

Expresión de E-cadherina, laminina y colágeno IV en la evolución de displasia a carcinoma epidermoide oral

Antonio Santos García ¹, M. Mar Abad Hernández ², Emilio Fonseca Sánchez ³, Roberto Julián Gonzalez ⁴, Purificación Galindo Villardón ⁵, Juan Jesús Cruz Hernández ⁶, Agustín Bullón Sopolana ⁷

(1) Doctor en Medicina. Médico Estomatólogo. Profesor Asociado de Odontopediatría. Dpto de Cirugía. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca

(2) Profesora Titular de Anatomía Patológica. Dpto de Biología celular y Patología. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca

(3) Profesor Asociado. Departamento de Medicina. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca

(4) Médico anestesista. Hospital "Virgen de la Concha". Zamora

(5) Directora del Departamento de Estadística Biosanitaria. Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca

(6) Catedrático de Oncología. Dpto. de Medicina. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca

(7) Catedrático de Anatomía Patológica. Dpto de Biología Celular y Patología. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca

Correspondencia:

Dr. Antonio Santos García

Avda. Tres Cruces, 13. Entrepr. 3. 49008 Zamora

E-mail: asantos@infomed.es

Recibido: 4-07-2004 Aceptado: 6-08-2005

Indexed in:

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

Santos-García A, Abad-Hernández MM, Fonseca-Sánchez E, Julián-Gonzalez R, Galindo-Villardón P, Cruz-Hernández JJ, Bullón-Sopolana A. E-cadherin, laminin and collagen IV expression in the evolution from dysplasia to oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006;11:E100-5.

© Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - ISSN 1698-6946

RESUMEN

Objetivos: Estudiar la pérdida o reducción de la adhesión celular mediada por E-cadherina en leucoplasias, carcinomas epidermoides y metástasis ganglionares. Estudiar la pérdida de continuidad de la expresión de laminina y colágeno IV en la membrana basal epitelial en el desarrollo biológico de las leucoplasias y carcinomas orales.

Material y método: Hemos estudiado 124 muestras de pacientes portadores de leucoplasias y carcinomas orales con diversos diagnósticos que abarcan desde epitelio normal (13 muestras), displasias leves (2), displasias moderadas (12), carcinomas in situ (13) carcinomas microinvasores (11) Carcinoma epidermoide oral (64 muestras) y metástasis ganglionar (9). Se construyeron 7 bloques de tissue microarrays con aguja de 2mm y se realizó un estudio mediante técnica inmunohistoquímica para E-cadherina (clona 36, T.D. ABD Company), Laminina (078P, Biogenex) y Colágeno IV (PHM12, Biogenex).

Resultados: En Displasias Leves y Moderadas presentan pérdida de expresión de E-cadherina, Laminina, y Colágeno IV (20%). En Carcinomas in situ y Microinvasores, presentaron pérdida de expresión de E-cadherina (73%), y en Laminina y Colágeno IV (57%). En los carcinomas epidermoides, encontramos pérdida de expresión de E-cadherina (90%) y discontinuidad en la M. basal (70%). Todas las metástasis ganglionares presentaron pérdida de E-cadherina y discontinuidad en Laminina y Colágeno IV.

Conclusiones: La pérdida de expresión de E-cadherina se incrementa al aumentar el grado de displasia de las lesiones. La pérdida de continuidad en la expresión de laminina y Colágeno IV sigue una evolución paralela desde displasias a metástasis ganglionares. La disminución en la expresión de los tres marcadores ha sido significativa en la evolución de las lesiones orales.

Palabras clave: Leucoplasia oral, cáncer oral, E-cadherina, Laminina, Colágeno IV, tissue microarrays, inmunohistoquímica.

ABSTRACT

Objectives: Study the loss or reduction of the cellular adhesion mediated for E-cadherin in oral leukoplakias, oral squamous cell carcinomas and metastatic nodules. Study the loss of continuity of the laminin and collagen IV expression in the epithelial basal membrane from the biological development of the oral leukoplakias and oral carcinomas.

