

Estudio inmunohistoquímico del carcinoma epidermoide de labio

Epidermoid carcinoma of the lip: An immunohistochemical study

Belén García-Montesinos Perea ⁽¹⁾, José Fernando Val Bernal ⁽²⁾, Ramón Saiz Bustillo ⁽³⁾

(1) Médico Adjunto de Cirugía Maxilofacial. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander). Doctora en Medicina y Cirugía

(2) Jefe de Departamento de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander). Catedrático de Anatomía Patológica. Facultad de Medicina. Universidad de Cantabria

(3) Jefe de Servicio de Cirugía Maxilofacial. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander). Doctor en Medicina y Cirugía. Profesor asociado de Patología Quirúrgica, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria.

Correspondencia / Address:

Dra. Belén García-Montesinos Perea

C/ Castelar nº 5, 2º derecha.

39004. Santander. Cantabria

E-mail: gmontesinos@humv.es

Recibido / Received: 16-05-2004 Aceptado / Accepted: 22-12-2004

Indexed in:

-Index Medicus / MEDLINE / PubMed
-EMBASE, Excerpta Medica
-Indice Médico Español
-IBECs

García-Montesinos-Perea B, Val-Bernal JF, Saiz-Bustillo R.
Epidermoid carcinoma of the lip: An immunohistochemical
study. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2005;10:454-61.
© Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - ISSN 1698-4447

RESUMEN

Objetivos: Determinar la sobreexpresión de las proteínas c-erb-B2, p53, bcl-2, Ki67 y CD44varV6 y establecer su valor pronóstico en el carcinoma epidermoide de labio.

Diseño del estudio: Estudio inmunohistoquímico de las proteínas p53, c-erb-B2, bcl-2, ki67 y CD44varV6 en 79 carcinomas epidermoides de labio diagnosticados y tratados a lo largo de un periodo de 20 años. Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis estadístico uni y multivariante.

Resultados: La inmunotinción fue positiva en el 75% de los casos para la proteína c-erb-B2, en el 70,6% para la proteína p 53, en el 3,8% para la proteína bcl-2 y en el 89,9% para la molécula de adhesión cd44varV6. La expresión proteica de ki67 osciló entre un mínimo de 0% y un máximo de 6,29%. Los factores inmunohistoquímicos analizados no presentaron valor pronóstico en el carcinoma epidermoide de labio, y solamente los pacientes afectados por este tipo de tumores que expresaban la molécula de adhesión CD44varV6 se asociaron de forma significativa con una mayor supervivencia mediante el análisis de Kaplan-Meier.

Conclusiones: Las técnicas inmunohistoquímicas analizadas para el estudio anatomopatológico del carcinoma epidermoide de labio no deberían realizarse rutinariamente, dado su mayor coste y su menor utilidad en la práctica clínica diaria.

Palabras clave: Inmunohistoquímica, cáncer de labio, carcinoma epidermoide, c-erb-B2, p53, bcl-2, ki67, CD44.

INTRODUCCION

El carcinoma epidermoide de labio constituye el tumor más frecuente de la cavidad oral, entre un 25 y un 30%, que representa el 0'6-1% del total de los tumores malignos en el hombre. Las técnicas inmunohistoquímicas utilizadas para su diagnóstico

SUMMARY

Objectives: To determine the expression of the c-erb-B2, p53, bcl-2, Ki67 and CD44varV6 proteins, and to establish their prognostic value in epidermoid carcinoma of the lip.

Study design: Immunohistochemical study of the c-erb-B2, p53, bcl-2, Ki67 and CD44varV6 proteins in 79 epidermoid carcinomas of the lip, diagnosed and treated over a period of 20 years. The data obtained were subjected to uni- and multi-variate statistical analyses.

Results: Immunostaining was positive in 75% of cases for c-erb-B2 protein, in 70.6% for p53 protein, in 3.8% for bcl-2 protein and in 89.9% for adhesion molecule CD44varV6. Ki67 protein expression varied between a minimum of 0% and a maximum of 6.29%. Most immunohistochemical factors analyzed presented no prognostic value for epidermoid carcinoma of the lip. Only those patients affected by this type of tumor that expressed the adhesion molecule CD44varV6 were significantly associated with a greater survival calculated by means of Kaplan-Meier analysis.

Conclusions: The immunohistochemical techniques analyzed for the anatomicopathological study of epidermoid carcinoma of the lip should not routinely be used due to their high cost and low utility in daily clinical practice.

Key words: Immunohistochemistry, cancer of the lip, epidermoid carcinoma, c-erb-B2, p53, bcl-2, Ki67, CD44.

INTRODUCTION

Epidermoid carcinoma of the lip is the most frequent tumor of the oral cavity, accounting for between 25 and 30% of tumors located at this level, and representing 0.6–1.0% of all malignant tumors in humans. Immunohistochemical techniques quantify

cuantifican la cinética celular, preservan la arquitectura tisular y las reacciones intertisulares (1). Se fundamentan en la base molecular del cáncer (secundarias a la activación de protooncogenes como el c-erb-B2, a la inactivación de genes supresores como el p53, alteraciones genéticas localizadas en los genes que regulan la apoptosis como el bcl-2 y los virus oncogénicos) y en la biología del crecimiento tumoral (dependientes de la cinética tumoral como la proteína ki67 y del entorno tumoral como la molécula de adhesión CD44varV6).

