



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

SALIVA COMO BIOFLUIDO DIAGNÓSTICO PARA  
CÁNCER BUCAL.  
UNA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.  
(2010-2014).

**TESINA**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**CIRUJANO DENTISTA**

P R E S E N T A:

SERGIO LÓPEZ CORRAL.

TUTORA: Mtra. SANTA RITA ARROYO CRUZ.

MÉXICO, D.F.

**2015**



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.

## *Dedicatorias.*

Primeramente a Dios, porque sin El no hubiera llegado hasta donde estoy el día de hoy. Gracias por tus bendiciones a mi vida Padre Celestial.

A mi esposa Damaris y a mi hija Zoe Aide. Por enseñarme a caminar por este largo y maravilloso viaje, por ser motor en mi vida e inspiración para continuar adelante. ¡Las amo!

A mi madre María del Consuelo y a mi padre Vicente. Porque ustedes son ejemplo en mi vida de tenacidad y ayuda incondicional, porque hoy se lo que es tener un amor de padres. A ustedes ¡Gracias y los amo!

A mis hermanos Miriam y Fabián. Por ser mis confidentes, amigos y pacientes incondicionales.

A la familia López Olea, López Villegas, López Mote, López Heras, Corral López y en especial a mi segunda madre Juana Heras, por tu sabiduría y consejos oportunos dados a mi vida.

A la Iglesia Huerto de Getsemaní. Por ser pacientes incondicionales y ayudarme a desarrollarme como profesionista.

A mi tutora Dra. Rita Arroyo, Dra. Lila Domínguez y Dr. Guillermo Villagómez. Por su paciencia y su tiempo otorgados de manera incondicional.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y Facultad de Odontología, Por permitirme formarme dentro de sus aulas como un profesionista orgullosamente puma.

Finalmente y sin ser menos importante a cada persona, paciente y amigo que con su apoyo y ayuda puso su participación en que se culminara con éxito este maravilloso camino.

***¡¡Ha sido largo el viaje....pero al fin llegué!!***

**ÍNDICE**

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.- OBJETIVOS</b> .....	3
1.1 Objetivo General.....	3
1.2 Objetivos específicos.....	3.
<b>2.- SALIVA</b> .....	4
2.1 Descripción histológica de las glándulas salivales.....	4
2.2 Bioquímica de la saliva.....	6
<b>3.- BIOMARCADORES</b> .....	23
3.1 Definición de biomarcadores.....	23
3.2. Naturaleza bioquímica de biomarcadores.....	24
2.2.1. Proteínas.....	24
2.2.2. ARN.....	25
3.3 Biomarcadores caracterizados en saliva como medio de diagnóstico.....	27
<b>4- SALIVA COMO MEDIO DE DIAGNÓSTICO</b> .....	30
4. 1.Introducción.....	30
4.1.1. Aplicación de la saliva como medio diagnóstico.....	32
4.2. Técnicas asociadas a la utilización de saliva como medio de diagnóstico.....	33
4.2.1. ELISA.....	33
4.2.2 Cromatografía de gases.....	35
4.2.3 SELDITOF.....	38
4.2.4 PCR.....	40
4.2.5 Western Blot.....	44
4.2.6 MALDI-TOF.....	48

4.3. Saliva como medio de diagnóstico de cáncer bucal.....	50
4.3.1 Introducción (Saliva como medio de diagnóstico en cáncer bucal).....	50
4.4 Antecedentes del cáncer bucal.....	52
4.4.1 Factores de riesgo para cáncer bucal.....	52
4.4.2 Epidemiología del cáncer bucal.....	54
4.4.3 Clasificación y estadificación del cáncer bucal.....	55
4.4.4 Tamizaje y tratamiento para cáncer bucal.....	60
4.5 Biomarcadores específicos para cáncer bucal en saliva.....	62
4.6 Estudios reportados (2010-2014).....	70
4.7 Estudios reportados en México (2010-2014).....	73
<b>Conclusiones.....</b>	<b>74</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>75</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>79</b>

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad el cáncer oral es una enfermedad en donde las células de la cavidad bucal se dividen sin control y pueden invadir otros tejidos; éste se desarrolla por múltiples factores de riesgo como los de tipo ambiental, inmunológicos, nutricionales, hábitos y estilos de vida. A nivel celular surge como consecuencia de trastornos genómicos generados por aberraciones cromosómicas, activación de oncogenes e inactivación de genes supresores tumorales, originando células con características proliferativas e invasivas.

Así mismo en los últimos años la prevalencia de cáncer bucal ha aumentado, y la investigación en la búsqueda de un método de diagnóstico precoz, utilizando biofluidos como por ejemplo la saliva.

Entre las ventajas en comparación con las muestras de sangre se han propuesto que el método de recolección de saliva es seguro, indoloro y no traumático, la técnica es fácil de realizar, el equipo de recolección es simple y la muestra puede ser tomada varias veces sin causarle incomodidad al paciente. Se sostiene que la utilización de la saliva en comparación con la sangre puede ser más sensible y específica para las enfermedades de cavidad bucal tales como carcinoma oral de células escamosas.

La utilización de la saliva como auxiliar en el diagnóstico para el cáncer bucal considera un alto porcentaje de certeza, debido a los biomarcadores específicos que se presentan en procesos neoplásicos.

Con base en lo anterior se hace necesario la caracterización y posterior estudio de biomarcadores que se expresen en estadios iniciales de la enfermedad para que puedan ser útiles en el diagnóstico precoz, en este sentido conociendo que el proceso cancerígeno se inicia con cambios a nivel celular es pertinente mencionar, como objeto principal de esta revisión bibliográfica citar aquellos biomarcadores que se han reportado en saliva y que están involucrados en el ciclo celular, apoptosis o procesos relacionados con los marcadores de crecimiento tumoral.

Aunque existe un creciente esfuerzo dedicado a la investigación del cáncer bucal, centrándose en la identificación de indicadores biológicos para el diagnóstico y la agresividad biológica, son pocos los estudios que han examinado biomarcadores tumorales en la saliva. En el presente trabajo de revisión se muestran los principales marcadores hasta la fecha reportada para cáncer bucal en saliva.

## **OBJETIVOS.**

### **1.1 OBJETIVO GENERAL.**

Que la saliva es un biofluido utilizado en el diagnóstico para cáncer bucal.

### **1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.**

- 1.- Diferenciar los biomarcadores específicos para la saliva utilizados en el diagnóstico de cáncer bucal.
- 2.- Conocer las técnicas empleadas para identificar potenciales biomarcadores salivales de cáncer de cavidad bucal.
- 3.- Conocer si hay estudios realizados con saliva para el diagnóstico de cáncer bucal recientes en México.

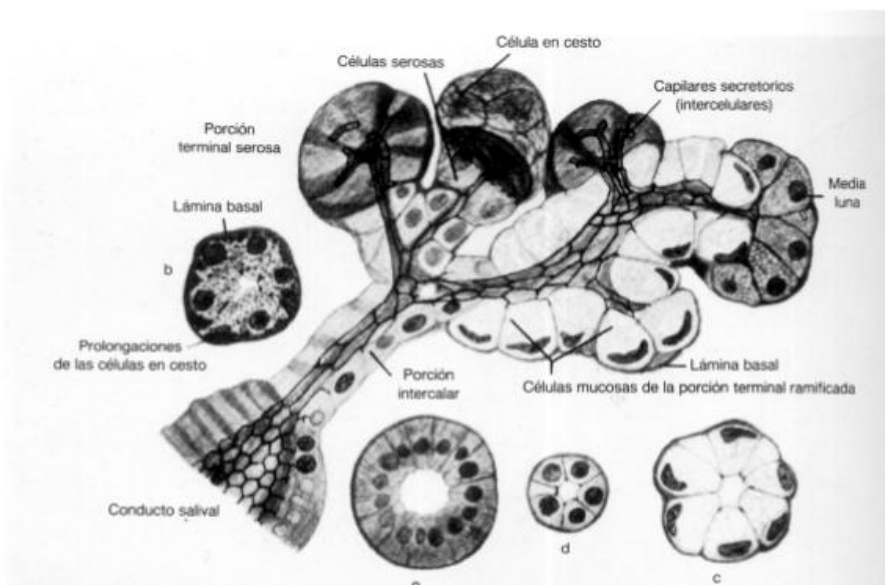


## 2.- SALIVA.

### 2.1 Descripción Histológica de las glándulas salivales.

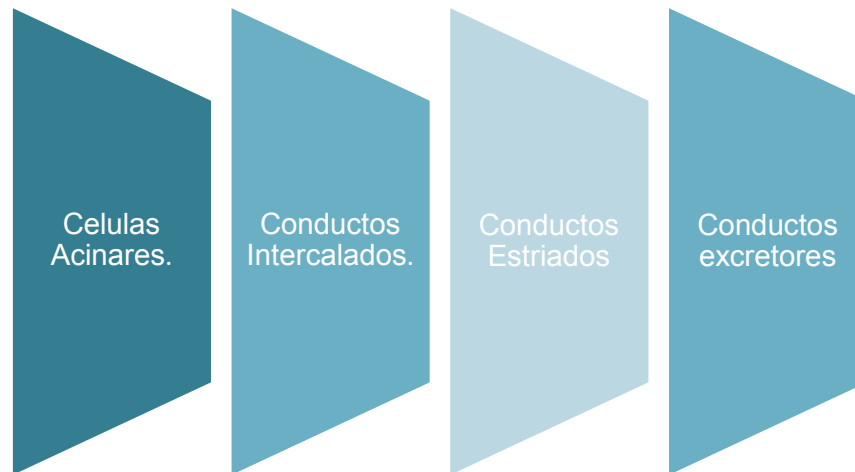
Las glándulas salivales se dividen en dos grupos: glándulas salivales mayores (parótida, submandibular y sublingual) y las glándulas salivales menores (que están localizadas en la mucosa en la superficie del epitelio bucal). La unidad básica de las glándulas salivales está formada por acinos, conductos intercalares, conductos estriados y el conducto excretor. Los acinos son sacos formados por células serosas y mucosas que segregan en gran cantidad, enzimas y mucina respectivamente.(1)

Las células acinares, tanto las serosas como las mucosas, almacenan las secreciones proteicas en sus gránulos que son modificados por el aparato de Golgi, siendo finalmente excretados por exocitosis. Los conductos intercalares están revestidos por pequeñas células cuboides cuya función no está clara. Los conductos estriados están revestidos de células columnares que modifican la composición de la saliva. Los conductos excretores, también están revestidos de células columnares que sintetizan varias proteínas como la ribonucleasa, el EGF (factor de crecimiento epidérmico), la alfa-amilasa y varias proteasas. En la **Figura 1** se puede observar los componentes de las glándulas salivales, así como sus elementos histológicos. (1)



**Fig. 1.-** Porción terminal de una glándula salival y su conducto excretor. B= Corte transversal de un acino seroso. C= Corte transversal de un acino mucoso. D= Corte transversal de un conducto transversal. E= Corte transversal de un conducto estriado.

Teniendo en cuenta la histología de las glándulas salivales, se puede resumir los principales elementos que la conforman de la siguiente manera.



La saliva es una mezcla de las secreciones de diferentes tipos de glándulas. Es un líquido viscoso, incoloro, opalescente que contiene agua, mucoproteína, inmunoglobulinas y algunos componentes inorgánicos, entre los que se encuentran el calcio, sodio, potasio y trazas de hierro. Entre sus constituyentes proteicos se encuentran enzimas como la amilasa (ptialina) que escinde el almidón en hidratos de carbono más pequeños e hidrosolubles. También en dicho biofluido se encuentran los corpúsculos salivales que son granulocitos y linfocitos en degeneración que se han originado en las amígdalas y en los nódulos linfoides en la parte posterior de la lengua. (1)

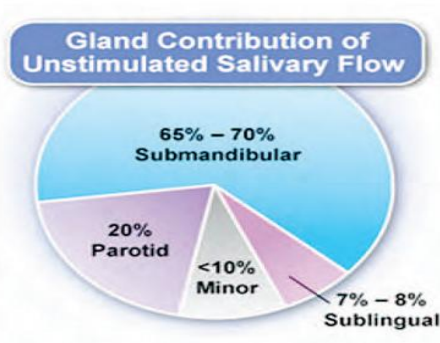
La saliva total es el resultado de fluidos bucales incluyendo la secreción de las glándulas salivales mayores y menores, abarcando también sustancias no salivales como fluido crevicular gingival, expectoraciones bronquiales y secreciones nasales, así como derivados de suero y sangre provenientes de heridas orales, bacterias y productos bacterianos, virus y hongos, células epiteliales descamadas y otros componentes como restos alimenticios. (1)

Esta misma ofrece numerosas funciones entre las que se destacan lubricación, función antimicrobiana, interviene en factores de crecimiento, ayuda a la integridad de la mucosa, así como su lavado y limpieza de la misma, capacidad amortiguadora, pero también participa en la preparación de alimentos, su digestión, sabor y ayuda en el habla.(2)

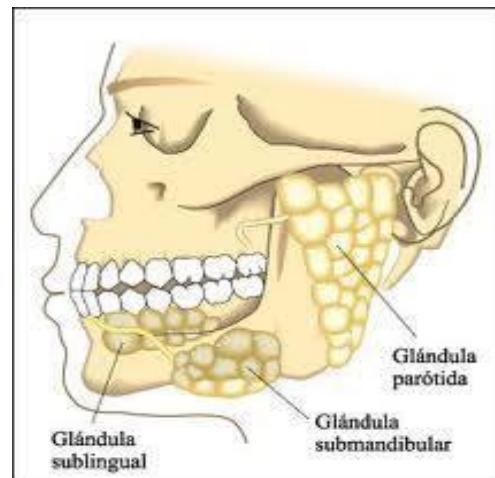
## 2.2 Bioquímica de la saliva.

La saliva es un fluido corporal que se compone principalmente por agua (99%) y el resto lo constituyen electrolitos, ácidos nucleicos, lípidos y células de desecho.(3)

Regularmente, el rango de producción de saliva es de 0.5 a 1 litro diario. Alrededor del 90% de toda saliva es producida por las tres glándulas salivales mayores: las parótidas, submandibulares y sublinguales. El otro 10% es secretado por glándulas salivales menores distribuidas en labios, mejillas y en otras zonas, como lo son el paladar, lengua y parte interna de los labios. Las glándulas salivales mayores, como la parótida, producen saliva de tipo serosa. Es una secreción fina y acuosa, rica en **amilasa salival**, y su volumen es menos de la mitad del volumen total secretado mientras que en las glándulas menores su secreción es más rica en **mucina**. (3)



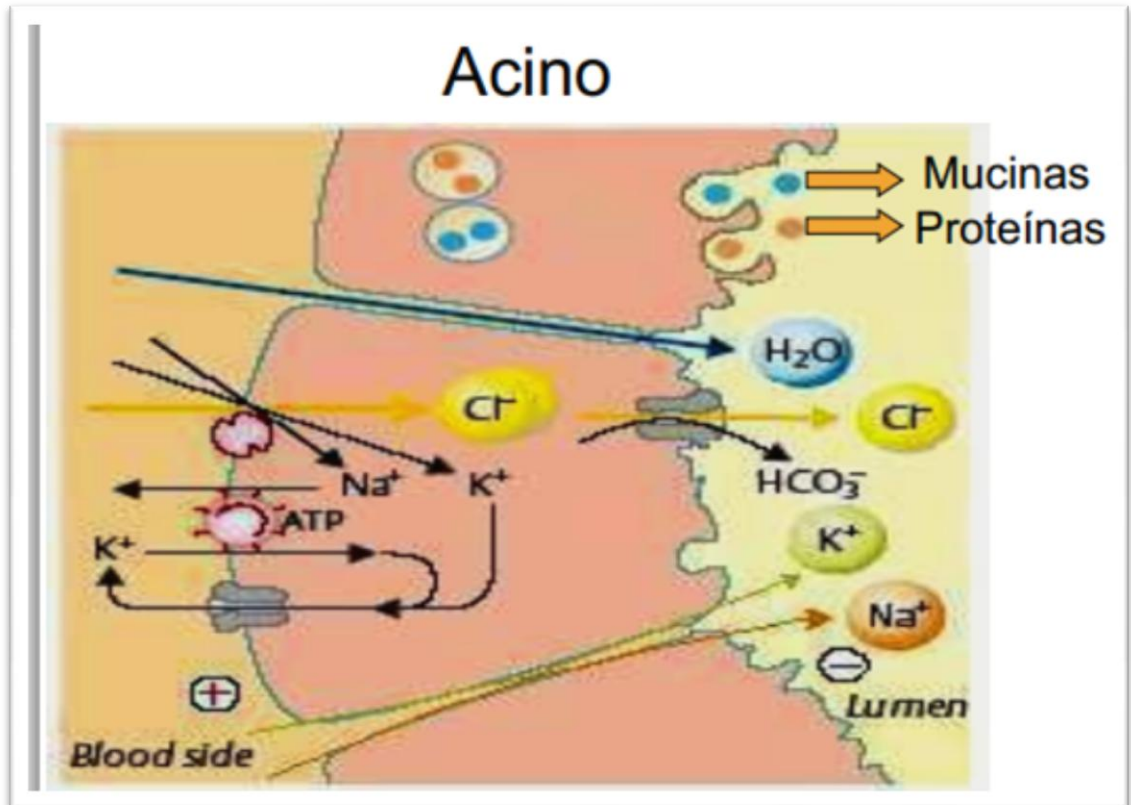
*Figura 2.- Distribución del volumen total aportado a la saliva excretada por las diferentes glándulas salivales.*



*Figura 3. Distribución anatómica de las glándulas salivales.*

### Formación de saliva primaria.

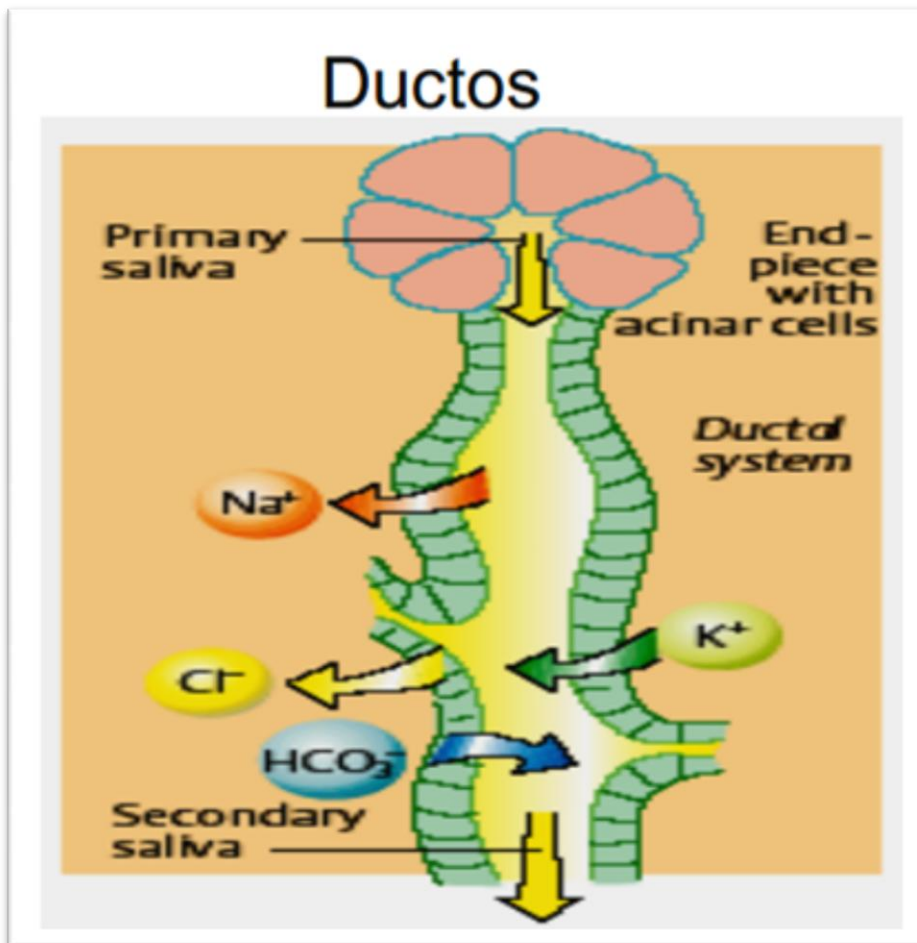
Los acinos producen la saliva primaria que tiene composición iónica ( $\text{Na}^+$  ,  $\text{Cl}^-$  ,  $\text{HCO}_3^-$  ,  $\text{K}^+$  ) igual a la del plasma (isotónica); y diversas proteínas.(20)



**Figura 4- Esquematización de la formación de saliva isotónica** 1.- Hay un transporte transcelular de cloro desde el lado basal de la célula acinar por transporte activo secundario de  $\text{Na}^+$ . 2 $\text{Cl}^-$  y  $\text{K}^+$ , el Cloro sale por el borde luminal por canales de cloro.2. La salida de cloro causa un potencial negativo en la luz por lo que el sodio sale siguiendo al cloro por difusión paracelular.3. El agua sigue al sodio y cloro por ósmosis.4. En el lado basal hay receptores de acetilcolina, sustancia P alfa noradrenérgicos que aumentan el calcio intracelular que va a abrir canales de cloro en el lado luminal y va a estimular la exocitosis a la luz de las vesículas que contiene proteínas.

