relación estadística entre el grado de malignidad histológica (definido por los parámetros de Broders) y la presencia de recidivas; sin embargo, la expresión de VEGF sí influyó en el desarrollo de afectación ganglionar cervical en el seguimiento. Resultados contradictorios han sido ofrecidos por Lim y cols.³¹ los cuales, en una serie de 56 estadios I-II, mostraron una relación estadística entre los sistemas de Broders, Anneroth y Bryne con la presencia de metástasis cervicales tardías. Nuestra serie tiene la particularidad de focalizarse en tumores menores de 4 cm. y sin afectación ganglionar cervical. En este grupo homogéneo de pacientes, nuestros resultados muestran el escaso valor de los diferentes sistemas de gradación en cuanto a periodo libre de enfermedad y supervivencia.

Nuestro estudio no mostró ninguna relación estadística entre los diferentes parámetros utilizados para evaluar la gradación histológica y el curso de la enfermedad. Sin embargo, de todos ellos, el que mostró mayor importancia pronóstica fue el modo de invasión. Crissman y cols.³ mostraron en un estudio fundamentado en 77 pacientes tratados mediante radioterapia preoperatoria y cirugía que el modo de invasión fue el único factor histológico predictor de supervivencia. Las neoplasias que invaden como cordones sólidos presentaron un mejor pronóstico que los casos con invasión en cordones pequeños. López Pizarro³² en su estudio publicado en el año 2000 sobre 122 casos de diferente tamaño tumoral mostró en su análisis de regresión logística como, de los factores analizados el patrón de invasión mostró el mayor riesgo metastásico.

El pronóstico en el cáncer oral se ha relacionado desde hace más de 20 años con diferentes sistemas de puntuación con intención predictiva. En 1987, Gavilán y cols.³³ publicaron un estudio acerca de más de 60 factores que podrían afectar al pronóstico en carcinomas de cabeza y cuello; a pesar de que el estudio sólo daba utilidad a 11 de los factores analizados, la utilidad clínica del mismo ha sido nula. Otros sistemas de puntuación han intentado relacionar diversos factores dependientes del tumor primario con el riesgo de afectación ganglionar cervical. El sistema más utilizado fue ideado por Martínez-Gimeno tras analizar un grupo de 126 pacientes con carcinoma epidermoide de cavidad oral e hipofaringe.³⁴ El riesgo de afectación nodal metastásica se correlacionó con 7 parámetros: estadio T, invasión vascular, grado tumoral, espesor tumoral, interfase tumor-huésped, infiltrado inflamatorio e infiltración perineural. A pesar de que Yuen y cols.³⁵ han resaltado que su valor predictivo se fundamenta en el peso específico dado al parámetro «espesor tumoral», el sistema ha sido validado por un reciente trabajo de su autor.³⁶

En nuestro estudio no analizamos estadísticamente la importancia del espesor tumoral en el pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, su trascendencia ha quedado demostrada por trabajos previos. De hecho, O'Brien y cols.³⁷ han sugerido en un trabajo reciente la necesidad de disección cervical electiva para los tumores de más de 4 mm de espesor. Kurokawa y cols.³⁸ observaron que los tumores >4 mm. de espesor y moderadamente diferenciados se asocian con un índice elevado de metástasis cervicales. En un estudio realizado por Yuen y cols.³⁹ analizando diversos factores clásicamente considerados pronósticos en un grupo de pacientes con

the biological properties of the tumor cannot be predicted. With the aim of evaluating these biological properties, histological grading systems emerged.

In 1920, Broders⁵ devised a histological classification system that he applied to squamous cell carcinoma of the lip. Four categories were identified depending on the proportion of neoplasm resembling the normal epithelium. The classification system was later modified by a group of pathologists who identified only 3 tumor types. The system developed by Broders divided tumors into three types according to the degree of differentiation: well-differentiated, moderately differentiated and poorly differentiated. He showed how the rate of metastasis increases in the groups of squamous cell carcinoma of the lip from well-differentiated tumors to poorly differentiated tumors. This system has been widely used, but its predictive value with regard to metastasis or survival has proved to be limited.²³ The results of our study also show the limited value of this classification system. The lack of correlation between Broders' grading system and prognosis can be explained by the fact that SCC is usually made up of a heterogeneous cell population with different degrees of invasiveness depending on the tumor area analyzed.

