



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**Adriana Milena Colonia García**

**Perfil de marcadores pronóstico en pacientes con carcinoma escamocelular de lengua, tratados en el Instituto de Cancerología Clínica Las Américas en la ciudad de Medellín, en el período 2008 a 2017**

**Araraquara**

**2020**



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**Adriana Milena Colonia García**

**Perfil de marcadores pronóstico en pacientes con carcinoma escamocelular de lengua, tratados en el Instituto de Cancerología Clínica Las Américas en la ciudad de Medellín, en el período 2008 a 2017**

Tesis presentada a la Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara, para la obtención del título de Doctor en Ciencias Odontológicas, Área de Diagnóstico y Cirugía. DINTER UNESP/CES

Orientador:

Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade

Co-orientador:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lina María Salazar Peláez

**Araraquara**

**2020**

Colonia García, Adriana Milena

Perfil de marcadores pronóstico en pacientes con carcinoma escamocelular de lengua, tratados en el Instituto de Cancerología Clínica Las Américas en la ciudad de Medellín, en el período 2008 a 2017 / Adriana Milena Colonia García.-- Araraquara: [s.n.], 2020

118 f.; 30 cm.

Tese (Doutorado em Ciências Odontológicas) –  
Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia  
Orientador: Prof. Cleverton Roberto de Andrade  
Coorientadora: Profa. Dra. Lina María Salazar Peláez

1. Neoplasias de la lengua 2. Carcinoma de células escamosas 3. Pronóstico. 5 Biomarcadores.6 Tasa de supervivencia. Título

**Adriana Milena Colonia García**

**Perfil de marcadores pronóstico en pacientes con carcinoma escamocelular de lengua, tratados en el Instituto de Cancerología Clínica Las Américas en la ciudad de Medellín, en el período 2008 a 2017**

**Comisión juzgadora**

**Tesis para la obtención del grado de Doctor en Ciencias Odontológicas**

**Presidente e orientador:** Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade

2° Examinador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine Maria Sgaviolli Massucato

3° Examinador: Prof. Dr. Osmir Oliveira Junior

4° Examinador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marisol Miranda Galvis

5° Examinador: Prof. Dr. Marcio Ajudarte Lopes

Araraquara, 31 de agosto de 2020.

## **DADOS CURRICULARES**

**Adriana Milena Colonia García**

NASCIMENTO: 18/02/1983 – Medellín – Antioquia – Colombia

FILIAÇÃO: Jaime Alberto Colonia Sepúlveda e Gloria Elena García Rincón

## **FORMAÇÃO ACADÊMICA**

2000-2006: Graduação em Odontologia - Faculdade de Odontologia Universidade CES, Medellín, Antioquia, Colombia.

2009-2011: Curso de Pos-Graduação em Periodontia - Faculdade de Odontologia Universidade CES, Medellín, Antioquia, Colombia.

**Dedico este trabajo a mi familia Gloria, Jaime, Gabriel y a mi  
esposo John, por su amor incondicional en todos los  
momentos de mi vida.**

## AGRADECIMENTOS

A mi maravilloso esposo **John**, por su amor, su apoyo, su paciencia infinita, y por darme una familia, con nuestra perrija **Venus**, que es mi mejor refugio.

A mis padres, **Gloria** y **Jaime**, por su ejemplo de responsabilidad, trabajo constante y honestidad. A mi hermano **Gabriel**, por siempre estar ahí, facilitando mi existencia.

A mi orientador, el Dr. **Cleverton Roberto de Andrade**, por recibirme en su línea de investigación, por la confianza depositada en mí, y por su pasión en este trabajo y orientación.

A mi co-orientadora, la Dra. **Lina María Salazar Peláez**, por acompañarme en todo el proceso, por predicar con su ejemplo de trabajo y su excelencia, y por mostrarme, ante todo, lo que debo ser en mi aspecto personal como investigadora.

A mi bioestadístico, el Dr. **Luis Gonzálo Álvarez**, por las incontables horas de trabajo, por su diligencia y excelente disposición de enseñarme siempre.

Al patólogo, Dr. **Carlos Serna**, por su ayuda con el análisis histopatológico.

A la **Facultad de Odontología de Araraquara y de la Universidad CES**, por haberme permitido ser parte del convenio del Doctorado en Ciencias Odontológicas DINTER UNESP/CES. A la coordinadora del programa, a todos los profesores y a la sección técnica de posgrados de FoAr-UNESP.

Al decano y al jefe de educación de la Universidad CES, **Dr. Julián Emilio Vélez** y **Dr. Luis Fernando Vélez**, por brindarme todo el apoyo y darme la libertad de coordinar mis actividades laborales y académicas del modo más conveniente para mí.

A la **Universidad CES** por su apoyo financiero y logístico a través del Departamento de Investigación e Innovación (proyecto INV.032017.009).

A la **Escuela de Graduados de la Universidad CES**, por acogerme como su estudiante de intercambio y permitirme participar de sus cursos y actividades académicas.

A la **Clínica Las Américas** por abrirme las puertas de su institución, por su confianza y colaboración invaluable, en especial al personal del archivo y del laboratorio de patología.

A la **Dra. Christiane Pienna Soares**, por permitirme realizar el procesamiento de mis muestras en su laboratorio de citología. A **Denise Ligeiro** por su dedicación y trabajo cuidadoso en el laboratorio.

A mi colega **Jairo Robledo Sierra**, por su ayuda constante y desinteresada.

A **María Isabel Amaya**, la hermana que me puso en el camino este doctorado, por las memorables tardes en Araraland y nuestros planes de jubiladas.

A todos aquellos que durante mi doctorado participaron directa o indirectamente de este proyecto de investigación y de vida. A todo lo que fue y no fue, porque **todo** me hizo crecer, **muchas gracias**.

“La permanencia, perseverancia y persistencia a pesar de todos los obstáculos, desalientos e imposibilidades: es eso lo que distingue las almas fuertes de las débiles.”

Thomas Carlyle\*

---

\* El pulso: operación Faraday. Emilio Antonio López Larrubia. Punto Rojo Libros, S. L.; 2017.

Colonia García AM. Perfil dos marcadores prognósticos em pacientes com carcinoma espinocelular de língua, tratados no Instituto de Cancerologia Clínica Las Américas, na cidade de Medellín, no período de 2008 a 2017 [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

## RESUMO

O carcinoma espinocelular de língua (OTSCC) é a neoplasia maligna mais comum encontrada na cavidade oral. As características biológicas das células tumorais não foram incluídas no sistema de classificação Tumor, Nódulo, Metástase (TNM), a mais usada atualmente para determinar o prognóstico. O conhecimento da expressão de biomarcadores, características clínicas e histopatológicas auxiliaria na identificação dos grupos de risco, permitindo a personalização do tratamento, melhorando as chances de sobrevivência. Objetivo. Explorar a relação entre a expressão de biomarcadores (Ki-67, E-cadherin, MMP-9 e  $\alpha$ -SMA), as características sociodemográficas, clínicas e histopatológicas com a sobrevida de pacientes com OTSCC. Materiais e métodos. Foram incluídos pacientes com OTSCC do Instituto de Cancerologia Clínica Las Américas, na cidade de Medellín, de 2008 a 2017. As características demográficas, clínicas e patológicas foram obtidas das fichas clínicas e registradas, e as amostras foram submetidas a reações imuno-histoquímicas com os anticorpos S100, Ki-67, E-cadherin,  $\alpha$ -SMA e MMP-9. A influência dessas características na sobrevida específica da doença (DSS) foi analisada pelo método de Kaplan-Meier e pelo modelo de riscos proporcionais de Cox. Resultados. Oitenta pacientes foram elegíveis para o estudo, dos quais 55% eram do sexo masculino. A idade média dos pacientes foi de  $63,1 \pm 16$  anos. 63,5% dos OTSCC foram bem diferenciados e 58,8% foram diagnosticados em estádios avançados. Invasão linfovascular (LVI  $\alpha$ -SMA+) e perineural (PNI S100+) foram detectados em 60% e 75% dos OTSCC, respectivamente. A presença simultânea de LVI e PNI esteve associada ao estágio clínico avançado, linfonodos positivos e ao prognóstico desfavorável do OTSCC ( $p < 0,05$ ). O seguimento médio foi de  $26,4 \pm 25$  meses, o tempo médio de sobrevida do diagnóstico foi de  $62,2 \pm 7,8$  meses (IC 95%; 46,9; 77,5) e a porcentagem de DSS em 5 anos foi de 41%. Na análise univariada, o DSS em 5 anos foi influenciado por estar sem companheiro (HR = 0,62;  $p = 0,030$ ), estágio avançado (HR = 5,37;  $p < 0,001$ ), recebeu glossectomia total (HR = 7,06;  $p = 0,011$ ), localização na língua móvel (HR = 0,44;  $p = 0,019$ ), tumor  $\geq 3$  cm (HR = 3,42;  $p = 0,001$ ), margens cirúrgicas comprometidas (HR = 2,04;  $p = 0,041$ ), metástase linfonodal (HR = 3,07;  $p = 0,002$ ) e tumor pouco diferenciado (HR = 3,67;  $p = 0,019$ ). O DSS não foi influenciado pela expressão de nenhum dos anticorpos avaliados. A análise multivariada mostrou que estágio clínico avançado (HR = 5,29;  $p < 0,001$ ), localização na língua móvel (HR = 0,34;  $p = 0,004$ ) e tumor pouco diferenciado (HR = 3,8;  $p = 0,020$ ) são preditores independentes para DSS. Conclusão. Não foi possível estabelecer a correlação prognóstica entre Ki-67, E-cadherin, MMP-9 e  $\alpha$ -SMA e a sobrevida dos pacientes com OTSCC. A localização do carcinoma espinocelular na base da língua, tumor superior a 3 cm e pouco diferenciado, foram fatores independentes que correlacionaram-se com a sobrevida. A presença de LVI e PNI, identificada com precisão por imuno-histoquímica, deve ser avaliada no futuro para estabelecer sua utilidade clínica.

**Palavras-chave:** Neoplasias da língua. Carcinoma de células escamosas. Prognóstico. Biomarcadores. Taxa de sobrevida.

Colonia García AM. Profile of prognostic markers in patients with squamous cell carcinoma of the tongue, treated at the Institute of Cancerology Clínica Las Américas in the city of Medellín, from 2008 to 2017 [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

## ABSTRACT

Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma (OTSCC) is the most common malignancy found in the oral cavity. The current prognosis-associated tumor classification system (Tumor, Nodule, Metastasis – TNM) did not include the tumor cell biological biomarkers. Knowledge of biomarkers expression, clinical and histopathological characteristics have the potential to improve the identification and differentiation of risk groups and individualized the cancer treatment to increase the overall survival. Objective. The aim of this study was to analyze the correlation of the expression of Ki-67, E-cadherin, MMP-9 and  $\alpha$ -SMA, and, the sociodemographic, clinical, and histopathological characteristics with survival of patients with OTSCC. Material and methods. OTSCC patients from the Cancerology Institute Clínica Las Américas, in the city of Medellín, from 2008 to 2017 were included. The retrospective analysis includes demographic, clinical and pathological data, and the tissue samples underwent immunohistochemical analysis of S100, Ki-67, E-cadherin,  $\alpha$ -SMA, and MMP-9 markers. The statistical analysis was performed using the Kaplan-Meier method and Cox proportional hazards model and the outcome assessed was disease specific survival (DSS). Results. Eighty eligible patients were included in the study. Higher male prevalence (55%) was observed. The mean age was  $63,1 \pm 16$  years, 63,5% of OTSCC were well-differentiated tumors and 58.8% were detected in advanced stages. Lymphovascular invasion (LVI  $\alpha$ -SMA+) and perineural invasion (PNI S100+) were detected in 60% and 75% of OTSCC, respectively. The presence of concomitant LVI and PNI was associated with the advanced clinical stage, metastatic nodes, and poor prognosis of OTSCC ( $p < 0.05$ ). The OTSCC 5-years disease-specific survival rate was 41% with a mean of  $62,2 \pm 7,8$  months (IC 95%; 46,9; 77,5) of follow-up. According to the univariate analysis, DSS was affected by the single marital status (HR=0,62;  $p=0.030$ ), tumors with an advanced clinical stage (HR=5,37;  $p < 0,001$ ), total glossectomy treatment (HR=7,06;  $p=0.011$ ), tumors arising from mobile part of the tongue (HR=0,44;  $p=0.019$ ), tumor size  $\geq 3$  cm (HR=3,42;  $p=0.001$ ), compromised surgical margins (HR=2,04;  $p=0.041$ ), lymph node metastasis (HR=3,07;  $p=0.002$ ), and undifferentiated tumor (HR=3,67;  $p=0.019$ ). However, the expression of biomarkers Ki-67, E-cadherin,  $\alpha$ -SMA, and MMP-9, showed no correlation with DSS. On the other hand, the multivariate analysis demonstrated that tumors with advanced clinical stage (HR=5,29;  $p < 0,001$ ), tumors arising from mobile tongue region (HR=0,34;  $p=0.004$ ), and undifferentiated tumor (HR=3,8;  $p=0.020$ ) are independent predictors for DSS. Conclusion. The biomarkers Ki-67, E-cadherin, MMP-9 and  $\alpha$ -SMA, did not show correlation with survival or prognosis in our sample. Base of tongue arising tumors, tumors larger than 3 cm and undifferentiated tumors were independent factors that affected survival (DSS) rate. The simultaneous presence of LVI and PNI, accurately identified by immunohistochemistry, demonstrated potential to influence the survival rate through rapid diagnosis and should be evaluated in the future to establish their clinical utility.

**Keywords:** Tongue neoplasms. Squamous cell carcinoma. Prognostic factors. Biomarkers. Survival rate.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Niveles y subniveles ganglionares. ....	25
Figura 2. Diseminación del cáncer de lengua.....	26
Figura 3. Características biológicas esenciales del cáncer. ....	32
Figura 4. Moléculas de invasión en el cáncer oral.....	34
Figura 5. Casos incluidos en el estudio. ....	39
Figura 6. Grado de diferenciación del OTSCC. ....	53
Figura 7. Infiltrado inflamatorio del OTSCC.....	54
Figura 8. Expresión de E-cadherina. ....	57
Figura 9. Expresión de Ki-67. ....	58
Figura 10. Expresión de MMP-9.....	59
Figura 11. Expresión de $\alpha$ -SMA. ....	60
Figura 12. Invasión linfovascular. ....	65
Figura 13. Invasión perineural. ....	66
Figura 14. Curvas de sobrevida del OTSCC. ....	70
Figura 15. Curvas de sobrevida: sociodemográfica y clínica I. ....	72
Figura 16. Curvas de sobrevida: sociodemográfica y clínica II.....	73
Figura 17. Curvas de sobrevida: histopatológica.....	77

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características sociodemográficas y clínicas, y asociación con muerte o recaída .....	49
Tabla 2. Tiempo de seguimiento total en meses de acuerdo con el desenlace .....	50
Tabla 3. Características tumorales y asociación con muerte o recaída .....	51
Tabla 4. Análisis bivariado de la metástasis nodal con variables clínicas e histopatológicas.....	52
Tabla 5. Características tumorales en el frente de invasión y asociación con muerte o recaída .....	55
Tabla 6. Patrones de expresión de los biomarcadores en los casos de OTSCC .....	56
Tabla 7. Expresión de los biomarcadores en el frente de invasión y asociación con muerte o recaída .....	61
Tabla 8. Expresión de biomarcadores y características histopatológicas .....	63
Tabla 9. Concordancia de la PNI en el frente de invasión de los pacientes con OTSCC,.....	67
Tabla 10. Análisis bivariado de la invasión perineural (PNI+S100) e invasión linfovascular (LVI+SMA).....	69
Tabla 11. Supervivencia (DSS) de los pacientes con OTSCC .....	71
Tabla 12. Supervivencia (DSS) de los pacientes con OTSCC según las características tumorales,.....	75
Tabla 13. Análisis bivariado y multivariado de la sobrevida de los pacientes con OTSCC,.....	80

## ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ADN</b> Ácido Desoxirribonucleico	<b>Intercuar.</b> Intercuartil
<b>AJCC</b> American Joint Commission on Cancer	<b>Lim.</b> Límite
<b>Bx</b> Biopsia	<b>LMN's</b> Linfomononucleares
<b>CAF</b> Fibroblasto Asociado a Cáncer	<b>LVI</b> Invasión Linfovascular
<b>Circ.</b> Circunferencia	<b>M</b> Metástasis
<b>cm</b> centímetros	<b>MB</b> Membrana Basal
<b>CN</b> Nervio Craneal	<b>MET</b> Transición Mesénquima-Epitelial
<b>CRA</b> Cleverton Roberto de Andrade	<b>MMP</b> Metaloproteinasa de la Matriz
<b>CSO</b> Carlos Serna Ortíz	<b>Mod-Int</b> Moderado e Intenso
<b>CSS</b> Sobrevida específica del cáncer	<b>mtDNA</b> ADN mitocondrial
<b>Cx</b> Cirugía	<b>N</b> Nódulos
<b>DE</b> Desviación Estándar	<b>OR</b> Odds Ratio
<b>DFS</b> Sobrevida libre de enfermedad	<b>OS</b> Sobrevida total
<b>DOI</b> Depth of Invasion	<b>OSCC</b> Carcinoma oral de células escamosas
<b>DSS</b> Sobrevida específica de la enfermedad	<b>OTSCC</b> Carcinoma oral de células escamosas en lengua
<b>E-cad</b> E-cadherina	<b>PMN's</b> Polimorfonucleares neutrófilos
<b>ECM</b> Matriz Extracelular	<b>PNI</b> Invasión Perineural
<b>EMT</b> Transición Epitelio-Mesénquima	<b>Q</b> Cantidad
<b>ENE</b> Extensión Extranodal	<b>QT</b> Quimioterapia
<b>EUA</b> Estados Unidos de América	<b>RFS</b> Sobrevida libre de recaída
<b>FDA</b> Food and Drug Administration	<b>RT</b> Radioterapia
Glos. Glosectomía	<b>T</b> Tumor
<b>H&amp;E</b> Hematoxilina-Eosina	<b>TME</b> Microambiente Tumoral
<b>HPV</b> Virus del Papiloma Humano	<b>TNM</b> Tumor, Nódulos, Metástasis
<b>HR</b> Hazard Ratio	<b>UNESP</b> Universidad Estadual Paulista
<b>I</b> Intensidad	$\bar{x}$ Promedio
<b>IC</b> Intervalo de Confianza	$\chi^2$ Chi cuadrado
<b>IDC</b> Instituto de Cancerología	$\alpha$ -SMA alfa Actina de Músculo Liso

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>2 PROPOSICIÓN .....</b>	<b>19</b>
2.1 Objetivos Específicos.....	19
<b>3 REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>20</b>
3.1 Epidemiología .....	20
3.2 Generalidades del Cáncer Oral.....	21
3.3 Consideraciones Anatómicas del Cáncer de Lengua .....	24
3.4 Clasificación del Estadiaje en Cáncer Oral.....	27
3.5 Invasión Perineural .....	29
3.6 Mecanismos Fisiopatológicos del Cáncer Oral .....	31
3.7 Biomarcadores Pronósticos en Cáncer Oral.....	35
<b>4 MATERIAL Y MÉTODO .....</b>	<b>38</b>
4.1 Enfoque Metodológico.....	38
4.2 Población y Muestra.....	38
4.3 Criterio de Inclusión y Exclusión .....	38
4.3.1 Inclusión .....	38
4.3.2 Exclusión .....	39
4.4 Instrumento de Recolección de la Información .....	39
4.5 Proceso de Recolección de la Información .....	40
4.5.1 Fuentes de información primaria .....	40
4.5.2 Fuentes de información secundaria .....	40
4.5.3 Variables .....	40
4.6 Control de Errores y Sesgos .....	42
4.7 Protocolo de Laboratorio.....	43
4.7.1 Equipamientos .....	43
4.7.2 Inmunohistoquímica .....	43
4.7.3 Criterios para la cuantificación de la positividad .....	45
4.8 Análisis Estadístico .....	46
4.9 Consideraciones Éticas.....	47
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>

<b>5.1 Descripción Sociodemográfica y Clínica .....</b>	<b>48</b>
<b>5.2 Descripción de las Características Histopatológicas .....</b>	<b>50</b>
<b>5.3 Expresión de Marcadores Tisulares .....</b>	<b>56</b>
<b>5.3.1 Detección de la LVI y PNI con inmunohistoquímica.....</b>	<b>64</b>
<b>5.4 Análisis de Sobrevida .....</b>	<b>70</b>
<b>5.5 Modelo Predictivo para Marcadores Pronóstico de Sobrevida en OTSCC.....</b>	<b>79</b>
<b>6 DISCUSIÓN .....</b>	<b>81</b>
<b>6.1 Características Sociodemográficas, Clínicas y Sobrevida .....</b>	<b>81</b>
<b>6.2 Características Histopatológicas y Sobrevida.....</b>	<b>85</b>
<b>6.3 Expresión de Biomarcadores y Sobrevida .....</b>	<b>92</b>
<b>6.4 Limitaciones .....</b>	<b>98</b>
<b>7 CONCLUSIÓN .....</b>	<b>101</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>102</b>
<b>APÉNDICE.....</b>	<b>116</b>

## 1 INTRODUCCIÓN

El cáncer oral es la neoplasia maligna más común de todos los sitios anatómicos de la cabeza y del cuello, afectando los labios, la mucosa bucal, la encía, el paladar duro y blando, y el triángulo retromolar. Sin embargo, los sitios más frecuentemente afectados son la lengua y el piso de la boca <sup>1</sup>.

El carcinoma oral de células escamosas es el subtipo histológico más frecuente y representa más del 90% de los casos <sup>2,3</sup>. La tasa de supervivencia a 5 años es de aproximadamente el 50 al 60% <sup>4-6</sup>, la cual se ha mantenido sin cambios durante las últimas décadas a pesar de los avances en la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en su desarrollo, y también en el tratamiento oncológico.

La epidemiología del carcinoma oral de células escamosas en lengua ha sufrido un cambio en las últimas décadas, observándose un aumento en la incidencia y una tendencia a presentarse en individuos cada vez más jóvenes (< 45 años) en países como Australia, Canadá, Finlandia, Suecia, entre otros. Sin embargo, esta información proviene de países desarrollados <sup>7,8</sup> y podría no reflejar lo sucedido en países latinoamericanos.

El diagnóstico de OTSCC comúnmente se establece en estadios avanzados y esto reduce su supervivencia <sup>9</sup>, con el aumento subsecuente en los costos de tratamiento y rehabilitación para el sistema de salud <sup>10-12</sup>. Además, las secuelas a nivel funcional, estético, psicológico y emocional en los pacientes, una vez han sido tratados, les impiden tener una calidad de vida adecuada, con afectación en sus relaciones familiares, sociales y laborales <sup>13,14</sup>.

La estadificación del cáncer en general se ha basado tradicionalmente en el tamaño del tumor, la afectación de los ganglios linfáticos y la presencia de enfermedad metastásica (sistema de clasificación TNM) <sup>15</sup>. Dada la simplicidad del TNM, se ha demostrado que, en muchos casos, resulta insuficiente para individualizar el pronóstico, a pesar de su reciente actualización (2016). Sin embargo, la actualización más significativa de esta última versión, fue incluir un algoritmo de estadificación independiente para el carcinoma escamocelular de orofaringe positivo para virus del papiloma humano. Por lo tanto, nuevos factores (clínicos, histopatológicos y moleculares) deben ser estudiados y adicionados a esta clasificación para aumentar su capacidad de predicción <sup>16</sup>.

Por ejemplo, es necesario reconocer otros aspectos relevantes para el pronóstico y el tratamiento que no han sido considerados, como la invasión perineural, que podrían tener un impacto en el estadiaje, como fue el caso de la profundidad de invasión, que fue integrado en la última edición como un elemento determinante para redefinir las características tumorales y, por ende, modificar el estadio de la enfermedad, lo que podría incluso, reclasificar algunos casos en un estadio mayor <sup>17</sup>. La evaluación de la PNI, también podría identificar y diferenciar grupos de pacientes con OSCC de bajo y alto riesgo de metástasis oculta y recurrencia de la enfermedad, además de personalizar el tratamiento para disminuir la morbilidad causada por la radiación innecesaria y la disección cervical, y analizar quienes se beneficiarían de un tratamiento más agresivo, lo que podría aumentar las probabilidades de supervivencia <sup>18</sup>.

Existe, además, la necesidad de validar marcadores previamente identificados en estudios publicados anteriormente, lo que permitiría acumular mayor evidencia respecto a ellos, analizando su utilidad en diferentes poblaciones en las que no se han estudiado.

En Colombia, son escasos los estudios en cáncer oral. En ellos, se han evaluado diferentes marcadores moleculares (Ki-67, Regiones Organizadoras del Nucleolo Argirofílicas-AgNOR-, cicloxigenasa-2, proteína translocadora mitocondrial 18kDa -TSPO-, ciclina D1, HPV-16) <sup>13,19-24</sup>, pero sólo unos pocos estudios describen en detalle las características sociodemográficas, clínicas e histopatológicas que permitan realizar comparaciones con individuos de otras regiones del mundo. Además, ninguno de tales estudios ha evaluado la expresión tisular de los marcadores Ki-67, E-cadherina, MMP-9 y  $\alpha$ -SMA, las características sociodemográficas, clínicas, histopatológicas y su relación con la supervivencia en pacientes diagnosticados con OTSCC.

## 2 PROPOSICIÓN

Explorar la relación entre las características sociodemográficas, clínicas, la expresión tisular de algunos biomarcadores relevantes en el pronóstico (Ki-67, E-cadherina, MMP-9 y  $\alpha$ -SMA), y características histopatológicas como la invasión linfovascular y perineural entre otras, con la sobrevida específica de la enfermedad en pacientes diagnosticados con carcinoma escamocelular oral en lengua tratados en el Instituto de Cancerología Clínica Las Américas en la ciudad de Medellín, en el período 2008 a 2017.

### 2.1 Objetivos Específicos

- Describir las características sociodemográficas y clínicas de los pacientes incluidos en el estudio.
- 2Describir las características histopatológicas, incluyendo la invasión linfovascular y perineural, de los pacientes incluidos en el estudio.
- Identificar la expresión tisular de Ki-67, E-cadherina, MMP-9 y  $\alpha$ -SMA mediante técnicas inmunohistoquímicas en las biopsias de los pacientes incluidos en el estudio.
- Analizar la asociación entre las características sociodemográficas, clínicas, histopatológicas y la expresión tisular de los biomarcadores, con el pronóstico y la sobrevida de los pacientes incluidos en el estudio.
- Explorar un modelo predictivo con todas las características evaluadas para identificar los factores independientes que afectan la sobrevida del OSTCC en los pacientes incluidos en el estudio.

### 3 REVISIÓN DE LITERATURA

A continuación, se revisan los aspectos más relevantes del OTSCC.

#### 3.1 Epidemiología

En 2018, GLOBOCAN reportó 18,1 millones de casos nuevos de cáncer y 9.5 millones de muertes en todo el mundo, aproximadamente 4 y 1.5 millones más de casos que en 2012, respectivamente <sup>25</sup>. El cáncer oral ocupa el 18<sup>vo</sup> lugar en incidencia y 16<sup>vo</sup> lugar en mortalidad, entre los 36 tipos de cáncer más comunes evaluados en 185 países, con 354,864 casos nuevos y 177,384 muertes asociadas <sup>26</sup>. En el mismo informe se reportó específicamente para Colombia, una incidencia de 101,893 casos de todos los tipos de cáncer con 46,057 muertes, de los cuales sólo 845 casos nuevos correspondieron a cáncer oral y 354 muertes asociadas al mismo. Sin embargo, estos datos deben interpretarse con precaución, ya que estas cifras se basaron en los registros de sólo cuatro ciudades (Bucaramanga, Cali, Manizales y Pasto) que representan un 8% de la población y sólo cubrieron el periodo 2003-2007 <sup>25</sup>. Actualmente existen dos centros de registro poblacional de cáncer adicionales: Medellín y Barranquilla <sup>27</sup>.

En 2015, el Instituto Nacional de Cancerología de Colombia reportó que el cáncer oral estuvo entre los diez tipos de cáncer con mayor incidencia y mortalidad en hombres <sup>28</sup>. Colombia, es un país que cuenta con una variada diversidad geográfica, demográfica, social y cultural, lo que conlleva a que los datos de un solo registro no sean aplicables a todo el resto del país <sup>29</sup>.

El registro poblacional de cáncer del departamento de Antioquia (donde se desarrolló la presente investigación), reportó sólo en el periodo 2013-2016, 424 casos nuevos de cáncer oral, de los cuales el 52% afectaron alguna porción de la lengua <sup>30</sup>. Antioquia es un departamento del noroeste de Colombia ubicada en medio de la Cordillera de los Andes, su población es el producto de una mezcla de razas (amerindia, europea y africana), cuyas condiciones geográficas la mantuvieron aislada hasta finales del siglo XIX <sup>31</sup>. Carvajal et al, en su estudio de ancestría, encontraron que la población antioqueña posee una mezcla genética donde el cromosoma Y y el ADN mitocondrial difieren notablemente. Mientras que el cromosoma Y tiene ~94% ascendencia europea, 5% africana y 1% amerindia, el mtDNA heredado de la madre

es ~90% amerindio, esto indicaría una población producto de la mezcla de hombres inmigrantes y mujeres nativas locales <sup>31</sup>.

Medellín es la segunda ciudad más poblada de Colombia, capital del departamento de Antioquia y cuenta con 2.529.403 habitantes <sup>32</sup>. Es la ciudad núcleo del área metropolitana del Valle de Aburrá. Los otros miembros de norte a sur son los municipios de Barbosa, Girardota, Copacabana, Bello, Envigado, Itagüí, Sabaneta, La Estrella y Caldas. El cáncer es un problema de salud pública en Medellín, siendo la segunda causa de muerte después de las enfermedades del sistema circulatorio reportadas hasta el año 2018, y responsable del 25% de las muertes ocurridas en la ciudad <sup>33</sup>.

Durante el periodo 2010-2014 se registraron 22.379 casos nuevos de cáncer, predominantemente en mujeres (61,6%) y 14.922 muertes asociadas en el área urbana del municipio de Medellín. Sin embargo, en este estudio el cáncer oral no fue analizado individualmente como uno de los tipos de cáncer contemplados dentro del Plan Decenal para el Control de Cáncer en Colombia, y se reporta un subregistro general de la enfermedad en la ciudad. Existe además una proporción de casos de cáncer oral no registrados, lo que sugiere que algunos de los pacientes en el área no son captados y los datos son incompletos. Por otro lado, la prevalencia de tabaquismo en la ciudad alcanza el 25.5%, los fumadores también presentan alto consumo de alcohol y esto se asocia de manera inversa con el nivel de educativo, todos estos factores de riesgo determinantes para el cáncer oral <sup>33</sup>.

La epidemiología del cáncer oral varía considerablemente por región, sexo, diferencias en hábitos alimenticios, edad y otros factores de riesgo de la población. Esto podría determinar diferencias en comparación con la población latinoamericana e incluso con otras regiones dentro del mismo país.

### **3.2 Generalidades del Cáncer Oral**

El cáncer oral se desarrolla durante la exposición prolongada a una variedad de factores carcinogénicos, representa un proceso multifactorial altamente complejo, que ocurre cuando las células epiteliales son afectadas por alteraciones genéticas y epigenéticas, y ocurren errores en los mecanismos de reparación del ADN <sup>34</sup>.

El consumo de tabaco (en sus diferentes formas) y alcohol son factores etiológicos bien establecidos para desarrollar cáncer oral, tienen una relación dosis dependiente y actúan de manera sinérgica cuando se presentan simultáneamente, sin embargo, estos factores explican solo un porcentaje de los casos. Otros factores asociados son, el hábito de masticar “betel quid“, muy común en el sur de Asia, este consiste en masticar una mezcla de sustancias que incluyen nuez de areca con o sin tabaco, envuelta en una hoja de betel, que puede incrementar hasta 3 veces el riesgo de desarrollar cáncer oral <sup>35,36</sup>.

La radiación ultravioleta es un factor de riesgo relacionado específicamente con el cáncer en labio <sup>36</sup>. Por otro lado, uno de los virus asociados más estudiado es el VPH, siendo los subtipos VPH 16 y 18 los de mayor riesgo oncogénico, aunque recientemente se han identificado otros serotipos de riesgo. Otros factores reportados son el bajo nivel educativo y de ingresos, la baja ingesta de frutas y vegetales frescos, la susceptibilidad genética, la salud e higiene oral pobre <sup>35,36</sup>. Recientemente también se ha hablado del papel de la obesidad en la carcinogénesis de cabeza y cuello, y de lengua específicamente <sup>37,38</sup>.

Un ejemplo de la singularidad de la población colombiana es el hábito de fumar invertido o tabaquismo invertido, el cual produce cambios tisulares que abarcan enfermedades benignas y malignas de la mucosa oral. Este hábito se practica en pocos lugares del mundo incluyendo Holanda, Suroeste Asiático, India, Sri Lanka, Jamaica, Panamá, Venezuela, Colombia y varias islas del Caribe <sup>39</sup>. En algunas regiones de Colombia se ha reportado una prevalencia de esta práctica del 15%, principalmente en mujeres <sup>40</sup> y mayor presencia de cáncer oral asociado a este hábito <sup>41,42</sup>.

Clínicamente el OSCC se puede presentar como una lesión temprana tipo eritroleucoplasia, pero clásicamente, se caracteriza por ulceración irregular con bordes elevados y dura a la palpación, o tumoración exofítica de superficie verrucosa. Las localizaciones más frecuentes dentro de la cavidad oral son la lengua y el piso de la boca, otras zonas afectadas son mucosa bucal, área retromolar, encía, paladar blando y duro, y labio. La localización depende de algunos factores geográficos, ocupacionales y factores de riesgo específicos. Su tamaño puede variar de unos pocos milímetros hasta varios centímetros, y esto se relaciona con los síntomas, normalmente las lesiones iniciales son pequeñas y asintomáticas. El dolor se presenta en lesiones de gran tamaño y es la principal razón de consulta de los pacientes,

muchas veces de manera tardía. En algunas localizaciones como la lengua, el dolor puede aparecer rápidamente debido al movimiento de roce contra las estructuras dentales, ya que comúnmente afecta las superficies laterales y el vientre lingual. Otros síntomas pueden incluir, otalgia, sangrado, movilidad dental, dificultades para respirar, hablar y deglutir, parestesia, linfadenopatía cervical, cambios en la voz, entre otros menos frecuentes <sup>1</sup>.

El diagnóstico temprano en OSCC es el factor más importante para alcanzar entre el 80-90% de supervivencia del paciente, además minimiza la extensión quirúrgica requerida. Debe sospecharse OSCC en pacientes con lesiones persistentes en la mucosa oral por más de tres semanas, y establecer el diagnóstico por medio de un análisis histopatológico <sup>1</sup>.

El tratamiento del OSCC requiere estrategias específicas para cada subsitio dentro de la cavidad oral. Para el caso del OTSCC, el tratamiento primario y definitivo con intención curativa es la cirugía por si sola, o con radiación (externa o por braquiterapia) o quimioterapia adyuvantes, además de la inmunoterapia, lo cual depende de la estadificación patológica. La reconstrucción depende en gran medida del tamaño del defecto, y puede ir desde un cierre primario en defectos pequeños, injertos de piel o apósitos biológicos en aquellos defectos moderados, hasta colgajos locoregionales o transferencia de tejido libre para glosectomía y hemiglosectomía. En cuanto al manejo de los nódulos linfáticos cervicales, se recomienda la disección selectiva del cuello incluso en los casos tempranos N0 debido al alto riesgo de metástasis ganglionar oculta al momento del diagnóstico <sup>43</sup>

Su pronóstico es muy variable y depende en gran medida del estadio clínico al momento del diagnóstico, pero también de la localización dentro de la cavidad oral, por lo tanto, un cambio de unos pocos centímetros altera significativamente su pronóstico. Las estructuras en la línea media, como la lengua, el piso de la boca y el paladar, tienden a drenar bilateralmente a los nódulos linfáticos y tienen un peor pronóstico <sup>6,9</sup>. Un parámetro importante en el pronóstico del cáncer es la sobrevida de la enfermedad. Esta se define como: *“El porcentaje de personas en un grupo de estudio o tratamiento que siguen vivas durante un cierto período de tiempo después de que se les diagnostica o comienza el tratamiento para una enfermedad...”* <sup>44</sup>. En el caso del cáncer oral, se estima una sobrevida a 5 años alrededor del 70% al 90% si es diagnosticado en estadios tempranos, mientras que, se reduce drásticamente, en el caso de los estadios avanzados (20-30%) <sup>9</sup>. La estimación de la supervivencia al

cáncer entre diversos países y, su posterior comparación, ha revelado grandes diferencias, probablemente atribuibles a las diferencias en el acceso al diagnóstico temprano y al tratamiento oportuno. La vigilancia de la supervivencia al cáncer debería convertirse en una fuente indispensable de información para los investigadores y un estímulo para el mejoramiento de las políticas y del sistema de atención en salud <sup>45</sup>. Existen diferentes formas de medir la sobrevida: sobrevida global, sobrevida libre de enfermedad, sobrevida específica de la enfermedad, entre otras, que permiten evaluar el éxito del tratamiento según el desenlace de interés <sup>44</sup>.