La proteína c-erb-B2 se localiza en las membranas citoplasmáticas tumorales, sobre todo en las microvellosidades y es activada por la unión a una molécula semejante al Factor de Crecimiento Tumoral alfa (TGF) a nivel de la superficie celular. Junto con el anterior codifica la sobreexpresión de las formas normales de los receptores de factores de crecimiento, de forma que son extremadamente sensibles a una cantidad muy pequeña de los mismos. El gen p 53 codifica una fosfoproteína que regula la replicación del ADN, la proliferación celular y la muerte celular (2). En las células expuestas a agentes mutágenos, aunque una mutación aislada no es capaz de transformar las células, el hecho de no existir la proteína p 53 normal predispone a las células a mutaciones adicionales y, al final, a la transformación maligna. Además de las mutaciones, la función normal del gen p 53 puede alterarse por unión a oncoproteínas virales ó del mismo individuo (3-5). La proteína bcl-2 presenta una distribución citoplasmática puntiforme, con ubicación intramitocondrial. El mecanismo por el cual este gen evita la apoptosis no está aclarado. Se piensa que su sobreexpresión confiere un mayor patrón de crecimiento, a la vez que sobrevengan mutaciones que afectan a protooncogenes y genes supresores.

La proteína ki67 está presente en todas las fases activas del ciclo celular, de forma que identifica las células que estén proliferando, siendo los tumores con un alto índice de Ki 67 los que tienen un peor pronóstico (6). Las moléculas de adhesión CD44 y CD44varV6 están presentes en el epitelio normal de la cabeza, del cuello y de la laringe. Su función parece ser el mantenimiento de la integridad del epitelio, de forma que su pérdida es un indicador de transformación maligna del epitelio escamoso y se relaciona con la progresión de los carcinomas de cabeza y cuello (7-9).

El objetivo del estudio es determinar el valor pronóstico de la sobreexpresión de la proteína c-erb-B2, de la proteína p53, de la proteína bcl-2, del grado de proliferación tumoral mediante la modificación de la proteína nuclear Ki67 y de la presencia o ausencia de la molécula de adhesión CD44varV6 en el carcinoma epidermoide de labio.

MATERIAL Y METODOS

Se realizó un estudio sobre variables inmunohistoquímicas en el carcinoma epidermoide de labio tomando como población de referencia los enfermos diagnosticados y tratados de dicho tumor desde 1975 hasta 1995 en la Comunidad de Cantabria, España.

Los criterios de inclusión en el estudio fueron el diagnóstico anatómo-patológico de carcinoma epidermoide de labio en la pieza quirúrgica, la disposición de las preparaciones histológi-

the cellular kinetics, preserving both the tissular architecture and the inter-tissular reactions (1). These techniques operate at the molecular level of the cancer (secondary to the activation of proto-oncogenes such as c-erb-B2, to the inactivation of suppressor genes such as p53, local genetic alterations in those genes that regulate apoptosis such as bcl-2, and the oncogenic viruses) and on the biology of tumor growth (dependent on tumoral kinetics such as the Ki67 protein and the tumoral environment such as the adhesion molecule CD44varV6).

The c-erb-B2 protein is located in the tumoral cellular membrane, above all in the microvilli, and is activated by its fusion with a molecule similar to Tumor Growth Factor alpha (TGF) at the superficial cellular level. Together they codify the overexpression of the normal forms of growth factor receptors, in such a way that they become extremely sensitive to a very small quantity of themselves.

The p53 gene codifies a phosphoprotein which regulates DNA replication, cellular proliferation and cell death (2). In those cells exposed to mutagenic agents, although an isolated mutation is not able to transform cells, the fact that the normal p53 protein does not exist predisposes the cells to additional mutations, and finally, to malignant transformation. In addition to mutation, the normal function of the p53 gene can be altered by fusion with viral onco-proteins or with the individual's own proteins (3-5).

Protein bcl-2 presents a punctiform cytoplasmic distribution, of intramitochondrial location. The mechanism by which this gene avoids apoptosis is not clear. It is thought that its overexpression confers on it an increased growth pattern, at the same time as the occurrence of mutations which affect the proto-oncogenes and suppressor genes.

Ki67 protein is present in all active phases of the cell cycle, in such a way that it identifies proliferating cells, tumors with a high Ki67 index being those with the worst prognosis (6).

The CD44 and the CD44varV6 adhesion molecules are present in normal epithelium of the head, neck and larynx. Their function seems to be to maintain the integrity of the epithelium, so that their loss is an indicator of malignant transformation of squamous epithelium and is related to the progression of carcinomas of the head and neck (7-9).

The aim of this study is to determine the prognostic value of the following: overexpression of the c-erb-b2, p53 and bcl-2 proteins, the grade of tumor proliferation through the modification of the nuclear protein Ki67, and of the presence or absence of the adhesion molecule CD44varV6 in epidermoid carcinoma of the lip.

MATERIAL AND METHODS

A study of immunohistochemical variables in epidermoid carcinoma of the lip was carried out, taking as a reference population, patients diagnosed and treated for this tumor from 1975 to 1995 in the Cantabrian Community, Spain.