### Formación de la saliva secundaria o ductal.

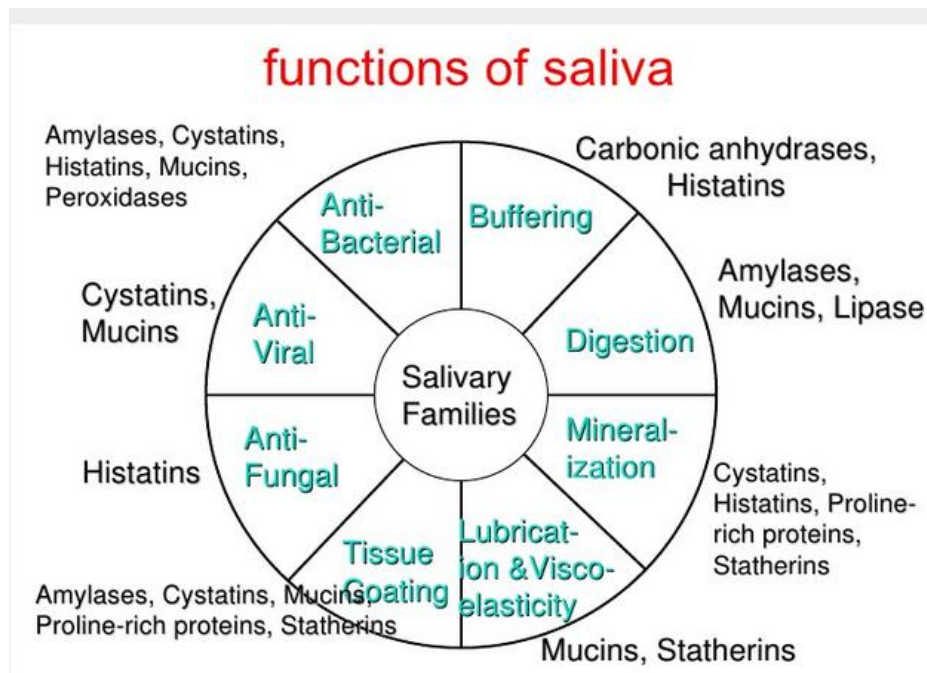
La saliva al dejar el acino y pasar a los ductos sufre modificaciones, se reabsorbe sodio y cloro y se secreta bicarbonato y potasio. Cuando la reabsorción de sodio y cloro es mayor que la secreción de potasio y bicarbonato, la saliva se vuelve hipoosmolar ya que aquí el agua no sigue al sodio y cloro pues el epitelio ductal es relativamente impermeable al agua. La aldosterona igual que en intestino y riñón favorece la reabsorción de sodio y secreción de potasio. Esto ocurre en reposo pero cuando hay gran actividad aumenta mucho la secreción de saliva primaria no hay tiempo de reabsorción importante de sodio y cloro y por tanto la saliva ductal está cerca de la isotonicidad.(20).



**Figura 5- Esquemización de la formación de saliva ductal en donde la saliva primaria es modificada por reabsorción de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  y secreción de  $\text{K}^+$  y  $\text{HCO}_3^-$ , dando la saliva secundaria, los ductos son impermeables al agua y al haber reabsorción neta de iones, la saliva secundaria resulta hipotónica.**

## Funciones y propiedades de la saliva.

La saliva cumple principalmente un papel lubricante de los tejidos orales, favoreciendo las funciones de: hablar, comer y tragar. También protege los dientes y las superficies de la mucosa oral. La función lubricante y antimicrobiana es mantenida por la saliva en reposo. La estimulación de la saliva genera un efecto de evacuación y limpieza de los residuos orales y de agentes nocivos. Hoy se han descubierto otras funciones, mediadas por los componentes orgánicos e inorgánicos de la saliva, que se relaciona principalmente con su efecto de control de la caries dental, como lo son la presencia de calcio, fosfatos y flúor. (3)



**Figura 6:** Principales grupos de proteínas presentes en saliva e involucradas en la homeostasis de la cavidad bucal, así como su función principal de cada una de las mismas.

**Composición.**

Al momento se han caracterizado más de 1,166 proteínas. Las principales son:

**Proteínas y Enzimas Secretoras.**

Mucina.  
Amilasa Salival (ptialina)  
Lipasa Lingual.  
Proteínas ricas en prolina  
Histatina.  
Cistatina.  
Peroxidasa.  
Lactoferrina.  
IgA  
Lisozimas (Muramidasa).

**Electrolitos.**

Na<sup>+</sup> (Sodio)  
K<sup>+</sup> (Potasio)  
Cl<sup>-</sup> (Cloro)  
HCO<sub>3</sub>. (Bicarbonato)  
Ca<sup>2+</sup> (Calcio)  
Mg<sup>2+</sup> (Magnesio)  
HPO<sub>4</sub><sup>-</sup> (Fosfato mono ácido)  
F<sup>-</sup> (Flúor)

**Componentes Celulares**

Leucocitos



**Mucinas.**

- Sustancia glicoproteica
- Componente principal del moco
- Compuestas por mucoproteínas, mucopolisacáridos y ácido mucoitisulfúrico.(3)
- Codificación de mucinas en el gen MUC ubicado en el cromosoma 11(4)

Se pueden distinguir:

- las sialomucinas, que son particularmente ricos en ácido siálico.
- las fucomucinas, que contienen altas cantidades de fucosa.
- Función: lubricar los tejidos y formar una barrera protectora frente a los agentes químicos.(3)

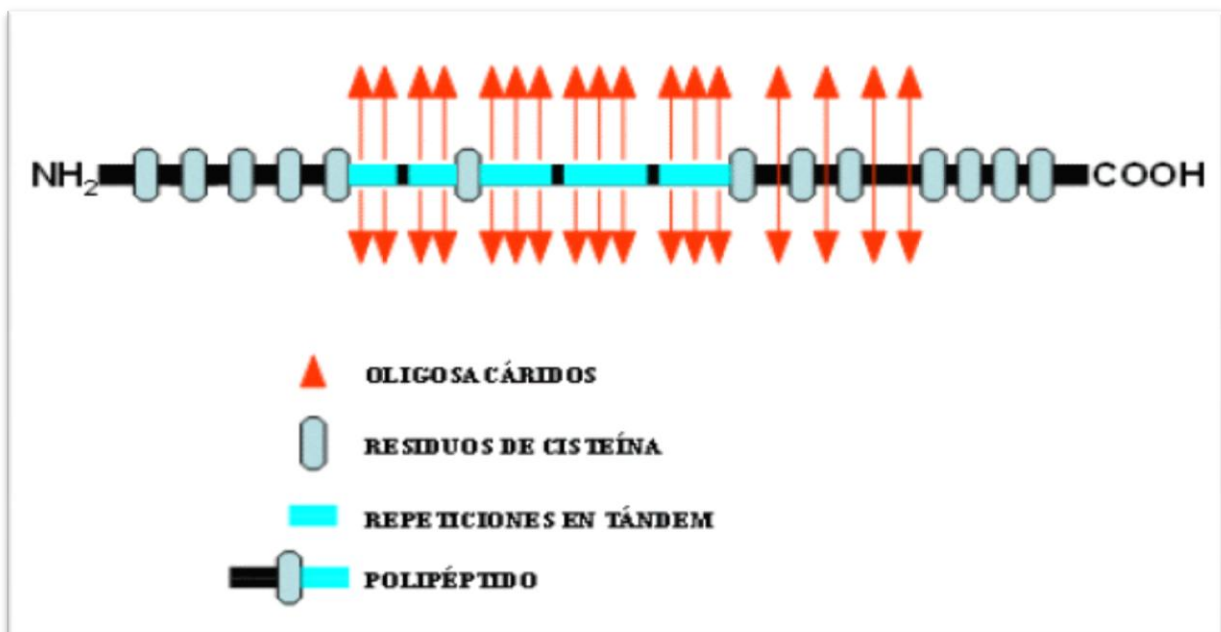
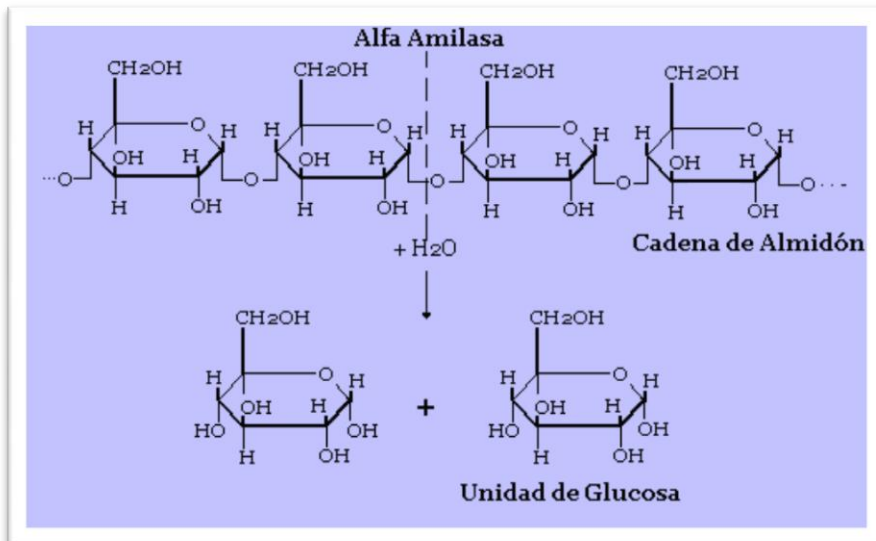


Figura 7.- Estructura bioquímica de la proteína mucina.

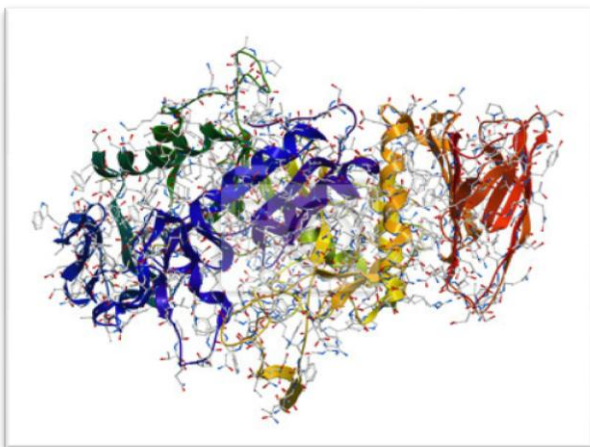


## Alfa – Amilasa

- Pertenece a la familia de las enzimas hidrolasas.
- Cataliza la degradación de los enlaces complejos.
- Producida por las glándulas parótidas y el páncreas.
- La amilasa salival (ptialina) participa en la primera fase del proceso digestivo.
- Trabaja a un pH de 6.8 por lo tanto su acción termina en el estómago.
- Hidroliza durante 30-50 minutos el 40% del total de carbohidratos.(3)
- Codificada por los genes AMY1A, AMY1B y AMY1C, localizados en el cromosoma 1 p21.(5)



**Figura 8:** Esquematización bioquímica de un fragmento de almidón con unidades repetidas de glucosa, donde se observa el sitio de corte de la alfa amilasa para dar como productos dos monosacáridos. de la proteína mucina.



**Figura 9.-** Estructura bioquímica tridimensional de la alfa-amilasa.

### Lipasa Lingual.

- Involucrada en la primera fase de la digestión.
- Secretada por las glándulas de Von Ebner de la lengua.
- Hidroliza cadenas medianas y largas de triglicéridos.(3)
- Su activación requiere fosfolípidos y ApoC-II(6)
- Codificada en el gen LIPA, ubicado en el cromosoma 10q23.2-q23.3



Figura 10: Estructura bioquímica tridimensional de la lipasa.

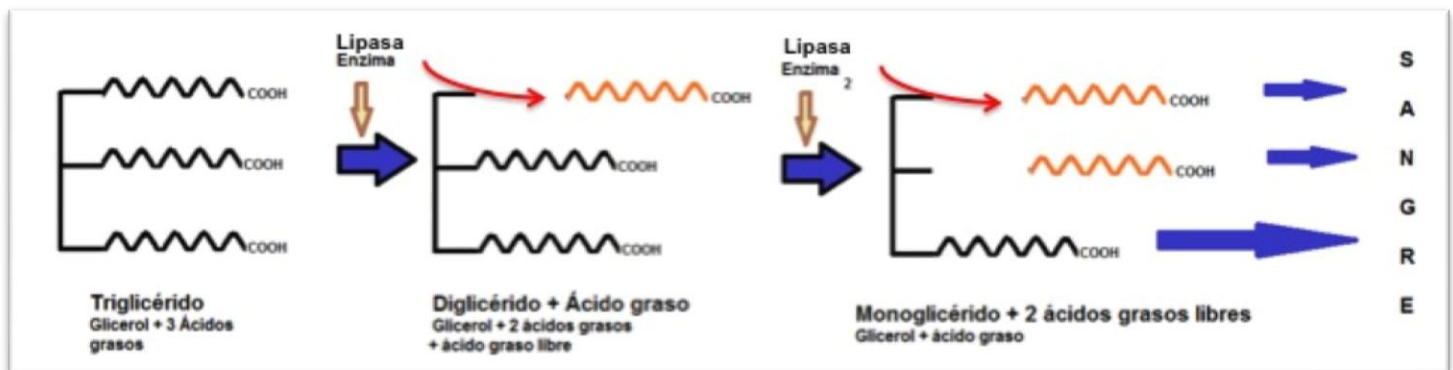
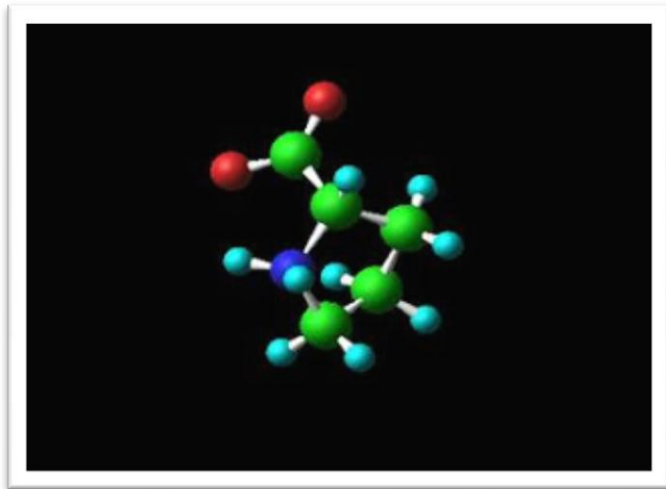


Figura 11: Sitio de acción de la enzima lipasa.

**Proteína rica en prolina (PRPs).**

- Proteínas constitutivas con un porcentaje relativamente alto del aminoácido prolina.
- Se encuentran entre los primeros constituyentes de la película de proteínas salivales, pueden ser ácidas o básicas.
- Constituyen de 25-30% de todas las proteínas de la saliva
- Inhibidora de cristales de fosfato de calcio.
- Sus grupos ácidos se cargan negativamente a pH fisiológico y unen iones  $\text{Ca}^{2+}$  libres lo que promueve la re mineralización del tejido dentario. (3)



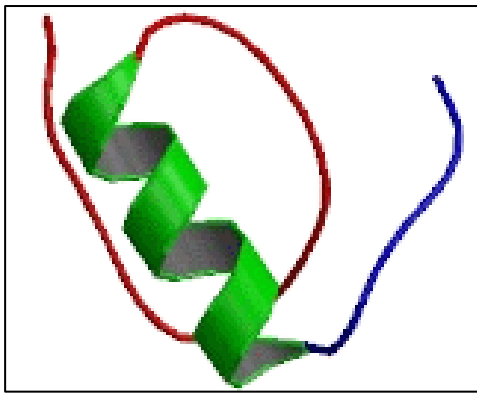
**Figura 12.- Estructura bioquímica tridimensional de la Prolina.**



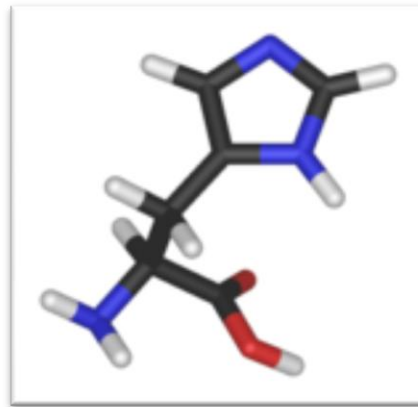
**Figura 13.- Estructura bioquímica de la Prolina.**

## Histatina.

- Proveniente de la familia de las proteínas ricas en histadina.
- Potente inhibidor de *candida albicans*.
- Se han identificado al menos 12 histatinas diferentes en la saliva, la mayoría de las cuales se originan por la degradación de dos moléculas originarias: la histatina 1 y la histatina.
- La histatina 5 deriva de la 3 y participa en la formación de la película adquirida, la neutralización de sustancias potencialmente nocivas, la quelación de iones metálicos, la inhibición de la inducción de citocinas inflamatorias y la inhibición de enzimas proteolíticas del hospedero y bacterianas(3).
- Codificada en el gen HTN1 localizado en el cromosoma 4q13



**Figura 14.- Estructura tridimensional bioquímica de Histatina**



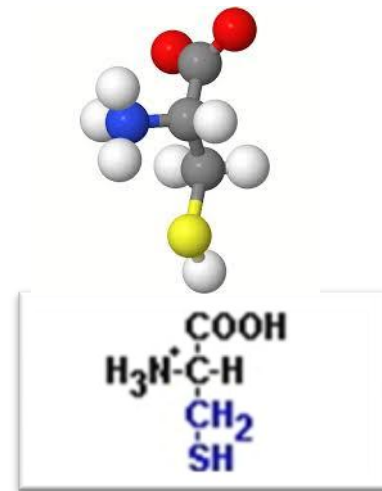
**Figura 15.- Estructura bioquímica del aminoácido histidina principal componente de la Histatina.**

## Cistatina.

- Son parte de una familia de fosfoproteínas que contienen cisteína.
- En la saliva hay al menos 9 isoformas: SN (cistatina neutral), tres isoformas moderadamente aniónicas de cistatina SA (cistatina ácida), tres isoformas decistatina S (más aniónica), una isoforma de cistanina C (catiónica) y una cistatina D. Todas presentan un plegamiento típico con 5 hojas beta antiparalelas, que envuelven una hélice alfa de 5 vueltas.
- Participan en el control de la actividad de enzimas proteolíticas del tipo cisteinilproteinasas, ya sean liberadas por el hospedero o por las bacterias.(3)
- Codificada por un gen housekeeping en el cromosoma 20.(9)



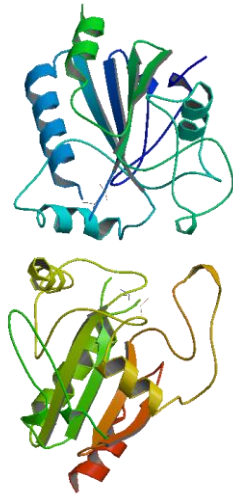
**Figura 16.- Estructura tridimensional bioquímica de la Cistatina.**



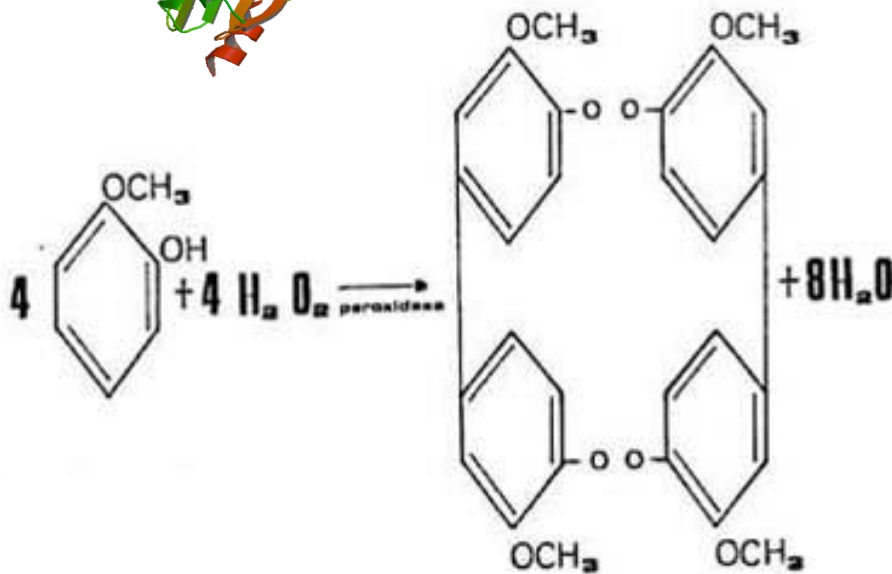
**Figura 17.- Estructura bioquímica del aminoácido cisteína componente de la proteína cistatina.**

**Peroxidasa:**

- Es una enzima que cataliza la formación de compuestos bactericidas como el hipotiocianato (OSCN-) y el ácido hipotiocianoso (HOSCN-), a partir del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el tiocianato (SCN-).
- Enzima del grupo oxidoreductasas, segregadas por los peroxisomas.
- Tiene función de detoxificación, protección y eliminación de moléculas radiactivas. (3).



