

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Relevancia clínico-patológica del Tumor Budding en el frente  
de invasión tumoral en los estadios clínicos iniciales de  
carcinoma escamoso de lengua oral. Análisis histológico e  
inmunohistoquímico**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Samuel Espías Alonso**

**Directores**

**Santiago Ochandiano Caicoya**  
**José Ignacio Salmerón Escobar**

**Madrid**

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



## TESIS DOCTORAL

Relevancia clínico-patológica del Tumor Budding en el frente de invasión tumoral en los estadios clínicos iniciales de carcinoma escamoso de lengua oral. Análisis histológico e inmunohistoquímico

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

Samuel Espías Alonso

DIRECTORES

Dr. Santiago Ochandiano Caicoya  
Dr. José Ignacio Salmerón Escobar

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA

INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS MEDICO-QUIÚRGICAS



**TESIS DOCTORAL**

Relevancia clínico-patológica del Tumor Budding en el frente de invasión tumoral en los estadios clínicos iniciales de carcinoma escamoso de lengua oral. Análisis histológico e inmunohistoquímico

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

Samuel Espías Alonso

DIRECTORES

Dr. Santiago Ochandiano Caicoya  
Dr. José Ignacio Salmerón Escobar



*A mi mujer, mi apoyo incondicional*

*A mis padres, por su entrega, cariño, y por haberme transmitido el amor a la medicina*

*A mi hermana, mi amiga y confidente*

## **AGRADECIMIENTOS**

*En primer lugar, quisiera agradecer al doctor Francisco Alijo sin cuya amistad y ayuda completamente desinteresada, este trabajo de Tesis Doctoral jamás habría visto la luz.*

*Al Profesor Juan Pablo Rodrigo, quien impulsó la idea para desarrollar este trabajo de Tesis Doctoral y a todo el Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Central de Asturias, dirigido por el Dr. Llorente, por su cariñosa acogida y por enseñarme la importancia de la docencia.*

*A todos los que fueron mis adjuntos durante mi formación en el Hospital Gregorio Marañón (Joselo, Javier, Juanjo, Guillermo, Nacho, Santi, Charly, Cris y Ana) liderados por el Profesor Navarro Vila, y posteriormente por el Dr. Salmerón, quienes fomentaron mi amor por la cirugía y me transmitieron su amplia experiencia con pacientes oncológicos.*

*A todos los que fueron mis compañeros de residencia en Servicio, con los que he tenido la inmensa suerte de coincidir y crecer, tanto en el ámbito personal como en el profesional (Pablo, Gema, Ricardo, Manu, Alba, Elena, Edu, Raúl, Marta, Marc, Dafne).*

*A Nacho Navarro, por su inestimable ayuda y orientación durante el desarrollo y redacción de la tesis. Gracias por tu completa y desinteresada disponibilidad, incluso a partir de nuestra hora límite de llamada.*

*A José Zamorano León, por su trabajo en el análisis estadístico y sus recomendaciones en la sección de resultados*

*A Paula Pinilla, por su inestimable ayuda y paciencia, siempre respondiendo con cariño a todas las llamadas y correos durante todos estos años de doctorado.*

*Al Dr. Ángel Arteaga, mentor y gran amigo, tú me transmites cada día el verdadero significado de la medicina.*

*A Charly, mi tutor de esta tesis, nunca olvidaré tu amistad y apoyo en los momentos difíciles, y esas conversaciones profundas que cambiaron mi forma de ver las cosas.*

*A mis directores de tesis, José Ignacio Salmerón, un ejemplo de constancia y esfuerzo, y Santiago Ochandiano, compendio de sabiduría y ganas de innovar cada día. Gracias por vuestra orientación y apoyo.*

# ÍNDICE

<b><i>I.RESUMEN</i></b>	<b><i>1</i></b>
<b><i>II.INTRODUCCIÓN</i></b>	<b><i>9</i></b>
2.1 ASPECTOS GENERALES .....	10
2.1.1 Recuerdo embriológico y anatómico de la lengua	10
2.1.2 Epidemiología	11
2.1.3 Histología	13
2.1.4 Etiopatogenia	14
2.1.5 Desarrollo y progresión del cáncer de lengua	15
2.1.6 Extensión local y vías de diseminación	16
2.1.7 Diagnóstico	18
2.1.8 Estadificación	20
2.1.9 Tratamiento del Cáncer de lengua en Estadios precoces (T1/T2)	22
2.1.10 Factores Pronósticos	24
2.2 RELEVANCIA DEL FRENTE DE INVASIÓN TUMORAL .....	27
2.2.1 Sistemas Clásicos de Gradación Histológica del ITF	29
2.2.2 Modo de invasión tumoral	31
2.3 TUMOR BUDDING .....	32
2.3.1 Concepto	32
2.3.2 Historia	32
2.3.3 Metodología diagnóstica	34
2.3.4 Transición epitelio-mesenquimal	35
2.3.5 Significación pronóstica	40
<b><i>III.HIPÓTESIS</i></b>	<b><i>42</i></b>
<b><i>IV.OBJETIVOS</i></b>	<b><i>45</i></b>
<b><i>V.MATERIAL Y MÉTODOS</i></b>	<b><i>48</i></b>
5.1 Tipo de estudio .....	49
5.2 Marco del estudio y fuentes de información .....	49
5.3 Criterios de inclusión y exclusión .....	50
5.4 Parámetros clínico-patológicos evaluados.....	50

5.5 Proceso de selección y tamaño de la muestra.....	51
5.6 Estudio Inmunohistoquímico.....	53
5.7 Valoración de los resultados inmunohistoquímicos .....	54
5.8 Análisis estadístico .....	58
5.9 Consideraciones éticas.....	59
<b>VI.RESULTADOS</b>	<b>61</b>
6.1 Análisis descriptivo de la población de estudio.....	62
6.1.1 Distribución respecto a variables clínico-demográficas	62
6.1.2 Distribución respecto a factores histológicos convencionales	63
6.1.3 Distribución según el análisis inmunohistoquímico	66
6.1.4 Distribución de las variables de evolución de enfermedad	68
6.2 Estudio analítico .....	69
6.2.1 Objetivo 1: Analizar la metodología diagnóstica del Tumor Budding	69
6.2.2 Objetivo 2: Evaluar la relación existente entre las características clínicas e histológicas del tumor primario y el índice de Tumor Budding	70
6.2.3 Objetivo 3: Valorar las características inmunohistoquímicas (E-Cadherina, KI-67) presentes en el ITF y su relación con el índice de Tumor Budding	72
6.2.4 Objetivo 4: Estudiar el significado pronóstico del índice de Tumor Budding en relación con la aparición de metástasis linfáticas cervicales	74
6.2.5 Objetivo 5: Identificar la repercusión del índice de Tumor Budding sobre el tiempo libre de enfermedad y la supervivencia	79
<b>VII.DISCUSIÓN</b>	<b>85</b>
7.1 Consideraciones sobre la muestra estudiada .....	86
7.2 Objetivo 1: Analizar la metodología diagnóstica del Tumor Budding.....	88
7.3 Objetivo 2: Evaluar la relación existente entre las características clínicas e histológicas del tumor primario y el índice de Tumor Budding.....	92
7.4 Objetivo 3: Valorar las características inmunohistoquímicas (E-Cadherina, Ki-67) presentes en el ITF y su relación con el índice de Tumor Budding .....	96
7.5 Objetivos 4 y 5: Estudiar el significado pronóstico del Tumor Budding sobre la presencia de metástasis linfáticas cervicales, el tiempo libre de enfermedad y la supervivencia.....	101
<b>VIII.CONCLUSIONES</b>	<b>106</b>
<b>IX.BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>109</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Desarrollo Embriológico del órgano lingual.....	10
<b>Figura 2:</b> Incidencia (A) y Mortalidad (B) estimada a nivel mundial del CE de cavidad oral y labio en el año 2018.....	12
<b>Figura 4:</b> Tinción con H-E. Displasia epitelial 10x (A); Carcinoma infiltrante 1,6x (B) .....	13
<b>Figura 5:</b> Estaciones linfáticas cervicales.....	17
<b>Figura 6:</b> Representación gráfica de la clasificación "N" del CE de cavidad oral .....	21
<b>Figura 7:</b> Estadíaje tumoral del CE de cavidad oral. Guías NCCN 2018.....	21
<b>Figura 8:</b> Algoritmo terapéutico del CE de cavidad oral T1/T2 N0. Guías NCCN versión 1.2021 .....	23
<b>Figura 9:</b> Representación esquemática de los cambios moleculares a nivel de ITF.....	27
<b>Figura 10:</b> Sistemas de Gradación Histológica. Jakobsson 1973 <sup>77</sup> . Anneroth 1986 <sup>78</sup> (B) .....	30
<b>Figura 11:</b> Presencia de TB en el ITF en tinción con H-E. Objetivo 20x .....	32
<b>Figura 12:</b> Sistemas de recuento del TB en el ITF: Hase et al. 1993 (A,B); Nakamura et al. 2005 (C,D); Ueno et al. 2002 (E,F); Un campo de aumento (G); 10 campos de aumento (H) <sup>92</sup> .....	35
<b>Figura 13:</b> Representación esquemática del proceso de transición epitelio-mesenquimal <sup>101</sup> .....	36
<b>Figura 14:</b> Misma sección tumoral teñida con Citoqueratina A1/AE3, marcador epitelial (A) y con Vimentina, marcador mesenquimal (B). Objetivo 1,6x.....	39
<b>Figura 15:</b> Diagrama de flujo: Obtención del tamaño muestral.....	52
<b>Figura 16:</b> Cristales con las tinciones empleados en nuestro estudio (A) Sistema automatizado Benchmark XT (B) .....	53
<b>Figura 17:</b> IHQ con Citoqueratina A1/AE3. Objetivo 4x.....	55
<b>Figura 18:</b> IHQ con E-Cadherina. Tinción intensa, fuerte y homogénea (+3) Objetivo 4x (A); Tinción débil a nivel del ITF (+1) Objetivo 20x (B).....	56
<b>Figura 19:</b> IHQ con Ki-67. Objetivo 4x (A); Campo seleccionado a nivel del ITF, Índice de proliferación >70%. Objetivo 40x (B).....	57
<b>Figura 20:</b> Informe favorable del CEIm .....	59

<b>Figura 21:</b> Gráficas de distribución respecto a la edad estratificada (A) y al sexo (B)	62
<b>Figura 22:</b> Ganglio linfático cervical con afectación metastásica.....	63
<b>Figura 23:</b> CE lingual pobremente diferenciado. Patrón en cordones .....	64
<b>Figura 24:</b> Infiltración perineural .....	64
<b>Figura 25:</b> Infiltración vascular venosa .....	64
<b>Figura 26:</b> Visualización de TB sobre muestras de H-E. Objetivo 20x. Bajo Índice de TB (A); Alto Índice de TB (B).....	65
<b>Figura 27:</b> Misma sección tumoral teñida con Citoqueratina AE1/AE3 (A), E-Cadherina (B), Ki-67 (C).....	67
<b>Figura 28:</b> Comparación de la concordancia entre el diagnóstico con H-E y Citoqueratina AE1/AE3. * $p < 0,05$ .....	69
<b>Figura 29:</b> Visualización del TB, objetivo 20x. Preparación con H-E (A) Citoqueratina AE1/AE3 (B) .....	69
<b>Figura 30:</b> Gráfica que muestra la asociación entre el índice de TB y el DOI ( $p < 0,05$ )* .....	71
<b>Figura 31:</b> Tinción con E-Cadherina, objetivo 20x. Tinción intensa +3 (A), Tinción leve +1 (B) .....	72
<b>Figura 32:</b> Tinción con Ki-67, objetivo 20x. Proliferación >50% (A), proliferación <50% (B).....	72
<b>Figura 33:</b> Gráfica que muestra la asociación entre el índice de TB y el índice de proliferación mediante Ki-67 ( $p < 0,05$ )* .....	73
<b>Figura 34:</b> Gráfica que muestra la asociación entre la Infiltración perineural y las metástasis cervicales ( $p < 0,05$ )* .....	75
<b>Figura 35:</b> Gráfica que muestra la asociación entre el DOI y las metástasis cervicales: Como variable cuantitativa continua, ( $p < 0,05$ )* (A), y agrupada (B) .....	75
<b>Figura 36:</b> Gráfica que muestra la asociación entre las metástasis linfáticas cervicales y el TB ( $p < 0,05$ )* .....	77
<b>Figura 37:</b> Gráfica que muestra el TLE según DOI.....	79
<b>Figura 38:</b> Curva de recidiva de Kaplan-Meier para TLE según Índice de TB.....	81
<b>Figura 39:</b> Curva de supervivencia de Kaplan-Meier para SG según Índice de TB.....	83

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Comparación entre los diferentes sistemas de diagnóstico radiológico <sup>45</sup> .....	19
<b>Tabla 2:</b> Especificaciones técnicas empleadas en cada uno de los Ac del estudio IHQ	54
<b>Tabla 3:</b> Distribución de las variables clínico-demográficas.....	63
<b>Tabla 4:</b> Distribución de las características histológicas de la población a estudio ....	66
<b>Tabla 5:</b> Distribución de las características del estudio IHQ. ....	67
<b>Tabla 6:</b> Distribución de las características de evolución de la enfermedad.....	68
<b>Tabla 7:</b> Asociación entre el índice de TB y las variables clínico-demográficas. ....	70
<b>Tabla 8:</b> Asociación entre el índice de TB y las variables histológicas.....	71
<b>Tabla 9:</b> Asociación entre el Índice de TB y las variables del estudio IHQ. ....	73
<b>Tabla 10:</b> Asociación entre las metástasis linfáticas cervicales y las variables clínico-demográficas .....	74
<b>Tabla 11:</b> Asociación entre el estado de los ganglios linfáticos cervicales y las variables histológicas .....	76
<b>Tabla 12:</b> Asociación entre metástasis linfáticas cervicales y el índice de Tumor Budding ( $p < 0,05$ )*.....	76
<b>Tabla 13:</b> Asociación entre metástasis linfáticas cervicales y estudio IHQ ( $p < 0,05$ )*	77
<b>Tabla 14:</b> Test multivariante de regresión logística binaria .....	78
<b>Tabla 15:</b> Asociación entre las variables del estudio y el TLE.....	80
<b>Tabla 16:</b> Asociación entre las variables del estudio y la supervivencia .....	82

## LISTADO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

- AC:** Anticuerpo
- AJCC:** American Joint Committee on Cancer
- ASCO:** American Society of Clinical Oncology
- ALDH:** Acetaldehído Deshidrogenasa
- BSGC:** Biopsia Selectiva de Ganglio Centinela
- CE:** Carcinoma Escamoso
- CEIm:** Comité de Ética y de Investigación con medicamentos
- CK:** Citoqueratina
- DOI:** Invasión Tumoral o “Depth Of Invasion”
- ECIS:** European Cancer Information System
- EORTC:** European Organization for Research and Treatment of Cancer
- FN:** Falso Negativo
- GD:** Grado de Diferenciación
- H-E:** Hematoxilina-Eosina
- HUGUM:** Hospital General Universitario Gregorio Marañón
- HR:** Hazard Ratio
- IARC:** International Agency for Research on Cancer
- IC:** Intervalo de Confianza
- IHQ:** Inmunohistoquímica
- ITBCC:** International Tumor Budding Consensus Conference
- KM:** Kaplan Meier
- NCCN:** National Comprehensive Cancer Network
- OR:** Odds Ratio
- OMS:** Organización Mundial de la Salud
- PAAF:** Punción Aspiración Aguja Fina
- PET-TC:** Tomografía por Emisión de Positrones
- POI:** Pattern Of Invasion / Patrón de invasión
- PPOI:** Predominant Pattern Of Invasion / Patrón de invasión predominante
- pT:** categoría del tumor primario una vez analizado por el patólogo
- PCR:** Polimerase Chain Reaction
- RMN:** Resonancia Magnética Nuclear
- RR:** Riesgo Relativo
- SG:** Supervivencia Global
- SLE:** Supervivencia Libre de Enfermedad
- TB:** Tumor Budding

***TB1:*** *Tumor Budding Bajo Grado*  
***TB2:*** *Tumor Budding Alto Grado*  
***TC:*** *Tomografía Computarizada*  
***TLE:*** *Tiempo Libre de Enfermedad*  
***UICC:*** *Union for International Cancer Control*  
***VEB:*** *Virus Epstein Barr*  
***VIH:*** *Virus de Inmunodeficiencia Humana*  
***VPH:*** *Virus del Papiloma Humano*  
***VPN:*** *Valor Predictivo Negativo*  
***VPP:*** *Valor Predictivo Positivo*  
***WHO:*** *World Health Organization*  
***WPOI:*** *Worst Pattern of Invasion*





# **I.RESUMEN / SUMMARY**

## RESUMEN

### INTRODUCCIÓN

El carcinoma escamoso (CE) lingual es una de las neoplasias más frecuentes de la cavidad oral. Presenta mayor agresividad que otros tumores en esta área debido a su rápida invasión local, su elevado índice de diseminación a los ganglios linfáticos cervicales y su alta tasa de recidiva. Es importante diferenciar la lengua oral (correspondiente con los dos tercios anteriores), de la base lingual (incluida en la orofaringe), puesto que el estadiaje, las vías de diseminación linfática y el tratamiento de los tumores difiere entre ambas regiones anatómicas. Las metástasis linfáticas cervicales constituyen el parámetro más determinante en la evolución y la supervivencia. Se estima que incluso en estadios precoces (T1/T2 N0 M0), entre un 20% y un 40% de los pacientes presentan metástasis ocultas no detectadas con la exploración clínica y las pruebas de imagen. Resulta necesario, por tanto, encontrar factores histológicos fáciles de analizar y reproducibles que nos aproximen a detectar comportamientos biológicos de mayor agresividad, principalmente en estadios tumorales precoces. Hallazgos histológicos que puedan ser estudiados en las biopsias preoperatorias, permitiendo predecir la posibilidad de metástasis linfáticas en pacientes con cuellos clínico-radiológicos negativos, guiando el sucesivo tratamiento y estadificando el riesgo, sobre todo, en etapas tempranas.

El *Tumor Budding* (TB), constituye un hallazgo histológico definido como la presencia de células tumorales aisladas o formando pequeños grupos celulares (de hasta 5 células) en el frente de invasión del tumor. La existencia de un alto índice de TB se asocia con un comportamiento tumoral más agresivo. Estas células, separadas de la masa tumoral principal, representan dos propiedades: una pérdida de cohesión celular y un aumento de la capacidad de invasión. Se ha relacionado el comportamiento biológico de estas células con la transición epitelio-mesenquimal (TEM), fenómeno mediante el cual las células epiteliales pierden su polaridad y sus uniones intercelulares adquiriendo un fenotipo mesenquimal, dotándolas de mayor capacidad de invasión. El TB ha sido ampliamente estudiado en neoplasias de estirpe epitelial como el cáncer colorrectal, cáncer esofágico o el cáncer de pulmón, correlacionando su presencia con un aumento del riesgo de metástasis linfáticas locorregionales, aumento de las recidivas y

disminución de la supervivencia. Actualmente, la *International Union Against Cancer (UICC)* ha establecido el índice de TB como factor pronóstico independiente adicional en el carcinoma colorrectal.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

Nuestra hipótesis de trabajo se basa en que la presencia de un alto índice de Tumor Budding se asocia con un comportamiento tumoral más agresivo, aumentando el riesgo de metástasis linfáticas en los ganglios cervicales y disminuyendo el tiempo libre de enfermedad y la supervivencia. El presente trabajo se ha realizado con el fin de obtener más información sobre el papel que juega el TB en el cáncer escamoso de lengua oral diagnosticado en estadios iniciales y, para ello, se han planteado los siguientes objetivos:

- *Objetivo 1: Analizar la metodología diagnóstica del TB.*
- *Objetivo 2: Analizar la relación existente entre las características clínicas e histológicas del tumor primario y el índice de Tumor Budding.*
- *Objetivo 3: Analizar las características inmunohistoquímicas (E-Cadherina, KI-67) presentes en el frente de invasión tumoral y su relación con el índice de TB*
- *Objetivo 4: Analizar el significado pronóstico del índice de TB en relación con la aparición de metástasis linfáticas cervicales*
- *Objetivo 5: Analizar la repercusión del índice de TB sobre el tiempo libre de enfermedad y la supervivencia.*

## MATERIAL Y MÉTODOS

Realizamos un estudio observacional, de tipo longitudinal retrospectivo de una serie de casos (61 casos) de carcinoma escamoso de lengua oral en estadios iniciales clínico-radiológicos intervenidos por el servicio de Cirugía Maxilofacial del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Tras establecer los criterios de inclusión y exclusión, se obtiene un tamaño muestral final de 61 pacientes. En una primera fase, se analizaron las muestras histológicas convencionales correspondientes con las piezas tumorales. En una segunda fase, se realizó un estudio mediante técnicas inmunohistoquímicas (Citoqueratina A1/AE3, E-cadherina, Ki-67), de las secciones correspondientes con el frente de invasión tumoral de cada pieza quirúrgica. En la fase

analítica, se estableció una significancia estadística para valores P inferiores a 0,05. El análisis estadístico se realizó con el software SPSS versión 25.0.

## RESULTADOS

El tiempo de seguimiento medio de la población a estudio fue de 47,42 meses (rango entre 1 y 113 meses). 15 enfermos presentaron una recidiva loco-regional (24,59%) y 5 desarrollaron enfermedad a distancia (8,19%). 12 pacientes fallecieron (19,67%) de los que 8 fue debido a la enfermedad, 2 a carcinomas de otras localizaciones, 1 a una neumonía y otro cuya causa de fallecimiento no está recogida en la historia clínica.

Los resultados revelan que hay una distribución significativa distinta en los niveles de concordancia y no concordancia entre la tinción con Hematoxilina-Eosina y su posterior confirmación mediante estudio inmunohistoquímico con Citoqueratina A1-AE3 entre los grupos TB 1 (baja intensidad, <5 buds) y TB2 (alta intensidad, >5 buds), observándose un 100% de confirmación en el grupo TB1, mientras que ese porcentaje cae al 89% en el TB2 ( $p=0.046$ )

Encontramos una asociación estadísticamente significativa entre el índice de TB y la profundidad de invasión tumoral ( $p< 0,01$ ), la invasión perineural ( $p< 0,01$ ), la expresión de E-Cadherina ( $p< 0,01$ ) y el índice de proliferación medido mediante Ki-67 ( $p<0,01$ ) a nivel del ITF.

En relación a la presencia de metástasis linfáticas cervicales, encontramos una asociación estadísticamente significativa entre la aparición de las mismas y la profundidad de invasión tumoral ( $p=0,04$ ), la infiltración perineural ( $p=0,02$ ), el índice de TB ( $p< 0,01$ ), la expresión de E-cadherina ( $p< 0,01$ ) y el índice de proliferación Ki-67 ( $p< 0,01$ ). En el análisis de regresión logística binaria, el único factor histológico que pudo ser considerado como factor pronóstico independiente fue el índice de TB.

En cuanto al tiempo libre de enfermedad y la supervivencia, no encontramos relación con el índice de TB.

## CONCLUSIONES

1. El análisis del tumor Budding, sobre inmunotinciones con citoqueratina A1-AE3, presenta una mayor facilidad diagnóstica, precisión y reproducibilidad frente a su estudio sobre muestras teñidas con Hematoxilina-Eosina
2. El índice de TB se asocia con la profundidad de invasión tumoral y la invasión perineural.
3. Los casos con alto índice de Tumor Budding se asociaron con una disminución en la expresión de E-cadherina en el frente de invasión tumoral.
4. Los casos con alto índice de Tumor Budding se asociaron con un aumento del índice de proliferación celular medido mediante Ki-67
5. El índice de Tumor Budding es un factor pronóstico independiente sobre la presencia de metástasis linfáticas cervicales.
6. No encontramos relación entre el índice de Tumor Budding y el tiempo libre de enfermedad ni la supervivencia.

## SUMMARY

### INTRODUCTION

Tongue squamous cell carcinoma is one of the most common tumors within the oral cavity, demonstrating heightened aggressiveness compared to other oral tumors. Its rapid local invasion, high rate of spread to cervical lymph nodes, and frequent recurrence contribute to its clinical challenge. Distinguishing between the oral tongue (anterior two-thirds) and the tongue base (part of the oropharynx) is crucial due to variations in staging, lymphatic dissemination pathways, and treatment modalities for tumors in these distinct anatomical regions. Cervical lymph node metastases play a pivotal role in the disease evolution and survival rates. Even in early stages (T1/T2 N0), 20-40% of patients exhibit occult neck metastases undetectable by clinical examination and imaging tests. Thus, identifying reproducible histological factors, especially in preoperative biopsies, is essential to predict aggressive behaviors and guide appropriate treatment strategies.

Tumor Budding (TB) is a histological finding characterized by isolated tumor cells or cell clusters (up to 5 cells) at the invasive tumor front. A high TB index is associated with more aggressive tumor behavior, reflecting loss of cell cohesion and increased invasion capacity. These characteristics are linked to the epithelial-mesenchymal transition, wherein epithelial cells lose polarity and intercellular junctions, acquiring a mesenchymal phenotype with enhanced invasive capabilities. TB has been extensively studied in various cancers, including colorectal, esophageal, and lung cancers, demonstrating correlations with increased risk of lymphatic metastases, higher recurrence rates, and reduced survival. Currently, the International Union Against Cancer (UICC) recognizes TB as an additional independent prognostic factor in colorectal carcinoma.

### OBJECTIVE

Our working hypothesis is grounded in the association between a high Tumor Budding index and aggressive tumor behavior, specifically increasing the risk of lymphatic metastasis in cervical nodes while decreasing disease-free time and overall

survival. This study aims to provide comprehensive insights into the role of TB in squamous cell cancer of the oral tongue during its initial stages. The include:

- *Objective 1: Analyzing the diagnostic methodology of TB*
- *Objective 2: Investigating the relationship between clinical and histological characteristics of the primary tumor and the TB index.*
- *Objective 3: Examining immunohistochemical characteristics (E-Cadherin, KI-67) in the tumor invasion front and their correlation with the TB index.*
- *Objective 4: Assessing the prognostic significance of the TB index in relation to cervical lymphatic metastases.*
- *Objective 5: Analyzing the impact of the TB rate on disease-free time and survival.*

## MATERIAL AND METHOD

We conducted an observational, longitudinal, retrospective study involving 61 cases of oral tongue squamous cell carcinoma in initial clinical-radiological stages. These cases were treated by the Maxillofacial Surgery service at the Gregorio Marañón General University Hospital. After establishing inclusion and exclusion criteria, the final sample comprised 61 patients. The study involved the analysis of conventional histological samples in the first phase, followed by immunohistochemical techniques (Cytokeratin A1/AE3, E-cadherin, Ki-67) in the second phase. Statistical analysis was performed using SPSS version 25.0 software, with significance set at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

The mean follow-up time for the study population was 47.42 months (range: 1-113 months). Of the patients, 24.59% experienced loco-regional recurrence, and 8.19% developed distant disease. A total of 19.67% of patients died, with 8 deaths attributed to the disease, 2 to carcinomas in other locations, 1 to pneumonia, and 1 with an unrecorded cause of death.

The results indicate a significantly different distribution in the levels of agreement and non-agreement between Hematoxylin-Eosin staining and subsequent confirmation by immunohistochemical study with Cytokeratin A1-AE3. This distinction

is observed between low intensity (<5 buds) and high intensity (>5 buds) groups, with a 100% confirmation rate in the TB1 group, decreasing to 89% in TB2 (p=0.046).

A statistically significant association was found between the TB index and depth of tumor invasion ( $p < 0.01$ ), perineural invasion ( $p < 0.01$ ), E-Cadherin expression ( $p < 0.01$ ), and Ki-67 proliferation index ( $p < 0.01$ ) at the invasive tumor front level. Regarding cervical lymphatic metastases, a statistically significant association was observed with the depth of tumor invasion (p=0.04), perineural infiltration (p=0.02), TB index ( $p < 0.01$ ), E-Cadherin expression ( $p < 0.01$ ), and Ki-67 proliferation index ( $p < 0.01$ ). In binary logistic regression analysis, the only histological factor considered an independent prognostic factor was the TB index. However, no relationship was found between the TB index and disease-free time or survival.

#### CONCLUSION:

1. Immunostaining with cytokeratin A1-AE3 enhances diagnostic rates, precision and reproducibility in Tumor Budding analysis compared to Hematoxylin-Eosin staining.
2. The TB index correlates with the depth of tumor invasion and perineural invasion.
3. Cases with a high TB index are associated with decreased E-cadherin expression in the tumor invasion front.
4. Cases with a high TB index were associated with an increased cell proliferation index measured by Ki-67
5. The Budding Tumor Index is an independent prognostic factor for the presence of cervical lymphatic metastases.
6. No relationship was found between the TB index and disease-free time or survival.

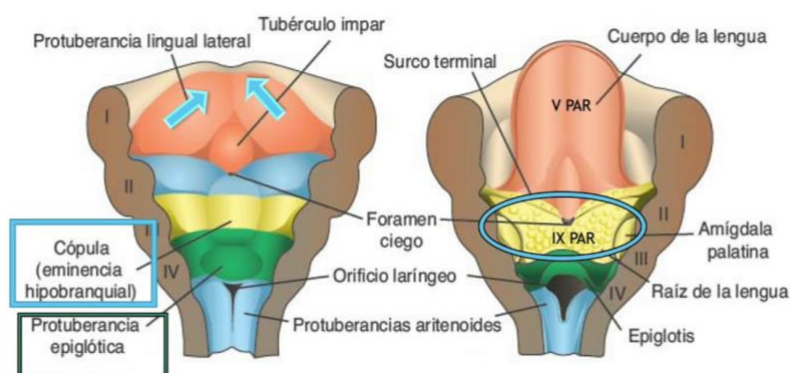


## **II.INTRODUCCIÓN**

## 2.1 ASPECTOS GENERALES

### 2.1.1 Recuerdo embriológico y anatómico de la lengua

La lengua es un órgano muscular cuyo desarrollo comienza en el embrión al final de la cuarta semana. El primer signo de su formación es la aparición de una prominencia media, denominada *tubérculo impar* y, a ambos lados del mismo, la aparición de dos prominencias denominadas *protuberancias linguales laterales*, fruto de la proliferación mesenquimal del primer arco faríngeo. Estas estructuras darán lugar al cuerpo o porción móvil de la lengua. Al mismo tiempo, la proliferación mesenquimal del segundo, tercer y porción anterior del cuarto arco faríngeo constituyen la *cópula o eminencia hipobranquial*, que dará lugar a la base o porción fija de la lengua. La porción más posterior de mesénquima del cuarto arco faríngeo, denominada *protuberancia epiglótica*, dará lugar a la epiglotis (Figura 1). El epitelio de la lengua tiene doble origen, ectodérmico o bucal y endodérmico o faríngeo<sup>1</sup>.



*Figura 1: Desarrollo Embriológico del órgano lingual*

Por lo tanto, una vez completado su desarrollo, podemos dividir el órgano lingual en dos partes: una “lengua oral o móvil”, que pertenece a la cavidad oral y se corresponde con los dos tercios anteriores (punta y el cuerpo de la lengua), y una “lengua faríngea, fija o base”, perteneciente a la orofaringe, correspondiente con el tercio posterior. Esta separación anatómica es muy relevante, puesto que las vías de diseminación, el estadiaje y el tratamiento de los tumores, difiere, entre ambas regiones<sup>2,3</sup>.

A nivel muscular, diferenciamos la musculatura intrínseca lingual, sin relación con ninguna otra estructura, compuesta por los músculos longitudinal superior, inferior,

vertical y transverso, y cuya principal función es cambiar la forma de la lengua; mientras que la musculatura extrínseca, compuesta por músculos que se originan fuera de la lengua y se insertan en ella (geniogloso, estilogloso, palatogloso e hiogloso) tiene como principal función cambiar la posición de la misma<sup>3</sup>.

La inervación motora corre a cargo del nervio hipogloso, a excepción del músculo palatogloso, que es inervado por el plexo faríngeo y la rama craneal del nervio espinal. La inervación sensitiva para las sensaciones de temperatura y tacto, en los dos tercios anteriores, depende del nervio lingual (tercera rama del nervio trigémino) y la gustativa, a través del nervio cuerda del tímpano (rama del nervio facial). El tercio posterior depende casi en exclusiva del nervio glossofaríngeo<sup>2</sup>.

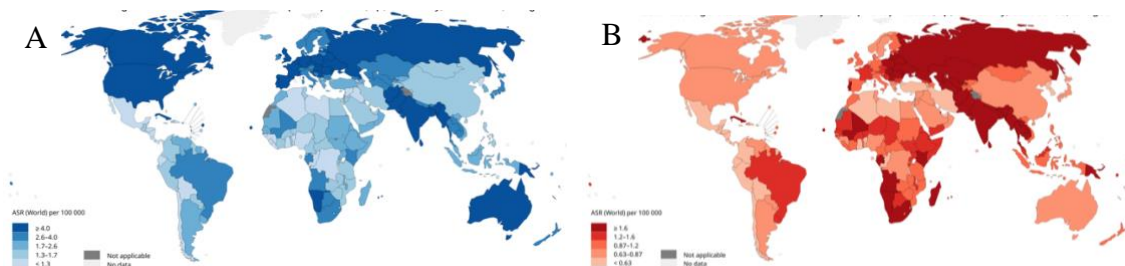
El aporte vascular arterial se realiza a través de las ramas linguales dorsales, profundas y sublinguales, que derivan de la arteria lingual, rama de la carótida externa. El drenaje venoso se realiza a través de las venas linguales dorsales y profundas, que desembocan en la vena yugular interna a través, generalmente, del troco tirolinguofacial<sup>2</sup>.

### **2.1.2 Epidemiología**

El cáncer de cabeza y cuello representa la sexta neoplasia maligna más frecuente a nivel mundial, siendo más del 95%, carcinomas de células escamosas (CCE)<sup>4</sup>. El cáncer de cavidad oral, incluyendo labio, representa un tercio de todos los tumores de cabeza y cuello, constituyendo, por sí mismo, alrededor del 3% de todos los tumores malignos en países occidentales, comprendiendo el 2,74% de los tumores malignos en hombres y el 0,7% en mujeres<sup>5</sup>.

Los estudios epidemiológicos demuestran que la incidencia y mortalidad del cáncer oral, incluyendo labio, varía significativamente en función del área geográfica analizada, encontrando en Asia central y meridional las tasas de incidencia más altas, seguidas de Melanesia, Australia y Nueva Zelanda<sup>6</sup>. Según datos del programa *GLOBOCAN*, de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (*IARC, International Agency for Research on Cancer*), se estima que, en el año 2018, del total de nuevos casos a nivel mundial (354.864), el 64,2% se encontraron en Asia (concretamente,

en la India, donde, el cáncer oral, es el tumor maligno más frecuente, representando hasta el 40% de todos los cánceres), el 17,4% en Europa, el 7,6% en América del Norte, 5,6% en América Latina, 3,8% en África y un 1,3% en Oceanía<sup>7</sup> (Figura 2).



