



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**INMUNOMARCAJE DE p16 Y p53 EN ZONAS DE PROLIFERACIÓN
CELULAR EN DISPLASIAS Y DE INVASIÓN TUMORAL EN EL
CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS**

TESIS

QUE PRESENTA:

JUAN CARLOS CUEVAS GONZÁLEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

TUTORA: DRA. ELBA ROSA LEYVA HUERTA



CIUDAD UNIVERSITARIA, MEXICO, D.F. 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

1. Resumen	1
2. Abstract	2
3. Introducción	3
4. Marco teórico	5
4.1 Desarrollo del cáncer	5
4.2 Ciclo celular	8
4.3 Gen p16	12
4.4 Gen p53	13
4.5 Carcinogénesis y progresión tumoral	15
4.6 Crecimiento e invasión tumoral	16
4.7 Patrón clínico – histológico del COCE	20
4.8 Patrón clínico- histológico de las displasias	23
5. Planteamiento del problema	26
6. Justificación	26
7. Hipótesis de trabajo	27
8. Objetivo general	27
8.1 Objetivos específicos	27
9. Diseño del estudio	27
9.1 Tipo de estudio	27
9.2 Universo de estudio	28
9.3 Tamaño de la muestra	28
9.4 Criterios de inclusión	28

9.5 Criterios de exclusión	28
10. Variables	28
10.1 Variables dependientes	28
10.2 Variables independientes	28
11. Material y método	30
11.1 Inmunohistoquímica	32
11.2 Análisis subjetivo	33
11.3 Análisis objetivo	33
11.4 Análisis semicuantitativo	35
12. Resultados	37
12.1 Inmunoexpresión de p16	37
12.2 Inmunoexpresión de p53	40
12.3 Inmunoexpresión de ambos marcadores en displasias	43
12.4 Inmunoexpresión de ambos marcadores en COCES	44
13. Discusión	46
14. Conclusiones	51
15. Referencias bibliográficas	52

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificaciones utilizadas en displasias	24
Tabla 2. Variables tomadas en cuenta en el estudio.	29
Tabla 3. Criterios de malignidad de la OMS 2005 utilizados para determinar la severidad de las displasias.	30
Tabla 4. Clasificación de Broders para el Diagnostico de COCE.	31
Tabla 5. Frente de Invasión Tumoral (FIT).	31
Tabla 6. Clasificación de las displasias y los COCES, e inmunomarcaje en relación al diagnóstico histopatológico.	39
Tabla 7. Resultados del inmunomarcaje con p53 en las dos lesiones en estudio y su distribución de acuerdo al diagnóstico histopatológico	42
Tabla 8. Distribución del marcaje de p16 y p53 en displasias.	43
Tabla 9. Distribución del marcaje de p16 y p53 en el FIT.	44

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Expresión de p16 en dos de los estratos epiteliales en las displasias.	39
Gráfica 2. Expresión de p16 en los diferentes sitios que comprenden el FIT.	40
Gráfica 3. Expresión de p53 en células pleomórficas de displasias.	42
Gráfica 4. Expresión de p53 en los diferentes sitios que comprenden el FIT	43

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Interacción de la proteína Rb con el factor de transcripción E2F.	9
Figura 2. Actividad del complejo ciclina-CDK; en las diferentes fases del ciclo celular.	11
Figura 3. Interacción del gen CDKN2A con el gen p16 y p53.	12
Figura 4. Interacción de p16 con cinasas dependientes de ciclinas 4 (Cdk4).	13
Figura 5. Participación del gen p53 en punto de control del ciclo celular.	14
Figura 6. Proteínas de matriz extracelular y su interacción con receptores de superficie.	17
Figura 7. Fenómeno de metástasis mediante una cascada de acontecimientos con interacción de células tumorales y el organismo.	19
Figura 8. Efecto de la angiogénesis sobre la invasividad tumoral.	19
Figura 9. Pérdida de moléculas de adhesión entre células tumorales facilitando su movilidad.	20
Figura 10. Imágenes obtenidas del análisis con el software ImageLab®.	34
Figura 11. Marcaje de p16 en displasias.	38
Figura 12. Marcaje de p16 en COCES.	38
Figura 13. Marcaje de p53 en displasias.	41
Figura 14. Marcaje de p53 en COCES.	41
Figura 15. Presencia de eosinófilos en el infiltrado inflamatorio y células neoplásicas.	45

1. RESUMEN

Introducción.

La carcinogénesis y la progresión tumoral son el resultado del acumulo de alteraciones genéticas. El estudio de inmunomarcadores tumorales así como la localización, tamaño y profundidad tumoral son los principales factores que determinan el riesgo del crecimiento e invasión tumoral, ayudando a inferir el comportamiento de lesiones potencialmente cancerizables y dar seguimiento a aquellas con mayor probabilidad de transformación maligna.

Objetivo.

Determinar la expresión de p16 y p53 en sitios de proliferación celular del epitelio displásico y en las zonas de proliferación e invasión tumoral en el Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE) correlacionándolo con el grado de diferenciación celular.

Metodología

208 casos de displasias y COCES de cuatro centros de referencia examinados histopatológicamente bajo los criterios de malignidad de la OMS, Clasificación de Broders y Frente de Invasión Tumoral. Para el análisis inmunohistoquímico utilizamos los ACs p53 (Biocare) y p16 (BSD). Las imágenes fueron analizadas con el sistema ImageLab® MCM versión 2.2.4. Se utilizó X² para el análisis estadístico.

Resultados

El inmunomarcaje en 96 displasias fue + a p16 en 28 casos (29%) y en 112 carcinomas en 50 (44%). p53 en displasias fue + en 32 casos (33%) y en carcinomas en 45 (40%). La reacción de ambos ACs en displasias fue significativa. En COCE, ambos marcadores se expresaron en sitios de mayor actividad y proliferación tumoral (p.0001).

Conclusiones

Existe asociación de ambos anticuerpos y el patrón de crecimiento tumoral, expresándose en células neoplásicas cercanas o que infiltraban vasos sanguíneos, lo que sugiere la participación de p16 en un intento de frenar el ciclo celular y un incremento en la cantidad de células positivas a p53 sugestivo de aumento en la proliferación celular.

2. ABSTRACT

Carcinogenesis and tumor progression are the result of accumulation of genetic alterations. The study of Immunomarkers, as well as assessment of location, size and depth of tumor are the main factors which determine risk of tumor growth and invasion. The aforementioned factors are coadjuvant to the assessment of the behavior of potentially premalignant lesions as well as to the follow up of lesions most likely to experience transformation into malignancy.

Objective:

To determine p16 and p53 expression in dysplastic epithelium cell proliferation and invasion sites in Squamos Cell Carcinoma of Oral Cavity (SCCOC) and to correlate with the degree of cell differentiation.

Methodology

208 dysplastic and SCCOC cases from four reference centers were considered for histopathological diagnosis under world health organization (WHO) criteria. Broders classification and front of invasion tumor malignancy were also used. Immunohistochemical analysis was performed with Antibody ACs (Biocare) p53 and p16 (BSD). Histological diagnoses images were analyzed with the ImageLab ® MCM version 2.2.4 system. X^2 was used for statistical analysis.

Results

Immunoexpression in 96 dysplasia cases was positive to *p16* in 28 cases (29%). In 112 carcinomas cases the ratio was 50 cases (44%); p53 was positive in 32 dysplasia cases (33%) as well as in 45 carcinoma cases (40%). Reaction of both ACs in dysplasia was statistically significant. In OSCC both markers were expressed on sites of increased activity and tumor proliferation (p.0001).

Conclusions

An association has been found between both antibodies and tumor growth pattern. These antibodies express themselves in neoplastic cells close to the vessels or infiltrating into them. This suggests p16 participation in an attempt to slow down invasive cells. Another fact to be considered is the observed increase of p53 positive cells, which in turn suggest an increase in proliferation.

3. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad genética que incluye un grupo de alteraciones que se caracterizan por presentar un crecimiento celular desordenado determinado por una mutación inicial y que continúa con mutaciones sucesivas, representa un serio problema de salud por la severidad de las secuelas de su tratamiento, la alta incapacidad en las personas que lo padecen y la disminución en la calidad de vida que en muchos casos es causa de muerte y los altos costos que implican para los servicios de salud y para el propio paciente.

En México se cuenta con algunos reportes al respecto, durante el periodo 1985-1994. El cáncer bucal se encontraba dentro de las diez principales neoplasias no genitales, ocupando el cuarto lugar en las mujeres y tercero en los hombres en morbilidad, cifras que se han venido incrementando significativamente con el paso de los años. Sin embargo es importante mencionar que el cáncer oral implica una amplia gama de neoplasias malignas que debemos tener la capacidad de diferenciar ya que internacionalmente se agrupan en carcinomas, sarcomas y linfomas.

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) comprende el 90% de las neoplasias malignas orales, no tiene una causa única sino que es resultado de la interacción de diferentes factores que pueden aumentar la probabilidad de que una persona desarrolle esta enfermedad.

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

En tumores de cabeza y cuello, la composición celular y la intensidad de la reacción estromal no han presentado valor pronóstico. En los últimos años se han multiplicado los esfuerzos por relacionar diversos tumores sólidos en gran número de células individuales con la construcción de un histograma representando la distribución de la población celular. Existen importantes trabajos a nivel molecular que determinan el comportamiento de un tumor. La identificación de variables cuantificables que directa o indirectamente condicionan la biología tumoral puede ayudar al clínico a determinar el estado de riesgo de un paciente y así seleccionar las opciones de tratamiento.

La localización, tamaño y profundidad tumoral son los principales factores que determinan el riesgo del crecimiento e invasión tumoral. No obstante, la tendencia actual es la de continuar considerando parámetros, como las características histopatológicas, que condicionan de forma decisiva el comportamiento y por tanto el pronóstico tumoral.

4. MARCO TEORICO

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es un proceso multiseccional que implica una serie de alteraciones discretas en su inicio, e irreversibles y complementarias en los genes que controlan el crecimiento, la muerte y la diferenciación celular.¹

Clínicamente se desarrolla en diferentes localizaciones anatómicas de la boca como son: labio, lengua, piso, encía, paladar, mucosa bucal y vestibular.² Sitios que deben ser considerados durante el análisis clínico por la importancia que reviste este tipo de cáncer dependiendo su localización, ya que se ha demostrado gran variabilidad en el pronóstico según el sitio donde se encuentra ubicado, repercutiendo en la supervivencia.³

Aproximadamente en la mitad de los casos el COCE va precedido por lesiones o condiciones precancerizables, por lo que un diagnóstico precoz de las mismas influirá notablemente en la tasa de supervivencia, reduciendo la morbilidad y mortalidad.¹

El principal factor de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad es el tabaco y como factor agregado el alcohol, siendo así los adultos mayores la población de alto riesgo debido a una prolongada exposición a estos;³ sin embargo en jóvenes en los que existe una disminución o ausencia de exposición a estos factores también se desarrolla este tipo de cáncer y aún con un peor pronóstico, planteando así cuestionamientos sobre la etiología de esta enfermedad. Considerándose que el factor determinante para que esta neoplasia se desarrolle en jóvenes depende del polimorfismo G870 A.⁴

4.1 Desarrollo del cáncer

La célula está programada genéticamente para llevar a cabo funciones metabólicas, diferenciación y especialización, respondiendo a estímulos fisiológicos o patológicos, que pueden llevarla a una serie de adaptaciones celulares en las cuales alcanzan un estado nuevo alterado, pero preserva su viabilidad y modula su función en respuesta a estos estímulos. La célula tiene blancos específicos para recibir el daño,

independientemente si la causa de este es de naturaleza química, física o biológica. El deterioro puede ser reversible cuando el estímulo cesa y la célula regresa a la normalidad, si no es posible revertir el daño celular y subcelular se torna irreversible con la eminente muerte de la célula.⁵ Existen factores como la señalización intercelular y los receptores de superficie celular, que intervienen para inducir y verificar que el ciclo celular se lleve a cabo correctamente pero estos factores necesitan mediadores solubles entre los cuales los más importantes son los factores de crecimiento polipeptídico que circulan en el suero o se sintetizan localmente en las células y estimulan la proliferación celular, influyendo en la expresión de genes implicados en las vías normales del control de crecimiento celular, denominados protooncogenes, dentro de los cuales tenemos cuatro grandes grupos:⁵

- ✓ Asociados con la embriogénesis, crecimiento y desarrollo
- ✓ Asociados con poblaciones celulares adultas y que tienen un continuo e intermitente recambio
- ✓ Asociados con la respuesta proliferativa al daño como en la reparación y la respuesta inflamatoria
- ✓ Los producidos por algunas poblaciones celulares tumorales conocidos como factores de crecimiento transformadores.⁵

Los factores de crecimiento estimulan la proliferación de células normales y se cree que muchos de ellos intervienen en la carcinogénesis. La proliferación celular sigue los siguientes pasos:

- Unión de factor de crecimiento a su receptor específico existente en la membrana celular.
- Activación del receptor del factor de crecimiento que a su vez activa a varias proteínas transductoras de señales existentes en la capa interna de la membrana plasmática.

- Transmisión por el citosol de la señal transducida hasta que llega al núcleo. Inducción y activación de los factores reguladores de núcleos que inician la transcripción del ADN.
- Paso de la célula al ciclo celular, por el que progresa hasta que se produce su división.¹

Todas las rutas estimuladoras e inhibitoras del crecimiento y proliferación celular convergen en un complejo aparato molecular presente en el núcleo conocido frecuentemente como el reloj del ciclo celular. Dicho reloj se desregula prácticamente en todos los tipos de cáncer del ser humano.¹

La génesis y el desarrollo tumoral son el resultado de numerosas alteraciones moleculares que se producen en el ADN a través de variaciones en la secuencia de nucleótidos de las proteínas que regulan el crecimiento, la diferenciación y la proliferación celular.¹ Un gen es un fragmento de ADN que codifica para una proteína específica, hormona o enzima, siendo este la unidad de información que suele codificar para una proteína. El resultado de la alteración de la secuencia génica del protooncogén por mutación, amplificación o reordenamiento cromosómico se reconoce con el nombre de oncogén.¹

Los oncogenes codifican proteínas llamadas oncoproteínas, similares a los productos normales de los protooncogenes, salvo que las oncoproteínas carecen de algunos elementos reguladores importantes y su producción no depende de factores de crecimiento ni de otras señales externas.¹ La acción de diversos oncogenes, se encuentra implicada en fenómenos de proliferación, diferenciación y supervivencia celular, así como en la capacidad de diseminación y metástasis de las células neoplásicas.¹

Existen factores intrínsecos del hospedero que inhiben o estimulan el desarrollo de una neoplasia siendo estos específicos para cada una de ellas como son:

- ✓ Genes estimuladores del ciclo celular
- ✓ Genes estimuladores de la proliferación celular

- ✓ Genes inhibidores de la proliferación celular
- ✓ Anti oncogenes o genes supresores de tumores ⁵

4.2 Ciclo celular

La serie de sucesos por los que una célula da lugar a dos células hijas se denomina ciclo celular y comprende el periodo entre dos divisiones mitóticas. Consta de cuatro fases: G_1 , S, G_2 y M. Hay células que pueden parar su progresión hacia la división celular y permanecer en un estado de reposo, periodo de quiescencia o fase G_0 . ⁵

La fase G_1 es el periodo de tiempo que sigue a una división celular, previa a la síntesis o replicación del ADN, que se produce en la fase S. Durante la fase G_1 , la célula dobla su tamaño y su masa debido a la síntesis continua de todos sus componentes como resultado de la transcripción y traducción de los genes que codifican las proteínas responsables de su fenotipo particular.⁵ En esta fase existe un punto de control llamado sitio de restricción (R) en el que la célula comprueba que ha generado la composición necesaria para seguir adelante e iniciar la síntesis de ADN, y que las condiciones ambientales sean favorables; es el punto de control y decisión más importante.