The criteria for inclusion in the study were: the anatomicopathological diagnosis of epidermoid carcinoma of the lip in the surgical specimens; the availability of histological preparations, surgical samples and clinical histories; and the existence of at

cas, piezas quirúrgicas e historias clínicas, y la existencia de un seguimiento clínico de los pacientes de, al menos, cinco años. Las fuentes de información fueron la Historia Clínica del Servicio de C. Maxilofacial del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla de Santander, y los Informes del Departamento de Anatomía Patológica del mismo Hospital.

Un patólogo experimentado seleccionó una de las preparaciones de cada caso, de forma que tuviera una cantidad de tumor adecuada frente a la población celular normal. Se buscaron los bloques tumorales conservados en parafina comprobando que correspondían a las preparaciones seleccionadas previamente, y dentro de cada uno de ellos se marcó una zona con una población tumoral de al menos el 20 % frente a la población de referencia no tumoral, evitando las zonas de necrosis y hemorragias. Después de todas estas selecciones previas a las técnicas de inmunohistoquímica, la muestra quedó reducida a 79 tumores, de los cuales se fueron excluyendo un determinado número de ellos según las diferentes técnicas realizadas.

Las técnicas inmunohistoquímicas se realizaron con el sistema EnVisión + en un aparato de tinción automática (Dako®) (tabla I). Para cuantificar los parámetros estudiados en todos los casos se utilizaron como control positivo otros tumores positivos conocidos, y como control negativo el tejido no tumoral adyacente al tumor. La valoración fue realizada de la siguiente manera según las diferentes variables por el mismo patólogo:

- Expresión proteica del gen c-erb-B2 (74 casos) :
 - (-): Las células tumorales no se teñían.
 - (+): Las células tumorales se teñían de forma citoplasmática y/o membranosa.
- Expresión proteica del gen supresor p53 (71 casos) :
 - (-): Ninguna célula tumoral se teñía.
 - (+): Entre el 10 y 50 % de las células tumorales se teñían.
 - (++): Más del 50 % de las células tumorales se teñían.
- Expresión proteica del gen regulador de la apoptosis bcl-2 (76 casos):
 - (-): Ninguna célula tumoral se teñía.
 - (+): Se teñen las células tumorales. También se teñen el infiltrado linfocitario y la queratina de los globos paraqueratósicos.
- Marcador de proliferación tumoral Ki67 (69 casos) :

Se utilizó el método de Simpson para cuantificar el número de células tumorales en cuatro campos consecutivos de gran aumento (x 40). Se hizo una estimación del número de células tumorales Ki67 positivas por cada 100 células tumorales.
- Molécula de adhesión CD44varV6 (79 casos) (Figura 1):
 - (-): Las células tumorales no se teñían ó se teñían en un porcentaje inferior al 30 %.
 - (+): Las células tumorales en la zona de invasión se teñían en un porcentaje variable entre un 30 y un 100 %. Se desglosó por decenas el resultado.

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa informático SPSS 8.0, en cuya base de datos relacional fueron almacenados los valores obtenidos. Al estudiar todas las variables existieron casos que no se pudieron valorar, bien porque la muestra carecía de la calidad idónea tras realizar la técnica inmunohistoquímica, o bien por no disponer de tejido tumoral suficiente para una correcta valoración en la preparación. Se realizó la estadística descriptiva e inferencial, y posteriormente

least five years clinical follow-up for the patients.

Information was obtained from the clinical records of the Maxillofacial Surgery Department, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, and the corresponding reports from the Pathology Department of the same Hospital.

An experienced pathologist selected one of the preparations from each case, in such a way that there was a sufficient amount of tumor material against the normal cellular population. The paraffin-block samples were located, checking that they corresponded to the previously selected preparation. Within each of these, an area of tumor population of at least 20% against the non-tumoral reference population was marked, avoiding areas of necrosis and hemorrhage. Following this initial selection procedure, the number of samples for immunohistochemical study was reduced to 79 tumors, of which a certain number were excluded as the different analyses were made.

The immunohistochemical study was carried out using the EnVision+ system in an automatic staining machine (Dako®) (table I). In order to quantify the parameters studied in all the cases, other known positive tumors were used as positive control and adjacent non-tumoral tissue was used as negative control. The evaluation was carried out by the same pathologist in accordance with the following criteria:

- Protein expression of c-erb-B2 gene (74 cases):
 - (-): No tumor cell staining.
 - (+): Cytoplasmic and/or membranous tumor cell staining.
- Protein expression of p53 suppressor gene (71 cases):
 - (-): No tumor cell staining.
 - (+): Between 10 and 50 % of tumor cells stained.
 - (++): More than 50 % of tumor cells stained.
- Protein expression of bcl-2 apoptosis regulator gene (76 cases):
 - (-): No tumor cell staining.
 - (+): Tumor cell staining. Staining also of the lymphocytic infiltrate and the keratin of the parakeratic globules.
- Ki67 tumor proliferation marker (69 cases):

The Simpson method was used to quantify the number of tumor cells in four consecutive high magnification fields (x 40). An estimate was made of the number of Ki67 positive tumor cells per 100 tumor cells.

- CD44varV6 adhesion molecule (79 cases) (Figure 1):
 - (-): Either no tumor cell staining, or less than 30 % tumor cell staining.

(+): Between 30 and 100% of tumor cells in the invasion area stained. The results were divided into groups of ten.