**Figura 2:** Incidencia (A) y Mortalidad (B) estimada a nivel mundial del CE de cavidad oral y labio en el año 2018. Fuente: International Agency for Research on Cancer. WHO

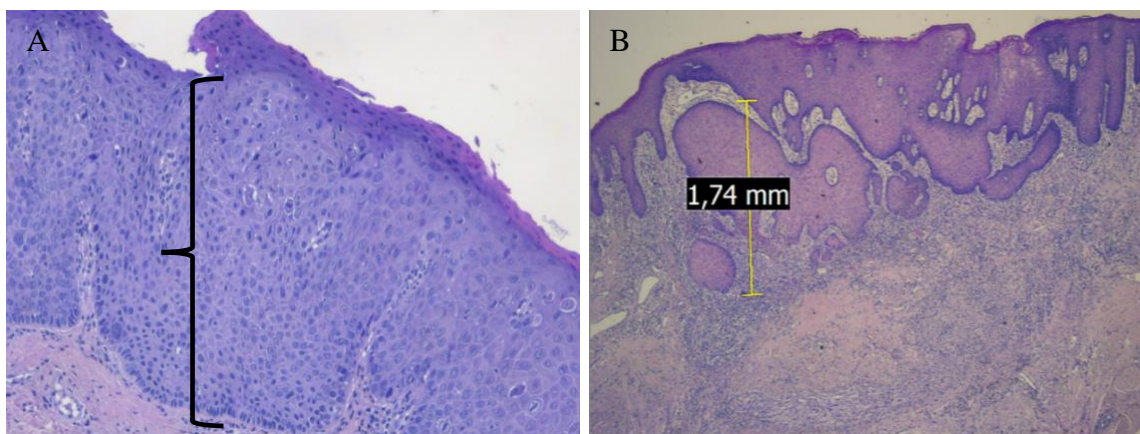
En relación a la edad, aproximadamente el 90% de los cánceres orales se diagnosticaron en mayores de 40 años y más del 50% en mayores de 65 años. Sin embargo, se está observando un cambio de tendencia en los últimos años con un aumento de la incidencia en individuos menores de 40 años sin factores de riesgo clásicos (tabaco y alcohol), el cual se ha relacionado con la infección del VPH<sup>8</sup>.

El cáncer de lengua es la neoplasia maligna más frecuente dentro de los tumores que asientan en la cavidad oral, representando alrededor del 40% de los mismos<sup>9</sup>. La Sociedad Americana de Oncología Clínica (*American Society of Clinical Oncology, ASCO*) estimó que, en 2019, se produjeron en Estados Unidos 17060 nuevos casos de cáncer de lengua (15550 en hombres y 4510 en mujeres) y 3020 fallecimientos (2220 en hombres y 800 en mujeres). La lengua fue la localización más frecuente de neoplasias malignas en la cavidad oral (incluyendo faringe), con un 35% de los casos diagnosticados, representando el 1% del total de neoplasias malignas<sup>10</sup>.

En Europa, según datos de la *IARC*, la incidencia del cáncer de lengua (incluyendo base) entre los hombres oscila entre 0,8/100.000 hombres en Polonia, hasta un máximo de 8/100.000 hombres en el Bajo Rin francés. En España, el mínimo lo vamos a encontrar en Albacete, con 2,1/100.000 hombres, frente al máximo de 5,2/100.000 en Asturias<sup>11</sup>. La supervivencia relativa del cáncer de cavidad oral en Europa se sitúa alrededor del 71% al año y del 46% a los 5 años, mientras que en el CCE de lengua estas tasas descienden al 66% y al 31% respectivamente<sup>12</sup>.

### 2.1.3 Histología

El carcinoma de células escamosas es una neoplasia maligna que deriva del epitelio estratificado de la mucosa oral, resultado de la multiplicación e indiferenciación celular. Esta variedad histológica es la más frecuente en la cavidad oral, representado hasta el 90% de los tumores malignos de lengua<sup>13</sup>. Se origina sobre un tejido alterado en el que, previamente, ha existido una displasia epitelial (Figura 3), caracterizándose por la proliferación alterada de células atípicas en el epitelio escamoso, que posteriormente rompen la membrana basal e infiltran la lámina propia, convirtiéndose en un carcinoma infiltrante<sup>14</sup> (Figura 4).



**Figura 3:** Tinción con H-E. Displasia epitelial 10x (A); Carcinoma infiltrante 1,6x (B)

Las células tumorales presentan unas características determinadas: diferentes tamaños (pleomorfismo), citoplasma eosinófilo, núcleos hipercromáticos y aumento de la relación núcleo/citoplasma. Son capaces de producir acúmulos redondeados formados por capas concéntricas de queratina, denominados globos córneos o perlas de queratina. Es frecuente observar un intenso infiltrado inflamatorio asociado, áreas de respuesta inmune celular elevadas y zonas de necrosis. A pesar de que la variante histológica más frecuente es la convencional, se pueden diferenciar hasta 6 subtipos de carcinoma escamoso menos comunes que afectan a la cavidad oral y lengua móvil: *CE Basaloide*, *CE Fusocelular*, *Adenoescamoso*, *CE Cuniculatum*, *CE Verrucoso*, *CE Linfoepitelial*, *CE Papilar*, *CE Acantolítico*<sup>15</sup>.

El grado de queratinización constituye un índice diferencial y establece con bastante fidelidad el grado de malignidad. A mayor grado de queratinización, mayor grado de diferenciación y, en consecuencia, menor grado de malignidad. En general, los

tumores bien diferenciados, son más comunes hacia las superficies anteriores de la lengua, aunque pueden encontrarse tumores anaplásicos y bien diferenciados en ambos sitios. Quizás por su localización y tendencia a ser menos diferenciados, los carcinomas que surgen en el tercio posterior de la lengua, comparados con los de los dos tercios anteriores, son más grandes cuando se diagnostican inicialmente, es más frecuente que hayan invadido estructuras vecinas y más probable que se acompañen de fijación de la lengua (prueba de un tumor infiltrante avanzado)<sup>16</sup>.

#### **2.1.4 Etiopatogenia**

La carcinogénesis oral es un proceso complejo, multiescalonado, de etiología multifactorial, y que surge como consecuencia del acúmulo de mutaciones en los genes que regulan el comportamiento celular. Este proceso responde tanto a la susceptibilidad genética de los tejidos del paciente frente al cáncer, como a la interacción con distintos agentes carcinogénicos.

La implicación del tabaco en este proceso está ampliamente establecida, con una influencia tanto dosis-dependiente como tiempo-dependiente, así como con sus distintas presentaciones (inhalado, mascado...)<sup>17</sup>. Se estima que, cuando se presenta como factor asilado, los fumadores presentan un riesgo relativo 7 veces mayor que los no fumadores en el desarrollo del cáncer oral<sup>18</sup>. Cabe destacar la implicación de otros factores carcinogénicos como el alcohol<sup>19</sup>, la dieta<sup>20</sup>, los virus..., que actúan de forma sinérgica.

Se ha demostrado una clara asociación entre el virus del papiloma humano (VPH), principalmente los subtipos VPH-16 y VPH-18 y el desarrollo de carcinoma orofaríngeo (incluyendo base de lengua), causando en pacientes más jóvenes y sin factores de riesgo clásicos (tabaco y alcohol), tumores muy indiferenciados y que suelen presentar una buena respuesta al tratamiento con radioterapia (RT). Su participación en el carcinoma intraoral y, por ende, en el cáncer de lengua móvil, todavía está siendo evaluado, sin contemplar las guías clínicas actualmente el VPH en esta localización<sup>21</sup>.

A todos estos factores anteriormente descritos, debemos añadir el estado inmunológico del paciente, siendo el cáncer, en general, la segunda causa de fallecimiento en pacientes inmunodeprimidos, tanto por inmunodeficiencia primaria (hereditaria) o

secundaria (VIH e inmunosupresión por fármacos en pacientes con trasplante). Otros factores etiológicos descritos que aumentan la susceptibilidad para el desarrollo de un cáncer oral son la irritación crónica mecánica de la mucosa oral, una higiene oral deficiente o síndromes de carácter hereditario.

### **2.1.5 Desarrollo y progresión del cáncer de lengua**

De forma genérica, el cáncer surge como consecuencia de la acumulación de cambios genéticos y epigenéticos en genes que actúan en distintas vías de señalización, provocando que las células adquieran un amplio espectro de propiedades aberrantes a medida que evoluciona. En el año 2000, *Hanahan y Weinberg*, describieron las características básicas de una célula tumoral: Autosuficiencia con respecto a las señales de crecimiento; insensibilidad a las señales de inhibición de crecimiento; evasión de la apoptosis; potencial replicativo ilimitado; angiogénesis mantenida y capacidad de invasión y metástasis<sup>22</sup>. Una década después, en una nueva revisión, añadieron otras dos características: alteración del metabolismo celular y evasión de la respuesta inmune<sup>23</sup>.

*Califano et al.*<sup>24</sup>, en 1996, basándose en el modelo de progresión tumoral en el cáncer de colon, descrito por *Fearon et al.* en 1990<sup>25</sup>, propusieron un modelo de progresión genética para el cáncer oral, estimando que son necesarias entre 6 y 10 mutaciones para que una célula normal se convierta en tumoral. Por lo tanto, las alteraciones genéticas definen la base molecular de la carcinogénesis, y estas incluyen mutaciones puntuales, amplificaciones, reordenamientos, variaciones en el número de copias, inserciones o deleciones, así como translocaciones cromosómicas de exomas o genomas completos. La progresión histopatológica desde las lesiones premalignas hasta el carcinoma oral está acompañada por una acumulación de anomalías genéticas que conducen a una inestabilidad genómica y finalmente a la alteración de los patrones de expresión proteica. El cromosoma 9 parece ser una de las dianas más precoces y sensibles en el desarrollo tumoral. La región 9p21 alberga genes que codifican los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas p16 y 15, que actúan como importantes reguladores de la proliferación celular. La deleción 9p21 es la más constante y precoz en el cáncer oral, habiéndose documentado esta mutación en la mayoría de lesiones premalignas y carcinomas incipientes. También se ha demostrado una alta prevalencia de LOH o

deleciones en los loci cromosómicos 3p, 9p, 13q y 17p. Estas regiones cromosómicas albergan importantes genes supresores tumorales, cuya función preventiva del desarrollo tumoral queda alterada por la aberración cromosómica<sup>26</sup>.

En los cánceres que afectan a la cavidad oral, es importante destacar el concepto de cancerización de campo, el cual sugiere que, las mucosas de tracto aéro-digestivo superior sometidas a agentes carcinógenos, tienen un mayor riesgo de desarrollar nuevos carcinomas<sup>27</sup>. Las alteraciones moleculares generadas por agentes carcinógenos en el tejido adyacente al tumor, pueden no expresarse como lesiones clínicas o histológicas, pero aumentan el riesgo de transformación maligna. Análisis moleculares sobre los epitelios histológicamente normales adyacentes a los carcinomas orales, han demostrado, la existencia de alteraciones genómicas tempranas (lesiones microsatélites, inestabilidad cromosómica), formando poblaciones clonales con una mayor tasa proliferativa<sup>28</sup>.

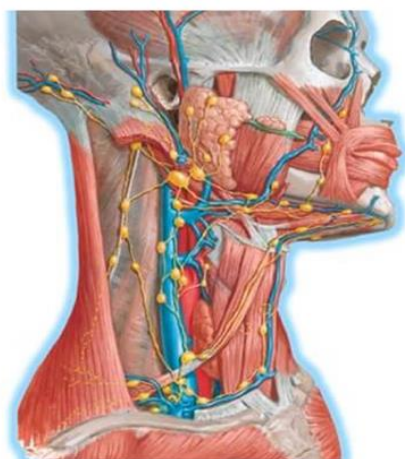
### **2.1.6 Extensión local y vías de diseminación**

La extensión local del tumor vendrá determinada por su forma de presentación clínica, diferenciando principalmente tres tipos de patrones: proliferativo/exofítico, ulcerativo, o infiltrativo/submucoso. Según distintas series, la localización más frecuente dentro de la lengua oral son los bordes laterales (60-70%) en forma de patrón ulcerativo, seguido de la cara ventral (30-40%), asentando tan sólo en el dorso, entre el 3-5%<sup>29</sup>. Los tumores de la línea media son entidades casi excepcionales, que representan incluso menos del 1% y suelen desarrollarse sobre leucoplasias previas<sup>30</sup>.

En el CE oral, la progresión linfática a los ganglios cervicales es la vía más frecuente de diseminación del tumor. Este hecho es un factor determinante en la estadificación de la enfermedad, condicionando la evolución y la supervivencia de los pacientes<sup>31</sup> y considerándose un factor pronóstico independiente. Se estima que, en el CE de cavidad oral, la frecuencia de metástasis ganglionares oscila entre el 7,8 y el 43% de los casos<sup>32</sup>. Sin embargo, el CE de lengua es más agresivo que los que afectan a otras localizaciones dentro de la cavidad oral. Si atendemos exclusivamente a los CE linguales, esta cifra llega a aumentar hasta el 66%<sup>33</sup>. Otro hecho de suma relevancia, es que si nos centramos exclusivamente en los cánceres de lengua en estadios precoces (T1/T2 N0) en

los que basamos nuestro estudio en el presente trabajo, se estima que entre el 20% -40% presentan metástasis cervicales ocultas al momento diagnóstico<sup>34</sup> y metástasis cervicales tardías tras la cirugía<sup>35</sup>.

Tomando distintas referencias anatómicas, podemos agrupar los ganglios linfáticos cervicales en siete niveles o estaciones con subniveles asociados (Figura 5). Esta división es sumamente valiosa porque, dependiendo de la localización del tumor primario, las metástasis linfáticas tenderán a producirse en uno u otro nivel. En 1990, *Shah et al.*<sup>36</sup> mapearon las distintas frecuencias de metástasis en los niveles cervicales de los carcinomas de cabeza y cuello, observando, en los tumores de cavidad oral, un mayor riesgo de afectación en los niveles I, II y III. En la lengua oral, la punta tiene mayor tendencia de drenaje linfático a los niveles Ia, III caudal y IV; la cara ventral a los niveles Ia, Ib, y IIa; los bordes laterales anteriores al nivel Ib y IIa; y los bordes laterales posteriores y el dorso lingual al nivel IIa. Actualmente, gracias a recientes estudios con técnicas de medicina nuclear, se está logrando una mayor precisión en el conocimiento de las vías de propagación linfática cervical<sup>37,38</sup>.

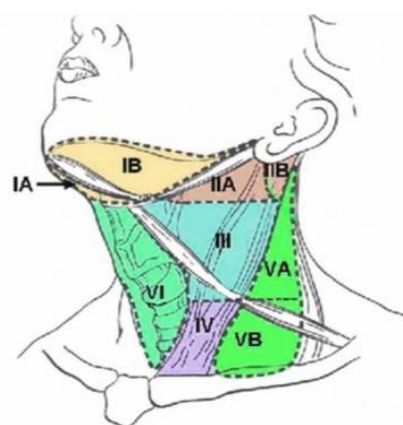


#### Nivel I

- Nivel Ia: región submentoniana.
- Nivel Ib: región submandibular.

#### Nivel II

- Nivel IIa: grupo yugular alto (pre-espinal).
- Nivel IIb: grupo yugular alto (retro-espinal).



**Nivel III: grupo yugular medio.**

**Nivel IV: grupo yugular bajo.**

**Nivel V:**

- Nivel Va: ganglios posteriores supracricoideos.
- Nivel Vb: ganglios posteriores infracricoideos.

**Nivel VI: grupo cervical central o visceral.**

**Nivel VII: grupo ganglionar del mediastino superior.**

*Figura 4: Estaciones linfáticas cervicales*

La diseminación por vía hematogena, que ocasionará la aparición de metástasis a distancia, se estima entorno al 7,5% de los pacientes, siendo el pulmón y la pleura el órgano más afectado, seguido del hígado y del esqueleto. De *Vicente et al.*<sup>39</sup> observaron que este riesgo se incrementa en tumores histológicamente indiferenciados, afectación ganglionar múltiple, extensa o bilateral, en tumores primarios de gran tamaño y de crecimiento rápido, en pacientes menores de 40 años, y en pacientes con recidivas tempranas.

### 2.1.7 Diagnóstico

La base del diagnóstico del CE lingual es una correcta exploración clínica, sistematizada y ordenada de la cavidad oral y del territorio cervical. La exploración de la parte anterior de la lengua es fácilmente realizable, sin embargo, la base es más complicada de explorar, y frecuentemente requiere el uso de faringoscopia/laringoscopia indirecta o, incluso, de procedimientos endoscópicos.

La palpación cervical es el método más antiguo utilizado para valorar las metástasis cervicales, con un VPP del 75% y un VPN del 83,3% según *Martinez-Gimeno et al.*<sup>16</sup>. Es normal un ganglio hasta 1 cm en todo el cuello, excepto en el área II, que pueden ser normales tamaños hasta de 1,5 cm. La fijación a planos profundos, así como la consistencia dura no elástica, son signos sugestivos de malignidad. El dolor es más típico de lesiones inflamatorias, salvo en estadios avanzados<sup>40</sup>.

El diagnóstico histológico se confirma mediante una biopsia incisional, en cuña o en sacabocados, con un volumen adecuado de tejido viable. Si una biopsia no muestra carcinoma en una lesión clínicamente sospechosa de malignidad, se debe repetir hasta que se confirme el diagnóstico histológico<sup>41</sup>.

La evaluación radiográfica mediante Tomografía Computarizada (TC) o resonancia magnética nuclear (RMN), proporciona información indispensable, en la estadificación y decisión terapéutica inicial. En la lengua, la TC con contraste puede usarse para determinar el alcance de la invasión submucosa y muscular, y los algoritmos óseos son útiles para determinar la presencia de invasión mandibular. La RMN detecta la

diseminación perineural, facilita la detección del reemplazo medular y caracteriza la extensión y el patrón de invasión muscular con mayor sensibilidad que la TC. *Curtin et al.*<sup>42</sup> compararon los resultados de la TC y la RMN para la detección de metástasis en los ganglios linfáticos, utilizando un tamaño de más de 10 mm o una anomalía interna para definir un ganglio metastásico. La TC tuvo un rendimiento ligeramente mejor, con un VPN del 84% para la TC y del 79% para la RM, y un VPP del 50% para la TC y del 52% para la RM.

La tomografía por emisión de positrones (PET-TC) es útil como estudio de extensión sobre todo en estadios avanzados. *Stoekli et al.*<sup>43</sup> concluyeron que el PET-TC mostraba incapacidad para valorar los cuellos N0, especialmente en el caso de micrometástasis, con una sensibilidad del 25% y una especificidad del 88%. Por tanto, su empleo está recomendado en los tumores avanzados de cabeza y cuello (Estadios III-IV), en los tumores de origen desconocido, así como para la detección de recidivas.

La ecografía es una técnica inocua, bien tolerada, pero que es operador-dependiente y proporciona un campo de visión limitado y menos detalles anatómicos que la TC y RMN. Por sí sola, en la evaluación de los ganglios metastásicos presenta una alta sensibilidad, pero una especificidad baja, que mejora sustancialmente al combinarse con la PAAF<sup>44</sup>.

*Stuckensen et al.*<sup>45</sup> compararon la sensibilidad, especificidad y seguridad diagnóstica de TC, RMN, PET-TC y ecografía, en la detección de metástasis cervicales en el CE cavidad oral (Tabla 1).

*Tabla 1: Comparación entre los diferentes sistemas de diagnóstico radiológico*<sup>45</sup>

	<i>ECOGRAFÍA</i>	<i>TC</i>	<i>RMN</i>	<i>PET-TC</i>
<i>Sensibilidad</i>	84%	66%	64%	70%
<i>Especificidad</i>	68%	74%	69%	82%
<i>Seguridad diagnóstica</i>	76%	70%	66%	75%

### 2.1.8 Estadificación

La estadificación precisa del cáncer es importante para la selección del tratamiento, predicción de resultados, así como para el desarrollo de líneas de investigación y actividades de control del cáncer. El sistema TNM fue concebido por *Pierre Denoix* para la clasificación de los tumores malignos, y desarrollado entre los años 1943 y 1952. Posteriormente fue codificado por la *Union for International Cancer Control (UICC)* y la *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*. El objetivo principal del sistema TNM es proporcionar una clasificación anatómica para representar adecuadamente el pronóstico del cáncer, centrándose en 3 factores: extensión del tumor primario (T), metástasis ganglionares (N) y la diseminación a distancia (M). Para mantener la relevancia clínica, son necesarias actualizaciones periódicas de TNM<sup>46</sup>.

La última actualización, publicada en 2017, se corresponde con la 8<sup>a</sup> edición. A nivel de la estadificación del cáncer oral se introducen las siguientes novedades respecto a publicaciones anteriores: inclusión de una nueva clasificación para el carcinoma orofaríngeo mediado por VPH/p16; modificación de la categoría “T” mediante la inclusión de la variable de profundidad de invasión; modificación de la categoría “N” mediante la inclusión de la variable de extensión extranodal (ENE)<sup>47</sup>.

#### *Estadificación Tumoral (T):*

- Tx: Datos insuficientes para valorar el tumor primario
- Tis: Carcinoma in situ (sin penetrar la membrana basal)
- T1: Tumor  $\leq 2$  cm con profundidad de invasión (DOI\*)  $\leq 5$  mm.
- T2: Tumor  $\leq 2$  cm, con DOI  $> 5$  mm o tumor de 2-4 cm con DOI  $\leq 10$  mm.
- T3: Tumor de 2-4 cm con DOI  $> 10$  mm o tumor  $> 4$  cm con DOI  $\leq 10$  mm.
- T4: Tumor invasor de estructuras adyacentes
  - **T4a:** Tumor  $> 4$  cm con DOI  $> 10$  mm o que afecta al hueso mandibular/maxilar\*, seno maxilar, musculatura extrínseca de la lengua o piel.
  - **T4b:** Tumor que invade el espacio masticador, apófisis pterigoides, base del cráneo o que engloba la arteria carótida interna.

**Estadificación Tumoral (N):**

**Nx:** Datos insuficientes para valorar los ganglios linfáticos cervicales.

**N0:** No existe afectación ganglionar linfática cervical.

**N1:** Metástasis en un único ganglio ipsilateral al tumor con un tamaño menor o igual a 3 cm y sin ENE\*.

**N2:**

**N2a:** metástasis en un único ganglio ipsilateral al tumor con un tamaño entre 3 y 6 cm y sin ENE.

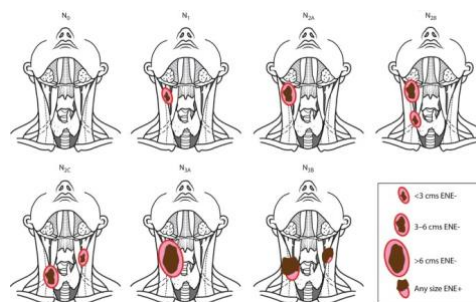
**N2b:** metástasis en múltiples ganglios ipsilaterales al tumor, ninguna mayor de 6 cm y sin ENE.

**N2c:** metástasis en ganglios bilaterales o contralaterales al tumor, ninguna mayor de 6 cm y sin ENE.

**N3:**

**N3a:** metástasis ganglionar mayor de 6 cm y sin ENE.

**N3b:** metástasis ganglionar con sospecha clínica de ENE +



**Figura 5:** Representación gráfica de la clasificación "N" del CE de cavidad oral

**Estadificación Metastásica (M):**

**Mx:** No se puede confirmar la presencia de metástasis a distancia

**M0:** Sin metástasis a distancia

**M1:** Metástasis a distancia.

	Tis	T1	T2	T3	T4a	T4b	M1
N0	Estadio 0	Estadio I	Estadio II				
N1			Estadio III				
N2			Estadio IV a				
N3					Estadio IV b		
M1						Estadio IV c	

**Figura 6:** Estadiaje tumoral del CE de cavidad oral. Guías NCCN 2018

## **2.1.9 Tratamiento del Cáncer de lengua en Estadios precoces (T1/T2)**

### ***Tratamiento del tumor primario***

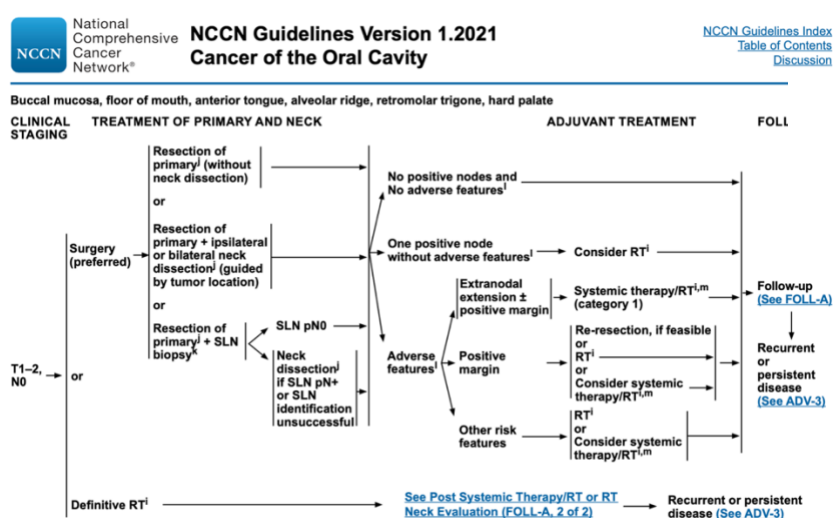
En nuestro medio la cirugía es a menudo el tratamiento inicial más frecuente de los tumores de los dos tercios anteriores de la lengua en estadios precoces (I y II). El objetivo quirúrgico principal es eliminar la masa tumoral sin dejar células malignas residuales, consiguiendo por tanto márgenes de resección negativos. De forma habitual se debe procurar realizar la cirugía con un margen de seguridad de 10 mm. Las lesiones T1-T2 de la lengua oral son adecuadas para una glosectomía parcial, que se puede realizar generalmente mediante un abordaje trans-oral.

La lengua es una de las estructuras más difíciles de reconstruir dentro de la cavidad oral, debido a su papel central en la fonación, la deglución y la protección de las vías respiratorias ejercidos por un complejo sistema de músculos intrínsecos y extrínsecos. Por tanto, los objetivos de la reconstrucción lingual se basan en restablecer la anatomía manteniendo el volumen, con el fin de permitir dichos movimientos. *Engel et al*<sup>48</sup>. en un estudio sobre las distintas técnicas reconstructivas afirman que cuando una glosectomía deja entre el 33 y el 50% de la musculatura original lingual, se debe hacer hincapié en la preservación de la movilidad lingual restante mediante el uso de colgajos delgados y flexibles. Cuando el porcentaje residual de lengua original es menor del 33%, la reconstrucción debe aportar volumen para dirigir secreciones lateralmente hacia la orofaringe, proporcionando contacto lingual con el paladar.

### ***Manejo del Cuello en pacientes N0.***

La afectación de los ganglios linfáticos cervicales es el factor pronóstico más asociado con la supervivencia en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, disminuyendo hasta en un 50% la misma en presencia de metástasis ganglionares<sup>49</sup>. En concreto, el cáncer de lengua y el cáncer de suelo de boca se caracterizan por presentar elevado índice de metástasis linfáticas respecto a otras regiones de la cavidad oral (entre el 30-40% presentan metástasis detectables al momento diagnóstico).

Las guías clínicas indican que el tratamiento electivo del cuello (profiláctico) ha de realizarse cuando el riesgo de metástasis ocultas supera el 15-20%<sup>50</sup>. Incluso, en estadios precoces, presentan entre un 20-40% de metástasis ocultas al diagnóstico<sup>51</sup>. El manejo cervical en pacientes clínica y radiológicamente negativos, ha sido un tema de debate y controversia durante décadas. Continúa existiendo una falta de consenso respecto a los riesgos y beneficios relativos de la disección electiva en el momento de la escisión del tumor primario frente a la observación con disección terapéutica en caso de recidiva ganglionar (Figura 8).



**Figura 7:** Algoritmo terapéutico del CE de cavidad oral T1/T2 N0. Guías NCCN versión 1.2021

“Wait and See”: Algunos estudios no han encontrado beneficios en las tasas de supervivencia, demostrando que la observación reduce la intervención quirúrgica innecesaria hasta en el 70% de los pacientes y se asocia con una disminución de los efectos secundarios como dolor de cuello, disestesia, lesión de la rama marginal y parálisis del nervio accesorio. Consideran que deben explicarse a los pacientes los riesgos y beneficios detallados de cada procedimiento para que ellos tengan la capacidad de elegir, y en el caso de no realizar un vaciamiento cervical asociado a la cirugía, llevar a cabo un seguimiento estrecho<sup>52</sup>. Un estudio retrospectivo de 77 pacientes concluyó que la decisión de “Wait and see” está justificada siempre que se puedan garantizar exámenes regulares mediante punción por aspiración con aguja fina guiada por ecografía en los pacientes no tratados de vaciamiento cervical electivo, sin disminuir las tasas de supervivencias respecto a los que si habían sido tratados<sup>44</sup>.

*Dissección Cervical Electiva:* En 2015, Cruz *et al.*<sup>53</sup> llevaron a cabo un estudio prospectivo randomizado sobre 500 pacientes con cáncer oral (85,5% presentaban CE de lengua) divididos en dos grupos en función del manejo cervical. 245 paciente con disección cervical electiva vs 255 pacientes donde no se trató el cuello y solo se realizó vaciamiento cervical en los casos de recidiva. En el primer grupo, se observaron 81 recurrencias y 50 defunciones, frente a las 146 recurrencias y 70 fallecimientos del segundo. Concluyeron que la disección cervical electiva presentaba mejores tasas de recidiva y supervivencia que la vigilancia estrecha.

*Biopsia selectiva de Ganglio Centinela:* De acuerdo a las guías clínicas, este procedimiento es una alternativa a la disección cervical electiva para el diagnóstico de metástasis cervicales ocultas en estadios precoces de cavidad oral, siempre que exista la experiencia y tecnología suficiente disponible para llevarla a cabo. Su principal ventaja radica en una menor morbilidad y un mejor resultado estético. Los pacientes con enfermedad metastásica en el ganglio centinela deben someterse a una disección completa del cuello, mientras que los negativos, pueden ser observados. Yamauchi *et al.*<sup>54</sup> compararon la biopsia de ganglio centinela Vs Wait and see en 22 pacientes N0 en estadios precoces de cáncer lingual. La tasa de recidiva locorregional fue del 27% en el grupo que se observó frente al 9,1% de ganglio centinela. Thompson *et al.*<sup>55</sup> en el 2013, en su metaanálisis sobre el valor diagnóstico del ganglio centinela en tumores de cabeza y cuello, observaron los siguientes resultados cuando se analizaron sobre tumores de cavidad oral (n=631) : Sensibilidad del 94% (95% IC 89-98%) y un VPN del 96%(95% IC 93-99%). Hingsammer *et al.*<sup>56</sup> en su estudio sobre la utilidad de la biopsia de ganglio centinela sobre una cohorte de 41 pacientes con cáncer de lengua en estadios precoces y un seguimiento medio de 92 meses, observaron un 17% de metástasis ocultas, una recurrencia en el grupo positivo en la biopsia del 0%, y en el grupo negativo del 3%, recomendando así el uso rutinario de esta técnica para el manejo en estadios precoces.

### **2.1.10 Factores Pronósticos**

Resulta de suma importancia analizar qué factores confieren un pronóstico más desfavorable al tumor primario, empeorando la evolución del mismo. Diferenciamos entre factores clínico-demográficos, factores histológicos y factores moleculares.

Factores clínico-demográficos

- **Sexo y raza:** algunos estudios han demostrado un pronóstico desfavorable en pacientes varones, y en la raza hindú.
- **Transfusiones sanguíneas:** *Taniguchi et al.*<sup>57</sup> describen una disminución de la supervivencia en pacientes tratados con más de 3 concentrados de hematíes, probablemente debido a alteraciones en la inmunidad humoral y a una disminución de células T y macrófagos.
- **Tamaño tumoral:** diversos estudios lo relacionan con la supervivencia, disminuyendo la misma a mayor dimensión del tumor<sup>58,59</sup>
- **Adenopatías cervicales:** como ya hemos comentado, la presencia de metástasis linfáticas cervicales es el factor pronóstico independiente más determinante (a excepción de la presencia de metástasis a distancia) en la evolución de los carcinomas epidermoides orales<sup>60,53</sup>.
- **Metástasis a distancia:** constituye el factor más desfavorable, disminuyendo drásticamente la supervivencia. Sin embargo, con el desarrollo de nuevos tratamientos en oncología médica y radioterápica (SBRT), se está produciendo un cambio en la evolución de estos pacientes<sup>61</sup>.
- **Tiempo libre de enfermedad:** cuanto más precoz sea la recidiva, más desfavorable será el pronóstico, con una disminución drástica de la supervivencia.

Factores histológicos clásicos comúnmente establecidos

- **Márgenes de resección afectos:** la ausencia de márgenes libres de enfermedad tumoral en la exéresis quirúrgica implica una menor tasa de supervivencia<sup>62</sup>.
- **Profundidad de invasión tumoral (DOI):** considerado actualmente uno de los factores más decisivos en la aparición de metástasis linfáticas cervicales y asociándose a un peor pronóstico a mayor profundidad tumoral, ha sido incluido en la última actualización del TNM de cavidad oral<sup>63</sup>.
- **Grado de diferenciación tumoral:** la mayor parte de estudios coinciden que es un factor pronóstico independiente y decisivo, observando un pronóstico desfavorable en tumores pobremente diferenciados<sup>64</sup>.
- **Modo de invasión tumoral:** como explicaremos más adelante, los patrones de invasión tipo IV y V presentan una disminución en la supervivencia<sup>65</sup>.

- **Infiltración perineural:** la identificación de células tumorales en el espacio perineural condiciona negativamente el pronóstico y la supervivencia<sup>66</sup>
- **Infiltración linfovascular:** la presencia de células cancerosas en el espacio de revestimiento endotelial condiciona un pronóstico desfavorable<sup>67</sup>.
- **Extensión extranodal:** como ya hemos comentado, la presencia de este hallazgo histológico ha sido incluido en la última actualización del TNM, disminuyendo drásticamente la supervivencia<sup>68</sup>.

### Factores moleculares

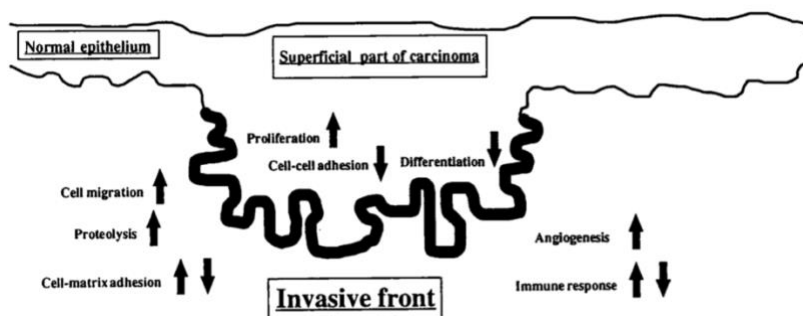
Como ya hemos comentado, la carcinogénesis oral es un proceso multiescalonado, donde las alteraciones genéticas existentes conllevan mutaciones en los oncogenes y genes supresores de tumores. Numerosos estudios han identificado marcadores moleculares que pueden asociarse con el curso clínico y el pronóstico de los tumores que afectan a la cavidad oral. *Bello et al.*<sup>69</sup>, realizan una revisión bibliográfica sobre marcadores moleculares y su significado pronóstico en el cáncer de lengua oral. A continuación, se citan dichos marcadores, resumidos y agrupados por el Doctor Rosado<sup>70</sup> en su trabajo de Tesis Doctoral

- **Receptores de membrana de ligandos extracelulares:** receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR) y receptor del factor de crecimiento epitelial humano tipo 2 (HER2/ c-neu or ErbB-2).
- **Proteínas del ciclo celular:** Ciclina B1, Ciclina D1, p34, Ki-67
- **Supresores tumorales:** p16, p14, p21, p27, Maspina, Proteína de retinoblastoma, p53
- **Moléculas de adhesión:** Proteínas de las uniones estrechas (claudina y ocludina), integrinas, Fak, E-cadherina, CD44,  $\beta$ -catenina, molécula de adhesión epitelial (EpCAM)
- **Metaloproteinasas de la matriz extracelular:** MMP-2 y 9.
- **Marcadores de angiogénesis:** Factor de crecimiento de los fibroblastos (bFGF), Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y CD-34
- **Marcadores relacionados con la apoptosis:** Bcl-2, Bax y Bag-1
- **Marcadores de hipoxia:** HIF-1 y -2, Anhidrasa carbónica, Transportador de glucosa y receptores de eritropoyetina.