### **3.3 Consideraciones Anatómicas del Cáncer de Lengua**

La lengua es un órgano móvil situado en el interior de la cavidad oral, compuesto por 17 músculos intrínsecos y extrínsecos, se divide en dos porciones por medio del surco terminal en forma de V: dos tercios anteriores y tercio posterior, cada uno con origen embrionario y estructura distinta. La mucosa que recubre la parte anterior de la lengua se origina en el primer arco faríngeo; por lo tanto, la inervación sensorial de esta área proviene de la rama mandibular del nervio trigémino (CN V3) por medio de su rama lingual. El nervio lingual avanza anteriormente adyacente a la mandíbula e inerva la encía lingual, la mucosa de la lengua y el piso de la boca; luego se curva debajo del conducto submandibular a medida que pasa hacia la punta de la lengua. Se han descrito variaciones en el patrón de ramificación en su extremo terminal de una a cuatro ramas, la mayoría de los nervios linguales se desvían hacia la lengua desde el piso de la boca entre mesial del primer molar y distal del segundo molar, también pueden tener conexiones con los nervios milohioideos <sup>46,47</sup>.

El gusto en los dos tercios anteriores de la lengua está dado por el nervio cuerda del tímpano, una rama del nervio facial (CN VII). El tercio posterior de la lengua se desarrolla de los arcos faríngeos restantes, y la mucosa que lo recubre tiene inervación sensorial del nervio glossofaríngeo (CN XI). El nervio hipogloso (CN XII) proporciona inervación motora a todos los músculos intrínsecos y extrínsecos de la lengua, excepto el músculo palatogloso, que está inervado por el nervio vago (CN X) <sup>46,47</sup>.

Debido a las interdigitaciones de los músculos intrínsecos y extrínsecos, un tumor que compromete la lengua conduce rápidamente a la invasión del piso de la boca, de ahí puede afectar la mandíbula y luego a los ángulos laterales que se funden

en el surco alvéololingual de la orofaringe. Además de su rica innervación, también posee un abundante aporte vascular que proviene predominantemente de la arteria lingual, una rama de la arteria carótida externa, y una amplia red linfática <sup>46,48</sup>.

La región de la cabeza y el cuello contiene más de 300 ganglios linfáticos. La American Joint Commission on Cancer, establece un sistema de niveles para describir la ubicación de los ganglios linfáticos en el cuello, así: Nivel I, grupo submental y submandibular; Nivel II, grupo yugular superior; Nivel III, grupo yugular medio; Nivel IV, grupo yugular inferior; Nivel V, grupo triangular posterior; y Nivel VI, compartimento anterior (Figura 1). Generalmente hay dos patrones de compromiso de los ganglios linfáticos que dependen de la localización del cáncer oral, regiones anteriores como los labios, piso de boca y tercios anteriores de la lengua, drenan hacia los ganglios submental y submandibulares; los más posteriores hacia los ganglios yugulo digástricos (niveles I, II y III). Muchos de estos ganglios no se detectan clínicamente y requieren de ayudas diagnósticas de imagenología.

Aproximadamente el 20% del cáncer de los tercios anteriores de la lengua y piso de la boca pueden tener metástasis ganglionar “saltatoria” (skip nodal metastasis) al Nivel IV, incluso se ha reportado en estadios tempranos (T1 y T2), y su porción media de forma bilateral a los ganglios cervicales medios <sup>48-50</sup>, lo cual determina el tipo de disección cervical indicada para cada caso (Radical Neck Dissection-RND, Modified Radical Neck Dissection-MRND, Selective Neck Dissection-SND and Extended Radical Neck Dissection-ERND) <sup>51</sup>.

Figura 1 - Niveles y subniveles ganglionares.

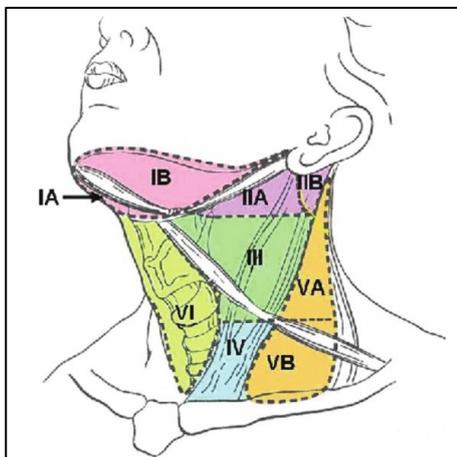
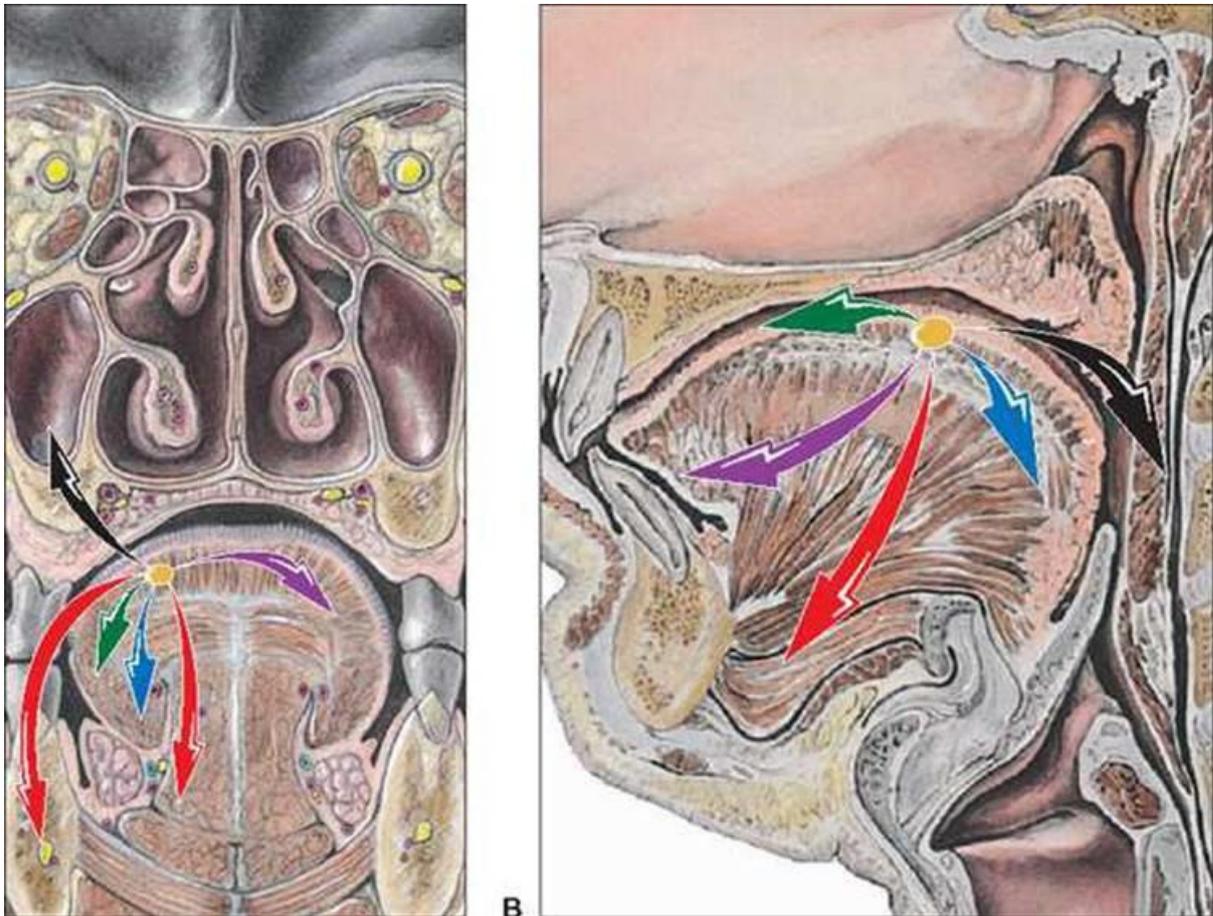


Diagrama del cuello mostrando los niveles y subniveles ganglionares.

Fuente: Carcinoma Papilar de Tiroides <sup>52</sup>.

Cada sitio específico de la cavidad oral tiene un patrón de diseminación del cáncer a manera de un cangrejo que puede invadir en seis direcciones básicas Superior-Inferior, Medial-Lateral, Anterior-Posterior. Por ejemplo, el cáncer de labios rara vez hacen metástasis a los ganglios linfáticos, a menos que haya una invasión profunda del músculo orbicular. Por el contrario, el cáncer de lengua invade fácilmente la musculatura subyacente, que conduce a la rápida infiltración y compromiso de los ganglios linfáticos (Figura 2) <sup>48</sup>.

Figura 2 - Diseminación del cáncer de lengua.



“Patrones de diseminación. A. Vista coronal: invasión del cáncer de lengua oral al piso de boca y procesos alveolares. B. Vista sagital: invasión del cáncer de lengua oral a la musculatura extrínseca del piso de boca y lengua posterior. El cáncer primario (cavidad oral) invade en varias direcciones, que son vectores codificados por colores (flechas) que representan la etapa de progresión: *Tis*, amarillo; T1, verde; T2, azul; T3, morado; T4A, rojo; y T4B, negro”.

Fuente: TNM Staging Atlas with Oncoanatomy <sup>48</sup> (traducción nuestra).

### 3.4 Clasificación del Estadiaje en Cáncer Oral

El sistema de estadificación TNM para el cáncer, es un sistema internacionalmente aceptado que se utiliza para determinar el estadio de la enfermedad, fue desarrollado por primera vez por Pierre Denoix en las décadas de 1940 y 1950, y su primera edición fue publicada en 1977 por el AJCC <sup>15</sup>.

La última edición (8va) del manual de estadificación del cáncer, fue publicada en octubre de 2016 y describe un nuevo sistema, que no sólo se basa en parámetros clínicos como la extensión anatómica de la enfermedad, sino también en marcadores histológicos adicionales que mejoran la identificación de pacientes de mayor riesgo de recurrencia, no sólo discriminando su pronóstico, sino también siendo una ayuda para determinar el abordaje terapéutico más efectivo <sup>15,53</sup>, tales como la profundidad de la invasión, definida como el grado de expansión del tumor por debajo de la membrana basal, y la extensión extranodal <sup>54,55</sup>. Sin embargo, los parámetros histopatológicos relevantes pueden variar dependiendo del tipo y localización del cáncer.

La determinación del estadio puede ser clínica inicialmente y patológica después de la resección quirúrgica, esta última se considera más precisa y guía el tratamiento y el pronóstico de la enfermedad. Para el caso del cáncer oral la clasificación del TNM clínico determina el estadio y los grupos pronóstico (Cuadro 1 y 2).

Cuadro 1 - Clasificación Tumor, Nódulo, Metástasis para cáncer de cavidad oral (continua)

<b>T- Tumor primario</b>	
<b>Tx</b>	Tumor primario no puede ser evaluado
<b>Tis</b>	Carcinoma <i>in situ</i>
<b>T1</b>	Tumor ≤2 cm con DOI ≤5 mm
<b>T2</b>	Tumor ≤ 2 cm con DOI > 5 mm o tumor > 2 cm y ≤ 4 cm con DOI ≤ 10 mm
<b>T3</b>	Tumor > 2 cm y ≤ 4 cm con DOI > 10 mm o tumor > 4 cm con DOI ≤ 10 mm
<b>T4</b>	Enfermedad local moderadamente avanzada o muy avanzada
<b>T4a</b>	Enfermedad local moderadamente avanzada.

	Tumor > 4 cm con DOI > 10 mm o tumor invade solo estructuras adyacentes (es decir, a través del hueso cortical de la mandíbula o el maxilar, o afecta el seno maxilar o la piel de la cara)
<b>T4b</b>	Enfermedad local muy avanzada. El tumor invade el espacio masticatorio, las placas pterigoideas o la base del cráneo y / o la arteria carótida.
<b>N- Nódulos linfáticos regionales</b>	
<b>Nx</b>	No puede ser evaluado
<b>N0</b>	Sin metástasis en nódulos linfáticos regionales
<b>N1</b>	Metástasis en un solo nódulo linfático ipsilateral, ≤3 cm en su mayor dimensión y ENE negativo
<b>N2a</b>	Metástasis en un solo nódulo linfático ipsilateral >3 cm pero no >6 cm en su mayor dimensión y ENE negativo
<b>N2b</b>	Metástasis en múltiples nódulos linfáticos ipsilaterales, ninguno >6 cm en su mayor dimensión y ENE negativo
<b>N2c</b>	Metástasis en nódulos linfáticos bilaterales o contraterales, ninguno >6 cm en su mayor dimensión y ENE negativo
<b>N3a</b>	Metástasis en un nódulo linfático >6 cm en su mayor dimensión y ENE negativo
<b>N3b</b>	Metástasis en cualquier nódulo(s) linfático y ENE positivo visible clínicamente
<b>M- Metástasis a distancia</b>	
<b>M0</b>	Sin metástasis a distancia
<b>M1</b>	Metástasis a distancia

Abreviaturas: DOI, Depth Of Invasion; ENE, Extensión Extranodal.

Fuente: AJCC Cancer staging manual, form supplement <sup>56</sup> (traducción nuestra).

Cuadro 2 - Estadios pronósticos en cáncer oral.

<b>Estadios pronósticos de la AJCC</b>			
<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>Estadio</b>
<b>Tis</b>	N0	M0	0
<b>T1</b>	N0	M0	I
<b>T2</b>	N0	M0	II
<b>T3</b>	N0	M0	III
<b>T1, T2, T3</b>	N1	M0	III
<b>T4a</b>	N0, N1	M0	IVA
<b>T1, T2, T3, T4a</b>	N2	M0	IVA
<b>Cualquier T</b>	N3	M0	IVB
<b>T4b</b>	Cualquier N	M0	IVB
<b>Cualquier T</b>	Cualquier N	M1	IVC

Fuente: AJCC Cancer staging manual, form supplement <sup>56</sup> (traducción nuestra).

### 3.5 Invasión Perineural

Históricamente se han considerado los vasos sanguíneos y linfáticos como vías clásicas de la diseminación del cáncer, sin embargo, una tercera vía es la diseminación nerviosa, que puede alcanzar mucho más allá de la invasión local y presentarse en ausencia de las vías anteriormente mencionadas. La PNI, también llamada neurotropismo, es el tropismo de las células tumorales sea dentro o a lo largo de los haces nerviosos adyacentes <sup>53</sup>.

El espacio perineural se considera un espacio imaginario con la ausencia de células de revestimiento epitelial dentro del tejido conectivo y una ruta de baja resistencia a través de la cual ocurre la invasión del epineuro, mediada por la presencia de moléculas de adhesión celular neural (N-CAM) en la superficie de las células tumorales <sup>57</sup>. La PNI es un reconocido factor de pronóstico pobre en cáncer colorrectal, de próstata, pancreático, entre otros <sup>58</sup>, y a nivel de la cavidad oral de ciertos tipos de cáncer de glándulas salivares como el carcinoma adenoideo quístico <sup>59</sup> y el carcinoma mucoepidermoide <sup>60</sup>. La invasión perineural en el área de cabeza y cuello fue descrita por primera vez por Cruveilheir en 1835. A partir de allí, puede

propagarse a la base del cráneo y la cavidad intracraneal, o hacia ramas nerviosas periféricas de menor calibre <sup>53</sup>.

Como ya se mencionó previamente, la lengua posee abundante inervación para cumplir sus múltiples funciones motoras y sensitivas, de ahí la importancia de evaluar PNI en uno de los subsitios de la cavidad oral más afectado por el cáncer. Sin embargo, puede presentarse un alto grado de variabilidad en su identificación, a causa de la alteración de las características de los tejidos adyacentes a la masa tumoral, al tamaño de la infiltración y de la terminación nerviosa, o también por enmascaramiento por un infiltrado inflamatorio intenso. La PNI puede ser identificada por medio de distintas técnicas, la más frecuentemente usada es la coloración Hematoxilina-Eosina, pero también se han usado marcadores inmunohistoquímicos como S100 (marcador superficial de la membrana de la célula de Schwann), *p75NGFR* (receptor de baja afinidad del factor de crecimiento nervioso), Glut-1, Laminina, entre otros <sup>61,62</sup>.

Los genes S100 son la mayor subfamilia de proteínas de unión a  $Ca^{++}$  de tipo mano EF, tienen bajo peso molecular (10,000 Da) y cuenta con 25 miembros estrechamente relacionados. La inmunotinción anti-S100 se ha considerado un método eficaz para la detección de la PNI oculta en cáncer <sup>63</sup>. Se ha reportado PNI oculta en OSCC y OTSCC de entre 51-82% después de la inmunotinción con anti-S100, y correlación positiva con mayor tamaño y espesor del tumor, nódulos linfáticos comprometidos, estadio clínico avanzado, mayor grosor del tumor, márgenes de resección cercanos y positivos, peor patrón de invasión y supervivencia pobre <sup>61,62</sup>.

Es de gran importancia identificar no sólo los factores de alto riesgo sino los intermedios, que ponen a los pacientes en riesgo de metástasis loco-regional y a distancia, esto podría dirigir las recomendaciones terapéuticas en un esfuerzo por mejorar la supervivencia <sup>64</sup>. Entre ellos, la invasión perineural ha sido ampliamente reconocida como un indicador de mal pronóstico, que se correlaciona fuertemente con el comportamiento agresivo del tumor, el aumento de la recurrencia y de la morbilidad y mortalidad en pacientes con OSCC y OTSCC, y afecta en gran medida las decisiones de tratamiento <sup>53,64</sup>. Por lo tanto, es una característica oncológica adversa que debe documentarse en los informes patológicos regulares para pacientes con cáncer oral.

No existe una clasificación unificada para la PNI en cáncer oral. Liebig et al. propusieron la clasificación más ampliamente utilizada, en ella la PNI se debería reportar positiva cuando, las células tumorales fueran identificadas en cualquiera de las tres capas de la vaina nerviosa, y/o cuando el tumor estuviera cerca del nervio y afectara más de un tercio de su circunferencia <sup>65</sup>. Debido a las diversas definiciones existentes, se ha reportado un amplio rango de frecuencia para la PNI entre 2-82% en OSCC <sup>66</sup>.

La PNI puede ser clínica o subclínica según la presencia de sintomatología, que puede ir desde dolor, parestesia, disestesia hasta déficit motor, sin embargo, los síntomas aparecen generalmente de manera tardía. Su presencia, también puede afectar la efectividad del tratamiento quirúrgico, ya que las células tumorales se extienden más allá de la lesión primaria. Por lo tanto, la identificación de la PNI histopatológica o usando otros medios, podría proporcionar un predictor más objetivo del compromiso cervical.

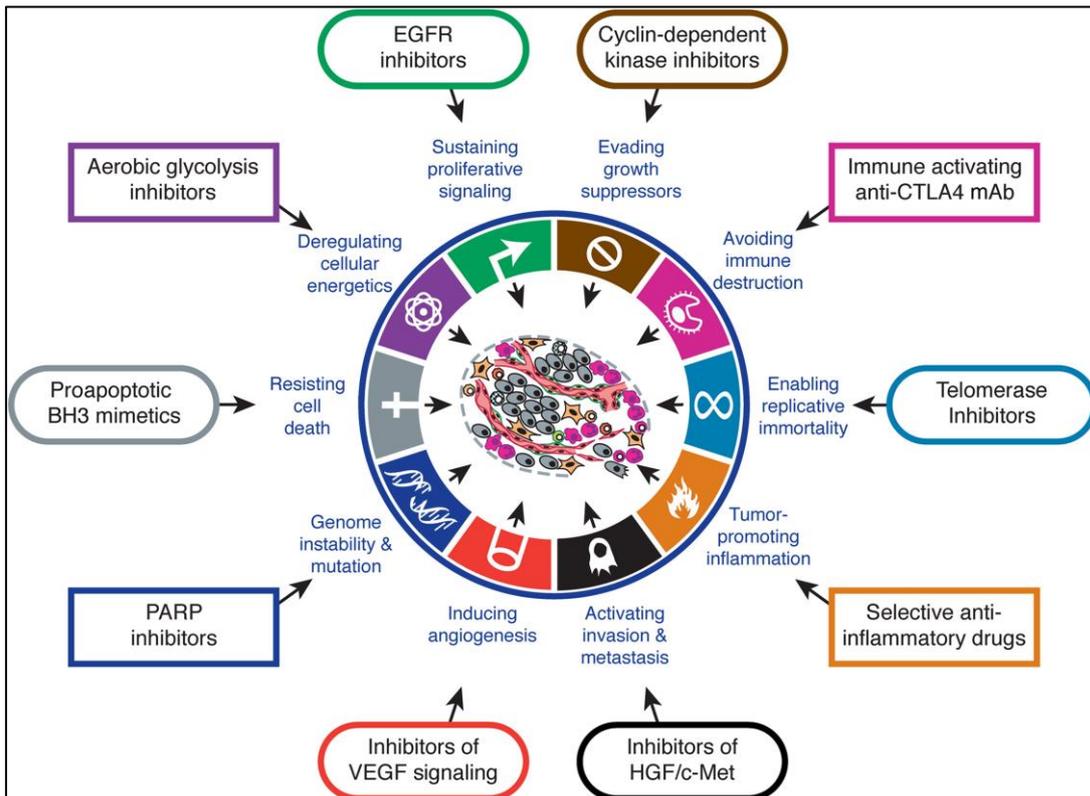
El abordaje terapéutico para los pacientes con cáncer oral y PNI histológicamente comprobada aún es materia de debate por la falta de evidencia científica sólida. Se debe considerar una resección más agresiva del tumor primario en presencia de PNI <sup>57</sup> y la disección cervical electiva podría mejorar el pronóstico en pacientes con N0 PNI positiva con OSCC <sup>53</sup>. La radioterapia postoperatoria adyuvante para PNI aislada sin otros factores de riesgo se recomienda en la mayoría de los algoritmos de tratamiento, aunque persiste la controversia con respecto a su capacidad para mejorar significativamente las tasas de supervivencia <sup>67</sup>.

### **3.6 Mecanismos Fisiopatológicos del Cáncer Oral**

Durante el desarrollo de casi todos los tumores humanos, se adquieren alteraciones esenciales en la fisiología celular, Hanahan et al. <sup>68</sup>, hace casi dos décadas las agruparon y denominaron como *Hallmarks of Cancer*, y consisten en: la autosuficiencia en las señales de crecimiento, la insensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento, la evasión de la muerte celular programada (apoptosis), el potencial replicativo ilimitado, la angiogénesis sostenida e invasión tisular y la metástasis. Posteriormente, surgieron cuatro nuevas características: el desarrollo de inestabilidad del genoma y mutación, la inflamación como promotora del tumor, la reprogramación del metabolismo energético y la evasión de la destrucción por el

sistema inmune <sup>69</sup>. La sumatoria de todas estas características adquiridas permite que las células cancerosas sobrevivan, proliferen y se diseminen. El entendimiento de dichos mecanismos constituye la base de las terapias dirigidas y valida su eficacia, pues su inhibición debería afectar el crecimiento y la progresión tumoral (Figura 3).

Figura 3 - Características biológicas esenciales del cáncer.



Blancos terapéuticos de las marcas del cáncer (traducción nuestra).

Fuente: Hallmarks of cancer: the next generation <sup>69</sup>.

De dichas características, la invasión tisular y la metástasis son los factores pronóstico más importantes en el cáncer oral como en cualquier otro carcinoma. El OSCC se desarrolla a través de la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas en un proceso de múltiples etapas. La adquisición de la capacidad invasiva es un proceso altamente dinámico que involucra la interacción entre elementos celulares intrínsecos, que permitan finalmente la trans migración a través de la membrana basal - la barrera natural que separa el epitelio del tejido conectivo subyacente-. El inicio y mantenimiento del proceso de invasión está regulado principalmente por varias vías de señalización <sup>70</sup>.

Inicialmente hay una alteración de la adhesión entre las células tumorales por la regulación positiva o negativa de algunas moléculas de adhesión intercelular (por ejemplo, *E-cadherina*, *Neural-cadherina (N-cadherina)*, *Claudina* y *Desmogleína (DSG)*) y adquieren movilidad. En circunstancias normales, las células migran durante el desarrollo embrionario y se asientan en una ubicación distante a través de la transición epitelio-mesénquima y de la transición mesenquimal-epitelial. La EMT permite que las células epiteliales adquieran un fenotipo de células mesenquimatosas con múltiples cambios bioquímicos que mejoran su capacidad migratoria, invasividad, resistencia a la apoptosis y mayor producción de componentes de la matriz extracelular <sup>70</sup>.

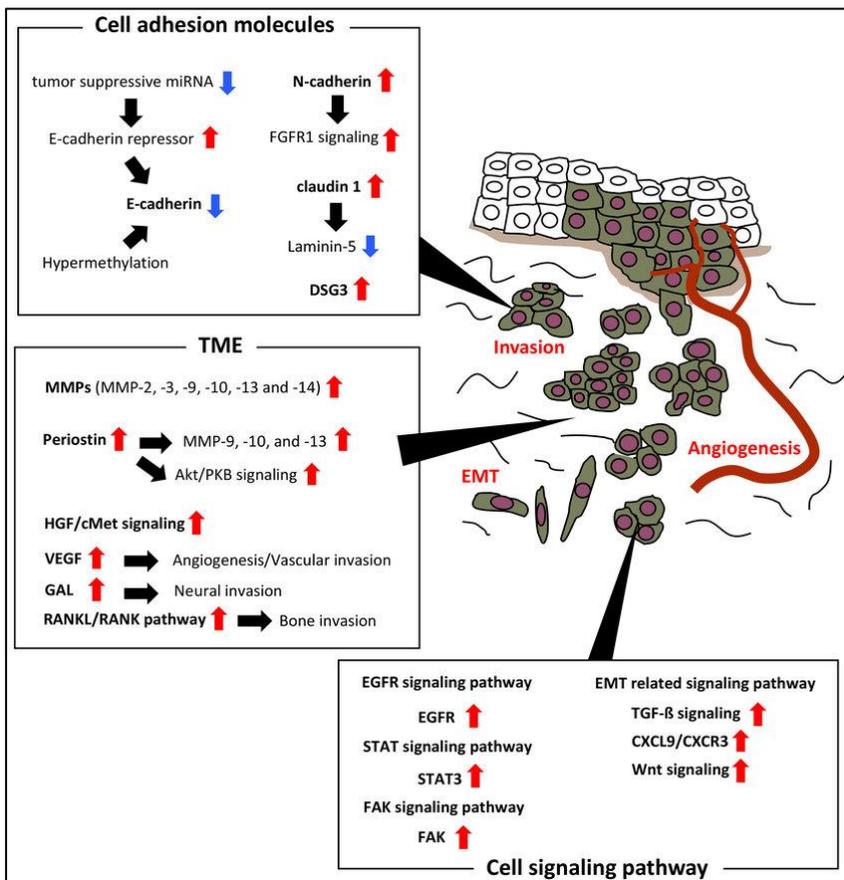
A medida que el tumor progresa dentro del epitelio, ocurren cambios en el estroma subyacente, como el aumento en el número de células y su rigidez. Posteriormente la comunicación entre las células tumorales y del estroma a través de la MB, producen su invasión y ruptura por medio de los siguientes mecanismos: (i) degradación proteolítica por metaloproteinasa de matriz y serina proteasa separasa; (ii) fuerzas mecánicas; y (iii) síntesis reducida o anormal de componentes de la MB <sup>70</sup>.

No se puede olvidar que las células tumorales están inmersas en un microambiente tumoral, compuesto por células no cancerosas, matriz extracelular y numerosos factores solubles. La investigación y la terapéutica en cáncer oral se ha centrado principalmente en la masa de células cancerosas, sin embargo, cada vez está más claro que la interacción entre las células cancerosas y el TME es dinámica, y trabajan en forma conjunta para promover el inicio, crecimiento, invasión y metástasis. Cuando hablamos de células no cancerosas del TME, nos referimos tanto a microorganismos como a células del sistema inmune (leucocitos, células dendríticas, macrófagos), fibroblastos, pericitos y células endoteliales, incluso a neuronas y adipocitos. Estas células adquieren roles anti-tumorales o pro-tumorales dependiendo del perfil de factores solubles que secreten y de su efecto autocrino y paracrino <sup>71,72</sup>.

Algunos de los factores liberados del TME que promueven la invasión son las MMP, la periostina, los factores de crecimiento de hepatocitos (HGF) y endotelial vascular (VEGF), y la galanina (GAL). Del mismo modo, los procesos de comunicación que gobiernan todas las actividades celulares necesarias para la invasión del OSCC, ocurren a través de la activación de las vías de señalización del ligando del receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$ B (RANKL) / RANK, del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), del transductor de señal y activador de la

transcripción (STAT) y de la quinasa de adhesión focal (FAK) (Figura 4). Sin embargo, hasta ahora se han identificado numerosas moléculas relacionadas con la invasión del OSCC, pero el mecanismo exacto aún está por aclararse. Se necesita identificar entre tantos factores cuales pueden ser blancos específicos para el tratamiento que permitan inhibir la invasión y la metástasis <sup>70</sup>.

Figura 4 - Moléculas de invasión en el cáncer oral.



“Moléculas relacionadas con la invasión en el OSCC. La figura muestra moléculas de adhesión celular relacionadas con la invasión y moléculas relacionadas con la invasión en un microambiente tumoral, y una vía de señalización celular en OSCC. Las flechas rojas muestran sobreexpresión en OSCC. Las flechas azules muestran regulación negativa en OSCC”.

Fuente: Invasion-related factors as potential diagnostic and therapeutic targets in oral squamous cell carcinoma-A review <sup>70</sup> (traducción nuestra).

### 3.7 Biomarcadores Pronósticos en Cáncer Oral

En el año 2015, la U.S. FDA y los National Institutes of Health (NIH) desarrollaron el BEST resource (Biomarkers, EndpointS, and other Tools), como un glosario cuyo objetivo era capturar las distinciones entre los biomarcadores y las evaluaciones clínicas, y describir sus distintos roles en la investigación biomédica, la práctica clínica y el desarrollo de productos médicos. En su última actualización en 2018, definen un *Biomarcador Pronóstico* como: "Un biomarcador utilizado para identificar la probabilidad de un evento clínico, recurrencia o progresión de la enfermedad en pacientes que tienen la enfermedad o condición médica de interés". Mientras que, un *Biomarcador Predictivo*, es definido como: "Un biomarcador utilizado para identificar a las personas que son más propensas que las personas similares sin el biomarcador, a experimentar un efecto favorable o desfavorable de la exposición a un producto médico o un agente ambiental " <sup>73</sup>. Ambas características son deseables en un biomarcador para cáncer.

Los biomarcadores tumorales son moléculas producidas o por el tumor o por el tejido hospedero circundante en respuesta a la carcinogénesis, y pueden tener aplicabilidad en la evaluación del riesgo de cáncer, diagnóstico y estadiaje, pronóstico y elección terapéutica <sup>74</sup>.

En oncología, los marcadores patológicos como tamaño del tumor, número de ganglios linfáticos positivos y presencia de metástasis se han utilizado tradicionalmente para indicar el pronóstico. Estos biomarcadores pronósticos a menudo se identifican a partir de datos observacionales y se usan regularmente para identificar a los pacientes con más probabilidades de tener un resultado particular. Cada vez más, los indicadores o las firmas moleculares medidas en tumores se están utilizando en lugar de, o además de, estas características clínico-patológicas <sup>73</sup>.

En el presente estudio, nos enfocamos en biomarcadores tumorales de dos de las alteraciones esenciales del cáncer: la insensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento y la invasión tisular y la metástasis. Almangush et al. <sup>8</sup> (2017) en su revisión sistemática, reportaron los biomarcadores Ki-67, E-cadherina, MMP-9 y  $\alpha$ -SMA como parte de los 10 más estudiados por su valor pronóstico en OTSCC.

Ki-67 es una proteína nuclear que puede detectarse durante todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y M), pero está ausente en las células en reposo

(G0) <sup>75</sup>. Ha sido estudiado ampliamente para evaluar la actividad de proliferación celular en varios tipos de cáncer y usado como marcador de agresividad tumoral <sup>76-78</sup>. Ki 67 es el biomarcador más estudiado después de p53 en OTSCC, sin embargo, la gran heterogeneidad en los datos de los numerosos estudios impiden que exista la evidencia suficiente para considerar su valor como marcador pronóstico, a pesar de esto, evaluar biomarcadores conocidos puede ayudar a validar los datos publicados anteriormente y permite la acumulación de mayor evidencia respecto a ellos <sup>8</sup>. En la literatura científica hay resultados controversiales a favor <sup>74,79,80</sup> y en contra <sup>81-84</sup> de su utilidad pronóstica en OSCC y OTSCC.

La E-cadherina es una glicoproteína transmembrana dependiente de  $Ca^{2+}$  que hace parte de las uniones adherentes de la superficie lateral de las células epiteliales. Su expresión se ha relacionado con funciones celulares tales como, la reducción de la invasividad, la inhibición del crecimiento, la apoptosis, la detención del ciclo celular y la diferenciación <sup>85</sup>. Ha sido catalogada como uno de los candidatos más promisorios para el diagnóstico temprano y el pronóstico del OTSCC, identificados en biopsia de tejidos por medio de inmunohistoquímica <sup>86</sup>.

Una de las células más representativas y estudiadas del estroma en cáncer oral y de lengua es el fibroblasto. Las células cancerosas liberan Factor de Crecimiento Transformante beta ( $TGF-\beta$ ) y de esa manera los fibroblastos adquieren un fenotipo activado denominado fibroblasto asociado a cáncer, fibroblasto asociado a tumor, fibroblasto peritumoral, miofibroblasto, entre otros. El marcador más usado y confiable para identificar CAF es el anticuerpo Actina de Músculo Liso alfa <sup>71,72,87,88</sup>. Su presencia se ha asociado con características clinicopatológicas como estadio y grado del tumor, recurrencia, invasión (vascular, linfática y neural) y diseminación extranodal, además de la disminución de la supervivencia libre de enfermedad y la pobre supervivencia total en pacientes con OSCC <sup>88</sup>.

Además de servir como marcador para CAF, el anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -SMA se ha utilizado para la detección de vasos sanguíneos y linfáticos en carcinoma gastrointestinal <sup>89</sup>, adenocarcinoma gástrico <sup>90</sup>, carcinoma mamario <sup>91</sup>, carcinoma escamocelular de labio <sup>92</sup>, donde permite la identificación pericitos y células musculares lisas.

Las metaloproteinasas de la matriz son una familia de enzimas proteolíticas dependientes de  $Zn^{++}$  de al menos 24 miembros en los seres humanos, encargadas de la remodelación de los componentes de la matriz extracelular, incluyendo la

membrana basal; además, cumplen un papel fundamental en los procesos fisiológicos del desarrollo embrionario y la cicatrización de heridas. Según su estructura y el sustrato específico se dividen en seis grupos: colagenasas, gelatinasas, estromelisininas, matrilisininas, transmembrana y otras<sup>93</sup>. En cáncer, las MMP pueden originarse tanto de células tumorales como del estroma<sup>94,95</sup>. La sobreexpresión de algunas de ellas (MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-11) está involucrada en la proliferación, angiogénesis desregulada, inflamación, destrucción celular, invasión tumoral y metástasis, se ha sugerido que incluso pueden estar implicadas en casi todas las capacidades esenciales del cáncer (*Hallmarks*)<sup>95,96</sup>.

La MMP-9 o gelatinasa-B, remodela el colágeno (tipo IV, V, VII, X, XIV), agrecano, elastina, fibronectina y gelatina, algunos de ellos componentes esenciales de la membrana basal; es una de las isoformas que se reporta como las proteasas más comúnmente desreguladas y es un biomarcador potencial en cáncer. Diversos estudios han reportado alta expresión de MMP-9 en pacientes con OSCC<sup>97-101</sup>, además de correlación con el sitio anatómico, el tamaño del tumor y el estadio clínico<sup>83</sup>. En OTSCC en estadios tempranos, se ha reportado para MMP-9 una sensibilidad del 100% y especificidad del 83.0% para recidiva tumoral, y para metástasis los valores fueron 88.9% y 88.0% respectivamente. En este estudio de Aparna et al. concluyen que, la combinación del estadio clínico con la expresión de MMP-9 podría ser útil para predecir el resultado y el pronóstico post-terapéutico de estos pacientes<sup>101</sup>.

## **4 MATERIAL Y MÉTODO**

La metodología utilizada en este estudio se detalla a continuación.

### **4.1 Enfoque Metodológico**

Se realizó un estudio de supervivencia de pacientes con OTSCC.

### **4.2 Población y Muestra**

Durante el periodo 2008 a 2017, asistieron aproximadamente 300 pacientes diagnosticados con OTSCC al IDC Clínica Las Américas de la ciudad de Medellín para tratamiento oncológico quirúrgico o adyuvante, de estos, 80 casos cumplieron con los criterios de inclusión (Figura 5).

### **4.3 Criterio de Inclusión y Exclusión**

Los criterios de inclusión y exclusión fueron los siguientes.

#### **4.3.1 Inclusión**

- Pacientes con diagnóstico de carcinoma escamocelular oral en lengua como tumor primario y tratados en el Instituto de Cancerología Clínica Las Américas durante el período 2008 a 2017.
- Pacientes con historia clínica, lámina histopatológica y espécimen quirúrgico (embebido en bloque de parafina) disponibles. La historia clínica, además, debía contar como mínimo con los datos de sexo, edad, tratamiento recibido y tiempo de seguimiento.
- Pacientes que tuvieron como mínimo una evolución de seguimiento en la historia clínica después del tratamiento quirúrgico.