Durante la fase S se produce la duplicación del ADN y antes de entrar en la mitosis, existe otro intervalo conocido como fase G_2 en el que la célula se prepara para iniciar la mitosis. En la fase M se produce el reparto equitativo del ADN a las células hijas. ⁵

La maquinaria básica del ciclo celular está constituida por enzimas denominadas cinasas o proteína-cinasas (PK), capaces de fosforilar otras proteínas mediante la transferencia de grupos fosfato. El resultado de la fosforilación de una proteína es generalmente un cambio en su actividad. En la proliferación celular, la fosforilación tiene un papel esencial como método para modular, activar o desactivar la función de las proteínas. Las cinasas que coordinan los procesos de control del ciclo celular se denominan cinasas dependientes de ciclinas o CDKs porque su actividad de fosforilar proteínas está regulada por la asociación reversible de otras proteínas llamadas ciclinas.⁵

Las concentraciones de las ciclinas son críticas en la división celular. Durante las distintas fases del ciclo celular se forman y destruyen diferentes complejos activos de ciclinas y CDKs. El control se ejerce a distintos niveles, sobre la transcripción de los genes de las ciclinas, su degradación y sobre la modificación de las CDKs por fosforilación e inhibición de su actividad. ⁵

Cuando la célula pasa de la fase G_0 a la fase G_1 , inicia la síntesis de ciclinas necesarias para continuar hacia la fase S. Las ciclinas que regulan el punto de restricción en la fase G_1 son de dos tipos, D y E. Las ciclinas de tipo D, se dividen en D1, D2 y D3, se unen a las CDK2, CDK4, CDK5 y CDK6 formando complejos binarios, pero principalmente lo hacen a CDK4 y CDK6 durante un periodo muy concreto, el final de la fase G_1 y el inicio de la fase S. ⁶ Las ciclinas E forman complejos con las CDK2, implicados en el inicio de la fase S, es decir, en la replicación del ADN. Una de las funciones básicas del complejo ciclina D-CDK4 es fosforilar la proteína del retinoblastoma (Rb) (producto del gen supresor de tumores *Rb*) y activar así la expresión de genes necesarios para la entrada en la fase S. ⁶ Sin embargo, tras su fosforilación en fase G, pRb es inactivada y ya no es capaz de unir y bloquear a estos factores activadores, promoviendo la entrada de la célula en la fase S. Los complejos ciclina E-CDK2 también son capaces de fosforilar la proteína Rb; cuando esta se encuentra hipofosforilada se une e inhibe a varias proteínas, entre ellas algunos factores activadores de la transcripción como E2F, que controlan la expresión de genes críticos para la síntesis de ADN. De esta forma, Rb bloquea la progresión de las células, manteniéndolas en fase G_1 ⁶ como se muestra en la figura 1.

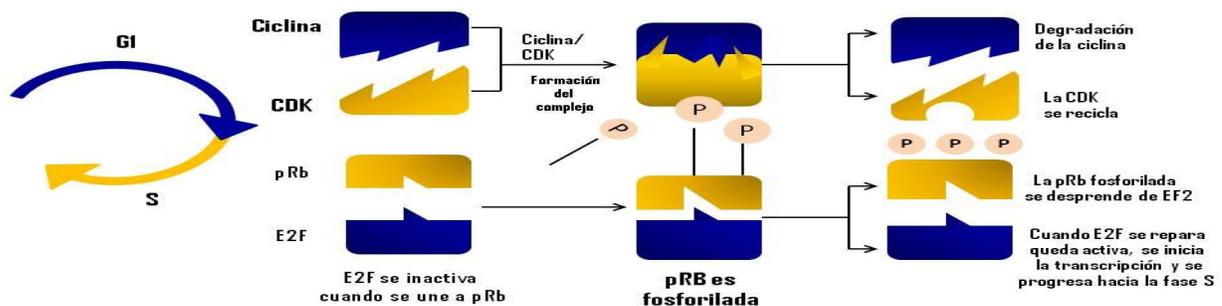


Figura 1. En el núcleo durante G₁, la pRb interactúa con el factor de transcripción E2F y lo inactiva. A medida que la célula se desplaza de G₁ a S, se forma un complejo CDK/ciclina que añade grupos fosfatos a pRb. Cuando pRb queda hiperfosforilado E2F se separa y pasa a ser transcripcionalmente activo, permitiendo que la célula pase a través de la fase S. La fosforilación de pRb es transitoria; a medida que la ciclina se degrada, disminuye la fosforilación.

Los niveles de pRb no se alteran significativamente durante el ciclo de división celular, pero sí su grado de fosforilación, que modula su actividad. ¹ Como se mencionó anteriormente pRb está poco fosforilada durante las fases G_0 y G_1 , mientras que al final de la fase G_1 o el inicio de la S es fosforilada en múltiples aminoácidos por las CDK.¹ Al final de la mitosis la pRb vuelve a su estado hipofosforilado por acción de las fosfatasas. Su nivel de fosforilación modula su interacción con los E2F (1, 2 y 3), factores de transcripción necesarios para la progresión de la fase S, que se unen a secuencias TTTCGCGC (secuencia que se encuentra en la región promotora de algunos genes de proliferación celular).¹ Cuando el nivel de fosforilación de la proteína Rb es bajo (fases G_0/G_1), Rb inhibe la acción activadora de E2F formando complejos Rb-E2F y de esta forma, bloquea la progresión de las células, manteniéndolas en la fase G_1 ; sin embargo, cuando el nivel de fosforilación de Rb es alto (fases S/M), E2F se libera y activa la transcripción de genes que son cruciales para la proliferación celular, como los que codifican las enzimas timidina cinasa, timidilato sintetasa, dihidrofolato reductasa, y la DNA polimerasa α , que intervienen en la síntesis del ADN, así como *c-myc*, *B-myb*, *cdc2/CDK1*, y los genes de las ciclinas A y D1 y el propio gen *E2F-1*.⁵

Existen mecanismos de regulación de los complejos ciclina-CDK; el primero compuesto por las proteínas p21, p27 y p57, el segundo compuesto por las proteínas p16, p15, p18 y p19, las cuales forman complejos con las CDK4 y CDK6 inhibiendo su unión a las ciclinas D, pero no inhiben el resto de las CDKs. Los CDKIs inhiben la fosforilación de Rb y el resultado final es que las células se frenan en el punto de restricción. Estas dos clases de CDKIs difieren en estructura, mecanismo de inhibición y especificidad y funcionan como supresoras de tumores por su efecto bloqueante en el ciclo celular.⁷ Un aspecto importante a considerar es que la delección del gen que codifica p16, la sobreexpresión de la ciclina D y la delección de *Rb* tienen el mismo efecto sobre la progresión del ciclo celular, existen estudios que demuestran que proteína p16, las cinasas CDK4 y CDK6, la ciclina D1 y la pRb están implicadas en la misma vía de tumorigénesis. Cerca del 100% de los tumores primarios de pulmón, esófago, cabeza y

cuello, tienen una alteración genética en al menos uno de los componentes de esta vía.⁷ En la figura 2 se muestra la actividad de las ciclinas y las cinasas en las diferentes fases del ciclo celular así como la interacción entre ambas proteínas y los sitios específicos de acción de los genes p16 y p53.

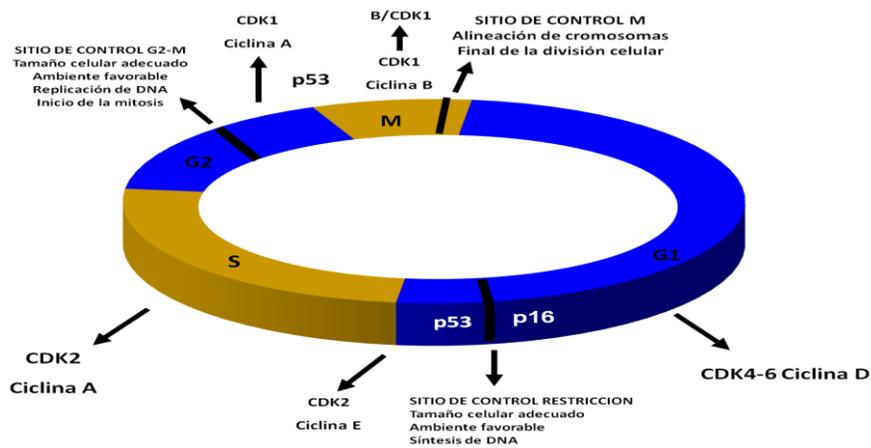


Figura 2. Muestra la actividad del complejo ciclina-CDK; en las diferentes fases del ciclo celular así como la interacción entre ambas proteínas y los sitios de control de acción de los genes p16 y p53.

Tomado de Patología General e Inmunología de LH, GC.

El CDKN2A es un gen que codifica dos proteínas con actividad supresora tumoral la p16 y la p14^{ARF}. Este gen está compuesto por 4 exones: 1 α , 1 β , 2 y 3. La p16 es un producto de los exones 1 α , 2 y 3 mientras que la p14^{ARF} es un producto de los exones 1 β , 2 y 3. La p16 es un inhibidor del CDK4, que de otra manera se une a la ciclina D y fosforiliza pRB, a su vez, la pRB fosforilizada libera los factores de transcripción E2F que promueven la transición G1 a S y la proliferación celular. La proteína p14^{ARF} es un inhibidor de MDM2, que de otra manera acelera la destrucción de p53. La pérdida de p53 altera el control del ciclo celular y la capacidad de las células para sufrir la apoptosis. La pérdida de CDKN2A por tanto contribuye a la génesis tumoral alterando la vía del pRB y del p53, Como se muestra en la figura 3 el gen CDKN2A codifica dos proteínas con actividad supresora tumoral, la p16 y la p14^{ARF}.

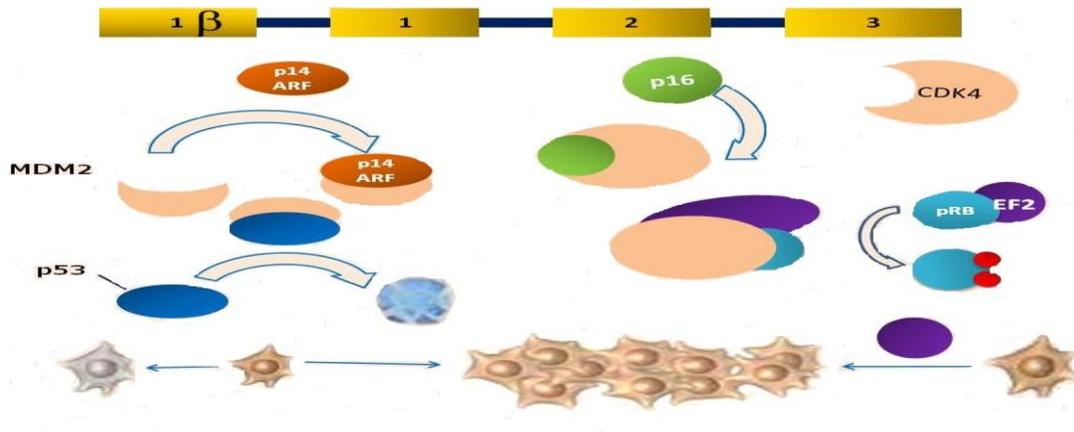


Figura 3. El gen CDKN2A está compuesto por 4 exones: 1 α , 1 β , 2 y 3. La proteína p16 es un producto de los exones 1 α , 2 y 3 mientras que la proteína p14^{ARF} es un producto de los exones 1 β , 2 y 3. La proteína p16 es un inhibidor del CDK4, que de otra manera se une a la ciclina D y fosforiliza la proteína del retinoblastoma (pRB), a su vez, la pRB fosforilada libera los factores de transcripción E2F que promueven la transición G1 a S y la proliferación celular. La proteína p14^{ARF} es un inhibidor de MDM2, que de otra manera acelera la destrucción de p53. La pérdida de p53 altera el control del ciclo celular y la capacidad de las células para sufrir la apoptosis. La pérdida de CDKN2A por tanto contribuye a la génesis tumoral por medio de alterar la vía del pRB y del p53.

4.3 Gen p 16

La proteína p16 fue identificada inicialmente, como un inhibidor de cinasas dependiente de ciclinas, formando un complejo binario independiente con las CDKs (p16-CDK), concretamente se une a CDK4 y CDK6 e inhibe la formación de los complejos ciclina D-CDK4/6, como consecuencia, evita la fosforilación de la proteína Rb y la progresión del ciclo celular. El gen *p16* se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 9, concretamente en 9p21, es un gen regulador del ciclo celular en la fase G1. Se denomina también MTS-1 ("major tumor suppressor"), *INK4a* (inhibidor de cinasas 4a dependientes de ciclinas), *CDKN2A* (inhibidor 2A de cinasas dependientes de ciclina) o *CDK4I*.⁷ En la figura 4 se observa la función reguladora del gen p16 cuyo producto final es la inhibición de la proliferación.

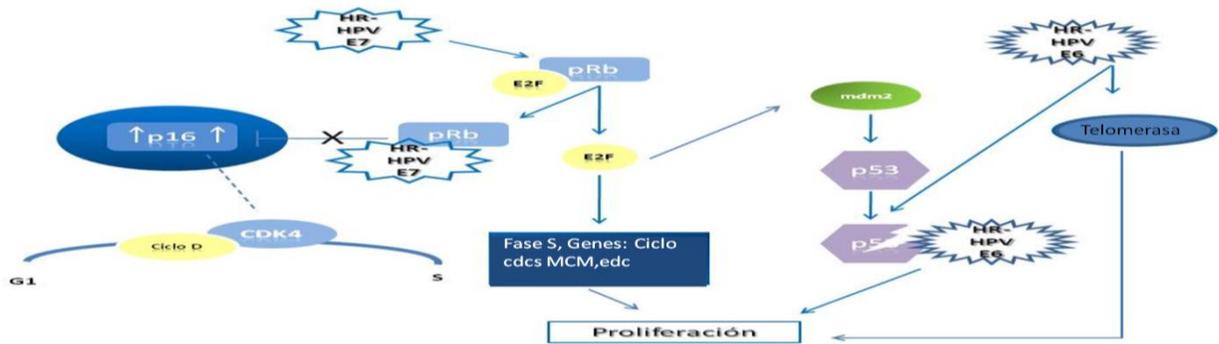


Figura 4. Interacción de p16 con cinasas dependientes de ciclinas 4 (Cdk4) en donde el resultado es la liberación del freno que impedía la progresión del ciclo celular.