The limited use of Broders' system led different authors to develop new systems for multifactorial classification.^{24, 25} In 1966, Arthur and Fenner²⁶ observed a significant correlation between the degree of keratinization, mitotic activity, hyperchromatism and the prognosis for tongue cancer, and they suggested that the evaluation of different parameters within a malignancy classification system could be useful. In 1973, Jakobsson and cols published a multifactorial grading system in order to evaluate tumor tissue morphologically.²⁴ Anneroth and cols. modified this system by evaluating morphological criteria more specifically.²⁵ In 1991 Bryne and cols.²⁷ introduced a multifactorial grading system that took into account tumor invasion margins while the author eliminated the «mitosis count» factor because of the controversy surrounding the use of this factor as a result of cellular heterogeneity and inter-observer subjectivity.

Al-Rajhi and cols.²⁸ in a series of 85 patients with tumors of the mobile tongue appreciated that neither the degree of differentiation nor tumor size appeared to affect loco-regional control or survival. Umeda and cols.²⁹ studied a group of 60 cases with ISCC and surprising results were observed: the presence of neck metastasis was not correlated with either primary site nor with tumor size, but a correlation was found between histological grade of malignancy (WHO grading) and the prevalence of neck metastasis. Okamoto and cols.³⁰ studied the development of delayed neck metastasis in a group of 59 T1-T2 patients that were treated by means of local surgery only. These authors did not find a statistical correlation between the histological grade of malignancy (as defined in Broders' parameters) and the incidence of relapse; however, VEGF-C expression did influence the development of neck node metastasis in the follow-up period. Lim and

CEI T1-T2, el espesor tumoral fue el único factor predictivo en cuanto a recidiva y supervivencia. Cabe señalar que la utilidad pronóstica del espesor tumoral puede fundamentarse en la necesidad de tratamientos adyuvantes pero, en cuanto a la indicación del tipo de cirugía a practicar, no parece resultar un parámetro útil debido al hecho de que la medición sólo puede obtenerse de forma fiable al disponer de la pieza de resección completa. En nuestra opinión, el espesor tumoral no es el único factor a considerar, deberíamos también tener en cuenta las características biológicas de la neoplasia incluyendo factores como la linfangiogénesis o la expresión de factores de crecimiento tumoral.

Estudios previos, como el de Dantas y cols.⁴⁰ han demostrado una ausencia de correlación entre gradación histológica de malignidad y pronóstico en el carcinoma intraoral. El sistema de clasificación Anneroth demostró su escaso valor pronóstico en este estudio, al igual que ha sucedido en el nuestro, contradiciendo a otros autores.^{41, 42} Uno de los problemas de estos sistemas de clasificación fue indicado por Crissman y cols.,³ el cual destacó el escaso valor de variables de difícil interpretación y sujetas a subjetividad tales como el conteo mitótico y la atipia nuclear. Estudios previos de nuestro grupo de investigación han demostrado la utilidad de parámetros menos usados tales como expresión de moléculas de adhesión epitelial,⁴³ presencia de linfáticos en el tumor e incluso la observación de embolización tumoral en linfáticos.¹⁵