### 4.3.2 Exclusión

- Diagnóstico diferente a OSCC, cuando los dos patólogos del equipo investigador revisaron nuevamente los hallazgos histopatológicos.
- Carcinoma escamocelular de tipo verrucoso.
- Ausencia de tumor en el bloque de parafina.

Figura 5 - Casos incluidos en el estudio.

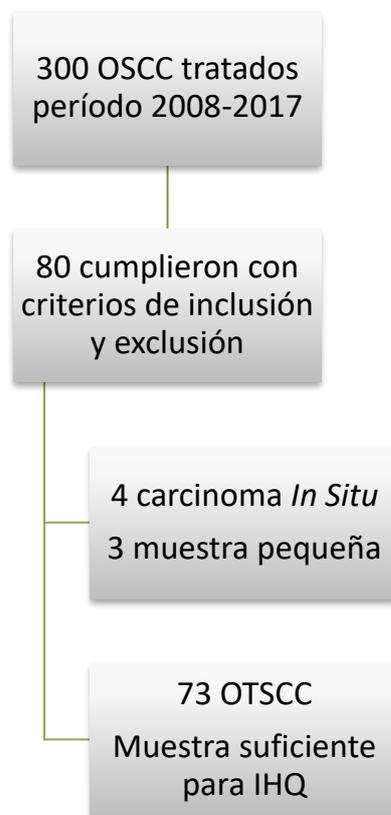


Diagrama de flujo de los casos de OTSCC incluidos en el estudio.

Fuente: Elaboración propia

### 4.4 Instrumento de Recolección de la Información

La información obtenida de las 80 historias clínicas incluidas y de sus respectivos reportes de patología, se digitalizó en una hoja de cálculo utilizando el programa Excel para la construcción de la base de datos.

## 4.5 Proceso de Recolección de la información

El proceso de recolección de la información se realizó como sigue.

### 4.5.1 Fuentes de información primaria

- Análisis histopatológico: se identificó la región tumoral más profunda de invasión (frente de invasión) en las láminas histopatológicas (coloreadas con H&E) y se realizó un análisis específico del grado de diferenciación histológica presente en esta región, el tipo y la intensidad del infiltrado inflamatorio, la presencia de invasión linfovascular y la presencia de invasión perineural.

- Análisis de la expresión de los biomarcadores: se procesaron las muestras por medio de inmunohistoquímica para determinar la expresión de los marcadores moleculares E-cadherina,  $\alpha$ -SMA, Ki-67 y MMP-9 en el frente de invasión. La marcación con S100 fue realizada para mejorar la identificación de la PNI. Del mismo modo, la marcación  $\alpha$ -SMA se usó para identificar la LVI, además, para este último biomarcador, también se realizó el análisis de su expresión intratumoral.

### 4.5.2 Fuentes de información secundaria

- Historia clínica: se recolectaron todos los datos sociodemográficos, de estilo de vida, clínicos y de seguimiento consignados en la historia clínica.

- Reporte histopatológico: se recolectó toda la información consignada en el informe histopatológico del análisis de rutina del espécimen quirúrgico, realizado según el protocolo del *College of American Pathologists*<sup>102</sup>, llevado a cabo en el laboratorio de patología del IDC Clínica Las Américas.

### 4.5.3 Variables

Se evaluaron las siguientes características sociodemográficas y de estilo de vida: sexo, edad, lugar de procedencia, estado civil, consumo de tabaco y alcohol.

Se consignó también, el tiempo de seguimiento total en meses, el tiempo transcurrido entre el diagnóstico inicial con biopsia y el tratamiento quirúrgico, y el estado final del seguimiento del paciente. Se definieron como casos no censurados aquellos que presentaron el evento de muerte o recaída asociadas al OTSCC, mientras que los casos censurados fueron aquellos que no presentaron dicho evento

durante el tiempo de seguimiento, los que se perdieron durante el seguimiento o que murieron por otra causa diferente al OTSCC.

De las características clínicas e histopatológicas se evaluaron: localización del tumor, estadio clínico, tratamiento recibido (cirugía, radioterapia, quimioterapia), tipo de procedimiento quirúrgico (resección local, glosectomía parcial y total), disección ganglionar, tamaño y espesor del tumor, grado de diferenciación, compromiso de los márgenes quirúrgicos y de los nódulos linfáticos, clasificación TNM; LVI, PNI e invasión ósea; intensidad y tipo de infiltrado inflamatorio.

El grado de diferenciación en el frente de invasión fue determinado según lo descrito por Bryne et al.<sup>103</sup>. Brevemente, se evaluaron las características histológicas grado de queratinización, polimorfismo nuclear, número de mitosis, patrón de invasión e infiltración linfoplasmocítica. Se asignó un puntaje de 1 a 4 para cada una de las características mencionadas y luego se sumaron los valores para un puntaje final. Un puntaje entre 4-8 se definió como un tumor bien diferenciado, entre 9-12 moderadamente diferenciado y entre 13-16 pobremente diferenciado.

Tanto la LVI como la PNI, fueron evaluadas inicialmente, mediante observación microscópica (H&E) y posteriormente con inmunotinción. La LVI se definió como la presencia de células neoplásicas en la pared o en la luz de vasos sanguíneos o linfáticos<sup>104</sup>. Al analizar las láminas coloreadas con H&E, la LVI en el frente de invasión se describió como mínima y marcada. Sin embargo, la evaluación con la inmunotinción para  $\alpha$ -SMA permitió una mejor visualización de las estructuras vasculares, por lo tanto, la LVI fue clasificada de la siguiente manera, adaptando lo descrito para la PNI: presente cuando se detectaron células tumorales en la capa íntima de los vasos (intraneural), y se consideró ausente, cuando la invasión sólo comprometió  $\geq 33\%$  de la circunferencia vascular, la circunferencia total vascular o las capas adventicia o media.

La PNI se definió como la presencia de células tumorales dentro de cualquiera de las tres capas de la vaina nerviosa (epineuro, perineuro, endoneuro), o la presencia de un foco tumoral rodeando un tercio o más de la circunferencia del nervio<sup>65</sup>. La PNI en el frente de invasión fue subdividida en tres patrones: intraneural,  $\geq 33\%$  de la circunferencia nerviosa y circunferencia completa nerviosa<sup>63</sup>. Por último, se determinó la presencia y patrón de la PNI con inmunotinción con S100.

Finalmente se analizó el porcentaje de células positivas y la intensidad de la inmunotinción de los biomarcadores Ki-67, E-cadherina, MMP-9 y  $\alpha$ -SMA.

#### 4.6 Control de Errores y Sesgos

El sesgo de selección se intentó controlar aplicando los criterios de inclusión y exclusión a todos los casos.

Debido al uso de una fuente de información secundaria, se definieron unos datos mínimos que debía contener la historia clínica y el reporte histopatológico original, para lo cual se construyó un formato de recolección de información utilizando el programa Excel. Además, se contó con la colaboración de los médicos tratantes de la institución para resolver dudas respecto a la información consignada, ya que muchas de las historias estaban en medio físico.

En cuanto al sesgo del observador, el patólogo oral (CRA) estuvo cegado respecto a los hallazgos histopatológicos y al estadio clínico reportados en el informe original, durante el proceso de revisión de los casos. Aquellos casos en donde existieron dudas respecto a los hallazgos histopatológicos fueron discutidos con un segundo patólogo participante en el estudio (CSO), hasta llegar a un acuerdo. Además, se evaluó la concordancia intra-evaluador de la identificación de la invasión perineural entre dos tipos de análisis (H&E e inmunotinción con S100) realizada por un mismo patólogo por medio del coeficiente de Kappa.

Para el sesgo del instrumento, todas las pruebas de laboratorio fueron estandarizadas previo a la realización del estudio. Se incluyeron controles positivos y negativos para cada anticuerpo utilizado en todas las baterías de reacción. Se utilizaron áreas de epitelio de mucosa normal como control para la marcación de E-cadherina. Se usó un área de invasión de carcinoma escamocelular para el control positivo de la expresión de MMP-9, junto con el infiltrado inflamatorio asociado. Del mismo modo, la marcación con  $\alpha$ -SMA, solo que, en este caso los vasos sanguíneos y el infiltrado inflamatorio proporcionaron un control adecuado de la marcación, ya que, en caso de marcación de las células inflamatorias, demostraría la necesidad de reducir la concentración del anticuerpo primario. Para Ki-67 también se utilizó un carcinoma escamocelular. Se utilizaron haces nerviosos en el tejido proveniente de la biopsia como control positivo para S100.

Por otro lado, los controles negativos se realizaron con la supresión del anticuerpo primario que fue sustituido por albúmina de suero bovino (BSA).

Es importante tener en cuenta, que se realizó un control riguroso del tiempo de la exposición al DAB. Para S100, el tiempo fue de 2 minutos, para  $\alpha$ -SMA el tiempo fue de 1 minuto y 44 segundos, para Ki67 el tiempo fue de 1 minuto y 11 segundos, para E-cadherina el tiempo fue de 1 minuto y 30 segundos, y para MMP-9 el tiempo fue de 1 minuto y 37 segundos.

#### **4.7 Protocolo de Laboratorio**

Se realizó el siguiente protocolo de laboratorio.

##### **4.7.1 Equipamientos**

Micrótomo - American Optical 820; láminas descartables de perfil alto – Leica 818; casetes para histología – Inlab; olla a presión.

##### **4.7.2 Inmunohistoquímica**

Para esta evaluación se contó con los bloques que tuvieron dos o más bloques de parafina con tejido tumoral, en total se procesaron 73 de los 80 casos incluidos. Los bloques de parafina fueron procesados en el laboratorio de estomatopatología de la Facultad de Odontología de Araraquara y en el laboratorio de citología.

Se obtuvieron cortes de 4  $\mu$ m de las muestras de OTSCC, en láminas silanizadas y fueron marcados con los anticuerpos primarios E-cadherina,  $\alpha$ -SMA, Ki-67, MMP-9 y S100.

Los cortes histológicos de las muestras de OTSCC fueron desparafinizados en estufa a 60 grados por una hora, seguidos de tres baños de 3 minutos cada uno en xilol 100% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), posteriormente, fueron rehidratados en soluciones decrecientes de xilol disuelto en alcohol (Mallinckrodt® Chemicals, St. Louis, MO, EUA) seguidos de soluciones decrecientes de alcohol diluido en agua destilada. Posteriormente, se realizó la recuperación de antígenos con tampón citrato 10mM, pH 6,0 (Dako, Dinamarca) bajo calor húmedo en una olla presión (95°C).

Luego, se realizó la inactivación de la peroxidasa endógena. Para ello, los cortes fueron expuestos a peróxido de hidrógeno al 3% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) preparado en buffer salino fosfato (PBS) 1X. Para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos primarios, los cortes fueron tratados con suero de cabra al 1% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) a temperatura ambiente por una hora.

Para los anticuerpos anti-Ki67, anti-E-cadherina, anti-alfa músculo liso, anti-MMP-9 y anti-S100 se muestra la información y diluciones utilizadas en el Cuadro 3. Para todos los anticuerpos, se realizó una marcación durante la noche (overnight) a 4°C. La dilución de los anticuerpos anti-Ki67, anti-E-cadherina, anti-alfa músculo liso, anti-MMP-9 y anti-S100 se hizo en albúmina de suero bovino al 1% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) en PBS 1X.

Después de esta fase, los cortes fueron lavados tres veces en solución de PBS 1X y la incubación con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, fue realizada por 30 minutos en estufa a 37°C, diluido 1:150 en BSA al 1% en PBS. Se utilizó el anticuerpo secundario micropolímero HRP (goat anti-rabbit IgG).

Después de la marcación con el anticuerpo secundario, se realizó la reacción con el cromógeno 3,3'-diaminobenzindina tetrahidrocloruro (DAB, Amresco®, Solon, OH, USA) y peróxido de hidrógeno al 3%. Los cortes fueron contra-coloreados con Hematoxilina de Meyer (Thermo Fisher Scientific, Suwanee, GA, USA), deshidratados con concentraciones crecientes de alcohol (Novalab), y montados en Shandon Consul (Thermo Fisher Scientific, Suwanee, GA, USA). Los controles negativos se realizaron con la supresión del anticuerpo primario que fue sustituido por BSA al 1% en PBS.

**Cuadro 3** - Fuentes de los anticuerpos y diluciones utilizadas para el análisis de inmunohistoquímica.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Tipo y dilución</b>	<b>Fuente</b>
<b>Ki-67</b>	Mouse monoclonal, IgG2b (1:100)	Anti-Ki67 antibody [MKI67/2462]. ABCAM (ab238019)
<b>S100</b>	Mouse monoclonal, IgG2a (1:100)	Anti-S100 antibody [4C4.9]. ABCAM (ab4066)
<b>MMP-9</b>	Mouse monoclonal, IgG2a (1:200)	Anti-MMP9 antibody [5G3]. ABCAM (ab119906)
<b>E-cadherina</b>	Mouse monoclonal, IgG1 (1:100)	Anti-E Cadherin antibody [HECD-1]. ABCAM (ab1416)
<b>α-SMA</b>	Mouse monoclonal, IgG2a (1:1600)	Anti-alpha smooth muscle Actin antibody [1A4]. ABCAM (ab7817)

Nota: El marcador α-SMA inicialmente mostró marcación inespecífica en células inflamatorias. Después de investigar el origen de esa marcación, se encontró que podía resolverse por medio de mayor dilución del anticuerpo primario. Por lo tanto, se identificó una dilución ideal de 1:1600.

Fuente: Elaboración propia

#### 4.7.3 Criterios para la cuantificación de la positividad

El análisis de la expresión inmunohistoquímica se realizó utilizando los parámetros de cantidad (Q) e intensidad (I) (Cuadro 4). El puntaje de marcación final se obtuvo por medio de la multiplicación de cantidad por intensidad ( $P = Q \times I$ ), que corresponde al sistema de puntuación rápida desarrollado por Detre et al. para cuantificar la inmunohistoquímica <sup>105</sup>, arrojando un puntaje de marcación en un rango de 1 – 12, donde se estableció la marcación negativa (0), leve (1 - 4), moderada (5 - 8) e intensa (9 - 12). Para el análisis estadístico de la sobrevida (DSS), la inmunoreactividad fue dividida en tres grupos de acuerdo con el puntaje final: reactividad negativa para el puntaje de 0, reactividad leve con un valor de corte por debajo de la mediana, y reactividad moderada a intensa por encima de la mediana, lo cual permitió la distribución equilibrada de los casos <sup>83</sup>.

**Cuadro 4** - Parámetros para los análisis de inmunohistoquímica.

<b>Puntaje</b>	<b>0</b>	<b>1+</b>	<b>2+</b>	<b>3+</b>	<b>4+</b>
<b>Cantidad (Q)</b>					
<b>Células Positivas</b>	≤10%	11-25%	26-50%	51-75%	>75%
<b>Puntaje</b>	<b>0</b>	<b>1+</b>	<b>2+</b>	<b>3+</b>	
<b>Intensidad (I)</b>					
<b>Células Positivas</b>	Sin marcación	Débilmente marcado	Moderadamente marcado	Fuertemente marcado	

Fuente: Elaboración propia

## 4.8 Análisis Estadístico

Los resultados fueron analizados con el programa estadístico IBM-SPSS® versión 21. Las características sociodemográficas, clínicas e histopatológicas de los pacientes con diagnóstico de OTSCC se resumieron con estadística descriptiva. Para las variables cuantitativas se utilizó el promedio o la mediana y el intervalo de confianza del 95% o el rango intercuartil, según fuera el caso, y para las variables cualitativas las frecuencias relativas expresadas de forma porcentual. Para el análisis estadístico se agruparon los diversos estados civiles (soltero, casado, divorciado, viudo, unión libre) en dos grupos (con y sin pareja), para que no quedaran algunas categorías con pocos datos. Del mismo modo se agrupó la variable edad en dos grupos de interés (mayores y menores de 60 años, y mayores y menores de 45 años).

Se evaluó la concordancia intra-evaluador de la identificación de la invasión perineural entre dos técnicas (H&E e inmunotinción con S100) realizada por un mismo patólogo por medio del coeficiente de Kappa. El diagnóstico de OTSCC fue definido por dos patólogos (Patólogos de la Clínica Las Américas y CRA), las discrepancias fueron resueltas por un tercer patólogo (CSO).

Se calculó el tiempo promedio y la mediana de la sobrevida después del diagnóstico del OTSCC, utilizando el análisis de sobrevida de Kaplan Meier en forma general y para cada variable de interés. La supervivencia específica de la enfermedad (Disease-Specific Survival) se calculó desde la fecha del diagnóstico inicial, hasta la fecha de la muerte asociada con el OTSCC, hasta la recurrencia/metástasis local, regional o a distancia de la enfermedad, o hasta la fecha del último seguimiento.

Para comparar las curvas de sobrevida se utilizaron el análisis de log rank o, en su defecto, la prueba de Breslow. Se utilizó la prueba  $X^2$  de Pearson o en su defecto la prueba exacta de Fisher para evaluar la asociación de las variables cualitativas respecto a la variable estado final del seguimiento del paciente. Las variables cualitativas y cuantitativas con valores de  $p < 0,20$  en el análisis univariado (Hazard Ratio), fueron incluidas para el análisis multivariado (Modelo de riesgos proporcionales de Cox) con el cual se estimó la función de supervivencia acumulada de los pacientes, a través del cual se identificaron los factores que probablemente afectaron la sobrevida al OTSCC en este estudio. Se asumió un nivel de significancia  $< 0,05$  para todas las pruebas estadísticas. Todos los resultados obtenidos son presentados mediante tablas de resumen y gráficos de sobrevida acumulada.

#### **4.9 Consideraciones Éticas**

El presente proyecto de investigación fue presentado y aprobado por los comités de ética de todas las instituciones involucradas (Universidad CES, IDC Clínica Las Américas) (ANEXOS).

El proyecto de investigación descrito se ajustó a lo estipulado en la Declaración de Helsinki, así como a lo especificado en la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos, proclamada por la UNESCO. Además, el punto 32 de la declaración de Helsinki menciona que en situaciones en las que sea impracticable obtener el consentimiento la investigación puede ser considerada y aprobada por un comité de ética de investigación.

De acuerdo con el artículo 11 de la Resolución 8430 de 1993 expedida por el Ministerio de Salud de la República de Colombia, por la cual se establecen las normas académicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, este estudio fue considerado “sin riesgo”, por tanto, se dispensó la aplicación del consentimiento informado, el estudio siguió las disposiciones determinadas en la totalidad de los artículos (5 al 16) del Título II “de la investigación en seres humanos”. En efecto, durante la ejecución del proyecto de investigación, prevaleció el respeto a la confidencialidad y anonimato de los individuos de los cuales se obtuvieron las muestras incluidas en el estudio, omitiendo cualquier dato que permitiera identificarlos en el momento de la divulgación de los resultados. Del mismo modo, la información proveniente de estos se manejó de manera responsable y sólo con fines científicos.

## 5 RESULTADOS

Los siguientes fueron los resultados encontrados.

### 5.1 Descripción Sociodemográfica y Clínica

Se incluyeron 80 pacientes con diagnóstico de carcinoma escamocelular oral en lengua entre el periodo de años 2008 y 2017 en el IDC Clínica Las Américas, con un rango de edad que osciló entre 23 y 95 años con un promedio de  $63,1 \pm 16$  años, el 50% de los pacientes tenían una edad entre 51 y 75 años, un 11,3% tenían 45 años o menos. La mayoría fueron hombres (55%), tenían pareja al momento del diagnóstico (59,6%), y el 40% procedían del área metropolitana del Valle de Aburrá. El 65,1% eran fumadores o exfumadores y el 13,8% consumían alcohol. Además, el 12,5% tenían simultáneamente ambos hábitos.

El 57,5% de todos los tumores comprometieron la porción móvil de la lengua. Todos los pacientes recibieron tratamiento quirúrgico, predominantemente glosectomía parcial (65%), mientras que al 83,8% se le realizó disección ganglionar. El 41,3% recibió, además de la cirugía, radioterapia postoperatoria con dosis promedio de  $57,2 \pm 14$  Gray (un 50% recibió entre 50 y 66 Gray). En cuanto al estadio clínico, el 5% fueron diagnosticados en estadio 0, el 41,3% en estadios tempranos (0, I, II) y el 58,8% en estadios avanzados (III, IV). De todas las variables sociodemográficas y clínicas el estado civil con pareja, el estadio clínico avanzado, la localización del tumor en la base de la lengua, la glosectomía como procedimiento quirúrgico y la disección cervical tuvieron asociación con peor pronóstico (muerte o recaída OTSCC) (Tabla 1).

El tiempo de seguimiento total varió entre 2,3 y 130,2 meses con un promedio de  $27,1 \pm 25,4$  meses (la mediana fue de 15,6 meses, con un rango entre 9,4 - 44,3 meses). El tiempo de seguimiento fue mayor de 5 años sólo en 8 pacientes (10%). El tiempo promedio transcurrido entre el diagnóstico de OTSCC y el tratamiento quirúrgico varió entre 0 y 14,2 meses con un promedio de  $3,5 \pm 2,5$  meses (la mediana fue de 2,9 meses, con un rango entre 2,1 - 4,0 meses).

El 43,8% de los pacientes presentaron el evento (muerte asociada al OTSCC 36,3% o recaída 7,5%), con lo que se obtuvo un porcentaje de censura del 56,2% (16,2% no presentaron el evento y se encontraban en buenas condiciones, 8,8%

murieron por causas diferentes al OTSCC, y el 31,2% se perdieron durante el tiempo de seguimiento).

**Tabla 1** - Características sociodemográficas y clínicas, y asociación con muerte o recaída de los pacientes con OTSCC, IDC Clínica Las Américas, Medellín, 2008-2017.

Variables	Categorías	n (%)	<sup>a</sup> Evento n (%)	Valor p* X <sup>2</sup>
<b>Sexo</b>	Masculino	44 (55)	19 (43,2)	0,910
	Femenino	36 (45)	16 (44,4)	
<b>Edad 1</b>	< 60 años	33 (41,3)	14 (42,4)	0,841
	≥ 60 años	47 (58,8)	21 (44,7)	
<b>Edad 2</b>	≤ 45 años	9 (11,3)	3 (33,3)	0,504
	> 45 años	71 (88,8)	32 (45,1)	
<b>Estado civil</b>	Con pareja	34 (59,6)	21 (61,8)	<b>0,020*</b>
	Sin pareja	23 (40,4)	7 (30,4)	
	Desconocido	23 (28,8)	7 (30,4)	
<b>Procedencia</b>	Valle Aburrá	32 (40)	12 (37,5)	0,358
	Otros	48 (60)	23 (47,9)	
<b>Estadio AJCC</b>	<sup>b</sup> Temprano	33 (41,3)	6 (18,2)	<b>0,000*</b>
	<sup>c</sup> Avanzado	47 (58,8)	29 (61,7)	
<b>Localización lengua</b>	Móvil	46 (57,5)	14 (30,4)	<b>0,005*</b>
	Base	34 (42,5)	21 (61,8)	
	Cx	31 (38,8)	9 (29)	
<b>Tratamiento</b>	Cx + RT	33 (41,3)	17 (51,5)	0,103
	Cx + RT + QT	16 (20)	9 (56,3)	
	Resección local	12 (15)	2 (16,7)	
<b>Procedimiento Cx</b>	Glos. parcial	52 (65)	21 (40,4)	<b>0,006*</b>
	Glos. total	16 (20)	12 (75)	
	<b>Disección ganglionar</b>	Si	67 (83,8)	
No	13 (16,3)	2 (15,4)		

Abreviaturas: OTSCC, Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma; IDC, Instituto de Cancerología; X<sup>2</sup>, Chi-cuadrado; AJCC, American Joint Committee on Cancer; Cx, Cirugía; RT, Radioterapia; QT, Quimioterapia; Glos, Glosectomía.

<sup>a</sup>Evento: muerte o recaída asociadas a OTSCC.

<sup>b</sup>Estadio temprano: incluye 0, I, II

<sup>c</sup>Estadio avanzado: incluye III, IV

\* Valor de p <0,05

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 2 se muestran en detalle los tiempos de seguimiento total de acuerdo con el desenlace. Al hacer el análisis de rangos múltiples, las diferencias en el tiempo de seguimiento total en meses se presentaron únicamente entre los pacientes que murieron a causa del cáncer (promedio 15,5 meses de seguimiento) y los que no presentaron el evento o se perdieron durante el seguimiento (promedio 36,9 meses de seguimiento), con un valor de p=0,001.

**Tabla 2** - Tiempo de seguimiento total en meses de acuerdo con el desenlace de los pacientes con OTSCC, IDC Clínica Las Américas, Medellín, 2008-2017.

	n	Media	DE	IC 95%		Mínimo	Máximo
				Lím. Inf	Lím. Sup		
<b>Recaída</b>	4	32,4	20,3	0,6	64,7	13,1	50,0
<b>Metástasis</b>	4	19,1	15,4	-5,4	43,5	10,6	42,1
<b>Muerto por OTSCC</b>	26	15,9	15,8	9,5	22,21	3,3	69,6
<b>Muerte por otra causa</b>	8	20,4	22,8	1,3	39,4	2,3	73,1
<b>Sin evento</b>	17	49,5	33,1	32,5	66,54	10,9	130,2
<b>Perdido</b>	21	25,9	21,3	16,2	35,5	2,8	65,1
<b>Total</b>	80	27,1	25,4	21,4	32,7	2,3	130,2

Abreviaturas: OTSCC, Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma; IDC, Instituto de Cancerología; IC, Intervalo de Confianza; DE, Desviación Estándar.

Fuente: Elaboración propia

## 5.2 Descripción de las Características Histopatológicas

Con respecto a las características del tumor, su tamaño osciló entre 0,12 y 12 cm con un promedio de  $3,5 \pm 2,4$  cm (la mediana fue de 3 cm, con un rango entre 1,7 - 5 cm) y el espesor del tumor sólo fue reportado en el 36% de los informes, el cual varió entre 0,1 y 7 cm con un promedio de  $1,96 \pm 1,6$  cm (la mediana fue de 1,5 cm, con un rango entre 1,2 - 5 cm). El 63,5% de los casos de carcinoma escamocelular eran bien diferenciados y en el 35,5% de los casos los márgenes quirúrgicos estaban comprometidos. El 41,2% presentaron metástasis a nódulos linfáticos (30% con compromiso ganglionar unilateral y 11,2% bilateral), de los cuales un 42,4% presentaron extensión extranodal; sólo un caso presentó metástasis a distancia (1,3%). La invasión linfovascular se identificó en el 13,8% y la invasión perineural en el 45%.

De todas las variables histológicas el tamaño del tumor  $\geq 3$ cm, los márgenes quirúrgicos y nódulos linfáticos positivos, y la mayor clasificación T y N patológica, tuvieron asociación con un peor pronóstico (muerte o recaída OTSCC) (Tabla 3).

**Tabla 3 - Características tumorales y asociación con muerte o recaída de los pacientes con OTSCC, IDC Clínica Las Américas, Medellín, 2008-2017.**

Variables	Categorías	n (%)	<sup>a</sup> Evento n (%)	Valor p* X <sup>2</sup>
<b>Tamaño cm</b>	< 3	35 (46,7)	10 (28,6)	<b>0,006*</b>
	≥ 3	40 (53,3)	24 (60)	
<b>Márgenes comprometidos</b>	No	49 (64,5)	16 (32,7)	<b>0,011*</b>
	Si	27 (35,5)	17 (63)	
<b>Nódulos linfáticos</b>	N0	47 (58,8)	13 (27,7)	<b>0,001*</b>
	<sup>b</sup> N+	33 (41,2)	22 (66,7)	
<b>ENE</b>	ENE+	14 (42,4)	10 (71,4)	0,618
	ENE-	19 (57,6)	12 (63,2)	
<b>Grado diferenciación</b>	Bien	47 (63,5)	20 (42,6)	0,268
	Moderado	22 (29,7)	11 (50)	
	Pobre	5 (6,8)	4 (80)	
<b>Clasificación pT</b>	Tis	4 (5)	0 (0)	<b>0,035*</b>
	T1	19 (23,8)	6 (31,6)	
	T2	25 (31,3)	10 (40)	
	T3	19 (23,8)	9 (47,4)	
<b>Clasificación pN</b>	T4	13 (3,8)	10 (76,9)	<b>0,000*</b>
	N0	45 (56,3)	13 (28,9)	
	N1	8 (10)	2 (25)	
	<sup>c</sup> N2	26 (32,5)	19 (73,1)	
<b>Clasificación clínica M</b>	N3	1 (1,3)	1 (100)	0,243
	M0	74 (92,5)	31 (41,9)	
<b>LVI</b>	M1	1 (1,3)	1 (100)	0,335
	No	63 (78,8)	26 (41,3)	
<b>PNI</b>	Si	11 (13,8)	7 (63,6)	0,081
	Desconocido	6 (7,5)	2 (33,3)	
	No	34 (42,5)	10 (29,4)	
	Desconocido	10 (12,5)	5 (50)	

Abreviaturas: OTSCC, Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma; IDC, Instituto de Cancerología; X<sup>2</sup>, Chi-cuadrado; cm, centímetros; ENE, Extensión Extranodal; Tis, Tumor *in situ*; LVI, Invasión Linfovascular; PNI, Invasión Perineural

<sup>a</sup>Evento: muerte o recaída asociadas a OTSCC.

<sup>b</sup>N+ Incluye N1, N2b y c, N3

<sup>c</sup>N2 Incluye N2b y N2c

\*Valor de p <0,05

Fuente: Elaboración propia

Se realizó un análisis bivariado del compromiso de nódulos linfáticos con algunas variables de interés, encontrando asociación entre los nódulos positivos con el estadio clínico avanzado. Aunque no hubo asociación significativa, si se observó un mayor porcentaje de nódulos negativos en casos localizados en la porción móvil de la lengua, con tumor menor de 3 cm, bien diferenciados y sin márgenes quirúrgicos comprometidos (Tabla 4).

**Tabla 4** - Análisis bivariado de la metástasis nodal con variables clínicas e histopatológicas de los pacientes con OTSCC, IDC Clínica Las Américas, Medellín, 2008-2017.

Variables	Categorías	N+ n (%)	N- n (%)	Valor p* X <sup>2</sup>
<b>Estadio AJCC</b>	<sup>a</sup> Temprano	0 (0)	33 (70,2)	<b>0,000</b>
	<sup>b</sup> Avanzado	33 (100)	14 (29,8)	
<b>Localización lengua</b>	Móvil	17 (51,5)	29 (61,7)	0,364
	Base	16 (48,5)	18 (38,3)	
<b>Tamaño cm</b>	< 3	12 (36,4)	23 (54,8)	0,113
	≥ 3	21 (63,6)	19 (45,2)	
<b>Grado diferenciación (tumor)</b>	Pobre	2 (6,1)	3 (7,3)	0,263
	Moderado	13 (39,4)	9 (22)	
<b>Márgenes comprometidos</b>	No	18 (54,5)	29 (70,7)	0,078
	Si	17 (53,1)	32 (72,7)	

Abreviaturas: OTSCC, Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma; IDC, Instituto de Cancerología; N, Nódulos; X<sup>2</sup>, Chi-cuadrado; AJCC, American Joint Committee on Cancer.

<sup>a</sup>Estadio temprano: incluye 0, I, II

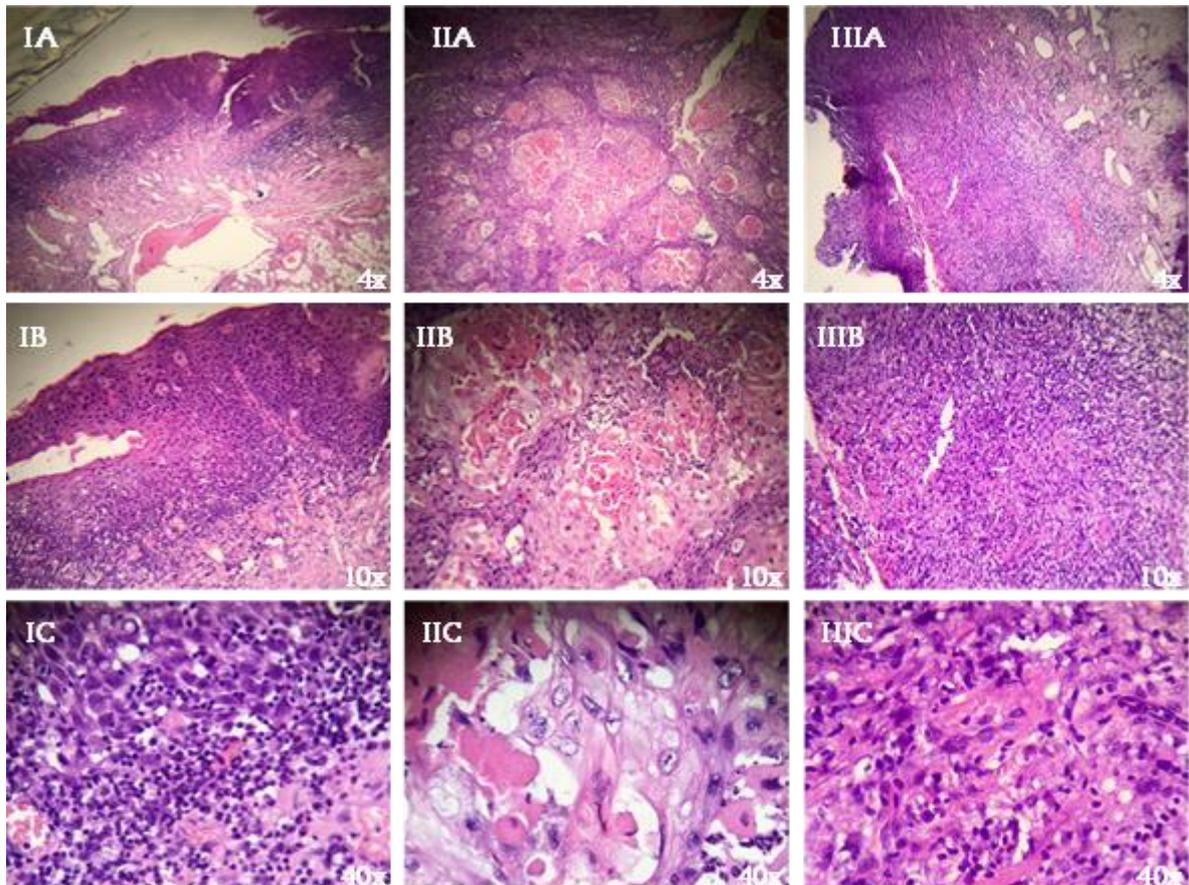
<sup>b</sup>Estadio avanzado: incluye III, IV

\*Valor de p <0,05

Fuente: Elaboración propia

Luego de realizar el análisis detallado del frente de invasión, se observaron algunos cambios en la clasificación del grado de diferenciación, respecto al inicialmente reportado en el informe (Figura 6). Esto debido a los diferentes sistemas de clasificación utilizados en los dos análisis (el propuesto por la World Health Organization y el descrito por Byne et al.<sup>103,106</sup> y a las dos localizaciones evaluadas (el tumor completo y el frente de invasión).

**Figura 6 -** Grado de diferenciación del OTSCC.

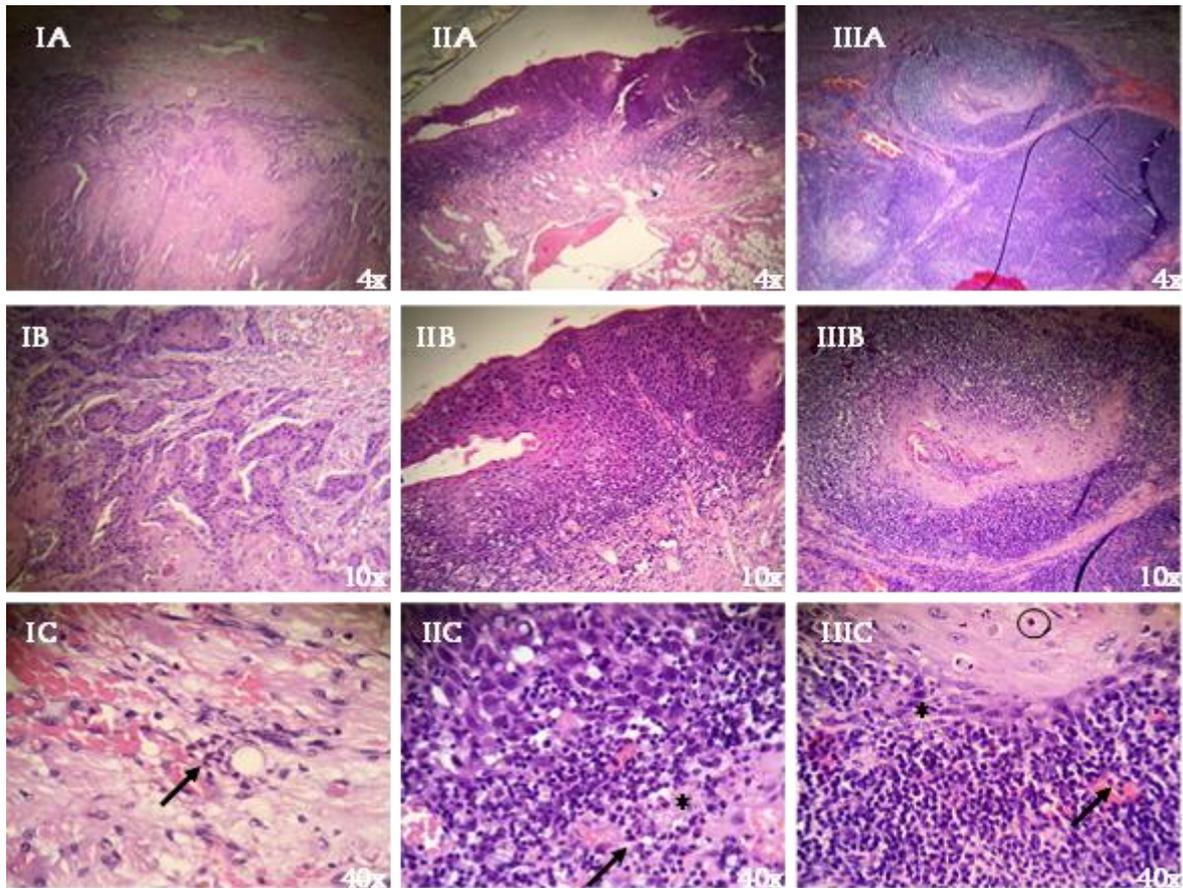


Grado de diferenciación del carcinoma escamocelular de lengua (Hematoxilina & Eosina): las figuras "I" muestran un carcinoma bien diferenciado, las figuras "II" muestran un carcinoma moderadamente diferenciado y las figuras "III" muestran un carcinoma pobremente diferenciado.

