

## Carcinoma oral de células escamosas. Parámetros citométricos de interés pronóstico

### *Oral squamous cell carcinoma. Cytometric parameters of prognostic interest*

Ramón Saiz Bustillo <sup>(1)</sup>, Guadalupe Corchero Martín <sup>(2)</sup>, Belén García-Montesinos Perea <sup>(3)</sup>, Tomás Gonzalez Terán <sup>(2)</sup>, Sergio Sánchez Santolino <sup>(2)</sup>

(1) Jefe de Servicio del Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial

(2) Médico Residente del Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial

(3) Médico Adjunto del Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander). Universidad de Cantabria

*Correspondencia / Address:*

*Dr. Ramón Saiz Bustillo*

*Hospital Universitario Marqués de Valdecilla :*

*Avd. Valdecilla s/n C.P.39008*

*Tel.:942202528 - Fax:942202726*

*E-mail: guacorch@yahoo.es*

Recibido / *Received:* 25-01-2004 Aceptado / *Accepted:* 19-02-2005

#### **Indexed in:**

-Index Medicus / MEDLINE / PubMed

-EMBASE, Excerpta Medica

-Índice Médico Español

-IBECs

Saiz-Bustillo R, Corchero-Martín G, García-Montesinos-Perea B, Gonzalez-Terán T, Sánchez-Santolino S. Oral squamous cell carcinoma, cytometric parameters of prognostic interest. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005;10:462-7.  
© Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - ISSN 1698-4447

### RESUMEN

**Objetivos:** el presente estudio se realizó para encontrar posibles factores pronósticos del Carcinoma oral de células escamosas puesto que es una enfermedad frecuente (3-4% de los tumores malignos) que origina una gran morbilidad y mortalidad y que justifica cualquier intento que trate de aportar algo para conocer mejor esta patología. **Diseño del estudio:** hemos realizado un estudio sobre 81 carcinomas orales de células escamosas extraídos del archivo del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander), tratados con el mismo procedimiento, de los cuales en 67 de ellos se realizó citometría de flujo.

**Resultados:** No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre el índice de proliferación celular y el índice mitótico, la ploidía y la fase S. Así mismo ninguna de las variables citométricas estudiadas ha presentado relación con la aparición de recidiva loco-regional, metástasis a distancia ni con la supervivencia.

**Conclusiones:** no podemos utilizar éstas variables como factor pronóstico en el carcinoma de células escamosas de la cavidad oral.

**Palabras clave:** Carcinoma oral de células escamosas, citometría de flujo.

### INTRODUCCION

Aproximadamente un 3% de los tumores malignos se origina en la cavidad oral. La mayoría corresponden a carcinomas de células escamosas, y un pequeño porcentaje a tumores malignos de glándulas salivares, enfermedades linforeticulares, tumores óseos, melanomas, sarcomas, tumores malignos odontogénicos y metástasis de tumores de otras localizaciones (1).

El pronóstico (2) de los pacientes con esta patología depende tanto del tamaño, infiltración y localización de la lesión, pre-

### SUMMARY

**Objectives:** the present study was made in order to find possible prognostic factors in oral squamous cell carcinoma, given that it is a frequent disease (3-4% of all malignant tumors) and is the cause of a high morbidity and mortality which justifies any attempt to contribute something towards the understanding of this pathology.

**Study design:** 81 oral squamous cell carcinomas, treated with the same procedure, and retrieved from the archive of the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander) were studied. Flow cytometry was carried out on 67 of the samples.

**Results:** no statistically significant differences were found between the cellular proliferative index and the mitotic index, ploidy and the S-phase factor. Likewise, none of the cytometric variables studied presented any association with the appearance of local relapse, distant metastases or survival.

**Conclusions:** these variables cannot be used as a prognostic factors in squamous cell carcinomas of the oral cavity.

**Keywords:** Oral squamous cell carcinoma, flow cytometry.

### INTRODUCTION

Approximately 3% of malignant tumors originate in the oral cavity. The majority of which correspond to squamous cell carcinomas, and a small percentage to malignant tumors of the salivary glands, lymphoreticular diseases, bone tumors, melanomas, sarcomas, malignant odontogenic tumors and metastases from other locations (1).