La investigación focalizada en la comprensión de la biología de los vasos linfáticos se ha visto potenciada por el descubrimiento de marcadores específicos del endotelio linfático, tales como podoplanina, LYVE-1, prox-1 y VEGFR-3.¹²⁻¹⁴ Entre estos marcadores, podemos incluir PA2.26, una proteína de superficie relacionada con el proceso de carcinogénesis en la epidermis y con la remodelación cutánea.^{18, 44} Informes previos han descrito una correlación significativa entre expresión de VEGF-C, linfangiogénesis y metástasis regionales en ciertos tipos tumorales.⁴⁵⁻⁴⁸ Sin embargo, autores como Beasley y cols.⁴⁹ han señalado que sólo determinados tipos de neoplasias pueden explotar sus linfáticos intratumorales para el desarrollo de metástasis. La diferencia en el potencial de invasividad puede deberse a la producción de factores tales como las metaloproteasas⁵⁰ o factores de crecimiento vascular endotelial.⁵¹ La ausencia de linfáticos intratumorales en neoplasias que desarrollan metástasis por vía linfática, tales como en el caso del cáncer de mama⁵² puede reflejar diferencias genuinas entre el comportamiento de los diferentes tumores, dependiendo sobre todo del tipo histológico.

En este estudio, analizamos la expresión de VEGF-C en muestras quirúrgicas correspondientes a casos de CEI, usando técnicas de inmunohistoquímica, y correlacionándola con la presencia de linfáticos intratumorales y con el pronóstico de la enfermedad. Kishimoto y cols.,⁵³ en un estudio sobre 38 pacientes con estadios precoces de carcinoma intraoral, correlacionaron la expresión de VEGF-C con la presencia de metástasis ganglionares a nivel regional. Sin embargo, como dato especialmente llamativo, no consiguieron establecer dicha correlación en un grupo de pacientes con tumores T3-T4. Dichos resultados resaltan el diferente significado que puede tener la expresión de este factor de crecimiento endotelial en función del tamaño tumoral que estemos estudiando.

cols.³¹ observed contradictory results as their series of 56 stage I-II patients, their study showed a statistical correlation between Broders, Anneroth and Bryne with late cervical metastasis. Our series particularly focuses on tumors of less than 4 cm and with no cervical node involvement. In this homogeneous group of patients, our results showed the little value of the different grading systems with regard to disease-free intervals and survival.

Our study did not reveal any statistical correlation between the different parameters used for evaluating histological grading and the course of the disease. However, of all these, mode of invasion had the greatest prognostic importance. Crissman and cols.³ demonstrated in a study based on 77 patients that were treated by means of preoperative radiation therapy and surgery, that the mode of invasion was the only histological factor that could predict survival. The neoplasms that invaded as solid cords had a better prognosis than when invasion was in the form of thin cords. In a study published in 2000 on 122 cases of different tumor sizes, López Pizarro³² showed in a logistic regression analysis how, of the factors analyzed, the pattern of invasion had the greatest metastatic risk.

The prognosis in oral cancer has been related for more than 20 years with different scoring systems with the intention of being predictive. In 1987, Gavilán and cols.³³ published a study on more than 60 factors that could affect the prognosis of carcinomas of the head and neck; in spite of the fact that the study only made use of 11 of the factors analyzed, the study was not useful clinically. Other scoring systems have tried to relate various factors depending on the primary tumor with the risk of neck node involvement. The system that is used most was created by Martínez-Gimeno after analyzing a group of 126 patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and hypopharynx.³⁴ The risk of cervical lymph node metastases was correlated with 7 parameters: T stage, vascular invasion, tumor grading, tumor thickness, tumor-host interphase, inflammatory infiltration and perineural spread. However, despite Yuen and cols.³⁵ pointing out that the predictive value of this system was based on the weight given to the «tumor thickness» parameter, the system has been validated by a recent work of its author.³⁶

Our study did not include a statistical analysis about the importance of tumor thickness in the prognosis of the disease. This transcendence has been demonstrated by previous. In fact, O'Brien and cols.³⁷ suggested in a recent work that elective neck dissection was necessary for tumors with more than a 4 mm thickness. Kurokawa and cols.³⁸ observed that tumors with a thickness >4 mm. and moderately differentiated, were associated with a high rate of cervical metastasis. In a study carried out by Yuen and cols.³⁹ that analyzed various factors traditionally considered as prognostic factors in patients with T1-T2 SSC, tumor thickness was the only predictive factor with regard to recurrence and survival. It should be pointed out the use of tumor thickness for prog-

