



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ANÁLISIS DE PROLIFERACIÓN CELULAR EN CULTIVO
PRIMARIO DE CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS
ESCAMOSAS. PRESENTACIÓN DE UN CASO.

TESINA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A:

AARÓN SÁNCHEZ TENORIO

TUTOR: Dr. LUIS FERNANDO JACINTO ALEMÁN

ASESOR: Esp. EMILIANO JURADO CASTAÑEDA

MÉXICO, D.F.

2015

Este trabajo fue financiado por el
proyecto PAPIIT IN223414



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.



AGRADECIMIENTO

A ti mamá, por todo tu esfuerzo y sacrificios, por tu amor incondicional y espíritu incansable, y también por todos tus éxitos personales y académicos, por ese ejemplo que nos ha hecho todo lo que somos Paula y yo.



ÍNDICE

1. Resumen	5
2. Introducción	6
3. Generalidades	7
3.1. Epitelios de la mucosa bucal	7
3.2. Drenaje linfático de la boca	8
3.3. Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE)	11
3.3.1. Epidemiología	11
3.3.2. Características clínicas	12
3.3.3. Características histológicas	13
3.3.4. Factores de riesgo	16
3.3.5. Diagnóstico	17
3.3.6. Pronóstico	18
3.3.7. Tratamiento	20
3.4. Cultivos primarios	21
3.5. Técnicas de análisis de proliferación celular	23
3.5.1. BrDU, Bromo Desoxi-Uridina	23
3.5.2. Ki-67	24
3.5.3. MTT	24
4. Planteamiento del problema	26
5. Justificación	27
6. Objetivo General	28
6.1. Objetivos Específicos	28
7. Recursos	29
7.1. Equipo e infraestructura	29
7.2. Recursos humanos	29
7.3. Recursos materiales	29



8. Materiales y métodos	31
8.1. Obtención de la muestra y cultivo primario	31
8.2. Preparación del cultivo en los pozos	32
8.3. Ensayo de viabilidad por MMT	34
8.4. Análisis estadístico	34
9. Resultados	35
9.1. Descripción del caso clínico	35
9.2. Resultados del ensayo MTT	38
10. Discusión	39
11. Conclusiones	42
12. Referencias	43



1. RESUMEN

Introducción: El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es la neoplasia más común en la cavidad oral. Es una neoplasia maligna de crecimiento rápido y desorganizado, por lo cual su análisis de proliferación es un punto importante para la determinación de su conducta biológica.

Objetivos: Determinar la proporción de proliferación celular del cultivo primario de un caso de COCE.

Materiales y método: Se usó un cultivo primario de COCE bien diferenciado invasor, procedente de un paciente masculino de 88 años que se presentó a la clínica de Patología Bucal de la DEPeI de la FO UNAM. Se empleó el ensayo MTT midiendo a las 0, 24 y 48 horas tomando lectura de la absorbancia a 545 nm a través de un espectrofotómetro. Se determinó la proporción de células para cada tiempo.

Resultados: El paciente reportó antecedentes de alcoholismo y tabaquismo, clínicamente se observó un aumento de volumen ulcerado con zonas leucoeritroplásicas y de necrosis. Radiográficamente presentó una zona de resorción correspondiente a la zona anatómica de OD 33 al 47, de bordes irregulares que provocó disminución del espesor mandibular. En el análisis proliferativo de MTT se obtuvo un aumento en la población celular de 17 % en un periodo de 24 horas.

Conclusión: Nuestros resultados nos indican que la proporción de proliferación en un periodo de 24 horas es del 17% para un COCE bien diferenciado. Esto nos sugiere la necesidad de seguir investigando sobre técnicas que ayuden a determinar de manera más precisa la conducta biológica del COCE.



2. INTRODUCCIÓN

El carcinoma oral de células escamosas es la neoplasia más común de la cavidad oral, es una neoplasia maligna que se asocia con el consumo de alcohol y tabaco. Clínicamente se puede observar como un aumento de volumen exofítico y/o endofítico, con zonas de eritroplasia, leucoplasia, úlceras, zonas de necrosis entre otras. Su diagnóstico se basa en el análisis histopatológico. Existen tres grados de diferenciación (bien, moderado y poco diferenciado). Se considera que este parámetro puede sugerir la agresividad de la neoplasia. No obstante, otros parámetros también han sido empleados con tal finalidad, tal es el caso al determinar la proliferación celular.