**Figura 18.- Estructura tridimensional bioquímica de la Peroxidasa.**



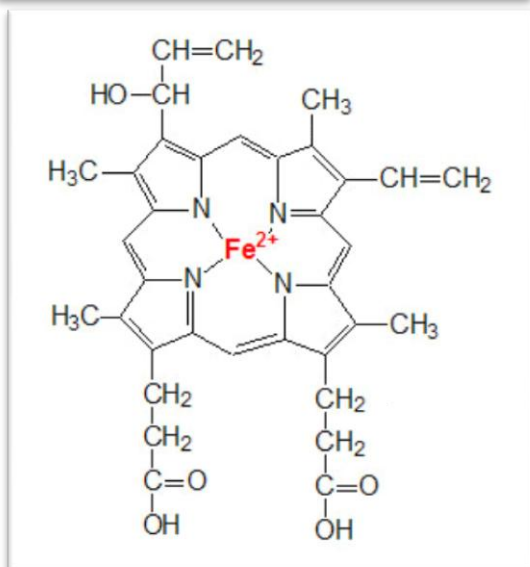
**Figura 19.- Actividad bioquímica de la Peroxidasa en donde se observa que la enzima cataliza la oxidación de ciertos compuestos dadores de hidrógeno, como fenoles (guayacol, pirogalol) y aminas aromáticas (o-fenilendiamina) por medio de peróxidos (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).**

**Lactoferrina:**

- La lactoferrina está distribuida en leche, calostro, saliva, lágrimas, bilis, secreciones vaginales, semen, fluido bronquial y en gránulos secundarios de neutrófilos.(10)
- Es una metaloproteína con la propiedad de unir al hierro perteneciente a la familia de las transferrinas.
- Proteína antimicrobiana, fungicida y bactericida.
- Evita que los microorganismos se reproduzcan y lisa la pared bacteriana.
- Función moduladora de la respuesta inflamatoria(.3)
- El NFκB( *nuclear factor κB*) está implicado en la regulación de la expresión de genes que codifican a la lactoferrina así como el factor de necrosis tumoral (*tumor necrosis factor* [TNF]) e IL-1.(10)



**Figura 20- Estructura bioquímica tridimensional de la Lactoferrina.**

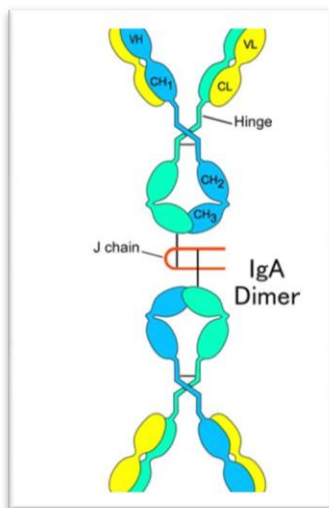


**Figura 21.- Estructura bioquímica de los anillos de hierro en las metaloproteínas.**

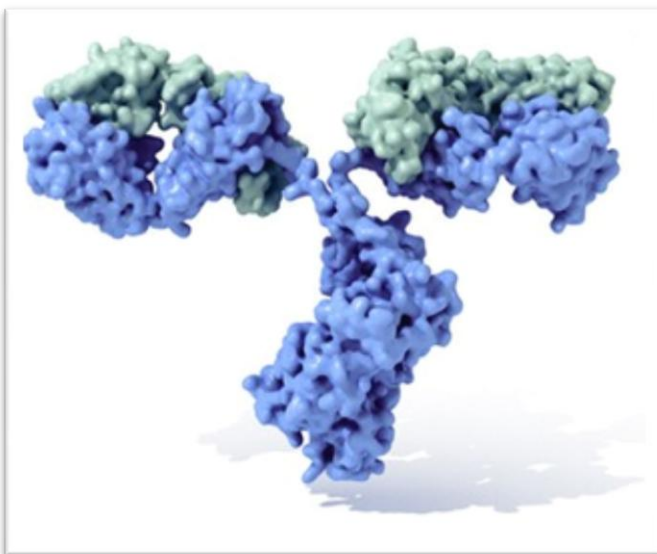


**IgA secretora:**

- Producida por células plasmáticas y glándulas salivales.
- Tiene forma dimérica.
- Previene de la adherencia a agentes externos.
- Pueden neutralizar varios factores de virulencia, limitar la adherencia y aglutinación de las bacterias y prevenir la penetración de agentes extraños a través de las mucosas. (3).
- Genes codificadores RAG1 y RAEG 2.(11)



**Figura 22.- Estructura bioquímica de la IgA**

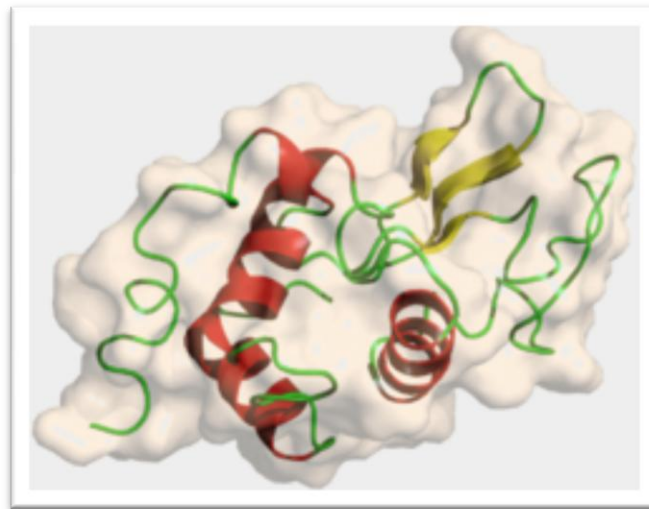


**Figura 23- Molécula de inmunoglobulina con su típica forma de Y. En azul se observan las cadenas pesadas con cuatro dominios Ig, mientras que en verde se muestran las cadenas ligeras. Entre el tallo (Fracción constante, Fc) y las ramas (Fab) existe una parte más delgada conocida como "región bisagra"**



**Lisozimas (Muramidasa).**

- Conocida también como muramidasa, descubierta por Alexander Fleming y primera proteína que se dispuso su secuencia mediante cristalografía de rayos X.
- Presente en células fagocitarias, glándulas mayores y menores y fluido crevicular gingival.
- Su acción antimicrobiana se asocia a que cataliza la hidrólisis de los polisacáridos de la pared celular bacteriana, causando inhibición de la adición bacteriana.
- Actividad bactericida no enzimática por activación de autolisinas bacterianas.(3,13)
- El gen *LYZ*, situado en el brazo largo del cromosoma 12 (12q15), va a ser el encargado de codificar a la lisozima.(12)



**Figura 24.- Estructura bioquímica tridimensional de la Lisozima (Muramidasa).**

**Electrolitos en saliva.**

<b>Electrolitos.</b>	<b>Función en saliva.</b>
<b>Na<sup>+</sup> (Sodio)</b>	Es el principal elemento regulador del balance o equilibrio ácido-básico metabólico en saliva y a la regulación del transporte activo a través de las membranas celulares.(14, 21)
<b>K<sup>+</sup> (Potasio)</b>	Coadyuvante en mantener el equilibrio ácido-base.(14)
<b>Cl<sup>-</sup> (Cloro)</b>	Estimula la producción de ácido clorhídrico, indispensable para la digestión de ciertos alimentos.(14)
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Bicarbonato)</b>	Su función principal es brindarle la capacidad amortiguadora o buffer a la saliva es decir, la habilidad de contrarrestar los cambios de pH salivales.(21)
<b>Ca<sup>2+</sup> (Calcio)</b>	Capacidad de tampón o buffer y mantienen la solubilidad baja en el esmalte.(14)
<b>Mg<sup>2+</sup> (Magnesio)</b>	Desempeña el intercambio de moléculas y electrolitos entre la célula y el plasma.(14)
<b>HPO<sub>4</sub><sup>-</sup> (Fosfato mono ácido)</b>	Contribuye al desarrollo de los cristales de hidroxiapatita en la fase de remineralización de los tejidos duros durante el proceso carioso.(21)
<b>F<sup>-</sup> (Flúor)</b>	Proporciona una barrera a la desmineralización y un equilibrio de la balanza hacia la remineralización gracias a los cristales de fluorapatita.(14)

## Porcentaje de Electrolitos en saliva en comparación con el plasma sanguíneo.

- 2–21 mmol/L sodio (más bajo en plasma)
- 10–36 mmol/L potasio (mayor en el plasma)
- 1.2–2.8 mmol/L calcio (similar en saliva y plasma)
- 0.08–0.5 mmol/L magnesio
- 5–40 mmol/L Cloruro (más bajo en plasma)
- 25 mmol/L bicarbonato (mayor en el plasma)
- 1.4–39 mmol/L fosfato.(3)

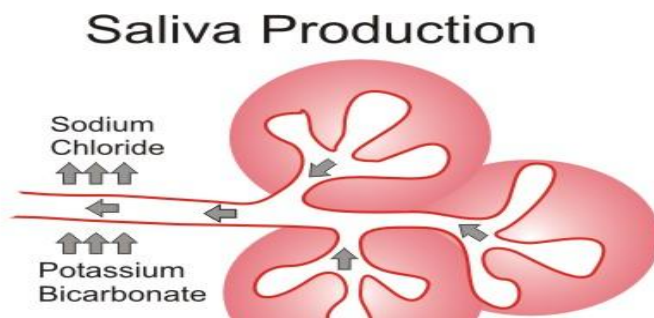


Figura 25.- Esquematización del trayecto de iones del flujo salival dentro de la glándula y su paso por el conducto interno.

## Componentes celulares.

### Leucocitos:

- Son células que preservan la integridad biológica; van de la sangre a la zona gingival en la cavidad bucal, para eliminar los microorganismos invasores.(3,7)

### 3.- BIOMARCADORES

#### 3.1 Definición de Biomarcador.

Un biomarcador es una característica que es medida y evaluada objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, patológicos o respuestas farmacéuticas a una intervención terapéutica. En su forma más precisa, el término debe hacer referencia a una sola especie molecular que está presente en las muestras de un sujeto con una determinada enfermedad o condición. (15)

Según el Consejo Nacional de Investigación de los Estados Unidos (National Research Council, NRC) a través del Comité de Marcadores Biológicos el término de “biomarcador” fue establecido formalmente en el año de 1987. Esta definición considera como biomarcador a un evento (de estado conocido) que puede usarse como guía para la evaluación de sistemas biológicos. Es decir, una característica de señalización, en muestras o sistemas biológicos que pueda ser medida y evaluada objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales o patogénicos. (15)



**Figura 26.- Características de biomarcadores moleculares en las áreas de salud, contaminación y biotecnología industrial**

Dentro de los biomarcadores se reconocen diversos tipos con base a la macromolécula tales como: genéticos, proteicos, enzimáticos; con base en el tipo de macromolécula evaluada y en la función que desarrolla en la fisiología de la célula. (15)

Aplicación	Nivel Biológico	Grado de Alteración	Función
Diagnóstico	Mortalidad	Exposición	Tóxicos y metabolitos
Progresión	Conductual	Efecto Adverso	Enzimáticos
patológica	Tisular	Respuesta a Estrés	Metabólicos
Terapéutico	Celular	Susceptibilidad	Reproductivos
Alteración	Subcelular	Otros	Endocrinos
ambiental	Molecular		Genéticos
Otros	Regulación		Epigenéticos
	Genética		Otros
	Otros		

**Tabla 1- Clasificación de los principales biomarcadores con base a sus características de aplicación, nivel de efecto biológico, grado de alteración y su función.**

### 3.2. Naturaleza bioquímica de biomarcadores.

Los diferentes tipos de biomarcadores de acuerdo a su macromolécula se pueden enlistar de la siguiente manera:(16)

<b><u>Categoría del Biomarcador (Origen Bioquímico)</u></b>	<b><u>Aplicaciones en diferentes diagnósticos.</u></b>
<b>ADN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Genotipo Estándar</li> <li>• Infecciones Bacterianas.</li> <li>• Diagnósticos de cáncer en cabeza y cuello.</li> </ul>
<b>ARN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Identificación viral y bacteriana.</li> <li>• Diagnósticos en cáncer bucal.</li> </ul>
<b>Mucinas/Glicoproteínas.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diagnósticos de cáncer en</li> </ul>

	<p>cabeza y cuello.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Susceptibilidad a caries.</li> <li>• Se han cuantificado alrededor de 1,166 proteínas de las cuales 914 provienen del fluido de la glándula parótida y 917 es una combinación las glándulas submandibular y sublingual.</li> </ul>
<b>Inmunoglobulinas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infecciones virales (virus VPH, Hepatitis B y C).</li> </ul>
<b>Metabolitos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Varias condiciones endocrinas de estrés.</li> <li>• Estado Psicológico.</li> <li>• Diagnósticos Periodontales.</li> <li>• Diagnósticos en quistes fibrosos.</li> </ul>
<b>Fármacos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Monitoreo de abuso de drogas y/o fármacos.</li> <li>• Monitoreo de pacientes en farmacoterapia.</li> </ul>
<b>Virus</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reactivación de virus de Epstein Barr (mononucleosis)</li> </ul>
<b>Bacterias</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diagnósticos en cáncer bucal.</li> <li>• Susceptibilidad a caries.</li> </ul>
<b>Material celular.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diagnósticos de cáncer en cabeza y cuello.</li> </ul>

**Tabla 2- Esquematización de las aplicaciones clínicas de los biomarcadores según su macromolécula.**

A continuación se muestra un esquema con ejemplos de pruebas de diagnóstico asociados a biomarcadores encontrados en otros biofluidos además de la sangre.(16).

<b>Tipo de Prueba</b>	<b>Biomarcadores</b>	<b>Indicación diagnóstica.</b>
<b>Líquido Amniótico.</b>	Acetil-Colinerasa Célula exfoliativas. Bilirrubina/ Factor RH.	Defectos en el tubo neural. Defectos cromosomales. Sensibilidad del factor RH.
<b>Líquido Cerebroespinal.</b>	Agentes infecciosos.  Encefalitis por Herpes simple.	Meningitis  Encefalitis
<b>Frotis Cervical.</b>	Papanicolau (citología). VPH  Clamidia (ADN)	Neoplasia intraepitelial cervical. Factores de Cáncer cervical. Infección por clamidia.
<b>Aspiración por aguja fina.</b>	Examen de citología.	Patologías celulares.
<b>Saliva.</b>	DNA viral/ Anticuerpos. DNA bacteriano/ Anticuerpos. Hormonas esteroideas. Fármacos.  Proteína cerbB-2	Varios patógenos virales. Infección por H. pylori. Susceptibilidad a caries. Función endocrina.  Monitoreo en el abuso de fármacos.  Cáncer de mama.
<b>Espuito.</b>	Eosinófilos. Marcadores bacterianos.  Células Exfoliativas epiteliales.	Asma Infecciones Bacterianas.  Factores de riesgo en cáncer de pulmón.

<b>Deposiciones.</b>	Cultivo de deposiciones. Enzimas pancreáticas. Mutaciones de ADN. FOBT (Prueba de sangre oculta en heces.)	Infecciones Gastrointestinales. Quistes Fibrosos.  Infecciones inflamatorias /  Factores de cáncer colorrectal.
<b>Lagrimas.</b>	Lisozimas.	Queratoconjuntivitis.
<b>Orina.</b>	Glucosa. Fármacos.  Metabolitos.  Albumina. Bacterias  Células Exfoliativas.	Diabetes Monitoreo en el abuso de fármacos Parámetros de metabolitos. Deficiencia renal. Infecciones en tracto urinario. Cáncer de vejiga.

**Tabla 3.- Esquematización de las diferentes pruebas de diagnóstico utilizando biomarcadores específicos.**

### **3.3 Biomarcadores caracterizados para saliva como medio de diagnóstico.**

Existe la evidencia que sugiere la existencia de biomarcadores salivales derivados de fuentes sistémicas. Estudios recientes demuestran que existe un cambio en la expresión genética a nivel transcripcional de los tejidos salivales y saliva en tumores distantes de la cavidad oral a diferencia de lesiones neoplasias malignas de origen específico (cavidad bucal). (15)



En los últimos años se ha propuesto que los exosomas (moléculas de 30-100nm de diámetro con origen endocítico) son probablemente los transportadores hacia la saliva de biomarcadores sistémicos o que quizá son los transportadores de efectos sobre la maquinaria transcripcional de las glándulas salivales, pues estudios han mostrado como estas moléculas pueden ser liberados por una célula y captados por otra e influir en las firmas moleculares de la célula receptora. Éstas en su interior contienen proteínas, ARN y ADN y se han identificado en la mayoría de los biofluidos incluidos en la saliva. (17)

#### **Biomarcadores caracterizados en el diagnóstico mediante la saliva.(18)**

<b>Biomarcador</b>	<b>Descubridor /Año.</b>
<b>8-Oxoguanina ADN Glicosilada</b>	Shpitzer, 2009
<b>Ácido hidroxieicosatetraenoico</b>	Metzger, 1995
<b>Carbonilos</b>	Shpitzer, 2009
<b>Ciclina D1</b>	Shpitzer, 2009
<b>Cistatina truncada SA-I</b>	Shintani, 2010
<b>Cyfra 21-1</b>	Zhong, 2007
<b>DUSP1</b>	Brinkmann, 2012
<b>Endotelina-1</b>	Cheng, 2011
<b>Fosfato sérico</b>	Shpitzer, 2009
<b>Galectinas 1, 3 y 7</b>	Alves, 2011
<b>Maspin</b>	Shpitzer, 2009
<b>Interleucina 1-beta</b>	Brinkmann, 2012 Elashoff, 2012
<b>Interleucina 8</b>	Brinkmann, 2012 Elashoff, 2012

<b>Ki67</b>	Shpitzer, 2009
<b>Lactato deshidrogenasa</b>	Shpitzer, 2009
<b>M2BP</b>	Brinkmann, 2012 Elashoff, 2012
<b>Metaloproteinasas 2 y 9</b>	Shpitzer, 2007, 2009
<b>p53</b>	Liao, 2000
<b>S100P</b>	Dowling, 2008
<b>SAT1</b>	Brinkmann, 2012 Elashoff, 2012
<b>Telomerasa</b>	Zhong, 2005
<b>Transferrina</b>	Jou, 2010

**Tabla 4.- Esquematización de los principales biomarcadores específicos en saliva.**

## **4.- SALIVA COMO MEDIO DE DIAGNÓSTICO**

### **4.1 Introducción:**

Desde hace 40 años el fluido salival es considerado como un elemento auxiliar importante en el diagnóstico y el tratamiento preventivo de las enfermedades de la cavidad oral, enfermedades sistémicas, tumorales, endocrinas, etc., debido a que se han detectado en su composición, mediante los test genéticos, moléculas orgánicas de naturaleza proteica principalmente antígenos específicos, fracciones proteicas, proteínas conjugadas, receptores celulares, glucoproteínas (trobospondina TSP1), citocinas (interleucinas y derivadas), quimoquinas.