La combinación de una simple manera aditiva en los sistemas de gradación multifactorial debe considerarse poco lógica. Sin el análisis del peso específico independiente de cada uno de ellos no es posible afrontar el problema de una manera apropiada. Según nuestros resultados, es posible asociar los datos de múltiples parámetros histológicos y producir una puntuación combinada que puede llegar a tener incluso menor valor pronóstico que el de cada uno de los factores aisladamente. En cualquier caso, los estudios sobre factores biológicos y crecimiento tumoral en CEI deben enfocarse hacia el grupo de pacientes con tumores pequeños, en los cuales son mayores las posibilidades de independizar el tratamiento. Los casos con marcadores pronósticos histológicos desfavorables podrían ser candidatos a un tratamiento inicial más agresivo.

Conclusiones

1. La presencia de LI puede considerarse un factor de riesgo en cuanto a la presencia de recidivas a nivel loco-cervical en estadios precoces del CEI.
2. Para poder confirmar una relación entre LI y expresión de VEGF-C resultan precisos más estudios fundamentados en un mayor número de casos, preferiblemente con diferentes tamaños tumorales.
3. La utilidad clínica de los sistemas pronósticos de puntuación en el cáncer oral podría aumentar si se incluyesen factores que consideren el comportamiento biológico tumoral.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a Teresa Alcalá Zamora y Eva García por su asistencia técnica, así como a todos los miembros presentes y pasados del Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial de nuestro Hospital por su labor en el tratamiento y la recopilación de datos correspondientes a los pacientes objeto de nuestro estudio.

Bibliografía

1. Platz H, Fries R, Hudec M, Min Tjoa A, Wagner RR. The prognostic relevance of various factors at the time of the first admission of the patient. Retrospective DOSAK study on carcinoma of the oral cavity. *J Maxillofac Surg* 1983;1:3-12.
2. Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res* 1987;95:229-49.
3. Crissman JD, Liu WY, Gluckman JL, Cummings G. Prognostic value of histopathologic parameters in squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Cancer* 1984;54:2995-3001.
4. Yamamoto E, Miyakawa A, Kohama G. Mode of invasion and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck Surg* 1984;6:938-47.
5. Broders AC. Carcinoma. Grading and practical application. *Arch Pathol* 1926;2:376-81.
6. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1989;18:432-7.

nosis can justify the need for adjuvant therapies but, with regard to indications as to the type of surgery to be carried out, it does not appear to be a useful parameter due to the fact that this measurement can only be obtained reliably if the specimen is completely resected. In our opinion, tumor thickness is not the only factor to be considered. The biological characteristics of the neoplasm should also be taken into account, as well as factors such as lymphangiogenesis or expression of tumor growth factors.

Previous studies, such as those carried out by Dantas and cols.⁴⁰ have showed no correlation between histological scores of malignancy and prognosis in oral carcinoma. The Anneroth classification system showed limited prognostic value in this study, as occurred in ours, but in contradiction to the results of other authors.^{41,42} One of the problems of these classification systems was pointed out by Crissman and cols.³ who highlighted the limited value of variables that were difficult to interpret and exposed to subjectivity such as mitotic count and nuclear atypia. Previous studies by our investigation group have shown the advantages of using parameters less frequently employed such as the expression of epithelial adhesion molecules,⁴³ the presence of lymphatics in the tumor, and even the observation of lymphatic embolization by tumoral cells.¹⁵

Investigations that focus on understanding the biology behind lymph vessels have been enhanced by the discovery of specific lymphatic endothelium markers such as podoplanin, LYVE-1, prox-1 and VEGFR-3.¹²⁻¹⁴ Among these markers we can include PA2.26, a cell-surface protein related to epidermal carcinogenesis and with the cutaneous remodelling process.^{18,44} Previous reports have described a significant correlation between VEGF-C expression, lymphangiogenesis and regional metastases in certain types of tumors.⁴⁵⁻⁴⁸ However, authors such as Beasley and cols.⁴⁹ have indicated that only certain types of neoplasms can use intratumoral lymphatics for developing metastasis. The difference in invasive potential could be due to the production of factors such as metalloproteinases⁵⁰ or vascular endothelial growth factors.⁵¹ The absence of intratumoral lymphatics in neoplasms that develop metastasis via the lymphatics, such as in the case of breast cancer⁵² can reflect the genuine differences between the behavior of different tumors, depending on histological type.