La pérdida de p16 es funcionalmente equivalente a la inactivación de Rb ya que en estos casos Rb permanece hiperfosforilado. En los casos del cáncer humano existe relación inversa entre estas dos moléculas de manera que el 89% de los carcinomas pulmonares de células pequeñas expresan p16, pero pierden la expresión de Rb o la expresan de una forma aberrante, mientras que los que han perdido p16 retienen la proteína Rb normal. De manera inversa en otros carcinomas de pulmón que son de los más estudiados Rb es generalmente normal, p16 se encuentra ausente o inactivado excepto en una minoría de lesiones en donde Rb se encuentra deletado o mutado.⁷

4.4 Gen p53

Es una proteína reguladora de la transcripción, inhibe la proliferación celular, tiene actividad anti-transformante e induce muerte celular ante un daño en el ADN que no puede ser reparado.⁸ El gen *p53* (TP53) está localizado en el locus 17p13 en el genoma humano, está compuesto por 11 exones y se expresa en todas las células, aunque la vida media de la proteína es corta, consta de 393 aminoácidos y como su nombre indica tiene un peso de 53 kDa. Cuenta con varios dominios, principalmente un dominio de transactivación, un dominio de unión a ADN, un dominio de translocación nuclear y un dominio de oligomerización. Sin embargo, el gen codifica hasta nueve isoformas de la proteína que son expresadas de forma tejido-específica⁹. Es un supresor tumoral del

cáncer, se trata de la diana más frecuente de las alteraciones genéticas, algo más del 50% de todos los tumores humanos contienen mutaciones de este gen.⁷ El hecho de que las mutaciones de p53 sean frecuentes en distintos tumores humanos indica que esta proteína actúa como guardián del genoma a nivel nuclear¹⁰ se ubica dentro del ciclo celular en los sitios de restricción al final de la fase G1 inhibiendo el crecimiento celular y tratando de corregir el ADN dañado, nuevamente al inicio de la fase G2 vuelve a participar en un punto de control celular en donde p53 verifica que el ADN celular haya sido corregido y en caso contrario induce apoptosis.¹¹ En la figura 5 se muestra el nivel de activación de p53

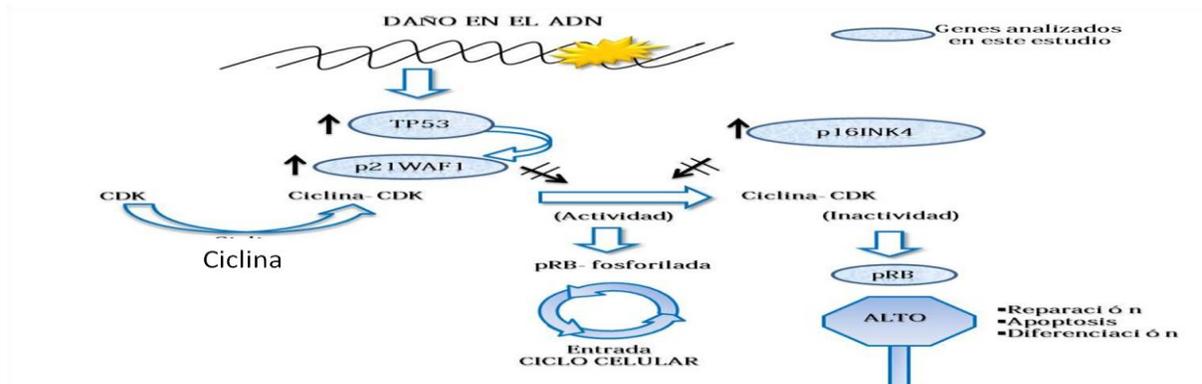


Figura 5. P53 Se ubica dentro del ciclo celular en los sitios de restricción al final de la fase G1 inhibiendo el crecimiento celular y tratando de corregir el ADN dañado, nuevamente al inicio de la fase G2 vuelve a participar en un punto de control celular en donde p53 verifica que el ADN celular haya sido corregido y en caso contrario induce apoptosis.

Se ha demostrado que una ruptura de la doble cadena de ADN aumenta rápidamente la concentración de p53 en las células demostrándose así su función de control y supresión celular. Cuando p53 está activado impide que la célula pase de la fase G1 a la fase de síntesis lo cual frena que las células alteradas acumulen más mutaciones. Sin embargo si p53 sufre una mutación con pérdida de la función y la proteína no puede actuar como factor de transcripción, una célula dañada sería capaz de dividirse, aumentando así la probabilidad de acumular más alteraciones y evolucionar a un carcinoma.¹² Las

mutaciones somáticas de p53 se encuentran en el 50 al 60% de todos los cánceres del ser humano encontrándose también estas mutaciones en células germinales, otro tipo de mutación de p 53 es por cambio de sentido en la disposición de los genes. Este tipo de mutación es más común en carcinomas, mientras que las deleciones, inserciones y rearrreglos son más frecuentes en sarcomas. ⁷ Un ejemplo es el que ocurre en las células germinales en el síndrome de Li-Fraumeni. Cuando p53 se inactiva, las células además de ganar una ventaja proliferativa, estarán expuestas a alteraciones genéticas adicionales. La mutación de p53 está relacionada con resistencia a fármacos. ⁷

En consecuencia el desarrollo tumoral es el resultado de múltiples alteraciones moleculares que se producen en el ADN en donde se encuentran implicados los genes reguladores del ciclo y la proliferación celular que a través de variaciones en sus secuencias de nucleótidos adquieren capacidad para generar tumores. ¹

4.5 Carcinogénesis y progresión tumoral

En resumen la carcinogénesis y la progresión tumoral son el resultado del acumulo de múltiples alteraciones genéticas: activación de oncogenes, deleción de regiones cromosómicas e inactivación de genes supresores tumorales. ⁵ La sobreexpresión y las alteraciones en las proteínas codificadas por estos genes, producen alteraciones en el control del ciclo celular, como es el caso de p53 es una proteína involucrada en la regulación del ciclo celular. Actúa a nivel del paso de G1 a S y cuando se activa induce apoptosis en respuesta a la alteración del DNA. La p53 media su efecto en parte a través de la p21 y por ello se estudian normalmente de forma conjunta. p21 tiene efecto p53 dependiente y p53 independiente, y este último inhibe a su vez a las ciclinas y CDKs, deteniendo el ciclo celular al inhibir la replicación del ADN. ⁷Las CDKs son facilitadoras de la progresión del ciclo celular y también actúan en el paso de G1 a S, por lo que sus inhibidores pueden bloquear la progresión del ciclo. La proteína p16 es un inhibidor de CDKs y compite por la unión de la ciclina D con CDK4 y CDK6, que a su vez tiene efecto

sobre la función de pRb. Cuando se une a las CDKs, la p16 inhibe la fosforilación de pRb inactivándolo, deteniéndose así el ciclo celular como se muestra en la figura 4. ⁷

4.6 Crecimiento e invasión tumoral

La invasión y las metástasis representan un aspecto clave en la progresión de los tumores malignos. Se trata de un proceso complejo en el que están involucrados aspectos tan diversos como alteraciones de la motilidad y adhesión celular, así como alteraciones en la degradación proteolítica de la membrana basal y matriz extracelular.¹³ En los carcinomas se han descrito una inestabilidad de la expresión de diversos parámetros moleculares asociados con esos procesos, lo que resulta indicativo de la heterogeneidad biológica que muestra este tipo de tumores. Así, se ha descrito una expresión reducida de la E-cadherina (molécula de adhesión intercelular calcio-dependiente), que está asociada con un crecimiento tumoral infiltrativo, desarrollo de metástasis y una menor supervivencia de los pacientes. Por el contrario, la sobreexpresión de la subunidad $\alpha 3$ de las integrinas (moléculas de adhesión célula-matriz extracelular) de CD44 (molécula de adhesión glicosilada que está involucrada en la adhesión intercelular y entre la célula y matriz extracelular), se han relacionado con un peor pronóstico¹⁴.

Asimismo, la alteración de determinados elementos de la matriz extracelular se ha demostrado que tienen relevancia pronóstica; en este sentido, recientemente se ha descrito que las concentraciones intratumorales elevadas de ácido hialurónico están asociadas con un peor pronóstico en el cáncer gástrico.¹⁶ Esto puede ser debido a que los elevados niveles tisulares del ácido hialurónico pueden ocasionar separación de las barreras de colágeno, facilitando así la migración de las células tumorales y la invasión tisular. Además, las células tumorales recubiertas de ácido hialurónico pueden protegerse del ataque de linfocitos citotóxicos. Actualmente se sabe que las células

tumorales utilizan enzimas proteolíticas para introducirse en el tejido circundante y provocar metástasis.¹⁴

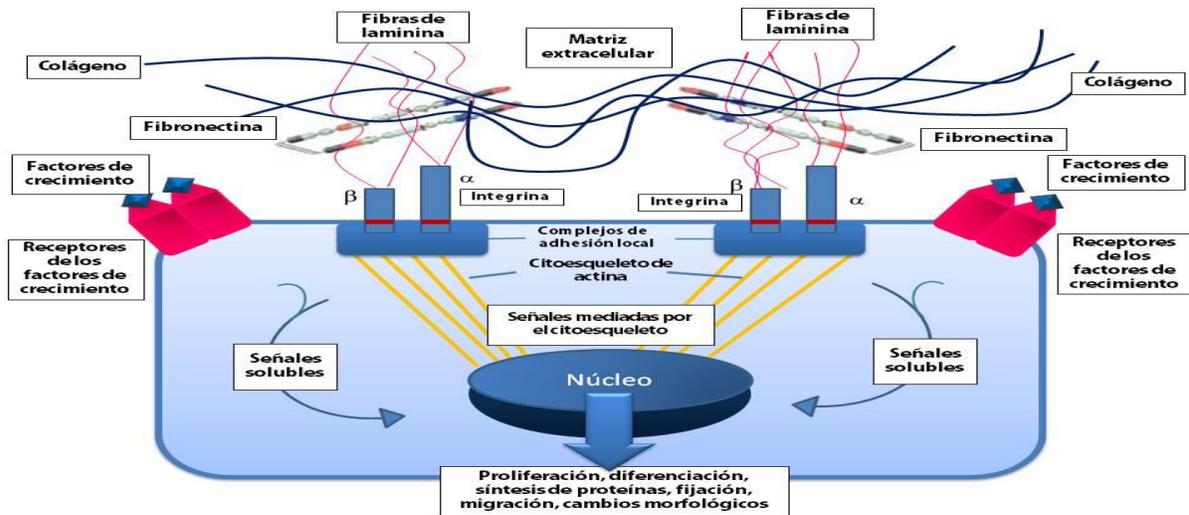


Figura 6. Las proteínas de la matriz celular no forman parte de la estructura de la ECM, sino que reaccionan con las proteínas de la matriz, con los receptores de la superficie celular o con otras moléculas (factores de crecimiento, citocinas o proteasas) que, a su vez, interactúan con la superficie celular. Todas ellas permiten las interacciones célula-matriz.

Se ha establecido un modelo de progresión en el COCE que contempla su evolución desde lesiones potencialmente cancerizables a carcinomas invasivos, este modelo establece la pérdida de heterocigocidad de determinados genes supresores. Se estima que en el desarrollo del fenotipo invasivo del COCE están implicadas entre 6 a 10 alteraciones genéticas de forma cronológica y acumulativa.¹⁵ El fenómeno de las metástasis es una cascada de acontecimientos con interacción entre las células tumorales y el organismo. El tumor primario forma un clon celular que adquiere rápidamente un grado variable de heterogeneidad al acumular mutaciones de forma progresiva. En resumen los pasos fundamentales de este proceso complejo son:

- 1) Invasión, donde los tumores malignos presentan cambios en la adhesión normal de las células debido a una pérdida de las moléculas de adhesión entre las mismas células tumorales facilitando su movilidad. Dentro de estas moléculas están integradas las Inmunoglobulinas CAM, DCC, CEA y MUC18 así como las E

cadherina, también hay alteraciones en la adhesión entre células de distinto tipo como la ICAM 1 establecida entre las células tumorales y el endotelio vascular, por último existen moléculas que participan en la adhesión entre la célula y diversas sustancias del sustrato o MEC como integrinas/FAC, CD44 y laminina

- 2) Proteólisis, las células tumorales deben degradar la MEC en las zonas cercanas al tumor, para proseguir la invasión, este proceso surge del desequilibrio entre las enzimas proteasas métralo o serinproteasas y sus inhibidores. Las metaloproteasas mas importantes son las colagenasas MMP 1, 8, 13, 18, las estromelinas MMP 3, 10, 7 y gelatinasas MMP 2 y 9. Las serinproteasas principales son la plasmina y los activadores del plasminogeno.
- 3) Movilidad, está regulada por señales parácrinas y autócrinas dirigidas a las proteínas CDC42, Rac1 y Rho, Tiam 1 además también participan HGF, las autotaxinas, IGF1 e Interleucina 8 es importante señalar que las células tumorales tienen capacidad para moverse activamente
- 4) Angiogenesis. Una vez que proliferan las células neoplásicas, inicia la formación de nuevos vasos sanguíneos producidos a partir del crecimiento y ramificación de vasos sanguíneos preexistentes.
- 5) El crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis son estrictamente dependientes de la formación de vasos sanguíneos tanto para su nutrición como para diseminarse.
- 6) El crecimiento e invasión tumoral, siendo un riesgo para las metástasis. El efecto de la angiogénesis sobre la invasividad tumoral se debe a la reducción en la tasa de apoptosis celular y al predominio de células proliferantes. Las células endoteliales proliferan por los estímulos de factores como FGF1, 2, 3, 4; VEGF A,B, y C, angiogenina y PD-ECGF y se ven inhibidas por PF4,TIMP, trombospondina y angiostatina.
- 7) Diseminación y colonización, consiste en la capacidad de las células tumorales de penetrar en los vasos sanguíneos, mantenerse en la sangre y poder abandonar el torrente circulatorio justamente en el órgano diana de la metástasis.

La variabilidad de estas células, en el torrente circulatorio es mayor de lo que se pensaba, aunque solo una mínima parte forman colonias metastásicas en determinados órganos. Esta capacidad órgano-específica de ciertos tumores se explica por el microambiente del órgano diana, unido a las características anatómo-mecánicas de sus vasos capilares. ¹⁵ Todo el proceso de invasión y metástasis se presenta en las figuras 7 y 8.

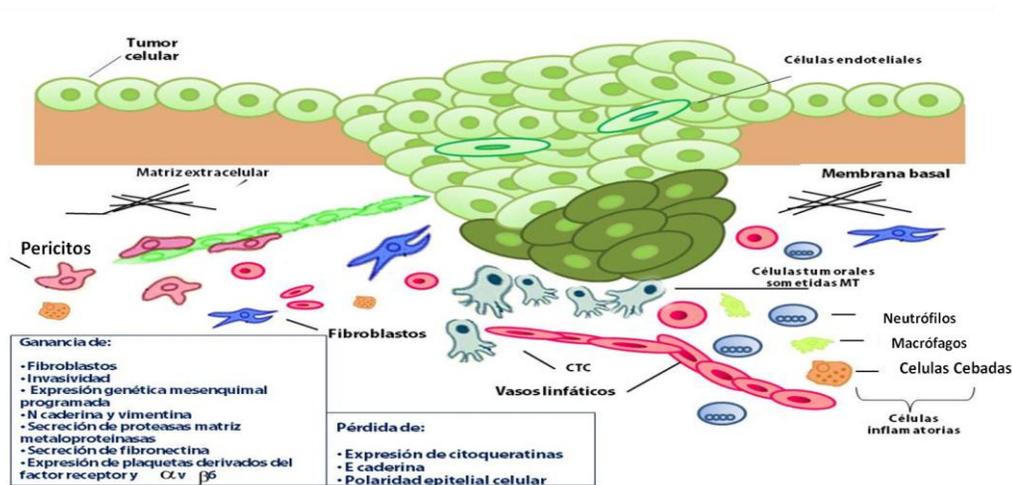


Figura 7. Cascada de acontecimientos con la interacción entre las células tumorales y el hospedero durante la invasión tumoral y la metástasis.

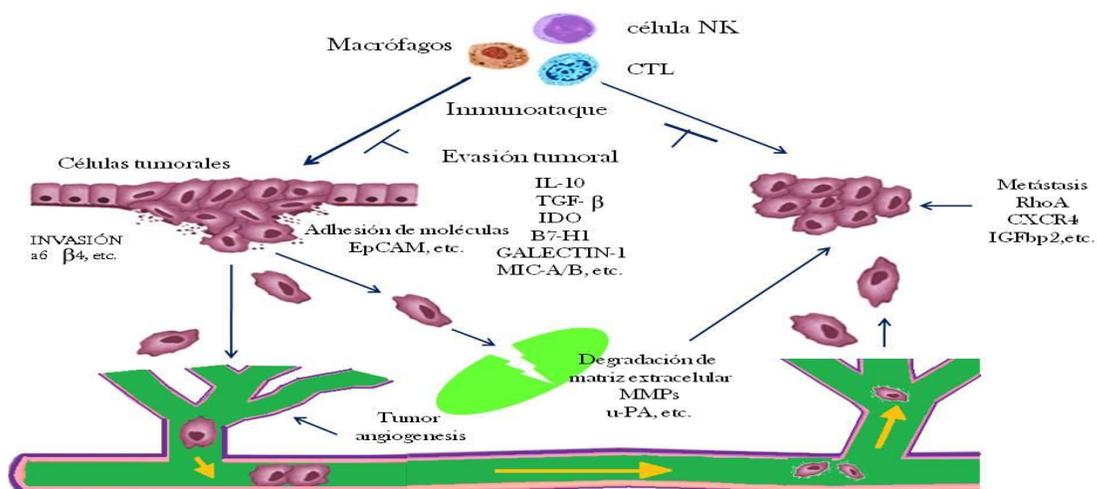


Figura 8. El efecto de la angiogénesis sobre la invasividad tumoral se debe a la reducción en la tasa de apoptosis celular y al predominio de células proliferantes. Las células endoteliales proliferan por los estímulos de factores como FGF1, 2, 3, 4; VEGF A,B, y C, angiogenina y PD-ECGF y se ven inhibidas por PF4, TIMP, trombospondina y angiostatina.