The prognosis for patients with this pathology depends on the size, infiltration and location of the lesion, presence or absence of metastatic spread, and to a certain degree the differentiation of the tumor (2). Tumor ploidy, measured through flow cyto-

sencia o ausencia de extensión metastásica y en cierto grado de la diferenciación del tumor. Otra variable predictora del pronóstico parece ser la ploidía tumoral, capaz de ser medida mediante Citometría de flujo, que es una técnica que combina los conocimientos adquiridos de la microespectrofotometría, la producción de anticuerpos monoclonales (3-6), el desarrollo de los fluorocromos y el procesamiento computarizado de datos, y los utiliza para conocer una serie de parámetros celulares. Surge como un método de medir, de forma objetiva y automatizada, parámetros celulares y de esta forma ayudar al diagnóstico tumoral midiendo el contenido de ADN y por lo tanto reflejando anomalías cromosómicas (7-9), siendo la aneuploidía (10) un parámetro de gran especificidad y sensibilidad. También relaciona el contenido de ADN con el pronóstico (12-18), de forma que un índice de ADN (contenido de ADN de células tumorales en fase G1/contenido de ADN de células euploides en fase G1) distinto de 1 se acompaña de peor pronóstico. Así mismo se podría aplicar esta técnica en la forma de tratar los pacientes ya que en el caso de la quimioterapia y la radioterapia, las alteraciones del ciclo celular que producen se pueden relacionar con la respuesta al tratamiento (19).

## MATERIAL Y METODOS

Se han utilizado para este estudio 81 casos diagnosticados de carcinoma oral de células escamosas, excluyendo el cáncer de labio, en el Departamento de Cirugía Maxilofacial del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander), tratados con intención curativa con cirugía y radioterapia. En 67 casos se realizó citometría de flujo, excluyéndose los 14 restantes por no disponer de suficiente material histológico del tumor y/o por presentar un coeficiente de variación mayor de 10.

De todos los casos se dispuso de la pieza de resección tumoral, de la cual se tomaron muestras representativas que fueron fijadas en formol e incluidas en parafina. Se procesaron todos los ganglios aislados de la pieza de resección. Con las secciones rutinarias teñidas con hematoxilina-eosina se tipificaron todos los tumores. Con los datos macro y microscópicos se determinó la clasificación TNM, estableciéndose el estadio patológico. Para citometría de flujo se tiñó el material según el método descrito por Vindelov y Christensen (11). Se utilizó el citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson), equipado con láser de argón (488-518 nm), con software Cellfit Cell-cycle Analysis version 2.0.2.

Las variables citométricas analizadas fueron el índice de ADN, la ploidía, la fracción de la fase S, el índice de proliferación y el coeficiente de variación del pico G0/G1.

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante el programa estadístico SPSS (Release 5.0.2, 1993):

Estadística Descriptiva: media, desviación estándar y valores máximos y mínimos para las variables cuantitativas, y frecuencias y porcentajes para las cualitativas.

Estadística Inferencial: se han utilizado la prueba de T de student, análisis de la varianza (ANOVA), coeficiente de correlación de Spearman, test de contraste de proporciones, tablas de contingencia según la distribución de chi-2 y test exacto de Fisher.

Análisis de la supervivencia: según el modelo no paramétrico

metry, seems to be another prognostic variable. The technique combines knowledge acquired from microspectrophotometry, the production of monoclonal antibodies (3-6), the development of fluorochromes and computer data processing, which are used to establish a series of cellular parameters. It is an objective and automated method for measuring cellular parameters and thus helps in tumor diagnosis, measuring the DNA content and therefore reflecting chromosomal anomalies (7-9), aneuploidy (10) being a highly sensitive and specific parameter. The DNA content also relates to the prognosis (12-18), in such a way that a DNA index (DNA content of G1 phase tumor cells/DNA content of G1 phase euploid cells) other than 1 is accompanied by a worse prognosis. Likewise, this technique can be applied to the treatment of patients, since in chemotherapy and radiotherapy the response to treatment can be related to the alterations produced in the cell cycle (19).