Material and method: we have studied 124 samples of patient payees leukoplakias and oral carcinomas with diverse

diagnosis that embrace from normal epithelium (13 samples), mild dysplasias (2), moderate dysplasias (12), "in situ" carcinomas (13), microinvasive carcinomas (11) oral squamous cell carcinomas (64 samples) and metastatic nodules (9). 7 blocks of tissue microarrays were built with needle of 2mm and was carried out a study by means of immunohistochemical technique for E-cadherin (clone 36, Biogenex), Laminin (078P, Biogenex) and Collagen IV (PHM12, Biogenex).

Results: In Mild and Moderate Dysplasias the results present loss of E-cadherin, Laminin, and Collagen IV (20%) expression. "in situ" and microinvasive carcinomas, the results presented loss of E-cadherin expression (73%), and loss in Laminin and Collagen IV expression (57%). In the squamous cell carcinomas, we find E-cadherin underexpression (90%) and discontinuity in the Basal Membrane. (70%). All the metastatic nodules presented loss of E-cadherin expression and discontinuity in Laminin and Collagen IV expression.

Conclusions: The loss of E-cadherin expression is increased when increasing the dysplasia grade of lesions. The loss of continuity in the laminin and Collagen IV expression follow a parallel evolution from dysplasias to metastatic nodules. The underexpression of the three markers has been significant in the evolution of the oral lesions.

Key words: Oral Leucoplasia, oral cancer, E-cadherin, Laminin, Collagen IV, tissue microarrays, immunohistochemistry.

INTRODUCCION

El cáncer de cabeza y cuello comprende alrededor del 3% de todas las neoplasias en Estados Unidos, donde en 2004 se estima que hay más de 28260 casos nuevos y 7230 muertes anuales (1). La capacidad de invasión de los cánceres orales y de producir metástasis regionales es un factor importante en el pronóstico y condiciona el tratamiento de los pacientes con cáncer oral (2). La E-cadherina es una glicoproteína transmembrana de 120kDa que interviene en la adhesión celular mediada por el calcio (3). La pérdida o reducción de la adhesión celular mediada por E-cadherina es un paso importante en el desarrollo de la invasión y metástasis en múltiples carcinomas incluidos los carcinomas orales (3-5).

La membrana basal es el primer obstáculo que deben atravesar las células neoplásicas. Los componentes principales de la membrana basal son colágeno tipo IV, laminina y en menor proporción otras moléculas como perlecan, nidogen, entactin, colágeno tipo VII y otras (6). En general la membrana basal se pierde en muchos carcinomas invasores. La habilidad de las neoplasias malignas de destruir la membrana basal se ha correlacionado con su potencial invasor y la pérdida de continuidad de la expresión de laminina y colágeno IV puede ayudar en el diagnóstico precoz y la predicción del desarrollo biológico de las lesiones orales (7).

En el presente trabajo se exploró el comportamiento de la expresión proteica de E-cadherina, Laminina, y Colágeno IV, en leucoplasias, carcinomas de células escamosas de cavidad oral y, en metástasis a ganglios regionales; con el objeto de determinar la relación entre la expresión proteica de estos marcadores con lesiones premalignas y malignas de cavidad oral. Para ello se efectuó un estudio mediante micro-arreglos tisulares (tissue-microarrays), que consiste en estudio de múltiples fragmentos de tejidos de lesiones orales en un mismo portaobjetos por el método de inmunohistoquímica.

MATERIAL Y METODOS

Para la realización de este estudio se han revisado los archivos de los Servicios de Anatomía Patológica y ORL

del Hospital Clínico Universitario de Salamanca desde el año 1990 hasta el año 2000 ambos inclusive. Seleccionando 124 muestras de pacientes con diagnóstico macroscópico de leucoplasia oral cuyo diagnóstico anatomopatológico fue de 13 casos de epitelio normal, 2 displasias leves y 12 displasias moderadas, 13 carcinomas in situ y 11 carcinomas microinvasores, 64 carcinomas epidermoides y 9 metástasis ganglionares siguiendo los criterios de diagnóstico anatomopatológico de estas lesiones (8,9). Se recuperaron del archivo los portaobjetos de las biopsias seleccionadas y los bloques de tejido conservados en parafina de las 124 muestras de biopsias seleccionadas.