The statistical analysis was carried out using the SPSS 8.0 program. On studying all the variables there were some cases that could not be evaluated, either because the sample was of insufficient quality following the immunohistochemical study, or because not enough tumoral tissue was available within the preparation for a correct evaluation. Both descriptive and inferential statistics were calculated, and the five-year survival tables were determined from all the variables using the Kaplan-Meier non-parametric model. The statistical significance was evaluated using the Log Rank test. Those variables having individual prognostic significance were studied together using the Cox multiple regression analysis in order to determine those variables

con todas las variables se determinaron las tablas de supervivencia actuarial a los 5 años según el modelo no paramétrico de Kaplan-Meier. La significación estadística fue valorada mediante el test de Log-Rank. Las variables con significación pronóstica individual se estudiaron de forma conjunta mediante el análisis de regresión múltiple de Cox, determinando aquellas con capacidad pronóstica independiente.

RESULTADOS

La inmunotinción para la proteína c-erb-B2 fue positiva en 56 casos, siendo todas ellas de localización citoplasmática, de modo que representó el 75% de las piezas tumorales estudiadas, mientras que la tinción fue negativa en las 18 piezas quirúrgicas restantes.

Respecto a la proteína p53, en 31 casos la tinción fue positiva entre el 10 y el 50% de las células tumorales, representando el 43,8% de la muestra; en 19 casos (26,8%) fue positiva en más del 50% de las células tumorales, y en 21 casos (29,6%) la tinción se consideró negativa.

Para la proteína bcl-2, de los 76 casos analizados, 73 de ellos fueron considerados negativos (96,2%) y solamente 3 fueron positivos (3,8%).

Los valores de la expresión proteica de ki67 oscilaron entre un mínimo de 0% y un máximo de 6,29%, con una media de 1,64% y una desviación estándar de 1,34.

En cuanto al estudio de la molécula de adhesión CD44varV6 (Figura 2), en 32 casos (40,5%) la tinción en la zona de invasión fue positiva en el 100% de las células tumorales; en 33 casos (41,8%) fue positiva entre el 51 y 99% de las células tumorales; en 6 casos (7,6%) la tinción fue positiva entre el 0 y 50%, y sólo en 8 casos (10,1%) la inmunotinción fue negativa.

En el estudio de la supervivencia de los pacientes mediante el análisis de Kaplan-Meier y analizando los resultados de las diferentes variables estudiadas, solamente se encontró significación estadística en el caso de la molécula de adhesión CD44varV6, de modo que conforme disminuye la positividad de la tinción para esta molécula (Figura 3), se acorta la supervivencia de los pacientes ($p=0,0237$). Al aplicar el análisis de regresión múltiple de Cox no tuvo significación pronóstica independiente.

with independent prognostic capacity.

RESULTS

Immunostaining for the c-erb-B2 protein was positive in 56 cases, all of these located in the cytoplasm, representing 75% of the tumor samples studied, and negative in the 18 remaining surgical samples.

With respect to the p53 protein, the staining was positive in between 10 and 50% of the tumor cells in 31 cases, representing 43.8% of the total sample; positive in more than 50% of the tumor cells in 19 cases (26.8%), and considered negative in 21 cases (29.6%).

For the bcl-2 protein, of the 76 cases analyzed, 73 were considered negative (96.2%) and only 3 were positive (3.8%).

The values for the Ki67 protein expression varied between a minimum of 0% and a maximum of 6.29%, with an average of 1.64% and a standard deviation of 1.34.

Regarding the study of the CD44varV6 adhesion molecule (Figure 2), positive staining of the invasive area was found in 100% of the tumor cells in 32 cases (40.5%), between 51 and 99% of tumor cells in 33 cases (41.8%), between 0 and 50% in six cases (7.6%), and was negative in only eight cases (10.1%).

In the survival study using the Kaplan-Meier analysis, and analyzing the results of the different variables studied, a statistical significance was found only in the case of the adhesion molecule CD44varV6, in such a way that as the positive staining for this molecule decreased (Figure 3), the survival of the patients was reduced ($p=0.0237$). On applying the Cox multiple regression analysis, no independent prognostic significance was demonstrated.

DISCUSSION

Few publications exist on studies of the immunohistochemical variables in epidermoid carcinoma of the lip. In our study, which with 79 cases represents one of the most extensive series to date, we found no significant association between the c-erb-B2 protein and survival, which is in accordance with the majority of series studied on cancer of the head and neck where no important prognostic significance has been demonstrated (10, 11).

Tabla I. Panel inmunohistoquímico.
Table I. Immunohistochemical panel.

<u>Anticuerpo</u> <i>Antibody</i>	<u>Clon</u> <i>Clone</i>	<u>Casa comercial</u> <i>Manufacturer</i>	<u>Dilución</u> <i>Dilution</i>	<u>Recuperación Antigénica</u> <i>Antigenic Recovery</i>
Bcl-2	124	Dako, Glostrup Dinamarca	1:150	sí / yes
P53	DO7	Novocastra Newcastle Reino Unido	1:200	sí / yes
CD44v6	VFF-7	Boehringer Ingelheim Heidelberg Alemania	1:50	sí / yes
Ki67	MiB-1	Immunotech Marsella Francia	1:50	sí / yes
C-erb-B2	NCL-CBII	Novocastra	1:50	sí / yes