El interés en la saliva como un medio de diagnóstico se ha incrementado considerablemente durante la última década. La saliva, como otros fluidos orales, ha demostrado ser un reflejo completo de los estados normales o de enfermedad del organismo incluyendo niveles de moléculas propias en tejidos, estado hormonal, inmunológico, neurológico, nutricional, concentraciones de moléculas del metabolismo y de sustancias introducidas en el organismo con fines terapéuticos o sustancias de abuso.

Entre las ventajas del empleo de saliva en comparación con otras muestras biológicas podemos mencionar que: la toma de ésta es fácil y no invasiva, los materiales que se requieren para su recolección tienen costo accesible y en general no son materiales muy complejos para su uso, no se requiere de personal altamente capacitado y el transporte y almacenaje son sencillos. Sin embargo, una de las mayores desventajas que tiene el empleo de saliva es la detección cuantitativa de los analitos (pruebas de laboratorio) de interés, ya que generalmente se encuentran presentes en concentraciones menores que en otros líquidos biológicos como suero.

Por fortuna, el desarrollo de nuevas tecnologías con alta sensibilidad permite realizar detecciones y cuantificaciones del analito de interés aún en concentraciones bajas como las encontradas en saliva, por lo que la muestra biológica no es, hoy en día, una limitación. Actualmente el diagnóstico mediante saliva depende fuertemente de la disponibilidad de procedimientos y tecnología innovadora de alta calidad que proporcionen soluciones prácticas para medir diversos y numerosos analitos en concentraciones fisiológicas dentro de una muestra biológica compleja.

#### 4.1.1 Aplicación de la saliva como medio diagnóstico.

La saliva se puede utilizar en gran diversidad de patologías, entre las cuales las principales se enlistan en la siguiente tabla. (16)

<b>Tipo de Patología</b>	<b>Aplicación diagnóstica de la saliva.</b>
<b>Síndrome de Sjögren</b>	Aumento de la concentración de cloruro de sodio, IgA, IgG, lactoferrina, y mediadores inflamatorios tales como PGE <sub>2</sub> , TXB <sub>2</sub> , Interleucina-6.
<b>Fibrosis Quística.</b>	Incremento de niveles calcio y fosfato, urea y ácido úrico y niveles elevados de PGE <sub>2</sub> .
<b>Diabetes Mellitus</b>	Incremento de niveles de IgA, peroxidasa salival y contenido de glucosa.
<b>Enfermedades de la mucosa oral</b>	Incremento del nivel de óxido nítrico.
<b>Diversos tipos de cáncer</b>	Presencia del biomarcador p53 en cáncer oral de células escamosas y calicreina en el nivel de malignidad de estos tumores, proteína CA 15-3 en diagnósticos presuntivos de cáncer de mama.
<b>Insuficiencia Renal</b>	Hiposalivación y mucosa oral pálida.
<b>Epilepsia</b>	Deficiencia de IgA e hipertrofia gingival.
<b>Infecciones virales (Hepatitis Ay B)</b>	Presencia de anticuerpos de IgM en saliva.
<b>VIH-SIDA</b>	Niveles de IgA en saliva.
<b>Infecciones bacterianas</b>	Presencia de microorganismos y bacterias localizadas en saliva.
<b>Esclerosis Múltiple</b>	Reducción de niveles de IgA
<b>Patologías Cardiovasculares.</b>	Biomarcadores presentes como: proteína C reactiva (CRP), mioglobulina (MYO), banda de creatinina quinasa miocordial (CKMB), proteína (cTp) y mioperoxidasa.
<b>Hipertensión Arterial.</b>	Incrementos de niveles de lisosimas en saliva.
<b>Caries.</b>	Incremento de <i>lactobacillus</i> y <i>streptococcusmutans</i> en saliva.
<b>Enfermedades periodontales.</b>	Incremento en el nivel de aminotransferasa (AST) y fosfatasa alcalina (ALP).

**Tabla 5.- Principales aplicaciones de la saliva como medio diagnóstico en distintas patologías.**

## **4.2 Técnicas asociadas a la utilización de saliva como medio de diagnóstico.**

### **4.2.1. ELISA. (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas).**

El nombre ELISA ( Enzyme Linked Inmuno Sobernt Assai) fue atribuido por los investigadores suecos Eva Engvall y Peter Pearlmann y por los científicos holandeses Bauke Klaas Van Weemen y Antonius Schruus en 1971. Es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como cambio de color o algún otro tipo; en ocasiones, con el fin de reducir los costos del ensayo, nos encontramos con que existe un anticuerpo primario que reconoce al antígeno y que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario que lleva enlazado la enzima anteriormente mencionada. La aparición de colorantes permite medir indirectamente mediante espectrofotometría el antígeno en la muestra. (24)

Dentro de las principales ventajas se encuentra la poca cantidad de suero utilizado, las pruebas son más estables y tiene mayor periodo de validez, mayor pureza, estabilidad y cantidad del antígeno, es versátil ya que consigue el uso de una fase solida, así mismo se pueden detectar sustancias en el orden de los nanogramos y picogramos por mililitro y finalmente que es un método automatizado. (24)

### **Métodos de ELISA.**

Los diferentes **tipos de ELISA** son:

- **ELISA directo:** Es la forma más básica de realizar la técnica. Consiste en recoger una muestra a estudiar (antígeno) y ponerla en un pocillo (un recipiente pequeño) en frente de una muestra igual (antígeno) y con el anticuerpo, y otra muestra en la que se sabe que no hay antígeno.

Se aplica el anticuerpo con la enzima en los tres pozos y se compara la muestra de estudio con las otras dos, que llamamos controles. (24)

- **ELISA indirecto:** Se realiza de forma similar al ELISA directo, pero en este caso se añade primero un anticuerpo sin enzima y después uno con enzima. De esa forma, la señal que emite el enzima es mucho más potente y la prueba es más sensible.(24)
- **ELISA *sándwich*:** En este caso en los pocillos primero se añade un anticuerpo y después la muestra, para que los antígenos queden ya retenidos en el fondo del pozo. Después se añade el anticuerpo con la enzima. Es la forma más eficaz de realizar la prueba.(24)
- **ELISPOT:** Es un tipo de ELISA que permite conocer de forma cuantitativa el antígeno, incluso identifica el número concreto de células donde se encuentra.(24)

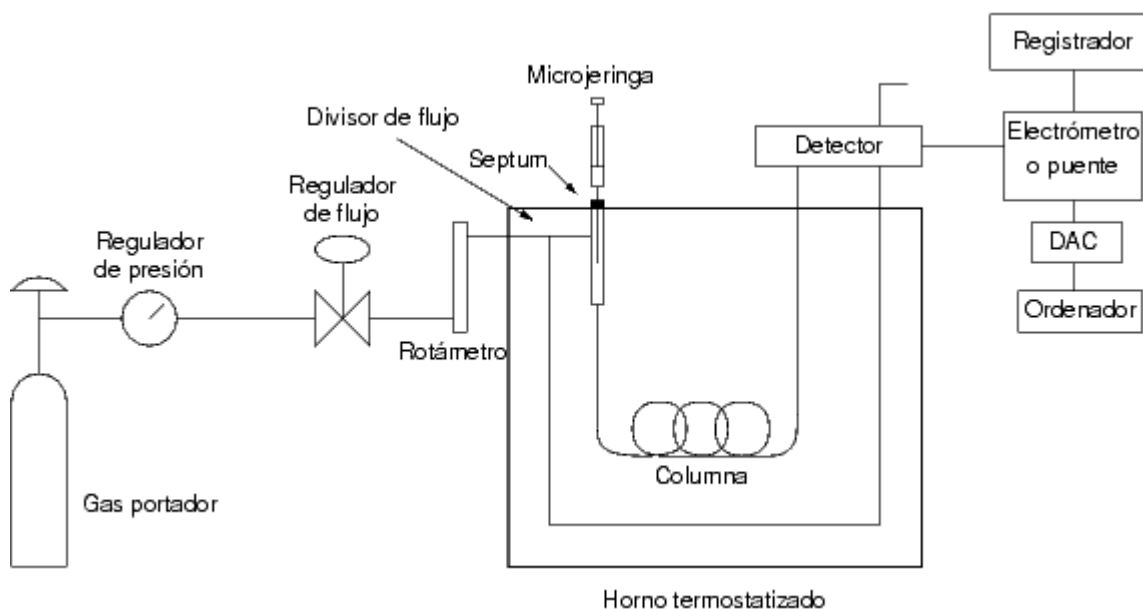
### Utilización de ELISA.

Se recomienda realizar un ELISA en todas las situaciones en las que se quieran detectar antígenos cuya existencia pueda ser determinante para un diagnóstico o para establecer conclusiones en un estudio científico. Algunas de las situaciones más frecuentes donde se usa el ELISA son:

- Diagnóstico de VIH.
- Detección de anticuerpos contra microorganismos.
- Diagnóstico de hepatitis B.
- Detección de microorganismos en heces.
- Detección de antígenos en orina.
- Detección y/o confirmación de neoplasias mediante un antígeno.(24)

#### 4.2.2 Cromatografía de gases.

La muestra en un cromatógrafo de gases la muestra se vaporiza y se inyecta en la entrada de la columna, que esta consiste en varios módulos básicos ensamblados para: 1) proporcionar un gasto o flujo constante del gas transportador (fase móvil usando gas inerte como el Helio o no reactivo respecto de la muestra como el Di nitrógeno o Bi hidrogeno), 2) permitir la introducción de vapores de la muestra en la corriente de gas que fluye, 3) contener la longitud apropiada de fase estacionaria, 4) mantener la columna a la temperatura apropiada (o la secuencia del programa de temperatura), 5) detectar los componentes de la muestra conforme eluyen de la columna, y 6) proveer una señal legible proporcional en magnitud a la cantidad de cada componente. Los módulos del instrumento se muestran esquemáticamente en la Figura 27. (25)

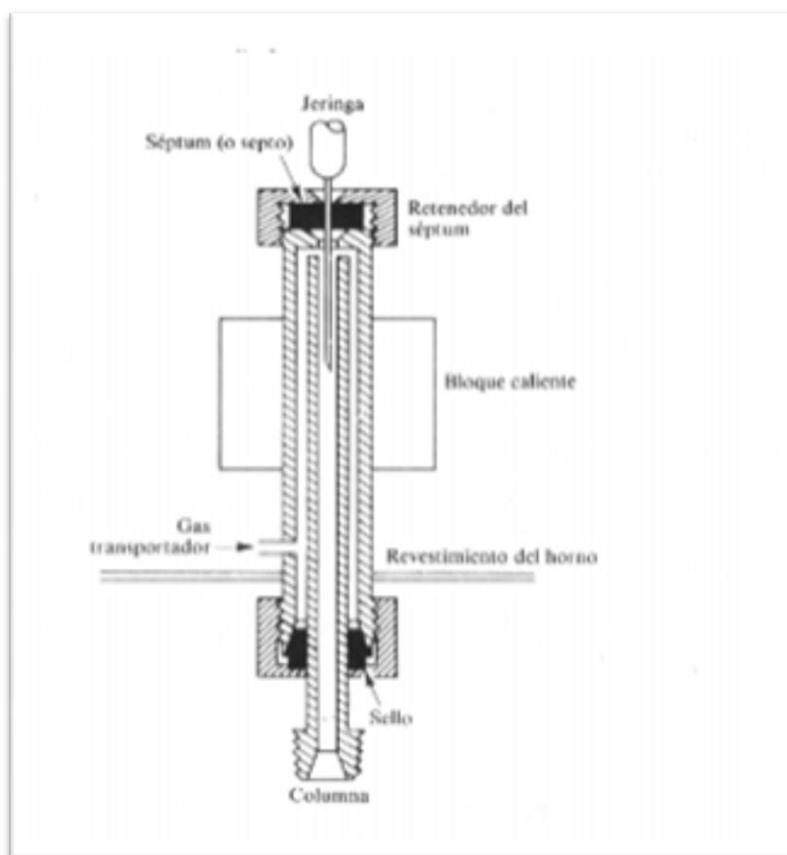


**Figura 27.- Esquemática de un cromatógrafo de gases.**



### Sistemas de inyección de muestra.

El modo estándar, adecuado para aproximadamente 95% de las aplicaciones de las columnas es la inyección directa. La muestra es inyectada con una jeringa hipodérmica a través de un séptum de goma (o hule) de silicona autosellante, a un alineador de vidrio (glassinsert) contenido en un bloque metálico, donde es vaporizada y es barrida hacia la columna (Figura 28). El bloque se calienta a una temperatura que se fija en un valor suficientemente alto para convertir prácticamente en forma instantánea la muestra líquida en vapor. La cantidad de muestra inyectada es del orden de  $\mu\text{L}$  para líquidos y algo superior para gases. (25)



**Figura 28.- Esquematación de un de un puerto de inyección por vaporización instantánea típico**

Para la detección de analitos y resultados los más comunes son los siguientes:

#### **Detector de ionización de llama (FID).**

En cromatografía de gases, el detector de ionización de llama (FID) es uno de los detectores más extensamente utilizado y, por lo general, uno de los más aplicables. En un quemador, el efluente de la columna se mezcla con hidrógeno y con aire para luego encenderse eléctricamente.(25)

#### **Detector de conductividad térmica (TCD)**

Uno de los primeros detectores que se utilizaron en cromatografía de gases, y uno de los que todavía tiene una gran aplicación, se basa en los cambios en la conductividad térmica de la corriente de gas ocasionados por la presencia de las moléculas de analito. Este dispositivo se denomina a veces un catetómetro.(25)

#### **Detector termoiónico de llama (FTD)**

El detector termoiónico (FTD) es un detector selectivo de los compuestos orgánicos que contienen fósforo y nitrógeno. Su respuesta a un átomo de fósforo es aproximadamente 10 veces mayor que a un átomo de nitrógeno, y de 10<sup>4</sup> a 10<sup>6</sup> veces superior que a un átomo de carbono. En comparación con el detector de ionización de llama, el detector termoiónico es unas 500 veces más sensible para los compuestos que contienen fósforo y unas 50 veces más sensible a las especies nitrogenadas.(25)

#### **Detector de emisión atómica (AED)**

El detector más reciente, y ya disponible en el comercio, para cromatografía de gases, se basa en la emisión atómica. En este dispositivo, el eluyente se introduce en un plasma de helio obtenido con microondas, que se acopla a un espectrómetro de emisión con series de diodos. El plasma es suficientemente energético como para atomizar todos los elementos de una muestra, excitarlos, y así obtener sus espectros de emisión característicos. (25)

### **4.2.3 SELDITOF**

SELDI-TOF- (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry) Espectrometría de Masas en Tiempo de Vuelo mediante Desorción-Ionización por Láser de Superficie, es una técnica proteómica que utiliza láser de superficie y espectrometría de masas para analizar mezclas complejas de proteínas (Figura 29). Es un método de detección de proteínas rápido, reproducible y fiable. Específicamente en el ámbito de la ingeniería genómica y medicina molecular se utiliza para medir niveles de proteínas en muestras de tejidos, biofluidos como sangre, saliva, orina y otras muestras de pacientes, una de sus aplicaciones es en el diagnóstico precoz del cáncer. (26)

En esta técnica la mezcla de proteínas se coloca sobre una superficie modificada capaz de unir la proteína a detectar. Esa capacidad puede tenerla la superficie en sí, que puede estar químicamente activada para obtener la adsorción necesaria o, en otros casos, para obtener uniones específicas pueden usarse como moléculas captadoras de ADN, anticuerpos u otras proteínas con capacidad de unir la proteína a detectar. El lavado libera las proteínas que se unen a la superficie de forma inespecífica. Se aplica un tratamiento con EAM (energy absorbing molecules) que hace posible la posterior acción de desadsorción y ionización del láser. Se analiza el "Tiempo de vuelo" en el que se mide el tiempo que cada proteína ionizada tarda en alcanzar el extremo del tubo. Este tiempo depende de la masa de la proteína. El espectrómetro de masas permite aproximar la masa de la proteína a detectar. La tecnología SELDI fue desarrollada por T. William Hutchens en el Baylor College of Medicine en 1993. La técnica de SELDI-TOF se usa para medir niveles de proteínas en muestras de tejidos, sangre, orina y otras muestras de pacientes. La diferencia de niveles de determinadas proteínas entre pacientes con una enfermedad dada frente a pacientes que no la padecen puede ser de gran utilidad como marcador diagnóstico. (26)

Así por ejemplo esta técnica se está usando para identificar proteínas implicadas en las etapas iniciales de la progresión tumoral buscando marcadores para diagnóstico precoz y detección de metástasis.(26)

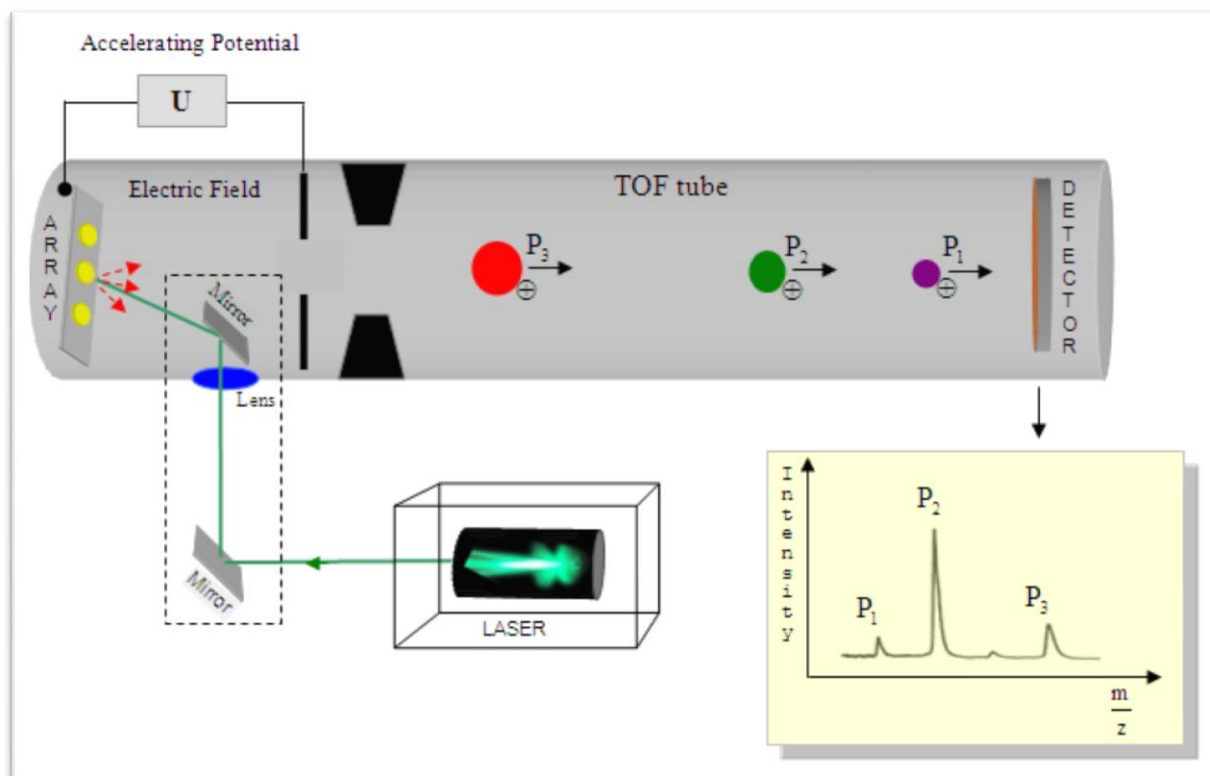
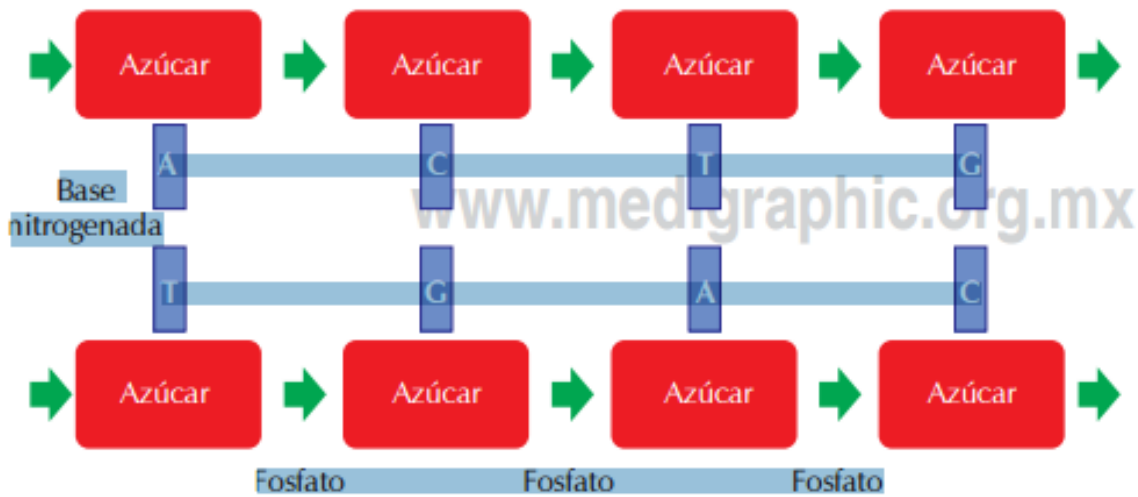


Figura 29.- Esquemización del mecanismo del SELDI TOF.