Fuente: Elaboración propia

La LVI no se identificó en la mayoría de los casos (90,4%), mientras que la detección de PNI aumentó visiblemente (78,1%), respecto a la reportada originalmente en el análisis histopatológico de rutina, con un patrón de invasión predominante de la circunferencia completa del nervio. En ningún caso se presentó invasión ósea. Al evaluar la intensidad del infiltrado inflamatorio, en el 91,8% de los tumores fue entre moderada y severa, con predominancia de células tipo neutrófilos y linfomononucleares (53,4%) (Figura 7). Se encontró asociación estadísticamente significativa entre el grado de diferenciación moderado y la presencia de PNI con peor pronóstico (muerte o recaída del OTSCC). Aunque no hubo asociación, si se observó un pronóstico desfavorable en aquellos con presencia de LVI y con una intensidad leve y moderada del infiltrado inflamatorio (Tabla 5).

**Figura 7 - Infiltrado inflamatorio del OTSCC.**



Infiltrado inflamatorio peritumoral (Hematoxilina & Eosina): las figuras "I" muestran un infiltrado inflamatorio leve, las figuras "II" muestran un infiltrado inflamatorio moderado y las figuras "III" muestran un infiltrado inflamatorio intenso. En IC, la flecha señala células polimorfonucleares. En IIC, la flecha señala un plasmocito y el asterisco una célula fagocitaria (macrófago). En IIIC, la flecha señala un polimorfonuclear (neutrófilo) y el asterisco una célula fagocitaria (macrófago). También es posible observar una célula apoptótica en medio de las células tumorales (círculo).

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 5** - Características tumorales en el frente de invasión y asociación con muerte o recaída de los pacientes con OTSCC, IDC Clínica Las Américas, Medellín, 2008-2017.

Variables	Categorías	n (%)	<sup>a</sup> Evento n (%)	Valor p* X <sup>2</sup>
<b>Grado diferenciación</b>	Bien	41 (57,7)	14 (34,1)	<b>0,004*</b>
	Moderado	28 (39,4)	20 (71,4)	
	Pobre	2 (2,8)	0 (0)	
<b>LVI</b>	No	66 (90,4)	30 (45,5)	0,422
	Si	7 (9,6)	4 (57,1)	
	Mínima	2 (2,7)	1 (50)	
	Marcada	5 (6,8)	3 (60)	
	No	16 (21,9)	4 (25)	
<b>PNI</b>	Si	57 (78,1)	30 (52,6)	<b>0,045*</b>
	≥33% circ.	13 (17,8)	8 (61,5)	
	Circ. completa	40 (54,8)	19 (47,5)	
	Intraneural	4 (5,5)	3 (75)	
<b>Intensidad Infiltrado Inflamatorio</b>	Leve	6 (8,2)	4 (66,7)	0,364
	Moderada	38 (52,1)	19 (50)	
	Severa	29 (39,7)	11 (37,9)	
<b>Tipo infiltrado</b>	PMN's + LMN's	39 (53,4)	19 (48,7)	0,694
	LMN's	34 (46,6)	15 (44,1)	

Abreviaturas: OTSCC, Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma; IDC, Instituto de Cancerología; X<sup>2</sup>, Chi-cuadrado; LVI, Invasión Linfovascular; PNI, Invasión Perineural; PMN's, Polimorfonucleares neutrófilos; LMN's, Linfomononucleares.

<sup>a</sup>Evento: muerte o recaída asociadas a OTSCC.

\*Valor de p <0,05

Fuente: Elaboración propia

### 5.3 Expresión de Marcadores Tisulares

Los patrones de expresión semicuantitativos de los biomarcadores en el frente de invasión, observados en los 73 casos de OTSCC están listados en la Tabla 6. E-cadherina fue expresada por el 100% de los tumores (Figura 8), Ki-67 por el 97,3% (Figura 9), MMP-9 por el 89% (Figura 10) y  $\alpha$ -SMA por el 64,4% (Figura 11) de los casos.

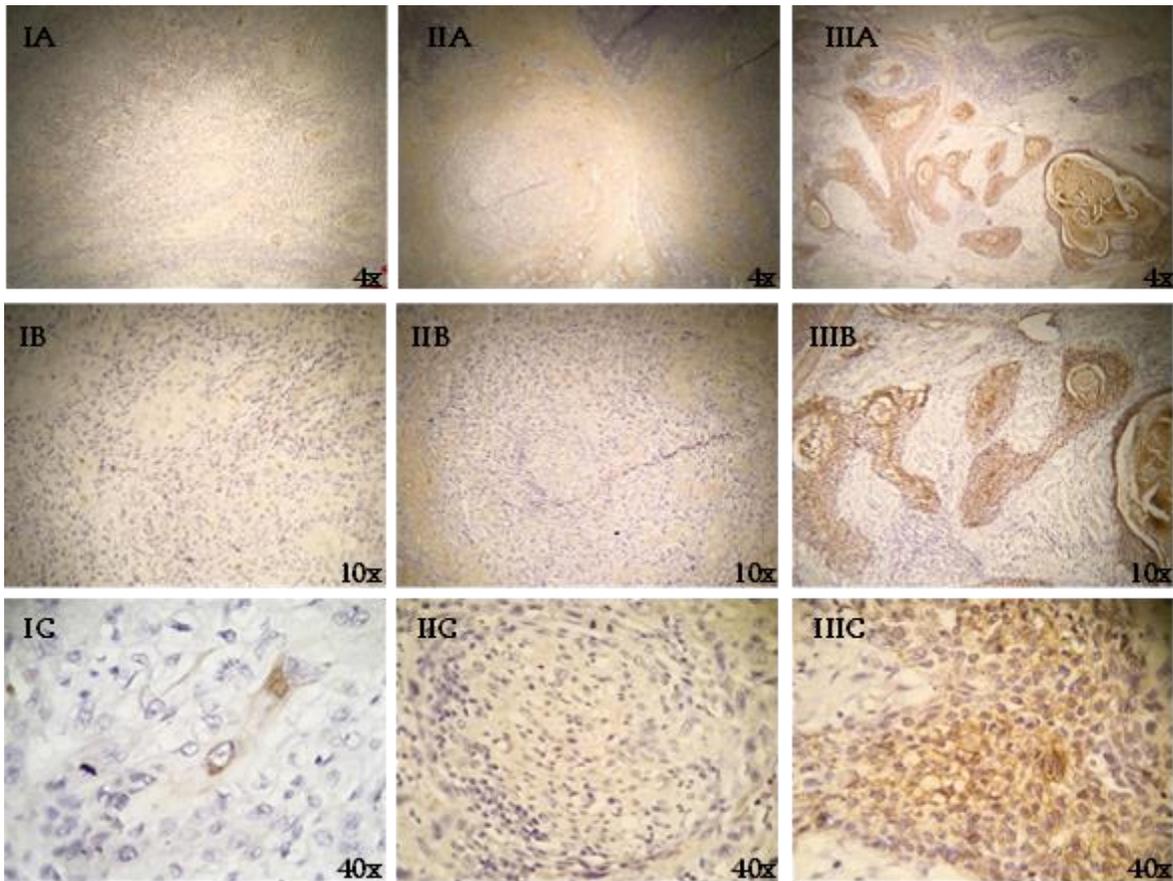
**Tabla 6** - Patrones de expresión de los biomarcadores en los casos de OTSCC

Biomarcador	Cantidad (Q)					Intensidad (I)				EXPRESIÓN (Q*I)		
	0	1+	2+	3+	4+	0	1+	2+	3+	Leve	Moderada	Intensa
<b>Ki-67</b>	16	29	21	7	0	2	22	39	10	34	19	4
<b>E-cad</b>	2	5	11	16	39	0	23	26	24	24	24	22
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	30	11	15	6	11	26	24	12	11	23	13	7
<b>MMP-9</b>	20	18	17	18	0	8	13	34	18	28	21	4

Abreviaturas: OTSCC, Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma; Neg, Negativo; E-cad, E-cadherina;  $\alpha$ -SMA, Actina de Músculo Liso alfa; MMP-9, Metaloproteinasa de la Matriz 9.

Fuente: Elaboración propia

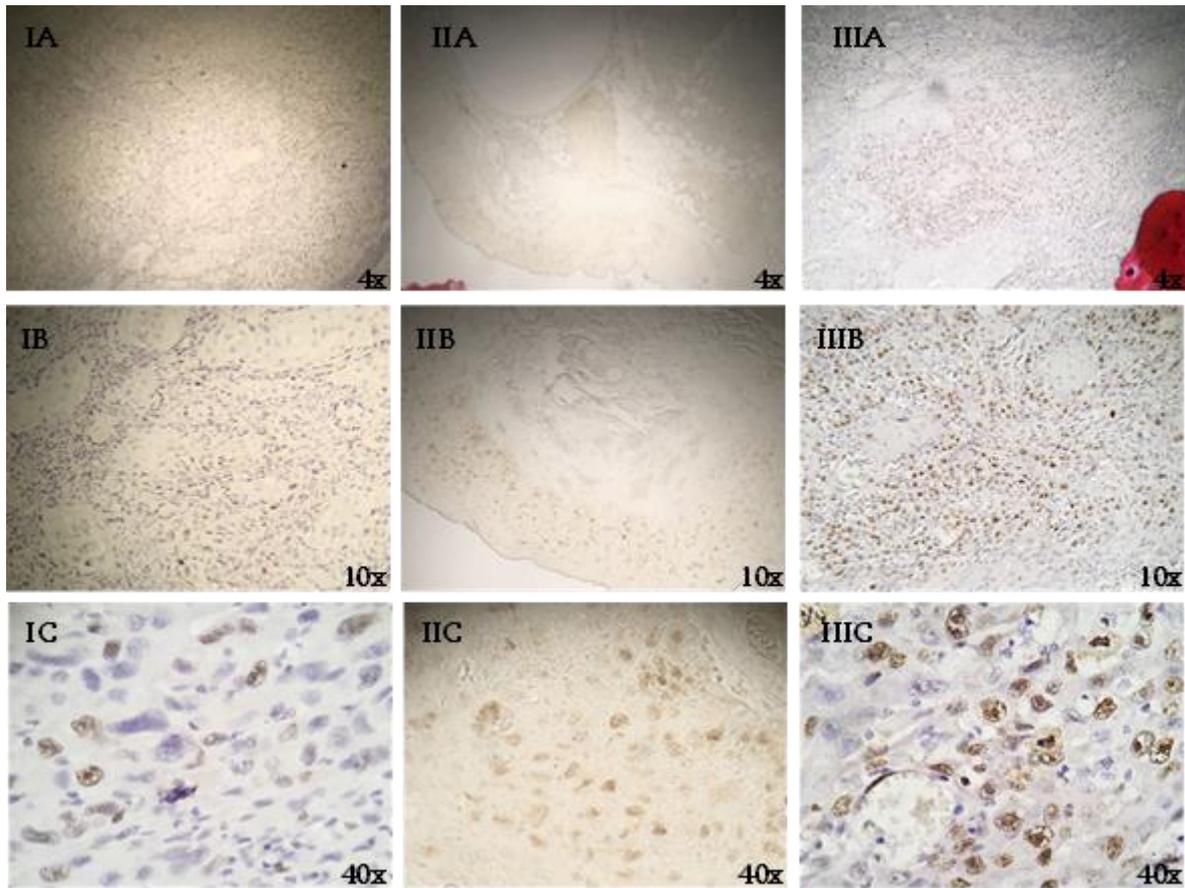
**Figura 8** - Expresión de E-cadherina.



Imunohistoquímica para E-cadherina (Abcam - 1:100): las figuras "I" muestran una marcación leve, las figuras "II" muestran una marcación moderada y las figuras "III" muestran una marcación intensa.

Fuente: Elaboración propia

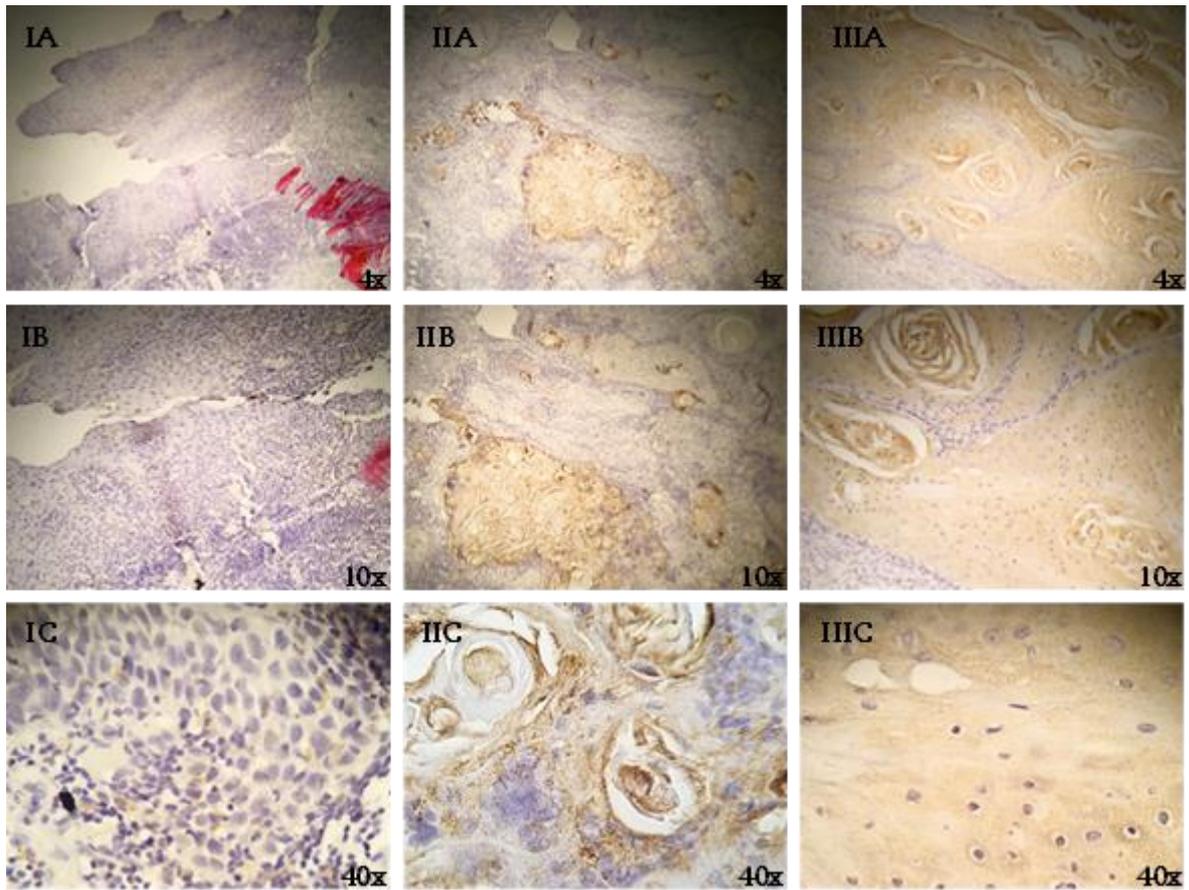
**Figura 9** - Expresión de Ki-67.



Imunohistoquímica para Ki67 (Abcam - 1:100): las figuras "I" muestran una marcación leve, las figuras "II" muestran una marcación moderada y las figuras "III" muestran una marcación intensa.

Fuente: Elaboración propia

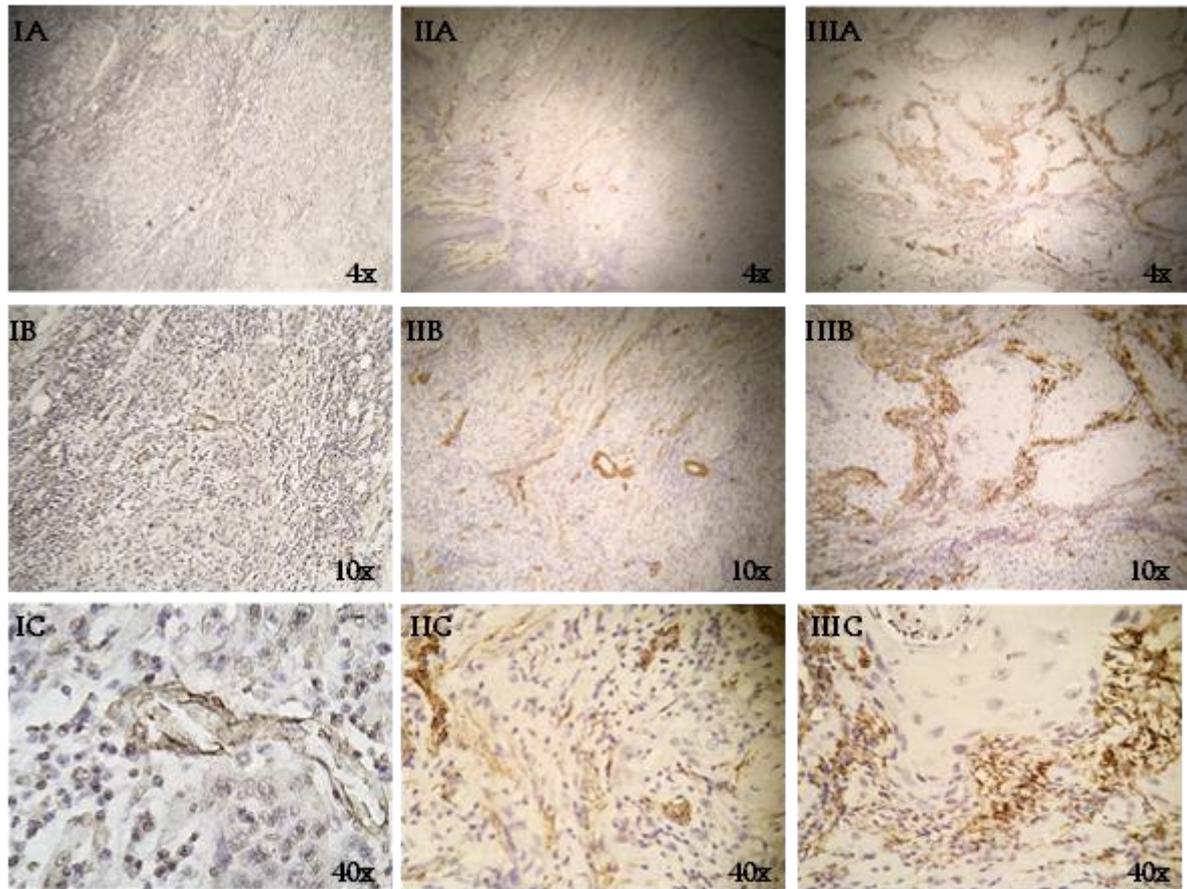
**Figura 10** - Expresión de MMP-9.



Imunohistoquímica para MMP-9 (Abcam - 1:200): las figuras "I" muestran una marcación leve, las figuras "II" muestran una marcación moderada y las figuras "III" muestran una marcación intensa.

Fuente: Elaboración propia

**Figura 11 -** Expresión de  $\alpha$ -SMA.



Inmunohistoquímica para  $\alpha$ -SMA (Abcam - 1:1600): las figuras "I" muestran una marcación leve, las figuras "II" muestran una marcación moderada y las figuras "III" muestran una marcación intensa.

Fuente: Elaboración propia

Se observó mayor porcentaje de expresión leve para Ki-67 y MMP-9, mientras que para E-cadherina la expresión moderada a intensa fue más frecuente. La  $\alpha$ -SMA no se expresó en el 41,1% de los casos. Ningún grado de expresión de los biomarcadores se asoció con la muerte o recaída por OTSCC (Tabla 7).

**Tabla 7** - Expresión de los biomarcadores en el frente de invasión y asociación con muerte o recaída de los pacientes con OTSCC, IDC Clínica Las Américas, Medellín, 2008-2017.

Variables	Categorías	n (%)	<sup>a</sup> Evento n (%)	Valor p* X <sup>2</sup>
<b>LVI (α-SMA)</b>	No	29 (39,7)	9 (31)	<b>0,031*</b>
	Ausente	15 (20,5)	3 (20)	
	≥33% circ.	5 (6,8)	1 (20)	
	Circ. completa	7 (9,6)	4 (57,1)	
	Adventicia	2 (2,7)	1 (50)	
	Media	0 (0)	--	
<b>PNI (S100)</b>	Si (Íntima)	44 (60,3)	25 (56,8)	0,065
	No	18 (24,7)	5 (27,8)	
	Si	55 (75,3)	29 (52,7)	
	≥33% circ.	5 (6,8)	1 (20)	
	Circ. completa	26 (35,6)	15 (57,7)	
	Intraneural	24 (32,9)	13 (54,2)	
<b>LVI3+PNI</b>	Ausente	12 (16,4)	3 (25)	<b>0,039*</b>
	Parcial	23 (31,5)	8 (34,8)	
	Presente	38 (52,1)	23 (60,5)	
<b>KI67</b>	Negativo	16 (21,9)	8 (50)	0,920
	Leve	34 (46,6)	16 (47,1)	
	Mod-Int	23 (31,5)	10 (43,5)	
<b>E-cad</b>	Negativo	3 (4,1)	0 (0)	0,203
	Leve	24 (32,9)	13 (54,2)	
	Mod-Int	46 (63)	21 (45,7)	
<b>α-SMA</b>	Negativo	30 (41,1)	12 (40)	0,483
	Leve	23 (31,5)	13 (56,5)	
	Mod-Int	20 (27,4)	9 (45)	
<b>MMP-9</b>	Negativo	20 (27,4)	10 (50)	0,874
	Leve	28 (38,4)	12 (42,9)	
	Mod-Int	25 (34,2)	12 (48)	

Abreviaturas: OTSCC, Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma; IDC, Instituto de Cancerología; X<sup>2</sup>, Chi-cuadrado; LVI, Invasión Linfovascular; α-SMA, Actina de Músculo Liso alfa; PNI, Invasión Perineural; ; E-cad, E-cadherina; MMP-9; Metaloproteínasa de la Matriz 9.

-- No aplica

<sup>a</sup>Evento: muerte o recaída asociadas a OTSCC.

\*Valor de p <0,05

Fuente: Elaboración propia

Se analizó la expresión de todos los biomarcadores respecto a las diferentes características evaluadas. La expresión de ninguno de los biomarcadores se asoció con las características sociodemográficas o clínicas (sexo, edad, localización o estadio). Mientras que, sí se observó asociación estadísticamente significativa con algunas de las características histopatológicas. La falta de expresión de Ki-67 se presentó más en tumores bien diferenciados, la expresión leve en los moderada y bien diferenciados, y la expresión moderada a intensa en los bien diferenciados. La expresión negativa de E-cadherina se observó más en tumores moderadamente diferenciados y los demás niveles de expresión en los bien diferenciados. Tanto la falta de expresión como los demás niveles de expresión de  $\alpha$ -SMA se presentaron más en aquellos con LVI y PNI positivas. Estos resultados parecen más el producto de una asociación aleatoria o deberse al poco número de casos en algunos de los grupos. Por último, la ausencia de expresión de MMP-9 se presentó más en tumores con clasificación patológica pT1, la expresión leve en pT2 y la expresión moderada a intensa en pT3 y 4 (Tabla 8).

**Tabla 8** - Expresión de biomarcadores y características histopatológicas de los pacientes con OTSCC, IDC Clínica Las Américas, Medellín, 2008-2017.

Variables	Categorías	KI-67				E-cad				SMA				MMP-9			
		0	Leve n (%)	M+I n (%)	Valor p*	0	Leve n (%)	M+I n (%)	Valor p*	0	Leve n (%)	M+I n (%)	Valor p*	0	Leve n (%)	M+I n (%)	Valor p*
Tamaño cm	< 3	10(32)	11(34)	11(34)	0,144	2(6)	7(22)	23(72)	0,223	12(38)	10(31)	10(31)	0,832	11(34)	12(38)	9(28)	0,444
	≥ 3	6(15)	22(55)	12(30)		1(2)	16(40)	23(58)		17(43)	13(32)	10(25)		9(22)	15(38)	16(40)	
Grado diferenciación	Pobre	2(50)	1(25)	1(25)	<b>0,036</b> **	1(25)	3(75)	0(0)	<b>0,009</b> *	2(50)	2(50)	0(0)	0,431	1(25)	1(25)	2(50)	0,636
	Moderado	4(18)	15(68)	3(14)		2(9)	8(36)	12(55)		9(41)	9(41)	4(18)		8(36)	9(41)	5(23)	
Márgenes	Bien	10(22)	17(38)	18(40)	0,846	0(0)	12(27)	33(73)	0,979	18(40)	12(27)	15(33)	0,595	11(24)	16(36)	18(40)	0,563
	No	11(24)	20(43)	15(33)		2(4)	15(33)	29(63)		19(41)	16(35)	11(24)		11(24)	20(43)	15(33)	
Clasificación pT	T1	7(41)	7(41)	3(18)	0,085	1(4)	8(31)	17(65)	0,658	10(38)	7(27)	9(35)	0,988	8(31)	8(31)	10(38)	<b>0,011</b> **
	T2	3(13)	8(35)	12(52)		0(0)	8(35)	15(65)		10(44)	7(30)	6(26)		6(26)	11(48)	6(26)	
Nódulos linfáticos	T3	4(22)	11(61)	3(17)	0,954	1(6)	6(33)	11(61)	0,915	7(39)	6(33)	5(28)	0,700	6(33)	5(28)	7(39)	0,553
	T4	2(15)	7(54)	4(31)		0(0)	4(31)	9(69)		4(31)	5(38)	4(31)		1(8)	3(23)	9(69)	
ENE	N0	9(22)	19(48)	12(30)	0,175	2(5)	13(32)	25(63)	0,145	17(43)	11(27)	12(30)	0,515	9(22)	17(43)	14(35)	0,199
	<sup>a</sup> N+	7(21)	15(46)	11(33)		1(3)	11(33)	21(64)		13(40)	12(36)	8(24)		11(33)	11(33)	11(33)	
LVI (SMA)	ENE+	5(38)	6(43)	3(21)	0,624	1(7)	7(50)	6(43)	0,694	7(50)	5(36)	2(14)	0,333	7(50)	3(21)	4(29)	0,578
	ENE-	2(11)	9(47)	8(42)		0(0)	5(26)	14(74)		6(32)	8(42)	5(26)		4(21)	8(42)	7(37)	
PNI (S100)	No	6(21)	12(41)	11(38)	0,704	1(3)	8(28)	20(69)	0,575	9(32)	10(34)	10(34)	<b>0,022</b> *	6(21)	12(41)	11(38)	0,769
	Ausente	4(27)	4(27)	7(46)		0(0)	5(33)	10(67)		6(40)	4(27)	5(33)		3(20)	8(53)	4(27)	
LVI+SMA	≥33% circ.	1(20)	2(40)	2(40)	0,624	0(0)	1(20)	4(80)	0,694	1(20)	2(40)	2(40)	0,333	0(0)	3(60)	2(40)	0,578
	Circ. completa	1(14)	4(57)	2(29)		1(14)	1(14)	5(72)		2(28)	3(44)	2(28)		3(43)	1(14)	3(43)	
PNI (S100)	Adventicia	0(0)	2(100)	0(0)	0,704	0(0)	1(50)	1(50)	0,575	0(0)	1(50)	1(50)	<b>0,022</b> *	0(0)	0(0)	2(100)	0,769
	Si	10(23)	22(50)	12(27)		2(5)	16(36)	26(59)		21(48)	13(29)	10(23)		14(32)	16(36)	14(32)	
LVI+PNI	No	5(28)	7(39)	6(33)	0,894	3(17)	5(28)	10(56)	0,441	7(39)	2(11)	9(50)	<b>0,002</b> *	5(28)	8(44)	5(28)	0,924
	Si	11(20)	27(49)	17(31)		0(0)	19(34)	16(36)		23(42)	21(38)	11(20)		15(28)	20(36)	20(36)	
LVI+PNI	≥33% circ.	1(20)	1(20)	3(60)	0,704	0(0)	2(40)	3(60)	0,575	2(40)	3(60)	0(0)	<b>0,022</b> *	1(20)	3(60)	1(20)	0,769
	Circ. completa	5(19)	12(46)	9(35)		0(0)	10(38)	16(62)		8(31)	11(42)	7(27)		5(19)	9(35)	12(46)	
LVI+PNI	Intraneural	5(21)	14(58)	5(21)	0,894	0(0)	7(29)	17(71)	0,441	13(54)	7(29)	7(27)	<b>0,002</b> *	9(38)	8(33)	7(29)	0,924
	Ausente	3(25)	4(33)	5(42)		1(8)	3(25)	8(67)		4(33)	0(0)	8(67)		3(25)	5(42)	4(33)	
LVI+PNI	Parcial	5(22)	11(48)	7(30)	0,894	2(9)	7(30)	14(61)	0,441	8(35)	12(52)	3(13)	<b>0,002</b> *	5(22)	10(43)	8(35)	0,924
	Presente	8(21)	19(50)	11(29)		0(0)	14(37)	24(63)		18(47)	11(29)	9(24)		12(32)	13(34)	13(34)	

Abreviaturas: OTSCC, Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma; IDC, Instituto de Cancerología; E-cad, E-cadherina; SMA, Actina de Músculo Liso; MMP-9, Metaloproteinas de la Matriz 9; M+I, moderada más intensa; ENE, Extensión Extranodal; LVI, Invasión Linfovascular; PNI, Invasión Perineural.

<sup>a</sup>N+ Incluye N1, N2b y c, N3

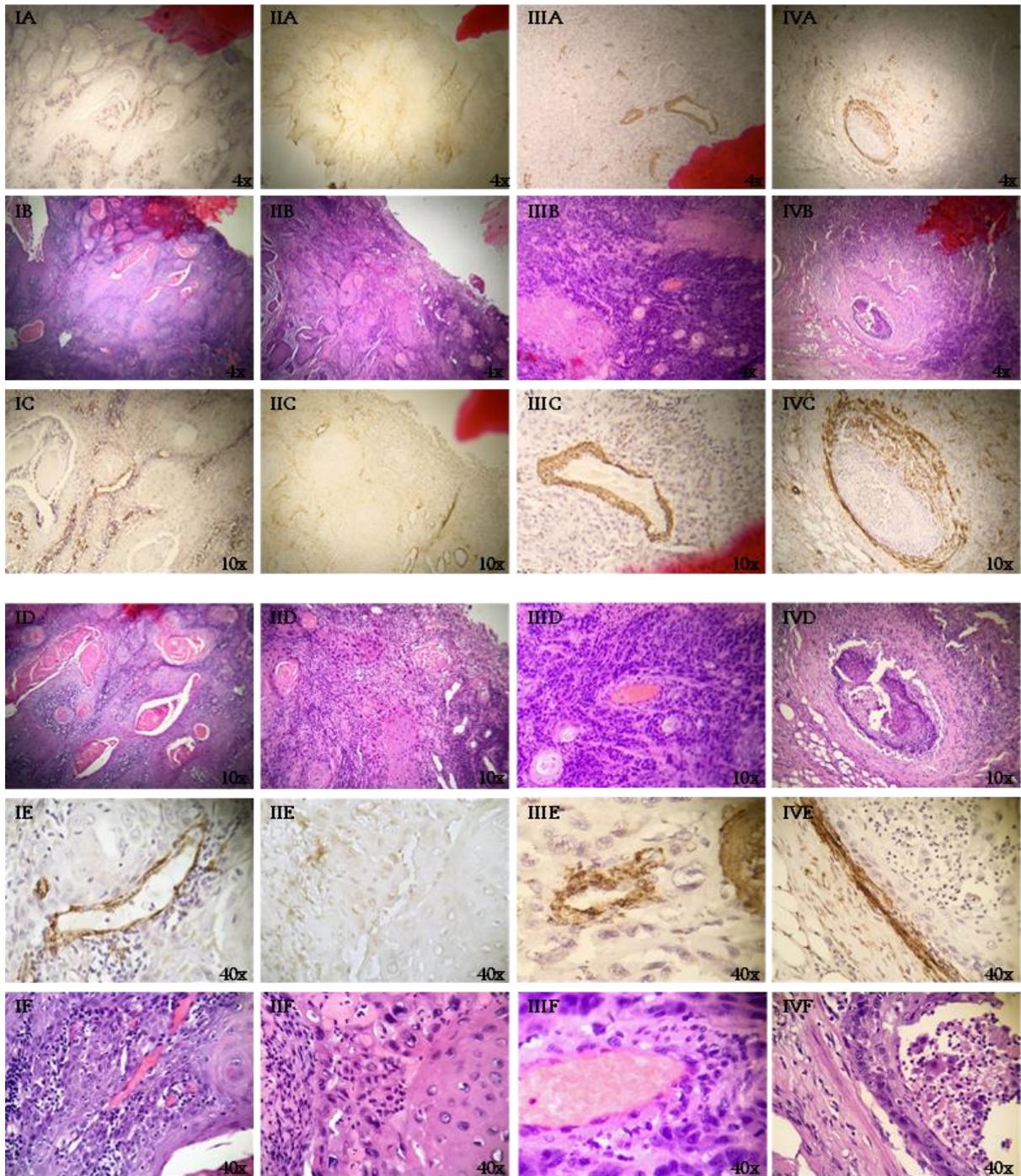
\*Valor de p <0,05. \*\* Cálculo realizado con la prueba exacta de Fisher

Fuente: Elaboración propia

### 5.3.1 Detección de la LVI y PNI con inmunohistoquímica

Al evaluar la LVI con  $\alpha$ -SMA aumentó su detección a un 60,3%, muy por encima a lo encontrado en los dos análisis histopatológicos (H&E) preliminares (Figura 12). Por otro lado, al evaluar la presencia de la PNI con S100, esta fue del 75,3%, similar al análisis histopatológico (H&E) previo (78,1%). Los patrones de invasión predominantes fueron la circunferencia completa nerviosa e intraneural (Figura 13). En la Tabla 7 se describe el patrón de invasión detallado para LVI y PNI. Tanto la presencia de LVI por sí sola, o en conjunto con PNI, se asociaron con un peor pronóstico ( $p < 0,05$ ).