## 2.2 RELEVANCIA DEL FRENTE DE INVASIÓN TUMORAL

Las neoplasias malignas contienen subpoblaciones de células tumorales heterogéneas y fenotípicamente diversas. Algunos de estos grupos celulares pueden evolucionar, en última instancia, desarrollando propiedades favorables para su progresión hacia células metastásicas. Estas diferencias probablemente estén moduladas por cambios genéticos, con mayor frecuencia, eventos epigenéticos intra y extracelulares, así como por interacciones celulares con el estroma circundante<sup>71</sup>.

Durante décadas, los patólogos han observado en los carcinomas escamosos de la cavidad oral, que las células tumorales de la parte más profunda mostraban características sustancialmente distintas de las células localizadas en la parte central y superficial<sup>72</sup>. Esta zona, correspondiente con las capas celulares más profundas del tumor y la interfaz con el tejido sano se denomina frente invasivo tumoral (*Invasive Tumor Front, ITF*). Como ya hemos comentado, el comportamiento agresivo del carcinoma oral subyace en la alteración de los mecanismos que controlan la diferenciación celular, la migración, la renovación celular, la apoptosis, y las interacciones epiteliales-mesenquimales en la interfaz tumor-huésped. Uno de los hallazgos más prometedores ha sido el reconocimiento de la importancia de las características morfológicas y moleculares de las células del ITF en la estadificación de la agresividad biológica del cáncer oral, puesto que, según numerosos estudios, reflejan mejor el pronóstico que otras regiones del tumor.



**Figura 8:** Representación esquemática de los cambios moleculares a nivel de ITF

Se ha demostrado que el ITF presenta, con frecuencia, un menor grado de diferenciación y un mayor grado de disociación celular que las partes centrales y superficiales de la misma neoplasia, siendo esta área donde presumiblemente se localizan

las subpoblaciones celulares más agresivas. Distintos eventos moleculares resultan fundamentales en la diseminación tumoral encontrándose presentes en el ITF y en la interfase tumor huésped.

Estos eventos moleculares a nivel del ITF podrían resumirse en<sup>73</sup>:

- Cambios en la matriz extracelular: La progresión de los tumores se asocia con una reorganización de la matriz extracelular, donde los componentes resultantes de la degradación de la misma desempeñan un papel fundamental en la invasión de las células tumorales.
- Cambios en las moléculas de adhesión intercelular: Existen principalmente cuatro clases de moléculas encargadas de la adhesión intercelular: cadherinas, inmunoglobulinas, selectinas y algunos tipos de integrinas. Estas glicoproteínas presentes en la superficie celular desempeñan un papel fundamental en la morfogénesis de los tejidos epiteliales permitiendo las uniones intercelulares. Distintos estudios han demostrado que la subexpresión de E-cadherina, CD44 en las células del ITF se asociaron con una reducción de la supervivencia. La pérdida de expresión de Beta-catenina se asoció con un aumento de la incidencia de metástasis linfáticas<sup>74</sup>.
- Sobreexpresión de enzimas proteolíticas: Una vez que las células tumorales se adhieren a la matriz extracelular debe producirse una degradación proteolítica para que las células tumorales invasoras se muevan y se diseminen. La actividad proteolítica es especialmente evidente en el ITF, demostrando una estrecha relación con la invasión tumoral. La actividad de las enzimas proteolíticas asociadas a tumores, dependen más del microambiente tumoral que de las propiedades inherentes de la célula cancerosa.
- Aumento de expresión de moléculas relacionadas con la proliferación celular: Existe una sobreexpresión de moléculas relacionadas con la proliferación celular a nivel del ITF superior a las áreas más centrales y superficiales de la masa tumoral, presentando una relación directa con el pronóstico.

### 2.2.1 Sistemas Clásicos de Gradación Histológica del ITF

Actualmente, la mayoría de los profesionales utiliza la clasificación clínica TNM (ya descrita en apartados anteriores) para determinar el pronóstico y orientar la actitud terapéutica en los CE de cavidad oral. Sin embargo, tumores dentro de un mismo estadio, pueden presentar diferente patrón de crecimiento y agresividad. A lo largo de la historia, los patólogos han intentado crear distintos sistemas de graduación histológica reproducibles, que permitan predecir con mayor exactitud el comportamiento biológico y por tanto el pronóstico de los tumores.

La clasificación histopatológica de los CE fue introducida por primera vez en 1920 por *Broders et al.*<sup>75</sup>. Su sistema se basaba en clasificar las células tumorales en función de su similitud con respecto al epitelio normal, categorizando las neoplasias en función de su grado de diferenciación celular. Fue empleado en distintas neoplasias de estirpe epitelial para predecir su pronóstico. A pesar de que este sistema fue ampliamente utilizado, era difícilmente reproducible y tenía un valor pronóstico limitado, puesto que solo incluía las poblaciones de células tumorales sin considerar la actividad biológica del tumor en relación con el tejido huésped. *Cade S. et al.*<sup>76</sup> en 1957, en un estudio sobre 653 pacientes con carcinoma de lengua no encontraron una asociación entre el grado de diferenciación y el pronóstico.

En 1973, *Jakobsson et al.*<sup>77</sup> propusieron un sistema novedoso de clasificación patológico con el fin de obtener una mayor precisión en la estadificación de las neoplasias. Este sistema comprendía diferentes parámetros morfológicos (cada uno calificado con una puntuación de 1 a 4) y media, de forma independiente, factores relacionados con las características de las células tumorales y otros relacionados con la interacción tumor-huésped. Posteriormente, *Anneroth et al.*<sup>78,79</sup> en 1986 y 1987 añadieron modificaciones en el sistema de multifactorial de *Jakobsson*, introduciendo criterios más precisos (Figura 10).

En 1989, *Bryne et al.*<sup>80</sup> introdujeron un sistema de graduación histológica de malignidad (*Invasive Front Grading Score*) para analizar con mayor precisión el comportamiento biológico del tumor. Este sistema estudia exclusivamente las áreas que presentaban mayor anaplasia en el ITF y la interfase entre el tumor y el huésped. Los

parámetros estudiados son: el grado de queratinización, el polimorfismo nuclear, el patrón de invasión y el infiltrado linfocitario (eliminando el número de mitosis por campo propuesto por *Anneroth* al considerar gran dificultad en su reproducibilidad).

**A**

**Table 1**  
*Histologic grading of malignancy. Tumour cell population*

	Points			
	1	2	3	4
Structure	Papillary and solid cords	Strands	Small cords and groups of cells	Marked cellular dissociation.
Differentiation	Highly: keratin.	Moderately: some keratin.	Poorly: minimal keratin.	Poorly: no keratin.
Nuclear polymorphism	Few enlarged nuclei	Moderate number of enlarged nuclei	Numerous irregular enlarged nuclei	Anaplastic, immature enlarged nuclei
Mitoses	Single	Moderate number	Great number	Numerous

**B**

**Histologic grading of malignancy of tumour cell population**

Morphologic parameter	Points			
	1	2	3	4
Degree of keratinization	Highly (>50% of the cells)	Moderate (20-50% of cells)	Minimal (5-20% of cells)	None (0-5% of cells)
Nuclear polymorphism	Little (>75% mature cells)	Moderately abundant (50-75% mature cells)	Abundant (25-50% mature cells)	Extreme (0-25% mature cells)
Number of mitotic cells/high-power field	0-1	2-3	4-5	>5

**Histologic grading of malignancy of tumour-host relationship**

Pattern of invasion	Points			
	1	2	3	4
Pattern of invasion	Pushing, well-delimited infiltrating borders	Infiltrating, solid cords, bands and/or strands	Small groups or cords of infiltrating cells (n > 10)	Marked and wide-spread cellular dissociation in small groups of cells (n < 10) and/or in single cells
Stage of invasion (depth)	Carcinoma in situ and/or questionable invasion	Distinct invasion, but involving lamina propria only	Invasion below lamina propria adjacent to muscles, salivary gland tissues and perosteum	Extensive and deep invasion replacing most of the stromal tissue and infiltrating jawbone
Lympho-plasmocytic infiltration	Marked	Moderate	Slight	None

**Table 2**  
*Histologic grading of malignancy. Tumour-host relationship*

	Points			
	1	2	3	4
Mode of invasion	Well defined borderline	Cords, less marked borderline	Groups of cells; no distinct border line	Diffuse growth
Stage of invasion	Possibly	Micro-carc. (few cords)	Nodular into connect. tissue	Massive
Vascular invasion	None	Possibly	Few obvious	Numerous
Cellular response (plasmolymphocytic)	Marked	Moderate	Slight	None

**Figura 9:** Sistemas de Gradación Histológica. Jakobsson 1973<sup>77</sup>. Anneroth 1986<sup>78</sup> (B)

En 1995, *Martínez Gimeno et al.*<sup>81</sup> crearon un sistema de gradación histológica para evaluar el riesgo de metástasis en los carcinomas de cavidad oral y así poder predecir la realización de un vaciamiento cervical electivo en estadios precoces. En este sistema se analizan 7 parámetros: estadio T, invasión vascular, grado tumoral, espesor tumoral, interfase tumor-huésped, infiltrado inflamatorio e infiltración perineural. Se asigna una puntuación a cada subgrupo. En su estudio sobre una muestra de 126 pacientes de carcinoma oral, una puntuación menor o igual a 13 asociaba un riesgo de metástasis prácticamente de 0. Por encima de 16, un riesgo muy elevado, en el que recomendaban realizar la disección cervical asociada.

Por tanto, como hemos explicado, el estudio del ITF en el carcinoma oral puede aportar una información pronóstica integral sobre la capacidad invasiva y metastásica, donde presumiblemente, residen poblaciones de células tumorales con mayor grado de agresividad.

### 2.2.2 Modo de invasión tumoral

De todos los parámetros analizados en los distintos sistemas de gradación histológica a nivel del ITF, el modo en el cual el tumor invade los tejidos adyacentes es el que mayor valor pronóstico ha mostrado. Los tumores que muestran una marcada disociación, se asocian a una peor evolución.

Uno de los sistemas más recientes de estadificación del patrón de invasión tumoral (*Pattern of Invasion, POI*) en el CE oral, es el propuesto por *Brandwein-Genslert et al.*<sup>82</sup>, en el que añaden un nuevo apartado a la clasificación establecida por Bryne et al<sup>80</sup>:

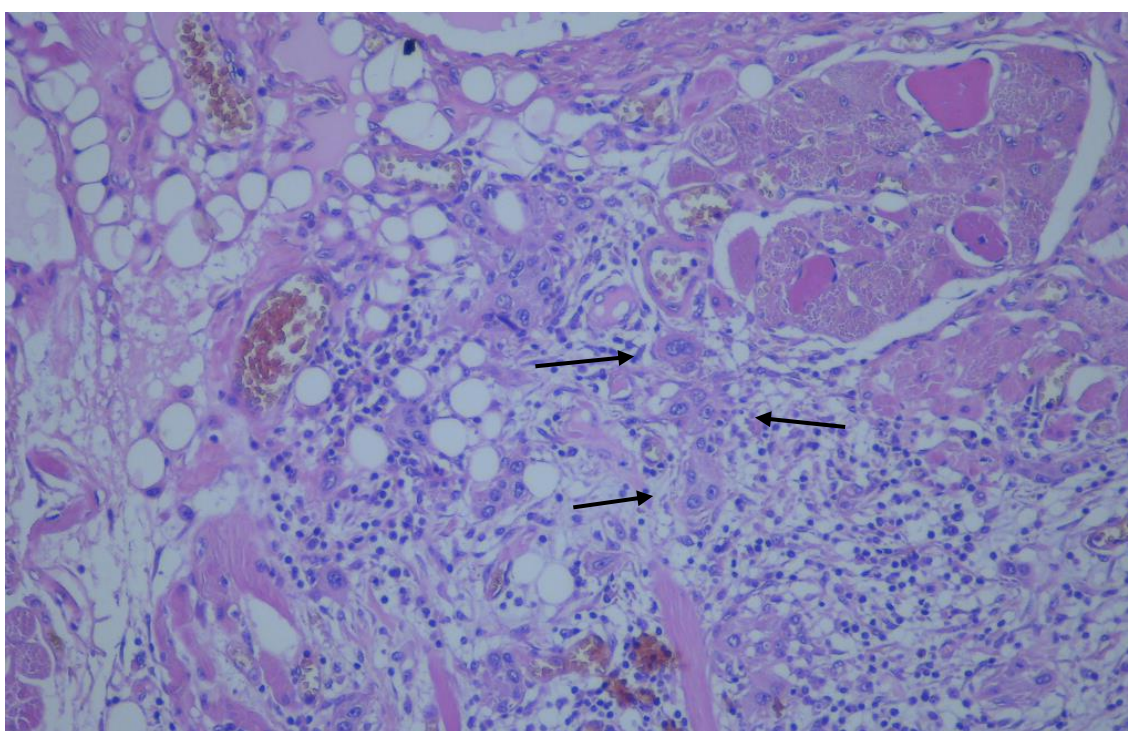
- POI 1: margen cohesivo, donde las células tumorales avanzan haciendo un frente bien definido que empuja el tejido adyacente.
- POI 2: Márgenes que infiltran en cordones sólidos, en “forma de dedo”.
- POI 3: Márgenes no cohesivos, con presencia de islotes celulares grandes (>15 células tumorales).
- POI 4: Márgenes no cohesivos, con presencia de islotes celulares pequeños (< 15 células tumorales).
- POI 5: Presencia de agrupaciones tumorales “satélite” de cualquier tamaño, a más de 1 mm de la masa tumoral principal.

Además, incluyeron dos nuevas técnicas de valoración, incluyendo el patrón predominante de invasión tumoral (*Predominant Pattern of Invasion, PPOI*: se realiza una media de los distintos patrones hallados en las distintas secciones histológicas) y el peor patrón de invasión tumoral (*Worst Pattern of Invasion, WPOI*: se toma como referencia el peor de los patrones hallados en todos los cortes). El WPOI es un predictor validado para pacientes con CE de cavidad oral en distintos análisis multivariantes. Para simplificar el pronóstico y mejorar las técnicas de validación entre distintos centros, el manual de la AJCC en su 8ª edición estableció como factor histológico pronóstico independiente la presencia de WPOI 5, pues se ha demostrado una asociación estadísticamente significativa con la recurrencia locorregional (cercana al 42%) y la supervivencia específica de la enfermedad<sup>47</sup>.

## 2.3 TUMOR BUDDING

### 2.3.1 Concepto

Se define *Tumor Budding* (TB) como la presencia de células epiteliales tumorales aisladas, o formando pequeños grupos (también denominados *buds o clusters*) de hasta 5 células, a nivel del ITF y/o en el estroma circundante (Figura 11). Estos “buds” representan la separación de células indiferenciadas del resto de la masa tumoral principal, y ponen de manifiesto dos propiedades que favorecen un comportamiento tumoral más agresivo: la pérdida de cohesión celular y un aumento de la capacidad de invasión<sup>83</sup>.



*Figura 10: Presencia de TB en el ITF en tinción con H-E. Objetivo 20x*

### 2.3.2 Historia

El concepto de TB no es reciente. Fue descrito por primera vez en la literatura científica en 1949 por *Imai et al.*<sup>84</sup>, cuando propuso un sistema de estadificación patológico para el cáncer basado en 3 parámetros: El “brote” de células tumorales (lo que actualmente conocemos como TB), la reacción estromal peritumoral y la invasión linfovascular. Estas células del “brote” parecían estar menos diferenciadas, presentaban

núcleos grandes, y ausencia de cohesión entre las mismas. Pocos años después, *Yokota et al.*<sup>85</sup> en 1957 y *Enjoji et al.*<sup>86</sup> en 1958 informaron de la correlación de este sistema de clasificación histológica con el pronóstico en el cáncer de recto, lengua, laringe, mama y cuello uterino. Sin embargo, después de estas publicaciones, las referencias al concepto de TB desaparecieron de la literatura científica.

A mediados de la década de los 80, *Gabbert et al.*<sup>87</sup> describieron de forma independiente un fenómeno compatible con la definición de TB, en cánceres de colon inducidos experimentalmente en ratones tratados con diclorhidrato de dimetilhidrazina. El ITF de las lesiones mostró una elevada desorganización a nivel de la arquitectura tumoral, junto con una desdiferenciación celular. Estos cambios finalmente ponían de manifiesto la presencia de células tumorales aisladas, que mostraron un fenotipo uniforme, independientemente del grado de diferenciación de la masa tumoral principal. El fenotipo de estas células tenía características compatibles con un aumento de la movilidad (pérdida de uniones intercelulares y uniones con la membrana basal, presencia de microfilamentos citoplasmáticos y una forma celular versátil), razón por la cual se sugirió que estas características compatibles con la locomoción permitían a las células cancerígenas independizarse de la masa tumoral principal, seguido posteriormente por la invasión de los tejidos del huésped. A finales de los años 80, se volvieron a publicar estudios demostrando la asociación del TB con las metástasis ganglionares linfáticas en estadios precoces de carcinoma de estómago<sup>88</sup> y en el carcinoma colorectal<sup>89</sup>.

*Morodomi et al.*<sup>90</sup> demostraron en su estudio sobre carcinoma rectal en estadios avanzados, que la presencia de TB predecía la invasión linfática por el tumor. En los años 90, *Hase et al.*<sup>91</sup> demostraron la asociación del TB con otros factores clínico-patológicos como el grado tumoral, el estadio, la invasión perineural y linfovascular. Suponían que estas células más indiferenciadas localizadas en el espacio intersticial y desprendidas de la masa tumoral principal presentaban mayor actividad biológica y eran el prelude de la invasión linfática. Además, sentaron las bases para su cuantificación y evaluación. Demostraron que un alto índice de TB se asociaba con mayor índice de recurrencia y menor tasa de supervivencia.

Durante los años siguientes fueron escasas las publicaciones que mencionaron este hallazgo histológico, hasta que ya en la década de los 2000, el concepto del *Tumor*

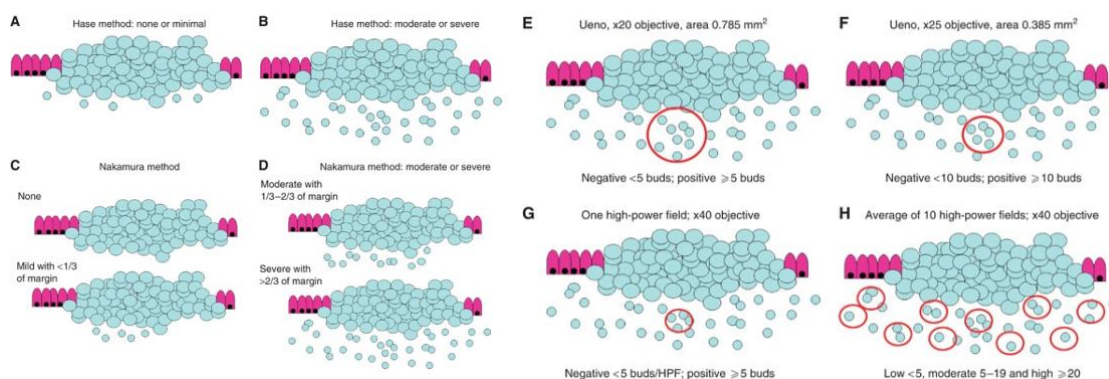
*Budding* comenzó a tomar relevancia, creciendo de forma exponencial los estudios que describían este hallazgo tanto de forma morfológica como su biología molecular. A pesar de que hasta entonces el ámbito de estudio principal había sido el carcinoma de colon y recto, en esta década ya comenzó a describirse el papel pronóstico del TB en los carcinomas de cabeza y cuello, principalmente en los localizados en cavidad oral.

### 2.3.3 Metodología diagnóstica

Generalmente, la presencia de TB es fácilmente identificable en secciones teñidas con Hematoxilina-Eosina (H-E). En la mayoría de los estudios, su cuantificación se realiza sobre esta tinción. Los mínimos requerimientos técnicos y su amplia disponibilidad favorecen que pueda ser un factor diagnóstico reproducible. Sin embargo, existen ciertas situaciones, como son el infiltrado peritumoral elevado o una reacción estromal excesiva (en la que los fibroblastos aparecen agrandados y atípicos) donde sea complicado distinguir y contabilizar los *Buds*. En estos casos, se ha descrito el empleo de técnicas inmunohistoquímicas basadas en la tinción con citoqueratina, que permiten una fácil identificación, una clasificación más rápida y por tanto acortan el tiempo de trabajo<sup>83</sup>.

Expuestas estas dos metodologías de trabajo, las recomendaciones para informar acerca de la presencia de TB consensuadas en 2016 para el carcinoma colorrectal en la Conferencia Internacional para el Consenso del Tumor Budding (*International Tumor Budding Consensus Conference, ITCC*) concluyen que la detección y conteo se realizará sobre tinciones con H-E<sup>83</sup>. En los tumores de cabeza y cuello, aún no existen protocolos definidos y establecidos sobre las tinciones donde debe ser evaluado el TB.

En cuanto a su categorización, existen distintos parámetros para evaluar su intensidad, desde recuentos absolutos hasta el establecimiento de puntos de corte, empleando sistemas de tres niveles de intensidad (alto, moderado o bajo) o de dos niveles (alto y bajo) para su clasificación. A pesar de existir distintos sistemas de puntuación, como los propuestos por *Hase et al.* (1993), *Ueno et al.* (2002) y *Nakamura et al.* (2005) la literatura científica avala su análisis como un marcador fiable y reproducible independientemente del sistema de evaluación utilizado<sup>92</sup>.



**Figura 11:** Sistemas de recuento del TB en el ITF: Hase et al. 1993 (A,B); Nakamura et al. 2005 (C,D); Ueno et al. 2002 (E,F); Un campo de aumento (G); 10 campos de aumento (H)<sup>92</sup>

### 2.3.4 Transición epitelio-mesenquimal

El concepto de Transición Epitelio-Mesenquimal (TEM) fue descrito por primera vez por *Elizabeth Hay* y *Gary Greenburg*<sup>93</sup>, y hace referencia al proceso mediante el cual una célula de estirpe epitelial polarizada, que normalmente interactúa con su membrana basal, pierde sus uniones intercelulares y su organización, para adquirir, de manera temporal, un fenotipo mesenquimal en respuesta a un estímulo externo o interno. Estas células, presentan una capacidad migratoria aumentada, mayor capacidad de invasión, una producción elevada de componentes de la matriz extracelular, y una resistencia a la apoptosis. Para que una célula epitelial consiga esta transformación, debe sufrir una serie de cambios morfológicos y moleculares mediados por la activación y represión de genes involucrados en las rutas de señalización específicas que definen la forma y organización del citoesqueleto<sup>94</sup>.

El tejido epitelial se caracteriza por la presencia de una interacción cohesiva intercelular, sustentada en la formación de capas celulares con tres dominios de membrana (apical, basal y lateral). Estas uniones intercelulares, impiden el movimiento de las células epiteliales dentro de cada capa celular. La expresión de proteínas como integrinas, citoqueratinas y E-cadherinas constituyen los principales marcadores moleculares de las células de estirpe epitelial. Por el contrario, el tejido mesenquimal, se caracteriza por la pérdida de interacción intercelular, ausencia de polarización, y un aspecto morfológico alargado, con la presencia de prolongaciones denominadas

filopodios. Entre los marcadores moleculares de las células de estirpe mesenquimal destacan la vimentina, la actina de músculo liso y la N-cadherina.

Los principales cambios en el proceso de TEM son la desestabilización coordinada de las uniones intercelulares y la estimulación de asociaciones dinámicas célula-matriz extracelular indispensables para la locomoción celular<sup>95</sup>. La TEM comienza cuando disminuye la expresión de claudinas y ocludinas, generando una pérdida de polaridad apical-basal, a medida que se van deshaciendo las uniones estrechas<sup>96</sup>. Cuando la E-cadherina se libera de la membrana y se degrada, las uniones intercelulares adherentes empiezan a desensamblarse, separándose los desmosomas y debilitando las uniones tipo *gap*. Posteriormente, la E-cadherina, es reemplazada por la N-cadherina e integrinas, que favorecen las uniones transitorias induciendo un fenotipo mesenquimal<sup>97,98</sup> (Figura 13).

Estas células epiteliales que ahora presentan un fenotipo mesenquimal, se caracterizan por presentar una forma alargada, parecida a la de los fibroblastos, una subregulación de marcadores de superficie y componentes del citoesqueleto propios de las células epiteliales (E-cadherina, claudinas, ocludinas), una sobreexpresión de marcadores mesenquimales (N-cadherina, vimentina, actina de músculo liso), una sobreexpresión o translocación nuclear de factores de transcripción específicos (*Snail*, *Slug*, *ZEB 1/2*, *Twist 1/2*), resistencia a la apoptosis, aumento de la capacidad de invasión y migración a través de la matriz extracelular sin contacto célula- célula<sup>99,100</sup>.

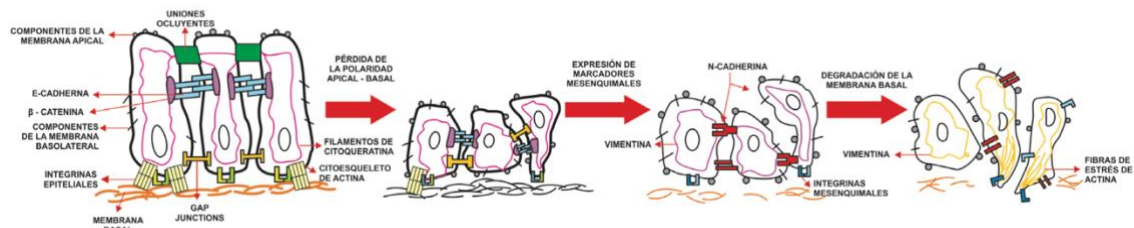


Figura 12: Representación esquemática del proceso de transición epitelio-mesenquimal<sup>101</sup>

La TEM se ha descrito tanto en procesos biológicos normales (embriogénesis y reparación de tejidos), como en procesos neoplásicos<sup>102,103</sup>.

- *TEM y embriogénesis*: asociado con el proceso de implantación, formación embrionaria y desarrollo de órganos. Las células trofoectodérmicas y

citotrofoblásticas sufren un proceso de TEM que les ayuda a invadir el endometrio y formar la placenta. También se observa en el proceso de gastrulación de un óvulo fertilizado, donde la capa epiblastica sufre una pérdida de expresión de E-cadherina, adquiriendo características migratorias que les permiten invaginarse para generar el mesodermo<sup>104</sup>.

- *TEM y reparación tisular*: las células epiteliales, bajo la influencia de células inflamatorias, logran separarse de la capa epitelial y de la membrana basal para acumularse en la zona intersticial, adquiriendo un fenotipo fibroblástico o miofibroblástico, capaz de generar colágeno y favorecer la reparación tisular.
- *TEM y neoplasias*: algunas de las subpoblaciones celulares de los tumores de estirpe epitelial, sobre todo, las correspondientes con las localizadas en el ITF, exhiben cambios en su estructura génica a favor de la proliferación, que favorecen la activación parcial o completa del proceso de TEM. Se ha observado que la capacidad invasiva y metastásica está relacionada con la aparición de mecanismos de TEM, donde las células tumorales sufren cambios moleculares que les permiten invadir los tejidos locales, acceder a los vasos y transitar a través del sistema linfático y sanguíneo, extravasándose en tejidos parenquimales y finalmente, generando micrometástasis en localizaciones distantes respecto a donde se originó el tumor primario. Se ha observado en estos casos, una sobreexpresión de marcadores mesenquimales como la  $\alpha$ -SMA, FSP1, vimentina y desmina y la pérdida en la expresión de marcadores epiteliales como la E-Cadherina<sup>105,106</sup>.

Diversos estudios científicos muestran una fuerte asociación entre el TB y fenómenos parciales de TEM. Varios estudios han demostrado que la expresión de E-cadherina a nivel de membrana celular de los Buds se redujo en comparación a la masa tumoral principal, mientras que los niveles de Vimentina (como marcador estromal) fueron positivos en los Buds, pero no a nivel del resto de células del tumor<sup>107,108</sup>.

*Attramadal et al.*<sup>109</sup> en una muestra de 62 casos de carcinoma escamoso oral observaron que más de la mitad de tumores que sobreexpresaron N-Cadherina asociaban altos índices de TB, indicando mayor capacidad invasiva de los mismos.

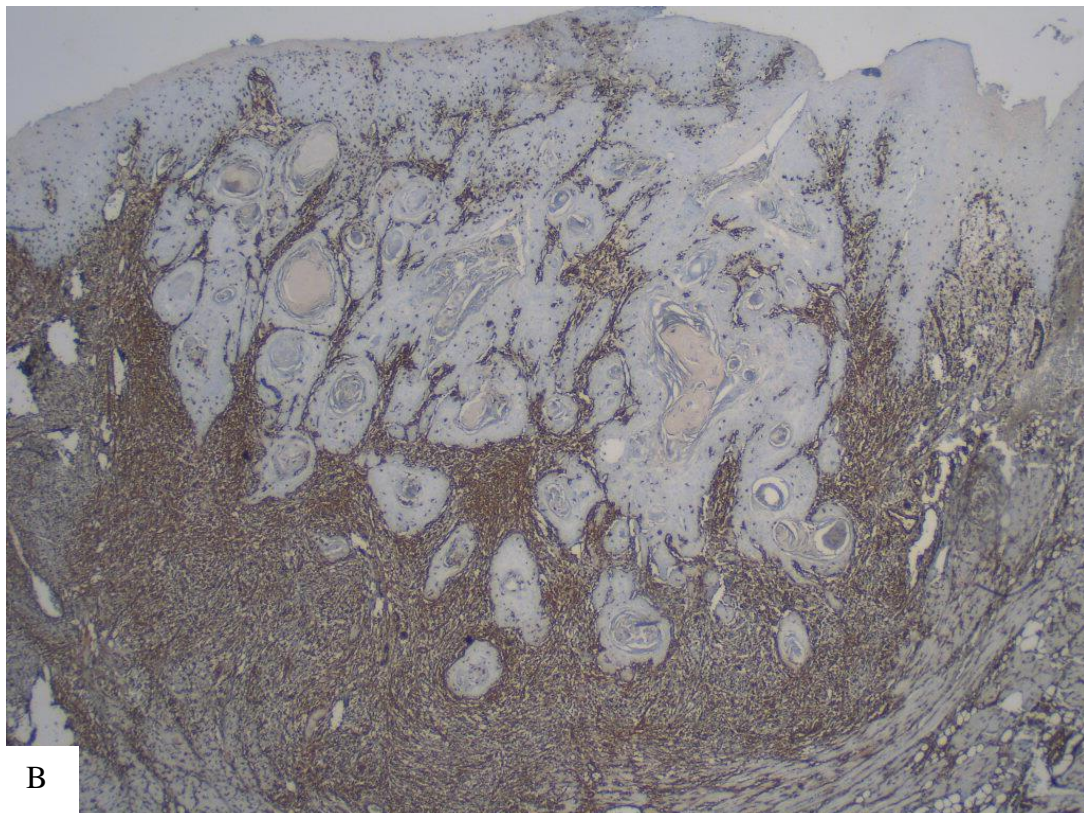
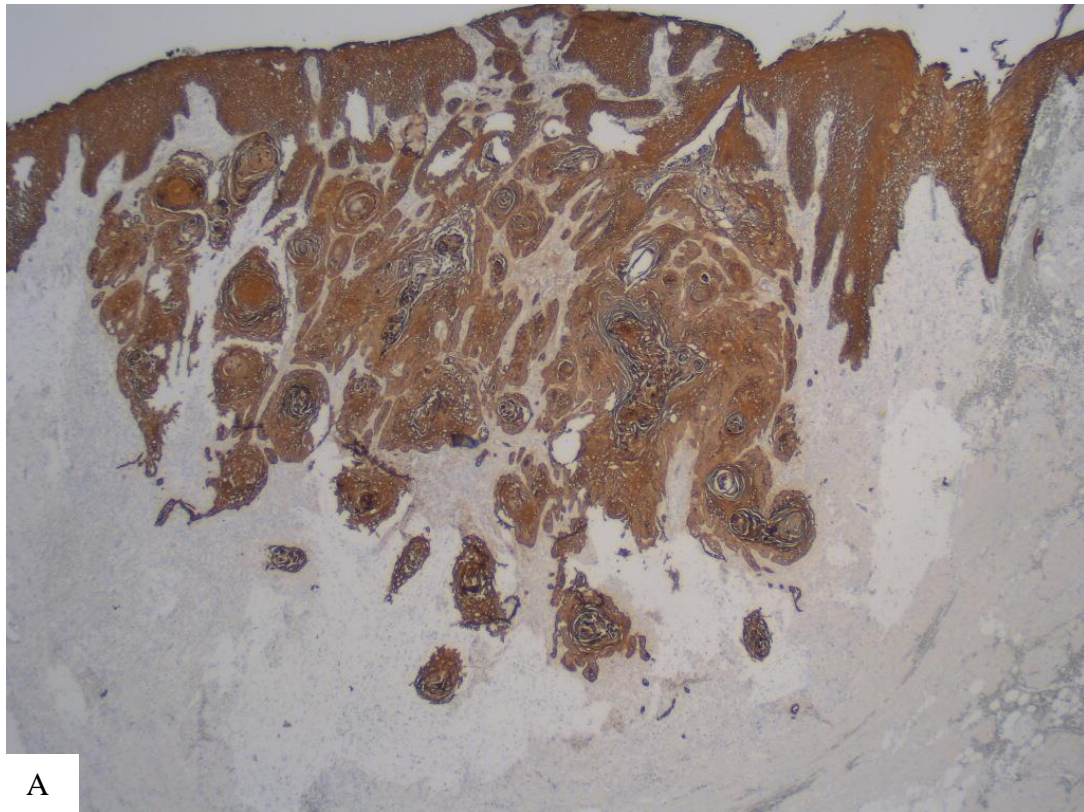
*Jensen et al.*<sup>110</sup> demostraron la sobreexpresión de los genes ZEB1 y PPRX, ambos factores de transcripción en la TEM en los Buds, así como la subexpresión de OVOL1, KLFs y GRHLs, factores de transcripción en la TEM. Sugieren que existe una asociación entre los Buds y la señalización activada del TGF-Beta que conduce a la TEM.

También se ha observado en CE orales, una asociación entre índices altos de TB y una sobreexpresión de miofibroblastos estromales que proporcionan un ambiente propicio para el desarrollo de un fenotipo invasivo, dada su capacidad para modificar la matriz extracelular<sup>111</sup>. La Laminin-5 gamma 2, proteína asociada con un fenotipo migratorio, se encuentra sobreexpresada en tumores con altos índices de TB<sup>112</sup>.

*Marangón et al.*<sup>113</sup> en un estudio sobre 163 pacientes con carcinoma escamoso oral encontraron una asociación significativa entre la proliferación celular (medida mediante la expresión de Ki-67) y la intensidad de TB. También comprobaron que el índice de proliferación fue superior en las áreas del TB en comparación con otras regiones del tumor, concluyendo la asociación entre el TB y un comportamiento biológico tumoral más agresivo.

El aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1), sobre todo su isotipo A1, es un enzima que se ha relacionado con la oncogénesis, considerándose un marcador en estudios inmunohistoquímicos para identificar células madre (normales y tumorales). Podría desempeñar un papel clave en la regulación del crecimiento, la diferenciación de células normales y tumorales, influyendo sobre distintas características fenotípicas<sup>114</sup>. Se ha observado que la expresión de ALDH1 es mayor en áreas con alta intensidad de TB en comparación con otras zonas de la masa tumoral. Este hallazgo sugiere que en los *Buds* se encuentran células con un fenotipo similar al de células madre, predisponiendo por tanto a un comportamiento biológico más agresivo, con propiedades aumentadas de migración e invasión<sup>115</sup>.

En definitiva, el TB se considera una representación histológica de dos características que aportan mayor agresividad a los tumores: pérdida de cohesión celular y capacidad de invasión activa. Es de suponer, que los cambios moleculares que suceden en estas células a nivel del frente invasivo tumoral las dotan de una mayor actividad biológica con un comportamiento tumoral más agresivo.



**Figura 13:** Misma sección tumoral teñida con Citoqueratina A1/AE3, marcador epitelial (A) y con Vimentina, marcador mesenquimal (B). Objetivo 1,6x.

### 2.3.5 Significación pronóstica

El carcinoma colorrectal (CCR) es la neoplasia donde más ampliamente ha sido estudiado y protocolizado el valor pronóstico del TB. Se considera un factor predictor independiente de metástasis en ganglios linfáticos en el CCR pT1. Es un predictor independiente de supervivencia en el CCR Estadio II. Debe analizarse sistemáticamente junto con otras características patológicas<sup>116</sup>. Los protocolos para el examen de piezas quirúrgicas correspondientes con CCR primarios de la Sociedad Americana de Patólogos incluyen desde el 2017 la categorización de TB en tres niveles (bajo, moderado y alto)<sup>117</sup>.

En el caso de los carcinomas escamosos de cavidad oral, distintos estudios muestran también una fuerte asociación entre la presencia de índices elevados de TB y las metástasis linfáticas. También como factor pronóstico independiente en la supervivencia. En el carcinoma de lengua, se ha propuesto algún modelo histológico pronóstico que analiza el DOI y el índice de TB en comparación con otros sistemas de gradación histológica multifactorial obteniendo buenos resultados<sup>118</sup>.

Distintos estudios han valorado el significado diagnóstico del TB en biopsias preoperatorias de CE orales y así poder predecir su agresividad con el fin de adoptar la actitud terapéutica más adecuada en estadios precoces<sup>119</sup>. Una revisión sistemática reciente ha demostrado que el análisis del TB preoperatorio tiene un valor pronóstico significativo para las metástasis cervicales linfáticas, supervivencia general y supervivencia libre de enfermedad<sup>120</sup>. Sin embargo, en la actualidad, no se ha sistematizado su evaluación, ni se ha establecido como factor histológico pronóstico en ninguna clasificación en los tumores de cabeza y cuello.



## **III.HIPÓTESIS**

El Tumor Budding, definido como la presencia de células sueltas o formando pequeños grupos celulares a nivel del frente de invasión tumoral, se considera una representación histológica de dos propiedades celulares que confieren mayor agresividad a los tumores: pérdida de cohesión celular y capacidad de invasión activa.

Basándonos en estudios previos realizados sobre neoplasias de estirpe epitelial, se plantea en el presente trabajo que la presencia de un alto Índice de Tumor Budding se asocia a un comportamiento tumoral más agresivo, aumentando el riesgo de metástasis linfáticas en los ganglios cervicales y empeorando el pronóstico de los pacientes en estadios iniciales de carcinoma escamoso de lengua oral.



## **IV.OBJETIVOS**

- *Objetivo 1: Analizar la metodología diagnóstica del Tumor Budding. Cuantificar la presencia de Tumor Budding en el frente de invasión tumoral en tinciones con Hematoxilina-Eosina y su posterior confirmación mediante estudio inmunohistoquímico con Citoqueratina A1-AE3, con el fin de valorar diferencias en la metodología diagnóstica y reproducibilidad.*
  
- *Objetivo 2: Evaluar la relación existente entre las características clínicas e histológicas del tumor primario y el índice de Tumor Budding.*
  
- *Objetivo 3: Valorar las características inmunohistoquímicas (E-Cadherina, Ki-67) presentes en el frente de invasión tumoral y su relación con el índice de Tumor Budding.*
  
- *Objetivo 4: Estudiar el significado pronóstico del índice de Tumor Budding en relación con la aparición de metástasis linfáticas cervicales.*
  
- *Objetivo 5: Identificar la repercusión del índice de Tumor Budding sobre el tiempo libre de enfermedad y la supervivencia.*



## **V.MATERIAL Y MÉTODOS**

## 5.1 Tipo de estudio

Se ha llevado a cabo un estudio analítico observacional de tipo longitudinal retrospectivo, sobre una serie de casos (61 pacientes) de carcinoma escamoso de lengua oral, sometidos a cirugía con intención curativa, por el servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM), en un período comprendido entre el 1 de enero de 2010 y el 31 de diciembre de 2019.

## 5.2 Marco del estudio y fuentes de información

El presente estudio se ha llevado a cabo sobre la población de la Comunidad Autónoma de Madrid que, en el año 2019, contaba con 6.663.394 habitantes, con un 52% de mujeres y un 48% de hombres. Teniendo en cuenta la edad y sabiendo que el CE de lengua se presenta principalmente en mayores de 55 años, conviene destacar que el 30% de los habitantes de la comunidad de Madrid son mayores de 55 años, y aproximadamente el 18% tienen más de 65 años. Al HGUGM, le corresponde la atención de la población en el área que engloba los municipios de la zona sureste de la Comunidad de Madrid (eje de la carretera nacional III, Corredor de Henares, y los distritos municipales de Puente de Vallecas, Villa de Vallecas, Moratalaz, Vicálvaro y Retiro). El servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial atiende a una población de 1.236.677 habitantes. Esta cifra, es el resultado de la población correspondiente con su área de acción (321.500 habitantes), así como la derivación de pacientes de otros centros del área del Sureste de la Comunidad de Madrid que carecen de esta especialidad: Hospital Severo Ochoa de Leganés (193.000), Hospital de Fuenlabrada (226.000), Hospital del Sureste en Arganda del Rey (183.000), y Hospital Infanta Leonor en Vallecas (307.000).

Las fuentes de información consultadas para identificar los pacientes candidatos a generar el estudio fueron las siguientes: Relación de números de Historias Clínicas de pacientes registrados con el diagnóstico de cáncer de lengua en el Comité de Tumores de Cabeza y Cuello del HGUM; Archivo de partes de quirófano del Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del HGUGM, Archivo Central e Historias Clínicas del HGUGM en la intranet, y el Archivo de Muestras Histológicas del Servicio de Anatomía Patológica.

### 5.3 Criterios de inclusión y exclusión

En el presente trabajo se han estudiado pacientes con diagnóstico histológico confirmado de carcinoma escamoso lingual, intervenidos por el servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del HGUGM, entre los años 2010-2019, y que cumpliesen los siguientes criterios:

#### *Criterios de inclusión:*

- Carcinoma escamoso lingual confirmado histológicamente.
- Tumor localizado en lengua oral, según clasificación de la AJCC (se descartaron tumores de base de lengua y suelo de boca).
- Pacientes en estadio inicial clínico-radiológico preoperatorio (T1/T2 N0).
- Pacientes intervenidos quirúrgicamente mediante extirpación tumoral y linfadenectomía cervical electiva asociada.
- Pacientes controlados postquirúrgicamente con un período mínimo de 3 años de seguimiento

#### *Criterios de Exclusión*

- Pacientes con patología tumoral previa en región cérvico-facial.
- Márgenes de resección afectos.
- Ausencia de disponibilidad de bloques de parafina y preparaciones histológicas en el Archivo de Anatomía Patológica de las Historias Clínicas analizadas, que no permitiesen la realización posterior de técnicas de inmunohistoquímica.

### 5.4 Parámetros clínico-patológicos evaluados

#### *Variables clínico-demográficas*

- Género: varón / mujer.
- Edad: como variable cuantitativa continua, y también estratificada.
- Hábitos tóxicos del paciente: consumo de tabaco y/o alcohol.
- Tamaño clínico-radiológico del tumor.
- Localización del tumor dentro de la lengua oral.

*Variables histológicas analizadas sobre tinciones de Hematoxilina-Eosina*

- Estado patológico de los ganglios linfáticos cervicales.
- Profundidad de invasión del tumor primario (DOI): Se calculó la distancia existente desde una línea reconstruida desde la membrana basal hasta el punto de máxima profundidad del tumor.
- Grado de diferenciación tumoral (Clasificación de Broders).
- Infiltración perineural.
- Infiltración vascular.
- Índice de Tumor Budding, según clasificación de Wang et al  
Índice bajo: < de 5 buds por campo.  
Índice alto: > de 5 buds por campo.

*Variables del Estudio Inmunohistoquímico*

- Tinción con Citoqueratina A1-AE3
- Tinción con E-cadherina
- Tinción con Ki-67

*Variables de control evolutivo*

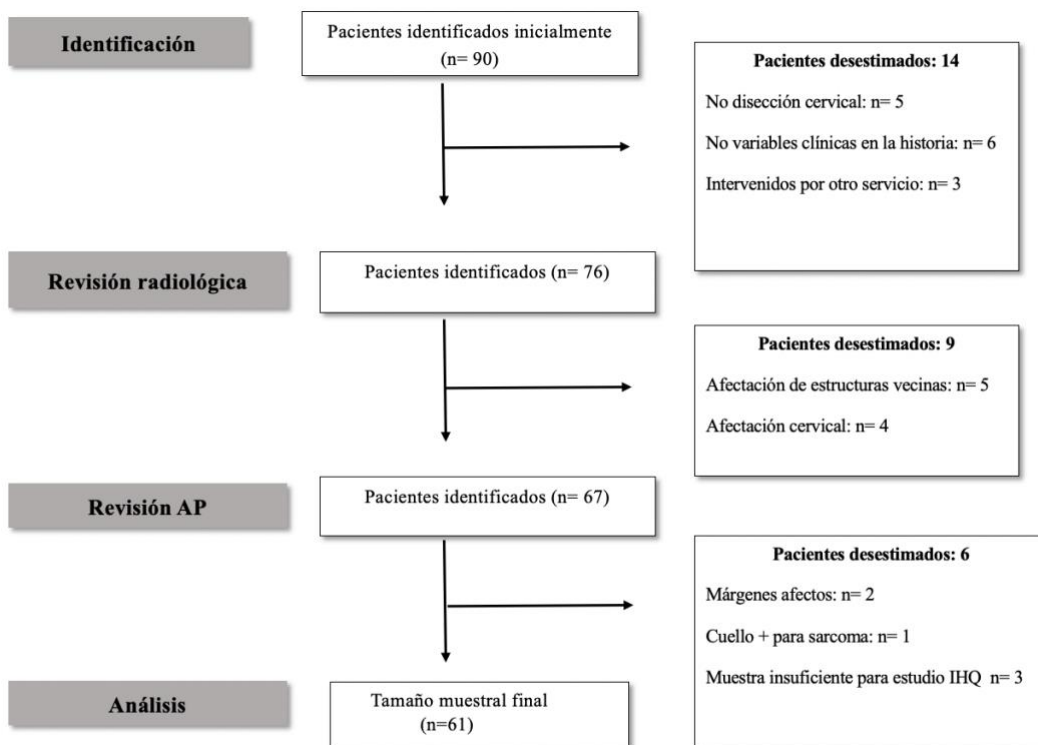
- Recidiva Loco-Regional
- Recidiva a distancia
- Recidiva total
- Mortalidad

**5.5 Proceso de selección y tamaño de la muestra**

La muestra seleccionada ha sido determinada a través de un muestreo no probabilístico incluyendo pacientes que su enfermedad se presentase en un estadio clínico inicial de carcinoma escamoso de lengua oral, y que cumplieren los criterios de inclusión y exclusión descritos anteriormente (Figura 15). En una primera fase, se identificaron un total de 90 registros de pacientes en estadios iniciales de CE de lengua oral que no hubiesen sido tratados previamente de carcinomas intraorales. En una segunda fase, de los 90 registros seleccionados, tras analizar las variables clínicas, demográficas y los

partes de cirugía, se desestimaron 14 pacientes, con un resultado muestral de 76. Posteriormente, se solicitó a la sección de Neuro-radiología del servicio de Radiodiagnóstico, la revisión de aquellas pruebas de imagen (TC) donde existían dudas en relación al tamaño de la lesión, infiltración de estructuras vecinas o presencia de adenopatías patológicas. En este proceso fueron excluidos 9 pacientes.

Una vez obtenidos los registros, se solicitó al Servicio de Anatomía Patológica la revisión de los cristales histológicos correspondientes (tinciones con hematoxilina-eosina) así como la comprobación de disponibilidad de suficiente material tumoral incluido en parafina. De los 67 individuos restantes, 6 pacientes fueron descartados, obteniendo un resultado muestral final de 61 pacientes. Se comprobaron de nuevo todos los cristales y se analizaron las variables histológicas descritas en el apartado 5.4. Posteriormente, se obtuvieron las secciones correspondientes con el frente de invasión tumoral de cada pieza, y se realizó el correspondiente inmunohistoquímico descrito en el apartado 5.4.



*Figura 14: Diagrama de flujo: Obtención del tamaño muestral*

## 5.6 Estudio Inmunohistoquímico

Las técnicas inmunohistoquímicas (IHQ) se basan en la alta especificidad y afinidad de la reacción antígeno-anticuerpo, lo que permite, mediante el empleo de anticuerpos (Ac) específicos y sistemas de detección, determinar la expresión de biomarcadores. Presenta la ventaja de que puede llevarse a cabo tanto en tejidos frescos, como en aquellos fijados en formol o parafina.

El estudio IHQ se realizó íntegramente en el servicio de Anatomía Patológica del HGUGM. Una vez seleccionadas las regiones correspondientes con el ITF de cada pieza tumoral, se procedió a cortar dichas secciones (incluidas en parafina) con un espesor de  $4\mu$ . Se emplearon anticuerpos de la casa comercial *Ventana*, de laboratorios *Roche*, que se suministran de forma prediluida. Los Ac utilizados para este estudio fueron los siguientes: *Anti-Pan Keratin* (Ac monoclonal de ratón, clon AE1/AE3/PCK 26, isotipo IgG1); *Anti-E-cadherin* (Ac monoclonal de ratón, clon 36, isotipo IgG2a/K); *Anti-Ki-67* (Ac monoclonal de conejo, clon 30-9).



**Figura 15:** Cristales con las tinciones empleados en nuestro estudio (A) Sistema automatizado Benchmark XT (B)

La IHQ es una técnica compleja, cuyo resultado final está influido por múltiples parámetros de las fases preanalítica, analítica y post-analítica. Esto implica que, dependiendo de la selección y rendimiento de estos parámetros, el resultado final de la técnica utilizando el mismo Ac primario puede mostrar un rango de negativo a positivo para el antígeno objetivo. Por lo tanto, para que los resultados obtenidos sean

reproducibles y confiables es imprescindible la estandarización de cada uno de los pasos o fases, desde la obtención de la muestra, hasta el ajuste de la técnica y valoración de los resultados obtenidos.

En nuestro estudio, para llevar a cabo las inmunotinciones, se empleó el sistema automatizado *BenchMark XT* (Figura 16), de la casa comercial *Ventana Medical Systems* (EE.UU) del laboratorio *Roche*. El sistema de tinción VENTANA *BenchMark XT* es un sistema que automatiza todas las etapas de la IHQ y de la hibridación in situ. Su ventaja radica en la estandarización completa del proceso permitiendo obtener unos resultados más homogéneos y reproducibles, así como un menor tiempo de trabajo. Empleando este sistema, el equipo realiza de forma automática, siguiendo un protocolo concreto para cada Ac los procesos correspondientes de desparafinación, recuperación antigénica, bloqueo de enzimas, Ac primarios, contratinción y postcontratinción. Las especificaciones técnicas empleadas para cada Ac quedan resumidas en la Tabla 2. Una vez finalizado el proceso de inmunotinción, las muestras se deshidrataron, se aclararon y se montaron con el cubrecristales.

**Tabla 2:** Especificaciones técnicas empleadas en cada uno de los Ac del estudio IHQ

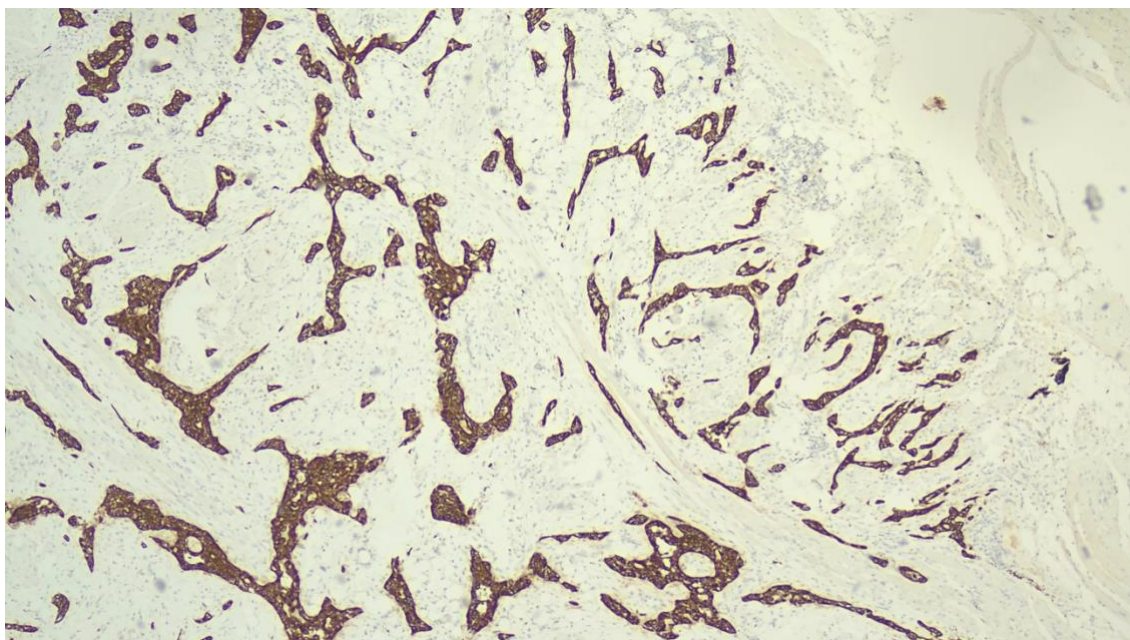
<b>TIPO DE PROCEDIMIENTO</b>	<b>Citoqueratina A1/AE3</b>	<b>E-Cadherina</b>	<b>Ki-67</b>
<b>Desenmascaramiento antigénico</b>	Cell Conditioning 1 suave	Cell Conditioning 1 estándar	Cell Conditioning 1 estándar
<b>Enzima (proteasa)</b>	Proteasa 3-4 min	No requiere	No requiere
<b>Anticuerpo primario</b>	8 min, 37°C	16 min, 37°C	16 min, 37°C
<b>Bloqueo de Ac</b>	Casein 4 min	Ninguno	Seleccionado
<b>Contratinción</b>	Hematoxylin II 4min	Hematoxylin II 4min	Hematoxylin II 4min
<b>Post-contratinción</b>	Bluing 4 min	Bluing 4 min	Bluing 2-4 min

## 5.7 Valoración de los resultados inmunohistoquímicos

Todas las preparaciones fueron evaluadas por dos miembros independientes de la sección de Cabeza y Cuello del Servicio de Anatomía Patológica del HGUGM que desconocían completamente el desenlace clínico de cada caso.

**IHQ con Citoqueratina AE1/AE3:** La Citoqueratina A1/AE3 (Figura 17) es una mezcla de citoqueratinas (CK) que incluye un amplio espectro de pesos moleculares y se obtiene inmunizando ratones con queratinas callosas humanas. Permite identificar la mayoría de las CKs humanas y, por tanto, posee una alta sensibilidad diagnóstica en la identificación de neoplasias de estirpe epitelial, en su clasificación en función del grado de diferenciación y en la detección de micrometástasis<sup>121</sup>. La CK AE1 reconoce citoqueratinas ácidas (CK 10,15,16,19) propias de epitelios simples. La CK AE3 reconoce las CK básicas (CK1-CK8) y es característica de los epitelios transicionales y de los carcinomas escamosos. El patrón de tinción celular para AE1/AE3 es citoplasmático<sup>122</sup>.

Teniendo en cuenta el origen epitelial de las células que componen el TB y puesto que, al localizarse tanto en el ITF como en el estroma circundante por delante del mismo, su observación puede ser compleja, se empleó esta técnica para facilitar la visualización de los TB por parte de los investigadores que, previamente, habían analizado su presencia sobre cristales teñidos con H-E, y así poder comparar la fiabilidad diagnóstica y reproducibilidad entre ambas tinciones.



**Figura 16:** IHQ con Citoqueratina A1/AE3. Objetivo 4x

**IHQ con E-Cadherina:** La inmunotinción con E-Cadherina en el ITF, se evaluó siguiendo criterios cualitativos y cuantitativos. Los niveles de inmunoreacción de la membrana celular, se clasificaron en 4 subgrupos de acuerdo a la clasificación de *Bankfalvi et al.*<sup>74</sup>, tomando como control fuertemente positivo, la inmunotinción observada en el propio epitelio sano:

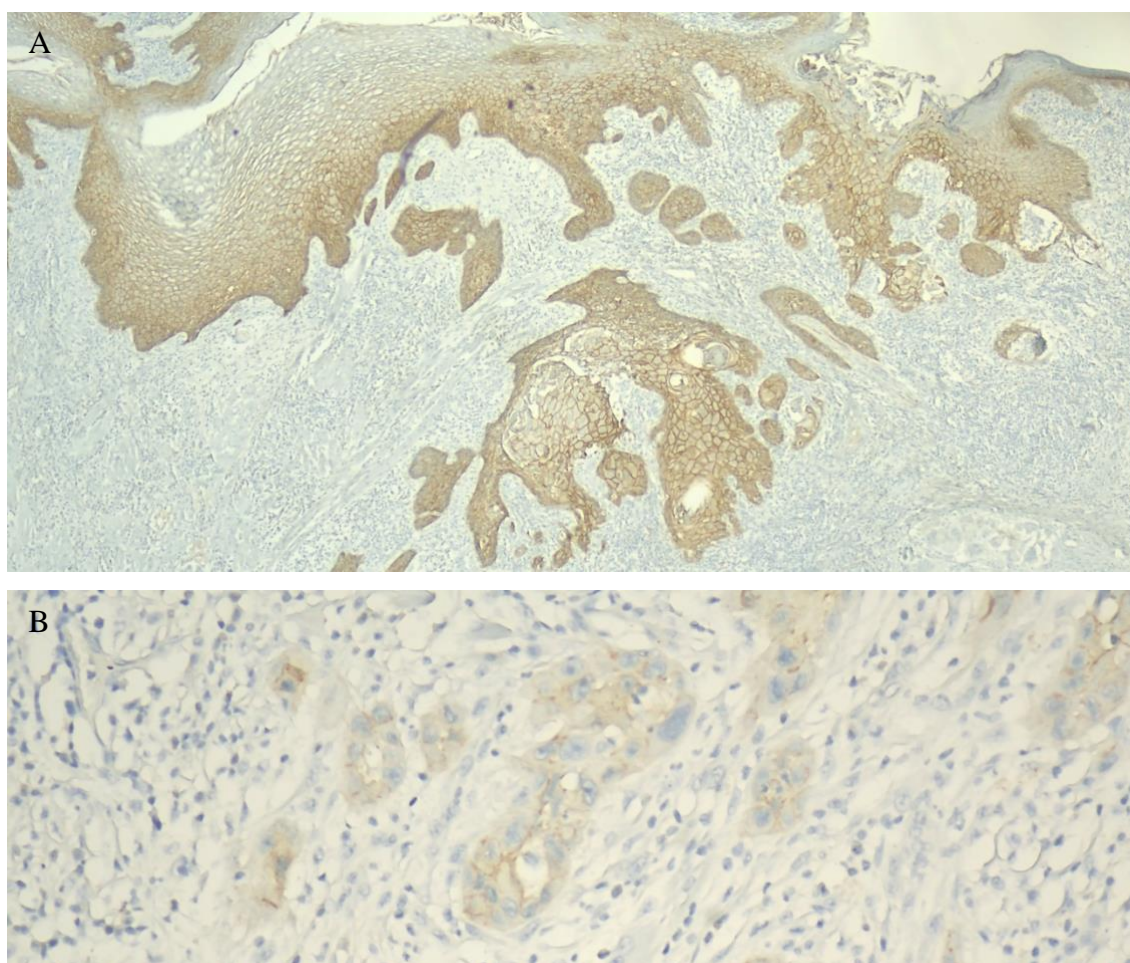
0: negativo, ausencia total de tinción.

1: tinción débil, detectada < 10% de las células tumorales teñidas.

2: tinción moderada, focal o heterogénea, 10-75% de las células tumorales teñidas.

3: tinción intensa, fuerte y homogénea en > 75% de las células tumorales teñidas.

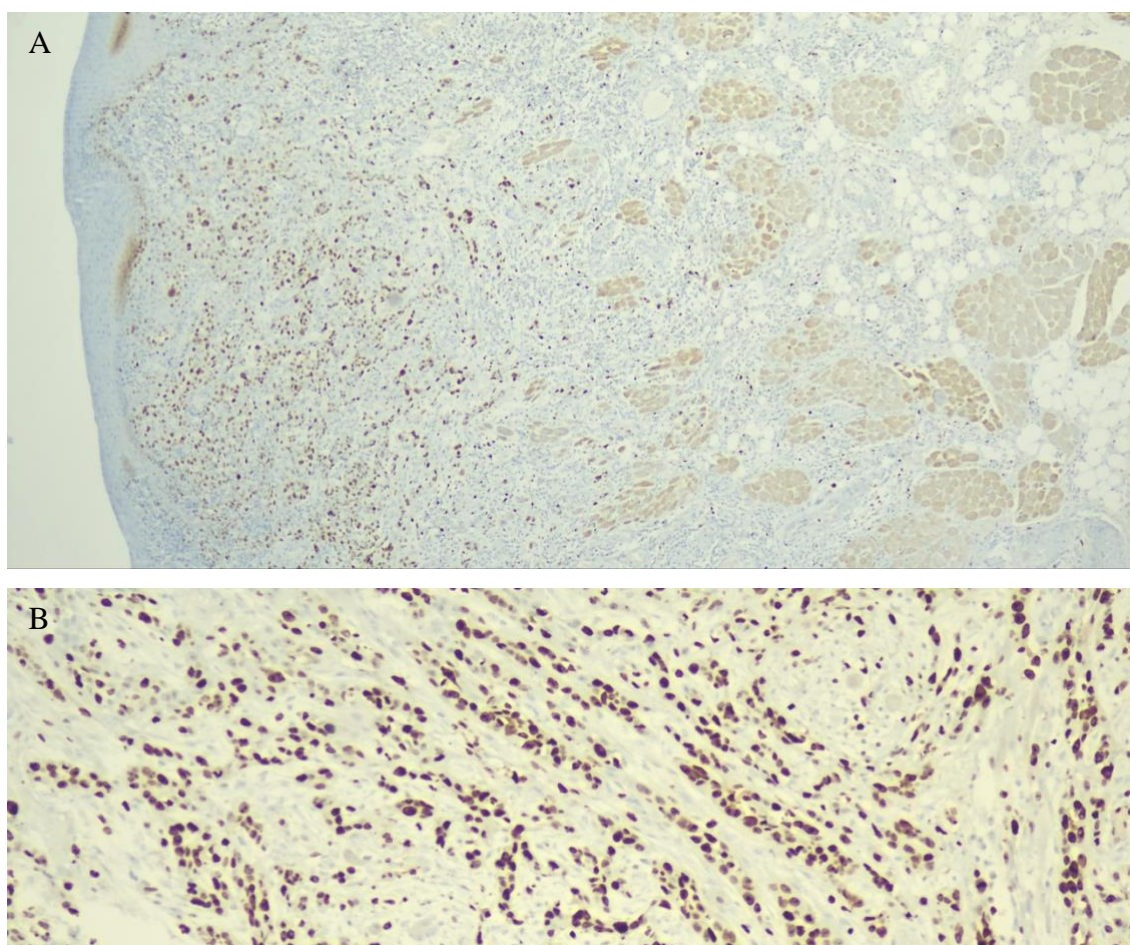
Con el fin de facilitar el posterior análisis estadístico, y puesto que no se apreció en ningún caso una inmunotinción completamente negativa (0), los resultados se agruparon en dos categorías: Tinción débil (1) y Tinción moderada-intensa (2 y 3).



**Figura 17:** IHQ con E-Cadherina. Tinción intensa, fuerte y homogénea (+3) Objetivo 4x (A); Tinción débil a nivel del ITF (+1) Objetivo 20x (B)

**IHQ con Ki-67:** La proteína Ki-67 es un marcador que está estrictamente relacionado con la proliferación celular, presente en todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y la mitosis), pero ausente en las células en reposo (G0). Durante la interfase, el antígeno Ki-67 puede ser detectado exclusivamente en el núcleo de la célula, mientras que, en la mitosis, la mayoría de la proteína se traslada a la superficie de los cromosomas.

La cuantificación de la expresión de Ki-67 se efectuó por medios manuales. Se seleccionaron al menos 3 campos de gran aumento (objetivo 40x) como representación de la muestra. Solo se consideró positiva la tinción nuclear, sin valorar la intensidad de la misma. Se midió el porcentaje de núcleos teñidos en un mínimo de 200 células por campo a nivel del ITF. Por tanto, el índice ki-67 debe expresar el porcentaje de células con tinción positiva entre el total de células invasivas valoradas. El punto de corte fue 50% para categorizar entre índice alto e índice bajo



**Figura 18:** IHQ con Ki-67. Objetivo 4x (A); Campo seleccionado a nivel del ITF, Índice de proliferación >70%. Objetivo 40x (B)

## 5.8 Análisis estadístico

Fue realizado mediante el software informático *SPSS para Windows (Versión 25.0, SPSS Inc., Chicago, IL)*. En una primera fase, los datos obtenidos de las variables cualitativas y cuantitativas descritas en el estudio se recogieron en un cuaderno de recogida de datos (*tabla Excel*), para posteriormente integrarse en una base de datos anonimizada. Se realizó un análisis descriptivo de las distintas variables, agrupadas en aspectos demográficos, clínicos, histológicos y de evolución clínica. Los resultados se presentaron como frecuencia y porcentaje en cada grupo de análisis para variables cualitativas y como media  $\pm$  desviación estándar de la media para variables cuantitativas.

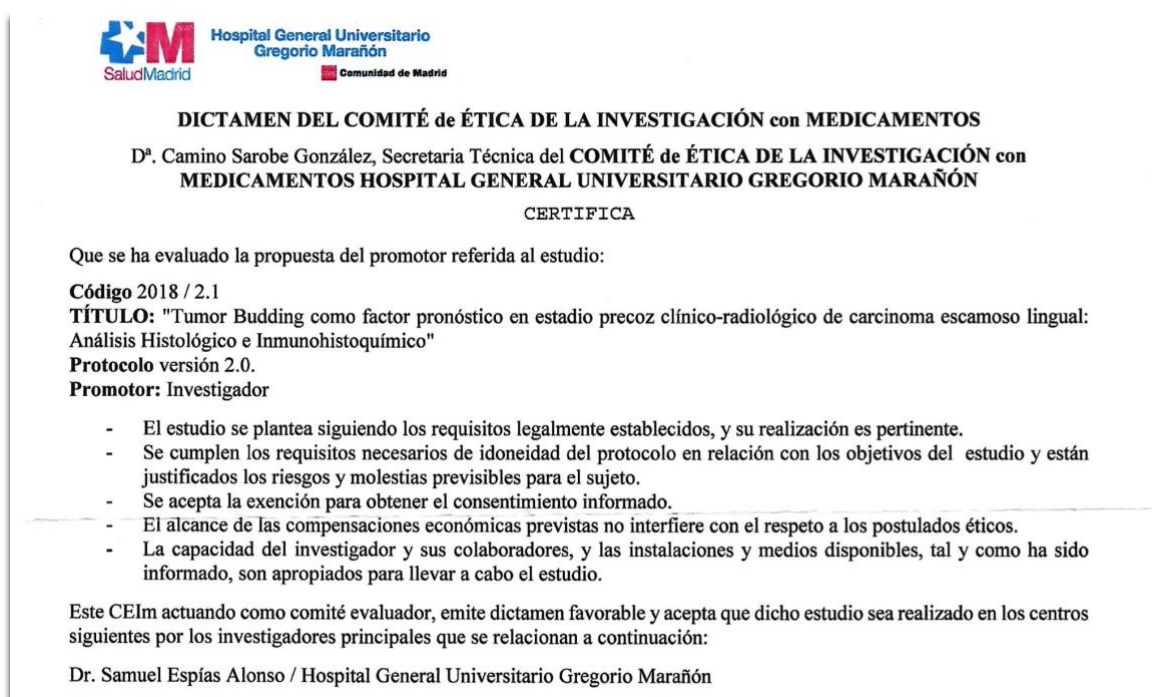
Se realizó un análisis de distribución de normalidad mediante la prueba *Kolmogorov-Smirnov*. El análisis de distribución de frecuencias entre los diferentes grupos de interés se realizó mediante *chi-cuadrado* ( $\chi^2$ ) y *test exacto de Fisher*, adicionalmente. La comparación de variables cuantitativas, se llevó a cabo por comparación de medias entre los diferentes grupos de interés, a través del test no paramétrico *Kruskal Wallis* y *U de Mann-Withney*.

Decidimos realizar un análisis multivariante de regresión logística binaria, tomando exclusivamente las variables que habían mostrado significación estadística en la prueba de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ), para mejorar la precisión de nuestros resultados y evitar sesgos, con el fin de estimar las variables predictoras independientes de la presencia de metástasis linfáticas cervicales y desarrollo de recidivas a lo largo de la evolución de la enfermedad.

Para analizar la influencia del marcador histopatológico Tumor Budding sobre la supervivencia global (medido como el transcurrido entre el tratamiento de cada paciente y la fecha del último contacto de seguimiento en el período de estudio o la fecha de muerte para aquellos pacientes que fallecieron a causa del cáncer de lengua) y recidivas (medidas desde la fecha de intervención quirúrgica hasta la aparición de eventos), se realizaron análisis de supervivencia, mediante funciones de supervivencia de *Kaplan-Meier (KM)*, así como la representación gráfica de las curvas KM y comparadas entre sí mediante el estadístico de log-rank. En la fase estadística analítica, se trabajó con un error tipo 1 de doble cola, estableciéndose significancia estadística para valores P inferiores a 0,05.

## 5.9 Consideraciones éticas

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación con medicamentos (CEIm) del HGUGM el 11 de febrero de 2019, con el código 2018/ 2.1 (Figura 20).