#### 4.2.4 PCR

La PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) es una técnica que permite replicar entre cientos de miles y millones de veces, en el transcurrir de pocas horas e *in vitro*, pequeñas cantidades de ADN. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. En la reacción, si se usa como sustrato ADN genómico, entonces típicamente se habla de una PCR, pero si se usa ADN complementario (ADNc) proveniente del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) se le conoce como RT-PCR (Reverse Transcription-PCR, por sus siglas en inglés). Esta conversión se logra mediante una reacción conocida como transcripción reversa y controlada por la enzima transcriptasa reversa, capaz de convertir el ARNm en una molécula de ADNc. Este método fue copiado de los retro virus que usan una transcriptasa reversa para convertir su genoma de ARN en ADN duplicándose en millones de partículas virales. El ADNc se utiliza cuando se analiza la expresión del ARNm de algún gen de interés. (27)

Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio ( $Mg^{+}$ ) una solución amortiguadora o buffer y agua (Figura 30). Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión. Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. (27).



**Figura 30.- Molécula de ADN de doble cadena. Cada cadena está formada por un azúcar, un grupo fosfato y una base nitrogenada que es complementaria con otra cadena: A = adenina, T = timina, C = citosina y G = guanina.**

Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco del gen de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa mediante electroforesis horizontal para confirmar si la reacción fue exitosa. (27).

**Etapas del método de la PCR.**

- **Desnaturalización.** En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T. Además, depende de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo al modelo del equipo. Al final de esta etapa se tiene las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente etapa.(27).
- **Hibridación.** En esta etapa, los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura melting ( $T_m$ ) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60 °C. Si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente.(27).
- **Extensión.** En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador (27).

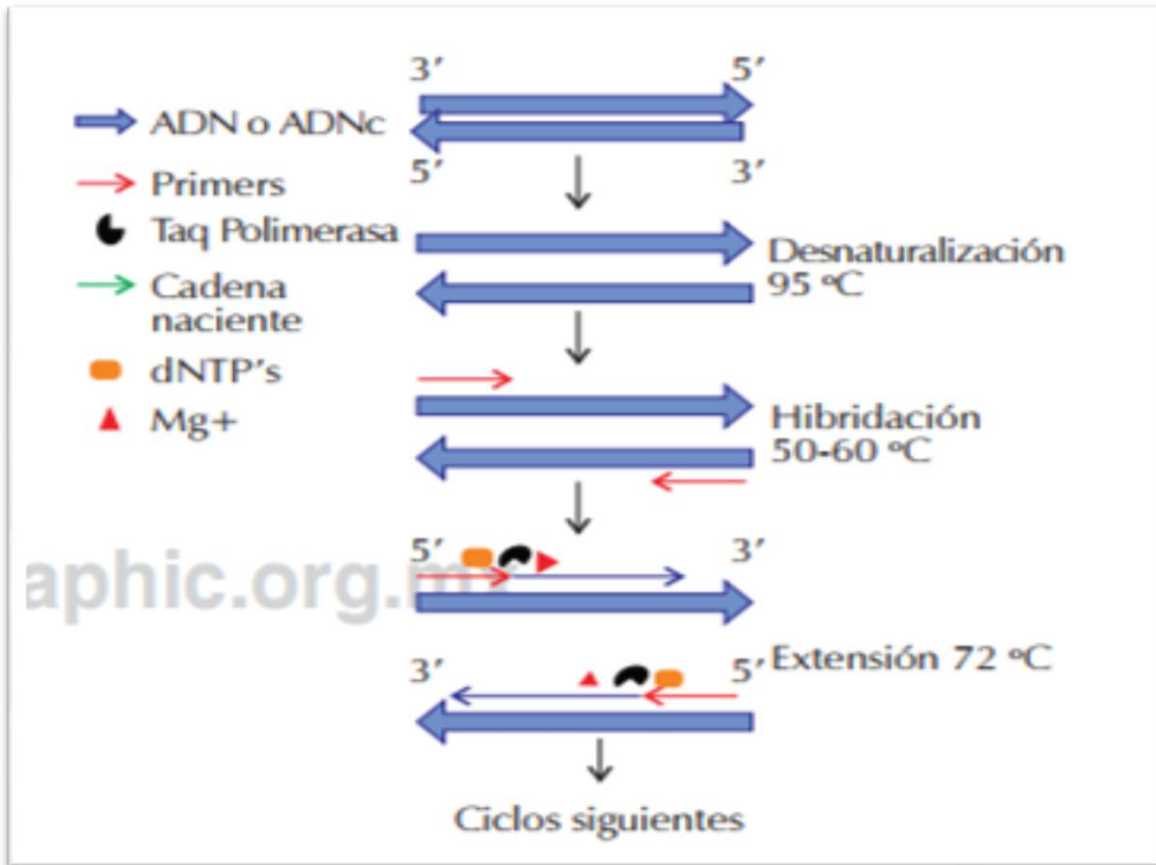


Figura 31.- Pasos de un ciclo de la PCR.

### Aplicaciones.

- Biotecnología y ciencias agropecuarias.
- Secuenciación de ADN.
- Estudios de evolución molecular.
- Diagnóstico de enfermedades hereditarias.
- Diagnóstico de enfermedades oncológicas.
- Diagnóstico prenatal.(27)



#### 4.2.5 Western Blot (electrotransferencia)

Es una técnica analítica, ampliamente utilizada, para el estudio de proteínas. Este método, permite la detección de una sola proteína dentro de una muestra biológica. La especificidad de esta técnica se logra mediante la utilización de un anticuerpo que reconoce y se une a un antígeno único de la proteína de interés. Con esta técnica se puede estimar el tamaño de una proteína, confirmar la presencia de modificaciones post traduccionales como la fosforilación, y ser utilizado para comparar cuantitativamente los niveles de proteína entre muestras.(25)

##### **Etapas del método del Western Blot.**

**1.- Preparación de la muestra:** Extracción de las proteínas de las muestras biológicas mediante disrupción (defecto morfológico interrupción externa mecánica, física o química). (Figura 32). (25)

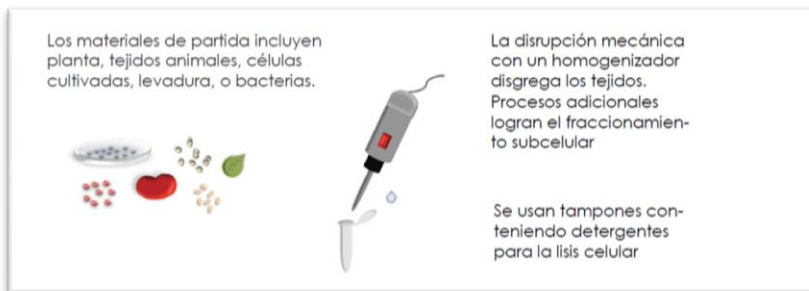
**2.- Electroforesis en gel de acrilamida:** Las proteínas en el extracto se separan de acuerdo a su tamaño mediante electroforesis. Se prepara un gel de acrilamida, bisacrilamida. El dodecilsulfato de sodio (SDS) añadido al gel se une a las proteínas y confiere, de forma proporcional a la masa de cada proteína, una carga negativa a cada una de ellas. (Figura 33). (25)

**3.-Transferencia electroforética a una membrana:** Las proteínas son transferidas electroforéticamente a un soporte rígido o membrana, dónde quedan inmovilizadas. (Figura 34). (25)

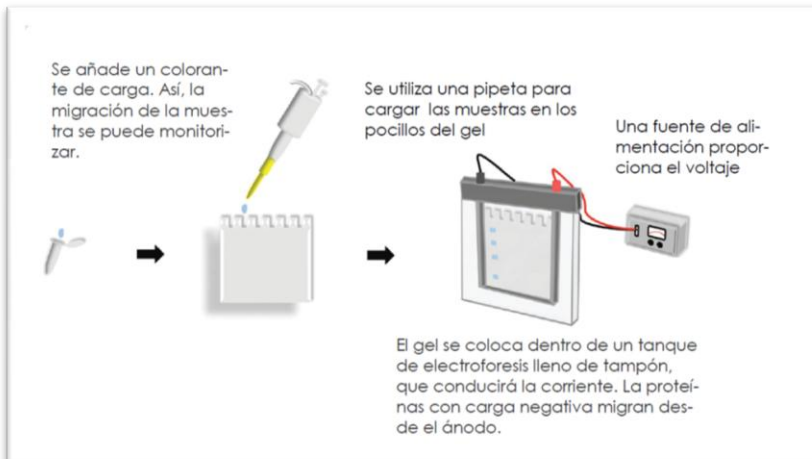
**4.- Hibridación del Anticuerpo:** La membrana con las proteínas inmovilizadas debe tratarse para bloquear las zonas con ausencia de proteínas y así evitar la unión no específica de los anticuerpos. A continuación se incuba con un anticuerpo primario dirigido contra el antígeno específico de la proteína diana.

Tras varios lavados de la membrana, se adiciona un anticuerpo secundario marcado que se unirá de forma específica al anticuerpo primario, proporcionando una forma de detección. (Figura 35). (25)

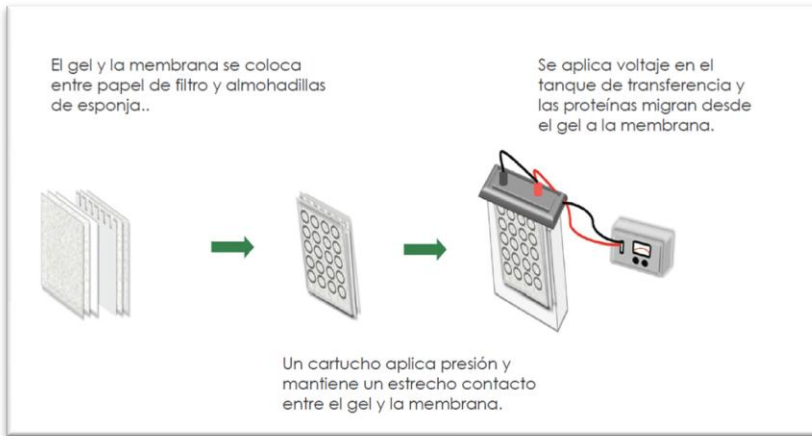
**5.- Detección de las bandas:** Después de un lavado de la membrana para eliminar el anticuerpo no unido, se procede a detectar la localización de la banda en la membrana. Para la detección de quimioluminiscencia, se utiliza un anticuerpo secundario conjugado con el enzima peroxidasa (HRP); la adición de un sustrato de HRP provoca una reacción enzimática que da como resultado final la emisión de luz. Dicha luz puede ser detectada en una película de rayos X, o de forma digital, mediante un sistema de captación de imágenes. La detección de fluorescencia se basa en la captación de luz emitida por sustancias fluoróforas conjugadas con el anticuerpo secundario. (Figura 36). (25)



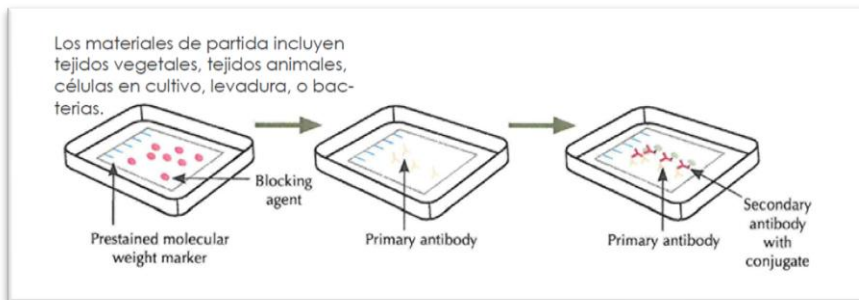
**Figura 32- Preparación de muestras para el ensayo de Western Blot**



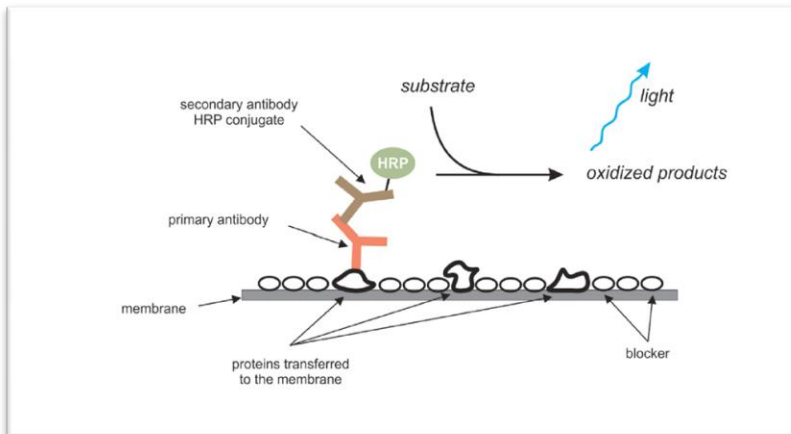
**Figura 33.- Electroforesis en acrilamida en el ensayo de Western Blot**



**Figura 34.- Transferencia de Proteínas a la Membrana**



**Figura 35.- Hibridación de Anticuerpo en las membranas durante el ensayo de Western Blot**



**Figura 36.- Detección quimioluminiscente de las bandas de proteínas en la fase final del ensayo de Western Blot**

### **Aplicaciones del Western Blot.**

Actualmente es una de las técnicas más usadas en el estudio de la biología molecular. (25)

#### **Utilidad como auxiliar de diagnóstico:**

- Prueba de VIH:
- Se emplea como prueba definitiva de la encefalopatía espongiforme bovina, comúnmente llamada "enfermedad de las vacas locas".
- Enfermedades infecciosas, más frecuentemente el VIH. (25)

#### 4.2.6 MALDI-TOF

La técnica MALDI-TOF (*Matriz-Assisted Laser Desorption/Ionización (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz)*) es una técnica de ionización suele asociarse a un analizador de tiempo de vuelo (TOF, Time-OfFlight) en el que los iones se separan en función de su relación masa-carga tras ser acelerados en un campo eléctrico, o a un analizador TOF/TOF (Figura 37) que proporciona un mejor enfoque de los iones y, por tanto, mayor resolución y precisión másicas. En el primer TOF los iones son acelerados a bajo voltaje, favoreciendo la fragmentación estable. Mediante un pulsador se selecciona un determinado ión primario y sus iones fragmento, que son acelerados a un potencial mayor y separados en el segundo TOF. (28)



**Figura 37.- Espectrómetro de Masas MALDI-TOF/TOF (4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems)**

Permite la identificación de microorganismos mediante el análisis de proteínas, principalmente ribosomales, a partir de colonias o directamente de muestras a través de la creación de un espectro de masas el que es específico para cada especie. Esta tecnología ha demostrado ser confiable, específica y rápida para la identificación de distintas bacterias aeróbicas y anaeróbicas. Los estudios abarcan bacterias de distintas familias como: enterobacteriaceae, bacilos gramnegativos no fermentadores, cocáceas grampositivas, levaduras y micobacterias. (28)

## Funcionamiento de la técnica MALDI-TOF.

La macromolécula es primero implantada en una matriz sólida que a menudo consiste de un material orgánico. La composición de la matriz dependerá de la muestra a analizar, usándose  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinamínico para analizar péptidos, DHB para moléculas grandes y ácido sinapínico también para péptidos y proteínas grandes. Otras matrices son el ácido *trans*-3-indoleacrílico y sales inorgánicas como cloruro de sodio o trifluoroacetato de plata. Se utiliza una matriz para proteger a la biomolécula de ser destruida y para facilitar la vaporización y la ionización. La muestra es entonces irradiada con un láser pulsado, como un láser de nitrógeno. La energía del láser expulsa iones de la matriz electrónicamente excitados, cationes y macromoléculas neutrales, que crean una densa nube de gas por encima de la superficie de la muestra. La macromolécula es ionizada por las colisiones y complejación con pequeños cationes (Figura 38). (28)

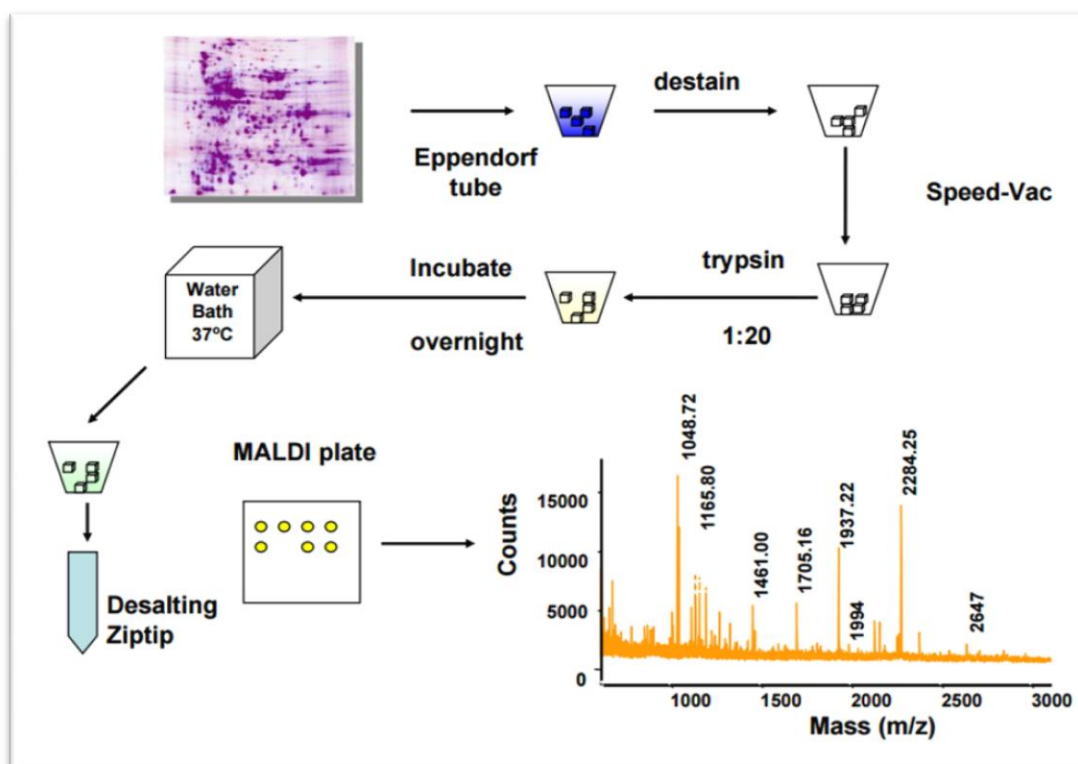


Figura 38- Mecanismo de acción de MALDI-TOF

### **4.3. Saliva como medio de diagnóstico de cáncer bucal.**

#### **4.3.1 Introducción (Saliva como medio de diagnóstico en cáncer bucal)**

El cáncer bucal es una enfermedad en donde las células de la cavidad bucal se multiplican sin control y pueden invadir otros tejidos; este se desarrolla por múltiples factores: ambientales, inmunológicos, nutricionales, hábitos y estilos de vida. A nivel celular surge como consecuencia de trastornos genómicos generados por aberraciones cromosómicas, activación de oncogenes e inactivación de genes supresores tumorales, originando células con características proliferativas e invasivas.