## MATERIAL AND METHODS

For the study, 81 diagnosed cases of OSCC, obtained from the Departamento de Cirugía Maxilofacial del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander), treated curatively with surgery and radiotherapy, and excluding cancer of the lip, were used. Flow cytometry was carried out in 67 cases, the remaining 14 were excluded for having insufficient histological tumor material available, and/or for presenting a variation coefficient higher than 10.

In all cases the resected tumor sample was available, from which representative samples were taken, fixed in formol and embedded in paraffin. All the lymph nodes isolated from the surgical specimen were processed. Sections stained with hematoxylin-eosin were used to typify the tumors. From the macro and microscopic data the TNM classification was determined, establishing the pathological stage. For the flow cytometry, the material was stained in accordance with the method described by Vindelov and Christensen (11). The FACScan flow cytometer (Becton Dickinson), equipped with an argon laser (488-518 nm) was used, with the Cellfit Celcycle Analysis software version 2.0.2.

The cytometric variables analyzed were: the DNA index, ploidy, S-phase fraction, the proliferative index, and the G0/G1 peak variation coefficient.

The statistical analysis of the data was made using the SPSS statistical package (release 5.0.2, 1993):

Descriptive statistics: mean, standard deviation and maximum and minimum values for the quantitative variables, and frequencies and percentages for the qualitative.

Inferential statistics: using the Student's *t* test, analysis of variance (ANOVA), Spearman rank correlation coefficient, proportional contrast test, contingency tables according to the chi-square distribution and the Fisher Exact test.

Survival analysis: following the nonparametric Kaplan-Meier model and log rank test.

Multivariate analysis: cox multiple regression analysis.

de Kaplan-Meier y la prueba de log-rank.

Análisis multivariante : mediante el análisis de regresión múltiple de Cox.

## RESULTADOS

### *Categoría clonal :*

De los 67 casos analizados , 49 ( 73,13% sobre el total ) fueron diploides y 18 ( 26,86 % ) aneuploides . De los diploides , 3 fueron peridiploides ; y de los aneuploides , 16 fueron hiperdiploides y 2 tetraploides . No se encontraron diferencias significativas en la distribución de pacientes en función de la edad y sexo respecto a la categoría clonal . Tampoco en relación a la presencia o ausencia de afectación ganglionar ni en cuanto al valor medio del índice mitótico en tumores diploides o aneuploides , ni respecto al tamaño de la tumoración o categoría T.

### *Índice de proliferación celular :*

El índice de proliferación celular medio en el total de casos ha sido de  $14,99 \pm 8,87$  , con unos valores extremos entre 4,3 y 39,2. No existen diferencias significativas entre el índice de proliferación celular y la edad , sexo , localización de la lesión o categorías T o N , aunque se agrupe este índice en dos categorías, menos del 25% y más del 25%.

En caso de un índice mitótico menor de 10, el índice de proliferación celular fue de 12,638 ( 7,216, d.t. ) ; mientras que en caso de tumores con índice mitótico igual o superior a 10 fue de 17,744 ( 10,140 , d.t. ) , con  $p < 0,05$  y  $t = 2,1211$ .

En relación a la categoría clonal , los tumores diploides presentan predominantemente un índice de proliferación celular inferior a 25% ( 95,65% de tumores diploides ) , al contrario que los aneuploides , en los que existe con mayor frecuencia un índice de proliferación mayor de 25%, con  $p < 0,001$  y  $\chi^2 = 19,2212$ .

### *Fase S :*

La fase S media en los tumores estudiados fue de  $11,67\% \pm 8,15\%$  , con unos valores extremos de 3,4 y 38,4 . Agrupando el porcentaje de células en fase S en clases hemos podido observar cómo la mayor frecuencia de casos correspondió a un porcentaje de fase S entre el 5 y 10%.

No encontramos diferencias en la fase S en relación a la edad del paciente , sexo , localización tumoral o categorías T o N.