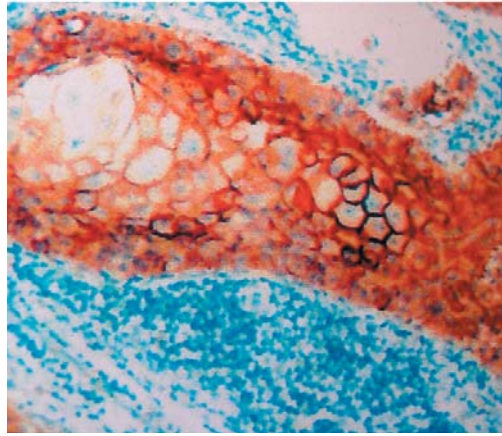


Fig. 1. Localización inmunohistoquímica de CD44varV6 en el carcinoma epidermoide de labio.
Immunohistochemical localization of CD44varV6 in the epidermoid carcinoma of the lip.

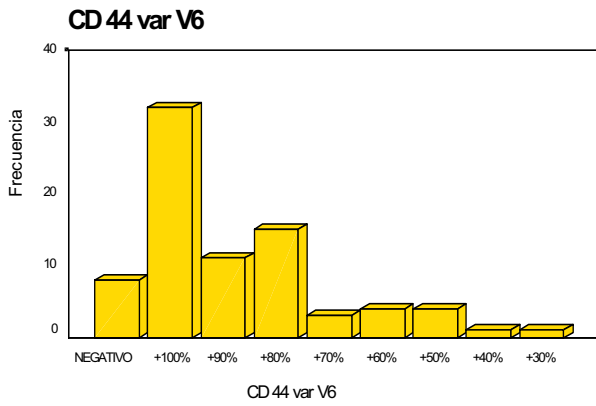


Fig. 2. Inmunotinción para la molécula de adhesión CD44varV6.

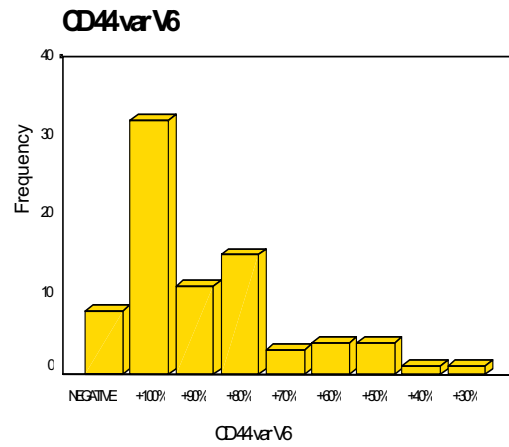


Fig. 2. Immunostaining for the CD44varV6 adhesion molecule.

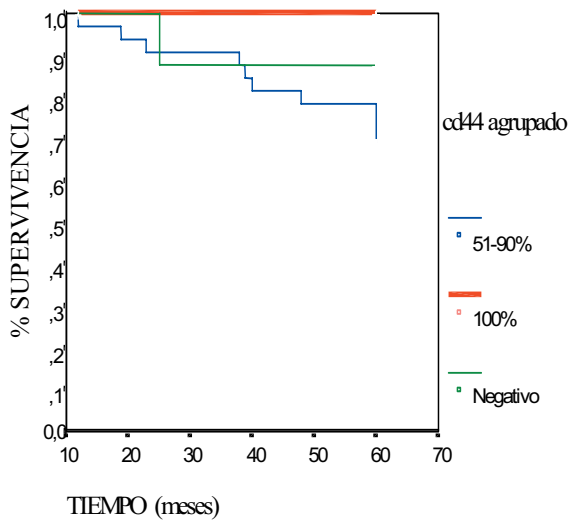


Fig. 3. Curva de supervivencia en meses mediante análisis de Kaplan-Meier para la molécula de adhesión CD44varV6.

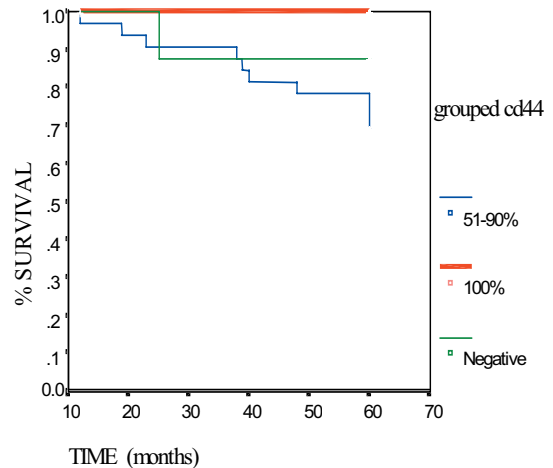


Fig. 3. Survival curve in months through Kaplan-Meier analysis for the adhesion molecule CD44varV6.

DISCUSION

Hasta el momento actual, se han publicado escasos trabajos dirigidos al estudio de las variables inmunohistoquímicas en el carcinoma epidermoide de labio. En nuestro estudio, que recoge una de las series más extensas aportadas con 79 casos, no encontramos asociación significativa entre la proteína c-erb-B2 y la supervivencia, al igual que en la mayoría de las series estudiadas de cáncer de cabeza y cuello donde no se ha demostrado importancia pronóstica (10,11). Existen estudios sobre carcinomas de laringe en los que se ha indicado su posible valor predictivo de metástasis ganglionares y a distancia (12, 13), y en el cáncer de mama se ha indicado que es un marcador de peor pronóstico y que puede predecir la respuesta al tratamiento (14).