*Figura 19: Informe favorable del CEIm*



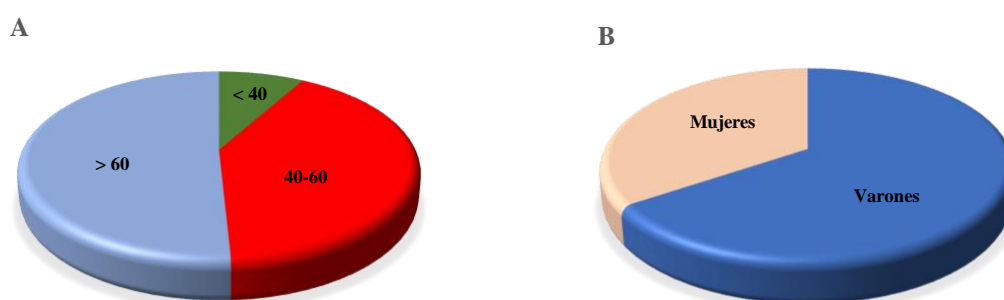
## **VI.RESULTADOS**

## 6.1 Análisis descriptivo de la población de estudio

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se ha recogido y analizado la información correspondiente a una población de estudio constituida finalmente por 61 pacientes con carcinoma escamoso de lengua oral, diagnosticados y tratados por el Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del HGUGM, en un periodo comprendido entre el 1 de enero de 2010 y el 31 de diciembre de 2019, y que reunían los criterios de inclusión y carecían de los criterios de exclusión establecidos en el estudio. A continuación, se presentan los resultados obtenidos en el análisis descriptivo, dividiendo las variables según correspondan a factores clínico-demográficos, factores histológicos convencionales, factores del estudio IHQ, y variables de evolución de la enfermedad.

### 6.1.1 Distribución respecto a variables clínico-demográficas

La tabla 3 resume la distribución de las variables clínico-demográficas. La edad media de diagnóstico fue de  $59,72 \pm 2,02$ , de los cuales 5 (8,2%) presentaban una edad < 40 años, 25 (41,0%) una edad comprendida entre los 40 y los 60 años y 31 (50,8%) eran > 60 años. Del total de pacientes incluidos en el estudio, 40 fueron hombres (65,6%) y 21 mujeres (34,4%) (Figura 17). En relación a los factores de riesgo, entorno al 40% de los pacientes eran fumadores y menos de un 20% reconocieron consumo habitual y diario de alcohol.



*Figura 20: Gráficas de distribución respecto a la edad estratificada (A) y al sexo (B)*

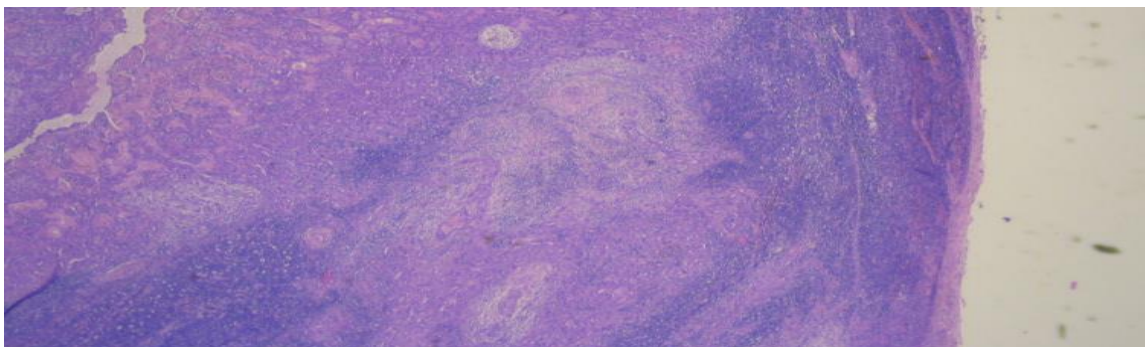
En relación al tamaño tumoral, siguiendo los criterios clínico-radiológicos preoperatorios, el 44,3% (27 casos) fueron clasificados como T1, y el 55,7% (34 casos) fueron clasificados como T2. Dentro de la lengua oral, los bordes laterales fueron la localización más frecuente, representando el 82% (50 casos de la serie), seguidos por la cara ventral 14,7% (9 casos), y solamente el 3,3% asentaron en la cara dorsal (2 casos).

**Tabla 3:** Distribución de las variables clínico-demográficas

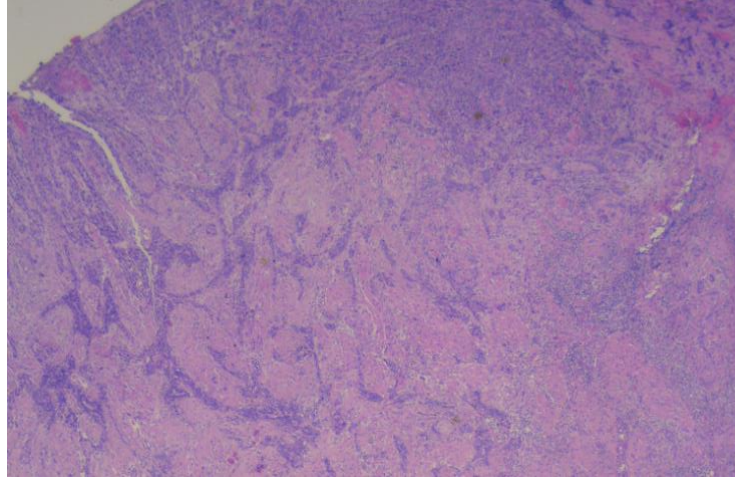
<i>Variables</i>	<i>Categorías</i>	<i>Población estudio (n=61)</i>	
		<i>Frecuencia</i>	<i>(%)</i>
<i>Edad (años)</i>	< 40	5	8,2
	40- 60	25	41,0
	> 60	31	50,8
<i>*Edad (años)</i>		59,72 ± 2,02	
<i>Sexo</i>	Hombre	40	65,6
	Mujer	21	34,4
<i>Tabaco</i>	Ausente	35	57,4
	Presente	26	42,6
<i>Alcohol</i>	Ausente	50	82,0
	Presente	11	18,0
<i>Localización</i>	Bordes laterales	50	82,0
	Cara ventral	9	14,7
	Cara dorsal	2	3,3
<i>T clínico</i>	1	27	44,3
	2	34	55,7

### 6.1.2 Distribución respecto a factores histológicos convencionales

La tabla 4 resume la distribución de las variables histológicas convencionales analizadas sobre H-E. Todos los pacientes incluidos en el estudio presentaban ausencia de afectación metastásica linfática cervical según los estudios clínico-radiológicos preoperatorios. Sin embargo, en el estudio histológico, el 34,4% (21 casos) presentaron cuellos histológicamente positivos, y el 65,6% (40 casos) fueron negativos.

**Figura 21:** Ganglio linfático cervical con afectación metastásica

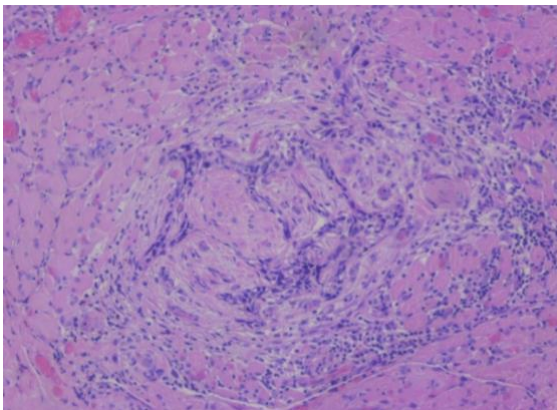
El grado de diferenciación tumoral se dividió en tres categorías, siguiendo los criterios de clasificación de la OMS. El 18% (11 casos) fueron clasificados como tumores bien diferenciados, el 72,1% (44 casos) moderadamente diferenciados, y el 9,8% (6 casos) fueron tumores pobremente diferenciados.



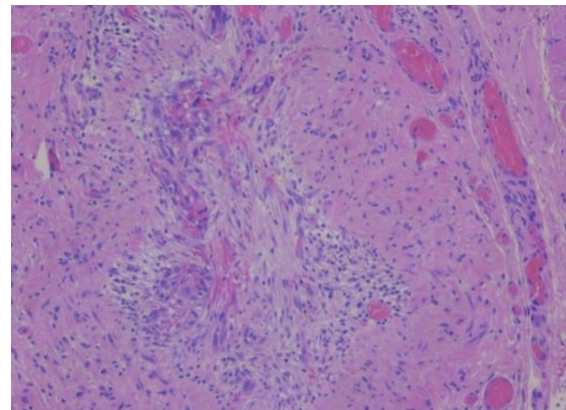
*Figura 22: CE lingual pobremente diferenciado. Patrón en cordones*

La media de la profundidad de invasión tumoral, entendida como la distancia entre el punto de la membrana basal de mucosa sana más cercana al tumor y el punto más profundo del mismo, fue de  $9,11 \pm 0,67$ . Cuando estratificamos el DOI en tres categorías, el 24,6% (15 casos) presentaron un DOI  $< 5$  mm, el 41% (25 casos) un DOI comprendido entre 5-10 mm, y un 34,4% (21 casos) un DOI  $> 10$  mm.

El 39,3% (24 casos) presentaron infiltración perineural, sin observarse en el 60,7% (37 casos). La infiltración vascular ha demostrado ser muy baja en nuestra serie, apreciándose únicamente en el 8,2% (5 casos) de las piezas tumorales analizadas.

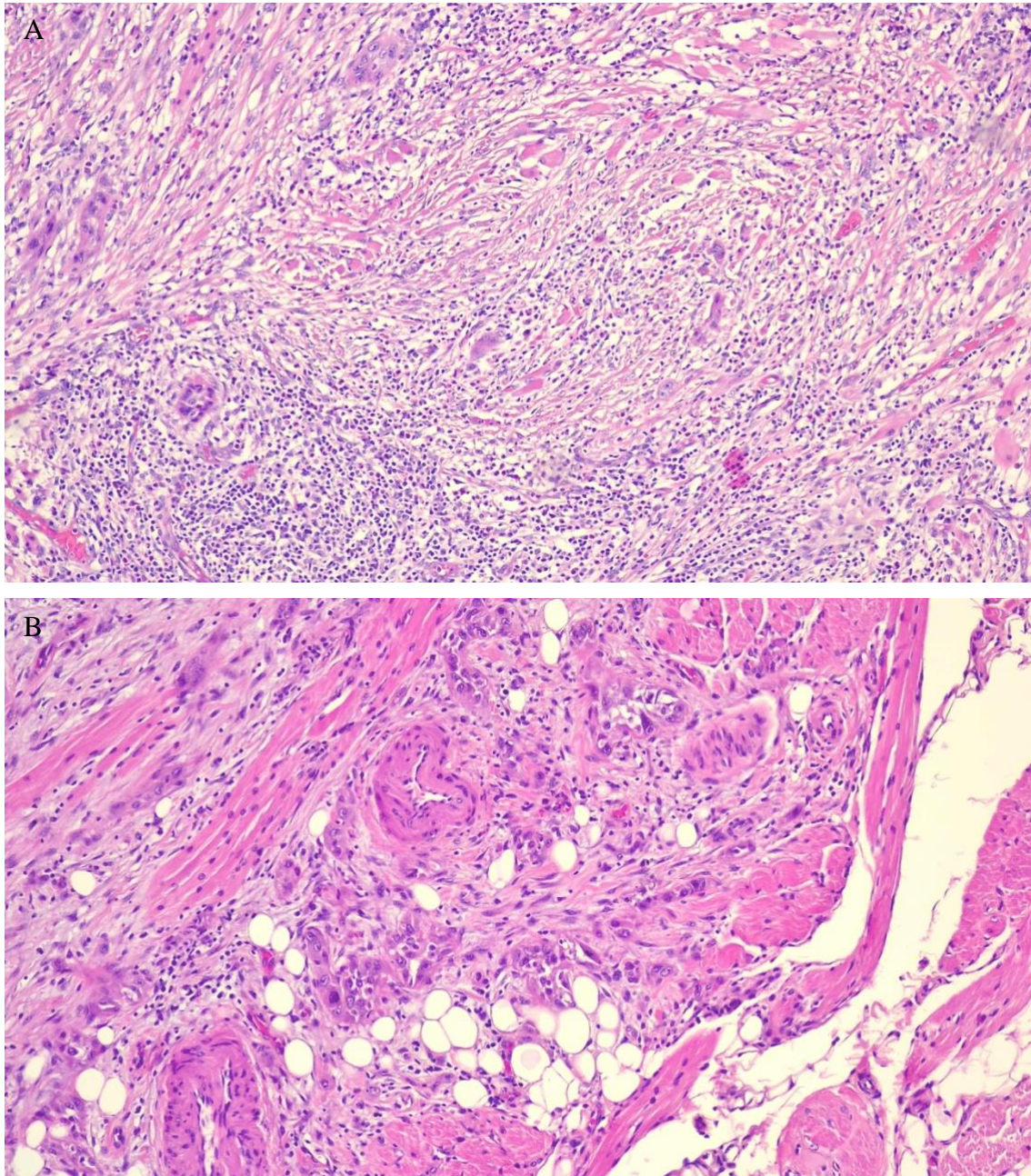


*Figura 23: Infiltración perineural*



*Figura 24: Infiltración vascular venosa*

La intensidad de Tumor Budding se clasificó entre alto y bajo grado empleando como punto de corte la presencia de 5 buds (< 5 bajo grado; > 5 alto grado). Se apreció un alto índice de TB en el 44,3% (27 casos), mientras que en el 55,7% restante (34 casos) se clasificó como bajo grado.



**Figura 25:** Visualización de TB sobre muestras de H-E. Objetivo 20x. Bajo Índice de TB (A); Alto Índice de TB (B)

**Tabla 4:** Distribución de las características histológicas de la población a estudio

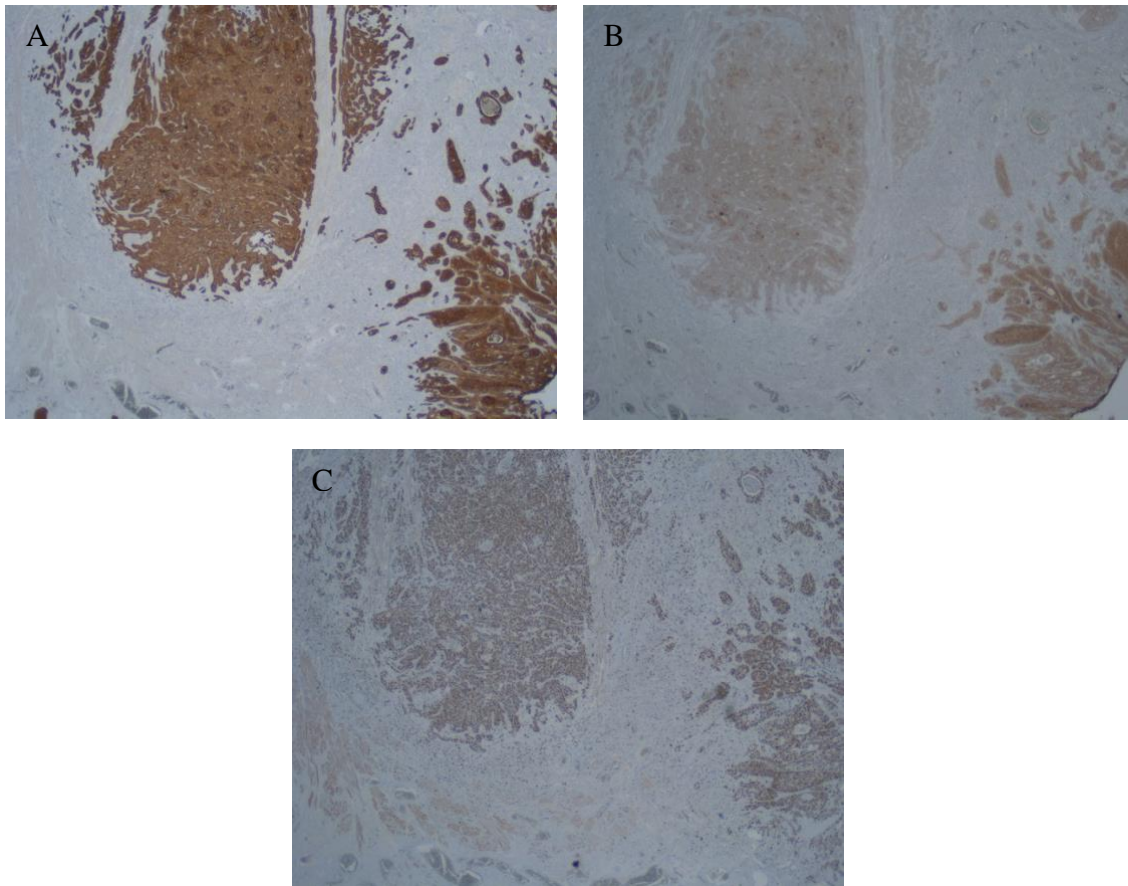
<i>Variables</i>	<i>Categorías</i>	<i>población estudio (n=61)</i>	
		<i>Frecuencia</i>	<i>(%)</i>
<i>Grado de diferenciación</i>	Bien	11	18,0
	Moderado	44	72,1
	Pobre	6	9,8
<i>DOI</i>	< 5 mm	15	24,6
	5-10 mm	25	41,0
	> 10 mm	21	34,4
<i>Tumor Budding</i>	1 (Bajo)	34	55,7
	2 (Alto)	27	44,3
<i>Infiltración perineural</i>	Ausente	37	60,7
	Presente	24	39,3
<i>Infiltración vascular</i>	Ausente	56	91,8
	Presente	5	8,2
<i>Positividad cuello</i>	No	40	65,6
	SÍ	21	34,4

### 6.1.3 Distribución según el análisis inmunohistoquímico

La tabla 5 resumen la distribución en relación a las variables del estudio IHQ. La expresión de E-Cadherina en el ITF se evaluó de forma semicuantitativa. Los niveles de inmunorreacción de la membrana celular se clasificaron en 4 subgrupos de acuerdo a la clasificación de *Bankfalvi et al.*<sup>74</sup>: 0: negativo, ausencia total de tinción; 1: tinción débil, detectada < 10% de las células tumorales teñidas; 2: tinción moderada, focal o heterogénea, 10-75% de las células tumorales teñidas 3: tinción intensa, fuerte y homogénea en > 75% de las células tumorales teñidas. Con fines estadísticos, se decidió dicotomizar la variable en dos grupos (0-1 y 2-3). El 65,6 % (40 casos) mostraron una expresión moderada-intensa (2-3), y el 34,4 % (21 casos) mostró una expresión débil (1). En ninguna de las muestras estudiadas se evidenció una ausencia total de tinción (0).

El índice de proliferación medido mediante Ki-67, debe expresar el porcentaje de células con tinción positiva entre el total de células valoradas en el ITF. Como variable continua, su media  $\pm$  error estándar de la media, fue  $38,20 \pm 3,66$ . Para el análisis

estadístico, se tomó como punto de corte el 50%, para categorizar entre alto y bajo índice de proliferación. El 54,1% (33 casos) mostró un índice de proliferación superior al 50%, mientras que 28 casos (45,9%) mostraron un índice de proliferación < 50%.



**Figura 26:** Misma sección tumoral teñida con Citoqueratina AE1/AE3 (A), E-Cadherina (B), Ki-67 (C)

**Tabla 5:** Distribución de las características del estudio IHQ. : el Ki-67\* se presenta tanto dicotomizada, cómo su media  $\pm$  desviación estándar

Variables	Categoría	Población de estudio (n=61)	
		Nº de casos	(%)
Ki-67 (%)	< 50	28	45,9
	$\geq$ 50	33	54,1
*Ki-67 (%)		38,20 $\pm$ 3,66	
E-Cadherina	1	21	34,4
	2 - 3	40	65,6

#### 6.1.4 Distribución de las variables de evolución de enfermedad

La tabla 6 resumen la distribución en relación a las variables de evolución de la enfermedad.

Una vez analizada tanto lo recidiva loco-regional, a distancia y la total, se observó que tanto la recidiva loco-regional como la total presentaron los mismos valores, puesto que los pacientes que presentaron la recidiva a distancia (5 casos), también lo hicieron a nivel loco-regional. En relación al exitus, un 20% de los pacientes incluidos en la muestra habían fallecido al finalizar el estudio.

*Tabla 6: Distribución de las características de evolución de la enfermedad*

<i>Variables</i>	<i>Categorías</i>	<i>Población de estudio (n=61)</i>	
		<i>Nº de casos</i>	<i>(%)</i>
<i>Recidiva Loco-regional</i>	No	46	75,4
	Si	15	24,6
<i>Recidiva a Distancia</i>	No	56	91,8
	Si	5	8,2
<i>Recidiva Total</i>	No	46	75,4
	SÍ	15	24,6
<i>Exitus</i>	No	49	80,3
	SÍ	12	19,7

## 6.2 Estudio analítico

### 6.2.1 Objetivo 1: Analizar la metodología diagnóstica del Tumor Budding

Los resultados revelan que hay una distribución significativamente distinta en los niveles de concordancia y no concordancia entre la tinción con Hematoxilina-Eosina y su posterior confirmación mediante estudio inmunohistoquímico con Citoqueratina AE1-AE3 entre los grupos TB 1 (baja intensidad, <5 buds) y TB2 (alta intensidad, >5 buds), observándose un 100% de confirmación en el grupo TB1, mientras que ese porcentaje cae al 89% en el TB2 ( $p=0,046$ ) (Figura 28).

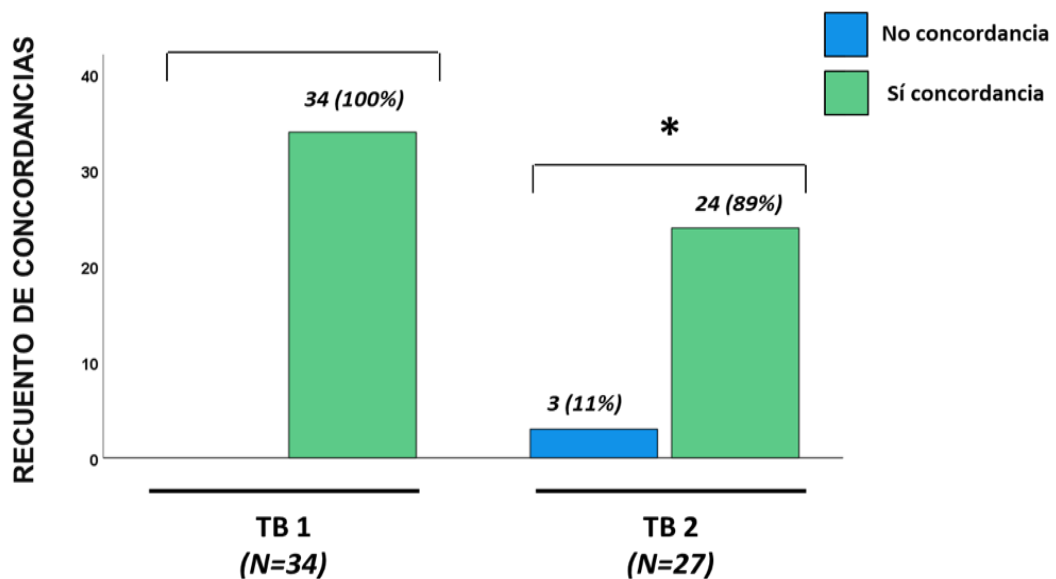


Figura 27: Comparación de la concordancia entre el diagnóstico con H-E y Citoqueratina A1/AE3. \* $p < 0,05$

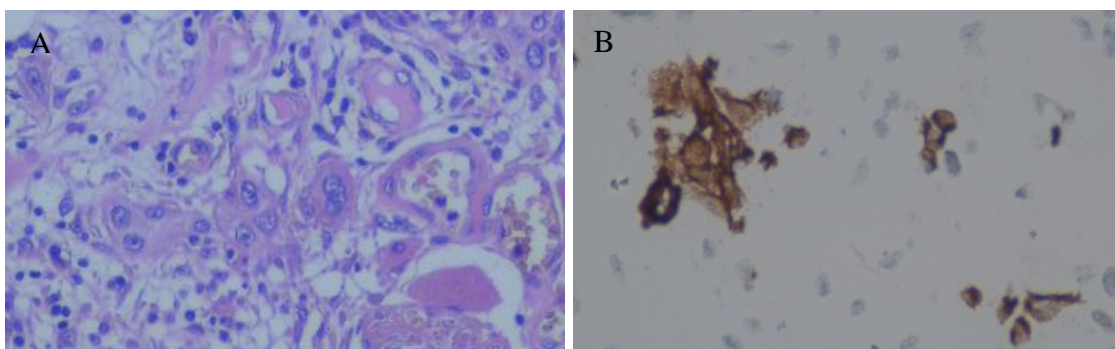


Figura 28: Visualización del TB, objetivo 20x. Preparación con H-E (A) Citoqueratina AE1/AE3 (B)

## 6.2.2 Objetivo 2: Evaluar la relación existente entre las características clínicas e histológicas del tumor primario y el índice de Tumor Budding

### 6.2.2.1 Tumor Budding y su relación con los parámetros clínico-demográficos

La tabla 7 resume las correlaciones entre el índice de TB y los factores clínico-demográficos.

No fue posible establecer una relación estadísticamente significativa entre la intensidad del TB en el ITF y la edad ( $p=0,976$ ), el sexo ( $p=0,213$ ), el consumo de tabaco ( $p=0,191$ ) y el consumo de alcohol ( $p=0,054$ ), si bien, atendiendo a esta última variable, la relación fue casi significativa. Tampoco pudo establecerse una relación estadísticamente significativa con el estadio “T” prequirúrgico, medido mediante técnicas clínico-radiológicas ( $p=0,126$ ).

**Tabla 7:** Asociación entre el índice de TB y las variables clínico-demográficas. Nota: la edad se presenta tanto estratificada como su media  $\pm$  desviación estándar

<i>variables</i>	<i>categorías</i>	<b>TB 1</b> <i>(n=34)</i> <i>frec (%)</i>	<b>TB 2</b> <i>(n=27)</i> <i>frec (%)</i>	<i>valor p</i>
<i>Edad (años)</i>	< 40	3 (8,8)	2 (7,4)	0,976
	40- 60	14 (41,2)	11 (40,7)	
	> 60	17 (50,0)	14 (51,9)	
<i>Sexo</i>	hombre	20 (58,8)	20 (74,1)	0,213
	mujer	14 (41,2)	7 (25,9)	
<i>Tabaco</i>	Presente	17 (50,0)	18 (66,7)	0,191
	Ausente	17 (50,0)	9 (33,3)	
<i>Alcohol</i>	Presente	25 (73,5)	25 (92,6)	0,054
	Ausente	9 (26,5)	2 (7,4)	
<i>T clínico</i>	1	18 (52,9)	9 (33,3)	0,126
	2	16 (47,1)	18 (66,7)	

<i>Variabes</i>	<b>TB 1</b> <i>(n=34)</i>	<b>TB 2</b> <i>(n=27)</i>	<i>valor p</i>
<i>Edad (años)</i>	59,82 $\pm$ 2,94	59,59 $\pm$ 2,71	0,822

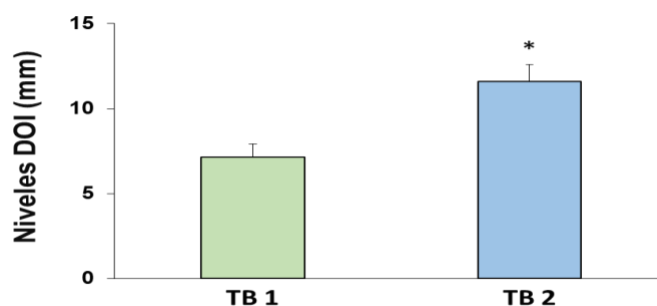
### 6.2.2.2 Tumor Budding en el carcinoma de lengua oral y su relación con otros parámetros histopatológicos convencionales

La tabla 8 resume las correlaciones entre el índice de TB y los parámetros histopatológicos convencionales analizados sobre tinciones de H-E. No fue posible establecer una relación estadísticamente significativa entre la intensidad del TB en el ITF y el grado de diferenciación tumoral ( $p=0,976$ ), y tampoco con la infiltración vascular ( $p=0,093$ ). Sin embargo, considerando que, en las piezas con mayor profundidad tumoral encontramos una mayor intensidad de *clusters* celulares en el ITF, encontramos una asociación estadísticamente significativa entre la intensidad de TB y el DOI ( $p=0,001$ ) (Figura 21). También hemos encontrado una asociación estadísticamente significativa con la infiltración perineural ( $p=0,021$ ).

**Tabla 8:** Asociación entre el índice de TB y las variables histológicas. Nota: el DOI se presenta como su media  $\pm$  desviación estándar

<i>Variables</i>	<i>Categorías</i>	<b>TB 1</b> ( <i>n=34</i> ) <i>frec (%)</i>	<b>TB 2</b> ( <i>n=27</i> ) <i>frec (%)</i>	<i>valor p</i>
<i>Grado diferenciación</i>	Bien	8 (23,5)	3 (11,1)	0,454
	Moderadamente	23 (67,6)	21 (77,8)	
	Pobremente	3 (8,8)	3 (11,1)	
<i>Infiltración vascular</i>	Ausente	33 (97,1)	23 (85,2)	0,093
	Presente	1 (2,9)	4 (14,8)	
<i>Infiltración perineural</i>	Ausente	25 (73,5)	12 (44,4)	0,021
	Presente	9 (26,5)	15 (55,6)	

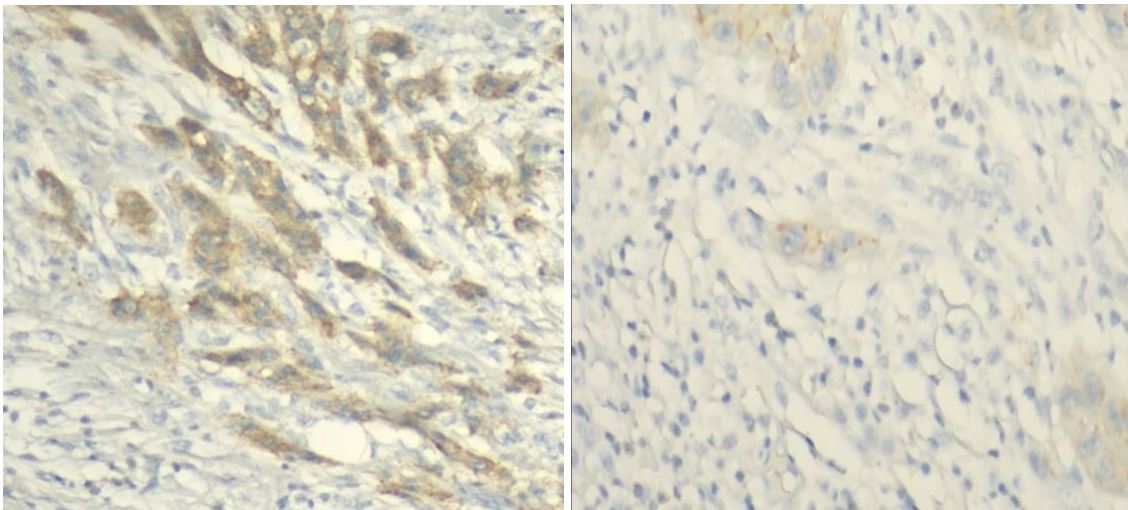
<i>Variables</i>	<b>TB 1</b> ( <i>n=34</i> )	<b>TB 2</b> ( <i>n=27</i> )	<i>valor p</i>
<i>DOI (mm)</i>	7,15 $\pm$ 0,77	11,59 $\pm$ 0,99	0,001



**Figura 29:** Gráfica que muestra la asociación entre el índice de TB y el DOI ( $p < 0,05$ )\*

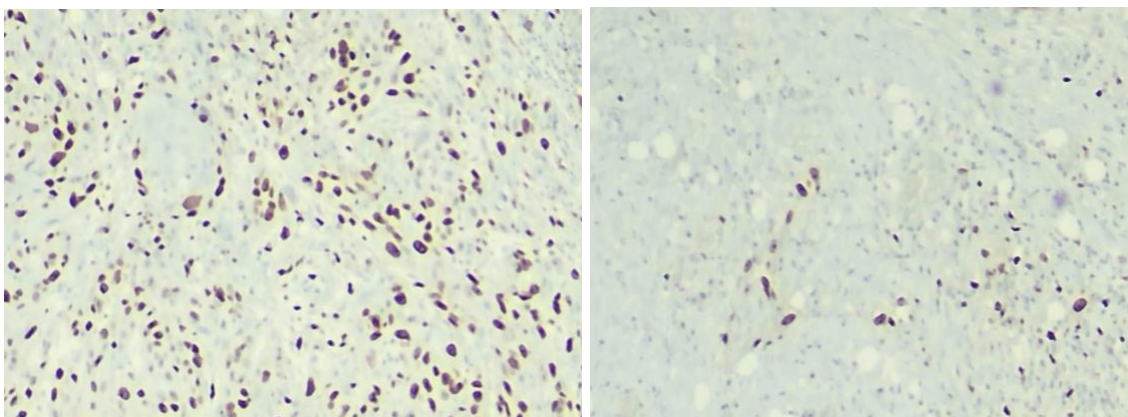
### 6.2.3 Objetivo 3: Valorar las características inmunohistoquímicas (E-Cadherina, KI-67) presentes en el ITF y su relación con el índice de Tumor Budding

La tabla 9 resume las correlaciones entre el índice de TB y características IHQ del ITF. Cuando analizamos la expresión de e-cadherina en la membrana de las células del ITF, observamos que, el 70,4% (19 casos) que fueron clasificados como TB de alto grado, asociaron una tinción débil, < 10% de las células tumorales teñidas en el ITF, encontrando una asociación estadísticamente significativa con el índice de TB ( $p < 0,001$ ).

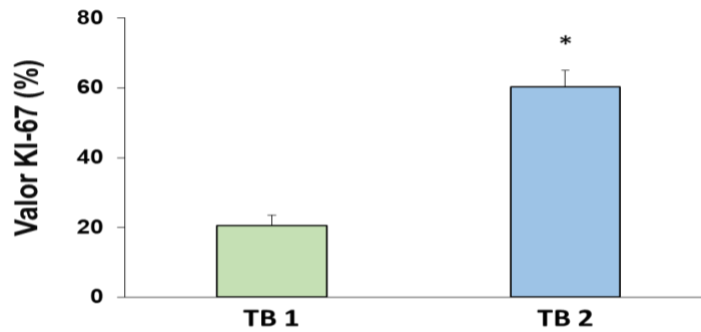


**Figura 30:** Tinción con E-Cadherina, objetivo 20x. Tinción intensa +3 (A), Tinción leve +1 (B)

En cuanto al índice de proliferación celular mediante Ki-67, observamos una asociación estadísticamente significativa entre éste y el índice de TB ( $p < 0,001$ ) (Figura 33). Cuando dicotomizamos la variable tomando como punto de corte el 50%, en un 85,2% (25 casos) de los tumores que presentaron un alto índice de TB encontramos un índice de proliferación celular aumentada en el ITF ( $> 50\%$ ) por tan solo un 14,8% (4 casos), que presentaron una proliferación  $< 50\%$ .



**Figura 31:** Tinción con Ki-67, objetivo 20x. Proliferación  $> 50\%$  (A), proliferación  $< 50\%$  (B)



**Figura 32:** Gráfica que muestra la asociación entre el índice de TB y el índice de proliferación mediante Ki-67 ( $p < 0,05$ )\*

**Tabla 9:** Asociación entre el Índice de TB y las variables del estudio IHQ. Nota: el Índice de proliferación mediante Ki-67 se presenta como su media  $\pm$  desviación estándar

<b>Variables</b>	<b>Categorías</b>	<b>TB 1 (n=34) frec (%)</b>	<b>TB 2 (n=27) frec (%)</b>	<b>valor p</b>
<i>e-cadherina</i>	1	2 (5,9)	19 (70,4)	< 0,001
	2 ó 3	32 (94,1)	8 (29,6)	
<i>ki-67 (%)</i>	< 50	24 (70,6)	4 (14,8)	< 0,001
	$\geq$ 50	10 (29,4)	23 (85,2)	

<b>Variables</b>	<b>TB 1 (n=34)</b>	<b>TB 2 (n=27)</b>	<b>valor p</b>
<i>Ki-67%</i>	20,59 $\pm$ 2,98	60,37 $\pm$ 4,65	< 0,001

#### 6.2.4 Objetivo 4: Estudiar el significado pronóstico del índice de Tumor Budding en relación con la aparición de metástasis linfáticas cervicales

Para llevar a cabo este objetivo, en primer lugar, analizamos la posible asociación estadística entre todas las variables incluidas en nuestro estudio y la presencia de metástasis linfáticas confirmadas mediante el estudio histológico de los ganglios cervicales. Posteriormente, las variables que mostraron significancia estadística, fueron incluidas en un estudio multivariable mediante un test de regresión logística binaria, para establecer cuáles de ellas podían ser consideradas factores pronósticos independientes de enfermedad metastásica cervical.