Así en conclusión, el crecimiento de las neoplasias más allá de 1 a 2 mm requiere del riego sanguíneo, el cual aporta oxígeno, nutrientes y los factores de crecimiento requeridos por las células tumorales para la expansión del tumor. Es importante mencionar que la angiogénesis es un proceso complejo en el que se encuentran implicados distintos tipos celulares; como son las células neoplásicas, las células endoteliales, pericitos y macrófagos así como factores u hormonas parácrinas, receptores, cinasas, moléculas de señalización y MEC; El aumento en la vascularidad y angiogénesis durante la actividad proliferativa permite el crecimiento y la invasión tumoral¹⁶ En la figura 9 se esquematiza los factores involucrados en el desarrollo y la progresión tumoral.

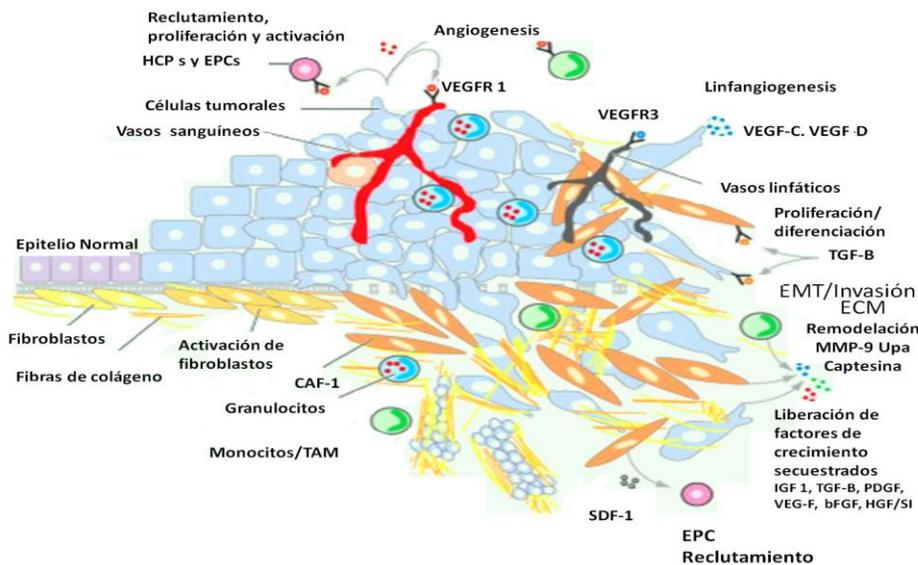


Figura 9. Pérdida de moléculas de adhesión entre las células tumorales facilitando su movilidad.

4.7 Patrón clínico histológico del COCE

Aproximadamente un 3% de los tumores malignos se origina en la cavidad oral. La mayoría corresponden a COCE y un pequeño porcentaje a tumores malignos de glándulas salivales, enfermedades linforreticulares, tumores óseos, melanomas, sarcomas, tumores malignos odontogénicos y tumores metastásicos.¹⁷ El COCE, representa el 90% de las lesiones malignas, definiéndose como una neoplasia maligna de

origen epitelial que se inicia a partir de células escamosas procedentes de los epitelios estratificados de la mucosa oral. Esta lesión puede desarrollarse en diversas zonas de la cavidad oral, presentando una alta frecuencia en la región labial, siendo el labio inferior el más comúnmente afectado. Presenta una considerable variación histológica, aunque están compuestos por láminas o nidos de células con origen en el epitelio escamoso. En 1920 Broders clasificó los carcinomas en: bien diferenciados, moderadamente diferenciados e indiferenciados basándose en los diferentes grados de diferenciación celular. Cantin L y cols.¹⁸ mencionan que Bryne en 1998 argumenta que las características histopatológicas de un tumor pueden diferir ampliamente de un área a otra por lo que considera que la información de mayor utilidad durante el diagnóstico histopatológico se encuentra en el Frente de Invasión Tumoral (FIT), que es donde residen presumiblemente las células tumorales más agresivas. La OMS clasificó los tumores histopatológicamente por medio de numerosos parámetros, como el número de mitosis, grado de queratinización e infiltrado inflamatorio sin embargo Spiro y cols en 1999 introdujeron a la gradación cuatro criterios de invasión en relación al patrón de crecimiento en los bordes del tumor.¹⁸

La proliferación celular en condiciones normales es considerada un proceso biológico fundamental debido al papel que juega en el crecimiento y mantenimiento de la homeostasis de un tejido en particular.¹⁹ En el caso del COCE la proliferación ha recibido tradicionalmente mucha atención por parte de los investigadores ya que histopatológicamente es un predictor tumoral, permitiendo valorar la recurrencia local, potencial de metástasis y el crecimiento metastásico y por ende poder estimar la sobrevida del paciente. Jacobsson y cols, Bryne y cols. Reportaron los criterios histopatológicos de malignidad en el COCE sin embargo solo evalúan las capas celulares de la interfase del tumor. Así mismo se ha tratado de evaluar la significancia pronóstica del frente de invasión tumoral en el COCE.¹⁷ Como ya se mencionó en apartados anteriores, el fenómeno de invasión tumoral precisa de una compleja secuencia de procesos incluyendo entre ellos la ruptura de los componentes tisulares estructurales

que actúan a modo de barrera. La lámina basal del epitelio y de los vasos sanguíneos es uno de los componentes que impiden la progresión tumoral. En las células tumorales se han identificado cierto número de enzimas proteolíticas, responsables de la destrucción de estos componentes.²⁰ Levine y cols mencionan la importancia de la lámina basal en la invasión tumoral, de tal forma que aquellos tumores que invaden a modo de finos cordones o células aisladas, por lo general no están delimitados por lamina basal; por lo que la distribución de la lamina podría considerarse como marcador de diferenciación, y su presencia indicaría falta de invasión tumoral activa. Se han utilizado diferentes métodos para analizar la proliferación celular sin alcanzar el éxito esperado sin embargo los métodos más utilizados en la práctica diaria es el análisis histopatológico y los marcadores tumorales de proliferación.²⁰ Las técnicas de inmunohistoquímica basadas en el uso de anticuerpos anti-p16 han sido empleadas como método pronóstico en varios escenarios incluyendo el aparato gastrointestinal, donde permiten inferir en el comportamiento biológico del tumor²¹. Así el pronóstico del COCE depende de una serie de variables histopatológicas que requieren de una adecuada sistematización y que han de ser correctamente analizadas para el estudio del comportamiento de este carcinoma. Considerándose que el patrón mediante el cual el COCE invade el tejido circundante es uno de los principales parámetros histopatológicos predictores de su comportamiento biológico. Sánchez L y cols.²⁰ mencionan un estudio realizado por Close y cols. en 65 tumores de cavidad oral y orofaringe, donde determinaron que la invasión microvascular es el criterio de mayor impacto en la supervivencia, siendo esta inferior al 51% en el primer año, existiendo una correlación del 77% entre recurrencia local y metástasis cervicales.

De todos los parámetros histopatológicos que han sido utilizados y reportados el que presenta un valor pronóstico más escaso es el grado de diferenciación celular de acuerdo a la clasificación de Broders; existe discordancia entre los patólogos al momento de evaluar el patrón citoarquitectónico y morfológico de las neoplasias debido a la subjetividad de los parámetros que se utilizan, lo que ha provocado la pérdida de consenso en relación con su comportamiento biológico y por ende en su

valor pronóstico.²² Actualmente se considera más efectivo el sistema propuesto por Bryne o sistema de graduación FIT.

Desde el punto de vista clínico la evaluación pronóstica y terapéutica del COCE se ha basado principalmente en la clasificación TNM, empleada para determinar la extensión anatómica de las neoplasias basadas en apreciaciones clínicas, una de las evaluaciones más importantes en esta clasificación es la valoración de ganglios metastásicos siendo el número de ganglios positivos uno de los factores pronósticos más determinantes.²³ A nivel Hospitalario el índice de Karnofsky es empleado para la valoración de pacientes oncológicos tratados con quimioterapia y ha sido ampliamente utilizado en estudios clínicos mostrando buenos resultados en la valoración global de la funcionalidad así como predictor de la evolución de dichos pacientes.²⁴ Además de gradificar clínicamente al tumor se consideran aspectos de importancia como el perfil demográfico atendiendo variables como la edad, sexo del paciente y sitio anatómico de la lesión, factores de riesgo como el tabaco y el alcohol, afectan principalmente a adultos mayores debido a una prolongada exposición en cuanto a dosis y tiempo. Sin embargo este esquema se ha roto debido a que el COCE se ha venido presentando cada vez más en ambos sexos y en pacientes jóvenes en los cuales existe disminución o incluso ausencia de exposición a estos factores, planteándose entonces cuestionamientos sobre la etiología de la enfermedad.³

4.8 Patrón clínico histológico de las displasias

En 1960 el término displasia se definió como aquellos cambios de falta de diferenciación del epitelio escamoso de menor grado que el carcinoma in situ. En 1975 la Organización mundial de la salud definió la displasia como una lesión en la cual parte del epitelio escamoso está reemplazado por células que muestran varios grados de atipias.²⁶

Echebarría Aguirre y cols ²⁵ mencionan que la displasia epitelial de la mucosa oral constituye en la actualidad una alteración morfológica que conlleva una serie de modificaciones de la normalidad histológica y que se correlaciona con la capacidad de

malignización del epitelio. El término displasia según la OMS desde el año 2005 significa literalmente crecimiento desordenado, debido a trastornos en el crecimiento normal, proliferación, maduración y organización de las células. Cerca de un 25% de las lesiones leucoplásicas, muestran evidencias de displasia epitelial o carcinoma in situ en el primer reconocimiento histopatológico Moret de González y cols realizaron una revisión en relación a los criterios utilizados para describir las displasias epiteliales iniciando a partir de 1977 con el Dr. Pindborg quién utilizo el término displasia para describir lesiones en las cuales parte del espesor del epitelio está reemplazado por células que demuestran diferentes grados de atipia celular.²⁶ El concepto morfo fisiológico de las displasias orales es en cierta forma diferente a los otros tipos de displasia, un ejemplo son las lesiones encontradas en cérvix

Tabla 1: Distintas clasificaciones utilizadas en displasias

Criterios de la OMS 2005	Datos de Richart	Nomenclatura de Bethesda
Displasia Leve	Neoplasia intraepitelial cervical 1	Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado
Displasia Moderada	Neoplasia intraepitelial cervical 2	Lesión escamosa intraepitelial de alto grado
Displasia Severa	Neoplasia intraepitelial cervical 3	

En patología bucal las displasias se clasifican bajo los criterios de malignidad de la OMS (2005) los cuales son: a) Bordes epiteliales en forma de gota, b) Hiperplasia de la capa basal,

c) Estratificación celular epitelial irregular d) Alto número de mitosis y presencia de mitosis anormales, e) Queratinización individual “perlas epiteliales” en la capa espinosa, f) Pleomorfismo celular, g) Hiper cromatismo nuclear, h) Alteración de la relación núcleo citoplasma, i) Nucléolos aumentados de volumen, j) Pérdida de la polaridad de las células basales y k) Pérdida o reducción de la adherencia de las células epiteliales.²⁶

Banoczy y Csiba en 1972, realizaron un estudio sobre displasias epiteliales de la mucosa bucal destacando que para llegar al diagnóstico de esta alteración es necesario que existan dos o más cambios de los señalados anteriormente. Tomando como base este criterio la displasia epitelial fue clasificada como: leve cuando solo hay dos cambios, moderada de dos a cuatro y severa más de cinco. Estos criterios fueron aprobados formalmente en el año 1978 por la OMS).²⁶

Warnakulasuriya en 2001,²⁷ después de revisar diferentes autores realiza una clasificación basándose en localización, cantidad e intensidad de las alteraciones del epitelio de la mucosa bucal y en base a esto plantea: **Displasia epitelial leve;** cuando las alteraciones se producen en el tercio basal del epitelio y solo existen dos criterios histológicos de displasia. **Displasia epitelial moderada:** Cuando los cambios displásicos afectan a los dos tercios inferiores del epitelio y estén presentes entre dos y cuatro criterios histológicos y **Displasia epitelial severa;** cuando los cambios afectan más de dos tercios del espesor del epitelio sin llegar a involucrarlo por completo y que están presentes más de cinco criterios histológicos de displasia.

Cuando el epitelio está afectado en su totalidad ya no se considera una displasia severa sino un Carcinoma in situ, término que hace referencia a la presencia de un carcinoma intraepitelial que no ha roto la membrana basal, no ha penetrado al corion subyacente y no posee capacidad invasiva.²⁵

Sin embargo, debido a la variabilidad de los rasgos celulares presentes y a los conceptos establecidos para identificar los diferentes grados de severidad de la displasia epitelial, donde el diagnóstico es esencialmente subjetivo, en la década de los 80^s se empezaron a buscar predictores específicos en estudios histoquímicos, morfométricos, y ultraestructurales y más recientemente en el campo de la biología molecular, con el objetivo de proveer indicadores pronósticos de mayor certeza.

Considerando que el diagnóstico y el grado de displasia epitelial es un proceso subjetivo ya que no existen en la actualidad parámetros cuantificables, por lo que no siempre es sinónimo de malignización y está sujeto a la valoración personal de cada observador,

existiendo frecuentemente discrepancias entre los patólogos sobre los grados de displasia epitelial,²² por lo que es fundamental considerar la utilización de marcadores biológicos que midan proliferación celular y capacidad de transformación maligna y de esta manera lograr unificar criterios para establecer un mejor pronóstico. La importancia de determinar la existencia de displasia epitelial bucal en algunas lesiones como leucoplasia, eritroplasia, y queilitis actínica entre otras, no sólo radica en que se trata de un indicador fundamental para determinar potencial de malignización sino también para establecer la conducta a seguir.¹⁶ Así mismo existen estudios clínicos epidemiológicos que sugieren que la displasia epitelial puede poseer hasta 5 veces el riesgo de sufrir transformación maligna, o inclusive se ha manejado que del 10 al 20% de las lesiones displásicas progresan a carcinomas aunque esto no es determinante, sin embargo los estudios sobre mucosa normal, displasias y carcinomas pueden ser empleados como modelos de progresión tumoral.¹⁶

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Son p16 y p53 marcadores que pueden ser identificados en el epitelio proliferativo de las displasias y en el frente de invasión tumoral de los COCES.

6. JUSTIFICACIÓN

Existe controversia con respecto al papel que desempeñan p16 y p53 en el comportamiento biológico de lesiones premalignas y malignas de origen epitelial, sin embargo es escasa la evidencia de la participación de estas proteínas en el desarrollo de un tumor y su asociación con el frente de invasión tumoral (FIT). Por lo cual es necesario identificar el patrón de crecimiento del COCE y en caso de displasias determinar si la positividad de los anticuerpos se relaciona con el patrón pleomórfico, identificando aquellos casos en los que se pudiera inferir una mayor agresividad y orientar al clínico para que opte por la mejor terapéutica. La tendencia al incremento del cáncer bucal a nivel mundial, aunado a un diagnóstico tardío refleja un alto costo económico para los

servicios de salud, la saturación de centros de referencia, los tratamientos mutilantes y el deterioro en la calidad de vida.