Construcción de Microarreglos tisulares:

Se realizó mediante el empleo del Tissue-Arrayer (Beecher instruments, Silver Spring, MD) (Figura 1A). Es un instrumento de precisión operado de forma manual, que permite a los investigadores formar múltiples muestras de tejido en un solo bloque de parafina. Permitiendo el estudio de múltiples muestras pequeñas de tejido en condiciones homogéneas y con mínimo consumo de reactivos, mucho menor que con técnicas convencionales de inmunohistoquímica (10-12).

Primeramente, se llevó a cabo la selección del material objeto de estudio, en los portaobjetos de las biopsias teñidos con hematoxilina y eosina, localizando, en dichos portaobjetos la zona que va a ser objeto de estudio (tejido normal control, hiperplasias, displasias carcinomas etc) (Figura 1B). Posteriormente se localizó, la zona previamente seleccionada en el portaobjetos, en el bloque de tejido donante conservado en parafina. Se Construyó un bloque de parafina en blanco que será el bloque receptor de los micro-arreglos tisulares (Figura 1C). Se preparó el Tissue-Arrayer colocando dos agujas de punción, donante y receptora, con una sección de 2mm. en la torreta. Se situó el bloque receptor en su receptáculo y se colocaron en cero los dos micrómetros X e Y, en la posición que decidida como punto de inicio en la construcción del micro-arreglo tisular. Con la aguja receptora del Tissue-Arrayer de 2 mm. Se realizó una perforación en el bloque receptor y se extrajo el cilindro blanco de parafina sobrante de la aguja receptora (Figura 1D). Situando la bandeja puente protectora encima del bloque receptor,

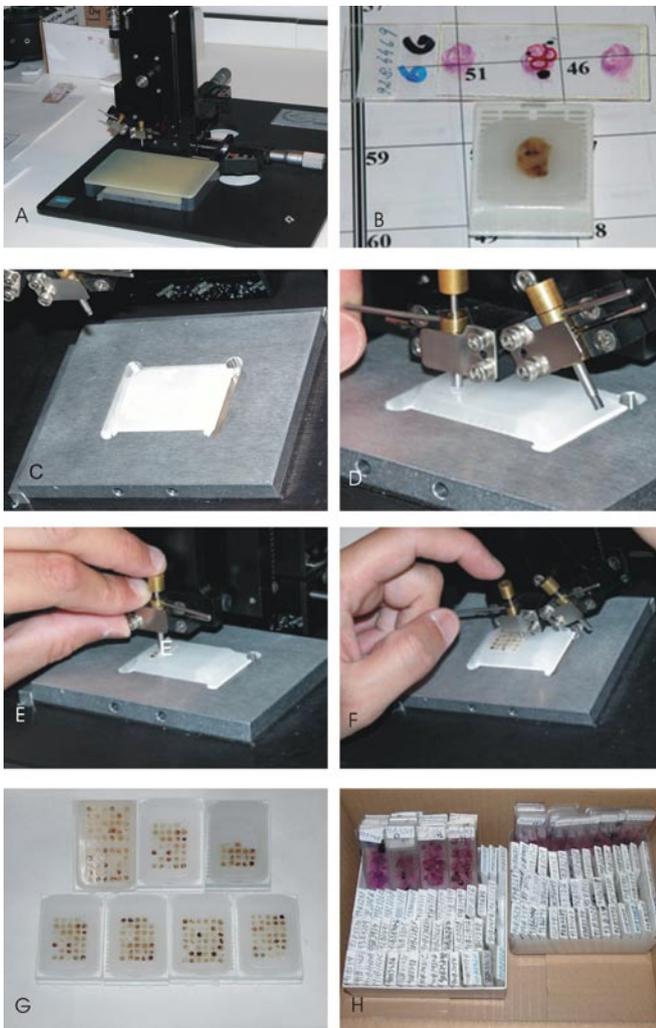


Fig. 1. Preparación de Matrices tisulares para el estudio de lesiones de cavidad oral