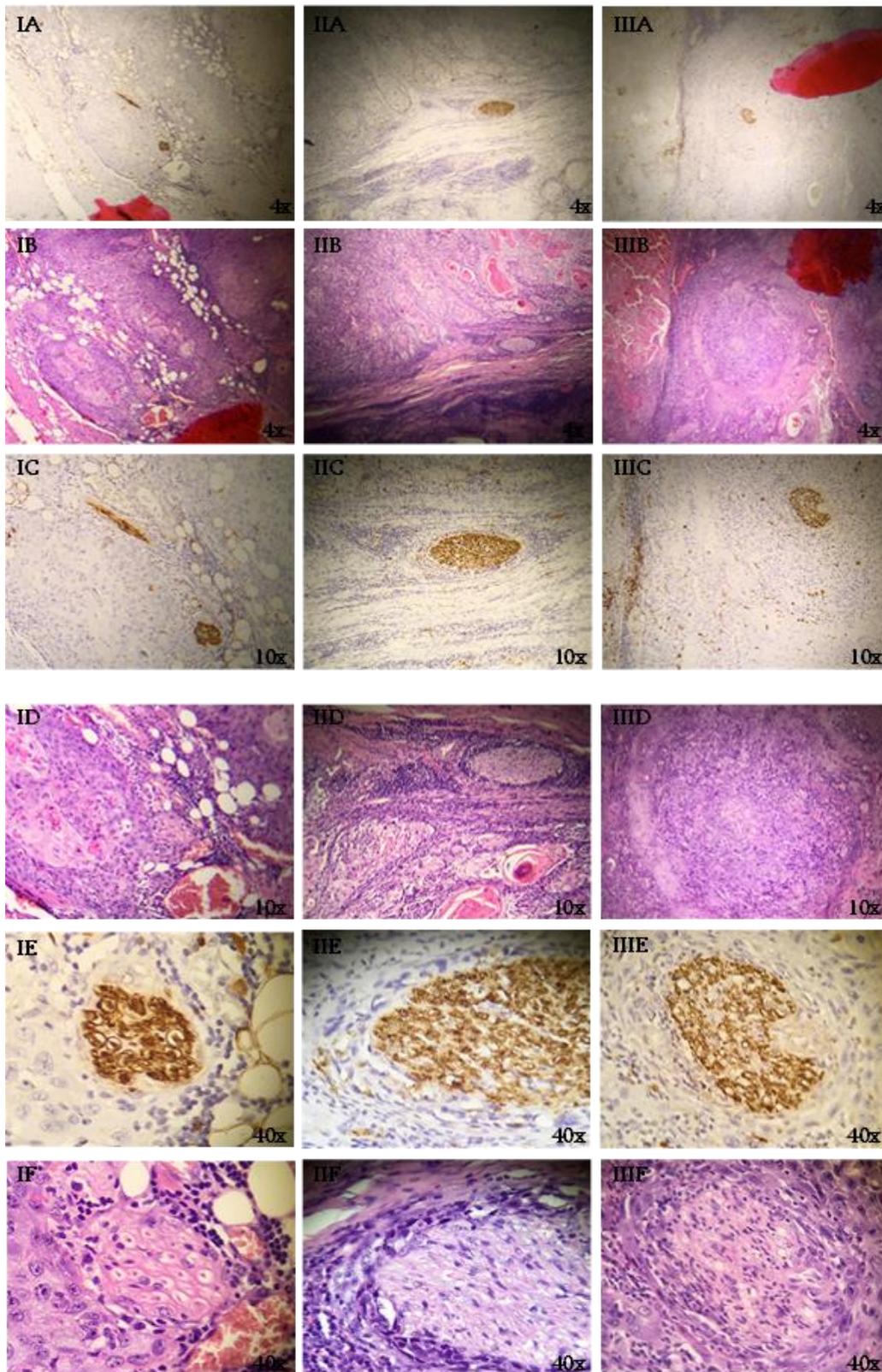
**Figura 12 - Invasión linfovascular.**



Invasión linfovascular (LVI): A, C y E muestran la inmunohistoquímica para  $\alpha$ -Actina de Músculo Liso ( $\alpha$ -SMA). B, D y F muestran el área correspondiente coloreada con Hematoxilina & Eosina. I - LVI  $\geq$  33%; II - LVI circunferencia completa; III - LVI capa adventicia; IV - Intravascular.

Fuente: Elaboración propia

**Figura 13 - Invasión perineural.**



Invasión perineural (PNI): A, C y E muestran la inmunohistoquímica para S100. B, D y F muestran el área correspondiente coloreada con Hematoxilina & Eosina. I - PNI  $\geq$  33%; II - PNI circunferencia completa; III - PNI intraneural. Fuente: Elaboración propia

De los cuatro casos en los que no se reportó LVI en el análisis histopatológico inicial, dos casos fueron detectados luego de realizar la inmunotinción ( $\alpha$ -SMA). Y, de estos, uno presentó el evento (25%). Del mismo modo, de los ocho casos en los que no se reportó PNI en el análisis inicial, al realizar la inmunotinción (S100) tres casos (38%) nuevos fueron identificados, de los cuales dos presentaron el evento (66,7%).

Se calculó la concordancia para la PNI resultante de la revisión histopatológica (H&E) de los casos y la identificada con la marcación (S100), con un índice de Kappa de 0,41, el cual representa una concordancia moderada (42/73 casos) (Tabla 9).

**Tabla 9** - Concordancia de la PNI en el frente de invasión de los pacientes con OTSCC, IDC Clínica Las Américas, Medellín, 2008-2017.

PNI+ H&E	PNI+ S100				Total
	Ausente	$\geq 33\%$ Circ.	Completa	Intraneural	
Ausente	12 (75)	1 (6,3)	0 (0)	3 (18,8)	16
$\geq 33\%$ Circ.	2 (15,4)	4 (30,8)	4 (30,8)	3 (23,1)	13
Completa	4 (10)	0 (0)	22 (55)	14 (35)	40
Intraneural	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (100)	4
Total	18 (24,7)	5 (6,8)	26 (35,6)	24 (32,9)	73

Abreviaturas: PNI, Invasión Perineural; OTSCC, Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma; IDC, Instituto de Cancerología; H&E, Hematoxilina-Eosina.

Fuente: Elaboración propia

Se realizó también un análisis bivariado de la PNI y la LVI, y su relación con algunas características de interés (Tabla 10). Se encontró asociación entre la presencia de la LVI+ con la presencia de la PNI+ ( $p=0,007$ ). De los casos con presencia de PNI+, dos tercios también presentaron LVI+. La presencia de LVI+ y PNI+ por sí solas o en conjunto, se asociaron con el estadio clínico avanzado, con haber recibido resección ganglionar y con el grado de diferenciación bueno o moderado en el frente de invasión. La LVI+ se asoció con el compromiso de los nódulos, a diferencia de la PNI+ donde fue igual para negativos y positivos. Mientras que la presencia simultánea de LVI+PNI se asoció con la presencia de nódulos linfáticos positivos y con la ausencia de compromiso de los márgenes quirúrgicos. Aunque no se encontró asociación, si se observó mayor presencia de LVI+PNI en tumores de la porción móvil de la lengua, mayores de 3 cm y sin extensión extranodal.

La PNI en el frente de invasión fue de 68,3% (28/41) en pacientes con OTSCC bien diferenciado, 92,9% (26/28) en los moderadamente diferenciados, y 50% (1/2) de

los pobremente diferenciados. Esta diferencia fue significativa entre los OTSCC bien diferenciados y los moderada a pobremente diferenciados ( $p=0,027$ ).

**Tabla 10 -** Análisis bivariado de la invasión perineural (PNI+S100) e invasión linfovascular (LVI+SMA) con variables clínicas e histopatológicas de los pacientes con OTSCC, IDC Clínica Las Américas, Medellín, 2008-2017.

Variables	Categorías	PNI+ n (%)	PNI- n (%)	Valor p* X <sup>2</sup>	LVI+ n (%)	LVI- n (%)	Valor p* X <sup>2</sup>	LVI + PNI			Valor p* X <sup>2</sup>
								Ninguna	Una	Ambas	
<b>Estadio AJCC</b>	<sup>a</sup> Temprano	17 (31,5)	11 (57,9)	<b>0,042*</b>	13 (29,5)	15 (51,7)	0,057	8 (66,7)	10 (43,5)	10(26,3)	<b>0,036*</b>
	<sup>b</sup> Avanzado	37 (68,5)	8 (42,1)		31 (70,5)	14 (48,3)		4 (33,3)	13 (56,5)	28 (73,7)	
<b>Localización lengua</b>	Móvil	31 (57,4)	12 (63,2)	0,661	24 (54,5)	19 (65,5)	0,351	8 (66,7)	15 (65,2)	20 (52,6)	0,523
	Base	23 (42,6)	7 (36,8)		20 (45,5)	10 (34,5)		4 (33,3)	8 (34,8)	18 (47,4)	
<b>Disección ganglionar</b>	Si	51 (94,4%)	15 (78,9)	<b>0,048*</b>	43 (97,7)	23 (79,3)	<b>0,014*</b>	8 (66,7)	21 (91,3)	37 (97,4)	<b>0,042</b>
	No	3 (5,6)	4 (21,1)		1 (2,3)	6 (20,7)		4 (33,3)	2 (8,7)	1 (2,6)	
<b>Tamaño cm</b>	< 3	22 (40,7)	10 (55,6)	0,273	18 (40,9)	14 (50)	0,449	8 (72,7)	8 (34,8)	16 (42,1)	0,104
	≥ 3	32 (59,3)	8 (44,4)		26 (59,1)	14 (50)		3 (27,3)	15 (65,2)	22 (57,9)	
<b>Grado diferenciación (tumor)</b>	Pobre	3 (5,6)	1 (5,9)	0,987	4 (9,1)	0 (0)	<b>0,041**</b>	0 (0)	1 (4,3)	3 (7,9)	0,569
	Moderado	17 (31,5)	5 (29,4)		16 (36,4)	6 (22,2)		2 (20)	6 (26,1)	14 (36,8)	
<b>Grado diferenciación (frente)</b>	Bien	34 (63)	11 (64,7)	<b>0,036*</b>	24 (54,5)	21 (77,8)	<b>0,029**</b>	8 (80)	16 (69,6)	21 (55,3)	<b>0,016</b>
	Pobre	1 (1,8)	1 (6,3)		2 (4)	0 (0)		0 (0)	1 (4,3)	1 (2,6)	
<b>Márgenes comprometidos</b>	Moderado	26 (47,3)	2 (12,5)	0,395	21 (48)	7 (26)	0,813	2 (20)	5 (21,7)	21 (55,3)	<b>0,041*</b>
	Bien	28 (50,9)	13 (81,3)		21 (48)	20 (74)		8 (80)	17 (73,9)	16 (42,1)	
<b>Clasificación pT</b>	No	36 (66,7)	10 (55,6)	0,828	27 (62,8)	19 (65,5)	0,060	5 (41,7)	19 (82,6)	22 (59,5)	0,258
	Si	18 (33,3)	8 (44,4)		16 (37,2)	10 (34,5)		7 (58,3)	4 (17,4)	15 (40,5)	
	T1	12 (22,2)	5 (29,4)		13 (29,5)	4 (14,8)		3 (30)	3 (13)	11(28,9)	
	T2	17 (31,5)	6 (35,3)		11 (25)	12 (44,4)		4 (40)	10 (43,5)	9 (23,7)	
<b>Nódulos linfáticos</b>	T3	14 (25,9)	4 (23,5)	0,165	9 (20,5)	9 (33,3)	<b>0,001*</b>	3 (30)	7 (30,4)	8 (21,1)	<b>0,004*</b>
	T4	11 (20,4)	2 (11,8)		11 (25)	2 (7,4)		0 (0)	3 (13)	10 (26,3)	
	N0	27 (50)	13 (68,4)		17 (38,6)	23 (79,3)		10 (83,3)	16 (69,6)	14 (36,8)	
<b>ENE</b>	<sup>c</sup> N+	27 (50)	6 (31,6)	0,184	27 (61,4)	6 (20,7)	0,649	2 (16,7)	7 (30,4)	24 (63,2)	0,168
	ENE+	10 (37)	4 (66,7)		12 (42,9)	2 (40)		0 (0)	5 (71,4)	9 (36)	
	ENE-	17 (63)	2 (33,3)		16 (57,1)	3 (60)		1 (100)	2 (28,6)	16 (64)	

Abreviaturas: OTSCC, Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma; IDC, Instituto de Cancerología; PNI, Invasión Perineural; X<sup>2</sup>, Chi-cuadrado; LVI, Invasión Linfovascular; AJCC, American Joint Committee on Cancer; ENE, Extensión Extranodal.

<sup>a</sup>Estadio temprano: incluye 0, I, II

<sup>b</sup>Estadio avanzado: incluye III, IV

<sup>c</sup>Incluye N1, N2b y c, N3

\* Valor de p <0,05

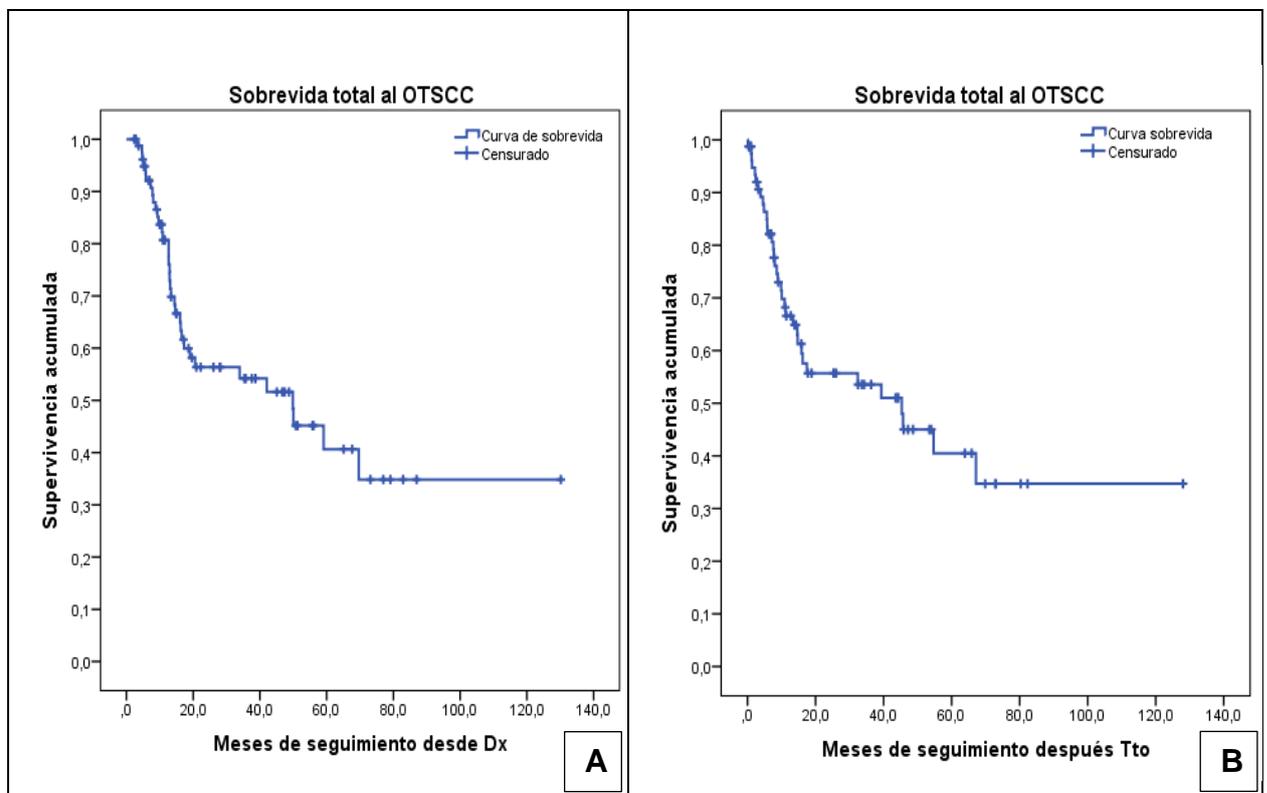
\*\* Cálculo realizado con la prueba exacta de Fisher

Fuente: Elaboración propia

## 5.4 Análisis de Sobrevida

El tiempo promedio de sobrevida específica de la enfermedad desde el diagnóstico fue de  $62,2 \pm 7,8$  meses (IC 95%; 46,9; 77,5) con una mediana de 49,9 (IC 95%; 16,8; 82,9), la probabilidad de sobrevida a 5 años fue del 41%. Por otro lado, el tiempo promedio de sobrevida específica de la enfermedad desde el inicio del tratamiento fue de  $58,9 \pm 7,9$  meses (IC 95%; 43,4; 74,4) (**Figura 14**).

**Figura 14** - Curvas de sobrevida del OTSCC.



Curvas de sobrevida con Kaplan Meier en 80 pacientes con OTSCC, Instituto de Cancerología Clínica las Américas, Medellín, 2008-2017. **A.** Tiempo promedio de sobrevida desde el diagnóstico inicial con. **B.** Tiempo promedio de sobrevida desde el tratamiento quirúrgico.

Fuente: Elaboración propia

En las Tablas 11 y 12 se muestra el promedio de sobrevida específica de la enfermedad en meses para cada una de las variables con el intervalo de confianza (95%), la mediana con el rango intercuartil, el valor de p y la respectiva DSS a 5 años. Para las características estado civil, estadio clínico, localización del tumor y procedimiento quirúrgico hubo una diferencia estadísticamente significativa en su sobrevida (Figura 15), mientras que las características sexo, edad, procedencia,

tratamiento, disección cervical y el estadio clínico sin agrupar no mostraron diferencias en su sobrevida (Tabla 11 y APÉNDICE A).

**Tabla 11 - Supervivencia (DSS) de los pacientes con OTSCC según características sociodemográficas y clínicas., IDC Clínica Las Américas, Medellín, 2008-2017.**

Variables	Categorías	$\bar{x}$ meses	IC 95%	Mediana	Rango Intercuar.	Valor p*	DSS 5 años (%)
<b>Sexo</b>	Masculino	55,4	33,8 ; 77,1	33,9	12,6 ; --	0,466	39
	Femenino	50,2	37,5 ; 62,8	49,9	13,3 ; --		43
<b>Edad 1</b>	< 60 años	64,2	40,8 ; 87,7	59	14,6 ; --	0,331	46
	≥ 60 años	43,4	31,2 ; 55,6	20,6	10,9 ; --		36
<b>Edad 2</b>	≤ 45 años	61,8	41,9 ; 81,7	--	50,0 ; --	0,203	62
	> 45 años	57,3	40,8 ; 77,5	34	12,6 ; --		36
<b>Estado civil</b>	Con pareja	44,3	24,3 ; 71,8	16,3	9,3 ; 59,1	<b>0,025*</b>	21
	Sin pareja	53,6	40,2 ; 66,9	69,6	16,6 ; --		64
<b>Procedencia</b>	Valle Aburrá	74,6	51,4 ; 97,9	--	13,3 ; --	0,329	50
	Otros	42,2	31,8 ; 52,7	42,1	12,6 ; 70		33
<b>Estadio AJCC</b>	<sup>a</sup> Temprano	67,3	56,6 ; 78	--	69,6 ; --	<b>0,000*</b>	76
	<sup>b</sup> Avanzado	38,9	22,3 ; 55,5	16,1	9,6 ; 49,9		17
<b>Localización lengua</b>	Móvil	83,1	63,5 ; 102,6	--	16,3 ; --	<b>0,016*</b>	59
	Base	35,5	24,7 ; 46,3	20,6	10,9 ; 59		21
	Cx	54,1	41,2 ; 67,1	--	17,3 ; --		54
<b>Tratamiento</b>	Cx + RT	55	34,2 ; 75,9	42,1	10,9 ; 42	0,317	35
	Cx + RT + QT	37,8	18,6 ; 56,9	16,1	12,6 ; 16		34
	Resección local	58,3	40,0 ; 76,6	--	--		76
<b>Procedimiento Cx</b>	Glos. parcial	69,3	50,8 ; 87,7	50,0	16,1 ; --	<b>0,001*</b>	48
	Glos. total	21,3	9,7 ; 32,9	12,6	8,7 ; 14,6		0
<b>Disección ganglionar</b>	Si	56,2	40,2 ; 72,2	42,1	12,6 ; --	0,104	36
	No	68,8	51,1 ; 86,4	--	--		81

Abreviaturas: DSS, Disease-specific survival; OTSCC, Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma; IDC, Instituto de Cancerología; IC, Intervalo de Confianza; AJCC, American Joint Committee on Cancer; Cx, Cirugía; RT, Radioterapia; QT, Quimioterapia; Glos, Glosectomía.

-- No aplica

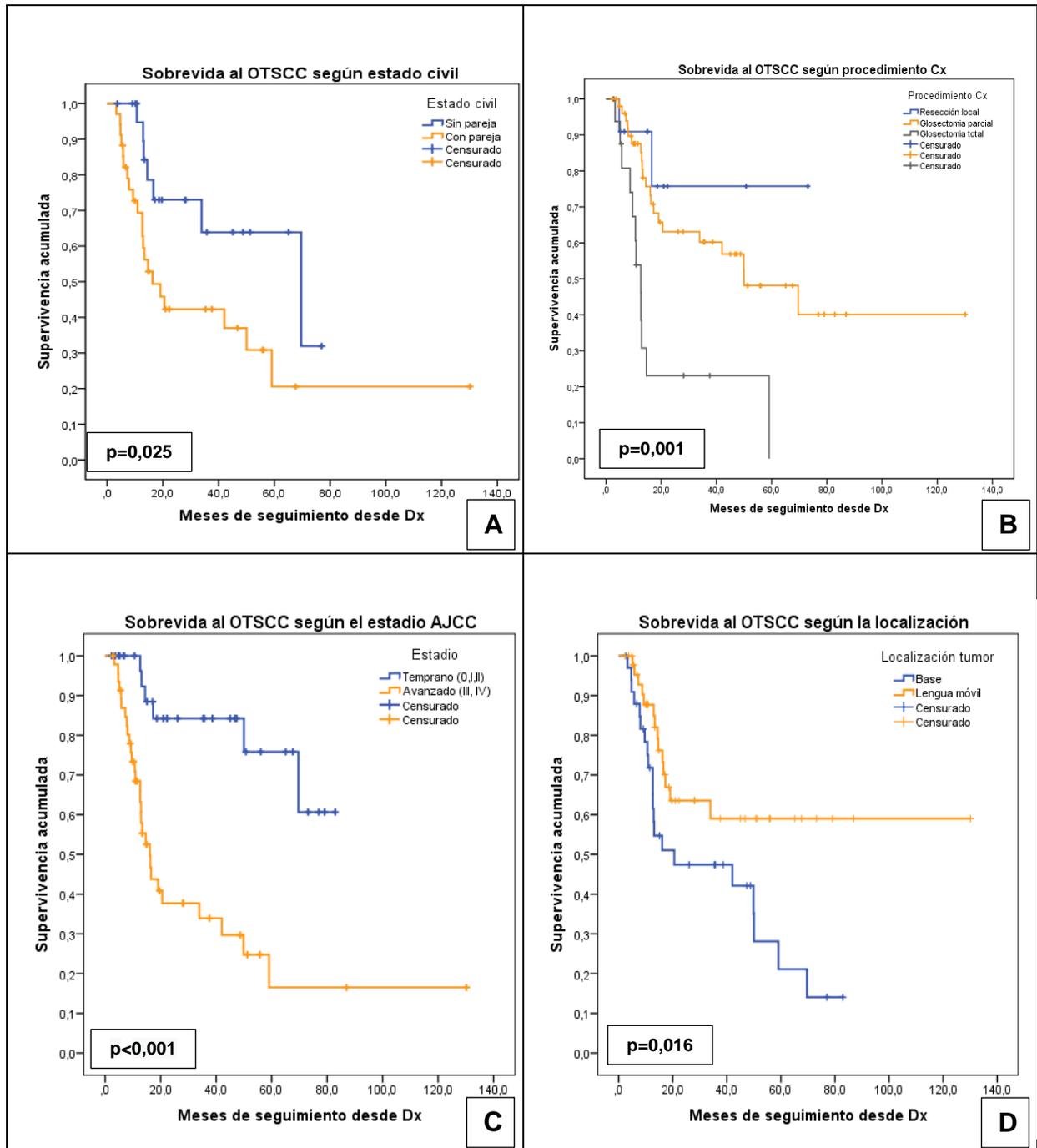
<sup>a</sup>Estadio temprano: incluye 0, I, II

<sup>b</sup>Estadio avanzado: incluye III, IV

\* Prueba de Log Rank o prueba de Breslow para la comparación de la sobrevida. Valor de p <0,05

Fuente: Elaboración propia

**Figura 15 - Curvas de sobrevida: sociodemográfica y clínica I.**



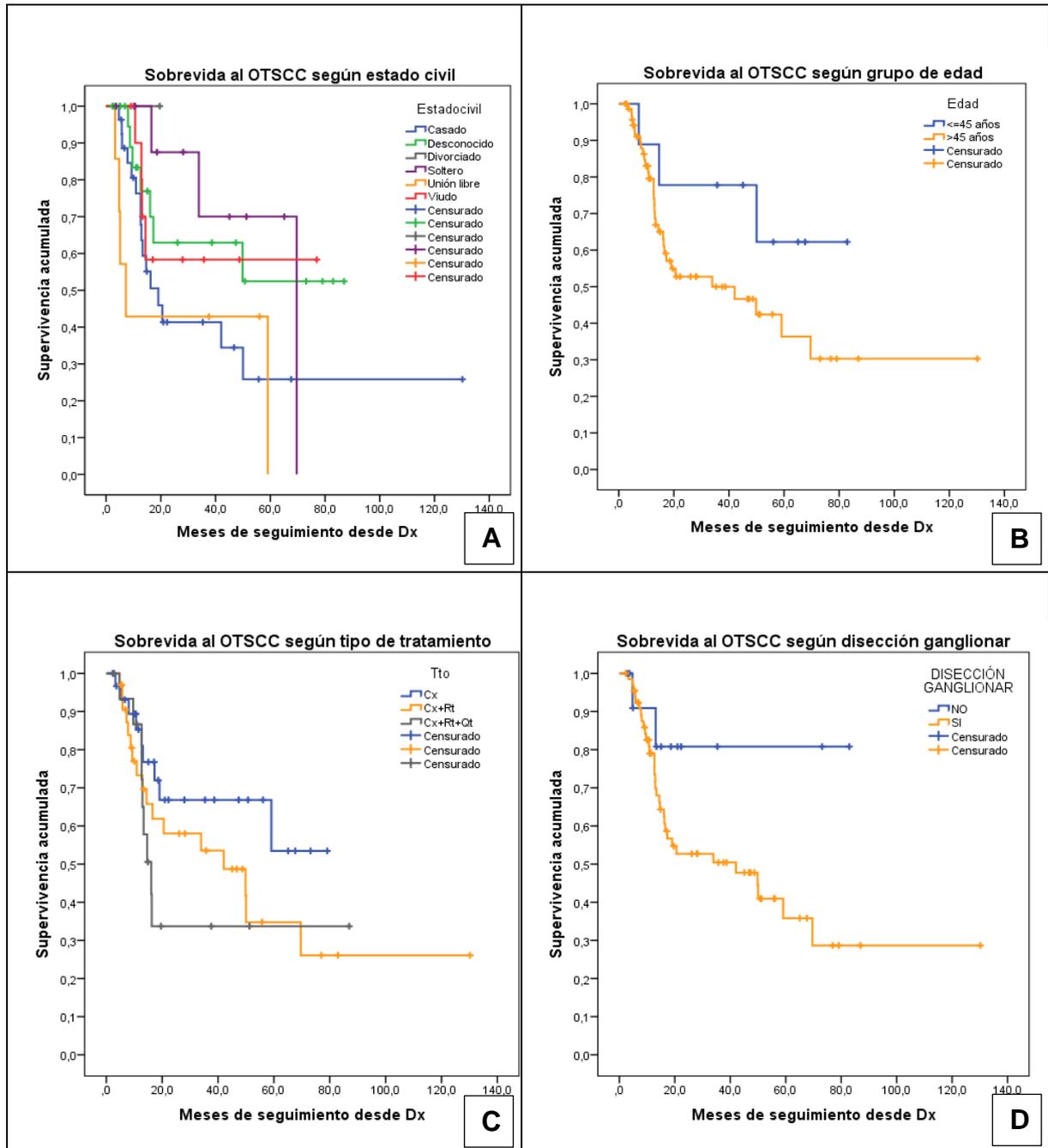
Curvas de sobrevida con Kaplan Meier en 80 pacientes con OTSCC, Instituto de Cancerología Clínica las Américas, Medellín, 2008-2017, comparadas por A. Estado civil. B. Tipo de procedimiento quirúrgico realizado. C. Estadio clínico temprano (0, I, II) y avanzado (III, IV). D. Localización del tumor.

Fuente: Elaboración propia

Aunque no hubo asociación con la sobrevida, sí se observó un menor porcentaje de sobrevida a 5 años de los grupos con estado civil unión libre y casado (con pareja), aquellos con estadio clínico avanzado y los que recibieron glosectomía

total. Por otro lado, los pacientes  $\leq 45$  años tuvieron la mejor sobrevida a 5 años (62%) entre los dos grupos de edades, lo mismo que los que sólo recibieron tratamiento quirúrgico (54%) y aquellos a quien no se les realizó disección ganglionar (81%) (Figura 16).

**Figura 16** - Curvas de sobrevida: sociodemográfica y clínica II.



Curvas de sobrevida con Kaplan Meier en 80 pacientes con OTSCC, Instituto de Cancerología Clínica las Américas, Medellín, 2008-2017. **A.** Estado civil detallado. **B.** Grupo de edad  $\leq$  y  $>$  45 años. **C.** Tratamiento recibido. **D.** Disección ganglionar.

Fuente: Elaboración propia

Las características tamaño del tumor, compromiso de márgenes y nódulos linfáticos, grado de diferenciación, la intensidad del infiltrado inflamatorio, así como la clasificación TNM, tuvieron una diferencia estadísticamente significativa en su sobrevida. Se observó una tendencia a menor porcentaje de sobrevida a 5 años en aquellos con extensión extranodal positiva; LVI clasificada como negativa, pero con presencia de células tumorales en la totalidad de la periferia del vaso y la capa adventicia; PNI positiva con patrón de invasión de la periferia completa del nervio e intraneural; y LVI y PNI simultánea (Tabla 12 y Figura 17), a pesar de que no hubo diferencia estadísticamente significativa. El nivel de expresión de ninguno de los biomarcadores se asoció con la sobrevida. Sin embargo, aquellos con expresión moderada a intensa de  $\alpha$ -SMA y MMP-9 mostraron tendencia a menor porcentaje de sobrevida específica del OTSCC a 5 años (APÉNDICE B y C).

**Tabla 12** - Supervivencia (DSS) de los pacientes con OTSCC según las características tumorales, IDC Clínica Las Américas, Medellín, 2008-2017. (continua)

Variables	Categorías	$\bar{x}$ meses	IC 95%	Mediana	Rango Intercuartil	Valor p*	DSS 5 años (%)
Tamaño cm	< 3	85,7	63,8 ; 107,6	--	20,6 ; --	<b>0,001*</b>	57
	≥ 3	34,1	22,8 ; 45,4	13,3	9,3 ; 59,1		25
Márgenes comprometidos	No	75,1	54,1 ; 96,1	69,6	16,6 ; --	<b>0,037*</b>	57
	Si	36,2	23,3 ; 49,1	16,3	10,9 ; 59,1		20
Nódulos linfáticos	N0	60,3	48,9 ; 71,7	--	33,9 ; --	<b>0,001*</b>	61
	<sup>a</sup> N+	36,5	17,4 ; 55,5	14,7	10,6 ; 59,1		13
ENE	ENE+	26,1	13,0 ; 39,1	12,7	10,6 ; 59,1	0,686	0
	ENE-	43,1	17,4 ; 68,9	16,1	9,6 ; 49,9		23
Grado diferenciación	Pobre	15,8	0,1 ; 31,6	5,8	4,8 ; 12,6	<b>0,001*</b>	20
	Moderado	44,3	27,5 ; 61,2	16,6	10,9 ; --		43
	Bien	57,2	37,6 ; 76,9	49,9	13,3 ; 69,6		36
Clasificación pT	T1	56,2	39,6 ; 72,8	--	17,3 ; --	<b>0,005*</b>	59
	T2	63,4	37,0 ; 89,7	50,0	12,9 ; --		46
	T3	37,8	18,9 ; 56,6	33,9	9,6 ; --		26
	T4	22,6	9,5 ; 35,6	12,6	9,3 ; 59,1		0
Clasificación pN	N0	60	48,6 ; 71,5	--	33,9 ; --	<b>0,000*</b>	60
	N1	90,6	44 ; 137,2	--	19,1 ; --		66
	<sup>b</sup> N2	23,4	14,9 ; 31,9	12,9	10,6 ; 49,9		0
Clasificación clínica M	N3	4,8	4,8 ; 4,8	4,8	4,8 ; 4,8	<b>0,011*</b>	0
	M0	64,3	48,4 ; 80,1	49,9	12,9 ; --		44
Intensidad Infiltrado	M1	7,3	7,3 ; 7,3	7,3	7,3 ; 7,3	<b>0,024</b>	0
	Leve+Mod	58,3	39,3 ; 77,3	16,6	10,6 ; --		37
Tipo Infiltrado	Severo	52,1	38,3 ; 65,9	59,1	17,3 ; --	0,453	41
	PMN + LMN	46,4	34,6 ; 58,2	49,9	12,9 ; --		37
	LMN	70,3	48,7 ; 91,9	20,6	12,6 ; --		49

Abreviaturas: DSS, Disease-specific survival; OTSCC, Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma; IDC, Instituto de Cancerología; IC, Intervalo de Confianza; ENE, Extensión Extranodal; LVI, Invasión Linfovascular; SMA, Actina de Músculo Liso; PNI, Invasión Perineural; PMN, Polimorfonucleares neutrófilos; LMN, Linfomononucleares.

-- No aplica

<sup>a</sup>N+ Incluye N1, N2b y c, N3

<sup>b</sup>N2 Incluye N2b y N2c

\* Prueba de Log Rank o prueba de Breslow para la comparación de la supervivencia. Valor de p <0,05

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 12** - Supervivencia (DSS) de los pacientes con OTSCC según las características tumorales, IDC Clínica Las Américas, Medellín, 2008-2017. (conclusão)

Variables	Categorías	$\bar{x}$ meses	IC 95%	Mediana	Rango Intercuartil	Valor p*	DSS 5 años (%)
<b>LVI (<math>\alpha</math>-SMA)</b>	No	55,2	39,8 ; 70,7	50,0	10,9 ; --	0,121	46
	Ausente	51,3	36 ; 66,6	--	42,1 ; --		57
	$\geq 33\%$ circunf	44,7	25,4 ; 64	--	10,6 ; --		75
	Circ completa	40,7	15,1 ; 66,4	13,1	12,9 ; 50		25
	Adventicia	33,9	33,9 ; 33,9	33,9	33,9 ; 33,9		0
<b>PNI (S100)</b>	Si	51,6	33,8 ; 69,5	17,3	12,6 ; --	0,099	33
	No	61,7	44,2 ; 79,2	--	42,1 ; --		55
	Si	52,9	36 ; 69,9	19,1	12,6 ; 19,1		34
	$\geq 33\%$ circunf	50,5	41,1 ; 60	--	33,9 ; --		75
	Circ completa	53,1	29,8 ; 76,5	16,3	10,6 ; --		32
<b>LVI+PNI</b>	Intraneural	34,2	21,5 ; 46,9	17,3	12,6 ; 69,6	0,110	28
	Ausente	64,2	44,5 ; 83,9	--	42,1 ; --		53
	Parcial	37,9	28,2 ; 47,7	--	12,9 ; --		56
<b>Ki67</b>	Presente	48,7	30,6 ; 66,9	16,6	10,9 ; 69,6	0,936	31
	Negativo	40,6	26,9 ; 54,2	59,1	13,1 ; --		36
	Leve	61,6	39,7 ; 83,4	33,9	12,6 ; --		38
<b>E-cad</b>	M+I	39,7	25,4 ; 54	50	12,6 ; 69,6	0,143	37
	Negativo	-	-	-	-		-
	Leve	35,7	20,6 ; 50,9	13,3	9,6 ; --		34
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	M+I	50,4	30,3 ; 70,5	42,1	14,4 ; 69,6	0,074	34
	Negativo	52,6	39,3 ; 66	59,1	16,1 ; --		46
	Leve	53,5	28 ; 79	16,6	8,0 ; --		35
<b>MMP-9</b>	M+I	37,8	22,6 ; 53,1	42,1	13,1 ; --	0,590	27
	Negativo	47,2	31,2 ; 63,2	49,9	14,6 ; --		44
	Leve	44,6	30,7 ; 58,6	19,1	12,6 ; --		48
	M+I	52,6	27,6 ; 77,7	42,1	10,6 ; 59,1		24

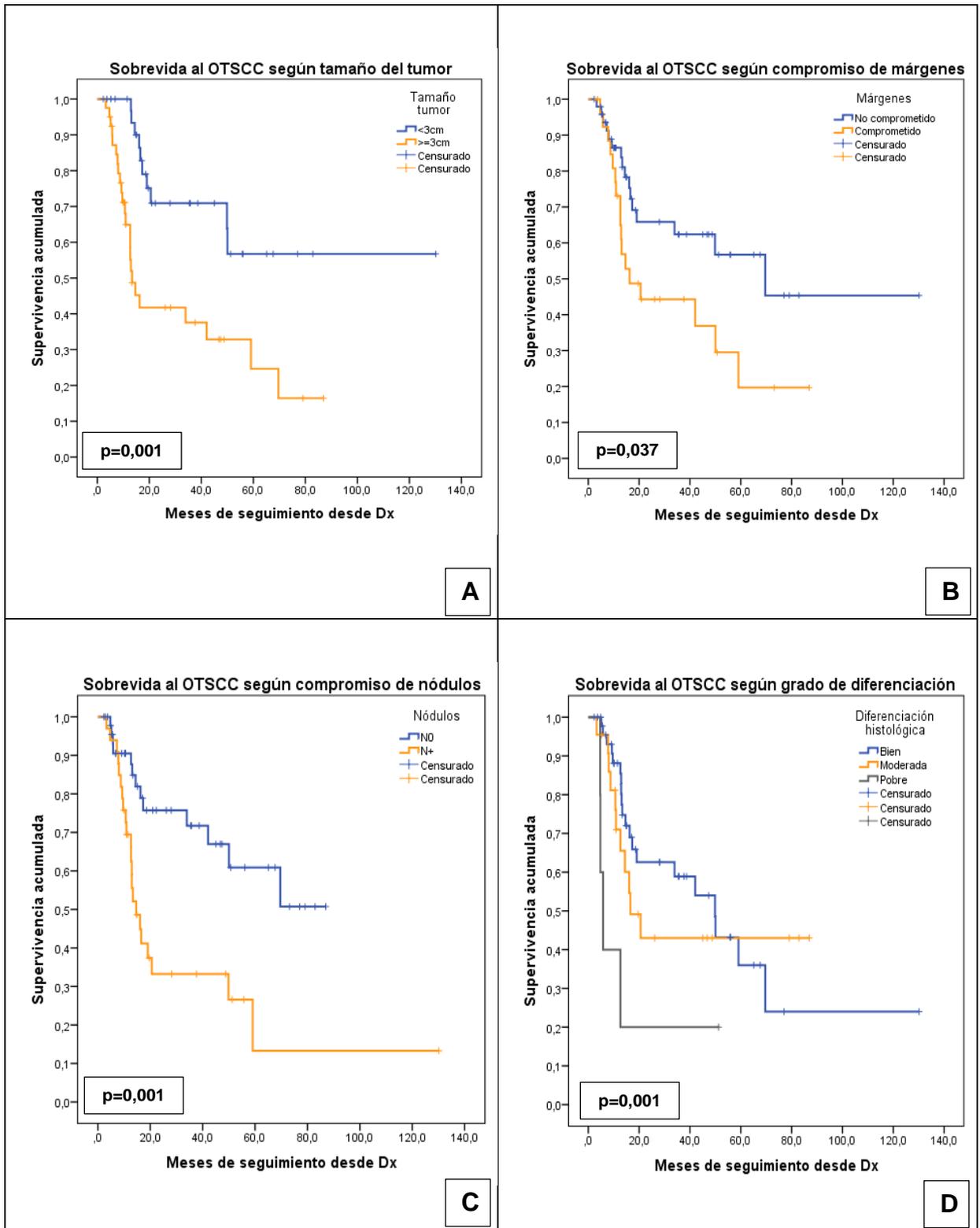
Abreviaturas: DSS, Disease-specific survival; OTSCC, Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma; IDC, Instituto de Cancerología; IC, Intervalo de Confianza; LVI, Invasión Linfocelular; SMA, Actina de Músculo Liso; PNI, Invasión Perineural; M+I, moderada más intensa; E-cad, E-cadherina; MMP-9; Metaloproteínasa de la Matriz 9.