7. HIPÓTESIS DE TRABAJO

p16 y p53 se expresan simultáneamente en los sitios de proliferación celular de las displasias y en el frente de invasión tumoral (FIT) del carcinoma de células escamosas

8. OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión de p16 y p53 en sitios de proliferación de displasias y en sitios de proliferación celular e invasión tumoral en el COCE

8.1 Objetivos específicos

- Determinar las características demográficas de los casos
- Analizar histológicamente el epitelio proliferativo de las displasias.
- Evaluar histológicamente el patrón de invasión y crecimiento tumoral de los COCES
- Determinar histológicamente el tipo de displasia y el grado de diferenciación celular de los carcinomas.
- Identificar la inmunoreacción del gen p16 y p53 en las displasias y en los carcinomas.
- Asociar la inmunoreacción de los anticuerpos con el epitelio proliferativo de las displasias y el patrón de crecimiento de los COCES

9. DISEÑO DEL ESTUDIO

9.1 Tipo de estudio Se trata de un estudio descriptivo en donde la selección de la muestra fue por conveniencia en una población cerrada tanto en hombres como en mujeres de todas las edades.

9.2 Universo de estudio. Los casos seleccionados fueron los diagnosticados histopatológicamente como Displasias y COCES de cuatro centros de referencia: Laboratorio de Patología Clínica y Experimental de la DEPEI de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Estomatología del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Hospital General Calixto García de la Habana Cuba y Unidad Anatomoclínica Madero de la Ciudad de Durango, Dgo. México en el periodo comprendido de 1989 al 2009.

9.3 Tamaño de la muestra. Se utilizó la muestra total disponible obteniéndose 265 casos de los archivos de los departamentos de patología participantes.

9.4 Criterios de Inclusión.

- Casos diagnosticados histopatológicamente como displasia epitelial y COCE
- Bloques de tejidos con muestra suficiente para ser procesada para HyE e Inmunohistoquímica.

9.5 Criterios de exclusión

- Laminas cuyos bloques de tejidos que no se encuentren correctamente fijados y/o procesados.
- Casos cuyo diagnostico no se haya corroborado o la localización clínica no pertenezca a cavidad bucal.

10. VARIABLES

10.1 Dependientes.

- Anticuerpo monoclonal p16
- Anticuerpo monoclonal p53

10.2 Independientes.

- Carcinoma Oral de Células Escamosas.
- Displasia Epitelial
- Frente de Invasión Tumoral.

Tabla 2. Variables tomadas en cuenta en el estudio.

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicadores
Carcinoma Oral de Células Escamosas	El cáncer es una enfermedad genética que incluye un grupo de alteraciones que se caracterizan por presentar un crecimiento celular desordenado determinado por una mutación inicial y que continúa con mutaciones sucesivas	Se tomaron en cuenta los criterios de Malignidad de la OMS(2005), Clasificación de Broders y Frente de Invasión Tumoral	<ul style="list-style-type: none"> • Son lesiones moderadas o bien diferenciadas. • Son evidentes con frecuencia las perlas de queratina así como la queratinización individual. • Es frecuente también la invasión a estructuras subyacentes en forma de nidos de células hiper cromáticas.
Displasia	Es la presencia microscópica de una combinación de fenómenos indicativos de un desorden de la maduración epitelial y de una alteración en la proliferación epitelial.	Se tomaron en cuenta los criterios de malignidad de la OMS 2005 Criterios arquitecturales y citológicos	<ul style="list-style-type: none"> • Estratificación irregular • Pérdida de la polaridad de las células basales • Crestas epiteliales en forma en gota • Aumento del número de mitosis • Mitosis anormales superficiales • Queratinización individual • Perlas de queratina • Variaciones en forma y tamaño del núcleo • variación en forma y tamaño celular • aumento en la proporción núcleo citoplasma • Aumento en el número de nucléolos • Hiper cromatismo
p16	Es un biomarcador inhibidor de las cinasas dependiente de ciclinas que muestran sobreexpresión en lesiones displásicas y malignas.	p16 es un anticuerpo monoclonal citoplasmático	Se cuantificaron los campos en los que se observe positividad del anticuerpo así como el lugar donde se presentó
p53	p53 es un biomarcador que representa la inducción del cese del ciclo celular en el punto G1-S para permitir la reparación del ADN o la apoptosis. La inactivación del p53 lleva a la pérdida de control del G1 y de la apoptosis lo que produce un crecimiento descontrolado	p53 es un anticuerpo monoclonal intranuclear	Se cuantificaron los campos en los que se observe positividad a la inmunohistoquímica
FIT	Es un Índice de valoración pronóstica en el COCE	Son 4 indicadores: Pleomorfismo, queratinización, patrón de invasión, profundidad de invasión e infiltrado inflamatorio	Se utiliza una escalas con 5 posibles valores, nulo, leve, moderado y severo

11. MATERIAL Y METODO

La selección de la muestra fue la total disponible, se revisaron las solicitudes y los diagnósticos histopatológicos en los archivos de cuatro centros de referencia del año 1989 al 2010, basados en el diagnóstico emitido por el patólogo adscrito sumando un total de 265 casos entre displasias y carcinomas. Se localizaron los bloques de los casos en estudio, se prepararon nuevamente en inclusión en parafina realizándose cortes histológicos a 5 μ con un total de 3 laminillas por bloque. (Una laminilla para HyE, una para P16 y una para P53.)

Efectuados los cortes la primera tinción realizada fue la de HyE cuyo objetivo era corroborar el diagnóstico de acuerdo a los criterios diagnósticos seleccionados en este estudio. Las clasificaciones utilizadas para establecer el diagnóstico y realizar el análisis fueron: Los criterios de Malignidad de la OMS, Clasificación de Broders y el Frente de Invasión Tumoral (FIT) los cuales fueron determinados por el tutor y el alumno.

A continuación se presentan los criterios utilizados internacionalmente y que fueron la base de este trabajo.

Tabla3: Criterios de malignidad de la OMS 2005 (Utilizados para determinar la severidad de las displasias)

Datos arquitecturales	Datos Citológicos
1. Estratificación irregular	1. Variación anormal en el tamaño nuclear
2. Pérdida de la polaridad de las células basales	2. Variación anormal en la forma nuclear
3. Crestas epiteliales anómalas	3. Variación anormal en el tamaño celular
4. Aumento en el número de mitosis	4. Variación anormal en la forma celular
5. Mitosis superficiales	5. Aumento en la proporción núcleo citoplasma
6. Queratinización prematura de células aisladas	6. Aumento del tamaño nuclear
Perlas de queratina dentro de las crestas	7. Mitosis atípicas
	8. Aumento del número/tamaño de nucléolos
	9. Hiperchromasia nuclear

Tomando en cuenta los criterios de la OMS, las displasias se clasifican en leves, moderadas y severas. Algunos autores entre ellos el Dr. Aguirre Urizar²⁵ para determinar la severidad de las displasias es necesario considerar un número

determinado de criterios, de tal manera que la displasia leve debe presentar 2 criterios arquitecturales y 3 citológicos, la moderada 4 criterios arquitecturales y 6 citológicos y la displasia severa 6 arquitecturales y 8 citológicos. Estos criterios fueron contemplados durante el análisis histológico de los casos en estudio.

Para el análisis histológico de los COCES utilizamos la clasificación de Broders y el FIT, ambos criterios los mostramos en las tablas 3 y 4.

Tabla 4. Clasificación de Broders para el Diagnostico de COCE

Grado I	25% de las células malignas están indiferenciadas
Grado II	50% de las células malignas están indiferenciadas
Grado III	75% o más de las células malignas están indiferenciadas

Tabla 5. Frente de Invasión Tumoral (FIT)

Número de mitosis	Nulo =0	Leve de 0-1	Moderado de 2-5	Severo Mas de 5
Patrón de invasión		Cercana al vaso	Rodea vasos y nervios	Infiltra vasos y nervios
Profundidad tumoral de Invasión		Lamina propia	Musculo y glándula	Invade hueso
Grado de queratinización		Mas del 75%	Hasta un 50%	Menos del 25%
Pleomorfismo Nuclear		Menos del 25%	Del 50 al 75%	Mas del 75%
Infiltrado inflamatorio		Intenso	Moderado	Leve

Previo al análisis histopatológico para determinar el tipo de displasia y el grado de diferenciación celular de los carcinomas se realizo una prueba de concordancia inter e intra observador entre el tutor y el alumno. La estandarización se efectuó en un microscopio de enseñanza de dos cabezas donde ambos determinamos la morfología celular y el patrón de crecimiento tumoral; se realizaron tres observaciones de manera independiente en tres ocasiones obteniendo un valor de Kappa interobservador de 0.91 e intra observador de 0.93 y 0.92 respectivamente de acuerdo a los criterios de Landis y

Koch. Se llevo a cabo el entrenamiento para realizar la técnica de inmunohistoquímica bajo la supervisión de un instructor experto en las técnicas.

11.1 Inmunohistoquímica.

Anticuerpos

- p53 DE 1 ML, CONCENTRADO. MCA BIOCARE. (Concentración 1/100)
- p16 DE 10 ML, PREDILUIDO MCA BSD.

Se desparafinaron en Xilol las laminillas, se hidrataron en alcoholes a diferentes concentraciones y se lavaron con agua destilada desionizada.

Se colocaron en Buffer de citrato con pH=6 a una modalidad de 0.1 y se llevaron al horno de microondas, de alto poder durante 5 a 10 minutos para recuperación antigénica.

Se lavaron con PBS por 5 minutos y se procedió al bloqueo de peroxidasa endógena con peróxido de hidrogeno al 3% incubándolos de 3 a 5 minutos a temperatura ambiente. Nuevamente se lavaron con PBS y se colocaron en PBS limpio en un vaso de coplin con PBS.

Se bloquearon sitios inespecíficos o cargados con suero normal durante 10 a 20 minutos, el cual se preparó usando 10 ml de PBS x 3 gotas de suero normal de caballo, se agitó y se usó.

Se incubaron los tejidos con el anticuerpo primario durante 40 minutos (en cámara húmeda), en una concentración de 1/100, se decantó y colocó el anticuerpo primario así como el control negativo.

Se preparó el anticuerpo secundario en 10 ml de PBS, 3 gotas del suero bloqueador y una gota de ácido biotilado, para preparar el ABC se colocó 5 ml de PBS y agregaron dos gotas de reactivo A y dos del reactivo B, mezclándolas fuertemente.

A los 40 minutos de incubación con el anticuerpo primario, se lavaron las laminillas con PBS y se montaron en Coverplates con PBS se colocaron en Racks y se les agregaron 2 o 3 gotas del Ac secundario dejándose incubar por 20 a 30 minutos a temperatura ambiente.

Se enjuagaron con PBS dejándose 5 minutos. Se colocaron 2 o 3 gotas de ABC y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Se lavaron nuevamente con PBS y se preparo el cromógeno.

Se agregaron 2 gotas del cromógeno a cada coverplate incubándose por 5 minutos.

Se reviso la reacción al microscopio y se aplico más cromógeno en los casos en que fue necesario.

Se lavaron y colocaron en un vaso de coplin con agua

Se procedió a realizar la contratincion, se filtraron con hematoxilina y se vació en el vaso de coplin con las laminillas, se bañaron y dejaron en agua caliente. Por último se deshidrataron las laminillas en alcohol y se montaron.

Se utilizaron controles positivos y negativos; para p53 de usó como control positivo Ca de Tiroides y para p16 displasia de cérvix en ambos casos el control negativo fue tejido normal.

11.2 Análisis subjetivo

Se realizo a doble ciego por el alumno y el tutor. Para la obtención de los resultados se tomó en cuenta que p53 es una proteína nuclear por lo que se describieron los hallazgos en consideración a la positividad del núcleo en donde de acuerdo al cromógeno (Diaminobencidina) se expresa de color café oscuro. P16 es una proteína intracitoplasmática que puede llegar a expresarse nuclearmente de color marrón

La evaluación cualitativa se realiza determinando si la expresión es: nula=0, leve=+, moderada=++ y severa= +++ tanto en intensidad como en cantidad de células reactivas; los resultados se vaciaron en hojas de recolección de datos.

11.3 Análisis objetivo

Se utilizó el sistema de proceso y análisis de proyección de imagen ImageLab® MCM versión 2.2.4 ajustado a la escala micrométrica μm . en un microscopio óptico Olympus xb40, la cuantificación del inmunomarcaje fue realizada de manera digital semicuantitativa y por análisis de imagen por computadora.

De cada muestra se tomaron fotomicrografías con 640X480 pixeles obtenidos de campos consecutivos con el objetivo de 40X de 200X200 µm con cámaras digitales Olympus C3040. A manera de ejemplo se presenta una de las imágenes obtenidas durante el análisis.

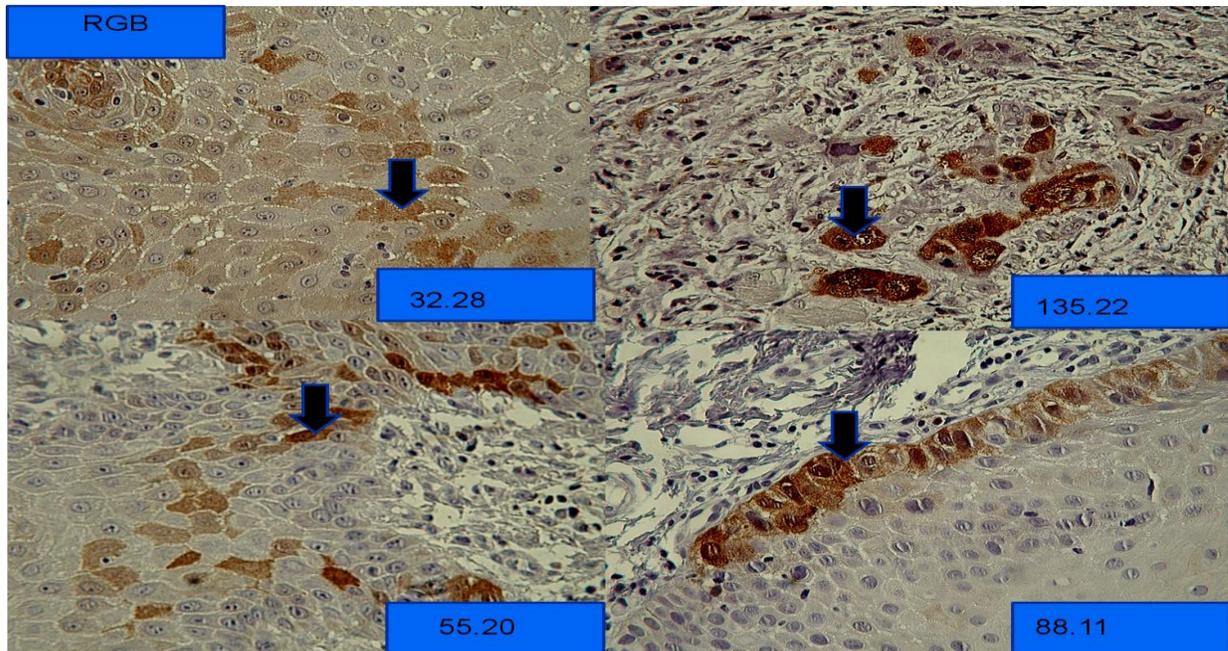


Figura 10. Imágenes obtenidas del análisis con el software ImageLab®.

Tres parámetros se obtienen al utilizar el software:

- Porcentaje de células positivas
- Intensidad digital de la inmunomarcaje
- Índice digital de la expresión

El porcentaje de las células marcadas (PCM) de las displasias o de los COCES fueron contadas digitalmente utilizando la fórmula:

$$\text{PCM} = \frac{\text{Numero de células marcadas} \times 100}{\text{Total de células contadas}} = \%$$

El promedio de la densidad óptica de las áreas positivas café oscuro y marrón RGB fue expresado en unidades ($ou/\mu m^2$) el mismo procedimiento fue aplicado para obtener la densidad óptica del fondo (DOF) de un área tomando un espacio sin tejido o un espacio vascular para cada microfotografía.