Dentro de las lesiones oncológicas en cavidad bucal, la neoplasia más frecuente es el carcinoma de células escamosas (CCECO) presentándose comúnmente en los labios, lengua, orofaringe, paladar, mucosas yúgales y piso de boca. El diagnóstico de estas lesiones empieza con el examen clínico y es confirmado con el estudio histopatológico que muestra la presencia y grado de displasia; sin embargo, no permiten determinar el grado de invasión y el potencial metastásico. Generalmente, este tipo de cáncer puede iniciar con una lesión de mancha blanca o una úlcera, que no tiene un factor etiológico claro asociado ni resolución satisfactoria a corto plazo, hay aumento del volumen de la lesión, cronicidad, cambios morfológicos y linfadenopatías. Histológicamente la severidad se establece basada en el grado de diferenciación, en donde se tiene en cuenta el nivel de queratinización, pleomorfismo celular y nuclear y la actividad mitótica.

Se ha establecido que la vida media de supervivencia de estos pacientes es de 5 años tras el diagnóstico que generalmente se realiza sobre lesiones de fase avanzada. Esto hace necesario buscar pruebas que establezcan de manera precoz el riesgo de padecer esta enfermedad o identifiquen lesiones precancerosas; en este sentido, se deben emplear de forma selectiva, otros exámenes más específicos, que permitan valorar las alteraciones celulares y establecer un diagnóstico precoz de esta patología.

Para la realización de estos exámenes existen diferentes biomarcadores celulares y tisulares que desde una perspectiva molecular, proporcionan información adicional a la obtenida en el examen clínico y el estudio histopatológico. Aunque existe un creciente esfuerzo dedicado a la investigación del cáncer oral, centrándose en la identificación de indicadores biológicos para el diagnóstico y la agresividad biológica, son pocos los estudios que han examinado biomarcadores tumorales en la saliva. Ésta se ha utilizado como un medio de investigación durante décadas en los pacientes con enfermedades locales y sistémicas, debido a que está en contacto directamente con la mucosa oral, la descamación de las células y sus productos pueden ser detectados, lo que hace posible estudiar marcadores moleculares tumorales en saliva de pacientes con cáncer bucal.

Entre las ventajas de la utilización de la saliva en comparación con las muestras de sangre, se han propuesto que el método de recolección es seguro, indoloro y no traumático, la técnica de recolección es fácil de manipular, el equipo de recolección es simple y la muestra puede ser tomada varias veces sin causarle incomodidad al paciente. Diversos autores sostienen que la utilización de la saliva en comparación con la sangre puede demostrar la presencia de marcadores más sensibles y específicos para las enfermedades orales tales como carcinoma oral de células escamosas. La utilización de la saliva se considera una alternativa no invasiva, convirtiéndose en una efectiva modalidad para el diagnóstico y predicción del pronóstico de cáncer oral a través de un monitoreo a pacientes en tratamiento.



#### 4.4 Antecedentes del cáncer bucal.

##### 4.4.1 Factores de riesgo para cáncer bucal.

De manera general los principales factores de riesgo para cáncer bucal son los siguientes:

- a) Tabaquismo. Representa el principal factor de riesgo, estimando que entre el 90% de los tumores malignos en cavidad bucal en hombres y el 60% en mujeres están asociados al consumo de tabaco.
- b) Consumo de alcohol. En cantidades de 60 gramos al día, existe un incremento 6 veces el riesgo a desarrollar una lesión neoplásica en boca (efecto sinérgico).
- c) Exposición a barnices de pintura, ácido sulfúrico, polvo de madera y níquel, debido a los componentes químicos contenidos en estos productos.
- d) Virus del papiloma humano (VPH serotipos 16 y 18). Se asocia de un 20 a 40% los casos de cáncer orofaríngeo y bucal la infección a estos serotipos.
- e) Factores genéticos hereditarios. Aumenta en un 30% más de probabilidad contraer este padecimiento cuando un familiar haya padecido una neoplasia maligna o el incremento de proteínas indicadoras de proliferación celular presentes en biofluidos como ejemplo proteína Ki67.
- f) Lesiones y condiciones precancerosas presentes en cavidad bucal. Entre algunas de estas se encuentran leucoplasia, eritroplasia y líquen plano. (Tabla 6)
- g) Pacientes con VIH-SIDA. La infección con este retrovirus incrementa 75% el riesgo de padecer sarcoma de Kaposi en cavidad bucal. (29,30)

<b>LESIONES PRECEROSAS</b>	<b>CONDICIONES PRECANCEROSAS</b>
Clasificación clínica:  1.- Leucoplasia. 2.-Eritroplasia. 3.-QuelitisnActínica. 4.-Palatitis nicotínica.	<b>Liquen plano.</b>
	<b>Disfagia sideropénica.</b>
	<b>Fibrosis oral submucosa.</b>
	<b>Sífilis.</b>
	<b>Lupus eritematoso discoide.</b>
Clasificación histológica: 1.- Displasia epitelial. 2.- Carcinoma Insitu	<b>Xeroderma pigmentado.</b>
	<b>Inmunosupresión.</b>
	<b>Epidermólisis bullosa.</b>
	<b>Disqueratosis congénita.</b>

**Tabla 6 - Lesiones potencialmente precancerosas presentes en cavidad bucal.**

#### **4.4.2 Epidemiología del cáncer bucal.**

El cáncer de cabeza y cuello es el sexto cáncer humano más frecuente a nivel mundial. De todos los tumores en esta región, el 3% se localizan en la cavidad bucal. Este porcentaje no representa a cualquier zona o región mundial pues existe una variabilidad geográfica. Se ha observado una mayor prevalencia en países de América del Sur, el sudeste asiático y sobre todo en la India donde el cáncer bucal representa al 40% de todos los tumores malignos. (29)

Cada año se diagnostican en el mundo más de 575 mil casos nuevos de cáncer bucal. La incidencia en América Latina va de 100 mil casos en hombres por año y 53 mil casos de mujeres al año. Estas cifras se están igualando debido al cambio en hábitos nocivos por parte de las mujeres, ya que cada vez tienen mayor similitud al comportamiento de los hombres. En cuanto a la edad, el 90% de los cánceres orales se diagnostican en mayores de 40 años, y más del 50% en individuos de más de 65 años. Asimismo la incidencia de esta enfermedad se ha incrementado en menores de 40 años, hipotetizándose una asociación al incremento en infecciones por VPH (serotipos 16 y 18). (29)

Se estima que la supervivencia a los 5 años es del 40-56%, sin embargo de manera específica es 70% labial y 30 % otras localizaciones. (29)

En México no existe un registro estadístico sobre la incidencia de este padecimiento. Se cuentan con datos del registro histopatológico de neoplasias malignas, el cual para el año 2002 indicaba que el 17.6% de las malignidades provenían de cabeza y cuello, así como el 12.5% en cavidad bucal. (29)

### 4.3.2 Clasificación del Cáncer Bucal

Se entiende por cáncer bucal al grupo de neoplasias malignas desarrolladas a partir de la mucosa oral, las cuales comprenden las siguientes áreas:(29)

- Labios y comisura labial.
- Mejillas.
- Piso de boca y lengua.
- Paladar duro.
- Istmo de las fauces.

#### **Clasificación de los tumores malignos de los tejidos blandos orales.**

En función del tejido del que derivan se pueden distinguir:

##### **a) Tumores malignos derivados del *epitelio*:**

**Carcinoma oral de células escamosas o epidermoide.** Es el cáncer que comienza en las células escamosas, encontrándose éstas en piel, revestimiento de los órganos huecos del cuerpo y en los pasajes de los tractos respiratorio y digestivo, teniendo el 90% de casos en neoplasias malignas de cavidad bucal (Figura 39). (29)

**Carcinoma verrucoso.** Consiste en un carcinoma epidermoide descrito por su comportamiento distinto, ya que poseen menor grado de malignidad, tienen un crecimiento lento y no es invasivo.(29)

**Carcinoma de células fusiformes.** Comprende un tumor bimórfico que muestra en la superficie focos de carcinoma epidermoide y más en profundidad células fusiformes.(29)

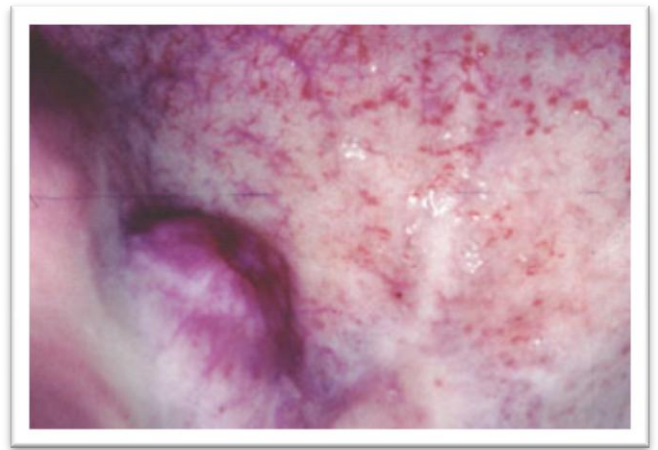
**Melanoma.** Neoplasia de los melanocitos de alto grado de malignidad.(29)

**Adenocarcinoma o carcinoma mucoepidermoide.** Define un tipo de cáncer que afecta a las glándulas salivales. (Figura 40)(29)

**Carcinoma basocelular.** Consiste en un cáncer que se origina en la capa más profunda de la epidermis (estrato basal), sobretodo en áreas expuestas al sol (Figura 41). (29)



**Figura 39.-Carcinoma epidermoide en trigono retromolar.**



**Figura 40- Carcinoma mucoepidermoide en paladar**



**Figura 41.- Carcinoma basocelular de labio y piel de barbilla.**

**b) Tumores malignos derivados del *tejido conectivo*.**

En función de las células conectivas de las que derivan se dividen en:

- **Fibrosarcoma:** Derivado de fibroblastos.
- **Fibrohistocitoma maligno:** Derivado de los fibroblastos e histiocitos malignos.
- **Liposarcoma:** Derivado de los adipocitos.
- **Angiosarcoma:** Derivado de las células endoteliales de los vasos sanguíneos y linfáticos. (29)
- **Neurosarcoma:** Derivado de la cubierta de los nervios periféricos.
- **Rabdomiosarcomas:** Derivado de células del músculo estriado.
- **Leiomiomas:** Derivado de células del músculo liso, son poco frecuentes en la cavidad oral. (29)

**c) Metástasis en las partes blandas de la cavidad oral:**

Son poco frecuentes en la mucosa oral, ya que de todas las neoplasias del organismo sólo un 1% metastatizan en mucosa oral, el 90% en huesos maxilares y el 10% en partes blandas. Los tumores primarios suelen localizarse en pulmón, riñón e hígado.(29)

**d) Neoplasias del *sistema inmune* con afectación oral:**

- **Linfoma No Hodgkin:** Es una neoplasia de los linfocitos y sus precursores.
- **Plasmocitoma-mieloma múltiple:** Comprende una neoplasia maligna hematológica con proliferación de células plasmáticas y con afectación múltiple de la médula ósea.(29)

## Estadificación.

El sistema de estadificación está basado en criterios aceptados por la *American Joint Commission of Cancer (AJCC)* aplicado principalmente al cáncer bucal, en específico al carcinoma de células escamosas de cavidad bucal. Este sistema principalmente está basado en:

- La determinación del tamaño, localización y extensión el tumor o lesión primaria (T).
- Presencia y situación de metástasis ganglionar (N).
- Presencia o ausencia de metástasis a distancia (M)(Tabla 7).
- Clasificación en estadios (Tabla 8).
- Grado de diferenciación histopatológica (Tabla 9).
- Clasificación ECOG (Tabla 10)

Siendo de la siguiente manera. (19, 29, 31,32):

<b>Tumor primario (T)</b>	
TX	Sin información de tumor primario
T0	Sin evidencia de tumor primario
TIS	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor $\leq$ 2 cm de diámetro
T2	Tumor entre 2 y 4 cm de diámetro
T3	Tumor de más de 4 cm de diámetro
T4	Tumor de más de 4 cm de diámetro con afección del antro, los músculos pterigoideos, la base de la lengua o la piel
<b>Ganglios linfáticos regionales (N)</b>	
NX	Los ganglios pueden ser valorables o no
N0	Sin ganglios clínicamente positivos
N1	Un nódulo clínicamente positivo, homolateral y de diámetro < 3cm
N2a	Un nódulo clínicamente positivo, homolateral y de diámetro entre 3 y 6 cm
N2b	Múltiples ganglios homolaterales clínicamente positivos, ninguno mayor de 6 cm de diámetro
N3a	Ganglios positivos homolaterales y mayores de 6 cm
N3b	Ganglios positivos clínicamente bilaterales y mayores de 6 cm
N3c	Ganglios positivos clínicamente contralaterales y mayores de 6 cm
<b>Metástasis a distancia (M)</b>	
MX	No se valoró las metástasis a distancia
M0	Sin evidencia de metástasis a distancia
M1	Con metástasis a distancia

**Tabla 7- Clasificación TNM para estadificación.**

Estadio I	T1, NO, MO
Estadio II	T2, NO, MO
Estadio III	T3, NO, MO, T1, T2, T3, N1, MO
Estadio IV	T4 NO, N1, MO
	Cualquier T, N2, N3, MO
	Cualquier T, cualquier N, M1

**Tabla 8- Clasificación del cáncer bucal en estadios y cáncer de células escamosas de cavidad bucal.**

Gx	No se puede establecer el grado de diferenciación
G1	Bien diferenciado
G2	Moderadamente diferenciado
G3	Pobrementemente diferenciado
G4	Indiferenciado

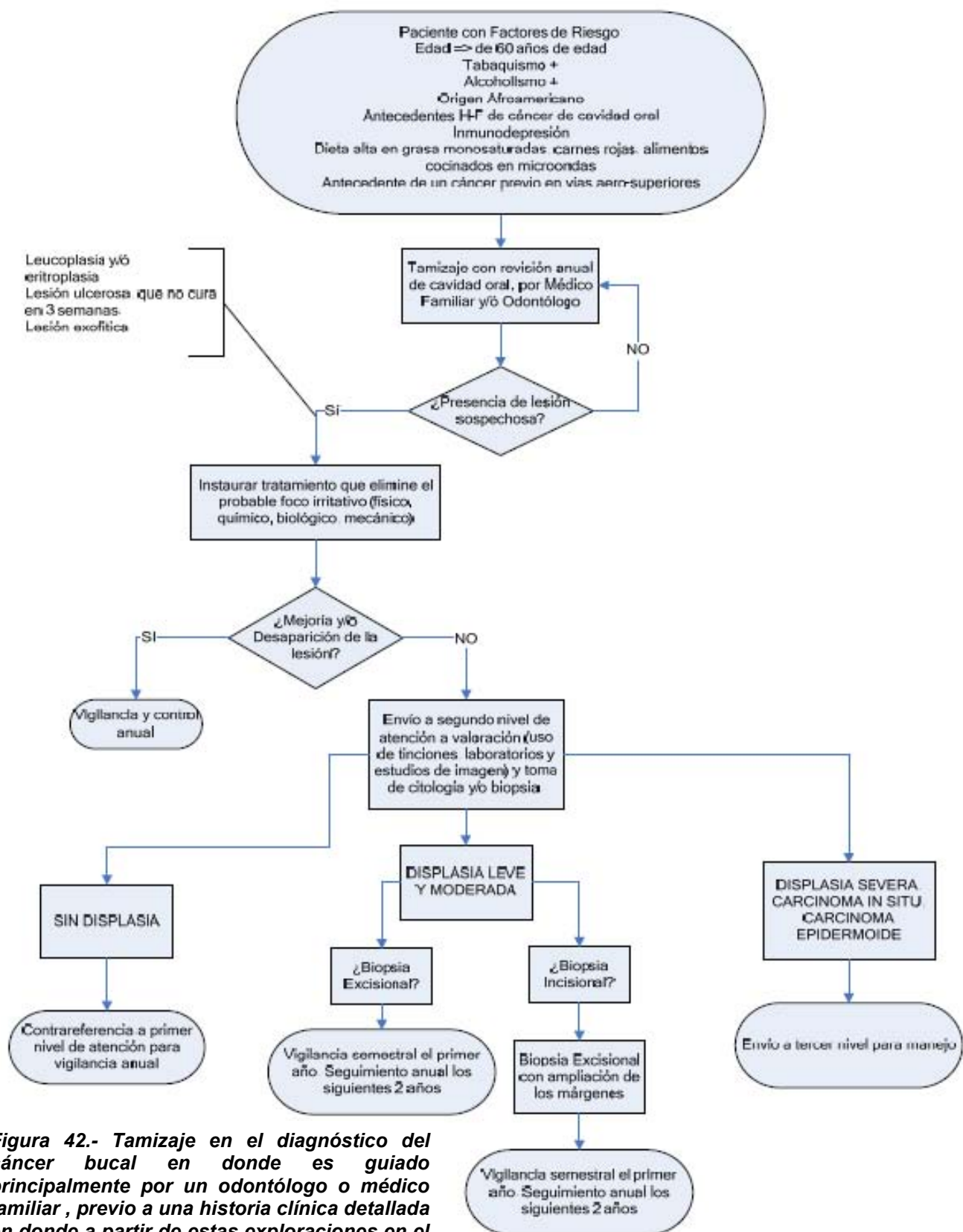
**Tabla 9.- Grado de diferenciación histopatológica.**

Clasificación del estado funcional (ECOG)	
ECOG 0.	El paciente encuentra totalmente asintomático y es capaz de realizar un trabajo y actividades normales de la vida diaria.
ECOG 1.	El paciente presenta síntomas que le impiden realizar trabajos arduos aunque se desempeña normalmente en sus actividades cotidianas. El paciente solo permanece en la cama durante las horas de sueño nocturno.
ECOG 2.	El paciente no es capaz de desempeñar ningún trabajo, se encuentra con síntomas que lo obligan a permanecer en la cama durante varias horas al día, pero no supera el 50 % del día. El individuo satisface la mayoría de sus necesidades solo.
ECOG 3.	El paciente necesita estar encamado más de la mitad del día por la presencia de síntomas. Necesita ayuda para la mayoría de las actividades de la vida diaria.
ECOG 4.	El paciente permanece encamado el 100 % del día y necesita ayuda para todas las actividades de la vida diaria.
ECOG 5.	El paciente se encuentra moribundo o morirá en horas.

**Tabla 10.- Clasificación de la escala validada por el grupo oncológico (of the estearn cooperative oncology group) (ECOG)**



#### 4.4.4 Tamizaje y tratamiento para cáncer bucal.



**Figura 42.- Tamizaje en el diagnóstico del cáncer bucal en donde es guiado principalmente por un odontólogo o médico familiar, previo a una historia clínica detallada en donde a partir de estas exploraciones en el paciente se podrá realizar un pronóstico más favorable en caso de existir una lesión precancerosa y así iniciar un tratamiento oportuno y precoz.**

Estadio o etapa del tumor	Tratamiento
<b>T1-2,N0</b>	Escisión del tumor primario junto con radioterapia externa.
<b>T3 , N0</b>	Excisión del tumor primario con extirpación de cadenas ganglionares afectadas junto con quimioradioterapia
<b>T1-3, N1-3, T4a</b>	Excisión del tumor primario con extirpación de cadenas ganglionares afectadas junto con quimioradioterapia y quimioterapia concomitante.
<b>Tumores no resecables (M0)</b>	Terapia estándar según la clasificación de ECOG, junto con quimioterapia concurrente y radioterapia paliativa.

**Tabla 11.-Plan de tratamiento a seguir dependiendo el estadio donde se encuentre el tumor:***T1: Tumor menor o igual a 2 cm; T2: Tumor mayor de 2 cm pero menor de 4 cm;T3: Tumor mayor de 4 cm; T4: El tumor invade estructuras adyacentes.N0: No hay evidencia de metástasis ganglionares; N1: Hay metástasis en un ganglio linfático homolateral menor o igual a 3 cm; N2a: Metástasis en un ganglio homolateral mayor de 3 cm pero menor de 6; N2b: Metástasis en múltiples ganglios homolaterales, menores de 6 cm; N3. Metástasis en un ganglio linfático mayor de 6 cm. M0: No hay metástasis a distancia; M1: Hay metástasis a distancia.*

#### 4.5 Biomarcadores para cáncer bucal en saliva.

Gracias a los avances biotecnológicos se ha permitido el impulso de la investigación y evaluación de una gran cantidad de biomarcadores de distinta naturaleza (proteínas, ácidos nucleicos, metabolitos, microvesículas, etc.) presentes en saliva con el objetivo de tener medios de detección temprana, pronóstico, predicción de agresividad, recurrencia y metástasis para cáncer bucal.