Se realizó una perforación en la zona preseleccionada del bloque donante con la aguja donante del Tissue-Arrayer, obteniendo un cilindro del interior de la aguja donante, al presionar sobre el tope de profundidad situado por encima de la aguja de punción. Se retiró la bandeja protectora del bloque receptor, y se introdujo el cilindro de tejido donante en el orificio previo que se había efectuado en el bloque receptor (Figura 1E). Se avanzó la torreta del Tissue-Arrayer a una distancia de 3 mm. del orificio anterior haciendo una nueva perforación con la aguja de punción receptora y se repitieron los pasos que se describieron, y así sucesivamente, hasta completar la primera fila de orificios y oclusión con cilindros tisulares donantes en el bloque receptor. Con el micrómetro X se efectuó un desplazamiento lateral para separar otros 3 mm. del último orificio realizado en la primera fila comenzando a construir el primer orificio de la segunda fila. Se repitieron los pasos descritos para la primera fila, en la segunda y sucesivas filas (Figura 1F). Una vez completado el primer bloque receptor de Tissue-Arrays se siguió

idéntico procedimiento para el resto de bloques receptores hasta completar un bloque de 60 muestras cilíndricas, y 4 bloques receptores de 35 cilindros cada uno, un bloque de 42 cilindros y finalmente un bloque de 18 cilindros restantes (Figura 1G). Se han incluido, de 1 (muestras endoscópicas) a 4 muestras cilíndricas por caso (10), haciendo un total de 260 cilindros en total. De este modo en 7 bloques se dispuso de la totalidad de las muestras.

Antes de realizar los cortes histológicos se introdujeron los bloques de microarreglos tisulares en una estufa a 60° durante 10 minutos para homogeneizar los posibles espacios virtuales creados en la parafina de los bloques receptores de microarreglos tisulares entre orificio receptor y orificio de tejido donante.

Técnicas Inmunohistoquímicas:

Se realizaron varios cortes, de 4 μ de los siete bloques de microarreglos tisulares, posteriormente se efectuó el desparafinado y rehidratación mediante 4 baños de Xilol 100% (5 minutos) seguido de 3 baños de alcohol absoluto (5 minutos). El desenmascaramiento antigénico se efectuó en una olla a presión con tampón citrato a pH 6, lavado con agua corriente 3 minutos. Lavado de los portaobjetos, con agua destilada, y con PBS.

La técnica de marcaje inmunohistoquímico se llevó a cabo en un inmunoteñidor automático *Optimax Plus de Biogenex de Menarini Diagnostics (Berkshire, England)*. Se ha utilizado la técnica Biotina/Estreptavidina Amplificada (BSA) según método supersensitivo de inmunodetección de *Biogenex (San Ramon, USA)*. Para E-cadherina, se ha utilizado como anticuerpo primario la clona 36 (1/200, B.D. Biosciences (San Diego, USA); para laminina la clona 078P (1/25, Biogenex); para colágeno IV la clona PHM12 (1/200, Biogenex). La incubación fue de 30 minutos en ambos casos. Contratación del corte histológico con hematoxilina de Carazzi y montaje en medio acuoso. Control negativo: el anticuerpo primario específico se sustituye por un tampón. Como control positivo para E-cadherina se empleó un carcinoma de mama con alta expresión, para laminina y colágeno IV control interno.

Valoración de la técnica inmunohistoquímica

Para E-cadherina se realizó una valoración por dos observadores independientes, como sigue: 3+ = tinción completa de la membrana celular de más del 50% de las células teñidas. 2+ = tinción mayor del 10% y menor del 50% de las células teñidas. 1+ = menos del 10% de células teñidas. 0 = ausencia de tinción (5). El patrón de tinción de laminina y colágeno IV se evaluó a una magnificación (400X) a lo largo de la membrana basal de la mucosa normal y lesiones displásicas y de los nidos tumorales en los carcinomas. La tinción se catalogó como continua cuando la reacción rojiza del producto se ve a lo largo del borde epitelial y conjuntivo, o discontinua cuando la reacción era fragmentaria o ausente. Las áreas de disrupción del epitelio debido a gran infiltrado inflamatorio del estroma se excluyeron del estudio. El depósito de laminina y colágeno IV alrededor de los vasos sanguíneos se utilizó como control interno (6).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el programa estadístico Stat View 4.0 para Mac/OS. Realizando un estudio estadístico descriptivo: media, desviación típica y error estándar para las variables cuantitativas. Los estudios inferenciales de comparación de tendencia central para las variables cuantitativas se han realizado utilizando un ANOVA. Cuando resultó significativo ($p < 0,05$), se buscaron las partes diferentes utilizando los test de Bonferroni, Tukey y LSD. Para las variables cualitativas o categorizadas se utilizó la prueba de Chi-cuadrada. La determinación de causas de significación se efectuó buscando las máximas contribuciones al estadístico de contraste y aplicando la propiedad aditiva de la chi-cuadrada. Se tomaron como significativos los contrastes con p-valores $< 0,05$. Se agruparon las muestras en un grupo epitelio normal, un grupo de displasias leves y moderadas, un grupo de carcinomas in situ, un grupo de carcinomas microinvasores, un grupo de carcinomas epidermoides y un grupo de metástasis ganglionares.