##### 6.2.4.1 Metástasis linfáticas cervicales y su relación con factores clínico-demográficos

La tabla 10 resume la asociación entre las metástasis linfáticas cervicales y las variables clínico-demográficas. No fue posible establecer una relación estadísticamente significativa entre el estado de los ganglios linfáticos cervicales y la edad, sexo, factores de riesgo y estadio “T” clínico.

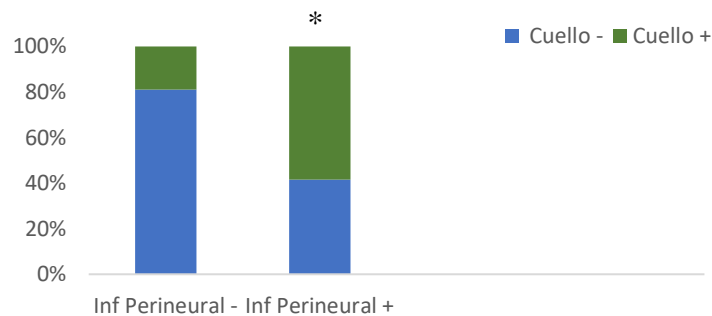
*Tabla 10: Asociación entre las metástasis linfáticas cervicales y las variables clínico-demográficas*

<i>Variables</i>	<i>Categorías</i>	<i>Positividad cuello</i>		<i>valor p</i>
		<i>no (n=40) frec (%)</i>	<i>sí (n=21) frec (%)</i>	
<i>Edad (años)</i>	< 40	4 (10,0)	1 (4,8)	0,647
	40- 60	15 (37,5)	10 (47,6)	
	> 60	21 (52,5)	10 (47,6)	
<i>Sexo</i>	hombre	26 (65,0)	14 (66,7)	0,896
	mujer	14 (35,0)	7 (33,3)	
<i>Tabaco</i>	Ausente	20 (50,0)	15 (71,4)	0,108
	Presente	20 (50,0)	6 (28,6)	
<i>Alcohol</i>	Ausente	31 (77,5)	19 (90,5)	0,210
	Presente	9 (22,5)	2 (9,5)	
<i>T clínico</i>	1	21 (52,5)	6 (28,6)	0,074
	2	19 (47,5)	15 (71,4)	

**6.2.4.2 Metástasis linfáticas cervicales y su relación con parámetros histológicos clásicos**

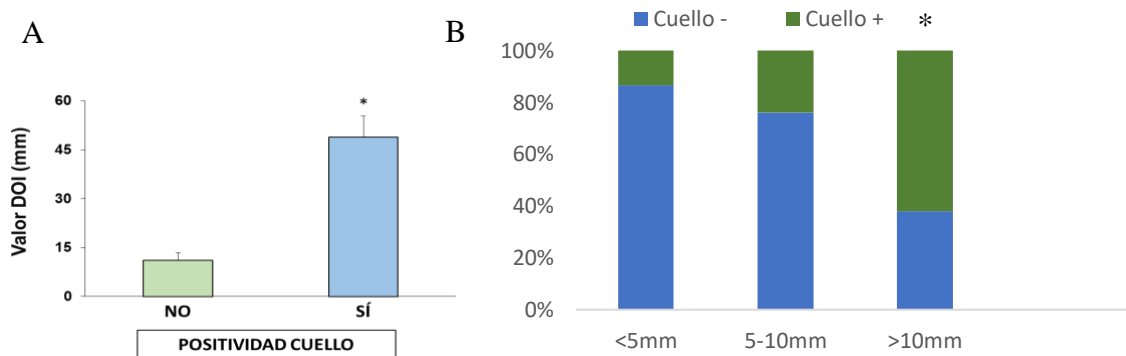
La tabla 11 resume la asociación entre las metástasis linfáticas cervicales y los factores histopatológicos convencionales analizados sobre tinciones de H-E. No fue posible establecer una relación estadísticamente significativa entre la presencia de metástasis cervicales linfáticas y el grado de diferenciación tumoral ( $p=0,230$ ), ni la infiltración vascular ( $p=0,209$ ).

Encontramos una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de metástasis linfáticas cervicales y la infiltración perineural ( $p=0,002$ ).



**Figura 33:** Gráfica que muestra la asociación entre la Infiltración perineural y las metástasis cervicales ( $p < 0,05$ )\*

Encontramos una asociación significativa entre una mayor profundidad invasiva tumoral (DOI) medida en mm, y la aparición de metástasis linfáticas cervicales, apareciendo mayor índice de metástasis en los ganglios en los casos que los tumores presentaban un mayor DOI (Figura 35).



**Figura 34:** Gráfica que muestra la asociación entre el DOI y las metástasis cervicales: Como variable cuantitativa continua, ( $p < 0,05$ )\* (A), y agrupada (B)

**Tabla 11:** Asociación entre el estado de los ganglios linfáticos cervicales y las variables histológicas.  
Nota: el DOI se presenta como su media  $\pm$  desviación estándar

Variables	Categorías	Positividad cuello		valor p
		no (n=40) frec (%)	sí (n=21) frec (%)	
Grado diferenciación	Bien	9 (22,5)	2 (9,5)	0,230
	Moderado	26 (65,0)	18 (85,7)	
	Pobre	5 (12,5)	1 (4,8)	
DOI	< 5 mm	13 (32,5)	2 (9,5)	0,004
	5- 10 mm	19 (47,5)	6 (28,6)	
	> 10 mm	8 (20,0)	13 (61,9)	
Infiltración perineural	Ausente	30 (75,0)	7 (33,3)	0,002
	Presente	10 (25,0)	14 (66,7)	
Infiltración vascular	Ausente	38 (95,0)	18 (85,7)	0,209
	Presente	2 (5,0)	3 (14,3)	

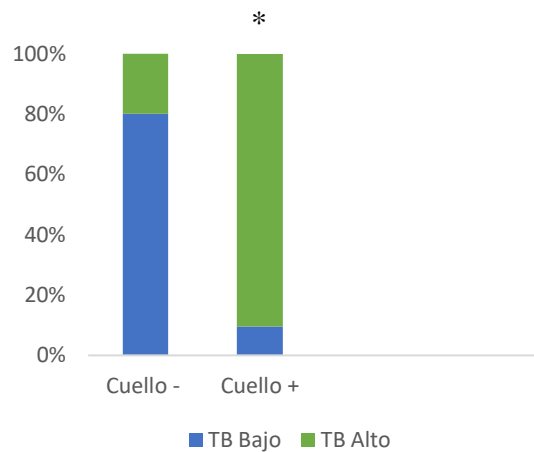
Variables	Positividad cuello		valor p
	no (n=40)	sí (n=21)	
DOI	7,45 $\pm$ 0,75	12,05 $\pm$ 1,13	< 0,001

#### 6.2.4.3 Metástasis linfáticas cervicales y su relación con el índice de Tumor Budding

La tabla 12 muestra la correlación entre las metástasis linfáticas cervicales y el índice de TB, encontrando una asociación estadísticamente significativa entre la intensidad del TB en el ITF y la presencia de metástasis linfáticas cervicales ( $p < 0,001$ ). El 90,5% de los pacientes que presentaron índices altos de TB, presentaban cuellos histológicamente positivos, y tan sólo dos pacientes (9,5%), con TB de alto grado, tenían ausencia de enfermedad metastásica cervical (Figura 36).

**Tabla 12:** Asociación entre metástasis linfáticas cervicales y el índice de Tumor Budding ( $p < 0,05$ )\*

Variables	Categorías	Positividad cuello		valor p
		no (n=40) frec (%)	sí (n=21) frec (%)	
Tumor Budding	1 (Bajo)	32 (80,0)	2 (9,5)	< 0,001
	2 (Alto)	8 (20,0)	19 (90,5)	



**Figura 35:** Gráfica que muestra la asociación entre las metástasis linfáticas cervicales y el TB ( $p < 0,05$ )\*

#### 6.2.4.4 Metástasis linfáticas cervicales y su relación con otros parámetros inmunohistoquímicos (E-cadherina, ki-67)

La tabla 13 muestra la correlación entre las metástasis linfáticas cervicales y los parámetros IHQ analizados (E-cadherina y Ki-67).

Encontramos una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de E-cadherina, el índice de proliferación calculado mediante Ki-67, y las metástasis linfáticas cervicales ( $p < 0,001$  y  $p < 0,001$  respectivamente).

**Tabla 13:** Asociación entre metástasis linfáticas cervicales y estudio IHQ ( $p < 0,05$ )\*

Variables	Categorías	Positividad cuello		valor p
		no (n=40) frec (%)	sí (n=21) frec (%)	
Ki-67 (%)	< 50	26 (65,0)	2 (9,5)	< 0,001
	≥ 50	14 (35,0)	19 (90,5)	
E-cadherina	1	6 (15,0)	15 (71,4)	< 0,001
	2 - 3	34 (85,0)	6 (28,6)	

#### 6.2.4.5 Regresión logística binaria para establecer factores predictivos independientes de metástasis linfáticas cervicales en el carcinoma de lengua oral

Para analizar la influencia de forma independiente de los diferentes parámetros clínico-patológicos y moleculares sobre las metástasis cervicales linfáticas, se realizó un análisis multivariante de regresión logística binaria incluyendo exclusivamente, para la realización de este test, los parámetros que habían mostrado significancia estadística en la prueba de Chi Cuadrado.

Este modelo mostró que el Índice de Tumor Budding era un factor predictor independiente de la presencia de metástasis linfáticas,  $p < 0,035$  (OR=1178, IC 95% (1,19 - 116,68))

*Tabla 14: Test multivariante de regresión logística binaria*

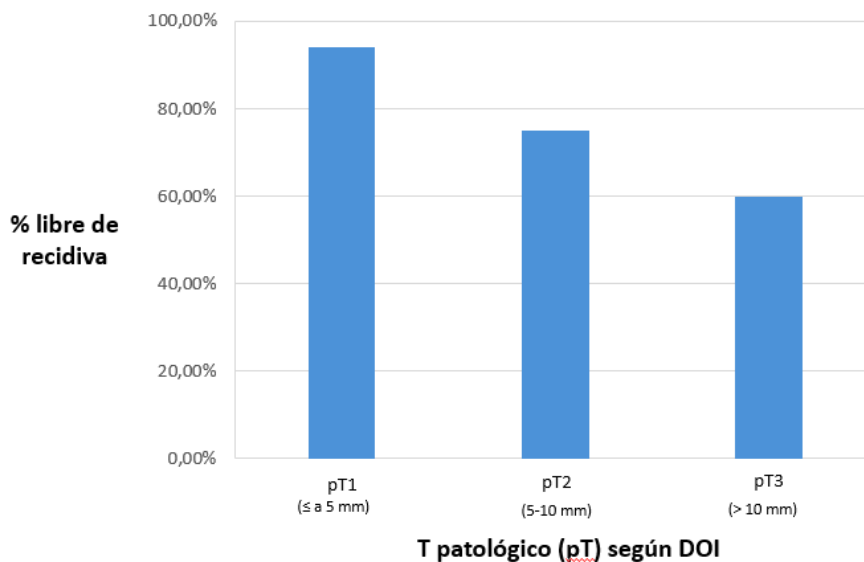
<i>Variables</i>	<i>Categorías</i>	<i>Positividad cuello</i>		<i>valor p</i>
		<i>OR</i>	<i>IC (95%)</i>	
<i>pT octava edición</i>	1	1		
	2	1,38	(0,09 - 21,14)	0,818
	3	2,43	(0,15 - 40,01)	0,535
<i>Tumor budding</i>	1 (Bajo)	1		
	2 (Alto)	11,78	(1,19 - 116,68)	0,035
<i>Infiltración perineural</i>	Ausente	1		
	Presente	5,36	(0,80 - 35,84)	0,084
<i>ki-67 (%)</i>	< 50	1		
	≥ 50	6,56	(0,60 - 71,81)	0,123
<i>e-cadherina</i>	1	1		
	2 - 3	1,95	(0,15 - 24,71)	0,607

## 6.2.5 Objetivo 5: Identificar la repercusión del índice de Tumor Budding sobre el tiempo libre de enfermedad y la supervivencia

### 6.2.5.1 Tiempo libre de Enfermedad (TLE)

La tabla 15 resume la asociación entre todas las variables analizadas en nuestro estudio (clínico-patológicas, histológicas e IHQ) y el TLE.

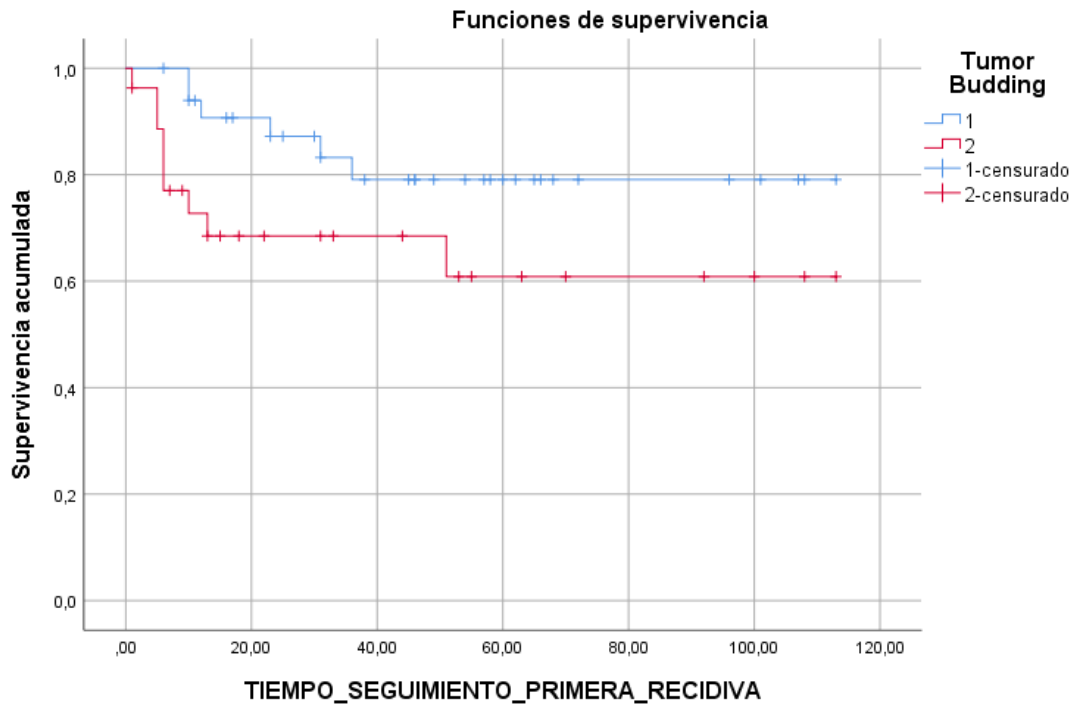
Encontramos una asociación estadísticamente significativa entre la profundidad de invasión tumoral, y la aparición de recidivas ( $p=0,036$ ). Observamos que el 95% de los pacientes con un DOI  $< 5$  mm no presentan recurrencias a lo largo del estudio, mientras que ese porcentaje disminuye (60%) en los pacientes con DOI  $>10$  mm (Figura 37). Sin embargo, no encontramos ninguna asociación entre el índice de TB y el TLE.



**Figura 36:** Gráfica que muestra el TLE según DOI

Tabla 15: Asociación entre las variables del estudio y el TLE

<i>variable</i>	<i>categorías</i>	<i>Recurrencia</i>		<i>valor p</i>
		<b>No (n=46) frec (%)</b>	<b>Sí (n=15) frec (%)</b>	
<i>Edad (años)</i>	< 40	4 (8,7)	1 (6,7)	0,869
	40- 60	18 (39,1)	7 (46,7)	
	> 60	24 (52,2)	7 (46,7)	
<i>Sexo</i>	hombre	33 (71,7)	7 (46,7)	0,076
	mujer	13 (28,3)	8 (53,3)	
<i>Tabaco</i>	Ausente	24 (52,2)	11 (73,3)	0,150
	Presente	22 (47,8)	4 (26,7)	
<i>Alcohol</i>	Ausente	37 (80,4)	13 (86,7)	0,586
	Presente	9 (19,6)	2 (13,3)	
<i>Grado diferenciación</i>	Bien	9 (19,6)	2 (13,3)	0,781
	Moderadamente	33 (71,7)	11 (73,3)	
	Pobremente	4 (8,7)	2 (13,3)	
<i>T clínico</i>	1	23 (50,0)	4 (26,7)	0,114
	2	23 (50,0)	11 (73,3)	
<i>pT octava edición</i>	< 5 mm	14 (30,4)	10 (6,7)	0,036
	5 – 10 mm	20 (43,5)	5 (33,3)	
	>10 mm	12 (26,1)	9 (60,0)	
<i>Tumor budding</i>	1	28 (60,9)	6 (40,0)	0,158
	2	18 (39,1)	9 (60,0)	
<i>Infiltración perineural</i>	Ausente	29 (63,0)	8 (53,3)	0,504
	Presente	17 (37,0)	7 (46,7)	
<i>Infiltración vascular</i>	Ausente	43 (93,5)	13 (86,7)	0,404
	Presente	3 (6,5)	2 (13,3)	
<i>Mortalidad</i>	No	42 (91,3)	7 (46,7)	< 0,001
	Sí	4 (8,7)	8 (53,3)	
<i>Ki-67 (%)</i>	< 50	22 (47,8)	6 (40,0)	0,597
	≥ 50	24 (52,2)	9 (60,0)	
<i>E-cadherina</i>	1	13 (28,3)	8 (53,3)	1,000
	2 - 3	33 (71,7)	7 (46,7)	



*Figura 37: Curva de recidiva de Kaplan-Meier para TLE según índice de TB*

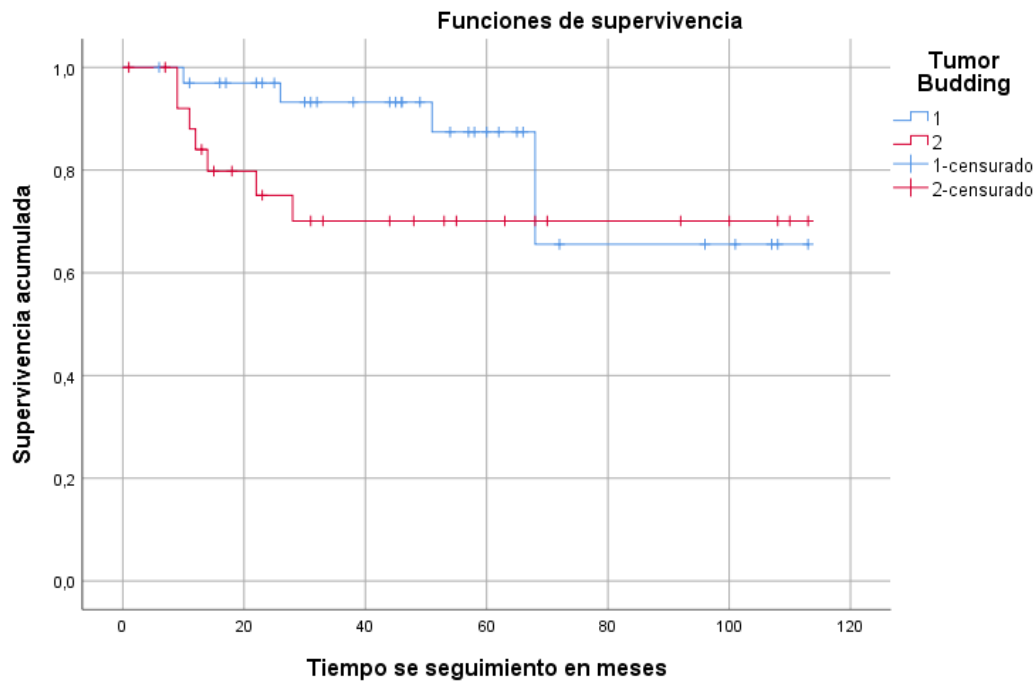
No hay diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de aparición de recidiva locorregional entre los grupos TB 1 vs TB 2: TB1:  $93,9 \pm 7,0$  vs TB2:  $74,8 \pm 10,2$  meses; Log rank (Mantel-Cox)  $p = 0,076$ .

### 6.2.5.2 Supervivencia Global

Para estudiar los factores que podían influir sobre la supervivencia global, analizamos todas las variables incluidas en el estudio (Tabla 16). Solo encontramos una asociación estadísticamente significativa entre la aparición de recurrencias y un aumento de la mortalidad.

**Tabla 16:** Asociación entre las variables del estudio y la supervivencia

<i>Variable</i>	<i>Categorías</i>	<i>Mortalidad</i>		<i>valor p</i>
		<b>no (n=49) frec (%)</b>	<b>sí (n=12) frec (%)</b>	
<i>Edad (años)</i>	< 40	4 (8,2)	1 (8,3)	0,827
	40- 60	21 (42,9)	4 (33,3)	
	> 60	24 (49,0)	7 (58,3)	
<i>Sexo</i>	hombre	32 (65,3)	8 (66,7)	0,929
	mujer	17 (34,7)	4 (33,3)	
<i>Tabaco</i>	Ausente	27 (55,1)	8 (66,7)	0,468
	Presente	22 (44,9)	4 (33,3)	
<i>Alcohol</i>	Ausente	38 (77,6)	12 (100,0)	0,070
	Presente	11 (22,4)	0 (0,0)	
<i>Grado diferenciación</i>	Bien	8 (16,3)	3 (25,0)	0,779
	Moderadamente	36 (73,5)	8 (66,7)	
	Pobremente	5 (10,2)	1 (8,3)	
<i>T clínico</i>	1	24 (49,0)	3 (25,0)	0,134
	2	25 (51,0)	9 (75,0)	
<i>pT octava edición</i>	< 5 mm	14 (28,6)	1 (8,3)	0,117
	5-10 mm	21 (42,9)	4 (33,3)	
	> 10 mm	14 (28,6)	7 (58,3)	
<i>Tumor budding</i>	1 (Bajo)	29 (59,2)	5 (41,7)	0,274
	2 (Alto)	20 (40,8)	7 (58,3)	
<i>Infiltración perineural</i>	Ausente	30 (61,2)	7 (58,3)	0,584
	Presente	19 (38,8)	5 (41,7)	
<i>Infiltración vascular</i>	Ausente	46 (93,9)	10 (83,3)	0,233
	Presente	3 (6,1)	2 (16,7)	
<i>Ki-67 (%)</i>	< 50	23 (46,9)	5 (41,7)	0,743
	≥ 50	26 (53,1)	7 (58,3)	
<i>E-cadherina</i>	1	15 (30,6)	6 (50,0)	0,205
	2 o 3	34 (69,4)	6 (50,0)	



*Figura 38: Curva de supervivencia de Kaplan-Meier para SG según Índice de TB*

No hay diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de supervivencia entre los grupos TB 1 vs TB 2: TB1:  $93,2 \pm 7,6$  vs TB2:  $83,9 \pm 9,3$  meses; Log rank (Mantel-Cox)  $p = 0,219$ .



## **VII.DISCUSIÓN**

El CE lingual es la neoplasia maligna más frecuente de todos los tumores que asientan en la cavidad oral. Presenta mayor agresividad que otros tumores en esta área debido a su rápida invasión local, su elevado índice de diseminación a los ganglios linfáticos cervicales y su alta tasa de recidiva. La existencia de metástasis linfáticas cervicales constituye el indicador pronóstico más determinante<sup>123</sup>, apreciando una reducción significativa en la supervivencia de los pacientes que las presentan<sup>124</sup>.

El TB, definido como la presencia de células asiladas o formando pequeños grupos celulares de hasta 5 células a nivel del ITF, ha sido estudiado en distintos tumores sólidos de estirpe epitelial. Su presencia es considerada como la manifestación histológica de dos propiedades de malignidad: pérdida de cohesión celular y movimiento invasivo activo. En el carcinoma colorrectal ha sido incluido en las guías clínicas como factor histológico pronóstico independiente, mientras que, en el CE de cavidad oral, aún continúa en estudio su papel pronóstico. El presente trabajo de Tesis Doctoral se ha llevado a cabo con el objetivo de analizar algunas características moleculares y su posible significado pronóstico en estadios iniciales de CE lingual.

### **7.1 Consideraciones sobre la muestra estudiada**

A pesar de que los carcinomas de células escamosas que asientan en la cavidad oral presentan características clínico-patológicas similares, la agresividad con la que el tumor se comporta, las vías de diseminación linfática y la actitud terapéutica varía en función de la localización dentro de este área<sup>125</sup>. Incluso cuando estudiamos el órgano lingual, las guías clínicas presentan algoritmos terapéuticos diferentes para los dos tercios anteriores (lengua oral), que se incluyen dentro de las guías de cáncer oral, mientras que la base y amígdala lingual quedan excluidas, entrando en la categoría de orofaríngea<sup>126</sup>. La mayor parte de estudios sobre TB se han llevado a cabo en la cavidad oral, presentando la desventaja, de analizar neoplasias con distintas localizaciones dentro de esta región anatómica<sup>127</sup>. Nuestro trabajo elimina este inconveniente, al haber incluido exclusivamente tumores que asientan en la lengua oral, permitiendo obtener una muestra más homogénea. Sin embargo, este hecho presenta como inconveniente una reducción significativa del tamaño muestral.

Según distintas series, la localización más frecuente dentro de la lengua oral son los bordes laterales (60-70%) en forma de patrón ulcerativo, seguido de la cara ventral (30-40%), asentando en el dorso tan sólo el 3-5% de los mismos<sup>29</sup>. *Lederman*<sup>128</sup> propuso que la acumulación de carcinógenos en la saliva retenida en los bordes laterales por un período prolongado podría explicar el aumento de frecuencia en estas áreas. Además, los bordes laterales son regiones expuestas a traumatismos crónicos, por roce de prótesis o piezas dentales destruidas o en mal estado. Nuestros resultados concuerdan con estos datos, puesto que, los bordes laterales, fueron la localización más frecuente (82% de los casos), seguidos de la cara ventral y solamente 2 casos asentaron en la cara dorsal. Como ya hemos comentado, los tumores de la línea media son entidades casi excepcionales que representan menos del 1% y suelen desarrollarse sobre leucoplasias previas<sup>30</sup>. En nuestro estudio, sólo uno de los tumores se presentó en la línea media y la paciente, sin hábitos de riesgo, había presentado previamente una leucoplasia de más de 10 años de evolución.

Actualmente, como ya hemos explicado e insistiremos más adelante, existe controversia en el tratamiento de los ganglios linfáticos cervicales en pacientes con cáncer de lengua sin metástasis aparentes en el estudio clínico-radiológico. Uno de ellos, quizás el procedimiento terapéutico más ampliamente extendido en estos pacientes, consiste en la exéresis tumoral asociada a una linfadenectomía cervical<sup>129</sup>. Todos los sujetos incluidos en nuestra muestra serie, a pesar de no presentar metástasis linfáticas en el estudio preoperatorio, debían haber sido sometidos a ambos procedimientos (exéresis del tumor + linfadenectomía cervical electiva asociada) con el fin de poder analizar la relación existente entre la intensidad de TB y la presencia de metástasis linfáticas. Además, no se incluyeron pacientes tratados previamente de CE intraorales porque, este hecho, podría condicionar la aparición de nuevas lesiones (tumores radio-inducidos) o producir una alteración en el patrón de diseminación linfática convencional.

La presencia de márgenes patológicos afectados en la resección del tumor primario constituye uno de los factores pronósticos individuales más determinantes<sup>130</sup>, aumentando significativamente el riesgo de recidiva loco-regional y disminuyendo el TLE y la SG<sup>131</sup>. Por lo tanto, para intentar homogeneizar lo más posible nuestra muestra y que el resto de variables estudiadas no se viesan alteradas por este factor, uno de los criterios de inclusión fue la presencia de márgenes quirúrgicos libres en las piezas tumorales analizadas.

## 7.2 Objetivo 1: Analizar la metodología diagnóstica del Tumor Budding

Como ya hemos comentado previamente, el análisis del ITF, correspondiente con las capas celulares más profundas del tumor y la interfaz con el estroma sano circundante, ha tomado gran protagonismo en las últimas décadas en el estudio de los CE de cavidad oral. Las células presentes en el ITF presentan un comportamiento más agresivo en comparación con las localizadas en la región central de la masa tumoral principal.

El TB es una manifestación histológica de células que se han separado de la masa tumoral principal y han migrado al tejido adyacente, actuando como “avanzadilla” para el resto de células neoplásicas. Por lo tanto, la presencia de TB representa una biología tumoral más invasiva y agresiva y, presuntamente, una de las vías iniciales para el desarrollo de metástasis linfáticas.

Desde que comenzó a analizarse la implicación pronóstica del TB en distintas neoplasias de estirpe epitelial se han empleado diferentes métodos para su evaluación y cuantificación<sup>132</sup>. En el carcinoma oral la secuencia diagnóstica más ampliamente extendida y utilizada en la literatura científica que hemos revisado es la propuesta en 2011 por Wang *et al.*<sup>107</sup> donde, una vez localizadas las secciones correspondientes con el frente ITF y visualizados con un objetivo de bajo aumento (4x), se localizan las áreas con mayor cantidad de “buds” para, posteriormente, realizar un recuento en una magnificación mayor (objetivo 20x).

Esta secuencia de trabajo es la que hemos empleado en nuestro estudio. Es importante destacar, como ya hemos mencionado previamente, tanto en esta metodología descrita como en nuestro trabajo, el análisis se ha llevado a cabo sobre piezas tumorales completas, donde el ITF suele localizarse en las secciones más profundas. Sin embargo, en estudios que se hayan realizado sobre biopsias preoperatorias y que puedan no incluir las zonas correspondientes con el ITF, también se ha descrito el análisis del TB intra-tumoral como un factor histológico pronóstico<sup>133</sup>, pero aún sin determinar en los carcinomas de cavidad oral<sup>127</sup>.

En relación a su categorización y gradación histológica, también se han propuesto distintos sistemas<sup>134,135,136</sup>, con diferentes puntos de corte para su clasificación entre alto y bajo grado, sobre todo en el carcinoma colorrectal, la neoplasia epitelial donde más se ha estudiado el papel pronóstico del TB. La ITBCC estableció su clasificación en tres grupos en el carcinoma colorrectal: BD1 (0-4 buds), BD2 (5-9 buds) y BD3 ( $\geq 10$  buds)<sup>137</sup>.

En los carcinomas de cavidad oral, al no estar el TB aún establecido como factor pronóstico en las guías clínicas, no existe un consenso sobre los puntos de corte aunque, en todas las clasificaciones que hemos revisado, solo se establecen dos categorías (alto y bajo grado) en lugar de tres (como en el carcinoma colorrectal). Se describen principalmente 3 puntos de corte : 3 buds ( $< 3$  bajo grado vs  $\geq 3$  alto grado)<sup>138</sup>; 10 buds ( $< 10$  buds bajo grado vs  $\geq 10$  buds alto grado)<sup>139,140</sup>, y sobre todo, 5 buds ( $< 5$  buds bajo grado vs  $\geq 5$  buds alto grado) en la mayoría de trabajos<sup>107,110,141,142</sup>.

*Almangush et al.*<sup>127</sup> realizaron un metaanálisis para estudios con distintos puntos de corte y paralelamente, dos metaanálisis unificando en cada uno los que tenían puntos de corte de 5 y los que tenían puntos de corte de 10. Concluyeron que, el riesgo de un peor pronóstico comienza a partir de la observación de más de 5 buds y, considerando este hecho, resulta necesario determinar en próximos estudios cual de estos puntos de corte tiene mayor predictibilidad y por tanto debería ser empleado en la práctica clínica habitual en los carcinomas de cavidad oral. Partiendo de estos datos y puesto que la mayor parte de estudios en cavidad oral toman como punto de corte 5 buds, sumado a ello la ventaja de dicotomizar esta variable, decidimos clasificar en nuestro estudio la presencia de TB en bajo grado ( $< 5$  buds) y alto grado ( $\geq 5$  buds).

Habitualmente la presencia de TB es analizada en tinciones con Hematoxilina-Eosina, aunque también es frecuente encontrar en la literatura estudios que emplean técnicas IHQ con Citoqueratina AE1/AE3 para su visualización. Ambas técnicas presentan ventajas y desventajas. La H-E permite apreciar mejor el grado de atipia morfológica y citológica; sin embargo, cuando existe una elevada inflamación peritumoral, los fibroblastos activados pueden tener una morfológica similar y malinterpretarse como “buds”. En estos casos, la tinción con Citoqueratina brinda una inestimable ayuda resaltando la presencia de estos *cluster* celulares<sup>143</sup>.

En el carcinoma colorrectal algunos estudios han encontrado mejor reproductibilidad y mayor consenso entre patólogos independientes en las muestras tratadas con IHQ frente a H-E<sup>144,145</sup>. Sin embargo, varios metaanálisis concluyen que la evaluación y clasificación del TB no difiere entre ambas técnicas y además, la relación coste-efectividad de la tinción con H-E es claramente superior a nivel mundial<sup>146,147</sup>. En 2016 se estableció en el ITBCC que el análisis del TB debía llevarse a cabo sobre tinciones con H-E siempre que no existan factores que limiten su evaluación (inflamación peritumoral, fragmentación glandular) empleando las técnicas de IHQ exclusivamente en los casos que se encuentren las mencionadas limitaciones con H-E<sup>83</sup>.

También cabe mencionar el desarrollo actual de algoritmos informatizados para facilitar la visualización en casos complejos y mejorar la variabilidad entre los observadores, así como automatizar su recuento. Varios grupos han publicado algoritmos para la detección y cuantificación de TB en el cáncer colorrectal<sup>148</sup>, carcinoma de vejiga<sup>149</sup> y en el carcinoma oral<sup>150</sup>. Todos ellos se han llevado a cabo sobre IHQ con Citoqueratina AE1/AE3 o inmunofluorescencia. Estos sistemas de cuantificación automática o semiautomática aún no se han descrito en tinciones con H-E.

En el cáncer oral tampoco existe ningún consenso en cuanto a tinciones se refiere. En la mayor parte de los estudios, se ha empleado exclusivamente la H-E. Sin embargo, *Leao et al.*<sup>151</sup>, en un estudio sobre 103 muestras de pacientes con CE oral donde comparan ambas técnicas, concluyen que la evaluación y cuantificación del TB en muestras tratadas con Citoqueratina AE1/AE3 presenta una mejor reproductibilidad, una mayor concordancia entre diferentes examinadores y una menor dificultad frente a su análisis con H-E.

En nuestro estudio todas las muestras fueron visualizadas por dos patólogos independientes de la sección de Cabeza y Cuello del Servicio de Anatomía Patológica del HGUGM. Primero en H-E y posteriormente, sobre muestras tratadas con técnicas de IQH teñidas con Citoqueratina AE1/AE1 con el fin de evaluar la concordancia o discordancia entre ambas tinciones.