La saliva representa un biofluido muy atractivo para el estudio de esta enfermedad pues bajo un protocolo de obtención y manejo estandarizado tiene varias ventajas sobre otros medios, como la sangre y la orina. Se puede obtener una muestra adecuada para su análisis con una toma que represente un mínimo estrés para el sujeto al donarla. Asimismo se ha demostrado que es un medio rico en una gran variedad de moléculas de distinta naturaleza y aunque se ha evaluado si la saliva puede servir para la evaluación de distintas condiciones sistémicas, probablemente el mejor sitio que refleje y nos dé información molecular sea el de la cavidad bucal. (18)

Distintos biomarcadores salivales han sido estudiados y clasificados de acuerdo a su naturaleza, pero también de acuerdo al proceso o etapa en la pueden participar durante la carcinogénesis o fenómenos asociados. En base a esto, a continuación se mencionan algunos de los analitos estudiados en estos últimos años:

##### **Marcadores de crecimiento tumoral**

- **Telomerasa:** En varios tipos de cáncer, la habilidad de dividirse sin límite es logrado por la producción de una enzima llamada telomerasa, la cual ayuda a los cromosomas para que no se acorten. Ésta es una proteína normal que está presente en las células durante el desarrollo del feto. En la mayoría de células de un adulto, la telomerasa no está presente ya que la enzima no está siendo expresada.

Sin embargo, en algunas células cancerosas esta función es necesaria reactivando el gen que codifica la telomerasa. La actividad de la telomerasa podría ser de potencial valor diagnóstico del cáncer oral. (18).

- **Endotelina-1 (ET-1):** La ET-1 pertenece a la familia de endotelinas, potentes vasoconstrictores que participan no sólo en la biología vascular, sino también en diversos procesos incluyendo la inflamación, la cicatrización de heridas y la carcinogénesis. La expresión de endotelinas y sus receptores se asocia con un alto grado de agresividad, invasión y metástasis (18).
- **Ciclina D:** Las ciclinas son una familia de proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular. Estas forman complejos con enzimas quinasas dependientes de ciclinas (Cdks) activando en estas últimas su función quinasas. La concentración de las ciclinas varía a lo largo del ciclo celular; cuando su concentración es baja la función de su correspondiente quinasas dependiente de ciclina es inhibida. Dada la participación de la ciclina D en el proceso de división celular, esta proteína podría participar en el desarrollo de distintos tipos de cáncer proliferación tumoral, la metástasis y los pobres pronósticos. (18).
- **Ki-67:** Es una proteína nuclear no histónica expresada en las células durante las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2, M), y ausente en las células en estado de reposo (G0). Por lo tanto, Ki-67 puede ser empleada para medir crecimiento en los tejidos normales y en las neoplasias malignas y esta correlacionada con la gravedad de la enfermedad y con un mal pronóstico. (18).

- **Galectinas:** Las galectinas constituyen una familia de proteínas extremadamente conservadas a través de la evolución. En función de su propiedad de descifrar glicocódigos específicos, estas proteínas han sido involucradas en un amplio espectro de eventos biológicos. Están relacionadas a la regulación de la respuesta inmune, tales como adhesión linfocitaria, crecimiento celular, producción de citoquinas y regulación de la muerte celular programada y proteína relacionada con la carcinogénesis oral (18).
- **EGFR:** Es un regulador de importantes procesos tumorigénicos, este a su vez conduce al crecimiento de las células cancerosas y a la progresión tumoral. Se ha identificado al EGFR como una molécula blanco para la terapia contra procesos carcinogénicos.(18, 19).
- **Calreticulina:** Proteína chaperona de unión a calcio en el retículo endoplasmático. Esta proteína no ha sido estudiada lo suficiente y por lo tanto no se ha elucidado su origen y su función en cavidad bucal, aunque se sugiere que pudiera estar asociada a respuestas inflamatorias. Aunque es una proteína presente en saliva, probablemente esta en concentraciones por debajo del límite de detección de inmunoensayos. Teniendo como sentencia una baja presencia como biomarcador para cáncer bucal, pero que no es descartada como un marcador predictivo a un futuro de seguir siendo estudiada.(19)
- **Calicreina-1:** Pertenece a una familia de proteasas que han sido hipotetizadas como posibles biomarcadores para cáncer bucal. Esta proteína se origina de 15 genes diferentes. En saliva humana se ha reportado que puede ser inhibida por benzamidina, leupeptina, calistatina e inhibidor de proteína C.(19)

- **Anexina-A1:** Proteína de 37kDa que pertenece a la superfamilia de las anexinas. Su papel se ha involucrado en vías inflamatorias, proliferación y regularización de muerte celular (apoptosis), así mismo en el proceso de carcinogénesis.(19)

### **Marcadores de supresión tumoral**

- **p-53** El gen *p53* se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17 y codifica un factor de transcripción nuclear de 43.7 KDa. Resulta esencial para inducir la respuesta de la célula ante el daño del ADN, deteniendo el ciclo celular en caso de mutación. Éste es un gen supresor tumoral que desempeña un papel importante en apoptosis y control del ciclo celular. La inactivación del gen supresor de tumores es importante durante varias etapas de carcinogénesis. El gen *p53* está frecuentemente mutado en los carcinomas orales de células escamosas, estas mutaciones pueden servir como biomarcadores muy específicos para la presencia de células tumorales.(18,19)

### **Marcadores de invasión tumoral.**

- **Metaloproteinasas de matriz (MMP):** Las MMP-2 y MMP-9 son metaloproteinasas que participan en la patogénesis del cáncer, ellas degradan el colágeno tipo IV, el componente principal de la membrana basal, así como otros tipos de colágenos (V, VII y X), elastina y fibronectina, son altamente expresadas en las células del estroma que rodean la frontera de invasión en metástasis de tumores y sus niveles se elevan en el endotelio del tumor y en la orina. Las MMPs están involucradas en el proceso de metástasis y se asocian a los estadios finales de la lesión, sin embargo no pueden ser consideradas como un biomarcador de predicción y de diagnóstico precoz del cáncer. (18)

- **Proteína de unión a calcio S100p:** Las proteínas S100 están localizadas en el citoplasma o el núcleo de una amplia variedad de células y están implicadas en la regulación de diversos procesos celulares tales como la progresión del ciclo celular y la diferenciación celular. El mayor uso de estas proteínas ha sido el de marcadores tumorales. Esto ha permitido resolver diagnósticos de tumores indiferenciados e incluso es relacionada principalmente con la metástasis tumoral. (18)

### **Marcadores enzimáticos.**

- **Lactato deshidrogenasa (LDH)** En un medio anaeróbico, el piruvato se reduce a lactato en una reacción reversible catalizada por LDH que utiliza la nicotinamida adenina dinucleótido como coenzima. La LDH es una enzima detectable en el citoplasma de casi todas las células del ser humano, que se convierte extracelular después de la muerte celular. Por lo tanto, su presencia extracelular está siempre relacionada con la necrosis celular y lesión tisular. La similitud entre el perfil de isoformas de la LDH en toda la saliva y el epitelio oral apoya la hipótesis de que la LDH salival es predominantemente de origen extraglandular, por consiguiente, la concentración de LDH en la saliva, como una expresión de necrosis celular, podría ser un indicador específico para las lesiones precancerosas orales que afectan al integridad de la mucosa oral, es considerada como un biomarcador inespecífico para el cáncer oral debido a que se puede encontrar aumentada por diversos procesos que ocurren en la cavidad bucal.(18)

**Marcadores intracelulares.**

- **Cyfra 21-1** Es un fragmento soluble de la citoqueratina 19(CK19), la cual es un componente de la proteína del citoesqueleto con un peso molecular de 40 kDa, es una citoqueratina de tipo ácido con un pH isoeléctrico de 5.2. en saliva es un valor clínico potencial para la detección del cáncer oral, así como la predicción de la recurrencia del tumor. (18)

<b>Biomarcador</b>	<b>Posible indicación diagnóstica</b>	<b>Técnica empleada</b>
8-Oxoguanina ADN glicosilada	Disminuye.	ELISA
Ácido hidroxieicosatetraenoico	Aumenta, involucrada en procesos de metástasis.	Cromatografía de gases
Carbonilos	Aumenta, indica daño oxidativo de proteínas	Oxidación de proteínas
Ciclina D1	Aumenta, se relaciona con la progresión celular y mal pronóstico	ELISA
Cistatinatruncada SA-I	Aumenta, se relaciona con estadios de tumor.	SELDITOF
Cyfra 21-1	Se relacionada con la recurrencia.	ELISA
DUSP1	Se aumentan en el cáncer oral.	PCR
Endotelina-1	Buen marcador para diagnosticar lúquen plano.	ELISA
Fosfato sérico	Disminuye.	ELISA



Galectinas 1, 3 y 7	Aumenta, involucrada en la progresión del tumor.	ELISA
Maspin	Disminuye, se relaciona con el crecimiento, progresión y metástasis.	ELISA
Interleucina 1-beta	Aumentan en cáncer oral	ELISA-PCR
Interleucina-8	Aumenta en cáncer oral.	ELISA-PCR
Ki67	Aumenta, relacionadas con la progresión celular y mal pronóstico.	ELISA
Lactato deshidrogenasa	Indicador de necrosis celular, se relaciona con el mal pronóstico y la recurrencia.	Cromatografía de gases
M2BP	Aumenta, principalmente en estadios iniciales del cáncer oral.	ELISA
Metaloproteinasas 2 y 9	Aumenta, relacionada con la metástasis.	ELISA
p53	Disminuye, se asocia a la capacidad de aberraciones celulares.	PCR
S100P	Aumenta, en cáncer oral, se relaciona con la progresión, metástasis y angiogénesis.	Western Blot

SAT1	Aumenta, en cáncer oral.	PCR
Telomerasa	Biomarcador de cáncer pero no diferencia estadio de la lesión.	PCR-ELISA
Transferrina	Se correlaciona con el tamaño. y etapa del tumor.	MALDITOF Western Blot ELISA

**Tabla 12.- Principales biomarcadores encontrados en saliva descritos para cáncer bucal y sus técnicas empleadas para su análisis, así como su presunta indicación diagnóstica en el cáncer bucal,**

#### **4.6 Estudios reportados (2010-2014).**

Apoyados por la iniciativa del Instituto Nacional de Investigación Dental y Craneofacial de Estados Unidos (NIDCR), durante los últimos diez años se ha observado un incremento en la publicación de estudios sobre biomarcadores para la detección de enfermedades a través de la saliva, sin embargo, de las investigaciones pioneras y de mayor alcance ha sido la búsqueda de estos indicadores relacionados a cáncer bucal, mismas que han alcanzado estudios de prevalidación clínica. Resultado de estas investigaciones se ha llegado a la actual conclusión que los marcadores que mejor podrán discernir la enfermedad son aquellos que se empleen de manera conjunta o múltiple, producto del análisis de varias moléculas (proteínas, ARN, ADN, microRNA, etc.) al mismo tiempo.

A continuación se ejemplifican distintas investigaciones relevantes reportadas durante los últimos cinco años:

En el año 2010 Renata Hoffmann y cols. Reportaron una sobreexpresión de ET-1 en tumores bucales (COCE) sin embargo, a pesar de ser un marcador relacionado con la enfermedad los niveles en la saliva no pudieron ser corroborados mediante inmunoensayos debido a la carencia de un anticuerpo para validación. (37)

En 2010 Jou YJ y cols, encontraron una expresión positiva de la actividad de la telomerasa en la saliva con una sobreexpresión del 75%, sin embargo no había diferencias entre los estadios iniciales y finales de la lesión, así como entre lesiones con y sin metástasis a los ganglios linfáticos, concluyendo que el valor diagnóstico es limitado, considerando a este biomarcador como coadyuvante para el diagnóstico de cáncer oral.(34)

En 2010 un estudio realizado por el Dr, González Moles y cols, que consistió en el análisis de saliva de 83 pacientes con tumores malignos de cavidad bucal establecieron que la falta de asociación de la expresión del gen Ki67 en saliva está relacionado con el pronóstico de los tumores. 83% de los pacientes recibieron un pronóstico desfavorable debido al estadio avanzado de la lesión. Concluyeron que esta acción está relacionada a que parte de la expresión de este gen, se refleja en el total de las fracciones de células con diferente capacidad de proliferación. (41)

En el año 2011 el equipo del Dr. ShenHu y cols. (33) afirmaron que el carcinoma de células escamosas en cavidad oral es el cáncer con más casos reportados teniendo un porcentaje de un 90% de todas las neoplasias malignas reportadas, en una población de estudio de 128 participantes contando 68 pacientes con carcinoma de células escamosas de cavidad oral (COCE) así mismo reportan que el biomarcador p-53 es el más caracterizado (83% de los casos) en sus experimentos realizados validados con geles bidimensionales y espectrometría de masas.(33)

En el año 2011 la investigación del equipo del Dr. Alvez y cols. Establecen la inmunexpresión diferencial de galectinas 1, 3, y 7, ellos sugieren la participación de estas proteínas en la carcinogénesis oral, donde en las 42 muestras recolectadas de saliva el 75% de los resultados comprobó el aumento de dichas proteínas concluyendo que están relacionadas como posible un biomarcador de comportamiento biológico y progresión del tumor en el carcinoma de células escamosas específicamente en la zona lingual (40).

En el año 2011 Brinkmann O y cols., analizaron muestras salivales de 60 pacientes con lesiones neoplásicas de cavidad oral mediante técnicas proteómicas como SELDI TOF y validación por Western, concluyendo que la transferrina y la proteína S100P sobre expresadas podrían estar relacionadas con la progresión del tumor y metástasis, concluyendo que podrían ser biomarcadores de crecimiento tumoral relacionados con pronóstico desfavorable (42).

En el año 2012 Malecki k. y cols. analizaron muestras salivales de 136 sujetos reportando que un 50% de los casos tenían la presencia del gen p53 mutado y relacionado el gen Ki67, asociándolos a la proliferación tumoral en estadios avanzados de las lesiones.(38)

En el año de 2012, Jing G. y cols. analizaron 30 muestras salivales entre casos y controles, reportando como hallazgo la sobreexpresión de la proteína p53 donde reportan que el 60% de los sujetos con la sobreexpresión de este gen tienen un pronóstico desfavorable relacionado con la capacidad de aberración y proliferación celular (39).

En el año 2013 Ronell Bologna y cols. cuantificaron la expresión de Ki67 en 29 muestras tomadas del Instituto Nacional de Oncología y Radiología de la Habana Cuba; determinaron que la progresión en la expresión de Ki67 es mayor en el carcinoma bien diferenciado (58.87%), comparado con el carcinoma pobremente diferenciado (46.99%), así mismo el equipo del Dr. Bologna llegan a la conclusión de que la proteína Ki67 se puede determinar mejor en estadios de carcinoma bien diferenciados, ya que este marcador está caracterizado por estar asociado a la proliferación celular (36).

#### **4.7 Estudios reportados en México (2010-2014).**

Después de una exhaustiva revisión bibliográfica en la actualidad son escasos los estudios realizados en México sobre la búsqueda de biomarcadores salivales como auxiliares diagnósticos de cáncer bucal, sin embargo autores como Ronell Molina y su colaboradora la Dra. Nataly Mendoza, catedráticos de la Facultad de Odontología de la Universidad del Estado de Durango han estudiado la expresión de la proteína Ki67 en relación a la presencia cáncer de células escamosas de cavidad oral, sus resultados fueron publicados en el mes de Junio del año 2013.(Anexo 1).

**CONCLUSIONES.**

Con el término de este trabajo de investigación se concluye que el cáncer bucal es una enfermedad multifactorial que está asociada a cambios moleculares, genéticos y tisulares; por lo tanto, se ha vuelto indispensable que su diagnóstico se realice de manera precoz para así evitar pronósticos desfavorables y mejorar la calidad de vida de los pacientes afectados por esta enfermedad, en este sentido el descubrimiento de biomarcadores en saliva proporciona una herramienta para un diagnóstico correcto y temprano, mejor pronóstico, monitoreo y seguimiento del del paciente. Existen diferentes biomarcadores salivales reportados, por lo cual se sugiere el análisis de varios de estos en un mismo tiempo para crear un posible perfil bioquímico de cáncer bucal, diferencial para cada uno de los estadios de la enfermedad.

Así mismo se enfatiza la importancia y la exhortación por desarrollar la investigación de este tema que en la actualidad es uno de los centros de investigación de vanguardia y novedad a nivel mundial debido a que en nuestro país el desarrollo de este tema en instituciones especializadas es pobremente abordado posiblemente atribuido a la falta de recursos financieros y equipo requerido para llevar a cabo una investigación de tal magnitud.

Sin embargo se hace énfasis que todos los biomarcadores que han sido descritos en saliva para cáncer bucal actualmente la mayoría se encuentran en fase de hipotetización, debido que no existe un biomarcador que sea totalmente específico para el cáncer bucal, es decir, que las indicaciones diagnósticas que pudieran mostrar dichos marcadores pueden ser señalados en otras patologías distintas al cáncer.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Fawcett DW, Bloom W, Raviola E. A textbook of histology. 12th ed. New York: Chapman & Hall; 1994. xx, 964 p. p.
2. C L-P. The role of saliva in mantaining oral health as an aid to diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11:449-55.
3. Sánchez RG. Principales proteínas salivales: estructura, función y mecanismos de acción. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 2012;11(4):450-6.
4. P V- J; Hill, RL. Mucin Family of Glycoproteins. *Encyclopedia of Biological Chemistry Lennarz& Lane*. 2004; 7: 758–764.
5. Lamby CP, Gómez OL, Jaramillo L. La  $\alpha$ -amilasa salival: relación con la caries dental y la salud en general. *UnivOdontol*. 2013;(69): 93-101.
6. Gutiérrez LG. Formación de la saliva. 5th ed. México DF: Secretaria de Salud 2006.
7. Bioquímica Agroindustrial: Proteínas. 2009; Availablefrom: <http://bioagroin.blogspot.mx/2011/05/prolina.htmlscreens>].
8. Expresión Genética: 2010; Availablefrom: [archive.org/web/20150212084634/http://lab314.com/genmol/code-standard.htm](http://archive.org/web/20150212084634/http://lab314.com/genmol/code-standard.htm).
9. Martínez,Brú C. Servei de Bioquímica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona Cistatina c. propiedades y utilidad clínica. *Ed.ContLabClín* 2006;9:36-41.
10. Drago-Serrano M.E et al. La lactoferrina como modulador de la respuesta inmunitaria. *Medigraphic*. 2008; 2: p. 71-82 71.
11. Curso de inmunología general:Departamento de Microbiología 2009; Availablefrom: [http://ugr.es/inmuno/cap\\_07](http://ugr.es/inmuno/cap_07).
12. Genes APOA 1, FGA, LYZ, B2M. 2008 Available from. [http://www.ivami.com/noticia\\_indiv.php?id\\_noticia=2834&opc=5&id=2067&lang=es](http://www.ivami.com/noticia_indiv.php?id_noticia=2834&opc=5&id=2067&lang=es)



13. WilmanCarrillo. Lysozyme: AntibacterialActivity and Allergenicity. Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación.2013;14: 156-67
14. Daniel Pedro Núñez. Bioquímica de la caries dental. Revista Habanera de Ciencias Médicas 2010;9(2) 156-166.
15. Anguiano Vega G. Biomarcadores moleculares: La nueva herramienta en la biotecnología. Universidad Iberoamericana león.2012;15: 52-59.
16. Wong D. Salivary diagnostics. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell 2008 xviii Pp 99-101
17. György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják. et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. Cell MolLifeSci. 2011;(16):2667-88.
18. Madera Anaya MV. Salivary analysis of oral cancer biomarkers. Av. Odontostomatology2013; 29 (6): 293-302.
19. Villagómez Olea J. Identificación de biomarcadores de adenocarcinoma pulmonar en el proteoma de saliva. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Odontología. División de estudios de posgrado e investigación; 2013: Pp23.
20. Fader Claudio .Secreción Salival. Universidad nacional de Cuyo Facultad de odontología. bioquímica general y estomatológica.2012; 12: 6-7.
21. Kenny Loyo Molina. Caries activity and itsrelationshipwithsalivaryflow and buffer capacity of the saliva .Med Oral Patol Oral. 2012;37: 3-11
22. Manuel E. Taboada Vega y Vilma. Rol de la saliva como marcador biológico en patología bucal. DepAcad. 2006;2: 12-18.
23. La saliva como muestra biológica. 2011; Available from:<http://www.biopps.com/article.php?story=>
24. Fernandez Nora. ELISA (EnzymeLinkedImmunoSorbentAssay). ClinicalChemistry. 2007; 11: 758-764.
25. Towbin, H. et. al. Chromatography gas a transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl AcadSci U S A. 76. 2009;(9):4350-4.