Las técnicas o ensayos para medir la proliferación pueden ser abordados sobre el paciente mismo, en el análisis histológico o bien en cultivos celulares. El análisis de potencial de proliferación celular es un parámetro básico, muy importante para conocer la conducta biológica de las neoplasias, la velocidad de división celular o en términos más coloquiales su agresividad. La importancia de este parámetro tiene injerencia a nivel individual al dar a conocer el patrón específico de proliferación tumoral en un individuo.



3. GENERALIDADES

3.1. EPITELIOS DE LA MUCOSA ORAL

El tejido epitelial es uno de los cuatro tejidos básicos que conforman el organismo (conjuntivo, muscular, nervioso y epitelial) cubre todas las superficies del cuerpo, tapiza las cavidades internas y forma las glándulas.¹ Los epitelios descansan sobre una membrana basal que los separa del tejido conjuntivo subyacente. Los epitelios son avasculares y se alimentan por la difusión de nutrientes a través tejido conjuntivo. El tipo de células y su organización determinan su función y esta puede ser protección, absorción o secreción.²

En la cavidad oral están presentes los siguientes tipos de epitelio: El epitelio plano estratificado no queratinizado que conforma a la mucosa de revestimiento, se ubica la en la superficie interna de labios, mucosa yugal,³ en la porción ventral de la lengua y continúa hacia el piso de boca.⁴ El epitelio escamoso estratificado ortoqueratinizado especializado se presenta únicamente en el dorso de la lengua y es un tejido especializado por la cualidad te poseer papilas equipadas con quimiorreceptores sensibles al sabor.^{4, 5}

El epitelio escamoso estratificado ortoqueratinizado conforma la mucosa masticatoria y se encuentra en la encía libre, insertada y en la mucosa palatina.⁶

La región compuesta por el piso de boca, el vientre de la lengua, el surco sublingual y la zona retromolar inferior representa el 20% de la superficie total de la mucosa y es ahí, donde el 75% de los carcinomas orales de células escamosas han sido reportados.³



Los tejidos que conforman la boca, al igual que todos los tejidos del cuerpo, son drenados por vasos linfáticos que se encargan de llevar los productos de desecho celular y del sistema inmune para filtrarlos en los nódulos linfáticos.

3.2. DRENAJE LINFÁTICO DE LA BOCA

La linfa (del latín *lympha* = agua clara) es un líquido acuoso claro, ligeramente amarillento u opalescente, se recolecta del espacio intersticial de todos los tejidos y tiene los mismos componentes que el plasma sanguíneo.⁷

Los capilares linfáticos forman redes en los espacios hísticos y desembocan en los nódulos situados durante su recorrido, el calibre de estos capilares es mayor que el de los capilares sanguíneos y su trayecto menos regular, no poseen válvulas a diferencia de los colectores de diámetro mayor; su característica principal es que la pared endotelial es permeable a partículas de mayor tamaño comparado con los capilares sanguíneos, lo que les permite captar sustancias ajenas e incluso células.⁸

Los nódulos linfáticos consisten en masas de tejido linfático sostenido por una estructura reticular de tejido conjuntivo fibroso de 1-25 mm de diámetro aproximadamente, se sitúan en el curso de los vasos linfáticos, de manera que filtran la linfa y la colectan en el conducto torácico y el conducto linfático derecho antes de alcanzar de nuevo la corriente sanguínea en los troncos braquiocefálicos derecho e izquierdo respectivamente.⁹

Los principales sitios de drenaje linfático de la boca y orofaringe son las cadenas ganglionares cervicales, definidas en siete niveles que agrupan a los diferentes plexos por regiones, y son (**Tabla 1**).



**TABLA 1:
CADENAS LINFÁTICAS CERVICALES**

TABLA 1: CADENAS LINFÁTICAS CERVICALES	
Nivel 1	
IA cadena submentoniana.	IIA cadena submandibular.
Nivel 2	
IIA Cadena anterior a la vena yugular interna.	IIB Cadena posterior a la vena yugular interna.
Nivel 3	Cadena yugular interna (entre el hueso hioides y el cartílago cricoides).
Nivel 4	Cadena yugular interna (entre el cartílago cricoides y la clavícula).
Nivel 5	Cadena espinal accesoria por detrás del músculo esternocleidomastoideo
VA Desde la base craneal hasta el borde inferior del cartílago cricoides.	VB Desde el borde inferior del cartílago cricoides hasta la clavícula.
Nivel 6	Cadena del compartimiento visceral desde el hueso hioides hasta la escotadura supra esternal.
Nivel 7	Cadena del mediastino superior.
Tabla Obtenida de. García Gómez J, Alva L F, García Rena J C, Ortega Nayeli, Espinosa V, Arias G, Caracterización de cadenas ganglionares por US y PET-CT, RevInvest Med Sur Mex, 2013;20(3):136-145 www.medicasur.org.mx/pdf-revista/RMS133-AO01-PROTEGIDO.pdf ¹⁰	