En el cáncer humano las alteraciones moleculares del gen p53 son el acontecimiento genético más comúnmente encontrado. En la serie de tumores estudiada no se demostró la existencia de importancia pronóstica alguna, siendo los resultados publicados en otros estudios dispares entre sí. Así, en un estudio sobre tumores de cabeza y cuello se demostró que este factor no tiene valor pronóstico (13) y en otra serie de carcinomas epidermoides cutáneos se concluyó que la expresión proteica del gen supresor p53 no es un factor pronóstico independiente (15). Por el contrario, en el carcinoma de laringe se encontró asociación entre el p53 y el mal pronóstico en estadios tardíos de la enfermedad, independientemente de la presencia ó no de metástasis cervicales (7), y en otros trabajos la sobreexpresión de p53 se relacionó con un mejor pronóstico en el cáncer de cabeza y cuello (16).

La relación entre la expresión proteica del gen supresor p53 y la patogénesis del cáncer de labio ha sido también referida. En los 71 cánceres epidermoides de labio estudiados el 70,6% de los mismos expresó la proteína p53, mientras que en una serie de 26 cánceres epidermoides de labio (17), se detectó en el núcleo celular esta proteína en el 88% de los casos, en el 64% en el epitelio adyacente normal y en todos los casos en el epitelio adyacente atípico, demostrándose que las radiaciones ultravioletas pueden inducir la mutación del gen p53, con la consiguiente transformación neoplásica. En un estudio multicéntrico sobre carcinomas epidermoides de labio sí hallaron incremento en la expresión de esta proteína en tejido tumoral, al igual que en áreas de piel fotoexpuestas crónicamente (18). En otro estudio sobre lesiones benignas, premalignas y malignas de labio se encontró que la expresión de p53 puede relacionarse con la patogénesis del cáncer de labio y la exposición al sol. Para estos autores los pacientes con lesiones benignas de labio con expresión de p53 aberrante deberán ser sometidos a revisiones periódicas (19).

En cuanto a la expresión proteica del gen regulador de la apoptosis bcl-2, el 96,2% de los 76 carcinomas epidermoides de labio estudiados en nuestra serie no presentaron la expresión de esta proteína, y no se encontró relación significativa de esta variable con la supervivencia de los pacientes. En una serie de 48 tumores de cabeza y cuello, no se encontró valor pronóstico de este factor y de p53, ni relación con la presencia de metástasis (20). Sin embargo, en linfomas no Hodgkin de células B, adenocarcinomas de próstata, carcinomas de pulmón y carcinomas nasofaríngeos sí se han encontrado niveles altos de esta proteína y/o proteína bcl-2 aberrante, pero con significación pronóstica desconocida (21).

There are studies on carcinoma of the larynx in which a possible predictive value for lymph node metastasis has been indicated (12, 13); and in breast-cancer the c-erb-B2 protein has been indicated as a marker of worse prognosis and as a possible predictor for response to treatment (14).

In human cancer, molecular alterations of the p53 gene are the most common genetic finding. In this series no prognostic importance has been demonstrated, and results published in other studies are inconsistent.

Likewise, in a study on tumors of the head and neck it was shown that this factor has no prognostic value (13), and in another series of cutaneous epidermoid carcinomas it was concluded that the protein expression of the p53 suppressor gene is not an independent prognostic factor (15). On the other hand, in a study of carcinoma of the larynx an association between p53 and poor prognosis was found in late stages of the disease, independently of the presence, or otherwise, of cervical metastasis (7); and in other studies the overexpression of p53 was related with a better prognosis in cancer of the head and neck (16).

The relationship between the expression of the p53 suppressor gene and the pathogenesis of cancer of the lip has also been referred. In the 71 epidermoid carcinomas of the lip studied, 70.6% expressed the p53 protein, while in a series of 26 epidermoid carcinoma of the lip (17), this protein was detected in the cellular nucleus in 88% of the cases, in the normal adjacent epithelium in 64% and in the atypical adjacent epithelium in all the cases, demonstrating that ultraviolet radiation can induce mutations in the p53 gene, with a resulting neoplastic transformation. In a multicentric study on epidermoid carcinoma of the lip, an increase in the expression of this gene was found in tumor tissue, and in areas of chronically photo-exposed skin (18). In another study on benign, premalignant, and malignant lesions of the lip, it was found that p53 expression may be related with the pathogenesis of cancer of the lip and exposure to the sun. For these authors, those patients with benign lesions of the lip with aberrant p53 expression should be given periodic reviews (19).

Regarding the protein expression of the bcl-2 apoptosis regulator gene, 96.2% of the 76 epidermoid carcinoma of the lips studied in our series did not present expression of this protein and no significant relationship was found between this variable and patient survival. In a series of 48 tumors of the head and neck, no prognostic value was found for this factor or p53, nor any relation with the presence of metastasis (20). However, in non-Hodgkin's lymphomas of B cells, prostate adenocarcinomas, lung carcinomas and nasopharyngeal carcinomas, high levels of this protein and/or aberrant bcl-2 have been found, but with no clear prognostic significance (21).