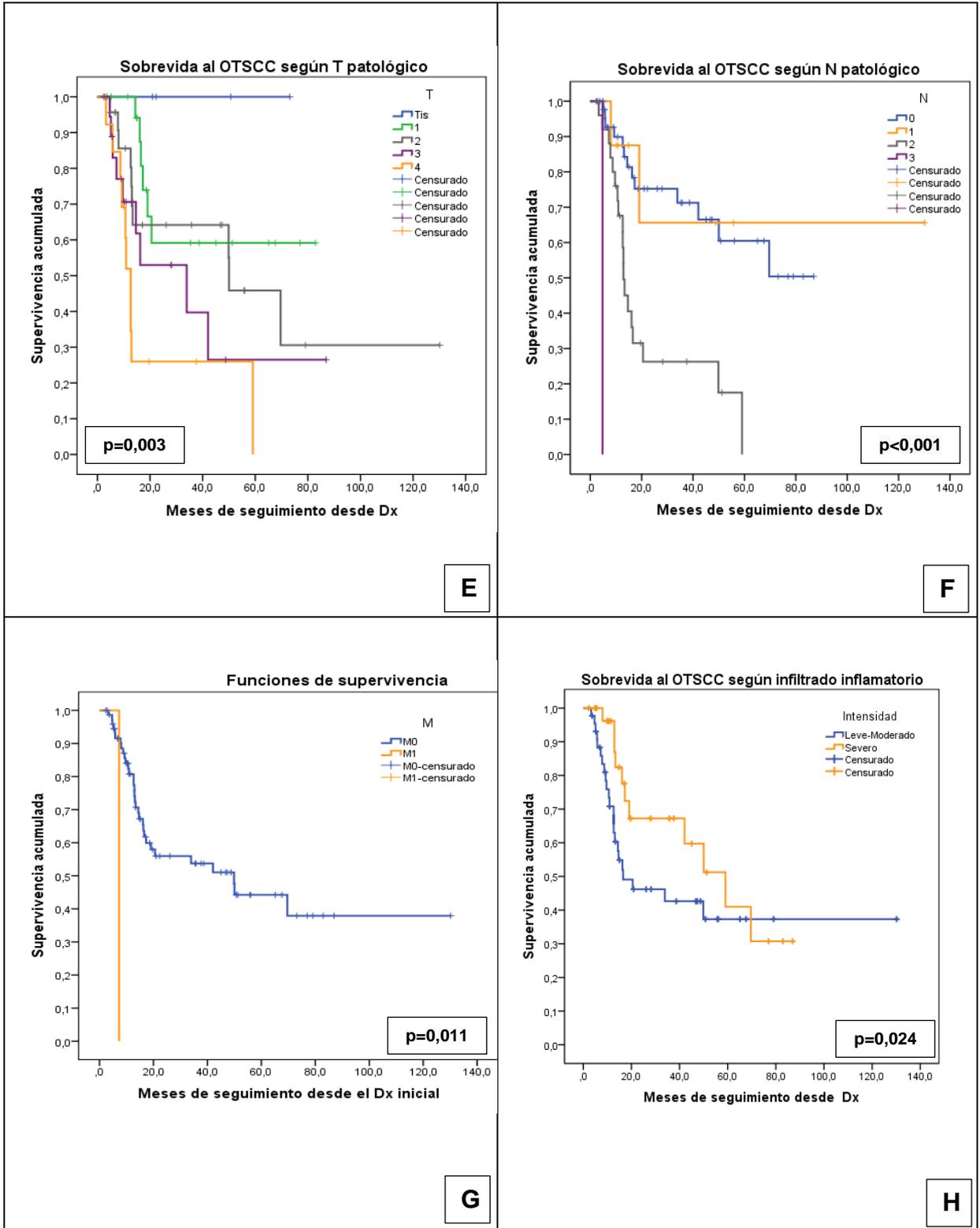
-- No aplica

\* Prueba de Log Rank o prueba de Breslow para la comparación de la supervivencia. Valor de p <0,05

Fuente: Elaboración propia

Figura 17 - Curvas de sobrevida: histopatológica.





Curvas de sobrevida con Kaplan Meier en 80 pacientes con OTSCC, Instituto de Cancerología Clínica las Américas, Medellín, 2008-2017, comparadas por A. Tamaño del tumor <math>< 3\text{cm}</math> y

Fuente: Elaboración propia

### **5.5 Modelo Predictivo para Marcadores Pronóstico de Sobrevida en OTSCC**

En la Tabla 13 se muestran las variables sociodemográficas, clínicas y tumorales que estuvieron asociadas con la DSS en el análisis univariado, pero sólo se presentan las que fueron significativas en el análisis multivariado. En el análisis univariado se identificó asociación del estado civil, estadio clínico, tipo de procedimiento quirúrgico realizado, localización y tamaño del tumor, compromiso de márgenes y nódulos linfáticos, grado de diferenciación, clasificación pT y pN; mientras que la presencia de LVI y PNI simultáneas no alcanzó una diferencia significativa ( $p=0,085$ ). Los resultados del análisis de sobrevida utilizando el modelo de riesgo proporcional de Cox identificaron como factores predictores independientes para una pobre sobrevida-específica a la enfermedad al estadio clínico avanzado (HR=5.3 veces) y el grado de diferenciación del tumor pobre (HR=3.8 veces). Este riesgo se redujo un 66% cuando el tumor se localizó en la parte móvil de la lengua.

**Tabla 13** - Análisis bivariado y multivariado de la sobrevida de los pacientes con OTSCC, IDC Clínica Las Américas, Medellín, 2008-2017.

Variables		Univariado DSS			Multivariado DSS		
		<sup>a</sup> HR	IC 95% (HR)	Valor p*	<sup>a</sup> HR	IC 95% (HR)	Valor p*
<b>Estado civil</b>	Con pareja	1					
	Sin pareja	0,62	0,41 ; 0,46	<b>0,030*</b>			
<b>Estadio AJCC</b>	<sup>b</sup> Temprano	1			1		
	<sup>c</sup> Avanzado	5,37	2,21 ; 13,06	<b>0,000*</b>	5,29	2,12 ; 13,18	<b>0,000*</b>
<b>Tratamiento</b>	Cx	1					
	Cx + RT	1,78	0,79 ; 3,99	0,164			
<b>Procedimiento Cx</b>	Cx + RT + QT	2,25	0,89 ; 5,71	0,087			
	Resec local	1					
<b>Disección cervical</b>	Glos. parcial	1,99	0,47 ; 8,52	0,352			
	Glos. total	7,06	1,57 ; 31,88	<b>0,011*</b>			
<b>Localización lengua</b>	Si	1					
	No	0,57	0,28 ; 1,17	0,123			
<b>Tamaño cm</b>	Base	1	0,23 ; 0,87	<b>0,019*</b>	1	0,16 ; 0,71	<b>0,004*</b>
	Móvil	0,44			0,34		
<b>Márgenes positivos</b>	< 3	1	1,62 ; 7,20	<b>0,001*</b>			
	≥ 3	3,42					
<b>Nódulos linfáticos</b>	No	1	1,03 ; 4,04	<b>0,041*</b>			
	Si	2,04					
<b>Grado diferenciación</b>	N0	1	1,53 ; 6,15	<b>0,002*</b>			
	<sup>d</sup> N+	3,07					
	Bien	1					
	Moderado	1,23	0,59 ; 2,57	0,584	1,07	0,51 ; 2,26	0,860
<b>Clasificación Pt</b>	Pobre	3,67	1,24 ; 10,86	<b>0,019*</b>	3,80	1,23 ; 11,89	<b>0,020*</b>
	T1	1					
<b>Clasificación Pn</b>	T2	0,20	0,07 ; 0,55	<b>0,002*</b>			
	T3	0,32	0,13 ; 0,79	<b>0,013*</b>			
	T4	0,53	0,21 ; 1,31	0,166			
	N0	1					
<b>LVI (SMA)</b>	N1	0,89	0,20 ; 3,93	0,873			
	<sup>e</sup> N2	4,02	1,94 ; 8,36	<b>0,000*</b>			
<b>PNI (S100)</b>	No	1					
	Si	1,79	0,84 ; 3,86	0,134			
<b>LVI+PNI</b>	No	1					
	Si	2,18	0,84 ; 5,65	0,108			
<b>Ki-67</b>	Ausente	1					
	Presente	1,89	0,92 ; 3,90	0,085			
<b>E-cad</b>	Neg-Leve	1					
	M+I	1,20	0,57 ; 2,52	0,627			
<b>α-SMA</b>	Neg-Leve	1					
	M+I	1,02	0,51 ; 2,06	0,953			
<b>MMP-9</b>	Neg-Leve	1					
	M+I	0,80	0,89 ; 3,65	0,101			
		1					
		1,25	0,62 ; 2,53	0,538			

Abreviaturas: OTSCC, Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma; IDC, Instituto de Cancerología; DSS, Disease-specific survival; AJCC, American Joint Committee on Cancer; Cx, Cirugía; RT, Radioterapia; QT, Quimioterapia; Resec, Resección; LVI, Invasión Linfovascular; SMA, Actina de Músculo Liso; PNI, Invasión Perineural; E-cad, E-cadherina; SMA, Actina de Músculo Liso; MMP-9, Metaloproteínasa de la Matriz 9; M+I, moderada más intensa.

<sup>a</sup>HR: razón de dos tasas de incidencia. <sup>b</sup>Estadio temprano: incluye 0, I, II. <sup>c</sup>Estadio avanzado: incluye III, IV. <sup>d</sup>N+ Incluye N1, N2b y c, N3. <sup>e</sup>N2 Incluye N2b y N2c

\* Valor de p <0,05. Fuente: Elaboración propia

## 6 DISCUSIÓN

Para el conocimiento de los autores, el pronóstico y la sobrevida del OTSCC y su asociación con las características sociodemográficas, clínicas, histopatológicas y la expresión de marcadores moleculares, no había sido reportada en esta población de Colombia. Nuestros hallazgos muestran que la sobrevida específica al OTSCC está influenciada por muchos de los factores pronósticos reconocidos, tales como, el estadio clínico avanzado, el mayor tamaño del tumor, el compromiso de los márgenes quirúrgicos y de los nódulos linfáticos, el grado de diferenciación pobre y el sistema de clasificación TNM. Además, surgen otras asociaciones que no han muy sido exploradas, como el estado civil de los pacientes y la intensidad del infiltrado inflamatorio. Un hallazgo importante de este estudio fue la detección de la presencia de invasión linfovascular y perineural de forma simultánea, y su asociación con el pobre pronóstico del OTSCC, además de asociarse con otras características histopatológicas importantes para el pronóstico (estadio clínico, grado de diferenciación, nódulos linfáticos). También se evidenció un menor porcentaje de sobrevida específica de la enfermedad a 5 años en este grupo en particular.

### 6.1 Características Sociodemográficas, Clínicas y Sobrevida

En cuanto a la edad y el sexo, se observó un promedio de 63 años y un 55% de hombres afectados, lo que coincide con lo encontrado en varios estudios de pacientes con OSCC y OTSCC en poblaciones de Turquía, Japón, Suecia, Estados Unidos, Croacia, Brasil, Finlandia, Israel e India, en donde se reportan rangos de promedio de edad entre 57-65 años, afectando principalmente a hombres (52-82%)  
3,16,63,64,66,107-118.

En este estudio, los casos fueron agrupados por edad de dos maneras. La primera, de acuerdo con la forma más frecuentemente expresada por otros estudios de pronóstico de OTSCC (mayores y menores de 60 años), y la segunda, de acuerdo con lo reportado como paciente joven en la mayoría de los estudios de cáncer oral (mayores y menores de 45 años). De acuerdo con lo anterior, no se encontró diferencia en la sobrevida para los diferentes grupos de edad evaluados, aunque el mayor porcentaje de sobrevida (DSS) a 5 años fue para los pacientes  $\leq 45$  años (62%).

Sin embargo, respecto a la edad, no hay un consenso en el punto de corte para categorizar a un paciente como joven. Diferentes estudios han reportado rangos que van desde los 30 hasta los 45 años <sup>83,119-121</sup>, lo que podría explicar la heterogeneidad en los resultados y, en consecuencia, dificultar la realización de comparaciones. Por lo tanto, algunos autores han recomendado que, se debería considerar como paciente joven solo a los menores de 30 años, por la mayor incidencia de metástasis a distancia y la tasa de mortalidad alta observada en este grupo <sup>119</sup>.

Al evaluar la relación entre el estado civil (con pareja y sin pareja) y la presentación del evento y su supervivencia, se encontró asociación para ambas ( $p$  0,020 y  $p$  0,025, respectivamente). El 62% de los pacientes con pareja presentaron la muerte o recaída del OTSCC, lo cual difiere de lo reportado por Wong et al. (2006) quienes encontraron, en un estudio retrospectivo de 1.010 historias clínicas, que los pacientes con OSCC casados tuvieron un mejor pronóstico que aquellos que eran solteros, viudos o divorciados (RR: 1.528,  $p$  = 0.008) <sup>122</sup>. Estas diferencias pueden atribuirse al tamaño muestral, a la falta de registro del estado civil en las historias clínicas y a las diferentes definiciones de estado civil usadas. Además, los estudios que abordan este tópico son escasos.

De otro lado, es importante considerar la localización del cáncer oral. Se ha demostrado que la lengua y el piso de la boca son los sitios más frecuentemente afectados por el cáncer, lo que se asocia con un comportamiento más agresivo, en comparación con otros lugares de la boca <sup>109,123</sup>. Generalmente se ha considerado que el cáncer de la base de la lengua es menos frecuente y tiene un mejor pronóstico que la porción móvil de la misma, lo cual podría explicarse por los diferentes factores de riesgo relacionados con cada localización. En el caso de los tumores que se originan en la base de la lengua, se ha demostrado que el Virus del Papiloma Humano juega un papel principal en su etiología <sup>124,125</sup>. Sin embargo, se ha reportado en población india mayor frecuencia de tumores en base de lengua, posiblemente a causa del uso generalizado de la mezcla de betel, que es un conocido carcinógeno oral <sup>126</sup>.

En el presente estudio, el 57,5% de los casos de OTSCC se localizaron en la porción móvil de la lengua. Sin embargo, los casos en la base de la lengua fueron los que se asociaron con un peor pronóstico y una menor sobrevida específica a 5 años. Además, el resultado del análisis multivariado mostró que la localización del tumor en

la base de la lengua fue un factor predictor para la menor supervivencia ( $p=0,004$ ). Un estudio realizado en Alemania, en una cohorte de 1.486 pacientes con cáncer oral, también encontró mayor número de casos en la lengua móvil ( $n=223$ ) que en la base ( $n=135$ ), y una menor tasa de supervivencia y DSS en aquellos casos con afección de la base de la lengua. Este resultado fue atribuido a una mayor frecuencia de metástasis nodal y a distancia <sup>127</sup>. Del mismo modo, Zhang et al. encontraron diferencias en la DSS a 3 y 5 años en pacientes con cáncer en base de lengua respecto a los de la porción móvil, siendo menor en aquellos con afectación de la base lingual. Reportaron además, una DSS a 5 años del cáncer de base de lengua del 26% respecto a un 46% en la porción móvil, resultados similares a los del presente estudio ( 21% y 59% respectivamente) <sup>128</sup>. Estos resultados sugieren, que se debe prestar especial atención a los casos que afectan la base de la lengua e individualizar su abordaje terapéutico.

Puesto que, en nuestro estudio, sólo se contó con la información clínica registrada en la historia y en el informe patológico, en algunas ocasiones la descripción de la localización del tumor no fue muy específica. En efecto, este fue el caso cuando sólo se registraba “el borde”, sin describir si era anterior, medio o posterior, o cuando sólo se registraba “tumor en lengua”. Por lo tanto, la falta de datos con respecto a la ubicación específica del OTSCC puede ser una fuente importante de sesgo de información durante el análisis. El uso de guías como la clasificación topográfica de la mucosa oral de Roed-petersen y Renstrup <sup>129</sup>, que ilustra en detalle las regiones anatómicas de la cavidad oral y de la lengua pueden ayudar a aumentar la calidad de los datos.

El estadio clínico y patológico se consideran parámetros esenciales en la determinación del pronóstico de los pacientes con cáncer. Como se ha reportado ampliamente en la literatura, el OSCC y OTSCC se diagnostican con mayor frecuencia en estadios avanzados <sup>61,83,97,100,111,115,124,130-135</sup>. En este estudio, el 58,8% de los casos correspondieron a estadios III y IV, lo cual concuerda con los hallazgos en diversas poblaciones. Sin embargo, en algunos lugares han logrado disminuir o invertir estos porcentajes como resultado de esfuerzos en la educación y detección temprana del OSCC y OTSCC <sup>62,109,112,123,136-138</sup>. En Colombia, en los últimos años, las facultades de odontología han realizado campañas de detección temprana de cáncer de lengua (“Sácale la lengua al cáncer”), en una iniciativa liderada por la IADR región

Latinoamérica (International and American Association for Dental Research), en un intento por reducir la morbilidad asociada al OTSCC <sup>139</sup>.

En este estudio, además, se observó una asociación significativa entre el estadio y la muerte o recaída del OTSCC ( $p < 0,001$ ), así como con la sobrevida (DSS) a 5 años ( $p < 0,001$ ). En efecto, el 76% de los pacientes con OTSCC en estadio temprano sobrevivieron al menos 5 años. Tras realizar el análisis multivariado, el estadio avanzado se mantuvo como un predictor de menor sobrevida (HR=5.29; 2.12-13.18;  $p < 0,001$ ). Rodríguez et al. también reportaron que los pacientes con estadio avanzado tuvieron menor sobrevida (cancer-specific survival) tanto en el análisis univariado (95%CI 62.2–77.3;  $p < 0.001$ ) como en el multivariado (HR=2.72; 95%CI 1.81–4.09;  $p < 0.001$ ) <sup>109</sup>.

Los retrasos en oncología pueden provenir de tres fuentes: el paciente, los profesionales y el tratamiento; siendo este último el periodo de tiempo entre la primera consulta del paciente con el especialista tratante y el inicio de la terapia ablativa o paliativa. En este estudio, se estableció que el tiempo promedio transcurrido entre el diagnóstico de OTSCC con biopsia y el inicio del tratamiento quirúrgico varió entre 0 y 14,2 meses, con un promedio de  $3,5 \pm 2,5$  meses. Además, en el 50% de los pacientes el tiempo varió entre 2,1 y 4 meses. Se ha reportado que un retraso de 4 a 6 semanas entre el diagnóstico definitivo y el tratamiento resulta aceptable desde la perspectiva oncológica, ya que un tiempo mayor reduce significativamente la sobrevida al aumentar el estadio clínico <sup>140</sup>.

A este respecto, una revisión en el 2015 del National Cancer Database (NCDB) encontró, que el tiempo promedio para el inicio del tratamiento específico del OTSCC fue de 32.8 días. Además, tras el análisis multivariado, uno de los predictores más fuertes para el aumento de dicho tiempo fue ser hispano <sup>141</sup>, como es el caso de nuestra población de estudio. En el presente estudio, el tiempo transcurrido hasta el inicio del tratamiento fue tres veces mayor, debido a que, generalmente, el diagnóstico de OTSCC se hizo por fuera de la institución en la que se realizó este estudio, incluso en municipios alejados de la ciudad, lo cual generó que los pacientes tuviesen múltiples consultas en otras instituciones antes de llegar al Instituto de Cancerología Clínica las Américas. Otro factor que influyó en el retraso del tratamiento, fue el retraso en la autorización de la atención por parte de las empresas aseguradoras en salud. La oncología de cabeza y cuello enfatiza la necesidad del diagnóstico y tratamiento

tempranos, para reducir el riesgo de propagación micrometastásica, la morbilidad asociada al tratamiento y mejorar la calidad de vida.

## 6.2 Características Histopatológicas y Sobrevida

Actualmente, algunas características histopatológicas poseen una utilidad reconocida como marcadores pronóstico de la enfermedad. Entre ellas, la clasificación TNM, el espesor del tumor y el grado de diferenciación histológico. Sin embargo, se desconoce, o es controversial, la utilidad de otros hallazgos histopatológicos. En este estudio, tras realizar el análisis bivariado, el mayor tamaño del tumor, los márgenes y nódulos linfáticos comprometidos, y una mayor clasificación T y N patológica se asociaron con un peor pronóstico y una menor sobrevida ( $p < 0,05$ ), lo cual concuerda con los resultados reportados por otros estudios en OSCC y OTSCC<sup>63,104,135</sup>. Sin embargo, en el análisis multivariado, el único factor predictivo independiente fue el grado de diferenciación pobre (HR= 3,8;  $p=0,020$ ), inicialmente reportado en el informe histopatológico original, y que, fue realizado según la clasificación de los tumores de cabeza y cuello de la World Health Organization<sup>106</sup>.

En cuanto a la diferenciación histológica, se observó una mayor frecuencia de OTSCC bien diferenciados. En el frente de invasión, el grado de diferenciación tuvo asociación con un peor pronóstico ( $p=0,004$ ), mientras que en el tumor completo la pobre diferenciación fue un factor predictivo independiente para una menor sobrevida específica de la enfermedad (DSS HR=3.8; 95%CI 1.23–11.89;  $p=0,020$ ). Otros estudios han obtenido resultados similares (DSS HR=2.00; 95%CI 1.07–3.73;  $p=0,03$ )<sup>109</sup>, (DFS HR=6.44;  $p=0,001$  y OS HR=22.91;  $p=0,001$ )<sup>142</sup>. Esto podría reflejar la biología de los tumores indiferenciados, los cuales presentan gran poder invasivo.

Confirmar tales hallazgos en estudios futuros podría permitir que este parámetro histológico adquiriera una mayor importancia pronóstica y tal vez podría ser incluido en la clasificación TNM. También se sugiere evaluar el grado de diferenciación con un sistema de clasificación más objetivo, como el propuesto por Bryne et al<sup>103</sup>, tanto en el tumor completo como en el frente de invasión, ya que las células tumorales más profundas podrían exhibir un menor grado de indiferenciación.

Otra característica histopatológica estudiada fue la extensión extranodal (ENE). En este estudio se encontró un alto porcentaje de ENE (42,4%). Sin embargo, este

parámetro, no tuvo asociación con la sobrevida, contrario a lo reportado en otros estudios en donde reportan que la ENE es poco frecuente (6,8%) y, quizás, debido a ello, esta no tuvo influencia en la sobrevida ( $p=0.10$ )<sup>109</sup>. Jardim et al. reportaron la ENE como un factor que influyó negativamente la sobrevida global HR=2.99 (95% CI 1.72–5.21;  $p=0,004$ ) y libre de enfermedad HR=2.11 (95% CI 1.26–3.55;  $p=0,004$ ) del OSCC<sup>104</sup>. Estos resultados fueron muy similares a un estudio de sobrevida previo, realizado en India en 586 casos de OTSCC. Ellos reportaron un 66% de presencia de ENE y asociación con pobre sobrevida (OS HR=2.6; 95% CI 1.5–4.4;  $p<0,001$  y DFS HR=2.2; 95% CI 1.6–2.9;  $p<0,001$ )<sup>135</sup>. Sin embargo, en el presente estudio no se logró establecer esta asociación, pero sí se observó, que ninguno de los casos con ENE positiva sobrevivió a los 5 años. Tal vez en este estudio la muestra pudo ser insuficiente para evidenciar dicha asociación.

De otro lado, en este estudio se encontró un infiltrado inflamatorio de intensidad moderada a severa en la mayoría de los casos (91,8%), y asociación con pobre sobrevida (DSS) en aquellos con un infiltrado leve a moderado ( $p=0,024$ ). Estudios previos<sup>108,117,143</sup> han reportado que los OSCC y OTSCC muestran una respuesta inflamatoria más intensa en la interface tumoral, en comparación con el resto de carcinomas escamocelulares de cabeza y cuello, y que esto se relaciona con una mejor respuesta a la radioterapia y una menor recurrencia. Otros estudios, además, encontraron una mayor frecuencia del patrón de infiltrado inflamatorio denso en OTSCC<sup>111,116</sup>. Estos hallazgos indican la importancia de evaluar no sólo la intensidad del infiltrado inflamatorio asociado al OTSCC, sino también, la composición específica y su perfil protumorigénico o antitumorigénico. Se ha demostrado que un infiltrado con alto porcentaje de células T CD8<sup>+</sup>, células T Natural Killer CD57<sup>+</sup>, macrófagos asociados a tumores M1, tiene actividad antitumorigénica, y se asocia con mejor pronóstico en OSCC<sup>143</sup>.

Finalmente, este estudio evaluó la invasión linfovascular y perineural. La LVI se ha definido como la presencia de agregados de células tumorales dentro de canales revestidos por endotelio, o la invasión de la capa media de un vaso con ulceración de la capa íntima. La LVI, además, se considera una buena herramienta pronóstica y su impacto es significativo en la sobrevida del OSCC<sup>144,145</sup>. Sin embargo, la dificultad en reconocer este parámetro con precisión ha evitado su inclusión en los sistemas de graduación del cáncer<sup>144</sup>.

En efecto, el reporte de la presencia de LVI en OSCC y OTSCC varía considerablemente entre los estudios cuando la evaluación se realiza en placas teñidas con H&E (2 – 40.8%)<sup>16,104,109,117,135,145</sup>, pero aumenta cuando se evalúa con ayuda de ciertos marcadores e inmunohistoquímica<sup>61,116</sup>. Por ejemplo, algunos estudios han reportado la visualización de estructuras vasculares con la marcación para  $\alpha$ -SMA<sup>137,138</sup>. En este estudio, la LVI se identificó sólo en el 13,8% de los pacientes y, fue desconocida en el 7,5% de los casos, debido a que, no fue reportada en el informe histopatológico original. Inclusive, luego de realizar una segunda revisión de las láminas H&E, su detección permaneció baja (9,6%). Finalmente, cuando se hizo la marcación con  $\alpha$ -SMA se logró identificar un gran porcentaje de casos positivos (60,3%) y, además, se pudo analizar en detalle no sólo el patrón de invasión acorde con la circunferencia de los vasos, sino también la profundidad de las paredes vasculares comprometidas.

Adicionalmente, hubo asociación ( $p < 0,05$ ) entre la presencia de LVI y los tumores moderada a pobremente diferenciados, similar a otros resultados reportados en la literatura<sup>104</sup>. Por el contrario, Kurtz et al. no encontraron asociación entre la invasión vascular y la metástasis a nódulos linfáticos, ni el estadio o grado de diferenciación en OSCC. Sin embargo, el análisis de sobrevida demostró que la presencia de invasión vascular fue un predictor de mortalidad (HR=4; IC 95% 1.5-10.8;  $p = .006$ )<sup>61</sup>.

En lo concerniente a nuestro estudio, los resultados mostraron una asociación entre la presencia de LVI y la muerte/recaída del OTSCC ( $p = 0,031$ ), pero no con la sobrevida específica de la enfermedad a 5 años. Del mismo modo, Thiagarajan et al. no encontraron asociación entre la LVI con la sobrevida total y libre de enfermedad en 586 pacientes con OTSCC<sup>135</sup>. Otro estudio que sólo incluyó pacientes con OSCC en estadios tempranos (I y II) tampoco encontró dicha asociación<sup>142</sup>. Otros estudios sí han encontrado que la LVI afecta negativamente la sobrevida total, la sobrevida libre de enfermedad y el intervalo libre de enfermedad (DFI) en OSCC y OTSCC.<sup>104,109</sup> Al comparar los resultados, debe considerarse que, algunos de los estudios mencionados incluyeron casos en todos los estadios, y uno de ellos, sólo incluyó estadios tempranos; además que, las definiciones de sobrevida usadas por los estudios (OS, DFS, DFI), fueron diferentes a la usada en el presente estudio (DSS).

Por otra parte, generalmente sólo se define que la presencia de LVI es positiva cuando el carcinoma entra a la luz del vaso sanguíneo o linfático<sup>142</sup>. Cabe resaltar

que, en nuestros resultados, aquellos casos con presencia de células tumorales en la circunferencia completa de los vasos, las capas adventicia o íntima tuvieron menor porcentaje de sobrevida específica de la enfermedad a 5 años. Esto sugiere la importancia de evaluar no sólo la afectación de la capa íntima, sino también los diferentes patrones de invasión vascular y explorar su relación con el pronóstico y la sobrevida.

Es sabido que, las vías clásicas para la diseminación del cáncer son los vasos sanguíneos y linfáticos. Sin embargo, una tercera vía ha sido estudiada con mayor interés en los últimos años: la invasión perineural<sup>53</sup>. Durante el análisis histopatológico inicial de los tumores, los patólogos deben reportar decenas de características histológicas importantes para orientar el pronóstico y la elección del tratamiento, por lo que esto pudiera hacer que hallazgos como la LVI y la PNI pasen desapercibidos. Además, la PNI es difícil de detectar en cortes histológicos teñidos con H&E, ya sea por el tamaño reducido de los nervios, el tamaño y el patrón de la infiltración tumoral, la alteración del tejido adyacente al tumor, la densidad del infiltrado inflamatorio, entre otros factores<sup>61,62</sup>. S100 es un marcador de superficie membranal de la célula de Schwann, por lo que su detección, mediante inmunohistoquímica, se ha considerado un método eficaz para la detección de invasión perineural oculta en cáncer oral<sup>63</sup>.

En el presente estudio, no fue posible evaluar la concordancia de la detección de la PNI entre el reporte original y la segunda revisión de las láminas (H&E), debido a la definición utilizada en el primero (dicotómica: si y no), así como a la falta de su reporte en algunos de los casos. Sin embargo, se encontró una concordancia moderada ( $\kappa=0,41$ ) entre la detección de PNI+H&E durante la revisión de los casos y la inmunotinción (PNI+S100). Debido posiblemente a que, en primer lugar, la marcación con S100 es más precisa que la observación de cortes coloreados con H&E. Y, en segundo lugar, el uso de cortes histológicos seriados podría generar la visualización de un pequeño nervio en un corte, pero no en el siguiente. Se ha reportado gran variabilidad interobservador al evaluar la PNI, en láminas teñidas con H&E en OSCC, lo cual podría reflejar, la gran variedad de criterios utilizados para definir su presencia. Chi et al., encontraron un acuerdo interobservador aceptable ( $\kappa=0,38$ ) después de evaluar una encuesta con microfotografías enviada a patólogos expertos para detectar la presencia de la PNI. Además, encontraron una concordancia leve ( $\kappa=0,10$ ) entre los criterios usados para definir la PNI, por lo que sugieren usar

criterios más objetivos, reproducibles y ampliamente aceptados para su evaluación <sup>146</sup>.

La detección de la PNI en OSCC y OTSCC varía entre los estudios que la evalúan con la tinción de rutina (H&E) (22,9 – 67,9%) <sup>16,63,104,109,114,116–118,135</sup>. Kurtz et al. (2005) evaluaron 40 pacientes con OSCC, la mayoría localizados en lengua. Reportaron la presencia de PNI en el 30% de los reportes originales, en el 62% al realizar la relectura de las láminas y en el 82% después de la marcación con S100 <sup>61</sup>. Del mismo modo, Schmitd et al., al evaluar láminas teñidas con H&E de muestras de OSCC, encontraron PNI presente en el 22,5% de los casos, posteriormente, tras la tinción con el marcador S100, su detección aumentó a un 33,8% <sup>63</sup>.

En este estudio la PNI se identificó en el 45% de los reportes originales y no fue reportada en el 12,5% de los casos. Tras una segunda revisión de las láminas teñidas con H&E su detección aumentó a un 78%. Pero, con la marcación con S100, este porcentaje fue del 75,3%. Esta diferencia puede deberse a la similitud de algunas estructuras histológicas del tejido conectivo con los nervios, o el tamaño pequeño de algunos de ellos, lo que podría dar lugar a resultados falsos positivos <sup>61,62</sup>. Por otro lado, también se evidenció un patrón de invasión predominante de la circunferencia completa del nervio (35,6%) e intraneural (32,9%), los cuales tuvieron un menor porcentaje de sobrevida a 5 años. Los diversos patrones de la PNI (extraneural, perineural e intraneural) pueden representar diversas etapas en la propagación tumoral, la cual es desencadenada por interacciones entre las células tumorales, el tejido nervioso y el microambiente <sup>117</sup>. Sugerimos, entonces, clasificar los hallazgos de la PNI de acuerdo con el patrón de invasión para explorar su importancia en el pronóstico del cáncer oral.

Por otra parte, también se ha reportado asociación entre la presencia de PNI en OSCC y el estadio clínico, la clasificación T (Tumor) y N (Nódulos) patológica avanzada, el tamaño del tumor, los márgenes comprometidos, la extensión extranodal, la pobre diferenciación tumoral, la LVI y la mayor profundidad de invasión <sup>117,147</sup>. Sin embargo, también existen estudios que contradicen algunas de estas asociaciones <sup>61,63</sup>. En el presente estudio, sólo se encontró asociación entre la PNI y el estadio clínico, el vaciamiento ganglionar, el grado de diferenciación en el frente de invasión tumoral y la presencia de LVI ( $p < 0,05$ ). No encontramos asociación estadísticamente significativa con variables como la localización y el tamaño del

tumor, pero sí una tendencia a presentar mayor porcentaje de PNI positiva en los tumores localizados en la porción móvil de la lengua y  $\geq 3$  cm. A este respecto, Manjula et al. Reportaron una asociación entre PNI y el tamaño del tumor, pero cuando este era  $>4$  cm. Esto sugiere que los tumores más grandes son más propensos a desarrollar PNI. También se reportó que no existió asociación entre la PNI y el grado de diferenciación, pero sí mayor porcentaje de PNI en tumores pobremente diferenciados <sup>117</sup>. En nuestro caso encontramos lo contrario, mayor PNI en los tumores bien diferenciados. Por lo tanto, es necesario esclarecer la asociación entre la PNI y el grado de diferenciación histológica en estudios posteriores y dilucidar si la PNI es un evento temprano o tardío en el proceso de diferenciación de los tumores.

Respecto al pronóstico y a la sobrevida, no encontramos una asociación entre la presencia de PNI con la muerte o recaída por el OTSCC ( $p=0,065$ ), ni con la sobrevida específica de la enfermedad a 5 años ( $p=0,099$ ), pero sí una tendencia a menor porcentaje de sobrevida (DSS a 5 años del 35%) en aquellos con PNI positiva. Lo anterior coincide con otro estudio que evaluó la presencia de PNI (S100) en 71 casos de OSCC y reportó menor OS y menor DSS en casos con PNI positiva, aunque no hubo diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,098$  y  $p=0,106$ , respectivamente) <sup>63</sup>.

Por el contrario, otros estudios han reportado que la PNI es un factor predictor independiente para una menor sobrevida total y libre de enfermedad del OSCC avanzado (HR=1.72; CI 95% 1.10–2.70;  $p=0,01$  y HR=1.58; CI 95% 1.04–2.41;  $p=0,03$  respectivamente) <sup>104</sup>, como también para una menor sobrevida específica del OSCC (HR=1.57; 95%CI 1.06–2.31;  $p=0.02$ ) y un menor intervalo libre de enfermedad (HR=1.58; 95%CI 1.15–2.16;  $p=0.004$ ) <sup>109</sup>. Resultados similares se han reportado para el OTSCC (DFS HR=1.9; 95%CI 1.4–2.6;  $p=0,001$ ) <sup>135</sup>. Mientras que, otros estudios no han encontrado asociación de la PNI con la sobrevida y el pronóstico en OSCC (OS HR=1.15;  $p=0.81$ . DFS HR=1.03;  $p=0.96$ . Mortalidad HR=2.4; IC 95% 0.5-10.6;  $p=.25$ ) <sup>61,142</sup>, ni en OTSCC en estadios tempranos (recurrencia local HR=1.25; IC 95% 0.82-1.92. Mortalidad HR=0.87; IC 95% 0.51-1.48) <sup>118</sup>. Esto podría reflejar la relación de la PNI con etapas avanzadas de la enfermedad. Por lo tanto, aún no hay un consenso entre los estudios respecto al verdadero valor pronóstico de la PNI en OSCC y OTSCC, pero los resultados en general de los estudios, incluido el presente, indican la importancia de seguir explorando la PNI como un factor pronóstico.