20% de los casos. Los carcinomas in situ y microinvasores, presentaron pérdida de expresión de E-cadherina en el 73% de los casos, y de laminina y colágeno tipo IV en el 57% de las muestras. En los carcinomas epidermoides, se encontraron pérdidas de expresión de E-cadherina en 90% y discontinuidad en la membrana basal en 70%. Todas las metástasis ganglionares presentaron pérdida de E-cadherina y discontinuidad en laminina y colágeno tipo IV (Gráficos 1 y 2).

laminina y colágeno IV

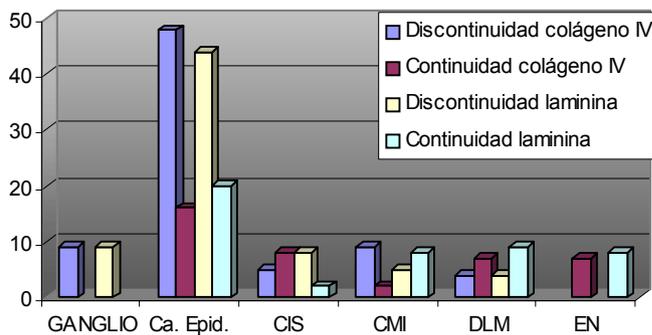


Gráfico 1. Expresión de Laminina y Colágeno IV en Epitelio normal (EN), Displasias leves y moderadas (DLM), Carcinomas in situ (CIS), Carcinomas microinvasores (CMI), carcinomas orales y metástasis ganglionares.

E-cadherina

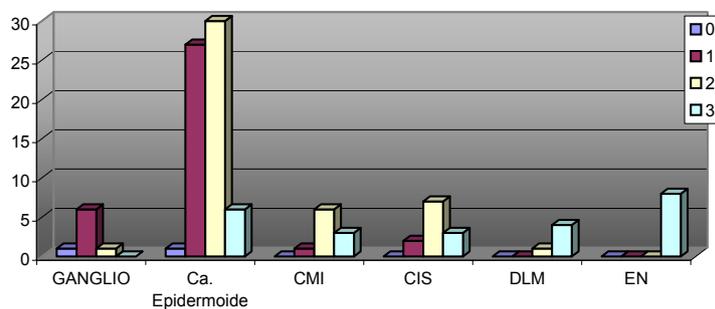


Gráfico 2. Expresión de E-cadherina en lesiones orales (Epitelio normal (EN), Displasias leves y moderadas (DLM), Carcinomas in situ (CIS), Carcinomas microinvasores (CMI), carcinomas orales y metástasis ganglionares). Se observa una pérdida de expresión que aumenta al avanzar el grado de displasia hacia carcinoma oral y en metástasis ganglionares.

RESULTADOS

La edad de los pacientes está comprendida entre los 34 años del paciente más joven y los 94 años del más mayor. Un 38,7% de los pacientes se corresponden con individuos entre 52 y 63 años. El 72,58% de los pacientes fueron varones y el 27,42% mujeres.

Las displasias leves y moderadas presentaron pérdida de expresión de E-cadherina, Laminina, y Colágeno IV en el

En displasias leves y moderadas comienza a observarse una pérdida de expresión que es más llamativa en el grupo de carcinomas in situ y en carcinomas microinvasores. En el grupo de carcinomas epidermoides se observó un aumento en la pérdida de expresión de E-cadherina que se mantuvo en el grupo de ganglios metastásicos estudiados (Figura 2). Se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de E-cadherina entre el grupo de epitelio normal y

el de carcinomas in situ y microinvasores ($p < 0,002$); y entre epitelio normal y carcinomas epidermoides ($p < 0,001$). También hay diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de displasias leves y moderadas y el de carcinomas epidermoides ($p < 0,001$) y entre el grupo de carcinomas in situ y microinvasores y el de carcinomas epidermoides y metástasis ganglionares ($p < 0,01$).