Los vasos linfáticos de la región mandibular drenan hacia los nodos submentonianos, submandibulares y tonsilas linguales.⁵ Los vasos linfáticos de la región maxilar drenan hacia las tonsilas palatinas, nodos retrofaringeos y yugulodigástricos.⁷

La lengua es drenada por un plexo marginal y uno central. Los vasos marginales drenan las caras laterales del dorso y del vientre hacia los nodos ipsilaterales submandibulares y yugulodigástricos. El plexo central drena hacia los nodos submandibulares bilaterales y yugulodigástricos.⁵

Las neoplasias epiteliales, como el carcinoma oral de células escamosas, invaden tejidos distantes principalmente a través de los vasos linfáticos, generalmente hacia los nodos ipsilaterales de la lesión primaria, aunque también pueden ser contra-laterales o bilaterales.¹¹



3.3. CARCINOMA ORAL DE CELULAS ESCAMOSAS

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es una neoplasia epitelial maligna e invasiva con varios grados de diferenciación celular altamente propensa a la temprana extensión y metástasis a nodos linfáticos, ocurre predominantemente en consumidores crónicos de tabaco y alcohol entre la quinta y sexta década de la vida.³

Se puede iniciar como una displasia epitelial la cual prolifera adquiriendo características malignas y puede invadir el tejido conjuntivo subyacente, sin embargo, también se suele originar *de novo*.¹²

El COCE es una patología multisequencial que implica una serie de alteraciones graduales, irreversibles y complementarias entre sí sobre los genes que controlan, el crecimiento, la diferenciación y la muerte celular.⁴

3.3.1. EPIDEMIOLOGÍA

La relación hombre-mujer está bien establecida en diferentes países y en general presenta un predominio en varones, por ejemplo, en los Estados Unidos la relación es 2:1¹³ mientras que en España es e 7:1¹⁴ en México se tenía previamente una proporción de 2:1¹⁵ sin embargo, más recientemente 1:1.1 (2006-2008).¹⁶ La percepción de la juventud mexicana acerca de fumar tabaco es un comportamiento normal y socialmente aceptable, la temprana exposición al tabaco y a bebidas alcohólicas se debe a una sociedad más permisiva y puede estar relacionado al aumento de COCE, específicamente en mujeres.¹⁶



3.3.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Las características comunes de las lesiones de COCE pueden presentar un tamaño variable, oscilando desde unos milímetros a varios centímetros en los casos más avanzados. A medida que la tumoración avanza, se infiltra y se extiende a tejidos vecinos, esto puede ser, por contacto directo o a través de vasos linfáticos pudiendo llegar incluso a invadir los huesos maxilares y la piel.¹³

Los pacientes con COCE temprano son generalmente asintomáticos o con síntomas vagos y mínimos hallazgos clínicos tales como, placas blancas que no desprenden, eritematosas o mixtas.^{7, 12}

En estados más avanzados se puede presentar un crecimiento endofítico, exofítico o mixto con ulceración central, dolor local, dificultad para hablar, abrir la boca, masticar y deglutir, sangrado, pérdida de peso e inflamación del cuello. Se suelen presentar nodos linfáticos inflamados sin presencia de síntomas en las lesiones orales o faríngeas.⁵ Un nodo linfático invadido por el carcinoma se encuentra firme, generalmente no doloroso y aumentado de tamaño. Los sitios más frecuentes de metástasis distante son los pulmones, el hígado y huesos, sin embargo, cualquier parte del cuerpo puede ser afectada.¹¹

Los casos extremadamente avanzados presentan zonas ulcero-proliferativas con áreas de necrosis y extensión a estructuras circundantes como huesos, músculos y piel. En etapas terminales se suelen presentar fístulas, sangrados no tratables, anemia severa y caquexia.¹⁰