In this study, we analyze the expression of VEGF-C in surgical samples of OSCC cases, using immunohistochemical techniques and correlating these with the presence of intratumoral lymphatics and with the prognosis of the disease. Kishimoto and cols.,⁵³ in a study of 38 patients with early stage oral carcinoma, correlated the expression of VEGF-C with the presence of regional lymph node metastasis. However, a data is specially significant, this correlation could not be established in patients with T3-T4 tumors. These results show that the expression of this endothelial growth factor can have different significance depending on the size of the tumor studied.

7. Yazdi I, Khalili M. Grading of oral cancer: Comparison of different systems with respect to lymph node metastasis in tongue squamous cell carcinoma. *Arch Iranian Med* 1999;2:1-5.
8. Sessions DG, Spector GJ, Lenox J, Haughey B, Chao C, Marks J. Analysis of treatment results for oral tongue cancer. *Laryngoscope* 2002;112:616-25.
9. Hicks WL Jr, North JH Jr, Loree TR, Maamoun S, Mullins A, Orner JB y cols. Surgery as a single modality therapy for squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Am J Otolaryngol* 1998;19:24-8.
10. Preisler HD, Raza A. The role of emerging technologies in the diagnosis and staging of neoplastic diseases. *Cancer* 1992;69:1520-6.
11. Henson DE. Future directions for the American Joint Committee on Cancer. *Cancer* 1992;69:1639-44.
12. Saharinen P, Tammela T, Karkkainen MJ, Alitalo K. Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends Immunol* 2004;25:387-95.
13. Reis-Filho JS, Schmitt FC. Lymphangiogenesis in tumors: what do we know? *Microsc Res Tech* 2003;60:171-80.
14. Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* 2002;2:573-83.
15. Muñoz-Guerra MF, Marazuela EG, Martín-Villar E, Quintanilla M, Gamallo C. Prognostic significance of intratumoral lymphangiogenesis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 2004;100:553-60.
16. Kyzas PA, Geleff S, Batistatou A, Agnantis NJ, Stefanou D. Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2005;206:170-7.
17. Al-Rawi MA, Mansel RE, Jiang WG. Molecular and cellular mechanisms of lymphangiogenesis. *Eur J Surg Oncol* 2005;31:117-21.
18. Scholl FG, Gamallo C, Vilaro S, Quintanilla M. Identification of PA2.26 antigen as a novel cell-surface mucin-type glycoprotein that induces plasma membrane extensions and increased motility in keratinocytes. *J Cell Sci* 1999;112:4601-13.
19. Bundgaard T, Rossen K, Henriksen SD, Charabi S, Sogaard H, Grau C. Histopathologic parameters in the evaluation of T1 squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Head Neck* 2002;24:656-60.
20. Beenken SW, Krontiras H, Maddox WA, Peters GE, Soong S, Urist MM. T1 and T2 squamous cell carcinoma of the oral tongue: prognostic factors and the role of elective lymph node dissection. *Head Neck* 1999;21:124-30.
21. Byers RM, Wolf PF, Ballantyne AJ. Rationale for elective modified neck dissection. *Head Neck Surg* 1988;10:160-7.
22. Kligerman J, Lima RA, Soares JR, Prado L, Dias FL, Freitas EQ y cols. Supraomohyoid neck dissection in the treatment of T1/T2 squamous cell carcinoma of oral cavity. *Am J Surg* 1994;168:391-4.
23. Cade S, Lee ES. Cancer of the tongue: a study based on 653 patients. *Br J Surg* 1957;44:433-46.
24. Jakobsson PA, Eneroth CM, Killander D, Moberger G, Martensson B. Histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. *Acta Radiol Ther Phys Biol* 1973;12:1-8.
25. Anneroth G, Hansen LS, Silverman S Jr. Malignancy grading in oral squamous cell carcinoma. I. Squamous cell carcinoma of the tongue and floor of mouth: histologic grading in the clinical evaluation. *J Oral Pathol* 1986;15:162-8.
26. Arthur JF, Fenner ML. The influence of histological grading on prognosis in carcinoma of the tongue (a computer analysis of 299 cases). *Clin Radiol* 1966; 17:384-96.
27. Bryne M. Prognostic value of various molecular and cellular features in oral squamous cell carcinomas: a review. *J Oral Pathol Med* 1991;20:413-20.
28. Al-Rajhi N, Khafaga Y, El-Husseiny J, Saleem M, Mourad W, Al-Otieschan A, y cols. Early stage carcinoma of oral tongue: prognostic factors for local control and survival. *Oral Oncol* 2000;36:508-14.