DISCUSION

E-cadherina juega un papel importante en la histogénesis y en el mantenimiento de la estructura del epitelio normal, forma las adherens junctions (originalmente conocidas como cinturón de desmosomas) que forman un cinturón continuo alrededor de la célula (4,13). Los esfuerzos por correlacionar E-cadherina con desarrollo tumoral en carcinomas orales no han culminado con éxito.

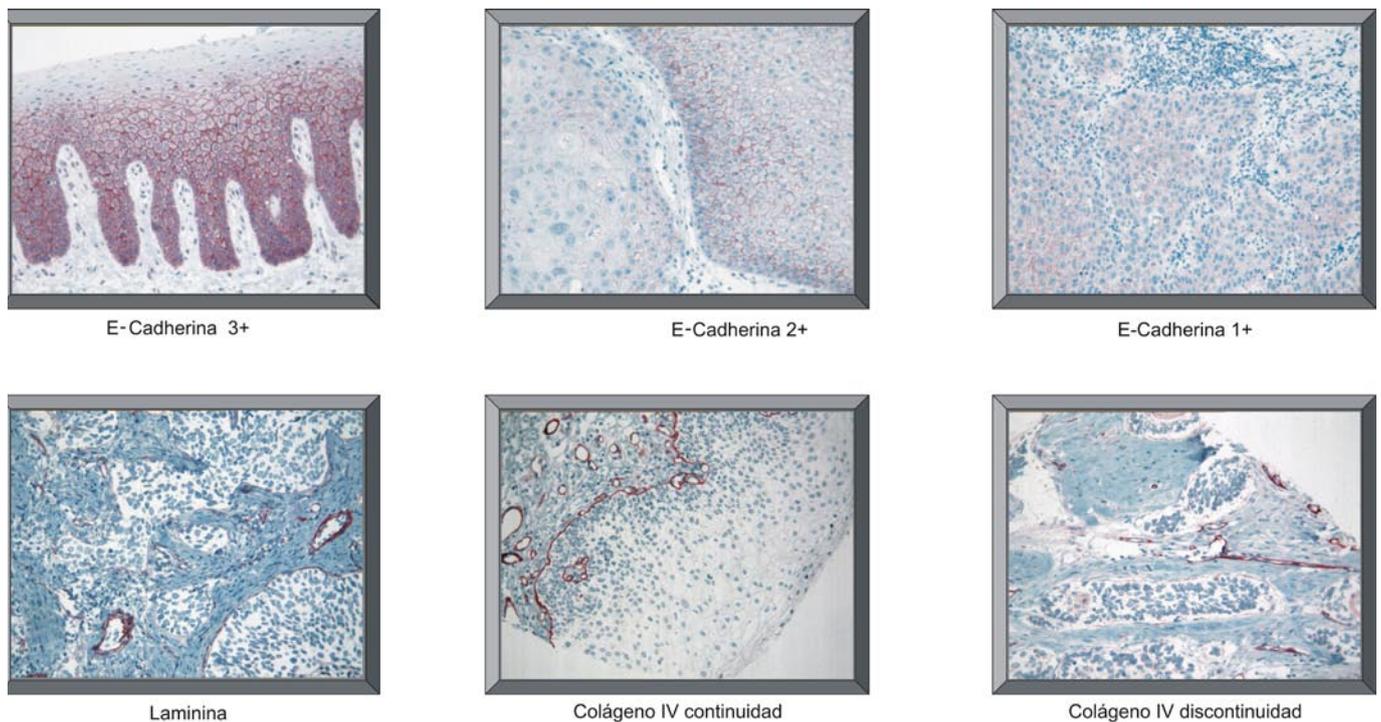


Fig. 2. Patrones de tinción de E-cadherina, laminina y colágeno IV en lesiones orales.