El índice mitótico medio en los tumores con una fase S menor de 20 fue de 10,708 ( 9,293 d.t. ) , mientras que en los tumores con una fase S igual o mayor de 20 fue de 16,860 ( 13,035 d.t. ) , sin ser estas diferencias significativas.

En el caso de categoría clonal , sí encontramos diferencias significativas entre la fase S de los tumores diploides y aneuploides , con  $p < 0,001$  y  $\chi^2 = 24,16$  , de forma que los diploides presentan una fase S menor de 20 en un 95,65% de los casos , mientras que en los aneuploides la fase S es mayor de 20 en un 72,72% . La fase S media en los tumores diploides ha sido de  $8,77\% \pm 4,86$  , mientras que en los aneuploides ha sido de  $23,8\% \pm 8,11$  , con  $p < 0,001$  y  $t = 5,8939$  . De igual forma , los tumores con una fracción de fase S menor de 20 presentan exclusivamente un índice de proliferación celular menor al 25%, mientras que los tumores con un índice de proliferación celular superior al 25% presentan en el 100% de lo casos una fracción

## RESULTS

### *Clonal category:*

Forty-nine of the 67 cases analyzed (73.13%) were diploid, and 18 (26.86%) aneuploid. Of the diploid, 3 were peridiploid; and of the aneuploid, 16 were hyperdiploid and 2 tetraploid. No significant differences were found in the distribution of patients with respect to age, sex, presence or absence of lymph node involvement, or with respect to the average value for the mitotic index in diploid or aneuploid tumors, or with respect to the tumor size or T category.

### *Cellular proliferative index:*

The mean cellular proliferative index for the total of cases was  $14.99 \pm 8.87$ , with maximum and minimum values of 4.3 and 39.2 respectively. There were no significant differences between the cellular proliferative index and age, sex, location of the lesion, or T or N categories, although this index was grouped into two categories, less than 25% and more than 25%.

Where the mitotic index was less than 10, the cellular proliferative index was 12.638 (7.216, d.t.); while for tumors with a mitotic index equal to or greater than 10 it was 17.744 (10.140, d.t.), with  $p < 0.05$  and  $T = 2.1211$ .

With respect to the clonal category, the majority of diploid tumors presented a cellular proliferative index of less than 25% (95.65% of diploid tumors), in contrast to the aneuploid, in which a proliferative index greater than 25% was more frequent, ( $p < 0.001$  and  $\chi^2 = 19.2212$ ).

### *S-phase:*

The mean S-phase fraction (SPF) in the tumors studied was  $11.67\% \pm 8.15\%$ , with maximum and minimum values of 3.4% and 38.4% respectively. Grouping the percentage of cells in S-phase into classes it was observed that most cases corresponded to an SPF between 5 and 10%.

No differences in the SPF were found in relation to the age or sex of the patient, tumor location, or T or N categories.

The mean mitotic index in those tumors with an SPF of less than 20 was 10.708 (9.293 d.t.), while in tumors with an SPF equal to or greater than 20 it was 16.860 (13.035 d.t.), these differences were not significant.

Significant differences were found in the clonal category between the S-phase of diploid and aneuploid tumors, ( $p < 0.001$  and  $\chi^2 = 24.16$ ), in such a way that the diploids presented an SPF of less than 20 in 95.65% of cases, while in the aneuploids the SPF was greater than 20 in 72.72% of cases. The mean SPF in the diploid tumors was  $8.77\% \pm 4.86$ , while in the aneuploids this was  $23.8\% \pm 8.11$ , ( $p < 0.001$  and  $T = 5.8939$ ). Likewise, those tumors with an SPF of less than 20 exclusively present a cellular proliferative index of less than 25, while the tumors with a cellular proliferative index greater than 25% present an elevated SPF in 100% of cases, ( $p < 0.001$  and  $\chi^2 = 43.6905$ ). The average percentage of S-phase cells in those tumors with a cellular proliferative index of less than 25% was  $8.78\% \pm 4.43$ , while in those cases with a proliferative index of greater than 25% this percentage of S-phase cells was  $27.1\% \pm 5.67$ , ( $p < 0.001$  and  $T = 10.8704$ ).