En cuanto al tiempo que tardaron ambos patólogos en localizar las áreas con mayor densidad de TB, la diferencia inicial en los primeros 20 casos fue aproximadamente de 5 minutos, disminuyendo a menos de 40 segundos en las muestras posteriores según iba avanzando la destreza de los examinadores. En todos los casos, la visualización fue más rápida sobre los cortes sometidos a IHQ con citoqueratina A1-AE3, frente a los analizados sobre H-E.

En nuestro estudio, hemos encontrado una mejor reproducibilidad y concordancia entre los examinadores en las muestras tratadas con citoqueratina A1-AE3, principalmente en los casos de alta intensidad de TB. Un 11% de las muestras tumorales clasificadas inicialmente como baja intensidad de TB en los cristales de H-E, fueron posteriormente incluidas en el grupo de alta intensidad en el estudio IHQ. Este hecho podría deberse a una mayor presencia de reacción inflamatoria peritumoral en los casos de TB de alta intensidad y que dificultaría el recuento en las tinciones con H-E.

Cabe destacar que los examinadores al ser patólogos de la Unidad de Cabeza y Cuello, donde el análisis de TB no está incluido en las guías clínicas, al inicio del estudio no estaban familiarizados con su metodología diagnóstica. Por ello, conforme avanzó nuestro estudio, tanto los tiempos como la precisión del recuento mejoraron en las muestras de H-E. La IHQ con Citoqueratina AE1-AE3 facilita el diagnóstico al marcar exclusivamente las células de estirpe epitelial. Por ello, estos grupos celulares localizados tanto en el ITF como en el estroma circundante son más fácilmente identificables mediante esta técnica. Sin embargo, también hay que tener en cuenta, el coste de las inmunotinciones, así como los medios y personal del laboratorio empleados para la preparación de las mismas, siendo bastante superior respecto a las muestras de H-E. Además, si no se consigue una estandarización en todos los pasos de las técnicas IQH, los resultados podrían no ser precisos ni reproducibles. Por lo tanto, aunque en nuestro trabajo la IHQ presentó una mayor precisión como método diagnóstico de TB, creemos que su estudio llevado a cabo con personal médico entrenado en el análisis y recuento del mismo podría ser valorado exclusivamente en cristales teñidos con H-E, mejorando la relación coste-efectividad.

### 7.3 Objetivo 2: Evaluar la relación existente entre las características clínicas e histológicas del tumor primario y el índice de Tumor Budding

Como ya hemos comentado, la incidencia y mortalidad en el CE de cavidad oral es superior en hombres que en mujeres<sup>152</sup>. A pesar de que en la actualidad los estudios demuestran un aumento de la incidencia de CE lingual en mujeres, *Ng et al.*<sup>153</sup> describen una incidencia superior en hombres en 8 bases de datos correspondientes con registros regionales y estatales, y solamente en 3, encontraron una incidencia mayor en mujeres. En el presente trabajo, 2/3 de la muestra analizada fueron varones y 1/3 mujeres, sin encontrar una asociación estadísticamente significativa entre el sexo y el TLE

En relación a la edad, los trabajos de *Campbell et al.*<sup>154</sup> y *Davidson et al.*<sup>155</sup> refieren una supervivencia mayor en los grupos de menor edad en el carcinoma de lengua oral (< 50 años y < 40 años respectivamente). Por el contrario, *Sarkaria et al.*<sup>156</sup> concluyen que la agresividad del cáncer de lengua oral es mayor en pacientes más jóvenes (< 40 años) con un menor TLE y una menor supervivencia. Expuestas las discrepancias encontradas en estos estudios, los trabajos de *Siegelmann et al.*<sup>157</sup>, *Friedlander et al.*<sup>158</sup> y *Manuel et al.*<sup>159</sup>, no encuentran diferencias estadísticamente significativas entre la edad y la supervivencia en pacientes con CE de lengua oral. En nuestro trabajo, en concordancia con los últimos tres estudios expuestos, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de edad (<40 años, 40-60 años, > 60 años) y el TLE y la supervivencia.

Cuando se evalúa la relación del TB con variables clínico demográficas en pacientes con cáncer de lengua oral (edad, sexo y factores de riesgo), de los pocos estudios que se centran exclusivamente en la lengua oral, el único que hemos encontrado que analiza la intensidad de TB con los factores demográficos es el de *Xie et al.*<sup>160</sup>, sin encontrar relación estadísticamente significativa.

*Yi-Yun Ho et al.*<sup>161</sup> analizan el significado pronóstico del TB y su relevancia frente a la última actualización (8ª Edición) de la Clasificación del Cáncer oral de la AJCC. En su estudio sobre 200 pacientes intervenidos de CE oral en estadios iniciales, observaron una correlación estadísticamente significativa entre el TB y la edad de los pacientes, encontrando índices de TB más elevados en pacientes más jóvenes. Para esta

asociación, exponen dos teorías: por un lado, la existencia de una respuesta inmune e inflamatoria de mayor intensidad en los pacientes más jóvenes que contribuye a la secreción de citoquinas y factores de crecimiento, y, por ende, a una mayor pérdida de cohesión de las células tumorales con un patrón de invasión más agresivo. Por otro lado, la lengua fue la localización más frecuente de neoplasias en el grupo de pacientes jóvenes y según sus resultados, aprecian una mayor intensidad de TB en este órgano respecto a otras áreas de la cavidad oral.

*Punnya et al.*<sup>139</sup> en un estudio sobre 75 casos de CE oral, observaron que tanto el grupo de hombres como el grupo de pacientes más jóvenes, con una media de edad de 48,1 años, presentaron una intensidad más alta de TB, en comparación con el grupo de mujeres y con el grupo de pacientes de edad más avanzada, donde se observó una menor intensidad del mismo.

En nuestro estudio no encontramos una asociación estadísticamente significativa entre la intensidad del TB y la edad. Cuando estratificamos esta variable, cada grupo de edad mostró un porcentaje similar entre intensidad baja y alta de TB. En cuanto al género, no encontramos tampoco ninguna correlación, aunque cabe mencionar que los casos con mayor intensidad de TB fueron superiores en hombres (74,1%) frente a las mujeres (25,9%).

En cuanto al consumo de tabaco y alcohol, considerados como factores de riesgo clásicos en el desarrollo de CE oral, trabajos como los de *Polesel et al.*<sup>162</sup>, y los de *Bungard et al.*<sup>163</sup> describen un pronóstico desfavorable en pacientes fumadores que desarrollaron cáncer oral. Contrariamente, *Gorsky et al.*<sup>164</sup> en su estudio sobre en pacientes con cáncer de lengua, no encontraron ninguna asociación entre el tabaco y un pronóstico desfavorable.

*Turati et al.*<sup>165</sup> en su metaanálisis donde analizan el riesgo relativo de padecer CE oral tanto en lengua, orofaringe e hipofaringe en pacientes consumidores habituales de alcohol, concluyen que los bebedores diarios con ingesta abundante, presentaron un RR 4,1 veces mayor en el desarrollo del cáncer lingual, siendo menor que para los CE de orofaringe e hipofaringe (RR 7,7 y 9 respectivamente).

La mayor parte de los trabajos revisados no encuentran diferencias en los factores de riesgo (tabaco y alcohol) de los pacientes entre los grupos de índice de TB alto y bajo grado<sup>161,160,151</sup>. En nuestro estudio, aunque tampoco hemos encontrado asociación estadística significativa entre el consumo de tabaco y alcohol y la intensidad de TB, si hemos observado que, curiosamente, el grupo de TB alto presentó un mayor porcentaje de no fumadores habituales ni bebedores (66,7% y 92,6% respectivamente) frente al de pacientes consumidores de algunas de estas sustancias (33,3% y 7,4% respectivamente).

Distintos estudios han encontrado una asociación estadísticamente significativa entre una alta intensidad de TB y una mayor profundidad de invasión tumoral en el carcinoma colorrectal<sup>166,167,168</sup>. Esta asociación con el DOI medida en mm, también ha sido confirmada por *Almangush et al.*<sup>169</sup> en el carcinoma de lengua.

*Yi-Yun Ho et al.*<sup>161</sup> observan una asociación estadísticamente significativa entre el TB y el tamaño clínico tumoral, el DOI, la infiltración perineural y la infiltración vascular sobre 200 casos de CE de lengua oral y suelo de boca.

Nuestro estudio, también confirma la asociación entre el TB y la profundidad de invasión tumoral, ya que hemos encontrado una asociación estadísticamente significativa entre ambas variables histológicas ( $p=0,001$ ), apreciando mayor intensidad de TB en aquellas muestras tumorales en la que se evidenció una mayor profundidad. Sin embargo, no hemos encontrado una asociación entre la intensidad de TB, y el tamaño clínico-radiológico del tumor.

*Chaitra et al.*<sup>170</sup> en su trabajo sobre 69 casos de CE oral, encontraron una asociación estadísticamente significativa entre la intensidad de TB y la edad, el grado de diferenciación tumoral, la infiltración perineural, infiltración vascular y las metástasis linfáticas cervicales.

Otros estudios también han encontrado una asociación estadísticamente significativa entre el TB y el grado de diferenciación histológica, la infiltración perineural y la infiltración vascular en el carcinoma colorrectal<sup>171</sup> y en el adenocarcinoma intestinal<sup>172</sup>.

En nuestro trabajo, si hemos encontrado una asociación estadísticamente significativa entre el TB y la invasión perineural ( $p=0,021$ ). Sin embargo, no hemos observado asociación con el grado de diferenciación tumoral ( $p=0,454$ ), ni con la invasión vascular ( $p=0,093$ ). Este hecho puede deberse a que la mayor parte de muestras tumorales analizadas en el presente estudio, fueron clasificadas como moderadamente diferenciadas (72,1%), mientras que solamente el 9,8% presentaron un pobre grado de diferenciación tumoral. Algo similar sucede respecto a la invasión vascular, la cual ha demostrado ser muy baja en nuestra serie, apreciándose únicamente en el 8,2% (5 casos) de las piezas tumorales analizadas.

#### **7.4 Objetivo 3: Valorar las características inmunohistoquímicas (E-Cadherina, Ki-67) presentes en el ITF y su relación con el índice de Tumor Budding**

##### ***Tumor Budding y E- Cadherina***

La cadherina-E es una molécula de adhesión intercelular que se expresa en la mayoría de epitelios tanto embrionarios como adultos y juega un papel fundamental en el mantenimiento de las uniones intercelulares. Una pérdida en su expresión determina una disminución en la cohesión celular, constituyendo un evento precoz en la capacidad invasiva tumoral y en el desarrollo de metástasis<sup>173</sup>. Se ha considerado que el gen que transcribe la E-cadherina podría actuar como un supresor en dicha actividad<sup>174</sup>.

Existen diversos mecanismos que pueden conducir a una inhibición en la expresión de E-Cadherina como son, la pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 16, descrita en el carcinoma hepatocelular<sup>175</sup>, así como mutaciones inactivadoras en el gen CDH1, presentes en el carcinoma lobulillar de mama y cáncer gástrico; sin embargo, estas mutaciones son infrecuentes en los carcinomas de cavidad oral<sup>176</sup>.

A nivel de los tumores que asientan en la cavidad oral, uno de los mecanismos más observados es el silenciamiento epigenético por hipermetilación de las islas CpG en la región promotora del gen de la E-cadherina incluso, en ausencia de mutaciones<sup>177,178,179</sup>. También se ha descrito una represión transcripcional, existiendo una relación inversa entre la expresión de la proteína *Snail* y la expresión de la E-Cadherina<sup>180,181</sup>.

Varios estudios han encontrado una correlación entre el modo de invasión tumoral y la expresión de E-cadherina en el cáncer oral, concluyendo que neoplasias epiteliales con un patrón histológico más invasivo (mayor disociación entre las células tumorales), presentaron una expresión ausente/débil de E-cadherina en comparación con tumores menos invasivos<sup>182,183,184</sup>. Además, los trabajos de *Shinohara et al.*<sup>185</sup> y *Tanaka et al.*<sup>182</sup> sobre pacientes con CE de cavidad oral, hallaron una relación estadísticamente significativa entre la expresión de E-cadherina y las metástasis cervicales al momento diagnóstico, encontrándose más adenopatías metastásicas en casos con pobre expresión de E-cadherina en la masa tumoral.

Como hemos explicado anteriormente, la presencia de TB en el ITF se corresponde con una manifestación histológica de la disociación celular respecto a la masa tumoral principal a nivel de las capas más profundas e invasivas. *Nakagawa et al.*<sup>186</sup> en su estudio sobre 55 pacientes intervenidos de cáncer epidermoide de esófago en estadios iniciales (T1) encontraron una correlación significativa entre un alto grado de TB y una subexpresión de E-Cadherina ( $p < 0,01$ ), así como una correlación entre la expresión de E-cadherina y el TB con la aparición de metástasis ganglionares ( $p = 0,04$  y  $< 0,01$  respectivamente).

*Lee S. et al.*<sup>187</sup> evaluando la expresión de E-cadherina, Beta-catenina y S100A4 mediante IHQ en el carcinoma colorrectal, observaron una relación entre la pérdida de expresión de E-Cadherina, y un alto grado de TB, la invasión perineural y el grado de diferenciación tumoral. Esta asociación también ha sido evidenciada en el carcinoma ductal pancreático<sup>188</sup> y en el carcinoma de endometrio<sup>189</sup>. Tan solo hemos encontrado un trabajo realizado sobre 32 piezas de carcinoma nasosinusal de tipo intestinal donde la presencia de TB se asoció a un peor pronóstico de los pacientes, pero no se apreció una relación con la pérdida de expresión de E-cadherina.

A nivel de la cavidad oral, no son muchos los estudios que han valorado las características biológicas del TB mediante técnicas IHQ. *Wang et al.*<sup>107</sup> en su trabajo sobre 230 casos de CE de Cabeza y Cuello, hallaron una intensa reducción en la expresión de E-Cadherina asociada también a una sobreexpresión de vimentina en la membrana de las células del TB, tanto en el IFT, como en el estroma por delante del mismo, en comparación con las células localizadas en el centro y en superficie de la masa tumoral (64% vs 90%,  $p < 0,05$ ).

*Attramadal et al.*<sup>109</sup> en CE de cavidad oral en estadios iniciales (T1-2/ N0) encontraron una pérdida generalizada de expresión de E-Cadherina en la membrana de los clusters celulares en el ITF, y tan solo un 6% de tumores con alto índice de TB mostraron inmunotinción intensa a nivel de los buds.

En el presente estudio, hemos analizado por medio de un estudio IHQ, la expresión y distribución de E-cadherina a nivel del ITF, en CE de lengua oral en estadios iniciales. Decidimos elegir esta técnica por distintos motivos: en primer lugar, nos permite

una visualización directa, tanto cuantitativa como cualitativa (homogeneidad e intensidad) y su asociación con el TB y otros parámetros clínicos e histopatológicos. En segundo lugar, esta técnica puede ser realizada sobre muestras embebidas en parafina, incluso fijadas hace años. En el examen de los 61 casos, hemos encontrado una pérdida de expresión de E-cadherina (tinción débil, detectada <10% de las células tumorales teñidas) en el 70% de las muestras con un alto índice de TB, frente al 5,9% de las muestras con un bajo índice de TB, hallando una relación estadísticamente significativa, entre un alto índice de TB y una pobre expresión de E-cadherina.

Además, cabe destacar, que se encontró también una relación estadísticamente significativa entre la disminución de E-cadherina y la aparición de metástasis cervicales ( $p < 0,001$ ). Sin embargo, no encontramos una relación entre la subexpresión de E-cadherina y un aumento de las recurrencias o la mortalidad.

### ***Tumor Budding y Ki-67***

La proliferación celular aumentada sin los mecanismos de control habituales que regulan el crecimiento celular, es una característica de las células tumorales. El Ki-67 es una proteína nuclear presente en todas las células con proliferación activa, y es utilizado como un marcador IHQ para evaluar la capacidad proliferativa tumoral. Para su análisis, el índice de proliferación celular ha sido convertida en una variable dicotómica con un punto de corte del 50%.

Existe controversia en los estudios realizados sobre CE de cavidad oral respecto al papel pronóstico que muestra el Ki-67. *Myoung et al.*<sup>190</sup> sobre una muestra de 113 pacientes de CE oral encontraron una correlación entre los tumores que presentaban alto grado de Ki-67 y PCNA en el ITF y un aumento de las metástasis linfáticas cervicales y una disminución de la supervivencia en estos pacientes.

*Klimowicz et al.*<sup>191</sup> realizando mediciones de Ki-67 sobre imágenes digitalizadas concluyeron que este parámetro podría constituir por sí mismo un factor pronóstico independiente en el CE oral.

*Sittel et al.*<sup>192</sup> hallaron un índice de proliferación más elevado en tumores que habían presentado un menor TLE, concluyendo que el Ki-67 podría ser un buen predictor de recidivas tempranas.

*Bettendorf et al.*<sup>193</sup> correlacionaron el índice de proliferación con el patrón de invasión, el grado de diferenciación, la profundidad de invasión y las metástasis en los ganglios cervicales.

Sin embargo, otros estudios como los de *Piffko et al.*<sup>194</sup>, *De Vicente et al.*<sup>195</sup>, *Watanabe et al.*<sup>196</sup>, no han encontrado asociación alguna entre un aumento de la proliferación y un aumento de las metástasis cervicales, un aumento de las recurrencias y tampoco con una disminución de la supervivencia.

En nuestro estudio, hemos encontrado una asociación estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ) entre un alto índice de proliferación y la afectación de los ganglios linfáticos cervicales, existiendo un índice de proliferación ki-67  $>30\%$  en el 90,5% de los pacientes que presentaron cuellos positivos. Sin embargo, no hemos encontrado asociación entre este índice y las recurrencias y tampoco con la supervivencia.

Uno de los objetivos del presente trabajo ha sido valorar la asociación entre la intensidad del TB y el índice de proliferación medido mediante Ki-67. En la literatura científica hemos encontrado pocos estudios que analicen esta relación. *Okcu et al.*<sup>197</sup> en un estudio sobre 311 casos de carcinoma ductal de mama encontraron una asociación estadísticamente significativa entre un alto índice de TB en el ITF y un alto índice de proliferación con ki-67.

*Zheng et al.*<sup>198</sup> en su trabajo sobre 95 tumores de CE cervical, hallaron una disminución del índice de proliferación en las áreas de mayor intensidad de los buds, respecto a la masa tumoral principal, pero no compararon las áreas de bajo grado de TB con las de alto grado.

A nivel de tumores que asientan en la cavidad oral, solo hemos encontrado dos estudios que analicen esta asociación. Por un lado, *Attramadal et al.*<sup>109</sup>, sobre una muestra de 62 pacientes que presentaron CE de cavidad oral en estadios iniciales (T1-2/ N0), no

encontraron una correlación entre la intensidad de TB y el índice de proliferación celular medido mediante Ki-67<sup>109</sup>.

Contrariamente, *Marangon et al.*<sup>113</sup> en un estudio con una muestra mayor de pacientes con CE oral (163 pacientes) si encontraron una asociación, observando que el índice de proliferación medido en inmunotinciones con Ki-67 era más alto en los carcinomas orales con mayor índice de TB en comparación con los que presentaron un índice de TB más bajo.

Nuestros resultados concuerdan con los expuestos por *Maragon et al*, encontrando una relación estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ) entre un alto grado de Tumor Budding y un alto índice de proliferación celular. De los casos que fueron clasificados como alto índice de TB, el 85,2% presentaron un índice de proliferación de  $ki-67 > 50\%$ . Estos resultados podrían reforzar la hipótesis de que el TB es un fenómeno histológico asociado con la progresión tumoral y un comportamiento biológico más agresivo con una mayor tasa de proliferación celular.

### **7.5 Objetivos 4 y 5: Estudiar el significado pronóstico del Tumor Budding sobre la presencia de metástasis linfáticas cervicales, el tiempo libre de enfermedad y la supervivencia**

La detección de metástasis cervicales preoperatorias se basa en la exploración clínica y en las pruebas de imagen (TC, RMN, PET-TC). Sin embargo, estas técnicas tienen una sensibilidad del 70%, y son incapaces de diagnosticar micrometástasis que puedan estar presentes a nivel de los ganglios linfáticos cervicales<sup>199</sup>. Se estima que entre el 20-40% de los pacientes con CE de lengua oral, incluso en estadios iniciales (T1-T2 N0), presentan metástasis ocultas al momento diagnóstico<sup>200</sup>.

La actitud terapéutica en los pacientes con cuellos positivos (cN+) está bien establecida, asociando una linfadenectomía electiva a la resección del tumor primario. Sin embargo, existe controversia en el manejo de los pacientes con cuellos clínicamente negativos (cN0), pudiendo optar por una actitud conservadora sin asociar linfadenectomía y realizando una vigilancia estrecha postoperatoria de los ganglios linfáticos (“*watchful waiting*”)<sup>52,201</sup>; realizar una linfadenectomía asociada profiláctica<sup>202,203,204</sup>; o realizar una biopsia selectiva de ganglio centinela<sup>205,206</sup>.

Teniendo en cuenta estas circunstancias, numerosos autores pretenden encontrar características histopatológicas que puedan ser fácilmente evaluadas sobre tinciones de H-E para intentar predecir un comportamiento tumoral más agresivo y un mayor riesgo de existencia de metástasis linfáticas ocultas en pacientes con cuellos clínico-radiológicos negativos<sup>199</sup>. La presencia o ausencia de estos parámetros histológicos, permitiría estratificar los pacientes según grupos de riesgo para valorar si es necesario asociar una linfadenectomía cervical a la resección del tumor primario<sup>207</sup>.

A la hora de determinar el probable significado pronóstico de una característica histológica se debe comparar con otras ya consensuadas y establecidas. La relevancia del TB como factor histológico en las neoplasias malignas para predecir un mayor riesgo de metástasis linfáticas, así como factor pronóstico independiente en relación al tiempo libre de enfermedad y supervivencia, ya ha sido ampliamente comprobada en el carcinoma colorrectal, neoplasia donde está incluido en las guías clínicas del TNM desde 2017<sup>208</sup> y la WHO desde 2019<sup>209</sup>. También se ha comprobado su papel como marcador pronóstico

en el carcinoma de esófago<sup>210</sup>, cáncer de páncreas<sup>211</sup>, cáncer de mama<sup>212</sup>, carcinoma de pulmón<sup>213</sup> y carcinoma de cuello uterino<sup>214</sup> entre otras.

En varios estudios llevados a cabo sobre CE de cavidad oral, el TB ha mostrado un valor pronóstico superior en los análisis multivariantes, comparados con otros factores histológicos clásicos como son, el estadiaje clínico TNM, la profundidad de invasión tumoral, y el grado de diferenciación tumoral.

*Chatterjee et al.*<sup>215</sup> en su estudio sobre una muestra de 126 pacientes con CE de cavidad oral T1/2 N0, evalúan la capacidad predictiva de distintos parámetros histológicos incluyendo el patrón de invasión tumoral, el TB, el grado de diferenciación tumoral, la invasión perinervial, la invasión vascular, la profundidad de invasión tumoral, y la respuesta estromal, observando en el análisis multivariante, que la presencia de un alto índice de TB y el WPOI, fueron los dos factores más significativos en relación a la predicción de metástasis linfáticas cervicales. Además, avalan la sencillez en el diagnóstico sobre tinciones con H-E y bajo coste, para ser incluidos en las guías clínicas del cáncer oral.

*Nan Xie et al.*<sup>160</sup> estudian el papel pronóstico del DOI y del TB sobre una muestra de 195 pacientes con CE de lengua oral T1/2 N0. En el análisis univariante, encontraron una asociación estadísticamente significativa entre la intensidad de TB y las metástasis cervicales ocultas, la recidiva loco-regional y la reducción de la supervivencia. En el análisis multivariante, el TB demostró ser un factor pronóstico independiente.

*Shimazu et al.*<sup>216</sup> desarrollaron un modelo pronóstico basado en la obtención de distintas puntuaciones midiendo la profundidad de invasión tumoral, la intensidad de TB y el microambiente tumoral, sobre una muestra de 250 secciones de CE de lengua. La intensidad de TB y el microambiente tumoral resultaron ser variables independientes en la predicción de las metástasis linfáticas y la supervivencia global.

Merece la pena destacar el estudio llevado a cabo por *Seki et al.*<sup>119</sup>. En él, analizan distintos indicadores histológicos en 209 biopsias incisionales preoperatorias de carcinoma oral, en lugar de piezas tumorales completas como en la mayoría de los trabajos publicados. En el análisis multivariante, el TB y la infiltración vascular, fueron

los únicos factores pronósticos independientes. Este hecho es interesante y resalta la importancia pronóstica del TB, porque en algunas biopsias, sobre todo en tumores con mayor penetración, puede no obtenerse una muestra representativa de las zonas más profundas del tumor, y en esos casos, el TB tanto en el ITF como el TB peritumoral, tendría mayor utilidad frente a otros factores clásicos como el DOI.

Uno de los últimos y más recientes metaanálisis publicado por *Elseragy et al.*<sup>217</sup> sobre estudios realizados exclusivamente en CE de lengua oral en estadios iniciales, concluye que el TB se asocia con la supervivencia global (HR 2,32; 95% CI 1,40-3,84;  $p < 0,01$ ) y con el tiempo libre de enfermedad (1,89; 95% CI 1,13-3,15;  $p = 0,02$ ). Subrayan que, debido al coste-efectividad que presenta su análisis, debería ser incluido en las guías clínicas del CE oral.

*Arora et al.*<sup>218</sup> analizan la sensibilidad y especificidad de distintos factores histopatológicas sobre 336 casos con el fin de desarrollar un modelo predictivo de desarrollo de metástasis linfáticas para pacientes en estadios iniciales de CE de cavidad oral. En el análisis multivariante, las variables que mostraron capacidad como factores pronósticos independientes en la presencia de metástasis linfáticas, fueron, en orden descendente: El DOI, el patrón de invasión tumoral, la infiltración perineural, la respuesta linfocitaria, y, por último, el TB (OR=1.28, sensibilidad=69%, especificidad=63%).

*Manjula et al.*<sup>140</sup> estudian la capacidad predictiva de distintos factores clínico-histológicos sobre una muestra de 33 pacientes intervenidos de cáncer escamoso de encía oral. En el análisis univariante, el TB, el hábito tabáquico, el sexo masculino, y el patrón de invasión tumoral tipo 5, resultaron ser factores predictivos de metástasis cervicales; sin embargo, en el análisis multivariante, solamente la profundidad de invasión tumoral y la presencia de metástasis cervicales ocultas, resultaron ser factores pronósticos independientes. Es importante destacar que, este es de los pocos estudios llevados a cabo sobre tumores de cabeza y cuello, donde se emplea como punto de corte la presencia de 10 buds, en lugar de 5 como clasifican la mayor parte de los estudios y también en nuestro trabajo.

En el presente trabajo, hemos encontrado que los cuellos histológicamente positivos, presentaron un 90,5% de casos de TB alto, y solo un 9,5% de TB bajo,

estableciéndose una asociación estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ). Además, en el estudio multivariante de regresión logística binaria que se realizó posteriormente con las variables histológicas que habían obtenido la significancia estadística, el TB fue el único factor que pudo establecerse como variable predictiva independiente (IC: 1,19-116,68;  $p = 0,035$ ). Este hecho refuerza la hipótesis de que el TB podría considerarse como una manifestación histológica inicial, que, en sí misma, favorece el desarrollo de metástasis linfáticas.

*Mascitti et al.*<sup>219</sup>, han publicado recientemente un estudio realizado sobre 211 pacientes con CE de lengua oral, donde analizan el significado pronóstico del TB en comparación con el DOI y sistemas clásicos de gradación histológica. Crean dos grupos de riesgo, empelando como punto de corte la presencia de 5 buds. Concluyen que el RR de presentar una disminución en la supervivencia en el grupo de alto TB es 3.08 veces mayor frente al grupo TB bajo.

A diferencia de la mayoría de los estudios cuyos resultados hemos resumido previamente y donde se describe una correlación entre el TB y el TLE y la supervivencia, en nuestro trabajo no hemos podido demostrar esta asociación. Este resultado puede ser debido a las limitaciones de nuestro estudio, ya que con el fin de homogeneizar lo más posible nuestra serie, el tamaño muestral se ha visto reducido. Esto podría explicar que los valores obtenidos en las curvas de recurrencia de Kaplan-Meier se acerquen a la significancia estadística.



## **VIII.CONCLUSIONES**

1. El análisis del Tumor Budding sobre inmunotinciones con Citoqueratina AE1/AE3 presenta una mayor facilidad diagnóstica, precisión y reproducibilidad frente a su estudio sobre muestras teñidas con Hematoxilina-Eosina.
2. Un alto índice de Tumor Budding se asocia significativamente con una mayor profundidad de invasión tumoral y con la presencia de invasión perineural.
3. Un alto índice de Tumor Budding se correlaciona significativamente con una disminución en la expresión de E-cadherina en el frente de invasión tumoral.
4. Un alto índice de Tumor Budding se asocia significativamente con un aumento del índice de proliferación celular medido mediante Ki-67 en el frente de invasión tumoral.
5. El índice de Tumor Budding constituye un factor histológico pronóstico independiente sobre la presencia de metástasis linfáticas cervicales.
6. No encontramos una correlación significativa entre el índice de Tumor Budding y el tiempo libre de enfermedad ni la supervivencia.



## **IX.BIBLIOGRAFÍA**

1. Sadler TW, Langman J. Embriologia medica/ Medical Embryology: Con orientacion clinica/ With Clinical Orientation. Ed. Médica Panamericana; 2007. pag. 280.
2. Rouvière H. Anatomía Humana: descriptiva, topográfica y funcional. Elsevier Masson 11a Ed.; 2005.
3. Koichi Watanabe, Mohammadali M. Shoja, Marios Loukas RST. Anatomy for Plastic Surgery of the Face, Head and Neck. *Thieme Med Publ.* 2016.
4. Mifsud M, Eskander A, Irish J, Gullane P, Gilbert R, Brown D, de Almeida JR, Urbach DR, Goldstein DP. Envolving trends in head and neck cancer epidemiology: Ontario, Canada 1993-2010. *Head&Neck.*2017;39:1770-1778.
5. Manuscript A. Europe PMC Funders Group The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol.* 2015;1(January 2014):505-527.
6. Miranda-Filho A, Bray F. Global patterns and trends in cancers of the lip, tongue and mouth. *Oral Oncol.* 2020 Mar;102:104551.
7. Global Cancer Observatory. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. <https://gco.iarc.fr>.
8. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol.* 2008;26:612–619.
9. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):309–16.
10. [www.cancer.net](http://www.cancer.net). American Society of Clinical Oncology (ASCO).
11. García Kass A.I., Domínguez Gordillo A.A., García Núñez J.A., Cancela Rivas G., Torres Salcines J. EGGC. Revisión y puesta al día en cáncer de lengua. *Av Odontoestomatol vol29 no5 Madrid oct 2013.*
12. Duarte B, Cuesta M, Navarro I et al. Cirugía oral. Carlos Navarro Vila. Arán Ediciones; 2008. Capítulo 32, páginas 524-565.
13. Rivera C VB. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). *Oncol Lett.* 2014;8(1):7-11.
14. Jerjes W UT. Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients. *Head Neck Oncol.* 2010;2(9).
15. El-Naggar A CJ. *WHO Classification of Head and Neck Tumors.* 4th ed.; 2017.
16. Martínez-Gimeno;Molinero C. Prospective validation of the Martínez-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(4):320-325.
17. Johnson NW. Orofacial neoplasms: global epidemiology, risk factors and recommendations for research. *Int Dent J* 1991; 41(6): 365-75.
  18. López Davis A, Rafael M-G. Cirugía Oral Y Maxilofacial. 3a Edición. Sociedad Española de Cirugía Oral Y Maxilofacial. 2021 ed. Madrid. 2012.
  19. Rodriguez T; Altieri. Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral Oncol*. 2004;40:207-213.
  20. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics 2001. *CA Cancer J Clin* 2001; 51: 16-36.
  21. National Comprehensive Cancer Network. Head and Neck Cancers (Version 1.2020). [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/head\\_and\\_neck.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/head_and_neck.pdf). Accessed April 18, 2019.
  22. Hanahan D; Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
  23. Hanahan D; Weinberg RA. The hallmarks of cancer: next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674.
  24. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996; 56: 2488-92.
  25. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis, *Cell* 1990; 61:759-67.
  26. González-Moles M.A., Gil-Montoya J.A., Ruiz-Ávila I.. Bases moleculares de la cancerización de cavidad oral. *Av Odontostomatol*. 2008 Feb; 24( 1 ): 55-60.
  27. Gallegos-Villanueva, MJ, Chimenos-Küstner, E, López-López, J, & Roselló-Llabrés, X. (2007). Cancerización de campo: revisión del concepto. *Avances en Odontostomatología*, 23(1), 35-44.
  28. Raimondi A, Cabrini R, Itoiz ME. Ploidy analysis of field cancerization and cancer development in the hamster cheek pouch carcinogenesis model. *J Oral Pathol Med* 2005;34:227-31.
  29. Moore SR; Johnson NW; Pierce AM; Wilson DF. The epidemiology of tongue cancer: a review of global incidence. *Oral Dis*. 2000;6:74-84.
  30. Pogrel MA; Weldon LL. Carcinoma arising in erosive lichen planus in the midline dorsum of the tongue. 1983;55:62-66. *Oral Surg*. 1983;55:62-66.