El color blanco absoluto corresponde a la máxima densidad óptica ($3207\ ou/\mu m^2$) compuesto por la totalidad de rojo, verde y azul siendo el negro la ausencia de estos colores. Por lo tanto los datos de densidad óptica calculados por el programa comprenden una escala en la cual los valores elevados corresponden a los colores que están claros

La intensidad de inmunoexpresión digital fue calculada utilizando la fórmula:

$$I_{dig} = \frac{320.7 - 320.7 \times \sum DO = Lo_{\mu/\mu m^2}}{\sum DOF}$$

El índice digital de la expresión (IEdig) fue obtenido por la multiplicación del PCM por la IEdig para cada caso

$$IEdig = \frac{PCM \times I_{dig} = Lo_{\mu/\mu m^2}}{100}$$

11.4 Análisis Semicuantitativo:

La fracción del área de células marcadas era resuelta utilizando la siguiente ecuación:

$$ALC = \frac{\text{total de células marcadas contadas} \times 100}{500} = \%$$

Los valores del área de células marcadas (ALM) fueron categorizados en:

0. Ausencia de células positivas
1. Hasta el 10% de células positivas
2. A partir del 11% y hasta el 50%
3. A partir del 51% de las células positivas

La cuantificación de 0 a 3 fue atribuida a la intensidad de la tinción (IISQ) considerándose los valores:

0. Negativo
1. Leve
2. Moderado
3. Severo

Finalmente el índice de expresión semicuantitativo (ISQ) fue determinado multiplicando el ACM y el (IISQ) categorizándolo en:

- Positividad leve: 1,2 ó 3 puntos
- Moderada: 4,5 y 6 puntos
- Severa: 7,8 y 9 puntos.

Se realizó la base de datos con el software SPSS Versión 13. Las variables continuas se describen a través de sus medias y desviaciones estándar, las variables categóricas se describen a través de porcentajes; para analizar la asociación entre p16, p53 y el inmunomarcaje de los anticuerpos, se aplicó la prueba de X^2 . Se realizó una prueba de ANOVA para observar si existen diferencias significativas entre displasias y carcinomas con respecto a la edad.

12. RESULTADOS

En el periodo comprendido de 1989 a 2009 se revisaron 17,155 expedientes recibidos y diagnosticados histopatológicamente en los cuatro centros de referencia ya mencionados. De éstos, se aislaron 322 casos con diagnóstico de displasias y COCE, descartándose 80 casos por no cumplir con los criterios de inclusión establecidos al inicio del estudio. Contando al final de la selección con 242 casos. Durante el proceso histoquímico e inmunohistoquímico se descartaron 34 casos quedando al final de la parte experimental 208 casos que reunían los criterios establecidos en el estudio.

El promedio de edad de los pacientes cuyos casos fueron incluidos en el estudio fue de 56.58 años \pm 17.20. De ellos, 109 (52.4%) correspondieron al sexo femenino (promedio de edad 57.08 años \pm 16.08, rango 24 a 91 años), y 98 (47.1%) al sexo masculino (promedio de edad 57.03 años \pm 17.19; rango de 21 a 88 años), en 1 caso no fue posible determinar el género. La prueba ANOVA no mostró diferencias significativas entre displasia y COCE con respecto a la edad ($P > .05$).

Las regiones anatómicas involucradas fueron: 57(27.4%) en la lengua, 46 (22.1%) encía, 42(20.2%) mucosa bucal, 18(8.7%) labio, 16(7.7%) paladar, 11 (5.3%) zona retromolar y 10(4.8%) piso de boca. En 8 (3.8%) casos no se pudo identificar la localización.

En la revisión microscópica con HyE el diagnóstico emitido fue: 96 displasias y 112 carcinomas; de las 96 displasias (100%), 40(41.66%) fueron displasias leves, 36(37.5%) moderadas y 20(20.84%) severas. En el caso de los COCES; 64(57.14%) fueron bien diferenciados, 38(33.92%) moderadamente diferenciados y 10 (8.94%) pobremente diferenciados.

12.1 Inmunoexpresión de p16

De las 96 displasias en estudio, 28 (29.17%) fueron positivas a p16 y 68(70.83%) negativas. Las displasias positivas fueron 13 casos (32.50%), displasia leve, 8(22%) moderada y 7(35.5%) severa; en la *figura 11* se muestra el marcaje de las células en el epitelio displásico, en la *figura 12* la expresión de este mismo marcador pero en el

epitelio proliferativo del COCE; en la *gráfica 1* se representa los porcentajes de los casos y los estratos del epitelio en que existió expresión de la proteína.

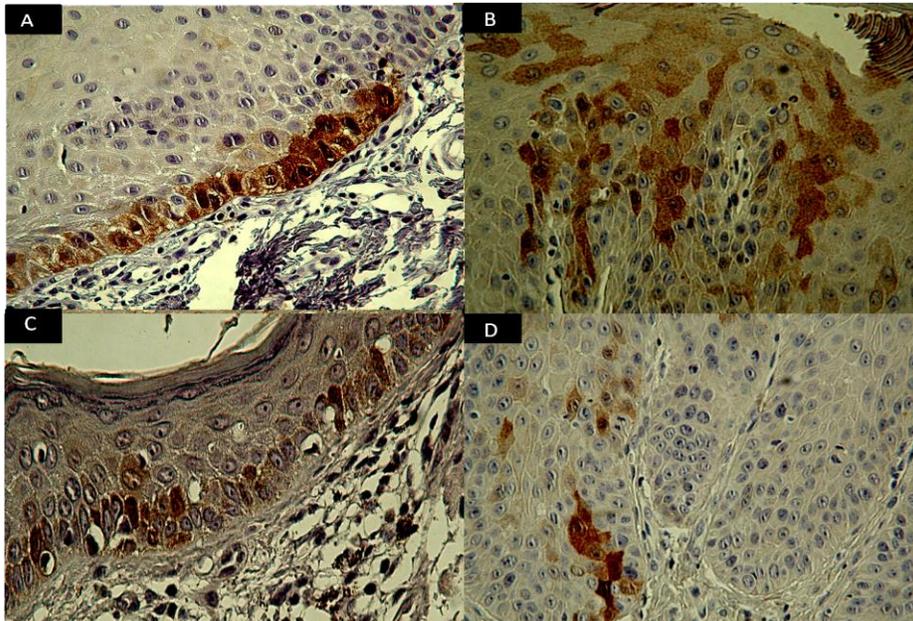


Figura 11. Displasia epitelial. A) Células del estrato basal con marcaje intracitoplasmático de p16, B) células positivas dispersas en los estratos basal, espinoso y granular, C) Expresión leve en áreas del estrato espinoso, y D) Marcaje de algunas células escamosas y células del estrato basal negativas en donde se observan dos o más nucléolos.

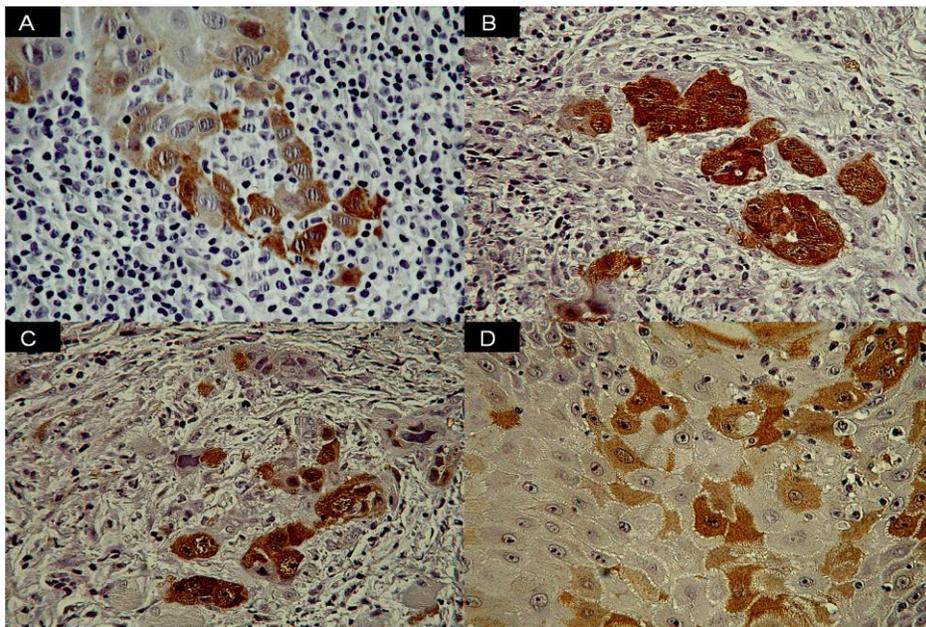
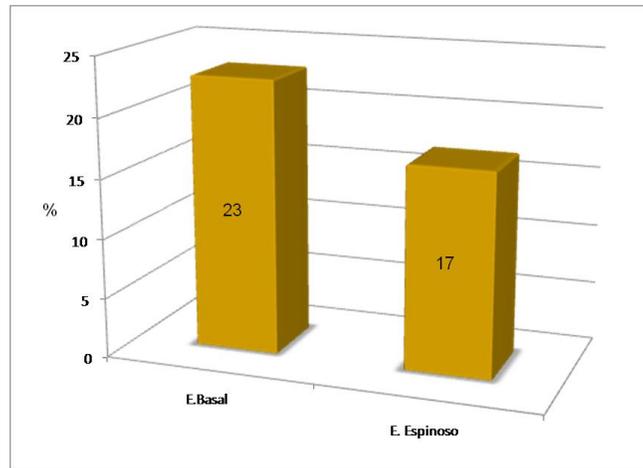


Figura 12. COCES. A) Marcaje de p16 en células malignas asociadas a infiltrado inflamatorio, B) y C) pequeños nidos y células neoplásicas positivas invadiendo tejido conectivo. D) células positivas en áreas de proliferación celular.

Grafica 1. Porcentajes de células positivas en los dos estratos en los que existió marcaje de p16 en las displasias; existieron casos en los que la expresión de p16 fue en ambos estratos.



Fuente Directa.

Al realizar la gradificación histológica obtuvimos 64 carcinomas bien diferenciados, 38 moderadamente y 10 pobremente diferenciados, de los cuales fueron positivos a p16 29 COCES bien diferenciados (45.31%), 18 (47.36%) moderadamente diferenciados y 3(33.33%) pobremente diferenciados. En general en los carcinomas el marcaje a p16 se observó en 50 casos (44.65%) y 62 casos (55.35%) fueron negativos. Los resultados del inmunomarcaje con p16 en las dos lesiones en estudio se muestran en la *Tabla 5*

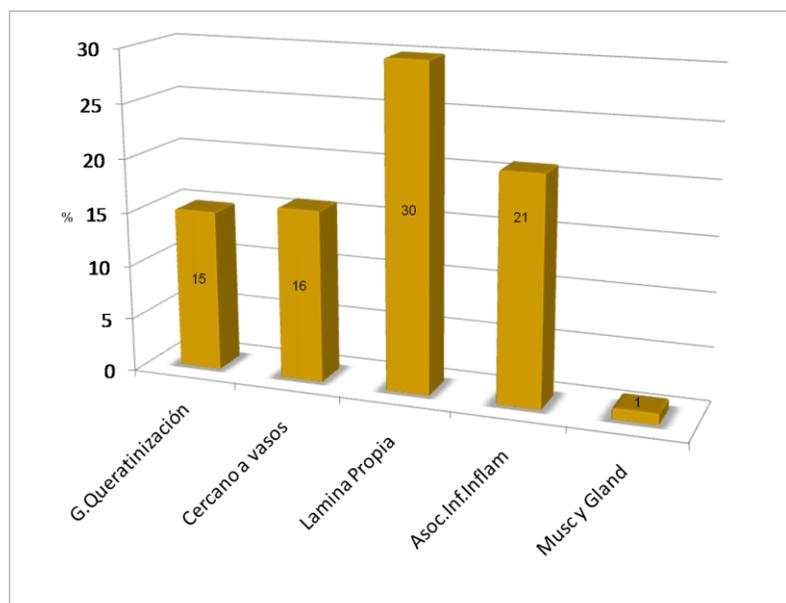
Tabla 6. Clasificación de las displasias y los COCES, e inmunomarcaje en relación al diagnóstico histopatológico.

DISPLASIAS	No de casos	%	Casos + a p16	%	Intensidad de la expresión		
					+	++	+++
Leve	40	41.66	13	32.50	4(30.76%)	5(38.46%)	4 (30.78%)
Moderada	36	37.50	8	22.22	4(50%)	3(37.5 %)	1 (12.5%)
Severa	20	20.84	7	35.50	2(28.57%)	1(14.28%)	4 (57.15%)
COCES	No de casos	%	Casos + a p16	%	Intensidad de la expresión		
Bien diferenciados	64	57.14	29	45.31	9(31.03%)	8(27.58%)	12(41.39%)
Moderadamente diferenciado	38	33.92	18	47.36	7(38.88%)	3(16.66%)	8 (44.46%)
Pobremente diferenciado	10	8.94	3	33.33	La expresión fue leve, moderada y severa para cada uno de los casos		

Fuente Directa.

La presencia y participación de p16 en el desarrollo de un tumor y su asociación con el frente de invasión tumoral es uno de los objetivos de este estudio por lo que se incluyó como parte del patrón de crecimiento a la profundidad de la invasión tumoral como lámina propia, tejido muscular, tejido glandular, etc. Así como las islas o nidos de células neoplásicas que se encontraban cercanas o infiltraban vasos y si existió asociación con el infiltrado inflamatorio. Los resultados se muestran en la *Gráfica 2*.

Gráfica 2. Expresión de p16 en los diferentes sitios que comprenden el FIT



Fuente Directa

12.2 Inmunoexpresión de p53

De las 96 displasias en estudio encontramos 32 casos (33.33%) positivos y 64 (66.67%) negativos. De estas 32 displasias positivas a p53, 18 (45.50%) fueron leves 10 (27.77%) moderadas y 4 (2%) severas. En general de los 32 casos positivos a p53 en 7 (21.87%) la expresión fue leve, 14 (43.76%) moderada y en 11 (34.37%) el marcaje fue intenso. En la *figura 13* se observa la expresión de la proteína en diferentes zonas del epitelio

proliferativo de las displasias en estudio y en la *figura 14*. Se muestra el marcaje nuclear en nidos de células neoplásicas malignas que invaden el tejido conectivo.

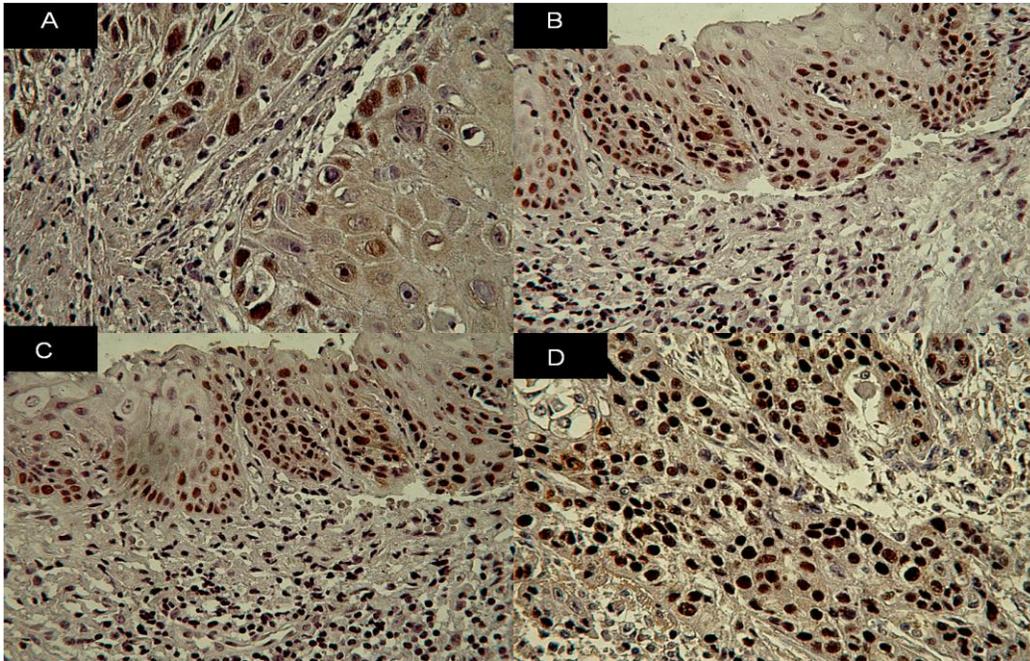


Figura 13. p53 es un marcador nuclear. A) células marcadas positivamente en el estrato basal del epitelio. B) y C) marcaje de células en el estrato basal y espinoso. D) Marcaje nuclear en zona de epitelio displásico proliferativo.