The combination of a simple addition method for the multifactorial grading systems should be viewed as not very logical. Without the analysis of the specific independent weight of each valuable the problem cannot be approached properly. According to our results, the data of multiple histological parameters can be associated and a combined score can be reached that can even turn out to have even less prognostic value than each of the factors on their own. Independently, the studies on biological factors and tumor growth in OSSC should be centered on groups of patients with small tumors, as the possibilities of independent treatment are greater. Those cases with unfavorable histological prognosis markers could be candidates for more aggressive treatment initially.

Conclusions

1. *The presence of IL can be considered a risk factor with regard to the presence of relapses at a loco-cervical level in early stage SCC of the oral cavity.*
2. *In order to confirm a link between IL and the expression of VEGF-C more studies are necessary based on a larger number of cases, preferably with different tumor sizes.*
3. *The clinical usefulness of these prognostic systems in oral cancer increases if factors are included that take into account the biological behavior of the tumor.*

Acknowledgements

The authors would like to thank Teresa Alcalá Zamora and Eva García for their technical assistance, as well as all the present and past members of the Department of Oral and Maxillofacial Surgery of our Hospital for their assistance in tabulating and compiling the data corresponding to the patients included in our study.

29. Umeda M, Yokoo S, Take Y, Omori A, Nakanishi K, Shimada K. Lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlation between histologic features and the prevalence of metastasis. *Head Neck* 1992;14:263-72.
30. Okamoto M, Nishimine M, Kishi M, Kirita T, Sugimura M, Nakamura M, y cols. Prediction of delayed neck metastasis in patients with stage I/II squamous cell carcinoma of the tongue. *J Oral Pathol Med* 2002;31:227-33.
31. Lim SC, Zhang S, Ishii G, Endoh Y, Kodama K, Miyamoto S, y cols. Predictive markers for late cervical metastasis in stage I and II invasive squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Clin Cancer Res* 2004;10:166-72.
32. Lopez Pizarro VM. Factores pronósticos de las metástasis linfáticas cervicales del carcinoma epidermoide de cavidad oral. Análisis de regresión logística. *Rev Esp Cirug Oral y Maxilofac* 2000;24:161-70.
33. Gavilan J, Gavilan C, Manos-Pujol M, Herranz J. Discriminant analysis in predicting survival of patients with cancer of the larynx or hypopharynx. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1987;12:331-5.
34. Martinez-Gimeno C, Rodriguez EM, Vila CN, Varela CL. Squamous cell carcinoma of the oral cavity: a clinicopathologic scoring system for evaluating risk of cervical lymph node metastasis. *Laryngoscope* 1995;105:728-33.
35. Yuen AP, Lam KY, Wei WI, Lam KY, Ho CM, Chow TL, y cols. A comparison of the prognostic significance of tumor diameter, length, width, thickness, area, volume, and clinicopathological features of oral tongue carcinoma. *Am J Surg* 2000;180:139-43.
36. Martinez-Gimeno C, Molinero AP, Castro V, Sastre MJ, Castro EE, Aguirre-Jaime A. Prospective validation of the Martinez-Gimeno clinicopathologic scoring system (MGSS) for evaluating risk of cervical lymph node metastases of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck* 2005;27:320-5.