En epitelio normal se observó continuidad de la membrana basal (laminina y colágeno IV). Se empezó a observar discontinuidad o fragmentación ocasional en lesiones displásicas, carcinomas in situ y carcinomas microinvasores. En carcinomas epidermoides se observó escasa expresión de laminina y colágeno tipo IV rodeando los cordones o nidos de células epiteliales atípicas (Figura 2). La pérdida de expresión de laminina y colágeno IV fue total en el grupo de 9 metástasis ganglionares. Se encontraron diferencias significativas en la pérdida de continuidad de laminina y colágeno IV observadas entre el grupo de carcinomas epidermoides y las lesiones precancerosas y entre carcinomas epidermoides y el grupo de 9 ganglios metastásicos ($p < 0,001$). Las pérdidas de continuidad en la membrana basal estudiadas en los grupos de lesiones, mediante Laminina y colágeno IV, al aplicar el coeficiente de correlación de Pearson, están correlacionados significativamente ($p < 0,05$).

La mayoría de los carcinomas muestran grados variables de pérdida de expresión, sin embargo, esto a menudo es más frecuente en tumores pobremente diferenciados. Hay estudios (2,14,15) que sugieren que la pérdida o reducción de E-cadherina se incrementan en invasión y metástasis en carcinomas epidermoides orales. La expresión de E-cadherina no se correlaciona con el grado de diferenciación tumoral ni metástasis, solamente observan, al igual que nosotros, reducción de expresión, ya que en ganglio metastásico siempre hay pérdida de expresión; pero no es un marcador de metástasis. Williams et al (16) encuentran reducción de expresión de E-cadherina y/o cateninas en carcinomas in situ y tumores infiltrantes. Concluyen que la rotura del complejo E-cadherina-cateninas es un acontecimiento tardío asociado con invasión. En resumen el papel de E-cadherina es ligar las células epiteliales entre si y mantener la integridad del epitelio estratificado. Generalmente, los carcinomas más agresivos muestran pérdidas de cohesión celular epitelial,

y esto, a menudo se asocia con reducción de expresión de E-cadherina (4). En el presente estudio, la pérdida de expresión de E-cadherina es precoz, observándose en displasias moderadas, aumentando en carcinomas in situ y microinvasores; indicando en este grupo de lesiones, que la pérdida de cohesión epitelial puede ser un indicador de su posible evolución. En Los carcinomas de células escamosas y en las metástasis ganglionares los niveles de expresión de E-cadherina descienden considerablemente sin encontrar diferencias significativas entre el grupo de carcinomas de células escamosas y el grupo de metástasis ganglionares. Esta pérdida de expresión de ha ido incrementándose a medida que avanzamos en la progresión histopatológica de las lesiones estudiadas.

La laminina es cuantitativamente la más importante matriz proteica no colagénica de la membrana basal (7). Firth et al., muestran que la distribución de laminina y colágeno IV es continua en la hiperplasia epitelial mientras que en las lesiones displásicas muestran pequeñas roturas focales cuyo número aumenta en las displasias severas (17). Kannan et al., muestran un incremento gradual en la frecuencia de discontinuidad de laminina y colágeno IV desde epitelio normal hacia hiperplasias, displasias y carcinomas epidermoides, con diferencias significativas entre grupos (18). Harada et al., encuentran que el patrón de tinción de laminina y colágeno IV en los carcinomas epidermoides primarios orales es similar al de los ganglios metastásicos y observando que la población celular de las áreas profundas expresan el potencial invasivo y metastásico del carcinoma oral (19). En nuestro estudio hemos comenzado a encontrar discontinuidad en lesiones displásicas, que progresivamente aumenta, en carcinomas in situ y microinvasores; haciéndose más elevada la discontinuidad en los carcinomas epidermoides y siendo total en el grupo de ganglios metastásicos estudiados. Desde un punto de vista práctico la infiltración debe ser el campo de estudio de alteraciones de la membrana basal en los carcinomas epidermoides orales. Los resultados del presente estudio confirman que la pérdida de expresión de E-cadherina y la alteración en la distribución de laminina y colágeno IV en lesiones premalignas y malignas del epitelio oral van paralelas a la progresión del proceso de transformación neoplásica siendo más alta en las metástasis ganglionares.