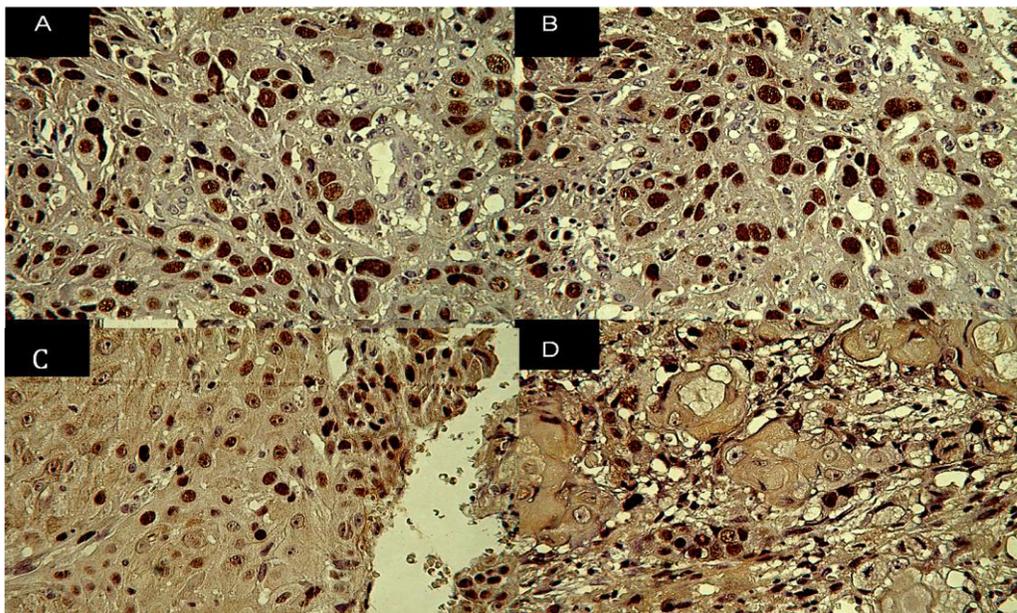
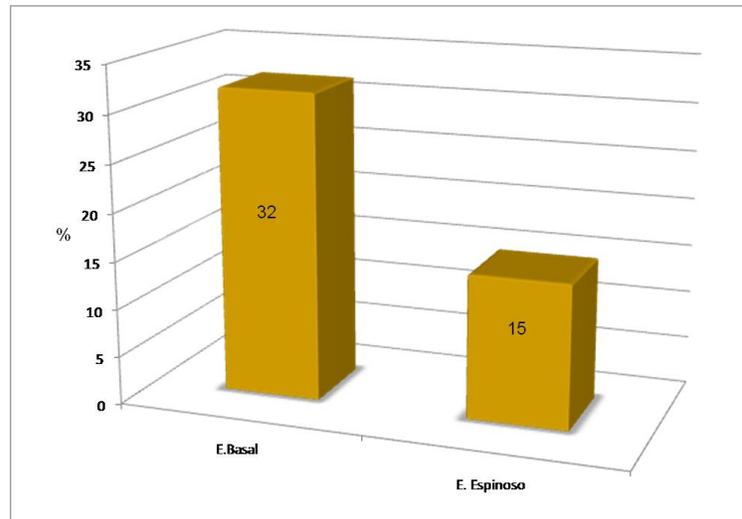


Figura 14. A) y B) Islas de epitelio neoplásico marcadas nuclearmente por p53. C) Células p53+ pleomórficas cercanas y rodeando a los vasos sanguíneos. D) Pequeñas islas de células marcadas positivamente invadiendo tejido conectivo y cercanas a perlas de queratina.

Gráfica 3. Expresión del anticuerpo p53 en células pleomorficas de displasias.



Fuente Directa

De los 112 COCES del estudio, que como ya se mencionó al describir los resultados obtenidos en el inmunomarcaje con p16, 64 fueron bien diferenciados, 38 moderadamente y 10 pobremente diferenciados. Del total de los COCES 45(40.17%) fueron positivos a p53 y 67 (59.83%) negativos. Los resultados del marcate y la intensidad de este en las dos lesiones en estudio se presentan en la *Tabla 6*

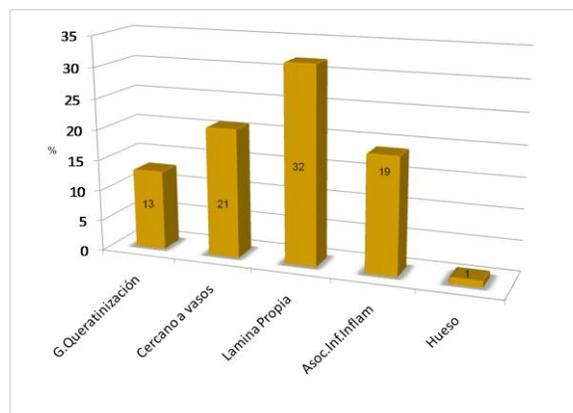
Tabla 7. Resultados del inmunomarcaje con p53 en las dos lesiones en estudio y su distribución de acuerdo al diagnóstico histopatológico

DISPLASIAS	No de casos	%	Casos + a p53	%	Intensidad de la expresión		
					+	++	+++
Leve	40	41.66	18	45.50	5(27.78%)	6(33.34%)	7(38.88%)
Moderada	36	37.50	10	27.77	2(20%)	7(70%)	1(10%)
Severa	20	20.84	4	2	0(0%)	1(25%)	3(75%)
COCES	No de casos	%	Casos + a p53	%	Intensidad de la expresión		
					+	++	+++
Bien diferenciados	64	57.14	24	37.5	5(20.82%)	12(50%)	7(29.18%)
Moderadamente diferenciado	38	33.92	18	47.36	1(5.56%)	8(44.44%)	9(50%)
Pobremente diferenciado	10	8.94	3	30			3(100%)

Fuente Directa.

Observar el patrón de crecimiento y la profundidad de la invasión tumoral de los COCES fue otro de los objetivos de este estudio al aplicar el FIT así mismo marcar con p53 células en los epitelios proliferativos y en las zonas en donde estas son más agresivas como es el frente de invasión de un tumor, en la *gráfica 4 se presenta el* Porcentaje de células marcadas a p53 en las diferentes zonas descritas en el FIT.

Gráfica 4. Expresión de p53 en los diferentes sitios que comprenden el FIT.



Fuente Directa.

12.3 Inmunoexpresión de ambos marcadores en displasias

Ambos anticuerpos se expresaron principalmente en el estrato basal considerándose que están asociados al patrón de proliferación celular y de actividad metabólica de las células en el estrato germinativo del epitelio displásico. La distribución del marcaje se presenta en la tabla 7 en donde existió asociación de los dos inmunomarcadores de este estudio.

Tabla 8. Distribución del marcaje de p16 y p53 en displasias.

p16				
Estrato	Positivas	Negativas	X²	P
Basal	23	5	73.45	.0001
Espinoso	17	11	50.17	.0001
p53				
Basal	30	2	87.27	.0001
Espinoso	15	17	35.55	.0001

Fuente Directa

12.4 Inmunoexpresión de ambos marcadores en COCES

La expresión de los marcadores fue variable ya que estos se encontraban, en diferentes áreas del epitelio proliferativo, predominando en células neoplásicas que invadían los tejidos adyacentes en forma de nidos, islas y cordones encontrándose asociadas al infiltrado inflamatorio y rodeando e infiltrando vasos sanguíneos. La asociación entre los criterios del FIT y la expresión de ambos marcadores fue estadísticamente significativo (.0001).

Tabla 9. Distribución del marcaje de p16 y p53 en el FIT

p16				
Parámetro	Positivas	Negativas	X²	P
G. Queratinización	15	35	21.47	.0001
Cercano a Vasos	16	34	23.14	.0001
Lamina Propia	30	20	50.81	.0001
Asoc.Inf.Inflamatorio	21	29	32.04	.0001
p53				
G. Queratinización	13	32	21.89	.0001
Cercano a Vasos	21	24	38.48	.0001
Lamina Propia	32	13	62.77	.0001
Asoc.Inf.Inflamatorio	19	26	30.44	.0001

Fuente Directa.

En relación al patrón de invasión y la asociación con p16, 40 COCES (80%) invadieron leve y moderadamente emigrando hacia los vasos sanguíneos y ubicándose perivascularmente. En 10 casos (20 %) células malignas positivas infiltraban vasos. En las zonas de infiltrado inflamatorio moderado e intenso encontramos células malignas positivas a p16. Se realizó X² para ambos casos no obteniendo significancia estadística (P >5).

Lo que respecta a p53 y al patrón de invasión 36 COCES (80%) invadieron leve y moderadamente en las cercanías y periferia de los vasos sanguíneos, en 9 casos (20 %) infiltraban los vasos. En las zonas de infiltrado inflamatorio moderado e intenso encontramos células positivas a p53, se realizó X² para ambos casos no obteniendo significancia estadística (P >5). En 51 (45.25%) casos de COCE en el infiltrado inflamatorio se encontraba la presencia de eosinófilos como se muestra en la figura 15. En 41(80%) los eosinófilos se encontraban en un infiltrado inflamatorio de intenso a

moderado y 10(20%) en un infiltrado leve. En 26(52%) casos la presencia de eosinófilos se relaciono a células neoplásicas positivas a p16 y en 20(44%) a p53, sin ser en ninguno de los dos marcadores estadísticamente significativo ($P > 5$).

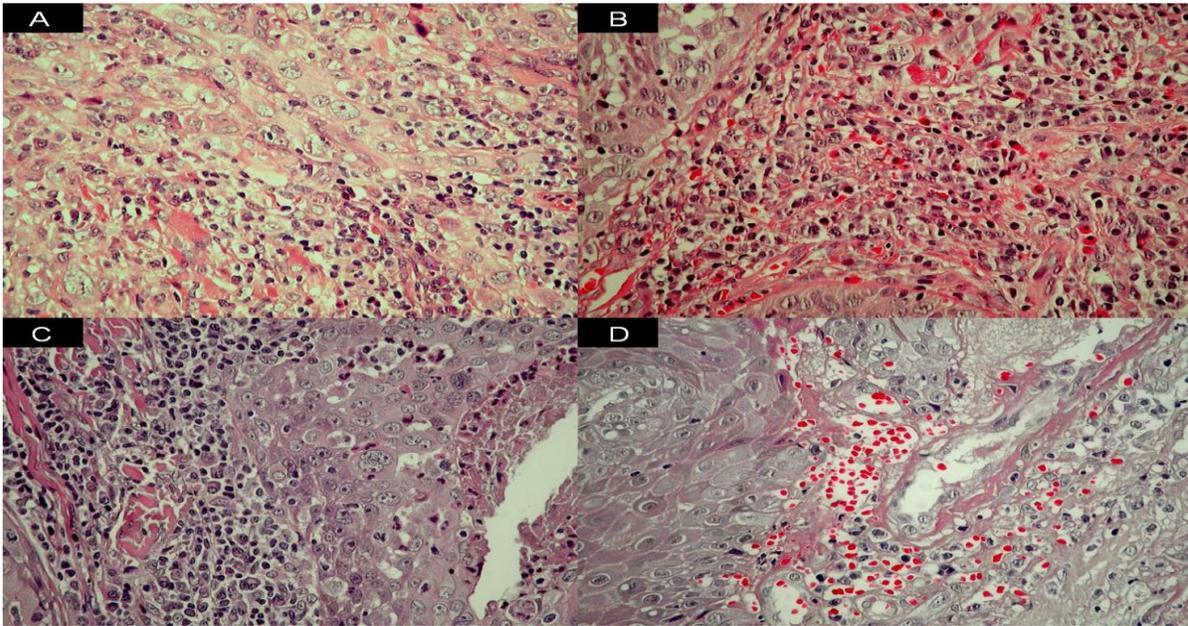


Figura 15. A, B Y C. Presencia de eosinófilos entre el infiltrado inflamatorio y células neoplásicas. D, Células epiteliales malignas rodeando vasos sanguíneos.

13. DISCUSIÓN

En oncología se definen como factores pronósticos un conjunto de síntomas y signos que informan sobre el posible futuro de un enfermo en cuanto a supervivencia global, respuesta terapéutica, intervalo libre de enfermedad o presencia de una complicación; dichos factores permiten el establecimiento de grupos homogéneos de pacientes con un pronóstico similar que permita la aplicación de procedimientos terapéuticos lo más parecidos posibles.²⁸

En el caso del cáncer de cabeza y cuello, el pronóstico del COCE depende de una serie de variables histopatológicas que requieren de su correcta sistematización y que han de ser fielmente sistematizadas para la precisa comprensión del pronóstico de dicho carcinoma. El patrón mediante el cual el COCE invade el tejido circundante es uno de los principales parámetros histopatológicos predictores de su comportamiento biológico.²⁸

Close y colaboradores en un estudio realizado en 65 tumores de cavidad bucal y orofaringe, determinaron que la invasión microvascular es el parámetro que tiene mayor impacto en la supervivencia (inferior al 51% en el primer año) pudiéndose establecer una correlación con la recurrencia local y metástasis cervicales (77%).²⁰ Nosotros encontramos que el 30% de las células tumorales se encontraban cercanas a vasos sanguíneos, el 46% rodeaban los vasos y un 24% de los vasos se encontraban infiltrados por células tumorales.

Cuando en la periferia de un tumor existe infiltrado celular mixto se interpreta como un mecanismo de defensa cito-inmunológico por parte del huésped, por lo que la presencia de infiltrado linfoplasmocitario en el estroma del tumor es considerado un factor pronóstico favorable, probablemente debido a la buena respuesta inmunológica del huésped frente al tumor.¹⁷ En nuestro estudio el 39% de los COCE presentaron infiltrado inflamatorio mixto intenso, 28% moderado y el 32% leve. Lo que presupone que el 39% de los carcinomas en estudio tendrían un factor pronóstico favorable.

Aunque el objetivo del estudio no era identificar la presencia de eosinófilos en algunos casos se observó su presencia sin embargo no fue estadísticamente significativo, pero vale la pena mencionar que actualmente se está considerando como un indicador de buen pronóstico tumoral la proporción de eosinófilos en el infiltrado inflamatorio, fenómeno que ha sido denominado , eosinofilia tisular asociada al tumor (TATE), lo cual hipotéticamente representa un mecanismo de defensa citoimmunológico por parte del huésped, no teniendo un carácter local, sino siendo la expresión de la liberación del factor eosinofilotactico de la anafilaxia ECF-4 liberada por las células cebadas.²⁹

De todos los parámetros histopatológicos considerados, el que determina un valor pronóstico muy diverso es el grado de diferenciación, (clasificación de Broders), aunado a esto la falta de concordancia al evaluar la graduación histopatológica debido a la subjetividad de los parámetros e interpretación de los patólogos ha provocado pérdida de consenso en relación con su valor pronóstico.²² Así mismo esta gradificación presenta el menor índice de asociación estadística principalmente al valorar el índice mitótico. Actualmente se considera más efectivo el sistema propuesto por Bryne o sistema de graduación del FIT, por otra parte Costa Ade³ describe que el patrón histopatológico del COCE puede variar de una zona a otra dentro del mismo tumor, por lo que consideran que el sitio más importante a evaluar y por lo tanto de mayor utilidad para establecer el pronóstico debe ser considerado en base al FIT, zona donde proliferan las células tumorales más agresivas, por lo que debe ser considerado la región más representativa de la neoplasia.³ En el análisis de los COCE utilizando la clasificación de Broders encontramos que el 54% de los carcinomas fueron bien diferenciados, 36% moderadamente y 8% pobremente diferenciados.