In many tumors, such as those of the head and neck, it has been shown that proliferative activity correlates with tumor prognosis and progression (22), and that a strong correlation exists between a high and low index of Ki67 and a high or low grade of tumor differentiation (23). In tumors of the head and neck the results of studies on the relationship between different parameters that measure proliferation are controversial.

Likewise, in the results of our study the Ki67 tumor proliferation factor did not correlate significantly with survival, unlike others (7) who, in a study on carcinoma of the larynx, found that Ki67

Se ha demostrado en muchos tumores, entre ellos los tumores de cabeza y cuello, que la actividad proliferativa se correlaciona con su progresión y pronóstico (22), y que existe una fuerte correlación entre el alto o bajo índice de Ki67 y el alto o bajo grado de diferenciación tumoral (23). En los tumores de cabeza y cuello los resultados de los estudios sobre la relación entre diferentes parámetros que miden la proliferación son controvertidos. Así, en los resultados de nuestro estudio el factor de proliferación tumoral Ki67 no se correlacionó significativamente con la supervivencia, a diferencia de otros (7), que en un estudio sobre el carcinoma de laringe encontraron que la proliferación Ki67 se correlaciona negativamente con la supervivencia, pero sin llegar a la significación estadística. También demostraron una correlación negativa entre Ki67 y CD44varV6.

En los últimos años se está investigando la proliferación tumoral Ki67 como predictor de la respuesta al tratamiento radioterápico en los tumores de cabeza y cuello, de forma que la cuantificación del antígeno Ki67 antes y después de la radioterapia puede ser un parámetro útil en la predicción de la evolución clínica de los pacientes afectados de tumores de cabeza y cuello (24). En este sentido, Raybaud-Diogene et al. (25), han referido una mala respuesta a la radioterapia en los pacientes con tumores de cabeza y cuello con sobreexpresión p53 y una fracción de proliferación tumoral Ki67 <20%, encontrando además que estos marcadores tienen un valor predictivo mayor que el estadio tumoral.

Finalmente, la molécula de adhesión CD44varV6 cuya ausencia se relaciona con la progresión tumoral, ha sido el único marcador inmunohistoquímico estudiado en el que hemos encontrado una relación significativa entre su presencia y una mayor supervivencia. En la cavidad oral existen estudios que demuestran que dicha molécula está presente en la mucosa del epitelio oral normal, manteniendo la integridad del epitelio escamoso y que tiende a desaparecer en las lesiones premalignas y malignas, al igual que se asocia significativamente a la presencia de metástasis regionales (26,27). Del mismo modo, en el carcinoma de laringe (7), se ha encontrado relación significativa entre la presencia de CD44varV6 y un mejor pronóstico, como también se señala la relación entre el descenso en la expresión de CD44 y el aumento en la prevalencia de metástasis, pero sin ser significativa. Sin embargo, no todos los estudios publicados han confirmado todos estos hallazgos referidos (28).

En definitiva, y como se puede apreciar en el análisis de los datos del estudio que aportamos y en consonancia con la mayoría de las serie publicadas, donde los resultados son en la mayoría de las veces dispares, podemos afirmar que el estudio inmunohistoquímico no es relevante en cuanto a su valor pronóstico en este tipo de tumores de labio. En este sentido, las variables inmunohistoquímicas analizadas en nuestra serie no deberían utilizarse habitualmente como predictores pronósticos ni tampoco deberían realizarse rutinariamente en el estudio anatomopatológico de estos tumores, ya que el estudio clínico e histopatológico clásicos, con menor coste, siguen teniendo un mayor valor e importancia pronóstica.

proliferation correlated negatively with survival, but without achieving statistical significance. They also demonstrated a negative correlation between Ki67 and CD44varV6.

In recent years the Ki67 tumor proliferation index has been investigated as a predictor of response to radiotherapy in tumors of the head and neck, in such a way that the quantification of the Ki67 antigen, before and after radiotherapy, can be a useful parameter in the prediction of the clinical evolution of patients affected by these types of tumors (24). In this regard, Raybaud-Diogene et al. (25) have referred to a poor response to radiotherapy in those patients with tumors of the head and neck with p53 over expression and a fraction of Ki67 tumor proliferation <20%, and finding, furthermore, that these markers have a better predictive value than tumor stage.

Finally, the adhesion molecule CD44varV6, the absence of which is related with tumor progression, was the only immunohistochemical marker studied in which we have found a significant relationship between its presence and greater survival. There are studies of the oral cavity which demonstrate that this molecule is present in normal oral epithelium, maintaining the integrity of the squamous epithelium and tending to disappear in premalignant and malignant lesions. It also associates significantly with the presence of regional metastases (26, 27). Likewise, in carcinoma of the larynx (7), a significant relationship between the presence of CD44varV6 and a better prognosis was found, as was a relation between the decrease in CD44 expression and an increase in the prevalence of metastasis, but without significance in this instance. However, not all the published studies have confirmed all of these findings (28).

In conclusion, as can be appreciated from the analysis of our data, and in accordance with the majority of the published series, where the majority of results are usually inconsistent, we can confirm that an immunohistochemical study has no relevant prognostic value in this type of tumor of the lip. In this regard, the immunohistochemical variables analyzed in our series should not generally be used as prognostic indicators, nor should they be used routinely in the anatomicopathological study of these tumors, since the classic and more cost effective clinical and histopathological studies continue to have a better and more significant prognostic value.