37. O'Brien CJ, Lauer CS, Fredricks S, Clifford AR, McNeil EB, Bagia JS, y cols. Tumor thickness influences prognosis of T1 and T2 oral cavity cancer--but what thickness? *Head Neck* 2003;25:937-45.
38. Kurokawa H, Yamashita Y, Takeda S, Zhang M, Fukuyama H, Takahashi T. Risk factors for late cervical lymph node metastases in patients with stage I or II carcinoma of the tongue. *Head Neck* 2002;24:731-6.
39. Po Wing Yuen A, Lam KY, Lam LK, Ho CM, Wong A, Chow TL, y cols. Prognostic factors of clinically stage I and II oral tongue carcinoma-A comparative study of stage, thickness, shape, growth pattern, invasive front malignancy grading, Martinez-Gimeno score, and pathologic features. *Head Neck* 2002;24:513-20.
40. Dantas DD, Ramos CC, Costa AL, Souza LB, Pinto LP. Clinical-pathological parameters in squamous cell carcinoma of the tongue. *Braz Dent J* 2003;14:22-5.
41. Holm LE, Lundquist PG, Silfversward C, Sobin A. Histological grading of malignancy in squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Acta Otolaryngol* 1982;94:185-92.
42. Odell EW, Jani P, Sherriff M, Ahluwalia SM, Hibbert J, Levison DA, y cols. The prognostic value of individual histologic grading parameters in small lingual squamous cell carcinomas. The importance of the pattern of invasion. *Cancer* 1994;74:789-94.
43. Muñoz-Guerra MF, Marazuela EG, Fernandez-Contreras ME, Gamallo C. P-cadherin expression reduced in squamous cell carcinoma of the oral cavity: an indicator of poor prognosis. *Cancer* 2005;103:960-9.
44. Scholl FG, Gamallo C, Quintanilla M. Ectopic expression of PA2.26 antigen in epidermal keratinocytes leads to destabilization of adherens junctions and malignant progression. *Lab Invest* 2000;80:1749-59.
45. Tsurusaki T, Kanda S, Sakai H, Kanetake H, Saito Y, Alitalo K, y cols. Vascular endothelial growth factor-C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis. *Br J Cancer* 1999;80:309-13.
46. Akagi K, Ikeda Y, Miyazaki M, Abe T, Kinoshita J, Maehara Y, y cols. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in human colorectal cancer tissues. *Br J Cancer* 2000;83:887-91.
47. Hashimoto I, Kodama J, Seki N, Hongo A, Yoshinouchi M, Okuda H, y cols. Vascular endothelial growth factor-C expression and its relationship to pelvic lymph node status in invasive cervical cancer. *Br J Cancer* 2001;85:93-7.
48. Kitadai Y, Amioka T, Haruma K, Tanaka S, Yoshihara M, Sumii K, y cols. Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C in human esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2001;93:662-6.
49. Beasley NJ, Prevo R, Banerji S, Leek RD, Moore J, van Trappen P, y cols. Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Res* 2002;62:1315-20.
50. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, y cols. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000;2:737-44.
51. Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;237:97-132.
52. Williams CS, Leek RD, Robson AM, Banerji S, Prevo R, Harris AL, y cols. Absence of lymphangiogenesis and intratumoural lymph vessels in human metastatic breast cancer. *J Pathol* 2003;200:195-206.
53. Kishimoto K, Sasaki A, Yoshihama Y, Mese H, Tsukamoto G, Matsuura T. Expression of vascular endothelial growth factor-C predicts regional lymph node metastasis in early oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2003;39:391-6.