Es importante tomar en cuenta que, para el paciente con COCE el sitio anatómico del tumor primario es un factor muy importante para determinar la evolución de la enfermedad y el tratamiento.¹⁴



Diferentes sitios anatómicos de la cavidad oral exhiben diferentes alteraciones oncogénicas que se ven reflejadas en diferentes patrones de crecimiento, comportamiento clínico y pronóstico.¹²

Por ejemplo, el carcinoma lingual aparece como una úlcera indurada que no cicatriza, de bordes elevados, tiene un patrón de crecimiento más rápido que otras regiones, exofítico y endofítico a la vez,¹⁴ más frecuentemente logra metástasis en los nodos linfáticos cervicales y tiene un pronóstico menos favorable.⁴ El COCE de encía generalmente se presenta como un aumento de volumen indurado y ulcerado. En el reborde alveolar puede manifestarse como pérdida de dientes asociada a la invasión ósea y a la inflamación crónica.¹³

3.3.3. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS

El COCE se caracteriza por la proliferación de nidos, cordones o islotes neoplásicos que recuerdan en mayor o menor grado el epitelio escamoso de donde derivan y que suelen penetrar en el tejido conjuntivo, cabe mencionar que cuando la neoplasia no ha traspasado la lamina basal se le considera carcinoma *in situ* dado que está confinado a su tejido de origen y cuando la ha atravesado se la llama invasor.¹² Se han propuesto diversas clasificaciones desde el punto de vista histopatológico, siendo la más aceptada la clasificación de Broders (1927), la cual fue modificada por la OMS y los divide en tres grados de malignidad, según el grado de queratinización, el pleomorfismo celular, nuclear y la actividad mitótica.⁴

COCE bien diferenciado: Presentan una gran semejanza con las células epiteliales, se observa abundante formación de queratina en forma de perlas corneas o como queratinización celular individual. La atipia celular y el número de mitosis son mínimos. Se observa un infiltrado inflamatorio crónico

peritumoral bastante marcado, formado por linfocitos y células plasmáticas
(Fig. 1).³

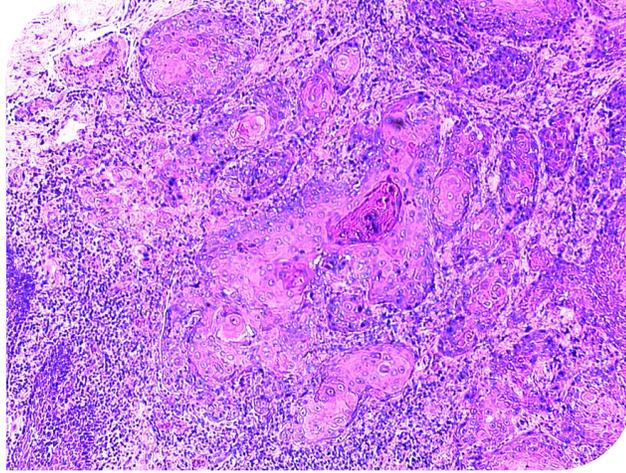


Fig. 1 Carcinoma Oral de Células Escamosas Bien Diferenciado observado a 40x, cortesía de la DEPeI de la FO UNAM

COCE moderadamente diferenciado: Presentan una menor semejanza con las células epiteliales, el grado de atipia nuclear y el número de mitosis son mayores. Además, disminuye la formación de perlas corneas y la queratinización individual tiende a aumentar **(Fig. 2)**³

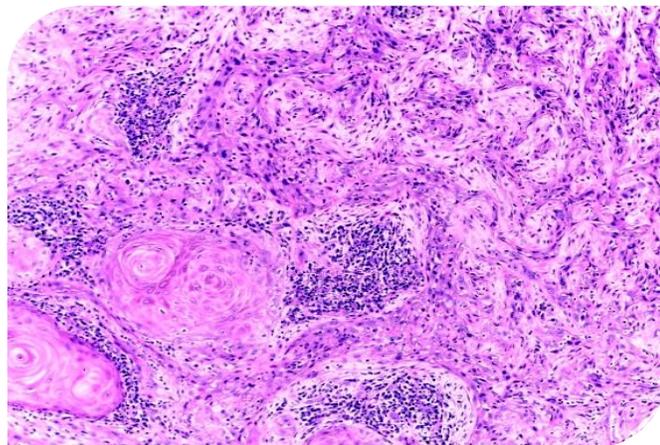


Fig. 2 Carcinoma Oral de Células Escamosas Moderadamente Diferenciado observado a 100x, cortesía de la Clínica de Patología Bucal de la DEPeI de la FO UNAM.