135 pacientes con carcinoma de células escamosas tuvieron un seguimiento a cinco años en donde en los tres primeros las revisiones fueron semestralmente y los dos últimos anual en la India, se realizó inmunohistoquímica durante el periodo del diagnostico inicial previo al tratamiento, utilizando EGFR, Stat3, H-ras, c-myc, p53, cyclin D1, p16, Rb, Ki-67, y Bcl-2, encontrando que los carcinomas positivos a p16

correspondieron a los pacientes libres de recidivas, contrario a p53 donde los positivos al momento del diagnóstico presentaban metástasis y en otros casos fueron pacientes que durante el seguimiento tuvieron recidiva, p16 y Stat 3 predecían la supervivencia libre de recidiva y en general todos los pacientes sobrevivieron por lo que la conclusión fue que p53 y p16 sirven como auxiliares potenciales en la evaluación de tumores orales y para predecir el riesgo de recidiva, así mismo describen que KI67 y bcl 2 son considerados marcadores de proliferación celular KI 67 y Bcl2 fueron positivos en el 75% de la muestra sin que su inmunoexpresión tenga valor pronóstico³⁰ En la misma India, Sinha en Nueva Delhi realizó un seguimiento mensual, bimestral y trimestral durante tres años posterior a la cirugía de pacientes con carcinomas de células escamosas, monitoreando recurrencias regionales o metastásicas mediante examen clínico de cabeza y cuello, análisis de laboratorio, chequeo radiográfico cada seis meses, PET y evaluación histopatológica únicamente en casos sospechosos de recidiva clínicamente. La falta de respuesta al tratamiento se presentó en 15 de 30 pacientes que durante el diagnóstico inicial tuvieron márgenes libres de tumor, de ellos 6 tuvieron recurrencia local, 7 regional y dos presentaron metástasis. De 38 pacientes con COCE en la lengua 33(86.8) presentaban hipermetilación de p16 con PCR, de esta manera reportan pérdida de la expresión de este gen en los tumores. La pérdida de expresión de esta proteína en el COCE está relacionada a una mayor agresividad tumoral.³¹

En este trabajo la expresión de los marcadores fue variable debido a que se observó en diferentes áreas del epitelio proliferativo, predominando en los nidos, islas y cordones de células malignas asociadas al infiltrado inflamatorio y rodeando e infiltrando vasos sanguíneos. La asociación entre los criterios del FIT y la expresión de ambos marcadores fue significativa. En 40 COCES (80%) se encontraron células malignas positivas a p16 que invadían el tejido conectivo adyacente y ubicadas perivascularmente; en 10 casos (20 %) células malignas positivas a p16 infiltraban vasos y se encontraron en zonas de infiltrado inflamatorio. Células malignas positivas a p53 fueron encontradas en las zonas proliferativas del tumor invadiendo la periferia de los vasos sanguíneos en el 80% de

los casos y 20%, los infiltraba. La asociación con el infiltrado inflamatorio no fue significativa. La sobre-expresión del gen p53 en cáncer de la cavidad oral ha sido correlacionada con los hábitos de tabaco y alcohol, igualmente, se ha demostrado la presencia del p53 en las lesiones displásicas de la cavidad oral, ofreciendo la posibilidad de usar este gen como marcador tumoral. En un estudio realizado por Matsuda en Japón donde analizaron 10 displasias y 10 hiperplasias epiteliales no presentaron mutaciones de p16 y de un grupo de 20 carcinomas de células escamosas, 10% (2 casos) tuvieron mutaciones de este gen y 25% (5 casos) presentaron mutaciones en p53, tardíamente durante la tumorigenesis.³² A pesar del número de estudios reportados sobre el papel crucial de p53 como mediador de funciones y control celular y del estrés en los carcinomas, y que ha sido una contribución muy importante para comprender la progresión tumoral aun existe la necesidad de determinar bajo qué condiciones se debe analizar la proteína para utilizarla como medida terapéutica en el carcinoma de células escamosas.

Con respecto a las displasias en el año de 1973 debido a una investigación de Richart, se dan a conocer una serie de hallazgos enfocándose en la biología de las lesiones y su comportamiento, el autor utilizó numerosas técnicas, estudios genéticos, cultivo de tejidos, evaluación de contenidos de ADN, ultra estructura así como identificación enzimática. Los hallazgos dieron lugar a conclusiones de que cada una de las lesiones etiquetadas como displasia tenían una conducta especial y se comportaban como lesiones pre-neoplásicas.³³ Se ha estudiado el comportamiento biológico de las displasias por medio de inmunohistoquímica llegando a la conclusión de que existe un mayor riesgo de transformación maligna en casos positivos a p53 con respecto a p16 sin embargo en el caso de las displasias orales aun son pocos los trabajos reportados hasta el momento.

En nuestro estudio de las 96 displasias, 28 (29.17%) fueron positivas a p16 y 68(70.83%) negativas. Las displasias positivas fueron 13casos (32.50%), displasia leve, 8(22%) moderada y 7(35.5%) severa. En el 82% de los casos el inmunomarcaje se

observó en el estrato basal y el 60% en el espinoso siguiendo así el patrón proliferativo de las lesiones. En cuanto a la intensidad de la reacción y el tipo de displasia no hubo diferencias significativas.

Correa y colaboradores estudiaron 5 displasias leves, 5 moderadas y 5 severas siendo positivas a la proteína anti p16 2 displasias leves y 2 moderadas (26.6%) respectivamente, ninguna displasia severa fue positiva. Aunque el autor reconoce que una de las limitantes de su estudio fue el número de casos tan reducido, sus resultados coinciden con Gologan que reporta que no existen diferencias entre el tipo de displasia y la intensidad de la expresión y que el 80% de las displasias leves y moderadas son positivas al anticuerpo y solo el 20% de las displasias severas lo son. Nosotros coincidimos con lo reportado por Correa en donde la expresión al anticuerpo se presenta en el 92% de los casos en citoplasma y solo el 8% en núcleo y citoplasma.

De las 96 displasias en estudio encontramos 32 casos (33.33%) positivos y 64 (66.67%) negativos a p53. De estas 32 displasias positivas, 18 (45.50%) fueron leves 10 (27.77%) moderadas y 4 (2%) severas. En general de los 32 casos positivos a p53 en 7 (21.87%) la expresión fue leve, 14 (43.76%) moderada y en 11 (34.37%) el marcaje fue severo sin que existieran diferencias significativas entre el tipo de displasia y la intensidad de la expresión.

El 100% de los casos fue positivo a la proteína en el estrato basal y el 46% en el espinoso por lo que nos indica que el inmunomarcaje a p53 sigue de igual manera el patrón proliferativo de las displasias por lo que coincidimos con Abrahao y colaboradores que este anti oncogén se expresa exclusivamente en células mutadas indicando que las lesiones precancerosas positivas tendrán un mayor riesgo de transformación maligna. Cruz y colaboradores mostraron que la expresión en estrato basal de p53 está presente en gran parte de las displasias y la extensión de un inmunomarcaje hacia estrato espinoso indica un mayor grado de daño epitelial.³⁴

14. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo se desprenden las siguientes conclusiones:

- Existe una asociación estadísticamente significativa entre la inmunoreacción de los anticuerpos p16 y p53 con el epitelio proliferativo de las displasias en los estratos basal y espinoso.
- En los COCES la expresión de los marcadores fue variable debido a que se observó en sitios de proliferación e invasión celular, predominando en los nidos, islas y cordones de células malignas asociadas a infiltrado inflamatorio y rodeando e infiltrando vasos sanguíneos.
- La asociación entre los criterios del FIT y la expresión de ambos marcadores fue significativa.
- Existió asociación significativa entre el patrón de crecimiento de los COCES, donde p16 fue positivo en células neoplásicas malignas que invadían los tejidos adyacentes y se correspondían con el infiltrado inflamatorio existente.
- Las células neoplásicas malignas positivas a p53 se ubicaban en las zonas de mayor proliferación epitelial y rodeaban e infiltraban vasos sanguíneos.
- p16 y p53 son anticuerpos que pueden ser considerados como marcadores de progresión tumoral que ayudarán junto con el FIT al patólogo establecer el diagnóstico y el patrón de crecimiento del COCE.

15. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

-
- ¹ García García V, González Moles M, Bascones Martínez A. Bases moleculares del cáncer oral revisión bibliográfica. Av O dontoestomatología 2005; 21-6: 287: 295.
- ² Silverman S, Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancer. JADA. Vol 132, November 2001.
- ³ Arriagada O et al. Rol de las características clínicas e histológicas como factores pronostico para la sobrevida en pacientes con carcinoma de celulas escamosas de la cavidad oral. Re. Chilena de Cirugía Vol. 62 No 5, Octubre 2010; pg 441-48
- ⁴ Kaminagakura E, Werneck I, Soares F, Nishimoto I, Kowalski L. CCND1 Amplification and protein Overexpression in oral squamous cell carcinoma of Young patients. Head and Neck DOI 10.1002/hed Month 2011
- ⁵ Leyva huerta, Gaitán Cepeda. Patología General e inmunología. Cap. 4, 8 y 10 Pg. 68 ,193, 195 y 266
- ⁶ Meza J, Montaña A, Aguayo A. Bases moleculares del cáncer. Revista de investigación clínica Vol 58, Num 1 Enero-febrero 2006, pg 56-70
- ⁷ Robins. Patología estructural y funcional. Capitulo 4 pg. 103.
- ⁸ Oikawa T et al. Transcriptional control of BubR1 by p53 and suppression of centrosome amplification by BubR1. Mol. Cell Biol, 25, 40-46-4061 (2005).
- ⁹ Levine AJ, Finlay CA, Hinds PW. *P53 is a tumor suppressor gene* Cell. 2004 Jan 23;116(2 Suppl):S67-9, 1 p following S69.
- ¹⁰ Levine AJ. p53 the cellular gatekeeper for growth and division. Cell 88;323,1997.
- ¹¹ Lacroix M, Toillon RA, Leclercq G. *p53 and breast cancer, an update* Endocr Relat Cancer 2006 Jun;13(2):293-325
- ¹² Chimenos E, Font I, Lopez J. Riesgo de cáncer oral y marcadores moleculares. Medicina Oral, Patología oral y cirugía bucal. 2004;9:377-84
- ¹³ Lance A. Liotta. Tumor Invasion and Metastases Role of the extracellular Matrix: Rhoads Memorial Award Lecture. Cancer Research 46, 1-7 January 1986.
- ¹⁴ Vizoso F, Torres C, García J. Factores pronósticos y nuevos aspectos de la biología molecular en el cáncer de estomago reseccable. Oncología 2004; 27 (4): 171-174
- ¹⁵ Al Kassam Martínez D. Marcadores tumorales en la producción de metástasis en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello. Universidad de Oviedo; Departamento de cirugía y especialidades medico quirúrgicas.
- ¹⁶ Cedeño F. Angiogenesis en lesiones premalinas y malignas de la mucosa bucal. Acta odontológica venezolana, Vol 43. No. 2 Caracas Mayo 2005.

- ¹⁷ Saiz Bustillos R, Corchero Martin G, Montesinos Perea B, González Terán T, Sánchez Santolino S. Carcinoma oral de células escamosas. Parámetros citométricos de interés pronóstico. Medicina oral, patología oral y cirugía bucal. 2005; 10:462-7
- ¹⁸ Cantin López M, Suazo Galdames I, Venegas Rojas B, Zavando Matamala D. Carcinoma de Células Escamosas de labio inferior asociación entre grado de angiogenesis, graduación histológica y Frente de Invasión Tumoral
- ¹⁹ Satiro Watanabe et al. Analysis of cell proliferation and pattern of invasion in oral squamous cell carcinoma. Journal of oral science, vol 52 No. 3, 417-424,2010
- ²⁰ Dario Sanchez J, Chamorro Santos Clara, Esquivias Lopez J, Valencia Laseca E. Factores Histopatologicos en el carcinoma lingual de células escamosas. Rev Esp Patol 2006: Vol 39, No 2: 99-104.
- ²¹ Schneide Stock R et al. High Prognostic value of p16 alterations in gastrointestinal stromal tumors. Journal of clinical oncology, vol 21, NO 9 (May 1), 2003: pp 1688-1697.
- ²² Kujan O et al. Why oral histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia: An attempt to understand the sources of variation. Oral oncology 2007; 43, 224-31
- ²³ González J, Martínez P. Una nueva modificación en la clasificación TNM del cáncer mamario. Rev Esp Patol 2004: Vol. 37, No 3: 247-51.
- ²⁴ Puiggro C, Lecha M, Rodriguez T, Pérez C, Planas M. El índice de Karnofsky como predictor de mortalidad en pacientes con nutrición enteral domiciliaria. Nutr. Hosp. 2009; 24 (2): 156-60.
- ²⁵ Echebarría Aguirre P, Aguirre Urizar J. Displasia Epitelial Concepto y Significación. Avances en Odontostomatología Vol. 24-Num 1-2008
- ²⁶ Moret González Y, Lopez Labady J, Garcia Toro M, Piñango V. Displasia epitelial bucal. Acta Odontol. Venez V. 46 n. 1 Caracas mar. 2008
- ²⁷ Warnakulasuriya S. Histological grading of oral epithelial dysplasia: revisited. DOI: 10.1002/1096-9896(200107)194:3, 294: AID-PATH911. 3.0.CO;2-Q
- ²⁸ Gallegos J. Factores que impactan en el pronóstico de los pacientes con carcinoma epidermoide de la cavidad oral. GAMO Vol. 9 Num. 3, Mayo-Junio 2010.
- ²⁹ Sanchez J, Sicilia M, Capitan L, Labrot I, Martinez S y cols. Profundidad tumoral y variables histopatologicas en el carcinoma epidermoide lingual, estudio retrospectivo sobre 60 pacientes. Av Odontostomatología 2005; 21-5: 241-49
- ³⁰ Shah NG, Trivedi TI, Tankshali RA, Goswami JV, Jetly DH, Shukla SN, Shah PM, Verma RJ Prognostic significance of molecular markers in oral squamous cell carcinoma: A multivariate analysis. Division of Molecular Endocrinology, Department of Cancer Biology, The Gujarat Cancer and Research Institute, Asarwa, Ahmedabad 380 016, Gujarat, India. Head and Neck 2009;59:190-197.

³¹ Sinha P, Bahadur S, Thakar A, Matta A, Macha M, Ralhan R, Gupta SD. Significance of promoter hypermethylation of p16 gene for margin assessment in carcinoma tongue Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, All India Institute of Medical Sciences, New Delhi Head and Neck 2009;60:230-36

³² Matsuda H, Konishi N, Hiasa Y, Hayashi I, Tsuzuki T, Tao M, Kitahori Y, Yoshioka N, Kirita T, Sugimura M, alterations of p16/CDKN2,p53, and ras genes in oral squamous cell carcinomas and premalignant lesions. J. Oral Pathol Med 1996 25: 232-8

³³ Richart R. Cervical intraepithelial neoplasia. Pathol Ann. Sheldon sommers. Nueva York. 1973

³⁴ Correa A, Venturi B, Daumas F, Preda E, Grillo M. Inmunohistochemical expression of p53, p16 and hTERT in oral squamous cell carcinoma and potentially malignant disorders. Braz Oral Res. 2011 6: 34-41