S elevada, con  $p < 0,001$  y  $\chi^2 = 43,6905$ . El porcentaje medio de células en fase S en los tumores con un índice de proliferación celular menor de 25% fue de  $8,78 \pm 4,43$ , mientras que en aquellos casos con un índice de proliferación superior al 25% este porcentaje de células en fase S fue de  $27,1 \pm 5,67$ , con  $p < 0,001$  y  $t = 10,8704$ .

Ninguna de las variables citométricas estudiadas ha presentado relación ni con la aparición de recidiva loco-regional ni con la posterior aparición de metástasis a distancia ni con la supervivencia.

## DISCUSION

El estudio de factores pronósticos en procesos oncológicos tiene gran interés porque permite conocer la historia natural de la enfermedad, posibilita la formación de grupos homogéneos de pacientes en ensayos clínicos y facilita el diseño de ensayos clínicos selectivos. Además explora posibles interacciones entre las variables pronósticas y el tratamiento y permite predecir el pronóstico de los pacientes y explicar las variaciones detectadas en la supervivencia entre grupos. De esta forma, influye en la estrategia terapéutica, mejora la estratificación de los pacientes en estudios aleatorizados y posibilita la comparación de resultados.

En nuestro estudio la citometría de flujo no ha sido una técnica de la que hallamos obtenido unos resultados que nos permitan afirmar que tiene un valor pronóstico fiable, aunque algunos datos tengan cierta significación. Al relacionar la supervivencia con los parámetros obtenidos por citometría de flujo, no hemos encontrado ninguno que aporte datos significativos.

Los resultados obtenidos mediante citometría de flujo son orientativos, pero distan mucho de lo que deberían ser unos datos que nos permitan afirmar que sea una técnica con la que podamos determinar ciertamente cuál es la capacidad agresiva de un carcinoma epidermoide de cavidad oral.

Dependiendo de la localización y extensión del tumor primario y el estado de los ganglios linfáticos, el tratamiento del cáncer de cavidad oral puede ser solamente quirúrgico, exclusivamente mediante radioterapia, o con una combinación de ambas (20,21). La amplia discrepancia en cuanto al tipo de tratamiento de los tumores de cavidad oral viene expresada en el gran número de protocolos terapéuticos existentes, lo que obliga a una continua necesidad de búsqueda de variables predictoras de su comportamiento.

En tumores de laringe en su localización supraglótica (22) la afectación ganglionar viene asociada a variables como el grado de diferenciación (Broders), con una mayor incidencia de afectación ganglionar en tumores poco diferenciados. Otras variables como el patrón expansivo o la presencia de un infiltrado linfoplasmocitario peritumoral se relacionan con la ausencia de metástasis ganglionares. La presencia de necrosis tumoral, por el contrario, se relaciona a la aparición de ganglios afectados. La reacción estromal y el grado citológico no serían, para estos autores, parámetros útiles en identificar la aparición de afectación ganglionar.

Coincidiendo con estos autores, la existencia de afectación ganglionar, en nuestro caso, se ha encontrado en tumores con importante extensión local, pobremente diferenciados, con in-

None of the cytometric variables studied presented any relationship with the appearance of local relapse, the later appearance of distant metastasis, or with survival.

## DISCUSSION

The study of prognostic factors in oncologic processes is of great interest because it allows us to know the natural history of the disease, makes it possible to form homogenous groups of patients in clinical trials, and facilitates the design of selective clinical trials. Furthermore, it explores possible interactions between the prognostic variables and the treatment, and allows the prediction of prognosis in patients and can help to explain the variations detected in the survival between groups. In this way, it influences the therapeutic strategy, improves the stratification of patients in random studies and makes the comparison of results possible.

From the results obtained in our study, we cannot confirm that flow cytometry is a technique with any reliable prognostic value, although some data have certain significance. On relating survival with the parameters obtained by flow cytometry, we have not found any that provide significant data.

The results obtained by flow cytometry serve as a guide, but are insufficient for us to confirm that this technique can be used to determine, with certainty, the aggressive capacity of an epidermoid carcinoma in the oral cavity.