BIBLIOGRAFIA/REFERENCES

1. Garcia R, Coltrera MB, Gown AM. Analysis of proliferative grade with anti PCNA7 cyclin monoclonal antibodies in fixed embedded tissues. *Am J Pathol* 1989;134:733-9.
2. Harris C, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor suppressor gene. *N Eng J Med* 1993;329:1318-27.
3. Harris C. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990's. *Cancer Res* 1991;51:5023-44.
4. Werness B, Levine A, Howley P. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990;248:76-9.
5. Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53 associated protein in human sarcoma. *Nature* 1992;358:80-3.
6. Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of cell proliferation-associated nuclear antigen. That is defined by monoclonal antibody Ki 67. *Am J Pathol* 1991;138:867-73.
7. Hudson D, Speight P, Watt F. Altered expression of CD44 isoforms in squamous cell carcinomas and cell lines derived from these. *Int J Cancer* 1996;66:457-63.
8. Herold-Mende C, Seiter S, Born AI, Patzelt E, Schupp M, Zoller J et al. Expression of CD44 splice variants in squamous epithelia and squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Pathol* 1996;179:66-73.
9. Soukka T, Salmi M, Joensuu H, Hakkinen L, Sointu P, Koulu L et al. Regulation of CD44 var v6 containing isoforms during proliferation of normal and malignant epithelial cells. *Cancer Res* 1997;57:2281-9.
10. Craven JM, Pavelic ZP, Stambrook PJ, Pavelic L, Gapany M, Kelley DJ et al. Expression of c-erb-2 gene in human head and neck carcinoma. *Anticancer Res* 1992;12:2273-6.
11. Field J, Spandidos DA, Yiagnisis M, Gosney JR, Papadimitriou K, Stell PM. C-erb-b2 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res* 1992;12:613-20.
12. Takes RP, Baatenburg de Jong RJ, Schuurin E, Hermans J, Vis AA, Litvinov SV et al. Marker for assesment of nodal metastasis in laryngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;123:412-9.
13. Weinstein G, Nuamah I, Tucker J, Montone K. Evaluation of HER-2/neu (cerb-B2) oncogene expression in whole organ sections of supraglottic squamous cell carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996;105:275-9.
14. Hynes N. Amplification and overexpression of the cerb-b2 gene in human tumors :its involvement in tumor development, significance as a prognostic factor, and potential as a target for a cancer therapy. *Semin Cancer Biol* 1993;4:19-26.
15. Mansoor A, Mc Kee PH, Simpson JA, McGuire B, Hobbs C. Prognostic significance of ki67 and p53 immunoreactivity in cutaneous squamous cell carcinomas. *Am J Dermatopathol* 1996;18:351-7.
16. Santer R, Ridge J. p53 overexpression correlates with increased survival in patients with squamous carcinoma of the tongue base. *Am J Surg* 1992;164:651-3.
17. Berner A, Holm R, Naess A, Hjortdal O. p53 protein expression in squamocellular carcinomas of the lip. *Anticancer Res* 1993;13:2421-4.
18. Fabbrocini G, Russo N, Pagliuca MC, Delfino M, Staibano S, Molea G et al. p53, cyclin-D1, PCNA, AgNOR expression in squamous cell cancer of the lip: a multicenter study. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2000;16:172-7.
19. Crosthwaite N, Teale D, Franklin C, Foster GA, Stringer BM. p53 protein expression in malignant, pre-malignant and non-malignant lesions of the lip. *J Clin Pathol* 1996;49:648-53.
20. Li Ma MD, Adam Ronai PD. Expression of p53 and Bcl-2 in squamous cell carcinoma of the Head and Neck :An immunohistochemical study. *Appl Immunohistochemi* 1998;6:77-83.
21. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA et al. Tumor suppressor P53 is a regulator of bcl-2 and box gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 1994;9:1799-1805.
22. Tubiana M, Conroli A. Proliferation kinetics in human solid tumors :relation to probability of metastatic dissemination and long term survival. *Radiother Oncol* 1989;15:1-18.
23. Lorz M, Meyer-Breiting E. Determination of cell proliferation using monoclonal antibodies studies of 21 squamous cell carcinoma of the head and neck area. *Laryngol Rhinol Otol* 1988;67:539-42.
24. Ogawa Y, Inomata T. Changes in Ki67 labeling rates of head and neck squamous cell carcinomas during preoperative radiation therapy. *Oncology* 1992;49:450-3.
25. Raybaud-Diogene H, Fortin A, Morency R, Roy J, Monteil RA, Tetu B. Markers of radioresistence in squamous cell carcinomas of the head and neck : A clinicopathologic an immunohistochemical study. *J Clin Oncology* 1997;15:1030-8.
26. Bahar R, Kunishi M, Kayada Y, Yoshiga K. CD44varV6 expression as a progression marker in benign, premalignant and malignant oral epithelial tissues. *Int J Oral Maxillofac* 1997;26:443-6.
27. Kunishi M, Kayada Y, Yoshiga K. Down regulated expression of CD44varV6 in oral squamous cell carcinomas and its relationship to regional lymph node metastasis. *Int J Oral Maxillofac* 1997; 26:280-3.
28. Piffko J, Bankfalvi A, Klauke K, Dreier R, Joos U, Bocker W et al. Unaltered strong immunohistochemical expression of CD44v6 and CD44v5 isoforms during development and progression of oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1996;25:502-6.