26. MartijnDijkstra. SELDI-TOF mass spectra: A view on sources of variation” Journal of Chromatography.B, 847 (2007) 12–23
27. Tamay de Dios L. et. al. Fundamentos de la reacción en cadenade la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real” Medigraphic. 2013; 2:70-78
28. Paulette Legarraga. et.al. Impacto de la espectrometría de masas por MALDI-TOF MS en la identificación rápida de bacterias aeróbicas y anaeróbicas de importancia clínica. Rev Chilena Infectol.2013;2:140-146.
29. García-García V. et. al. “Cáncer oral: Puesta al día” Av. Odontostomatol2009; 25 (5): 239-248.
30. Manual deDiagnostico y tratamiento del cáncer epidermoide en cavidad oral en pacientes mayores de 18 años. Secretaria de Salud. 2010; 1:32-48
31. Prieto Ignacio. “Cáncer Oral”. MedClin. 2006;127 (7) 258:64.
32. Scamous cell carcinoma of the head and neck: ESMO. Clinical recommendations of diagnosis, treatment and follow-up .Annals of oncology 2008;19 (supplement 2)ii 79-ii80,.
33. Shen Hu,MarthaArellano,PinmaneeBoonthung, et al. Salivary Proteomics for Oral Cancer BiomarkerDiscovery.Clin Cancer Res 2011; (19) 14-24
34. Jou YJ, Lin CD, Lai CH, Chen CH, Kao JY, ChenSY, et al.” Proteomic identification of salivary transferrin as a biomarker for early detection of oral cancer”. Anal ChimActa 2010;681(1-2): 41-8. 2. Brinkmann
35. Cheng YS, Rees T, Jordan L, Oxford L, O’Brien J, Chen HS, et al. ”Salivary endothelin-1 potential for detecting oral cancer in patients with oral lichen planus or oral cancer in remission”. Oral Oncol 2011;47(12):1122-6.
36. Bologna Molina Ronell, Barriento Mendoza Nataly. Expresión de la proteína Ki67 en variantes histológicas de carcinoma de células escamosas de la cavidad bucal.Revista san Gregorio No. 5 Junio 2013; 11-14.

37. Renata R. Hoffmann, Liliane S. Yurgel, et al. "Endothelins and their receptors as biological markers for oral cancer" *Oral Oncology* 2010; (46) 644–647.
38. Malecki K, Glinski B, Mucha-Malecka A. et al. Predictive and prognostic value of p53, Ki-67 and EGFR in patients with advanced oral cavity and oropharyngeal cancer treated with induction chemotherapy. *Przegl Lek* 2012;69(1):5-8.
39. Jing G, Lv K, Jiao X. The p53 Codon 72 Polymorphism and the Risk of Oral Cancer in a Chinese Han Population. *Genet Test Mol Biomarkers* 2012.
40. Alves PM, Godoy GP, Gomes DQ, Medeiros AM, de Souza LB, da Silveira EJ, et al. Significance of galectins-1, -3, -4 and -7 in the progression of squamous cell carcinoma of the tongue. *Pathol Res Pract* 2011;207(4):236-40.
41. Elashoff D, Zhou H, Reiss J, Wang J, Xiao H, Henson B, et al. Prevalidation of salivary biomarkers for oral cancer detection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012;21(4):664-72.
42. Brinkmann O, Wong DT. Salivary transcriptome biomarkers in oral squamous cell cancer detection. *Adv Clin Chem* 2011;55:21-34.

# ANEXOS.

## Expresión de la proteína Ki67 en variantes histológicas de carcinoma de células escamosas de la cavidad bucal.

*Dr. Ronell Bologna Molina*

*Especialista en Patología y Medicina Bucal, Doctor en Ciencias Biológicas. Departamento de investigación en Patología y Medicina Bucal, Facultad de Odontología, Universidad Juárez del Estado de Durango – MÉXICO. Facultad de Odontología, Universidad de la República (UDELAR). URUGUAY. (ronellbologna@hotmail.com)*

*Dra. Nataly Barreiro Mendoza*

*Estudiante de la Maestría en Ciencias Estomatológicas, Facultad de Odontología, Universidad Juárez del Estado de Durango – MÉXICO. (genaty8@hotmail.com)*

### RESUMEN

El cáncer se desarrolla a partir de la acumulación y selección sucesiva de alteraciones genéticas y epigenéticas que permiten a las células sobrevivir, replicarse y evadir mecanismos reguladores de la apoptosis, lo que permite una proliferación de manera incontrolada, a su vez existen también modificaciones o alteraciones en las moléculas de adhesión celular, que pueden estar relacionadas al comportamiento biológico de los carcinomas epidermoides. El propósito de esta investigación es determinar la expresión por inmunohistoquímica de la proteína relacionada con la proliferación celular (Ki67) en las variantes histológicas de carcinoma de células escamosas (bien, moderado y pobremente diferenciado) de la cavidad bucal.

**Palabras claves:** Carcinoma de células escamosas de la cavidad bucal, inmunohistoquímica, Ki67.

### ABSTRACT

Cancer develops from the accumulation and subsequent selection of genetic and epigenetic alterations allowing cells to survive and replicate evading apoptosis regulatory mechanisms like the replication and apoptosis, which allows uncontrolled proliferation. There are also modifications or alterations in cell adhesion molecules which may be related to the biological behavior of epidermoid carcinomas. The purpose of this study is to determine the expression of the protein by immunohistochemistry related to cell proliferation (Ki67) in the histological variants of squamous cell carcinoma (well, moderated and poorly differentiated) in the oral cavity.

**Keywords:** Squamous cell carcinoma, oral cavity, immunohistochemistry.

### INTRODUCCIÓN

El cáncer más común de la región oral es el carcinoma de células escamosas de la cavidad oral (CCECO), representando el 90% de las lesiones malignas, definiéndose como una neo-

plasia maligna de origen epitelial que se inicia a partir de células escamosas procedentes de los epitelios estratificados de la mucosa oral. Esta lesión puede aparecer en diversas zonas de la cavidad oral, presentando una alta prevalencia en la región labial. En la región intraoral tenemos la lengua, representando el 50% más común, especialmente en sus bordes laterales y superficie ventral<sup>1</sup>.

El CCECO es el sexto más común en los hombres de raza blanca y de edad avanzada; mientras que en mujeres se encuentra en el lugar número doce. En su estado avanzado infiltra a los vasos linfáticos, lo que es conocido como metástasis, principalmente a los nódulos linfáticos de la región submentoniana, la cadena ganglionar yugular y cervical, para finalmente realizar una metástasis a distancia a otros órganos, tales como: pulmones, hígado y huesos principalmente<sup>2,3</sup>.

El grado histopatológico de un tumor se relaciona a su comportamiento biológico y así tenemos: el carcinoma bien diferenciado, de bajo grado o grado I es aquel tumor que es lo suficientemente maduro como para parecerse mucho a su tejido de origen, crece a un ritmo ligeramente más lento y hace metástasis más adelante en su curso. El carcinoma pobremente diferenciado, de alto grado o grado III o IV es aquel que presenta mucho pleomorfismo celular y nuclear, con poca o ninguna producción de queratina, siendo tan inmaduro que se hace difícil identificar del tejido de origen, aumenta rápidamente y presenta metástasis en curso. Un tumor con una apariencia microscópica entre estos dos extremos es etiquetado como un carcinoma moderadamente diferenciado<sup>4</sup>.

A pesar de las técnicas de cirugía, una vez que se forma el cáncer invasivo el pronóstico es reservado con un promedio de supervivencia a 5 años del 40% de los pacientes afectados. La tasa de mortalidad por cáncer bucal es elevada (más de 6.000 americanos mueren cada año). El diagnóstico precoz del CCECO puede mejorar la supervivencia de los pacientes y reducir significativamente las altas tasas de

mortalidad<sup>5</sup>.

Los datos que aporta el examen clínico y el estudio histopatológico no son totalmente satisfactorios, es por ello que se busca el empleo de nuevos marcadores que contribuyan a determinar el grado de alteración celular<sup>6</sup>.

### Marcadores de proliferación celular

El incremento del número de células por división celular es un proceso ordenado en el organismo; sin embargo, la pérdida de regulación del mismo, genera una proliferación ilimitada e incontrolada de células, debido a mutaciones genéticas. Para este trabajo se revisó la proteína Ki67 que participa en la proliferación celular<sup>7, 8</sup>.

### Ki67 en carcinoma epidermoide

Ki67 es una proteína nuclear, siendo un excelente marcador que determina la fracción de crecimiento que lleva una población celular, ya que es asociada con la proliferación de las células durante la interfase y con la transcripción del ARN ribosomal, Ki67 tiene un peso molecular que oscila entre 345 y 395 kd, se ve expresada en G1, G2 y S del ciclo celular, se cataboliza al final de la fase M y forma parte del complejo ciclina D – cdk<sup>9</sup>.

Soluk y Cols (2012) estudiaron la proliferación celular con el marcador Ki67 y concluyeron que las técnicas de inmunohistoquímica, pueden ser empleadas para medir la fracción de crecimiento en tejidos normales y en carcinoma de células escamosas de la cavidad bucal<sup>10</sup>.

### METODOLOGÍA

Se llevó a cabo la cuantificación de la expresión de Ki67 en 29 muestras tomadas del Instituto Nacional de Oncología y Radiología de la Habana – Cuba; las cuales fueron recolectadas desde el año 2005 hasta el 2010. Todas las muestras son producto de una biopsia insisional o tratamiento quirúrgico. Las muestras fueron fijadas previamente en formol al 10% y posteriormente incluidas en bloques de parafina, para su estudio histopatológico.

### Procedimientos de laboratorio

Una vez revisados los cortes histológicos se seleccionan los bloques para realizar técnicas de inmunohistoquímica.

Se realizó el procedimiento de inmunohistoquímica en el laboratorio a las laminillas en conjunto, empezando con la hidratación, eliminación de parafina, posteriormente desmascaramiento de epítopes, colocación de anticuerpos, revelación, teñidos, deshidratación y coloca-

ción del cubre-objetos sobre dichas laminillas, procedimiento histopatológico que se basa en la utilización de un anticuerpo específico, previamente marcado mediante un enlace químico con una enzima que puede transformar un sustrato en visible, sin afectar la capacidad del anticuerpo para formar un complejo con el antígeno, aplicado a una muestra de tejido orgánico correctamente fijada e incluida en parafina.

### Procedimiento microscópico

Para la cuantificación celular del marcador Ki67 se tomaron fotomicrografías de un campo a 40x, se trabajó con el programa Image J, colocando una gradilla para posteriormente realizar el conteo celular, calculando el número de células positivas entre el total de células por campo, obteniendo así el porcentaje de expresión de los marcadores, mediante la siguiente fórmula:

El procedimiento microscópico se llevó a cabo en el Departamento de Investigación de la Facultad de Odontología, de la Universidad Juárez del estado de Durango.

Células positivas	R x 100 = Label Index
Total de células	

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se estimaron los porcentajes de las células positivas para cada caso de Ki67, generando medias, medianas y desviación estándar.

Para comparar los porcentajes de expresión del marcador de proliferación en el conteo de los 3 grupos, se realizó un análisis de varianza de rangos a través de la prueba de Kruskal-Wallis, mediante el programa estadístico SPS15.0.

### RESULTADOS

Del total de las muestras incluidas correspondían 13 (44.8%) a carcinoma bien diferenciado, 14 (48.3%) a moderadamente diferenciado y 2 (6.9%) a pobremente diferenciado. De las cuales 5 (17.2%) fueron obtenidas de pacientes femeninos y 24 (82.7) de pacientes masculinos, con un promedio de edad de 64.5 ± 14.

Como se describe en la tabla 1, no se encontró una diferencia significativa en la expresión de Ki67 de carcinoma bien diferenciado a pobremente diferenciado (p= 0.209).

La expresión positiva de Ki67 disminuyó progresivamente de carcinoma bien diferenciado (58.87 ± 14.26), a carcinoma moderadamente diferenciado (50.45 ± 16.08) y a carcinoma pobremente diferenciado (46.99 ± 19.48).



Gráfico 1. Género

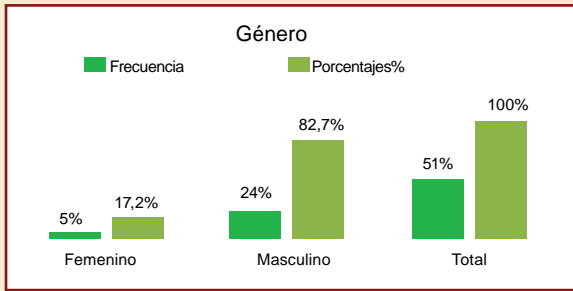


Gráfico 2. Edad

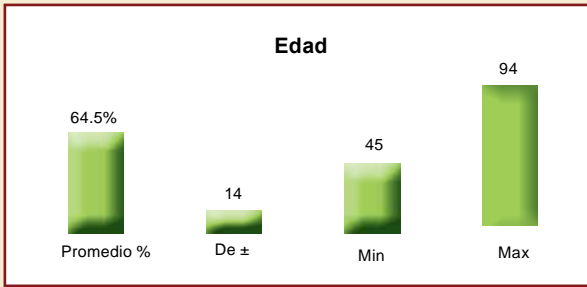


Gráfico 3. Diagnóstico histopatológicos

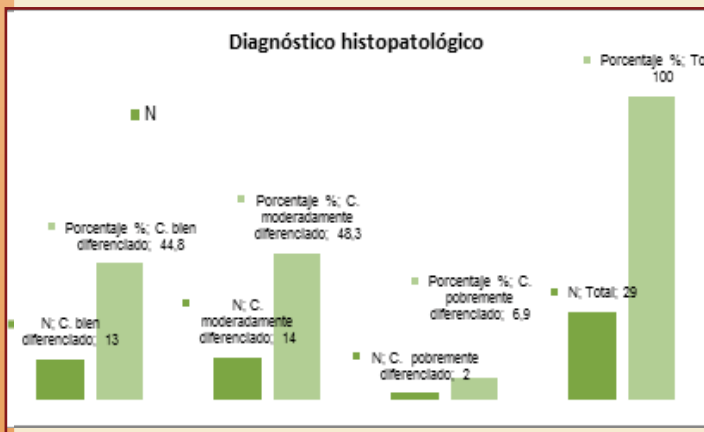


Tabla 1. Expresión de Ki67 en carcinoma bien, moderado y pobremente diferenciado.

	Expresión de Ki67		P
	Media	De ±	
C. bien diferenciado	58.9	14.3	
C. moderado diferenciado	50.5	16.1	
C. pobremente diferenciado	47.0	19.5	
			0.209

Figura 1. Tinción nuclear del marcador Ki67 en un carcinoma.

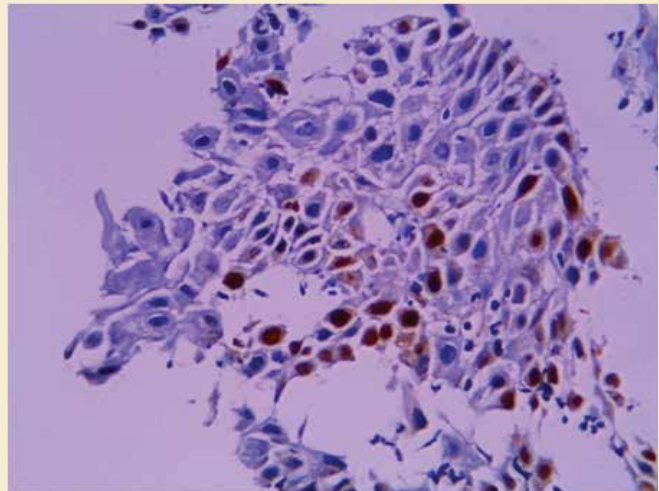


Figura 2. Procedimiento de laboratorio y microscópico.



## DISCUSIÓN

El cáncer es una proliferación incontrolable de las células que trae como consecuencia la mortalidad de la persona que lo padece, esta proliferación acelerada ocasiona que doblen su número en menor tiempo en comparación con las células normales, por lo que llega un punto en el que se pone en peligro la integridad del órgano.

La comprensión de las bases moleculares del carcinoma epidermoide de la cavidad bucal ha aumentado rápidamente durante los últimos años, aumentando el conocimiento de algunos mecanismos celulares que llevan al desarrollo del cáncer en todas sus formas.

En el presente estudio se observó una pérdida progresiva en la expresión de Ki67 de carcinoma bien diferenciado (58.87%) hasta carcinoma pobremente diferenciado (46.99%). Estos resultados son contradictorios pues contrastan con la mayoría de los reportes encontrados en la literatura, como Torres y col. (2009) varios autores han descrito el incremento en la expresión de Ki67 de acuerdo a los grados de alteración histopatológica; sin embargo, no siempre este marcador de proliferación celular se encuentra directamente asociado al pronóstico del tumor, por ejemplo: González Moles y Cols (2010), establecieron en su estudio realizado, que la falta de asociación de la expresión de Ki67 con el pronóstico de los tumores, se debe en parte a que la expresión de Ki67, se refleja en el total de las fracciones de células con diferente capacidad de proliferación.

Una limitante importante en nuestro trabajo, debido a no ser un centro de referencia que contará con grandes archivos de pacientes, la casuística de carcinomas pobremente diferenciados incluidos en el estudio resultó ser muy baja, por lo cual se sugiere hacer estudios multicéntricos con casuísticas más grandes.

## CONCLUSIÓN

Se ha estudiado Ki67 (un marcador de proliferación celular) para poder explicar la carcinogénesis, sin embargo, a pesar del enorme progreso en el campo de la patología molecular, se necesitan estudios con un mayor número de muestras, estudios prospectivos y con seguimiento del paciente, así como la búsqueda de nuevos marcadores o la combinación de distintas proteínas, que contribuyan en la detección

temprana y oportuna del cáncer bucal.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Cantín, L.M.; Suazo, G.I.; Venegas, R.B. & Zambando, M.D. Carcinoma de células escamosas de labio inferior: Asociación entre grado de angiogénesis, graduación histológica y frente de invasión tumoral. *Int. J. Morphol.*, 26(1):77-82, 2008
2. Cawson R, Odell E. *Fundamentos de medicina y patología oral*. 8va edición. España: Elsevier; 2009. P. 277-290.
3. Neville D, Dam D, Allen C, Bouquot J. *Oral and Maxillofacial Pathology*. 2da ed. New York: W.B. Saunders Company; 2002. P. 363
4. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. *Patología Humana*. 8va ed. México: ELSEVIER; 2010.
5. Torres A, Roy S, Craig G, Speight P Expression of Mcm2, geminin and Ki67 in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasias and their corresponding squamous-cell carcinomas. *BJC* 2009;100:1128-1134.
6. Soluk M, Mutlu S, Olgac V. Expressions of bax, bcl-2 and Ki-67 in Odontogenic Keratocysts (Keratocystic Odontogenic Tumor) in Comparison with Ameloblastomas and Radicular Cysts. *TJ Path* 2012.01097.
7. Gupta R, Shah N, Wang K, Kim J, Horlings H, Wong D. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*. 2010;15:464.
8. García García V, González-Moles MA, Bascones Martínez A. Bases moleculares del cáncer oral. *Revisión bibliográfica*. *Av. Odontomatol* 2005;21-6:287-295.
9. González M, Rodríguez A, et al. Suprabasal expression of ki67 antigen as a marker for the presence and severity of oral epithelial dysplasia. *Head and Neck*. 2000;22:658-61.
10. Gruss C, Herlyn M, et al Role of cadherins and matrixins in melanoma. *Curr Opin Oncol* 2001; 13:117-123.
11. González Moles MA, Bravo M, Ruiz A, et al. Ki67 expression in non-tumor epithelium adjacent to oral cancer as risk marker for multiple oral tumors. *Oral disease* 2010; 16:68-75.

\* Recibido 02/05/2013 - Aprobado 23/05/2013 \*