Depending on the location and extension of the primary tumor and the condition of the lymph nodes, treatment of cancer of the oral cavity maybe only surgical, exclusively through radiotherapy, or a combination of both (20, 21).

The wide discrepancy with regard to the type of treatment for tumors of the oral cavity is expressed by the large number of existing therapeutic protocols, which necessitates the continued search for predictive variables of its behavior.

In supraglottic laryngeal carcinoma (22) the lymph node involvement is associated to variables such as the grade of differentiation (Broders), with a higher incidence of lymph node involvement in undifferentiated tumors. Other variables such as the broad pattern or the presence of a peri-tumoral lymphoplasmacytic infiltrate are related with the absence of lymph node metastasis. The presence of tumor necrosis, on the other hand, is related to the appearance of affected lymph nodes. The stromal reaction and the cytologic grade would not, for these authors, be useful parameters in identifying the appearance of lymph node involvement.

Coinciding with these authors, the existence of lymph node involvement, in our case, has been found in tumors with significant local extension, poorly differentiated, with absent or light inflammatory tumor infiltrate, or the presence of tumor necrosis.

The prognostic value with regard to survival and the disease-free interval of the stromal inflammatory reaction and the vascular space invasion has been demonstrated in tumors of the cervix (23). In this study, the stromal reaction presented as an independent prognostic variable. An intense stromal reaction is related to a lesser lymph node involvement and to a lower recurrence, being more intense in microinvasive tumors. The



filtrado inflamatorio tumoral ausente o ligero, o presencia de necrosis tumoral.

El valor pronóstico en cuanto a supervivencia y a intervalo libre de enfermedad de la reacción estromal inflamatoria y la invasión del espacio vascular se ha demostrado en tumores de cervix (23). En este estudio, la reacción estromal se presenta como variable pronóstica independiente. Una reacción estromal intensa se relaciona a una menor afectación ganglionar y a una menor recurrencia, siendo más intensa en tumores microinvasivos.

El grado de reacción estromal, en cuanto a tipo de infiltrado, cantidad de éste y necrosis, no se ha relacionado con la supervivencia en tumores de cabeza y cuello en el área orofacial (24). Así, en tumores como el de labio, la composición celular y la intensidad de la reacción estromal tampoco han presentado valor pronóstico.

En los últimos años se han multiplicado los esfuerzos por relacionar el análisis del contenido de ADN y el pronóstico en diversos tumores sólidos.

La esencia del análisis de ADN es la medición del contenido de ADN en gran número de células individuales y la construcción de un histograma representando la distribución, dentro del estudio, de la población celular.

Existen diversos hechos a nivel molecular que determinan el comportamiento de un tumor. La identificación de variables cuantificables a nivel molecular que directa o indirectamente condicionan la biología tumoral puede ayudar al clínico a determinar el estado de riesgo de un paciente y así seleccionar las opciones de tratamiento.

La aneuploidía implica la presencia de una cantidad anormal de material genético y conlleva un pronóstico poco favorable a medida que el índice de ADN aumenta.

Estudios citométricos realizados en tumores de pene señalan como un índice alto de ADN puede indicar un riesgo aumentado de desarrollar progresión de la enfermedad, y de esta forma, estos pacientes serían candidatos a tratamientos más agresivos (25). La mayoría de los tumores tienen poblaciones celulares aneuploides y aquellos que no superan en mucho la banda diploide tienen mejor pronóstico.

Autores como Janot y colaboradores (26) no han encontrado en la citometría de flujo significación en cuanto el pronóstico en tumores de cabeza y cuello.

En tumores como los de glándula salivar mayor, la aneuploidía se relaciona a márgenes poco definidos por resonancia magnética nuclear, y con un peor pronóstico (27).

Aunque la relación entre ploidía y recurrencia de la enfermedad y la supervivencia no ha sido definitivamente demostrada, en citometría de flujo, una fase S elevada indica una mayor probabilidad de recurrencia en tumores diploides, principalmente en fases tempranas de la enfermedad.