La utilización de la técnica de Tissue-arrays ha mostrado ser un excelente medio tecnológico para el estudio de múltiples lesiones de la patología oral. Permite una visualización de múltiples lesiones patológicas junto con controles normales, un ahorro de tejidos y de reactivos marcadores permitiendo una mayor cantidad de estudios con un menor consumo de tejidos, teniendo en cuenta que una gran cantidad de las muestras estudiadas proceden de biopsias incisionales, donde la cantidad de tejido disponible para el estudio es menor que en las piezas procedentes de resecciones quirúrgicas, Siendo un medio prometedor para realizar estudios amplios de múltiples lesiones y de marcadores que nos permitan ir dilucidando las alteraciones en la biología molecular del cáncer oral.

BIBLIOGRAFIA

- Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, et al. Cancer statistics, 2004. *Ca Cancer J Clin* 2003;54:5-26.
- Takes RP, Baatenburg de Jong RJ, Alles MJ, Meeuwis CM, Marres HA, Knegt PP, et al. Markers for nodal metastasis in head and neck squamous cell cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;128:512-8.
- Chow V, Yuen AP, Lam KY, Tsao GS, Ho WK, Wei WI. A comparative study of the clinicopathological significance of E-cadherin and catenins (alpha, beta, gamma) expression in the surgical management of oral tongue carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127:59-63.
- Thomas GJ, Speight PM. Cell adhesion molecules and oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001;12:479-98.
- Shinohara M, Hiraki A, Ikebe T, Nakamura S, Kurahara S, Shirasuna K, et al. Immunohistochemical study of desmosomas in oral squamous cell carcinoma: correlation with cytokeratin and E-cadherin staining, and with tumour behaviour. *J Pathol* 1998;184:369-81.
- Tossios KI, Kapranos N, Papanicolaou SI. Loss of basement membrane components laminin and type IV collagen parallels the progresión of oral epithelial neoplasia. *Histopathology* 1998;33:261-8.
- Kosmehl H, Berndt A, Strassburger S, Borsi L, Rousselle P, Mandel U, et al. Distribution of laminin ad fibronectina isoforms in oral mucosae and oral squamous cell carcinoma. *British J Cancer* 1999;81:1071-9.
- WHO Collaborating centre for oral precancerous lesions. Definition of leukoplakia and related lesions: An aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978;46:517-39.
- Wenig BM. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: precursors and problematic variants. *Mod Pathol* 2002;15:229-54.
- Hoos A, Cordon-Cardo C. Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations. *Lab Invest* 2001;81:1331-8.
- Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A, Mastorides S, Dudas ME, Leung DHY, et al. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. *Am J Pathol* 2001;158:1245-51.
- Hoos A, Stojadinovic A, Singh B, Dudas ME, Leung DHY, Shaha AR, et al. Clinical significance of molecular expression profiles of Hürthle cell tumors of the thyroid gland analysed via tissue microarrays. *Am J Pathol* 2002;160:175-83.
- Horiguchi Y, Furukawa F, Fujita M, Imamura S. Ultrastructural localisation of E-cadherin cell adhesion molecule on the cytoplasmic membrane of keratinocytes in vivo and in vitro. *J Histochem Cytochem* 1994;42:1333-40.
- Schirper JH, Frixen UH, Behrens J, Unger A, Jahnke K, Birchmeier W. E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis. *Cancer Res* 1991;51:333-42.
- Jiang WG. E-cadherin and its associated protein catenins, cancer invasion and metastasis. *Br J Surg* 1996;83:437-46.
- Williams HK, Sanders DS, Jankowski JA, Landini G, Brown AM. Expression of cadherins and catenins in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1998;27:308-17.
- Firth NA, Reade PC. The prognosis of oral mucosal squamous cell carcinomas: a comparison of clinical and histopathological grading and of laminin and type IV collagen staining. *Austr Dent J* 1996;41:83-6.
- Kannan S, Balaran P, Chandran GJ, Pillai MR, Mathew B, Nalinakumari KR, et al. Alterations in expression of basement membrane proteins during tumour progression in oral mucosae. *Histopathol* 1994;24:531-7.
- Harada T, Shinohara M, Nakamura S, Oka M. An immunohistochemical study of the extracellular matrix in oral squamous cell carcinoma and its association with invasive and metastatic potential. *Virchows Arch* 1994;424:257-66.