COCE poco diferenciado: La similitud con las células epiteliales es tan pequeña que en ocasiones es difícil establecer el origen de estos tumores y hay que recurrir a técnicas inmunohistoquímicas para demostrar si hay positividad a la citoqueratina. Además está presente un gran pleomorfismo nuclear y un elevado número de mitosis aberrantes, mas de 5 por campo de observación (**Fig. 3**).³

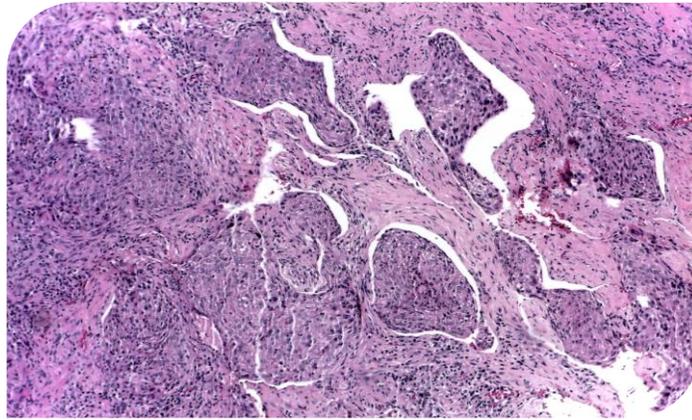


Fig. 3 Carcinoma Oral de Células Escamosas Poco Diferenciado observado a 100x, cortesía de la Clínica de Patología Bucal de la DEPel de la FO UNAM.

Los tumores bien diferenciados son de bajo grado de clasificación, es decir de mejor pronóstico y los poco diferenciados son de alto grado de clasificación y por lo tanto de pronóstico más desfavorable. En el COCE existen algunas variantes basadas en el aspecto clínico y características histológicas, estas son: El COCE verrucoso, acantolítico, basaloide, papilar, fusiforme, adenoescamoso, y el cuniculatum.³

Las características histológicas del COCE pueden diferir ampliamente de un área a otra dentro del mismo tumor, por lo que se cree que la información pronóstica más útil puede ser obtenida del Frente de Invasión Tumoral (FIT) zona donde residen las células tumorales más agresivas.⁴



3.3.4. FACTORES DE RIESGO

Los factores de riesgo por excelencia son el consumo crónico de tabaco y alcohol, ya sea por separado o de manera conjunta, sin embargo, existen otros factores menos frecuentes y/o complementarios como la exposición a radiaciones, la infección por virus del papiloma humano y otras aún en discusión, como la sífilis y la candidiasis crónica. Otros factores comprobados son la inmunodepresión, y casos endémicos de consumo de sustancias cancerígenas como las hojas de betel en Asia. Estos factores están relacionados con el estilo de vida, pero el entorno, la ocupación y la genética también tienen injerencia.^{3, 13}

El roce continuo con dientes en mal posición o prótesis desajustadas en zonas ya vulnerables también ha sido considerado como un posible factor promotor complementario de la carcinogénesis oral dado el trauma y la inflamación crónica, sin embargo, no ha sido demostrado.¹⁵

Así mismo, la higiene oral y el estado de los dientes también resultan implicados, aunque aun, de manera incierta, debido a que se ha observado de manera generalizada escasa higiene oral en los pacientes con COCE.¹³

Existen lesiones precancerosas, actualmente denominadas desordenes potencialmente malignos, o lesiones potencialmente cancerígenas (definidas por la OMS como tejido de morfología alterada, más propenso a generar neoplasias que el tejido equivalente de apariencia sana)¹⁶ tales como: lesiones, leucoplásicas, eritroplásicas o mixtas, liquen plano, fibrosis submucosa, lupus eritematoso discoide, queratosis sublingual, queilitis actínica entre otras.¹⁷



3.3.5. DIAGNÓSTICO

Según Scully y Bagán, cualquier aumento de volumen, úlcera, lesión blanca o roja, alveolo no cicatrizado persistente durante más de tres semanas, parestesia, o pérdida de dientes sin causa evidente debería considerarse como cáncer hasta que se demuestre lo contrario.¹⁶