Apesar de que, en el presente estudio encontramos un gran porcentaje de PNI, no evaluamos el calibre de los nervios y esto podría tener importancia respecto al pronóstico. Se sugiere, en estudios futuros, evaluar no solo la presencia de PNI, sino el patrón de la invasión, la distancia tumor-nervio y el tamaño de los nervios comprometidos, en busca de asociaciones con trascendencia clínica. Incluso, se ha reportado la importancia de evaluar, el número de focos presentes y la localización respecto a la masa tumoral para una adecuada estratificación de la PNI y permitir su asociación con sobrevida y otros tipos de desenlace <sup>147</sup>.

Por otro lado, la marcación con S100 demostró ser un método útil, sensible y específico para la detección de nervios. En efecto, esta marcación permitió identificar la PNI en nervios de calibre pequeño, aun con baja magnificación. La evaluación de la presencia de PNI mediante el uso de S100 incluso en biopsias para el diagnóstico inicial, podría mejorar su detección en la fase diagnóstica, lo cual podría influir en la planeación del tratamiento y en la cirugía definitiva. Esto, pues aquellos pacientes con PNI podrían beneficiarse de un tratamiento quirúrgico más agresivo <sup>63</sup>.

Por otra parte, se ha reportado que es mayor el riesgo de presentar LVI cuando hay PNI presente (OR=19.6; 95% CI: 5.3 - 72.3; p=0,001) <sup>117</sup>. En el presente estudio se observó la presencia simultánea de LVI+PNI en el 52,1% de los casos de OTSCC, lo cual se asoció con el estadio clínico, la disección ganglionar, el grado de diferenciación, el compromiso de márgenes y nódulos linfáticos (p<0,05). También se encontró asociación con la muerte o la recaída (p=0,039). Aunque en el análisis univariado no encontramos asociación con la sobrevida (p=0,085), sí se observó un mayor porcentaje de sobrevida específica de la enfermedad a 5 años en aquellos que no presentaron ni LVI ni PNI (53%), y aquellos con presencia de solo una de ellas (56%), en comparación con aquellos con presencia simultánea de LVI y PNI (31%).

En lo concerniente a otros estudios, Chen et al. encontraron que un 18,5% de casos con OSCC presentaron LVI y/o PNI principalmente cuando el tumor se localizó en la lengua. Tampoco encontraron diferencias significativas en la sobrevida libre de enfermedad a 5 años (p=0,48), en la sobrevida total (p=0,25), ni en la recurrencia local o regional <sup>142</sup>. Esto probablemente se explica porque los casos correspondían a estadios tempranos. Por esta razón, se deben validar estos resultados en estudios que evalúen todos los estadios y que incluyan un mayor número de casos de OTSCC.

Con base en nuestros hallazgos, la marcación de  $\alpha$ -SMA y S100 mejora la identificación de la invasión linfovascular y perineural, no sólo definiendo el estatus de presencia y ausencia, sino posibilitando el análisis detallado del patrón y la extensión de la invasión. Más allá de esto, el hallazgo de ambos tipos de invasión de manera simultánea afecta el pronóstico y reduce el porcentaje de supervivencia a 5 años. El uso rutinario de la inmunotinción en la fase diagnóstica podría sugerir la posibilidad de metástasis ganglionar, orientar la elección de un tratamiento más individualizado y, con ello, mejorar la supervivencia de los pacientes con OTSCC.

### 6.3 Expresión de Biomarcadores y Supervivencia

En este estudio, seleccionamos los marcadores moleculares Ki-67, E-cadherina, MMP-9 y  $\alpha$ -SMA, descritos como parte de los 10 marcadores más estudiados por su valor pronóstico en OTSCC<sup>8</sup>, y que reflejan dos sellos del cáncer, la insensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento y la invasión tisular y la metástasis<sup>69</sup>. Ki-67 es una proteína nuclear detectada en todas las fases activas del ciclo celular<sup>75</sup>, y que ha sido usada para evaluar la proliferación celular y la agresividad tumoral del OTSCC. Sin embargo, la gran heterogeneidad en los datos de los numerosos estudios impiden que exista la evidencia suficiente para considerar su valor como marcador pronóstico<sup>8</sup>.

En este estudio, no se logró identificar una asociación entre la expresión de Ki-67 con el pronóstico ( $p=0,920$ ) ni con la DSS ( $p=0,936$ ). A este respecto en Colombia sólo se ha realizado un estudio incipiente de la expresión de Ki-67 en OTSCC sin ningún resultado concluyente<sup>22</sup>.

Gontarz et al. (2015), reportaron que la alta expresión de Ki-67 en OSCC (lengua y piso de boca) fue un factor predictor independiente para una menor supervivencia a 5 años (DSS y DFS) con un HR= 4.54 (95% CI 1.91–10.78;  $p=0,001$ ) en el análisis multivariado, junto a otros factores como la localización en la lengua (HR= 4.18;  $p=0,002$ ) y el compromiso de los nódulos linfáticos (HR=2.38;  $p=0,033$ )<sup>133</sup>. Yu et al., en el mismo año, concluyeron que la sobreexpresión de Ki-67 se asoció con un OTSCC más agresivo y de peor pronóstico (OS  $p=0,06$ . RFS,  $p=0,041$ ). Ellos, además, encontraron una expresión alta de Ki-67 en el 24% de los casos, y asociación con el tamaño y con el grado de diferenciación del tumor ( $p < 0,05$ )<sup>74</sup>. Por el contrario,

Hwa et al. (2015), no encontraron ninguna asociación ( $p=0,450$ ) de la expresión de Ki-67 con características clinicopatológicas ni con la sobrevida (DSS) en 25 pacientes con OTSCC<sup>82</sup>, al igual que en otros estudios más recientes que evaluaron su expresión en OSCC<sup>83,84</sup>. El valor pronóstico de Ki-67 en cáncer oral aún es controversial en la literatura.

Como es sabido, la transición epitelio mesénquima (EMT) consiste en la expresión reducida de marcadores epiteliales y el aumento en los marcadores mesenquimales; y es considerada un paso clave en la carcinogénesis, la invasión, la metástasis y es predictor de la progresión en el OTSCC<sup>136</sup>. La coexpresión de E-cadherina/vimentina ha sido evaluada en OTSCC, encontrando que, en el frente de invasión tumoral, la expresión de E-cadherina disminuye mientras que la de vimentina aumenta durante la EMT y este hallazgo se correlaciona con etapas avanzadas de la enfermedad<sup>148,149</sup>.

En el presente estudio, la E-cadherina fue expresada en todos los casos de OTSCC, la mayoría de ellos, con una expresión moderada a intensa (63%). Sin embargo, no se evidenció asociación entre la expresión de E-cadherina con el pronóstico ( $p=0,203$ ), con la sobrevida (DSS  $p=0,143$ ), como tampoco con las características clínicas e histopatológicas en general, excepto para el grado de diferenciación, en donde los tumores bien diferenciados presentaron principalmente expresión moderada a intensa del marcador ( $p=0,009$ ).

Un estudio reportó conservación de la expresión de E-cadherina en la membrana de las células tumorales del OTSCC en el 68,5% de los casos, mientras que su ausencia se observó en el 16,6% de los casos. Además, la expresión de este marcador se asoció con el grado de diferenciación del tumor ( $p=0,007$ ), mientras que su ausencia, en el frente de invasión tumoral, se relacionó con una mayor recurrencia nodal y locoregional ( $p=0,028$ ), así como, una menor sobrevida (DFS,  $p=0,018$ ). Tras el análisis univariado y multivariado, se evidenció un aumento del riesgo de una menor sobrevida (DFS, HR = 1.566;  $p= 0.045$  y OS, HR = 1.224;  $p= 0.003$ ) respectivamente, cuando la E-cadherina no se expresaba en la membrana de las células tumorales del frente de invasión<sup>149</sup>. Resultados similares a otros estudios en OTSCC<sup>130,136</sup>. Luo et al., realizaron un metanálisis de la expresión de E-cadherina y el pronóstico de OSCC. Después de calcular el riesgo de la baja expresión de E-cadherina para la sobrevida total (HR=0,65; 95% CI 0.52–0.80;  $p<0,001$ ), concluyeron que la expresión reducida

de este marcador parecía asociarse con menor supervivencia, en contraste con aquellos con expresión normal o alta del mismo <sup>150</sup>.

Respecto a la asociación encontrada entre la expresión de la E-cadherina y el grado de diferenciación tumoral, Liu et al. (2017) reportaron al igual que en este estudio, que la alta expresión de E-cadherina, se asoció con mayor grado de diferenciación tumoral ( $p < 0,001$ ), además de asociarse con el estadio avanzado ( $p = 0,0013$ ) y la metástasis a nódulos linfáticos ( $p = 0,007$ ) <sup>136</sup>. Resultados similares a los reportados por otros estudios <sup>148,151-153</sup>. Esto podría explicarse, como pudiera ser previsto, por la relación entre el grado de diferenciación epitelial y la expresión de moléculas de adhesión celular. Por lo tanto, es de esperarse una mayor expresión de la E-cadherina en OTSCC bien diferenciados, ya que es una neoplasia que conserva la cohesividad intercelular y son menos invasivos que los pobremente diferenciados.

En nuestro estudio no se observó asociación entre la expresión de la E-cadherina con la positividad de los nódulos linfáticos. Al igual que otros estudios previos en OSCC <sup>151,152,154</sup>.

Para finalizar, Sgaramella et al. (2018) reportaron diferencias en la expresión de E-cadherina en tejido tumoral de OTSCC, según el origen étnico y geográfico (Escandinavia y sur de Italia). Ellos reportaron mayor proporción de alta expresión de dicho marcador en pacientes suecos que en italianos ( $p = 0,039$ ), la cual se asoció a una menor supervivencia ( $p = 0,016$ ). Por lo tanto, lo anterior resalta la necesidad de tener en cuenta la influencia de la variación étnica y geográfica de los pacientes con OTSCC, al comparar los resultados de los estudios respecto a la expresión de E-cadherina y el resultado clínico asociado <sup>155</sup>.

El proceso de la tumorigénesis en el OTSCC también involucra la destrucción de la matriz extracelular. Es sabido que las metaloproteinasas de la matriz (MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-11) producidas tanto por las células tumorales como por las del estroma, se encargan de la degradación de la matriz extracelular y, por ende, facilitan la migración y la liberación de factores de crecimiento, lo que promueve la invasión y la metástasis <sup>93,95</sup>. En el caso del OTSCC, por ejemplo, se ha descrito la sobreexpresión del ARNm de MMP-9 en el tejido tumoral <sup>149</sup>.

En el presente estudio, el 89% de los tumores evaluados expresaron el marcador MMP-9, de los cuales el 38,4% tuvieron una expresión leve del marcador por las células tumorales. Sólo hubo asociación entre la expresión de MMP-9 y la

clasificación T patológica ( $p=0,011$ ), donde a mayor T patológica mayor fue la expresión del marcador. Respecto al pronóstico, no se vio afectado por la expresión o falta de expresión de la MMP-9 ( $p=0,874$ ). Si bien, la sobrevida y la expresión del marcador no tuvieron asociación ( $p= 0,590$ ), si se evidenció el doble de porcentaje de sobrevida específica a la enfermedad a 5 años entre aquellos con expresión negativa o leve del marcador.

Mäkinen et al. (2012), encontraron de manera similar, la expresión de MMP-9 en el 83% de 70 OTSCC en estadios tempranos. Además, reportaron una frecuencia superior de células inmunopositivas con expresión moderada (44%) del marcador, y ninguna asociación con las características clinicopatológicas ni con el pronóstico <sup>156</sup>. En general sus hallazgos concuerdan con nuestros resultados. Sin embargo, hay que tener en cuenta, que sólo evaluaron tumores en estadios tempranos, y que, la evaluación de la inmunopositividad que usaron solo consideraba la cantidad de células expresada en porcentaje, mientras que en este estudio se utilizó un puntaje resultado de la multiplicación de la cantidad por la intensidad, que ha sido ampliamente usado en este tipo de estudios. Estudios más recientes <sup>100,133</sup>, han fallado también en encontrar una asociación entre la expresión de MMP-9 y las características clinicopatológicas y la sobrevida del OSCC.

Por el contrario, Miranda et al. (2017), encontraron asociación estadísticamente significativa entre la expresión de dicho marcador y el sitio anatómico (OSCC la mayoría en lengua), tamaño del tumor, nódulos con metástasis y estadio clínico, pero no con la sobrevida <sup>83</sup>. Del mismo modo, otro estudio reportó asociación entre una mayor expresión de MMP-9 y los nódulos linfáticos positivos, junto con una menor sobrevida (OS) <sup>157</sup>. Thangaraj et al. (2016), reportaron un 81,4% de casos de OTSCC con alta expresión de MMP-9, la cual se asoció con un mayor grado de diferenciación histológica del tumor ( $p=0,026$ ), fracaso del tratamiento ( $p=0,000$ ) y el patrón de recurrencia ( $p=0,006$ ). También encontraron que los pacientes con alta expresión de MMP-9 tuvieron mayor riesgo de tener una menor sobrevida (DFS HR=2.259; IC 95% 1.022–4.997;  $p=0,044$ ), mientras que los que presentaron baja expresión del marcador tuvieron una mayor sobrevida ( $p= 0,029$ ) <sup>149</sup>.

Otros estudios también han encontrado asociación entre la expresión de MMP-9 y algunas características clinicopatológicas, y con el pronóstico y la sobrevida del OTSCC <sup>101,158</sup>. Adicionalmente, Aparna et al. (2015), un 100% de sensibilidad y 83%

de especificidad de la expresión de MMP-9 para la recurrencia del tumor, y 88,9% de sensibilidad y 88% de especificidad para la metástasis, concluyendo que es un buen marcador de pronóstico en pacientes con OTSCC <sup>101</sup>. Esta diferencia en los resultados, podría atribuirse a que en algunos estudios se evaluó la expresión del marcador en las células tumorales, mientras que, en otros no separaron la expresión intratumoral del estroma asociado. También se usaron diferentes sistemas y puntos de corte, para evaluar la positividad de la expresión de MMP-9, y esto dificulta la comparación directa de los resultados.

Una de las células más representativas y estudiadas del estroma en cáncer oral es el fibroblasto. Las células cancerosas liberan Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- $\beta$ ) y de esa manera los fibroblastos adquieren un fenotipo activado denominado fibroblasto asociado a cáncer (CAF's), fibroblasto asociado a tumor (TAF's), fibroblasto peritumoral, miofibroblasto, entre otros <sup>71</sup>. La alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) es un marcador expresado por células musculares lisas vasculares, pericitos y células mioepiteliales y, a pesar de no ser un marcador específico para CAF's, ha sido ampliamente utilizado para caracterizarlos <sup>92,110,137,159,160</sup>. Además, existe una expresión diferencial del marcador mesenquimal  $\alpha$ -SMA entre fibroblastos normales y CAF's, que componen el microambiente tumoral (TME). Asimismo, un incremento en los CAF's se relaciona con el inicio y la progresión tumoral, a través de la transición epitelio-mesénquima (EMT) y del mejoramiento en el potencial migratorio de las células en el OTSCC, afectando el pronóstico <sup>110,159</sup> e, inclusive, confiriendo quimio-resistencia a las células tumorales <sup>161</sup>.

En este estudio, la expresión del marcador  $\alpha$ -SMA fue negativa en el 41,1% de los casos. Además, en aquellos donde esta fue positiva, la mayoría tuvieron expresión leve (31,5%), lo cual concuerda con estudios previos <sup>111,113</sup>. Pero, no se encontró asociación entre la expresión de  $\alpha$ -SMA y la muerte o recaída por OTSCC ( $p=0,483$ ), ni con la supervivencia (DSS  $p=0,074$ ). Lo que sí se encontró, fue un menor porcentaje de supervivencia a 5 años cuando la expresión del marcador fue moderada a intensa (27%). Por otro lado, al analizar la expresión de la  $\alpha$ -SMA frente a otras características, se encontró asociación entre la ausencia de expresión del marcador con la presencia de invasión linfovascular y perineural (LVI+PNI  $p=0,002$ ; PNI  $p=0,022$ ), resultados completamente opuestos a los esperados, y que se presume, obedecen a una asociación aleatoria. Del mismo modo, otros estudios no han encontrado asociación

entre la presencia de CAF  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> y la sobrevida del OSCC y OTSCC. Cabe resaltar, que dichos estudios sólo evaluaron estadios tempranos <sup>113,162,163</sup>. Mientras que otro estudio, encontró asociación entre la presencia de CAF's y la sobrevida del OSCC pero solo en pacientes jóvenes (<45 años) <sup>83</sup>.

Ding et al. por el contrario, reportaron una relación positiva entre la densidad alta de CAF  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> y la metástasis a nódulos linfáticos cervicales y linfangiogénesis intratumoral en el OTSCC. Además, en los casos con clasificación TNM avanzada, dicha densidad celular se ha asociado con una menor sobrevida total. Por lo tanto, una expresión alta del marcador en el frente de invasión se ha considerado una señal de la EMT, así como un factor pronóstico independiente para la sobrevida <sup>137</sup>. Resultados que concuerdan con múltiples estudios previos <sup>111,112,114,164-166</sup>. Bello et al. también encontraron que un TME rico en CAF  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> tuvo el impacto más significativo en la mortalidad de pacientes con OTSCC (HR= 4.85; 95% CI 1.41-16.6), pero no realizaron análisis de asociación con parámetros clinicopatológicos. Pese a ello, recomiendan realizar una evaluación rutinaria de la densidad de CAF  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> para determinar el pronóstico del OTSCC <sup>138</sup>.

En una revisión sistemática realizada por Dourado et al. reportaron que la presencia de altos niveles de CAF  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> en el estroma en OSCC predijo una menor sobrevida total y libre de enfermedad (OS HR: 2.16, 95% CI: 1.60-2.92,  $p < 0,00001$ . DFS HR = 3.32, 95% CI: 2.09-5.26,  $p < 0,00001$ ). Además, su presencia fue frecuente en asociación con otros parámetros que empeoran el pronóstico del OSCC, como el estadio avanzado, la recurrencia, el grado de diferenciación del tumor, la profundidad de la invasión, la invasión vascular, linfática y perineural, y la extensión extranodal <sup>88</sup>.

En resumen, nuestros resultados mostraron que las características clinicopatológicas, tales como, un estadio clínico avanzado, la localización del tumor en la base de la lengua, el mayor tamaño del tumor, el compromiso de los márgenes y nódulos linfáticos, la mayor clasificación patológica TNM, el grado de diferenciación pobre, y la presencia de invasión linfovascular y perineural; afectan negativamente el pronóstico y la sobrevida de los pacientes con OTSCC en esta población de Colombia como lo reportado en otras del mundo. Por el contrario, no fue posible establecer una asociación entre la expresión de los marcadores moleculares evaluados con el desenlace del OTSCC.

Con base en nuestras observaciones, se sugiere en futuros estudios, estratificar la localización del cáncer oral, ya que, como fue mencionado anteriormente, el cáncer de lengua y de piso de boca se consideran de comportamiento más agresivo. También, considerar todos los estadios clínicos y patológicos, y realizar un análisis por separado para los estadios tempranos y avanzados. Además, utilizar sistemas de clasificación validados en varios estudios, para definir las múltiples características histopatológicas y, realizar la evaluación no sólo del tumor sino del frente de invasión tumoral. Por último, las discrepancias entre los resultados también dependen de las diversas definiciones para la sobrevida usadas (sobrevida total, específica de la enfermedad, libre de enfermedad, libre de recaída, etc), las cuales deben ser estandarizadas y reportadas, en lo posible, por todos los estudios para permitir su comparación. Uno de los factores de mayor variabilidad y, que debe unificarse para poder establecer asociaciones confiables, es el método de cuantificación (cuantitativa, semicuantitativa) de la inmuno-reactividad para los marcadores y los diferentes valores de corte para definir si la expresión fue negativa o positiva, baja o alta, o el uso de escalas. En última instancia, también debe considerarse las diferentes poblaciones evaluadas y las características genóticas y fenotípicas propias que también podrían influir en el comportamiento biológico de los tumores.

#### **6.4 Limitaciones**

Este estudio tiene las limitaciones propias de un estudio de sobrevida de índole retrospectivo. El principal, el sesgo de información, propio del análisis de las fuentes de información secundarias, tal como la historia clínica y el reporte del laboratorio de patología. Por ejemplo, en ellas no suelen encontrarse ciertos datos que podrían ser valiosos en las investigaciones de pronóstico de cáncer oral, como la presencia de hábitos (consumo de tabaco y alcohol principalmente), incluida su frecuencia y dosis de consumo, los antecedentes de inmunización o lesiones por Virus del Papiloma Humano, y los antecedentes familiares de cáncer, entre otros.

También es de anotar que, si bien este estudio abarcó un período de 10 años, la información del seguimiento en las historias clínicas estaba incompleta, muchas veces debido a que los pacientes provenían de otras regiones y pertenecían a otras

instituciones prestadoras de servicios de salud, y no regresaban a la institución después del tratamiento. Un aspecto fundamental que imposibilitó hacer el seguimiento de los casos perdidos es que, en Colombia, el Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), anonimiza los casos de nacimientos y defunciones, y la Registraduría Nacional del Estado Civil sólo permite el acceso al certificado de defunción, con toda la información de la causa de muerte, al cónyuge sobreviviente y a los parientes más cercanos.

Por otra parte, el análisis histopatológico inicial, consignado en el reporte original, fue realizado por patólogos diferentes, lo que adiciona un sesgo de observación a dichos datos. Sin embargo, este fue controlado a través de una segunda revisión realizada por los patólogos pertenecientes al equipo de investigación.

También, consideramos que pudo existir un sesgo de selección en lo concerniente a los análisis de inmunohistoquímica, puesto que estos se realizaron solo en uno de los bloques de tejido de cada caso. Además, los diagnósticos de carcinoma *in situ* no pudieron ser tenidos en cuenta para dicho análisis, con el objetivo de evitar emplear la totalidad del tejido disponible. Adicionalmente, hubo pocos casos antiguos que representaran los primeros años del periodo de seguimiento.

A pesar de realizar un censo inicial de todos los pacientes con OTSCC que consultaron en el Instituto de Cancerología Clínica las Américas durante el periodo de 2008 a 2017, al aplicar los criterios de inclusión y exclusión, se obtuvo un tamaño de la muestra relativamente pequeño, lo que pudo impactar en el poder estadístico para detectar algunas asociaciones.

Respecto a la evaluación de la inmuno-reactividad de los marcadores moleculares, se definió un valor de corte con base en la mediana, para clasificar su nivel de expresión y compararlo con la sobrevida, lo cual podría considerarse un parámetro más objetivo que simplemente agrupar los niveles de expresión por puntajes de una escala. Sin embargo, esta clasificación varió entre los estudios y dificultó la comparación directa de los resultados.

Se sugieren estudios futuros con mayor tamaño muestral, prospectivos y multicéntricos, para establecer un modelo predictivo que explore las relaciones entre las características sociodemográficas, clínicas, histopatológicas y la expresión de marcadores moleculares, en especial con la presencia de invasión linfocelular y perineural, que permita estratificar a los pacientes con OTSCC en diferentes grupos

de riesgo respecto al pronóstico y a la sobrevida, lo cual podría orientar un abordaje terapéutico individualizado y efectivo. A pesar de las múltiples limitaciones de este estudio, es el primero en su tipo realizado en la población colombiana, permitiendo su caracterización y abriendo la puerta hacia futuras investigaciones, además de permitir una comparación inicial respecto a lo explorado ampliamente en otras poblaciones.

## 7 CONCLUSIÓN

Las características clinicopatológicas como, el estadio clínico avanzado, la localización del tumor en la base de la lengua, el mayor tamaño del tumor, el compromiso de los márgenes y de los nódulos linfáticos, la mayor clasificación patológica TNM, el grado de diferenciación pobre y, la presencia de invasión linfovascular y perineural, tuvieron un impacto negativo en el pronóstico y una menor sobrevida específica de la enfermedad en los pacientes con OTSCC. Otras características como el estado civil y la intensidad del infiltrado inflamatorio también se asociaron con un desenlace desfavorable y valdría la pena explorarlos en futuros estudios. En este estudio no se logró establecer la utilidad pronóstica de la expresión de los marcadores moleculares Ki-67, E-cadherina, MMP-9 y  $\alpha$ -SMA en el OTSCC. Por otro lado, el estadio clínico avanzado, la localización del tumor en la base de la lengua y el grado de diferenciación pobre demostraron ser factores predictores independientes para una menor sobrevida. Debe confirmarse la utilidad pronóstica de la presencia simultánea de invasión linfovascular y perineural, en un intento para realizar una clasificación más detallada e informativa de los tumores, de manera que pueda orientar la selección de la estrategia terapéutica.

## REFERENCIAS<sup>1</sup>

1. Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer: clinical features. *Oral Oncol.* 2010;46(6):414-7.
2. De La Fuente Ávila M, Díaz Jara M, Martínez Rondanelli B. Carcinoma espinocelular de lengua: estudio de sobrevivida a 5 años. *Rev Clín Periodoncia, Implantología y Rehabil Oral.* 2016;9(1):74-8.
3. Ledesma-Montes C, Hernández-Guerrero JC, Durán-Padilla MA, Alcántara-Vázquez A. Squamous cell carcinoma of the tongue in patients older than 45 years. *Braz Oral Res.* 2018; 32: e123.
4. Warnakulasuriya S. Living with oral cancer: epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. *Oral Oncol.* 2010; 46(6):407-10.
5. Amit M, Yen T-C, Liao C-T, Chaturvedi P, Agarwal JP, Kowalski LP, et al. Improvement in survival of patients with oral cavity squamous cell carcinoma: An international collaborative study. *Cancer.* 2013;119(24):4242-8.
6. van Dijk BAC, Brands MT, Geurts SME, Merkx MAW, Roodenburg JLN. Trends in oral cavity cancer incidence, mortality, survival and treatment in the Netherlands. *Int J Cancer.* 2016;139(3):574-83.
7. 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.
8. Almangush A, Heikkinen I, Mäkitie AA, Coletta RD, Läärä E, Leivo I, et al. Prognostic biomarkers for oral tongue squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer.* 2017;117(6):856-66.
9. Su WW-Y, Su C-W, Chang D-C, Chuang S-L, Chen SL-S, Hsu C-Y, et al. Impact of varying anatomic sites on advanced stage and survival of oral cancer: 9-year prospective cohort of 27 717 cases. *Head Neck.* 2019;41(5):1475-83.
10. Amarasinghe H, Jayasinghe RD, Dharmagunawardene D, Attygalla M, Scuffham PA, Johnson N, et al. Economic burden of managing oral cancer patients in Sri Lanka: a cross-sectional hospital -based costing study. *BMJ Open.* 2019;; 9(7). [citado 13 de diciembre de 2019]; Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6661677/>
11. Rezapour A, Jahangiri R, Olyaeemanesh A, Kalaghchi B, Nouhi M, Nahvijou A. The economic burden of oral cancer in Iran. *PLoS One.* 2018; 13(9). [citado 13 de diciembre de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6160006/>

---

<sup>1</sup> De acuerdo con la Guía de Trabajos Académicos de la FOAr, adaptado de las Normas Vancouver. Disponible en el sitio de la Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacaoatualizado.pdf>

12. Peres MA, Macpherson LMD, Weyant RJ, Daly B, Venturelli R, Mathur MR, et al. Oral diseases: a global public health challenge. *Lancet*. 2019;394(10194):249-60.
13. Posada-López A, Palacio-Correa MA, Agudelo-Suárez AA. Características sociodemográficas y clínicas de los pacientes tratados por primera vez por cáncer escamocelular oral. Medellín, Colombia. *Int J Odontostomat*. 2018;12(3):237-45.
14. Valdez JA, Brennan MT. Impact of oral cancer on quality of life. *Dent Clin North Am*. 2018;62(1):143-54.
15. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The eighth edition AJCC Cancer Staging Manual: continuing to build a bridge from a population-based to a more «personalized» approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(2):93-9.
16. Franceschi LLD, Santo JMMM, Abreu AM de, Kulcsar MAV, Cernea CR, Garcia MRT, et al. Staging of oral cavity cancer in the 8th edition of the TNM classification: the role of computed tomography in the assessment of depth of invasion and extranodal extension. *Arch Head Neck Surg*. 2018; 47(1): e0869.
17. Lydiatt WM, Patel SG, O'Sullivan B, Brandwein MS, Ridge JA, Migliacci JC, et al. Head and neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(2):122-37.
18. Kim K, Lee DJ. The updated AJCC/TNM staging system (8 th edition) for oral tongue cancer. *Translational Cancer Res*. 2019;8(2):S164-6.
19. Montoya LCC. Análisis del marcador tisular AgNOR en leucoplasia y carcinoma escamocelular oral. *Med Oral*. 2002;7:9.
20. Díaz MEB, Figueroa EAS, Álvarez FJP, Sánchez SB. Determinación de la ciclooxigenasa-2 en carcinoma escamocelular de lengua bien diferenciado, moderadamente diferenciado y poco diferenciado. *Universitas Odontologica* [Internet]. 2012 [citado 8 de diciembre de 2019];31(67). Disponible en: <https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/revUnivOdontologica/article/view/4345>
21. Cabeza GT, Vidal MM, Paez JO, Cuadro DM, Martinez FG. Proteína translocadora mitocondrial 18kDa en saliva como un biomarcador asociado a cáncer bucal [Informe de investigación]. [Cartagena]: Universidad de Cartagena; 2016.
22. Acero-Mondragón E, Rodríguez-Farías R, Salazar-Hernández M, Figueroa-Avenidaño J. Correlación histológica de expresión de marcadores Ki-67 y ciclina D1 presentes en carcinomas de células escamosas en cavidad oral. *Rev Odontol Mexicana*. 2016;20(4):233-7.
23. Ereira A, Motta LA, Chala A, Moreno A, Gamboa F, García DA. Genotipificación, niveles de expresión y estado físico del virus del papiloma humano en pacientes colombianos con cáncer de células escamosas en la cavidad oral. *Biomedica*. 2016; 36(Suppl 2):14-24.

24. Álvarez Martínez E, Preciado Uribe A, Montoya Fernández S, Jiménez Gómez R, Posada López A. Características clínicas e histopatológicas del carcinoma escamocelular bucal en el periodo 1990-2004 en Medellín, Colombia. *Rev Cubana Estomatol.* 2011;48(4):320-9.
25. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Cancer today [Internet]. 2019 [citado 3 de diciembre de 2019]. Disponible en: <http://gco.iarc.fr/today/home>
26. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
27. Bravo LE, Muñoz N. Epidemiology of cancer in Colombia. *Colomb Med.* 2018; 49(1):9-12.
28. Colombia, Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Cancerología, Wiesner Ceballos C, Henríquez Mendoza GM, Aguilera López J. Análisis de situación del cáncer en Colombia: 2017. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/ED/GCFI/guia-ross-cancer.pdf>.
29. Arias O. NE. Registros poblacionales de cáncer: avances en Colombia, Chile y Brasil. *Rev Fac Nac Salud Públ.* 2013;31(1):127-35.
30. Brome Bohórquez MR, Secretaría Seccional de Salud y Protección Social de Antioquia. Epidemiología del Cáncer. Conferencia presentado en: VI Simposio de Ciencias Básicas, Cáncer oral.; 2018 oct 25; Medellín.
31. Carvajal-Carmona LG, Soto ID, Pineda N, Ortíz-Barrientos D, Duque C, Ospina-Duque J, et al. Strong Amerind/White sex bias and a possible Sephardic contribution among the founders of a population in northwest Colombia. *Am J Hum Genet.* 2000; 67(5):1287-95.
32. Wikipedia. Medellín. En: Wikipedia, la enciclopedia libre [Internet]. 2019 [citado 7 de diciembre de 2019]. Disponible en: <https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Medell%C3%ADn&oldid=121805413>
33. Brome Bohórquez MR, Montoya Restrepo DM, Salcedo LA. Cancer incidence and mortality in Medellin-Colombia, 2010-2014. *Colomb Med.* 2018;49(1):81-8.
34. Rivera C. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(9):11884-94.
35. Conway DI, Purkayastha M, Chestnutt IG. The changing epidemiology of oral cancer: definitions, trends, and risk factors. *Br Dent J.* 2018;225(9):867-73.
36. Kumar M, Nanavati R, Modi TG, Dobariya C. Oral cancer: etiology and risk factors: a review. *J Cancer Res Ther.* 2016;12(2):458-63.
37. Wang K, Yu X-H, Tang Y-J, Tang Y-L, Liang X-H. Obesity: an emerging driver of head and neck cancer. *Life Sci.* 2019;233:116687.

38. Iyengar NM, Kochhar A, Morris PG, Morris LG, Zhou XK, Ghossein RA, et al. Impact of obesity on the survival of patients with early-stage squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Cancer*. 2014;120(7):983-91.
39. Ardila C, Gómez R, Martínez E. Revisión sistemática de los efectos del hábito de fumar invertido sobre la mucosa oral. *Rev Arch Méd Camagüey*. 2013;17:405-15.
40. Gómez GJA, Martínez EA, Gómez RJ, Silva YM, María A, Núñez G, et al. Reverse smokers's and changes in oral mucosa. Department of Sucre, Colombia. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008; 13(1): E1-8.
41. Carmona Lorduy M, Pimienta Vásquez L, Porto Puerta I, Pérez Martínez M. Caracterización epidemiológica de pacientes fumadores invertidos en Cartagena, Colombia. *Acta Odontol Colomb*. 2019;9(2):47-58.
42. Álvarez Martínez EDC, Barbosa Ch. M, Gaviria Núñez ÁM. Comportamiento clínico epidemiológico del carcinoma escamocelular bucal de pacientes tratados en el hospital Universitario San Vicente de Paúl (HUSVP), Medellín, entre enero de 1990 y diciembre de 1996. instname: Universidad de Antioquia [Internet]. 2005 [citado 7 de julio de 2020]; Disponible en: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co/handle/10495/8959>
43. Ettinger KS, Ganry L, Fernandes RP. Oral cavity cancer. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2019;31(1):13-29.
44. National Cancer Institute. Definition of survival rate - NCI Dictionary of Cancer Terms - National Cancer Institute [Internet]. 2011 [citado 22 de julio de 2020]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/survival-rate>
45. Allemani C, Weir HK, Carreira H, Harewood R, Spika D, Wang X-S, et al. Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *The Lancet*. 2015;385(9972):977-1010.
46. Dotiwala AK, Samra NS. Anatomy, Head and Neck, Tongue. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 [citado 3 de diciembre de 2019]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507782/>
47. Fagan SE, Roy W. Anatomy, Head and Neck, Lingual Nerve. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 [citado 3 de diciembre de 2019]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK546652/>
48. Rubin P, Hansen JT. Oral cavity perspective, patterns of spread, and pathology. En: *TNM staging atlas with oncoanatomy*. 2nd ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2012. cap. 5
49. 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*. 2019;107:86-92.

50. Deschler D, Moore M, Smith R. Quick reference guide to TNM staging of head and neck cancer and neck dissection classification. 4<sup>th</sup>. ed. Alexandria, VA: American Academy of Otolaryngology–Head and Neck Surgery Foundation; 2014.
51. Paleri V, Urbano TG, Mehanna H, Repanos C, Lancaster J, Roques T, et al. Management of neck metastases in head and neck cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *J Laryngol Otol*. mayo de 2016;130(Suppl 2):S161-9.
52. Kowalski L, Novelli J. Carcinoma papilar de tiroides. Rosario: Universidad Nacional de Rosario, Argentina; 2010.
53. Chatzistefanou I, Lubek J, Markou K, Ord RA. The role of perineural invasion in treatment decisions for oral cancer patients: a review of the literature. *J Craniomaxillofac Surg*. 2017;45(6):821-5.
54. Kowalski LP, Köhler HF. Relevant changes in the AJCC 8th edition staging manual for oral cavity cancer and future implications. *Chin Clin Oncol*. 2019;8(S1):S18.
55. Bullock MJ. Current challenges in the staging of oral cancer. *Head Neck Pathol*. 2019; 13(3):440-8.
56. American College of Surgeons. AJCC Cancer staging manual, form supplement. Eighth edition. American Joint Committee on Cancer; 2018.
57. De Paz D, Kao H-K, Huang Y, Chang K-P. Prognostic stratification of patients with advanced oral cavity squamous cell carcinoma. *Curr Oncol Rep*. 2017;19(10):65.
58. Cao Y, Li R, Cheng L, Chen N, Li J, Yu D. p75 Nerve growth factor receptor as a specific nerve marker in the diagnosis of perineural invasion of squamous cell carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2019;151(6):574-83.
59. Kobayashi K, Ando M, Saito Y, Kondo K, Omura G, Shinozaki-Ushiku A, et al. Nerve growth factor signals as possible pathogenic biomarkers for perineural invasion in adenoid cystic carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2015;153(2):218-24.
60. Lanzel E, Robinson RA, Zimmerman MB, Pourian A, Hellstein JW. The use of immunohistochemistry in detection of perineural invasion in mucoepidermoid carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2016;121(6):636-42.
61. Kurtz KA, Hoffman HT, Zimmerman MB, Robinson RA. Perineural and vascular invasion in oral cavity squamous carcinoma: increased incidence on re-review of slides and by using immunohistochemical enhancement. *Arch Pathol Lab Med*. 2005; 129(3):354-9.
62. Shen W-R, Wang Y-P, Chang JY-F, Yu S-Y, Chen H-M, Chiang C-P. Perineural invasion and expression of nerve growth factor can predict the progression and prognosis of oral tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2014; 43(4):258-64.