En tumores de mucosa bucal en fases tempranas (tumores T1 y T2), la aneuploidía es el mayor predictor de la agresividad biológica del tumor, por lo que su presencia indicaría la necesidad de una mayor agresividad terapéutica. En estos tumores de mucosa bucal la presencia de aneuploidía conlleva unos índices de recurrencia del 70 %, mientras que en los diploides es próxima al 5 %.

Se ha observado en neoplasias en la región cervical tratadas

grade of stromal reaction, with respect to the type of infiltrate, its quantity and necrosis, has not been related to survival in tumors of the head and neck in the orofacial area (24). Likewise, in tumors such as that of the lip, the cellular composition and the intensity of the stromal reaction have not presented any prognostic value either.

In recent years efforts have increased to relate the analysis of the DNA content and the prognosis in the various solid tumors.

The essence of DNA analysis is the measuring of the DNA content in a large number of individual cells and the construction of a histogram representing the distribution, within the study, of the cell population.

At the molecular level, various factors determine the behavior of a tumor. The identification of quantifiable variables at this level, which directly or indirectly condition the tumor biology, could help the clinician to determine the state of risk of a patient and thereby select the best therapeutic options.

Aneuploidy implies the presence of an abnormal quantity of genetic material and carries a more unfavorable prognosis as the DNA index increases.

Cytometric studies carried out on tumors of the penis indicate that a high DNA index can indicate an increased risk of progression of the disease, so these patients would therefore be candidates for a more aggressive treatment (25).

The majority of tumors have aneuploid cellular populations and those that are only slightly hyperdiploid have a better prognosis.

Authors such as Janot et al. (26) have not found any significance in flow cytometry with regard to prognosis in tumors of the head and neck.

In tumors such as those of the major salivary glands, aneuploidy is related to ill-defined margins by nuclear magnetic resonance, and with a worse prognosis (27).

Although the relationship between ploidy, the recurrence of disease and survival has not been definitively demonstrated, in flow cytometry, an elevated S-phase fraction indicates an increased probability of recurrence in diploid tumors, principally in the early stages of the disease.

In early-stage tumors of the buccal mucosa, (T1 and T2 tumors), aneuploidy is the major predictor for the biological aggressive behavior of the tumor; its presence would indicate the necessity for a more aggressive treatment. In these tumors of the buccal mucosa the presence of aneuploidy indicates a recurrence of 70%, while in the diploids it is approximately 5%.

It has been observed in cervical neoplasias previously treated with radiotherapy that the aneuploid tumors are more sensitive to treatment (28).

The relationship between the S-phase fraction and prognosis has been observed in sarcomas, in such a way that an increased SPF is associated with a worse prognosis (29), although not in tumors such as that of cancer of the esophagus.

previamente con radioterapia que las poblaciones aneuploides son más sensibles a la terapéutica (28).

La relación entre la fase S y el pronóstico ha sido observada en sarcomas, de forma que una fase S elevada se asocia a un peor pronóstico (29), aunque no en tumores como el cáncer de esófago.