31. Duarte B, Cuesta M, Navarro I et al. Tratado de Cirugía Oral y Maxilofacial. Carlos Navarro Vila. Ed Arán; 2008. Capítulo 76, páginas 1296-1137.
32. Horch H. Cirugía Oral y Maxilofacial. Capítulo 6. Editorial Masson. Barcelona, 1996.
33. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* 2002; 52: 195-215.
34. Ganly I, Patel S, Shah J. Early stage squamous cell cancer of the oral tongue-clinicopathologic features affecting outcome. *Cancer*. 2012;118(1):101-111. doi:10.1002/cncr.26229
35. Kurokawa H, Yamashita Y, Takeda S, et al. 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.
36. Shah JP, Candela FC, Poddar AK. The patterns of cervical lymph node metastases from squamous carcinoma of the oral cavity. *Cancer*. 1 de julio de 1990;66(1):109-13.
37. Farmer RW, McCall L, Civantos FJ, Myers JN, Yarbrough WG, Murphy B, et al. Lymphatic drainage patterns in oral squamous cell carcinoma: findings of the ACOSOG Z0360 (Alliance) study. *Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg*. ab.
38. Mølstrøm J, Grønne M, Green A, Bakholdt V, Sørensen JA. Topographical distribution of sentinel nodes and metastases from T1-T2 oral squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2019;107:86-92.
39. de Vicente Rodríguez JC. Cáncer oral. Aspectos clínicos y epidemiológicos. Tratado de Odontología. Cap. 5. Sección XXX. Trigo ediciones. Madrid, 1998.
40. Navarro Vila C. Tratado de Cirugía oral y Maxilofacial. In: ARÁN, ed. 2ª Ed. ; 2009:1313-1316.
41. Shah J. Cirugía y oncología de cabeza y cuello. In: 3ª Ed. ; 2004:173-233.
42. Curtin HD; Ishwaran H; Dalley RW; Caudry DJ. Comparison of CT and MR imaging in staging of neck metastases. *Radiology*. 1998;207:123-130.
43. Stoeckli SJ; Steinert H; Pfaltz M. Is there a role for positron emission tomography with 18F-fluorodeoxyglucose in the initial staging of nodal negative oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2002;24(4):345-349.
44. Michiel W; Van den Brekel M; Jonas A. Outcome of Observing the N0 Neck Using Ultrasonographic-Guided Cytology for Follow-up. *Arch Otolaryngol Head Neck*

- Surg.* 1999;125(2):153-156.
45. Stuckensen T, Kovács AF, Adams S, Baum RP. Staging of the neck in patients with oral cavity squamous cell carcinomas: a prospective comparison of PET, ultrasound, CT and MRI. *J Craniomaxillofac Surg.* 2000 Dec;28(6):319-24.
  46. Huang SH; O`Sullivan B. Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options Oncol.* 2017;18(7):40.
  47. AJCC Cancer Staging Manual 8th Edition. 8 th. Springer, ed. ; 2017.
  48. Engel H; Huang JJ; Lin CY; Lam W. A strategic approach for tongue reconstruction to achive predictable and improved functional and aesthetic outcomes. *Plast Reconstr Surg.* 2010;126(6):1967-1977.
  49. Mamelle G; Pampurik J; Luboinski B. Lymph node prognostic factors in head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Surg.* 1994;168(5):494-498.
  50. Paleri V; Urbano TG; Mehanna H. Management of neck metastases in head and neck cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *J Laryngol Otol.* 2016;130(2):161-169.
  51. Kelner N; Rodrigues PC; Bufalino A. Activin A immunoexpression as predictor of occult lymph node metastasis and overall survival in oral tongue squamous cell carcinoma. *Head NeckNeck.* 2015;37(4):479-486.
  52. Yuen AP; Ho CM; Chow TL. Prospective randomized study of selective neck dissection versus observation for n0 neck of early tongue carcinoma. *Head Neck.* 2009;31(6):765-772.
  53. D`Cruz AK, Siddachari RC, Walvekar RR, Pantvaidya GH, Chaukar DA, Deshpande MS, et al. Elective neck dissection for the management of the N0 neck in early cancer of the oral tongue: need for a randomized controlled trial. *Head Neck* 2009;31(5):618–24.
  54. Yamauchi K; Fujioka Y; Kohno N. Sentinel node navigation surgery versus observation as a management strategy for early tongue carcinoma. *Head Neck.* 2012;34(4):568-572.
  55. Thompson CF; ST John MA; Lawson G; Mendelsohn AH. Diagnostic value of sentinel lymph node biopsy in head and neck cancer: a meta-analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2013;270(7):2115-2122.
  56. Hingsammer L; Seier T; Zweifel D; Lanzer M. Sentinel lymph node biopsy for early stage tongue cancer-a 14-year single-centre experience. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2019;48(4):437-442.

57. Taniguchi Y, Okura M. Prognostic significance of perioperative blood transfusion in oral cavity squamous cell carcinoma. *Head Neck*. noviembre de 2003;25(11):931-6.
58. Moore C, Flynn MB, Greenberg RA. Evaluation of size in prognosis of oral cancer. *Cancer*. 1986 Jul 1;58(1):158-62.
59. Lo WL, Kao SY, Chi LY, Wong YK, Chang RC. Outcomes of oral squamous cell carcinoma in Taiwan after surgical therapy: factors affecting survival. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003 Jul;61(7):751-8.
60. Haddadin KJ, Soutar DS, Oliver RJ, Webster MH, Robertson AG, MacDonald DG. Improved survival for patients with clinically T1/T2, N0 tongue tumors undergoing a prophylactic neck dissection. *Head Neck* 1999;21(6):517–25.
61. Bonomo P, Greto D, Desideri I, Loi M, Di Cataldo V, Orlandi E, et al. Clinical outcome of stereotactic body radiotherapy for lung-only oligometastatic head and neck squamous cell carcinoma: Is the deferral of systemic therapy a potential goal? *Oral Oncol*.
62. Maxwell JH, Thompson LDR, Brandwein-Gensler MS, Weiss BG, Canis M, Purgina B, et al. Early Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma: Sampling of Margins From Tumor Bed and Worse Local Control. *JAMA Otolaryngol-- Head Neck Surg*. diciembre de 2015;141(12):1104-1.
63. O-charoenrat P, Pillai G, Patel S, Fisher C, Archer D, Eccles S, et al. Tumour thickness predicts cervical nodal metastases and survival in early oral tongue cancer. *Oral Oncol*. junio de 2003;39(4):386-90.
64. Kademani D, Bell RB, Bagheri S, Holmgren E, Dierks E, Potter B, Homer L. Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005 Nov;63(11):1599-605.
65. Shimizu S, Miyazaki A, Sonoda T, Koike K, Ogi K, Kobayashi J-I, et al. Tumor budding is an independent prognostic marker in early stage oral squamous cell carcinoma: With special reference to the mode of invasion and worst pattern of invasion. *PloS One*. 2.
66. Garzino-Demo P; Dell'Acqua A; Dalmaso P. Clinicopathological parameters and outcome of 245 patients operated for oral squamous cell carcinoma. *J Craniomaxillofac Surg*. 2006;34:344-350.
67. Woolgar JA, Scott J. Prediction of cervical lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue/floor of mouth. *Head Neck*. 1995;17:463–472.

68. Agarwal JP, Kane S, Ghosh-Laskar S, Pilar A, Manik V, Oza N, et al. Extranodal extension in resected oral cavity squamous cell carcinoma: more to it than meets the eye. *The Laryngoscope*. 2019;129(5):1130-6.
69. Bello IO, Soini Y, Salo T. Prognostic evaluation of oral tongue cancer: means, markers and perspectives (I). *Oral Oncol*. 2010 Sep;46(9):630-5.
70. Rosado P. Modelización de la supervivencia y recidiva en carcinomas de células escamosas de la cavidad oral, mediante análisis de datos clínicos, histopatológicos, expresión de moléculas de adhesión y máquinas de vectores de soporte. Tesis Doctoral. Facultad.
71. Nicolson G. Tumor cell instability, diversification, and progression to the metastatic phenotype: from oncogene to oncofetal expression. *Cancer Res*. 1987;47(6):1473-1487.
72. Kearsley JH, Furlong KL, Cooke RA, Waters MJ. An immunohistochemical assessment of cellular proliferation markers in head and neck squamous cell cancers. *Br J Cancer*. 1990;61(6):821-827. doi:10.1038/bjc.1990.184
73. Sharma M, Sah P, Sharma SS, Radhakrishnan R. Molecular changes in invasive front of oral cancer. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2013 May;17(2):240-7.
74. Bánkfalvi A; Krassort M; Buchwalow IB; Végh A; Piffko J. Gains and losses of adhesion molecules (CD44, E-cadherin, and beta-catenin) during oral carcinogenesis and tumour progression. *J Pathol*. 198(3):343-351.
75. AC Broders. Squamous-cell epithelioma of the lip. *JAMA*. 1920;74:656-64.
76. Cade S; Lee S. Cancer of the tongue: a study based on 653 patients. *Br J Surg*. 1957;44:433-446.
77. Jakobsson PA, Eneroth CM, Killander D, Moberger G, Mårtensson B. Histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. *Acta Radiol Ther Phys Biol*. 1973 Feb;12(1):1-8.
78. Anneroth G.; Hansen LS; Silverman S. Malignancy grading in oral squamous cell carcinoma. Squamous cell carcinoma of the tongue and floor of mouth: histologic grading in the clinical evaluation. *J Oral Pathol*. 1986;15:162-168.
79. 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;95:229-249.
80. 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(8):432-437.
81. Martinez-Gimeno C; Rodriguez EM; Vila CN. Squamous cell carcinoma of the oral cavity: a clinicopathologic scoring system for evaluating risk of cervical lymph node metastasis. *Laryngoscope.* 1995;105:728-733.
  82. Margaret Brandwein-Gensler; Miriam S. Teixeira; Carol Ming Lewis. Oral Squamous Cell Carcinoma Histologic Risk Assessment, but Not Margin Status, Is Strongly Predictive of Local Disease-free and Overall Survival. *Am J Surg Pathol.* 2005;29(2):167-178.
  83. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol.* 2017; 30(9):1299-1311.
  84. Imai T. Histological comparison of cancer of the stomach in autopsy and operation cases. *Jpn J Cancer Res* 1949; 40: 199-201.
  85. K.Yokota. Carcinoma of the rectum: its histological picture and its postoperative course. 1957;27:2003-14. *Igaku Kenkyu.* 1957;27:2003-2014.
  86. M. Enjoji. On the changes produced in course of time in the histological picture of human carcinoma. 1958;47:203-20. *Nippon Byorigakkai Zasshi.* 1958;47:203-220.
  87. Gabbert H., Wagner R., Moll R. GCD. Tumor dedifferentiation: An important step in tumor invasion. *Clin Exp Met.* 1985;3:257-279.
  88. Yokoyama H; Nagayo T. Initial changes in the development of gastric cancer. *Japan J cancer Clin.* 32(3):250-256.
  89. Hayashida K; Isomoto H; Shirouzu K. A study of invasive colorectal carcinoma with reference mainly to vessel invasion and budding.1987;40:119-26. *Nippon Dai- cho-komonbyo Gakkai Zasshi.* 1987;40:119-126.
  90. T. Morodomi. Clinicopathological studies of advanced rectal cancers: predicting the degree of lymph node metastases from histopathological findings in preoperative biopsy specimens. *Nippon Geka Gakkai Zasshi.* 1988;89:352-363.
  91. Hase K, Shatney C, Johnson D, Trollope M, Vierra M. Prognostic value of tumor “budding” in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 1993 Jul;36(7):627-35.
  92. Lugli A, Karamitopoulou E, Zlobec I. Tumour budding: a promising parameter in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2012 May 22;106(11):1713-7.
  93. Greenburg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol.* 1982;95:333-

- 9.
94. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1420-8.
  95. Tiwari N, Gheldof A, Tatarski M, Christofori G. EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells. *Semin Cancer Biol.* 2012 Jun;22(3):194-207.
  96. Huang RY, Guilford P, Thiery JP. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci.* 2012 Oct;125(Pt 19):4417-22.
  97. Peinado H, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol.* 2004;48(5-6):365-75.
  98. Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 2009 Jun;28(1-2):15-33.
  99. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol.* 2006 Mar;172(7):973-81.
  100. Zhu QC, Gao RY, Wu W, Qin HL. Epithelial-mesenchymal transition and its role in the pathogenesis of colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(5):2689-98.
  101. Benedetti, Ines, and Niradiz Reyes. "Epithelial-mesenchymal transition in the progression of prostatic adenocarcinoma/ Transición epitelial-mesenchymal en la progresión del adenocarcinoma prostático/ Transición epitelial-mesenchymal na progressão adenoc.
  102. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(3):178-96.
  103. Sato R, Semba T, Saya H, Arima Y. Concise review: Stem cells and epithelial-mesenchymal transition in cancer: Biological implications and therapeutic targets. *Stem Cells.* 2016;34:1997-2007.
  104. Montenegro MA, Rojas MA. Transformación epitelio-mesenchymal durante el desarrollo embrionario. *Rev Chil Anat.* 2001;19(3):301-10.
  105. Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2010 Jun;15(2):117-34.
  106. Jaggi M, Johansson SL, Baker JJ, Smith LM, Galich A, Balaji KC. Aberrant expression of E-cadherin and beta-catenin in human prostate cancer. *Urol Oncol.* 2005 Nov-Dec;23(6):402-6.

107. Wang C, Huang H, Huang Z, et al. Tumor budding correlates with poor prognosis and epithelial-mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2011;40(7):545-551. doi:10.1111/j.1600-0714.2011.01041.x
108. Grigore AD; Jolly MK; Jia D; Farach-Carson MC; Levine H. Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT. *J Clin Med.* 5(5). doi:doi:10.3390/jcm5050051
109. Attramadala C; Kumar S; Boysen M; Bryne M. Tumor Budding, EMT and Cancer Stem Cells in T1-2/N0 Oral Squamous Cell Carcinomas. *Anticancer Res.* 2015;35:6111-6120.
110. Jensen DH, Dabelsteen E, Specht L, et al. Molecular profiling of tumour budding implicates TGF $\beta$ -mediated epithelial-mesenchymal transition as a therapeutic target in oral squamous cell carcinoma. *J Pathol.* 2015;236(4):505-516. doi:10.1002/path.4550
111. Li H; Xu F; Li S; Zhong A; Meng X; Lai M. The tumor microenvironment: An irreplaceable element of tumor budding and epithelial-mesenchymal-transition-mediated cancer metastasis. *Cell Adh Migr.* 2016;10(4):434-445.
112. Marangon Junior H, Rocha VN, Leite CF, de Aguiar MCF, Souza PEA, Horta MCR. Laminin-5 gamma 2 chain expression is associated with intensity of tumor budding and density of stromal myofibroblasts in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2014;43(3):199-204. doi:10.1111/jop.12121
113. Marangon Junior H, Leão PLR, Melo VVM, et al. Cell proliferation is associated with intensity of tumor budding in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2018;47(2):128-135. doi:10.1111/jop.12653
114. Hiroyuki Tomita; Kaori Tanaka; Akira Hara. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget.* 2016;7(10):11018-11032.
115. Marangon JH; Melo VM; Caixeta ÂB; Souto GR; Horta MCR. Immunolocalization of Cancer Stem Cells Marker ALDH1 and its Association with Tumor Budding in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Head Neck Pathol.* 2019;13(4):535-542.
116. Lugli A; Kirsch R; Ajioka Y; Quirke P. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol.* 2017;30(9):1299-1311.
117. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Primary Carcinoma of the Colon and Rectum. Version: Colon Rectum 4.0.1.0 th. Protocol Posting Date: June 2017.

118. Almangush A, Leivo I, Siponen M, et al. Evaluation of the budding and depth of invasion (BD) model in oral tongue cancer biopsies. *Virchows Arch.* 2018;472(2):231-236. doi:10.1007/s00428-017-2212-1
119. Seki M, Sano T, Yokoo S, Oyama T. Tumour budding evaluated in biopsy specimens is a useful predictor of prognosis in patients with cN0 early stage oral squamous cell carcinoma. *Histopathology.* 2017;70(6):869-879. doi:10.1111/his.13144
120. Almangush A; Youssef O; Pirinen M; Sundström J; Leivo I; Mäkitie AA. Does evaluation of tumour budding in diagnostic biopsies have a clinical relevance? A systematic review. *Histopathology.* 2019;74(4):536-544.
121. Woodcock-Mitchell J, Eichner R, Nelson WG, Sun TT. Immunolocalization of keratin polypeptides in human epidermis using monoclonal antibodies. *J Cell Biol* 1982;95(2 Pt 1):580-8.
122. Eichner R, Bonitz P, Sun T-T. Classification of epidermal keratins according to their immunoreactivity, isoelectric point and mode of expression. *J Cell Biol* 1984;98(4):1388-96.
123. Jones AS, Cook JA, Phillips DE, Roland NJ. Squamous carcinomas presenting as an enlarged lymph node. *Cancer* 1993; 72: 1756-61.
124. Tanaka N, Ogi K, Odajima T, Dehari H, Yamada S, Sonoda T, Kohama G. PRb2/p130 protein expression is correlated with clinicopathologic findings in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 2001; 92: 2117-25.
125. Boyle P, Macfarlane GJ, Maisonneuve P, Zheng T, Scully C, Tedesco B. Epidemiology of mouth cancer in 1989: a review. *J R Soc Med* 1990; 83: 724-30.
126. *National Comprehensive Cancer Network (NCCN) NCCN Guidelines: Head and Neck Cancer Version 1.2017.* 2017.
127. Almangush A, Pirinen M, Heikkinen I, Mäkitie AA, Salo T, Leivo I. Tumour budding in oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis. *Br J Cancer.* 2018;118(4):577-586. doi:10.1038/bjc.2017.425
128. Lederman M. The Anatomy of Cancer: With Special Reference to Tumours of the Upper Air and Food Passages. *The Journal of Laryngology & Otology.* 1964;78(2):181-208.
129. Fasunla AJ, Greene BH, Timmesfeld N, Wiegand S, Werner JA, Sesterhenn AM. A meta-analysis of the randomized controlled trials on elective neck dissection versus therapeutic neck dissection in oral cavity cancers with clinically node-

- negative neck. Oral On.
130. Brown B, Barnes L, Mazariegos J, Taylor F, Johnson J, Wagner RL. Prognostic factors in mobile tongue and floor of mouth carcinoma. *Cancer* 1989; 64: 1195-202.
  131. Iseli TA, Lin MJ, Tsui A, Guiney A, Wiesenfeld D, Iseli CE. Are wider surgical margins needed for early oral tongue cancer? *J Laryngol Otol.* marzo de 2012;126(3):289-94.
  132. Koelzer VH, Langer R, Zlobec I, Lugli A (2014) Tumor budding in upper gastrointestinal carcinomas. *Front Oncol* 4: 216.
  133. Lugli A, Vljajnic T, Giger O, Karamitopoulou E, Patsouris ES, Peros G, Terracciano LM, Zlobec I (2011) Intratumoral budding as a potential parameter of tumor progression in mismatch repair-proficient and mismatch repair-deficient colorectal cancer patients.
  134. Hase K; Shatney C; Johnson D; Vierra M. Prognostic Value of Tumor “Budding” in Patients with Colorectal Cancer. *Dis Colon Rectum.* 36(7):627-635.
  135. Ueno, H. et al. A new prognostic staging system for rectal cancer. *Ann. Surg.* 240, 832–839 (2004).
  136. Nakamura, T., Mitomi, H., Kikuchi, S., Ohtani, Y. & Sato, K. Evaluation of the usefulness of tumor budding on the prediction of metastasis to the lung and liver after curative excision of colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 52, 1432–1435 (2005).
  137. Lugli A; Kirsch R; Ajioka Y. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol.* 2017;30:1299-1311.
  138. Seki M, Sano T, Yokoo S, Oyama T (2016) Histologic assessment of tumor budding in preoperative biopsies to predict nodal metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth. *Head Neck* 38(Suppl 1): E1582–E1590.
  139. Angadi P V., Patil P V., Hallikeri K, Mallapur MD, Hallikerimath S, Kale AD. Tumor budding is an independent prognostic factor for prediction of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Int J Surg Pathol.* 2015;23(2):102-110. doi:10.1177/1066896914565022
  140. Manjula B V., Augustine S, Selvam S, Mohan AM. Prognostic and Predictive Factors in Gingivo Buccal Complex Squamous Cell Carcinoma: Role of Tumor

- Budding and Pattern of Invasion. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014;67(1):98-104. doi:10.1007/s12070-014-0787-2
141. Nandita KP, Boaz K, Srikant N, Lewis AJ, Manaktala N (2016) Tumour budding: a promising parameter in oral squamous cell carcinoma. *Res J Pharm Biol Chem Sci* 7(5): 2059–2063.
  142. Boxberg M, Gotz C, Haidari S, et al. Immunohistochemical expression of CD44 in oral squamous cell carcinoma in relation to histomorphological parameters and clinicopathological factors. *Histopathology.* 2018;73(4):559-572.
  143. Koelzer, V. H. et al. Tumor budding in colorectal cancer revisited: results of a multicenter interobserver study. *Virchows Arch.* 466, 485–493 (2015).
  144. De Smedt L, Palmans S, Sagaert X. Tumour budding in colorectal cancer: what do we know and what can we do? *Virchows Arch* 2016;468:397–408.
  145. Koelzer VH, Zlobec I, Lugli A. Tumor budding in colorectal cancer—ready for diagnostic practice? *Hum Pathol* 2016;47:4–19.
  146. RogersAC, WinterDC, HeeneyA, et al. Systematic review and meta-analysis of the impact of tumour budding in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2016;115:831–840.
  147. van Wyk HC, Park J, Roxburgh C, et al. The role of tumour budding in predicting survival in patients with primary operable colorectal cancer: a systematic review. *Cancer Treat Rev* 2015;41:151–159.
  148. Jepsen, R. K. et al. Digital image analysis of pancytokeratin stained tumor slides for evaluation of tumor budding in pT1/pT2 colorectal cancer: results of a feasibility study. *Pathol. Res. Pract.* 214, 1273–1281 (2018).
  149. Brieu, N. et al. Automated tumour budding quantification by machine learning augments TNM staging in muscle-invasive bladder cancer prognosis. *Sci. Rep.* 9, 5174 (2019).
  150. Pedersen NJ, Jensen DH, Lelkaitis G, et al. Construction of a pathological risk model of occult lymph node metastases for prognostication by semi-automated image analysis of tumor budding in early-stage oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2017;8(11):18227-18237. doi:10.18632/oncotarget.15314
  151. Leão PLR, Marangon Junior H, Melo VVM, et al. Reproducibility, repeatability, and level of difficulty of two methods for tumor budding evaluation in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2017;46(10):949-955. doi:10.1111/jop.12578
  152. Source: ECIS - European Cancer Information System From

- <https://ecis.jrc.ec.europa.eu>, accessed on 21/04/2020.
153. Ng JH, Iyer NG, Tan M-H, Edgren G. Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: A global study. *Head Neck*. 2017;39(2):297-304.
  154. Campbell BR, Sanders CB, Netterville JL, Sinard RJ, Rohde SL, Langerman A, et al. Early onset oral tongue squamous cell carcinoma: Associated factors and patient outcomes. *Head Neck*. 2019;41(6):1952-60.
  155. Davidson BJ, Root WA, Trock BJ. Age and survival from squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Head Neck*. abril de 2001;23(4):273-9.
  156. Sarkaria JN, Harari PM. Oral tongue cancer in young adults less than 40 years of age: rationale for aggressive therapy. *Head Neck*. abril de 1994;16(2):107-11.
  157. Siegelmann-Danieli N, Hanlon A, Ridge JA, Padmore R, Fein DA, Langer CJ. Oral tongue cancer in patients less than 45 years old: institutional experience and comparison with older patients. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. febrero de 1998;16(2):745-53.
  158. Friedlander PL, Schantz SP, Shaha AR, Yu G, Shah JP. Squamous cell carcinoma of the tongue in young patients: a matched-pair analysis. *Head Neck*. agosto de 1998;20(5):363-8.
  159. Manuel S, Raghavan SKN, Pandey M, Sebastian P. Survival in patients under 45 years with squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Int J Oral Maxillofac Surg*. abril de 2003;32(2):167-73.
  160. Xie N, Wang C, Liu X, et al. Tumor budding correlates with occult cervical lymph node metastasis and poor prognosis in clinical early-stage tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2015;44(4):266-272. doi:10.1111/jop.12242
  161. Ho YY, Wu TY, Cheng HC, Yang CC, Wu CH. The significance of tumor budding in oral cancer survival and its relevance to the eighth edition of the American Joint Committee on Cancer staging system. *Head Neck*.
  162. Polesel J, Talamini R, La Vecchia C, Levi F, Barzan L, Serraino D, et al. Tobacco smoking and the risk of upper aero-digestive tract cancers: A reanalysis of case-control studies using spline models. *Int J Cancer*. 15 de mayo de 2008;122(10):2398-402.
  163. Bungard T, Bentzen SM, Wildt J. The prognostic effect of tobacco and alcohol consumption in intra-oral squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer Oral Oncol*, 1994; 30B: 323-8.
  164. Gorsky M, Epstein JB, Oakley C, Le ND, Hay J, Stevenson-Moore P. Carcinoma

- of the tongue: A case series analysis of clinical presentation, risk factors, staging, and outcome. *Oral Surgery Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 98: 546-52.
165. Turati F, Garavello W, Tramacere I, Bagnardi V, Rota M, Scotti L, et al. A meta-analysis of alcohol drinking and oral and pharyngeal cancers. Part 2: results by subsites. *Oral Oncol.* octubre de 2010;46(10):720-6.
  166. Ohtsuki K, Koyama F, Tamura T, et al. Prognostic significance of immunohistochemical analysis of tumor budding in colorectal carcinoma. *Anticancer Res.* 2008;28:1831-1836.
  167. Ueno H, Murphy J, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology.* 2002;40:127-132.
  168. Ohike N, Coban I, Kim GE, et al. Tumor budding as a strong prognostic indicator in invasive ampullary adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2010;34:1417-1424.
  169. Almangush A, Bello IO, Keski-Säntti H, et al. Depth of invasion, tumor budding, and worst pattern of invasion: prognostic indicators in early-stage oral tongue cancer. *Head Neck.* 2014;36:811-818. doi:10.1002/hed.23380.
  170. Chaitra B, Burela M, Kasula L, Inuganti RV, Vaddatti T. Correlative study of tumor budding, mode of invasion and lymphocytic host response with known clinicopathological prognostic factors in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2020 Se.
  171. Ozer SP, Barut SG, Ozer B, Catal O, Sit M. The relationship between tumor budding and survival in colorectal carcinomas. *Rev Assoc Med Bras (1992).* 2019 Dec;65(12):1442-1447. doi: 10.1590/1806-9282.65.12.1442. PMID: 31994623.
  172. Jun SY, Chung JY, Yoon N, Jung ES, Oh YH, Hong SM. Tumor Budding and Poorly Differentiated Clusters in Small Intestinal Adenocarcinoma. *Cancers (Basel).* 2020 Aug 6;12(8):2199. doi: 10.3390/cancers12082199. PMID: 32781596; PMCID: PMC7465895.
  173. Birchmeier W, Weidner KM, Hulsken J, Behrens J. Molecular mechanisms leading to cell junction (cadherin) deficiency in invasive carcinomas. *Semin Cancer Biol* 1993; 4: 231-9.
  174. Vleminckx K, Vakaet L Jr, Mareel M, Fiers W, van Roy F. Genetic manipulation of E- cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 1991; 66(1): 107-19.

175. Tsuda H, Zhang WD, Shimosato Y, Yokota J, Terada M, Sugimura T, et al. Allele loss on chromosome 16 associated with progression of human hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6791-4.
176. Saito Y, Takazawa H, Uzawa K, Tanzawa H, Sato K. Reduced expression of E-cadherin in oral squamous cell carcinoma: relationship with DNA methylation of 5' CpG island. *Int J Oncol* 1998; 12: 293-8.
177. Nakayama S, Sasaki A, Mese H, Alcade RE, Tsuji T, Matsumura T. The e-cadherin gene is silenced by CpG methylation in human oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2001; 93: 667-73.
178. Chang HS, Chow V, Lam KY, Wei WI, Yuen APW. Loss of E-cadherin expression resulting from promoter hypermethylation in oral tongue carcinoma and its prognostic significance. *Cancer* 2002; 94: 386-92.
179. Supić G, Kozomara R, Branković-Magić M, Jović N, Magić Z. Gene hypermethylation in tumor tissue of advanced oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol* 2009; 45(12): 1051-7.
180. Takkunen M, Grenman R, Hukkanen M, Korhonen M, García de Herreros A, Virtanen I. Snail-dependent and -independent epithelial-mesenchymal transition in oral squamous carcinoma cells. *J Histochem Cytochem* 2006; 54(11): 1263-75.
181. Schwock J, Bradley G, Ho JC, Perez-Ordóñez B, Hedley DW, Irish JC, Geddie WR. SNAI1 expression and the mesenchymal phenotype: an immunohistochemical study performed on 46 cases of oral squamous cell carcinoma. *BMC Clin Pathol* 2010; 10: 1.
182. Tanaka N, Odajima T, Ogi K, Ikeda T, Satoh M. Expression of E-cadherin,  $\alpha$ -catenin, and  $\beta$ -catenin in the process of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2003; 89: 557-63.
183. Bagutti C, Speight PM, Watt FM. Comparison of integrin, cadherin, and catenin expression in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *J Pathol* 1998; 186: 8-16.
184. Diniz Freita M. Carcioma oral de células escamosas: evaluación pronóstica de variables clínicas, histológicas e inmunohistoquímicas. Tesis doctoral Universidad de Santiago de Compostela. 2005.
185. Shinohara M, Hiraki A, Ikebe T, Nakamura S, Kurahara SI, Shirasuna K. Immunohistochemical study of desmosomes in oral squamous cell carcinoma: correlation with cytokeratin and e-cadherin staining, and with tumour behaviour. *J*

- Pathol 1998; 184: 369-81.
186. Nakagawa, Y. et al. Tumor budding and E-cadherin expression are useful predictors of nodal involvement in T1 esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 33, 5023–5029 (2013).
  187. Lee SJ, Choi SY, Kim WJ, Ji M, Lee TG, Son BR, Yoon SM, Sung R, Lee EJ, Youn SJ, Park SM. Combined aberrant expression of E-cadherin and S100A4, but not  $\beta$ -catenin is associated with disease-free survival and overall survival in colorectal cancer patients.
  188. Kohler, I. et al. Detailed analysis of epithelial-mesenchymal transition and tumor budding identifies predictors of long-term survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.*
  189. Koyuncuoglu, M. et al. Tumor budding and E-Cadherin expression in endometrial carcinoma: are they prognostic factors in endometrial cancer? *Gynecol. Oncol.* 125, 208–213 (2012).
  190. Myoung H, Kim MJ, Lee JH, Ok YJ, Paeng JY, Yun PY. Correlation of proliferative markers (Ki-67 and PCNA) with survival and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: a clinical and histopathological analysis of 113 patients. *Int J Oral Maxillo.*
  191. Klimowicz AC, Bose P, Nakoneshny SC, et al. Basal Ki-67 expression measured by digital image analysis is optimal for prognostication in oral squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 2012; 48: 2166-74.
  192. Sittel C, Ruiz S, Volling P, Kvasnicka HM, Jungehulsing M, Eckel HE. Prognostic significance of Ki-67 (MIB1), PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. *Oral Oncol* 1999; 35: 583-9.
  193. Bettendorf O, Herrmann G. Prognostic relevance of Ki-67 antigen expression in 329 cases of oral squamous cell carcinoma. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2002; 64: 200-5.
  194. Piffko J, Bankfalvi A, Ofner D, Kusch F, Bocker W, Joos U. In situ assessment of cell proliferation at the invasive front of oral squamous cell carcinomas. *Virchows Arch* 1996; 429: 229-34.
  195. Carlos de Vicente J, Herrero-Zapatero A, Fresno MF, Lopez-Arranz JS. Expression of cyclin D1 and Ki-67 in squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinicopathological and prognostic significance. *Oral Oncol* 2002, 38: 301-8.
  196. Watanabe S, Watanabe R, Oton-Leite AF, et al. Analysis of cell proliferation and

- pattern of invasion in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Sci* 2010; 52: 417-24.
197. Okcu O, Öztürk Ç, Şen B, Arpa M, Bedir R. Tumor Budding is a reliable predictor for death and metastasis in invasive ductal breast cancer and correlates with other prognostic clinicopathological parameters. *Ann Diagn Pathol.* 2021 Oct;54:151792.
  198. Zheng S, Luo J, Xie S, Lu S, Liu Q, Xiao H, Luo W, Huang Y, Liu K. Tumor budding of cervical squamous cell carcinoma: epithelial-mesenchymal transition-like cancer stem cells? *PeerJ.* 2022 Jul 15;10:e13745.
  199. Lim SC, Zhang S, Ishii G, et al. Predictive markers for late cervical metastasis in stage I and II invasive squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Clin Cancer Res.* 2004;10:166–172.
  200. Ho CM, Lam KH, Wei WI, Lau SK, Lam LK. Occult lymph node metastasis in small oral tongue cancers. *Head Neck* 1992; 14: 359–63.
  201. Yuen AP, Wei WI, Wong YM, Tang KC. Elective neck dissection versus observation in the treatment of early oral tongue carcinoma. *Head Neck* 1997;19:583–588.
  202. Hutchison IL, Ridout F, Cheung SMY, Shah N, Hardee P, Surwald C, et al. Nationwide randomised trial evaluating elective neck dissection for early stage oral cancer (SEND study) with meta-analysis and concurrent real-world cohort. *Br J Cancer.* noviembre de.
  203. Lim YC, Lee JS, Koo BS, Kim SH, Kim YH, Choi EC. Treatment of contralateral N0 neck in early squamous cell carcinoma of the oral tongue: elective neck dissection versus observation.
  204. Kelner N, Vartanian JG, Pinto CA, Coutinho-Camillo CM, Kowalski LP. Does elective neck dissection in T1/T2 carcinoma of the oral tongue and floor of the mouth influence recurrence and survival rates? *Br J Oral Maxillofac Surg* 2014;52:590–597.
  205. Schilling C, Stoeckli SJ, Haerle SK, Broglie MA, Huber GF, Sorensen JA, et al. Sentinel European Node Trial (SENT): 3-year results of sentinel node biopsy in oral cancer. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. diciembre de 2015;51(18):2777-84.
  206. Broglie MA, Haerle SK, Huber GF, Haile SR, Stoeckli SJ. Occult metastases detected by sentinel node biopsy in patients with early oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: impact on survival. *Head Neck* 2013;35:660–666.
  207. Khafif RA, Gelbfish GA, Tepper P, et al. Elective radical dissection in epidermoid

- cancer of the head and neck: a retrospective analysis of 853 cases of mouth, pharynx, and larynx cancer. *Cancer*. 1991;67:67–71.
208. Brierley, J. D., Gospodarowicz, M. K. & Wittekind, C. *TNM Classification of Malignant Tumours*. 8th edn (Wiley Blackwell, 2017).
  209. WHO Classification of Tumours Editorial Board. in *Digestive System Tumours*. 5th edn (IARC, 2019).
  210. Brown, M. et al. Tumour budding and a low host inflammatory response are associated with a poor prognosis in oesophageal and gastro- oesophageal junction cancers. *Histopathology* 56, 893–899 (2010).
  211. Lawlor, R. T. et al. Prognostic role of high- grade tumor budding in pancreatic ductal adenocarcinoma: a systematic review and meta- analysis with a focus on epithelial to mesenchymal transition. *Cancers* 11, 113 (2019).
  212. Gujam FJ, McMillan DC, Mohammed ZM, Edwards J, Going JJ (2015) The relationship between tumour budding, the tumour microenvironment and survival in patients with invasive ductal breast cancer. *Br J Cancer* 113(7): 1066–1074.
  213. Masuda, R. et al. Tumor budding is a significant indicator of a poor prognosis in lung squamous cell carcinoma patients. *Mol. Med. Rep.* 6, 937–943 (2012).
  214. Huang, B., Cai, J., Xu, X., Guo, S. & Wang, Z. High- grade tumor budding stratifies early- stage cervical cancer with recurrence risk. *PLoS ONE* 11, e0166311 (2016).
  215. Chatterjee D, Bansal V, Malik V, Bhagat R, Punia RS, Handa U, Gupta A, Dass A. Tumor Budding and Worse Pattern of Invasion Can Predict Nodal Metastasis in Oral Cancers and Associated With Poor Survival in Early-Stage Tumors. *Ear Nose Throat J.* 2019 Aug;98.
  216. Shimazu Y, Kudo T, Taya Y, et al. Tumor microenvironment and oral cancer invasion: YK classification and 3D architecture of tongue squamous cell carcinoma. *J Japanese Soc Oral Oncol.* 2012;24(3):77-87. doi:10.5843/jsot.24.77
  217. Elseragy A, Bello IO, Wahab A, Coletta RD, Mäkitie AA, Leivo I, Almangush A, Salo T. Emerging histopathologic markers in early-stage oral tongue cancer: A systematic review and meta-analysis. *Head Neck.* 2022 Jun;44(6):1481-1491.
  218. Arora A, Husain N, Bansal A, et al. Development of a New Outcome Prediction Model in Early-stage Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity Based on Histopathologic Parameters with Multivariate Analysis. *Am J Surg Pathol.* 2017;41(7):950-960. doi:10.1097/PAS.0000000000000843

219. Mascitti M, Togni L, Caponio VCA, Zhurakivska K, Lo Muzio L, Rubini C, Santarelli A, Troiano G. Prognostic significance of tumor budding thresholds in oral tongue squamous cell carcinoma. *Oral Dis.* 2023 Jul;29(5):1947-1958.