63. Schmitz LB, Beesley LJ, Russo N, Bellile EL, Inglehart RC, Liu M, et al. Redefining perineural invasion: integration of biology with clinical outcome. *Neoplasia*. 2018;20(7):657-67.
64. Cracchiolo JR, Xu B, Migliacci JC, Katabi N, Pfister DG, Lee NY, et al. Patterns of recurrence in oral tongue cancer with perineural invasion. *Head Neck*. 2018; 40(6):1287-95.
65. Liebig C, Ayala G, Wilks JA, Berger DH, Albo D. Perineural invasion in cancer: a review of the literature. *Cancer*. 2009;115(15):3379-91.
66. Matsushita Y, Yanamoto S, Takahashi H, Yamada S, Naruse T, Sakamoto Y, et al. A clinicopathological study of perineural invasion and vascular invasion in oral tongue squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015;44(5):543-8.
67. Adelstein D, Gillison ML, Pfister DG, Spencer S, Adkins D, Brizel DM, et al. NCCN guidelines insights: head and neck cancers, Version 2.2017. *J Nat Comprehensive Cancer Network*. 2017;15(6):761-70.
68. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
69. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144(5):646-74.
70. Siriwardena SBSM, Tsunematsu T, Qi G, Ishimaru N, Kudo Y. Invasion-related factors as potential diagnostic and therapeutic targets in oral squamous cell carcinoma-A Review. *Int J Mol Sci*. 2018;19(5):1462.
71. Salo T, Vered M, Bello IO, Nyberg P, Bitu CC, Zlotogorski Hurvitz A, et al. Insights into the role of components of the tumor microenvironment in oral carcinoma call for new therapeutic approaches. *Exp Cell Res*. 2014;325(2):58-64.
72. Spaw M, Anant S, Thomas SM. Stromal contributions to the carcinogenic process. *Mol Carcinog*. 2017;56(4):1199-213.
73. FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource [Internet]. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); 2016 [citado 3 de diciembre de 2019]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/>
74. Yu Y-H, Morales J, Feng L, Lee JJ, El-Naggar AK, Vigneswaran N. CD147 and Ki-67 overexpression confers poor prognosis in squamous cell carcinoma of oral tongue: a tissue microarray study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2015; 119(5):553-65.
75. Li LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Mol Med Rep*. 2015;11(3):1566-72.
76. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast*. 2008;17(4):323-34.

77. Lei Y, Li Z, Qi L, Tong S, Li B, He W, et al. The Prognostic Role of Ki-67/MIB-1 in upper urinary-tract urothelial carcinomas: a systematic review and meta-analysis. *J Endourol.* 2015;29(11):1302-8.
78. Luo Y, Zhang X, Mo M, Tan Z, Huang L, Zhou H, et al. High Ki-67 immunohistochemical reactivity correlates with poor prognosis in Bladder carcinoma: a comprehensive meta-analysis with 13,053 patients involved. *Medicine (Baltimore).* 2016; 95(15):e3337.
79. Freudlsperger C, Rohleder SE, Reinert S, Hoffmann J. Predictive value of high Ki-67 expression in stage I oral squamous cell carcinoma specimens after primary surgery. *Head Neck.* 2011;33(5):668-72.
80. Myoung H, Kim M-J, Lee J-H, Ok Y-J, Paeng J-Y, Yun P-Y. 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 Maxillofac Surg.* 2006;35(11):1005-10.
81. Sølrand TM, Brusevold IJ. Prognostic molecular markers in cancer - quo vadis? *Histopathology.* 2013;63(3):297-308.
82. Hwa JS, Kwon OJ, Park JJ, Woo SH, Kim JP, Ko GH, et al. The prognostic value of immunohistochemical markers for oral tongue squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2015;272(10):2953-9.
83. Miranda Galvis M, Santos-Silva AR, Freitas Jardim J, Paiva Fonseca F, Lopes MA, de Almeida OP, et al. Different patterns of expression of cell cycle control and local invasion-related proteins in oral squamous cell carcinoma affecting young patients. *J Oral Pathol Med.* 2018;47(1):32-9.
84. Monteiro LS, Diniz-Freitas M, Warnakulasuriya S, Garcia-Caballero T, Forteza J, Fraga M. An immunohistochemical score to predict the outcome for oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2018;47(4):375-81.
85. Wong SHM, Fang CM, Chuah L-H, Leong CO, Ngai SC. E-cadherin: its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2018;121:11-22.
86. Hussein AA, Forouzanfar T, Bloemena E, de Visscher J, Brakenhoff RH, Leemans CR, et al. A review of the most promising biomarkers for early diagnosis and prognosis prediction of tongue squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2018;119(6):724-36.
87. Mezawa Y, Orimo A. The roles of tumor- and metastasis-promoting carcinoma-associated fibroblasts in human carcinomas. *Cell Tissue Res.* 2016;365(3):675-89.
88. Dourado MR, Guerra ENS, Salo T, Lambert DW, Coletta RD. Prognostic value of the immunohistochemical detection of cancer-associated fibroblasts in oral cancer: A systematic review and meta-analysis. *J Oral Pathol Med.* 2018;47(5):443-53.
89. Tonino P, Abreu C. Microvessel density is associated with VEGF and  $\alpha$ -SMA expression in different regions of human gastrointestinal carcinomas. *Cancers (Basel).* 2011;3(3):3405-18.

90. Grigore D, Simionescu CE, Stepan A, Mărgăritescu C, Bălășoiu M, Georgescu CC, et al. Assessment of CD105,  $\alpha$ -SMA and VEGF expression in gastric carcinomas. *Rom J Morphol Embryol.* 2013;54(3 Suppl):701-7.
91. Cîmpean AM, Raica M, Suciuc C. CD105/smooth muscle actin double immunostaining discriminate between immature and mature tumor blood vessels. *Rom J Morphol Embryol.* 2007;48(1):41-5.
92. Marinescu IR, Simionescu CE, Stepan AE, Mărgăritescu C, Cernea D, Georgescu CC, et al. VEGF, CD105 and  $\alpha$ -SMA immunoexpression study in lips squamous cell carcinomas and associated dysplastic lesions. *Rom J Morphol Embryol.* 2014;55(1):35-41.
93. Maciejczyk M, Pietrzykowska A, Zalewska A, Knaś M, Daniszewska I. The significance of matrix metalloproteinases in oral diseases. *Adv Clin Exp Med.* 2016;25(2):383-90.
94. Ramón de Fata F, Ferruelo A, Andrés G, Gimbernat H, Sánchez-Chapado M, Angulo JC. The role of matrix metalloproteinase MMP-9 and TIMP-2 tissue inhibitor of metalloproteinases as serum markers of bladder cancer. *Actas Urol Esp.* 2013; 37(8):480-8.
95. Alaseem A, Alhazzani K, Dondapati P, Alobid S, Bishayee A, Rathinavelu A. Matrix metalloproteinases: a challenging paradigm of cancer management. *Semin Cancer Biol.* 2019;56:100-15.
96. Oliveira LR, Ribeiro-Silva A. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2011; 40(3):298-307.
97. Nanda DP, Dutta K, Ganguly KK, Hajra S, Mandal SS, Biswas J, et al. MMP-9 as a potential biomarker for carcinoma of oral cavity: a study in eastern India. *Neoplasma.* 2014;61(6):747-57.
98. Jose D, Mane DR. Correlation of matrix metalloproteinase-9 expression with morphometric analysis of mucosal vasculature in oral squamous cell carcinoma, oral epithelial dysplasia, and normal oral mucosa. *Int J Health Sci (Qassim).* 2018; 12(6):36-43.
99. Silva EMR, Freitas VM, Bautz WG, de Barros LAP, da Gama de Souza LN. Immunohistochemical study of Laminin-332  $\gamma$ 2 Chain and MMP-9 in high risk of malignant transformation lral Lesions and OSCC. *J Oral Maxillofac Res.* 2018;9(1):e3.
100. Silva RNF, Dallarmi LB, Araujo AKC, Alencar RCG, Mendonça EF, Silva TA, et al. Immunohistochemical analysis of neutrophils, interleukin-17, matrix metalloproteinase-9, and neofomed vessels in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2018;47(9):856-63.
101. Aparna M, Rao L, Kunhikatta V, Radhakrishnan R. The role of MMP-2 and MMP-9 as prognostic markers in the early stages of tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2015;44(5):345-52.

102. Pathologists C of A. Cancer Protocol Templates [Internet]. College of American Pathologists. 2019 [citado 3 de diciembre de 2019]. Disponible en: <https://www.cap.org/protocols-and-guidelines/cancer-reporting-tools/cancer-protocol-templates>
103. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjærheim Å. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol.* 1992;166(4):375-81.
104. Jardim JF, Francisco ALN, Gondak R, Damascena A, Kowalski LP. Prognostic impact of perineural invasion and lymphovascular invasion in advanced stage oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015;44(1):23-8.
105. Detre S, Saclani Jotti G, Dowsett M. A «quickscore» method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *J Clin Pathol.* 1995;48(9):876-8.
106. Board WC of TE, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, editores. WHO classification of head and neck tumours. 4.ed. Lyon: World Health Organization; 2017. 347 p.
107. Süslü N, Hoşal AŞ, Aslan T, Sözeri B, Dolgun A. Carcinoma of the oral tongue: a case series analysis of prognostic factors and surgical outcomes. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013;71(7):1283-90.
108. Lundqvist L, Stenlund H, Laurell G, Nylander K. The importance of stromal inflammation in squamous cell carcinoma of the tongue. *J Oral Pathol Med.* 2012; 41(5):379-83.
109. Rodrigues RM, Bernardo VG, Da Silva SD, Camisasca DR, Faria PA de S, Dias FL, et al. How pathological criteria can impact prognosis of tongue and floor of the mouth squamous cell carcinoma. *J Appl Oral Sci.* 2020;28:e20190198.
110. Okuyama K, Suzuki K, Yanamoto S, Naruse T, Tsuchihashi H, Yamashita S, et al. Anaplastic transition within the cancer microenvironment in early-stage oral tongue squamous cell carcinoma is associated with local recurrence. *Int J Oncol.* 2018; 53(4):1713-20.
111. Dayan D, Salo T, Salo S, Nyberg P, Nurmenniemi S, Costea DE, et al. Molecular crosstalk between cancer cells and tumor microenvironment components suggests potential targets for new therapeutic approaches in mobile tongue cancer. *Cancer Med.* 2012;1(2):128-40.
112. Vered M, Dobriyan A, Dayan D, Yahalom R, Talmi YP, Bedrin L, et al. Tumor-host histopathologic variables, stromal myofibroblasts and risk score, are significantly associated with recurrent disease in tongue cancer. *Cancer Sci.* 2010;101(1):274-80.
113. Kelner N, Rodrigues PC, Bufalino A, Fonseca FP, Santos-Silva AR dos, Miguel MCC, et al. Activin A immunoexpression as predictor of occult lymph node metastasis and overall survival in oral tongue squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2015;37(4):479-86.

114. Luksic I, Suton P, Manojlovic S, Virag M, Petroveckii M, Macan D. Significance of myofibroblast appearance in squamous cell carcinoma of the oral cavity on the occurrence of occult regional metastases, distant metastases, and survival. *International J Oral Maxillofac Surg.* 2015;44(9):1075-80.
115. Nóbrega T-D, Queiroz S-I-M-L, Santos E-M, Costa A-L-L, Pereira-Pinto L, de Souza L-B. Clinicopathological evaluation and survival of patients with squamous cell carcinoma of the tongue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2018;23(5):e579-87.
116. Mafra RP, Serpa MS, Lima KC de, Silveira ÉJD da, Souza LB de, Pinto LP. Immunohistochemical analysis of lymphatic vessel density and mast cells in oral tongue squamous cell carcinoma. *J Craniomaxillofac Surg.* 2018;46(12):2234-9.
117. Manjula M, Angadi PV, Priya NK, Hallikerimath S, Kale AD. Assessment of morphological parameters associated with neural invasion in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2019;23(1):157.
118. Almangush A, Bello IO, Coletta RD, Mäkitie AA, Mäkinen LK, Kauppila JH, et al. For early-stage oral tongue cancer, depth of invasion and worst pattern of invasion are the strongest pathological predictors for locoregional recurrence and mortality. *Virchows Arch.* 2015;467(1):39-46.
119. Zhang Y-Y, Wang D-C, Su J-Z, Jia L-F, Peng X, Yu G-Y. Clinicopathological characteristics and outcomes of squamous cell carcinoma of the tongue in different age groups. *Head Neck.* 2017;39(11):2276-82.
120. Hussein AA, Helder MN, de Visscher JG, Leemans CR, Braakhuis BJ, de Vet HCW, et al. Global incidence of oral and oropharynx cancer in patients younger than 45 years versus older patients: a systematic review. *Eur J Cancer.* 2017;82:115-27.
121. Paderno A, Morello R, Piazza C. Il carcinoma della lingua nei giovani: revisione della letteratura. *Acta Otorhinolaryngol Italica.* 2018;(3):175–80.
122. Wong Y-K, Tsai W-C, Lin J-C, Poon C-K, Chao S-Y, Hsiao Y-L, et al. Socio-demographic factors in the prognosis of oral cancer patients. *Oral Oncol.* 2006; 42(9):893-906.
123. Jia J, Jia M-Q, Zou H-X. Lingual lymph nodes in patients with squamous cell carcinoma of the tongue and the floor of the mouth. *Head Neck.* 2018;40(11):2383-8.
124. Kim K, Choi KY, Kim JH, Park IS, Rho YS, Lee DJ. Base of tongue cancer-is it tongue cancer located at the base of the tongue, or is it a type of lingual tonsil cancer? The perspective from a genomic analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2018;47(7):846-53.
125. Hammarstedt L, Lu Y, Marklund L, Dalianis T, Munck-Wikland E, Ye W. Differential survival trends for patients with tonsillar, base of tongue and tongue cancer in Sweden. *Oral Oncol.* 2011;47(7):636-41.
126. Krishnatreya M, Nandy P, Rahman T, Sharma JD, Das A, Kataki AC, et al. Characteristics of oral tongue and base of the tongue cancer: a hospital cancer registry based analysis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(4):1371-4.

127. Jehn P, Dittmann J, Zimmerer R, Stier R, Jehn M, Gellrich N-C, et al. Survival rates according to tumour location in patients with surgically treated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2019;39(5):2527-33.
128. Zhang L, Zhou X, Yao X, Wu Y, Zhang Q, Zhang L. Oral tongue cancer patients show a better overall survival than base of tongue cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012;138(2):341-6.
129. Roed-petersen B, Renstrup G. A topographical classification of the oral mucosa suitable for electronic data processing its application to 560 leukoplakias. *Acta Odontol Scand.* 1969;27(6):681-95.
130. Han MW, Lee JC, Kim YM, Cha HJ, Roh J-L, Choi S-H, et al. Epithelial-mesenchymal transition: clinical implications for nodal metastasis and prognosis of tongue cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2015;152(1):80-6.
131. Domingueti C-B, Janini J-B-M, Paranaíba L-M-R, Lozano-Burgos C, Olivero P, González-Arriagada W-A. Prognostic value of immunoexpression of CCR4, CCR5, CCR7 and CXCR4 in squamous cell carcinoma of tongue and floor of the mouth. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2019;24(3):e354-63.
132. Balasundaram P, Singh MK, Dinda AK, Thakar A, Yadav R. Study of  $\beta$ -catenin, E-cadherin and vimentin in oral squamous cell carcinoma with and without lymph node metastases. *Diagn Pathol.* 2014;9:145.
133. Gontarz M, Wyszynska-Pawelec G, Zapała J, Czopek J, Lazar A, Tomaszewska R. Immunohistochemical predictors in squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth. *Head Neck.* 2016;38 Suppl 1:E747-753.
134. Cohen Goldemberg D, de Araújo LHL, Antunes HS, de Melo AC, Santos Thuler LC. Tongue cancer epidemiology in Brazil: incidence, morbidity and mortality. *Head Neck.* 2018;40(8):1834-44.
135. Thiagarajan S, Nair S, Nair D, Chaturvedi P, Kane SV, Agarwal JP, et al. Predictors of prognosis for squamous cell carcinoma of oral tongue: squamous cell carcinoma of oral tongue. *J Surg Oncol.* 2014;109(7):639-44.
136. Liu P-F, Kang B-H, Wu Y-M, Sun J-H, Yen L-M, Fu T-Y, et al. Vimentin is a potential prognostic factor for tongue squamous cell carcinoma among five epithelial–mesenchymal transition-related proteins. *PLoS One* [Internet]. 1 de junio de 2017 [citado 30 de mayo de 2020];12(6). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5453552/>
137. Ding L, Zhang Z, Shang D, Cheng J, Yuan H, Wu Y, et al.  $\alpha$ -Smooth muscle actin-positive myofibroblasts, in association with epithelial-mesenchymal transition and lymphogenesis, is a critical prognostic parameter in patients with oral tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2014;43(5):335-43.

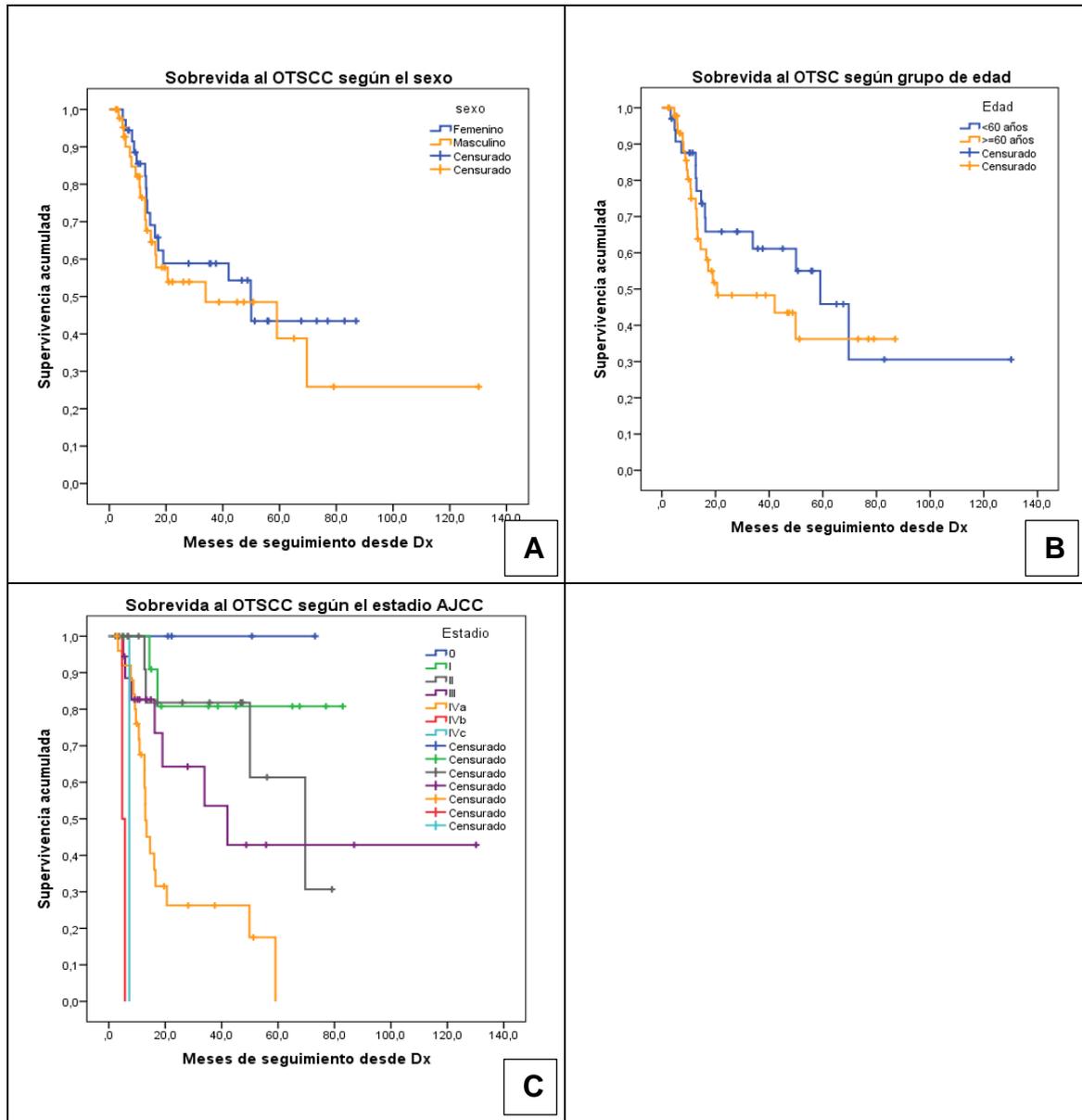
138. Bello IO, Vered M, Dayan D, Dobriyan A, Yahalom R, Alanen K, et al. Cancer-associated fibroblasts, a parameter of the tumor microenvironment, overcomes carcinoma-associated parameters in the prognosis of patients with mobile tongue cancer. *Oral Oncol.* 2011;47(1):33-8.
139. Bautista MA, Enríquez LE, Rueda AM. Programa Detección temprana de desórdenes potencialmente malignos dirigido a estudiantes de Odontología de la Universidad Santo Tomás [Internet]. [Bucaramanga]: Universidad Santo Tomás; 2016 [citado 18 de julio de 2020]. Disponible en: <https://repository.usta.edu.co/bitstream/handle/11634/9473/BautistaMayraAlejandraEnriquezLuisEduardoRuedaAnnieMichell2016.pdf?sequence=5&isAllowed=y>
140. Gigliotti J, Madathil S, Makhoul N. Delays in oral cavity cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2019;48(9):1131-7.
141. Murphy CT, Galloway TJ, Handorf EA, Wang L, Mehra R, Flieder DB, et al. Increasing time to treatment initiation for head and neck cancer: an analysis of the National Cancer Database. *Cancer.* 2015;121(8):1204-13.
142. Chen T-C, Wang C-P, Ko J-Y, Yang T-L, Hsu C-W, Yeh K-A, et al. The impact of perineural invasion and/or lymphovascular invasion on the survival of early-stage oral squamous cell carcinoma patients. *Ann Surg Oncol.* 2013;20(7):2388-95.
143. Fang J, Li X, Ma D, Liu X, Chen Y, Wang Y, et al. Prognostic significance of tumor infiltrating immune cells in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2017; 17(1):375.
144. Woolgar JA. Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2006;42(3):229-39.
145. Jones HB, Sykes A, Bayman N, Sloan P, Swindell R, Patel M, et al. The impact of lymphovascular invasion on survival in oral carcinoma. *Oral Oncol.* 2009;45(1):10-5.
146. Chi AC, Katabi N, Chen H-S, Cheng Y-SL. Interobserver variation among pathologists in evaluating perineural invasion for oral squamous cell carcinoma. *Head Neck Pathol.* 2016;10(4):451-64.
147. Aivazian K, Ebrahimi A, Low T-HH, Gao K, Clifford A, Shannon K, et al. Perineural invasion in oral squamous cell carcinoma: quantitative subcategorisation of perineural invasion and prognostication. *J Surg Oncol.* 2015;111(3):352-8.
148. Afrem MC, Mărgăritescu C, Crăițoiu MM, Ciucă M, Șarlă CG, Cotoi OS. The immunohistochemical investigations of cadherin «switch» during epithelial-mesenchymal transition of tongue squamous cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol.* 2014;55(3 Suppl):1049-56.
149. Thangaraj SV, Shyamsundar V, Krishnamurthy A, Ramani P, Ganesan K, Muthuswami M, et al. Molecular portrait of oral tongue squamous cell carcinoma shown by integrative meta-analysis of expression profiles with validations. *PLoS One.* 2016;11(6):e0156582.

150. Luo S-L, Xie Y-G, Li Z, Ma J-H, Xu X. E-cadherin expression and prognosis of oral cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol.* 2014;35(6):5533-7.
151. Cruz MCFN da, Pereira ALA, Lopes FF, Nonaka CFW, Silva RR da, Freitas R de A, et al. Immunohistochemical expression of E-cadherin and CD44v6 in squamous cell carcinomas of the lower lip and tongue. *Braz Dent J.* 2009;20(1):64-9.
152. Mahomed F, Altini M, Meer S. Altered E-cadherin/beta-catenin expression in oral squamous carcinoma with and without nodal metastasis. *Oral Dis.* 2007;13(4):386-92.
153. Zhou J, Tao D, Xu Q, Gao Z, Tang D. Expression of E-cadherin and vimentin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(3):3150-4.
154. Balasundaram P, Singh MK, Dinda AK, Thakar A, Yadav R. Study of  $\beta$ -catenin, E-cadherin and vimentin in oral squamous cell carcinoma with and without lymph node metastases. *Diagn Pathol.* 2014;9:145.
155. Sgaramella N, Wilms T, Boldrup L, Loljung L, Gu X, Coates PJ, et al. Ethnicity based variation in expression of E-cadherin in patients with squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Oncol Lett.* 2018;16(5):6603-7.
156. Mäkinen LK, Häyry V, Atula T, Haglund C, Keski-Säntti H, Leivo I, et al. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-2, -8, -9, and -13 in oral tongue cancer. *J Oral Pathol Med.* 2012;41(5):394-9.
157. Fan H-X, Li H-X, Chen D, Gao Z-X, Zheng J-H. Changes in the expression of MMP2, MMP9, and ColIV in stromal cells in oral squamous tongue cell carcinoma: relationships and prognostic implications. *J Exp Clin Cancer Res.* 2012;31(1):90.
158. Ciucă FI, Mărășescu PC, Matei M, Florescu AM, Mărgăritescu C, Demetrian AD, et al. The prognostic value of CXCR4, MMP-2 and MMP-9 in tongue squamous carcinoma. *Rom J Morphol Embryol.* 2019;60(1):59-68.
159. Zhou B, Chen W-L, Wang Y-Y, Lin Z-Y, Zhang D-M, Fan S, et al. A role for cancer-associated fibroblasts in inducing the epithelial-to-mesenchymal transition in human tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2014;43(8):585-92.
160. Coletta RD, Salo T. Myofibroblasts in oral potentially malignant disorders: is it related to malignant transformation? *Oral Dis.* 2018;24(1-2):84-8.
161. Liao J, Zhou B, Zhuang X, Zhuang P, Zhang D, Chen W. Cancer-associated fibroblasts confer cisplatin resistance of tongue cancer via autophagy activation. *Biomed Pharmacother.* 2018; 97:1341-8.
162. Almangush A, Bello IO, Keski-Säntti H, Mäkinen LK, Kauppila JH, Pukkila M, et al. Depth of invasion, tumor budding, and worst pattern of invasion: prognostic indicators in early-stage oral tongue cancer. *Head Neck.* 2014;36(6):811-8.
163. Sundquist E, Kauppila JH, Veijola J, Mroueh R, Lehenkari P, Laitinen S, et al. Tenascin-C and fibronectin expression divide early stage tongue cancer into low- and high-risk groups. *Br J Cancer.* 2017;116(5):640-8.

164. Kellermann MG, Sobral LM, Silva SD da, Zecchin KG, Graner E, Lopes MA, et al. Myofibroblasts in the stroma of oral squamous cell carcinoma are associated with poor prognosis. *Histopathology*. 2007;51(6):849-53.
165. Li H, Zhang J, Chen S-W, Liu L, Li L, Gao F, et al. Cancer-associated fibroblasts provide a suitable microenvironment for tumor development and progression in oral tongue squamous cancer. *J Transl Med* [Internet]. 21 de junio de 2015 [citado 20 de junio de 2020];13. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4475624/>
166. Lin N-N, Wang P, Zhao D, Zhang F-J, Yang K, Chen R. Significance of oral cancer-associated fibroblasts in angiogenesis, lymphangiogenesis, and tumor invasion in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2017;46(1):21-30.

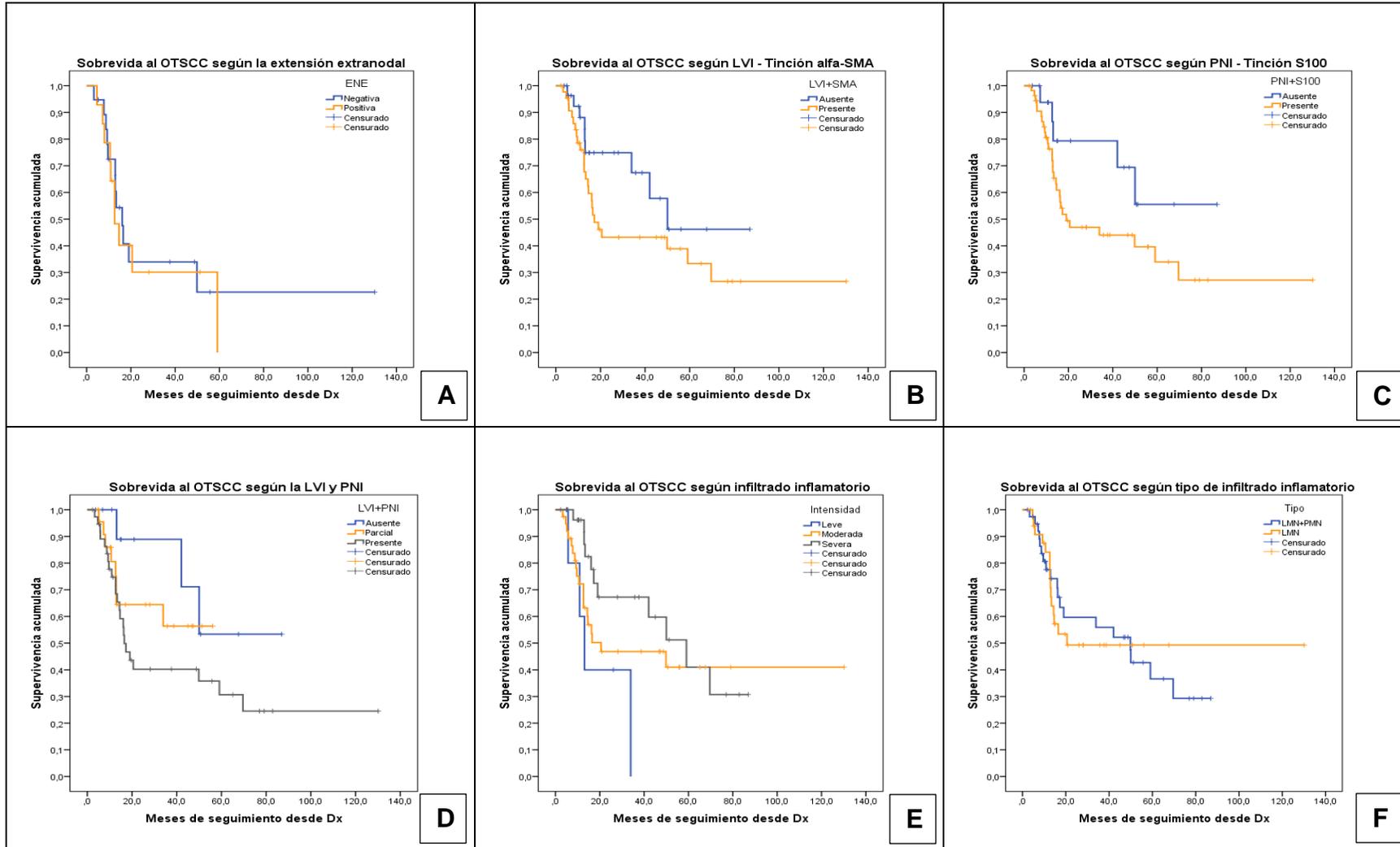
## APÉNDICE

### APÉNDICE A – Gráficas de sobrevida para las variables sociodemográficas y clínicas que no fueron estadísticamente significativas.



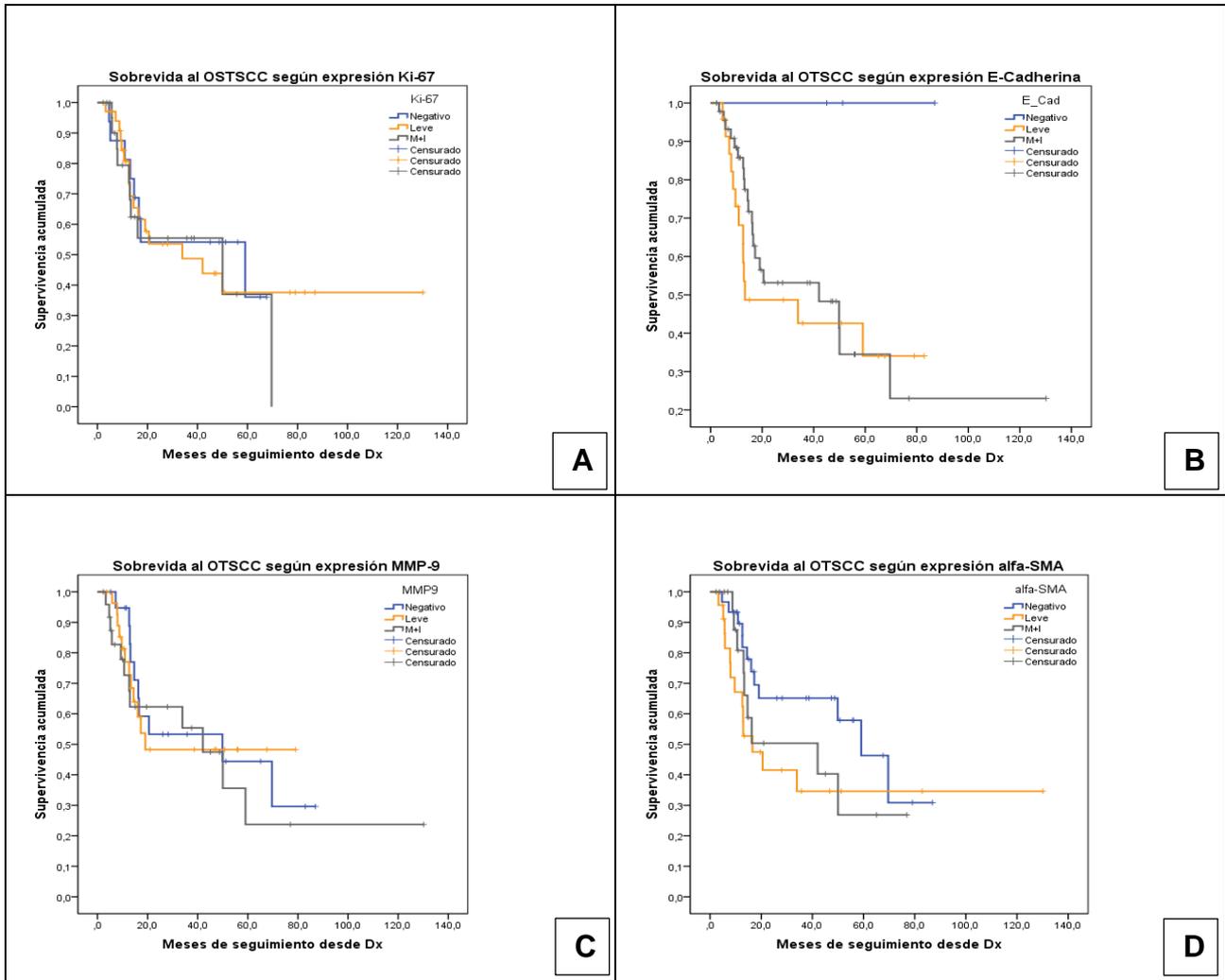
Curvas de sobrevida con Kaplan Meier en 80 pacientes con OTSCC, Instituto de Cancerología Clínica las Américas, Medellín, 2008-2017, comparadas por A. Sexo. B. Grupo de edad < y  $\geq$  60 años. C. Estadio clínico detallado.

**APÉNDICE B – Gráficas de supervida para las variables histopatológicas que no fueron estadísticamente significativas.**



Curvas de supervida con Kaplan Meier en 80 pacientes con OTSCC, Instituto de Cancerología Clínica las Américas, Medellín, 2008-2017, comparadas por A. Extensión extranodal. B. Invasión linfocelular. C. Invasión perineural. D. Invasión linfocelular y perineural. E. Intensidad del infiltrado inflamatorio. F. Tipo de infiltrado inflamatorio.

**APÉNDICE C – Gráficas de sobrevida para la expresión de marcadores que no fueron estadísticamente significativas.**



Curvas de sobrevida con Kaplan Meier en 80 pacientes con OTSCC, Instituto de Cancerología Clínica las Américas, Medellín, 2008-2017, comparadas por la expresión de los biomarcadores A. Ki-67. B. E-cadherina. C. MMP-9. D.  $\alpha$ -SMA.

**Não autorizo a reprodução deste trabalho até 31 de agosto de 2022  
(Direitos de publicação reservado ao autor)**

**Araraquara, 31 de agosto de 2020.**

**Adriana Milena Colonia García**