## BIBLIOGRAFIA/REFERENCES

1. Epstein Joel B, Zhang Lewei, Rosin Miriam. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. *J Can Dent Assoc* 2002;68:617-21.
2. Esteban F, Gonzalez MA, Ruiz. Gradación histopatológica de la malignidad y pronóstico del cáncer de cabeza y cuello. *Med Oral* 1998;3:148-62.
3. Atkin NB, Kay R. Prognostic significance of modal DNA value and other factors in malignant tumors based on 1465 cases. *Br J Cancer* 1979;40:210-21.
4. Lipford EH, Eggleston JC, Sears DL. Prognostic factors in surgically resected limited stage, non-small-cell carcinoma of the lung. *Am J Surg Pathol* 1984;8:357-65.
5. Janot F, Klijanienko J, Russo A. Prognostic value of clinicopathological parameters in head and neck squamous cell carcinoma: a prospective analysis. *Br J Cancer* 1996;73:531-8.
6. Mendez Eduardo, Cheng Chun, Farwell D Gregory, Ricks Sherianne, Agoff S. Nicholas, Futran Neal D, et al. Transcriptional expression profiles of oral squamous cell carcinomas. *Cancer* 2002;95:1482-94.
7. Berrocal A, González Barón M, Barón JM. Aplicaciones de la citometría de flujo en oncología. *Oncología* 1991;14:279-88.
8. Koss LG, Grenebaum E. Measuring DNA in human cancer. *JAMA* 1986;225:3158-9.
9. Pfitzer P, Pape HD. Characterization of tumor cell populations by DNA-measurements. *Acta Cytol* 1973;17:19-26.
10. Friedlander ML, Hedley DW, Taylor IW. Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumors. *J Clin Pathol* 1984;37:961-74.
11. Vindelov LL, Christensen IS. Some methods and applications of flow cytometric DNA analysis in clinical and experimental oncology. *Eur J Haematol* 1989;42:69-76.
12. Frost AR, Karcher DS, Terahata S. DNA analysis and S-phase fraction determination by flow cytometric analysis of infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Mod Pathol* 1996;9:930-7.
13. Mishra RC, Mohanty S. Study of tumour ploidy in early stages of buccal mucosa cancer. *Eur J Surg Oncol* 1996;22:58-60.
14. Yu JM, Zhang H, Wang SR. DNA ploidy analysis of effectiveness of radiation therapy for cervical carcinoma. *Cancer* 1991;68:76-8.
15. Ten Velde GPM, Schutte B, Vermeulen A. Flow cytometric analysis of DNA ploidy level in paraffin-embedded tissue of non-small-cell lung cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988;24:455-60.
16. Joensuu H, Kallioniemi O. Different opinions on classification of DNA histograms produced from paraffin-embedded tissue. *Cytometry* 1989;10:711-7.
17. Xi S, Grandis J.R. Gene therapy for treatment of oral squamous cell carcinoma. *J Dent Res* 2003;82:11-6.
18. Ghosh Surna, Mushi Hidayatullah G, Sen Ratna, Linz McGillem Laura A, Goldman Robert D, Lorch Jochen et al. Loss of adhesion regulated proteinase production is correlated with invasive activity in oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 2002; 95:2524-33.
19. Cruz I, Snijders P, Van Houten V, Vosjan M, Van der Waal I, Meijer C. Specific p53 immunostaining patterns are associated with smoking habits in patients with oral squamous cell carcinomas. *J Clin Pathol* 2002;55:834-40.
20. De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer: Principles and practice of oncology*. Philadelphia: JB Lippincott; 1989. p.450-551.
21. Million RR, Cassisi NJ, eds. *Management of Head and Neck Cancer: a Multidisciplinary Approach*. Philadelphia: Lippincott; 1994. p.1167-500.
22. Giannini A, Ninu MB, Gallina E. Parametri istopatologici e metastatizzazione linfonodale nel carcinoma laringeo sopraglottico. *Patológica* 1991;83:167-75.
23. Kainz C, Kohlberger P, Sliutz G. Vascular space invasion and inflammatory stromal reaction as prognostic factors in patients with surgically treated cervical cancer stage IB to IIB. *Gynecol Oncol* 1995;57:383-7.
24. Pastrnak A, Jansa P, Podstata J. Attempt at the evaluation of stromal reactions in orofacial tumors. *Cesk Patol* 1979;15:85-90.
25. Hoofnagle RF, Kandzari S, Lamm DL. Deoxyribonucleic acid flow cytometry of squamous cell carcinoma of penis. *W V Med J* 1996;92:271-3.
26. Janot F, Klijanienko J, Russ A. Prognostic value of clinicopathological parameters in head and neck squamous cell carcinoma: a prospective analysis. *Br J Cancer* 1996;73:531-8.
27. Takashima S, Sone S, Horii A. Major salivary gland lesions: correlation of MR findings with flow cytometric DNA analysis and prognosis. *AJR Am J Roentgenol* 1996;65:1297-304.
28. Yu JM, Zhang H, Wang SR. DNA ploidy analysis of effectiveness of radiation therapy for cervical carcinoma. *Cancer* 1991;68:76-8.
29. Gustafson P, Ferno M, Akerman M. Flow cytometric S-phase fraction in soft tissue sarcoma: prognostic importance analysed in 160 patients. *Br J Cancer* 1997;75:94-100.