Para ello, el diagnóstico siempre se confirma mediante la biopsia y análisis histopatológico. La muestra debe tomarse de la zona más alterada, evitando áreas necróticas o muy ulceradas, pudiendo ser necesaria más de una biopsia.¹⁸

En caso de lesiones menores a 1cm se recomienda biopsia excisional y en lesiones mayores incisional.¹⁹

En los pacientes que presentan adenopatías cervicales junto con el tumor primario, la biopsia debe tomarse en la zona del tumor y no en el nódulo cervical. En tales situaciones, la punción-aspiración con aguja fina (PAAF) puede esclarecer la afectación linfática.¹³

El azul de toluidina se ha utilizado como marcador de las lesiones orales potencialmente malignas, pudiendo identificar lesiones tempranas. Puede servir para perfilar la extensión del epitelio displásico o del carcinoma a la hora de realizar las biopsias, además de ayudar a detectar tumores secundarios y ayudar en el seguimiento de los pacientes en sospecha de recidiva. Hay estudios que sugieren que el azul de toluidina se une a las zonas donde se han producido cambios genéticos (pérdida de la heterocigosidad) que se han asociado con la displasia y el COCE. Puede servir de ayuda para tomar la biopsia, pero, sin llegar a sustituirla.²⁰



3.3.6. PRONÓSTICO

La evaluación del pronóstico y la terapéutica se ha basado en la clasificación TNM (tumor, nodo, metástasis).⁴

La UICC (Union For International Cancer Control) es una organización internacional que existe para ayudar a la comunidad global a acelerar la lucha contra el cáncer, fundada en 1933 en Ginebra, Suiza. La UICC ha publicado la clasificación TNM (Tumor, Nodo, Metastasis) desde hace más de 50 años y es el estándar internacionalmente aceptado para la estadificación, pronóstico y tratamiento del cáncer.²¹ Esta clasificación es un material adoptado y difundido por la OMS, actualmente existe una clasificación TNM para cada región anatómica del cuerpo humano.

El sistema de clasificación TNM actualmente es el más usado y confiable factor pronóstico para tratar el cáncer,^{3, 21} dado que no requiere más que análisis clínico facilitando la atención en las regiones del mundo donde no existen las condiciones apropiadas para realizar estudios de laboratorio **(Tabla 2)**.

El principal problema con el sistema TNM es que no predice efectivamente los resultados de los pacientes porque no toma en consideración la biología tumoral y las características moleculares,²² sino solo aspectos clínicos del tumor primario y los nódulos linfáticos. Añadir esta información al proceso de clasificación puede resultar útil para complementar la estadificación TNM.²³



TABLA 2: CLAVES PARA LA CLASIFICACIÓN TNM

T- Tumor primario	N- Nódulos linfáticos regionales	M-Metástasis distante
<p>Tx- Tumor primario que no puede ser evaluado.</p> <p>T0- Sin evidencia de tumor primario.</p> <p>Tis- Carcinoma <i>in situ</i>.</p> <p>T1- Tumor de 2cm o menos en su mayor dimensión.</p> <p>T2- Tumor de más de 2cm pero no mayo de 4 cm en su mayor extensión.</p> <p>T3- Tumor de más de 4cm en su mayor dimensión.</p> <p>T4(Labios) Tumor que invade hueso cortical, nervio alveolar inferior, piso de boca o piel de barbilla o nariz.</p> <p>T4a- Tumor que invade hueso cortical, músculos extrínsecos de la lengua, senos maxilares o piel de la cara.</p> <p>T4b- (Labio Y Cavidad Oral) Tumor que invade espacio de masticación, laminas pterigoideas o base de cráneo o rodea la arteria carótida Interna.</p>	<p>Nx- Nódulos os linfáticos regionales que no pueden ser evaluados.</p> <p>N0- No presenta metástasis en nódulos linfáticos regionales.</p> <p>N1-Metastasis en un solo nódulo ipsilateral de 3cm o menor en su mayor dimensión.</p> <p>N2- Metástasis como se especifica en n2a, 2b, 2c abajo.</p> <p>N2a- Metástasis en un solo nódulo ipsilateral de no más de 6 cm en su mayor extensión.</p> <p>N2b- Metástasis en múltiples nódulos linfáticos ipsilaterales de no más de 6cm en su mayor dimensión.</p> <p>N2c- Metástasis en nódulos linfáticos bilaterales o contra laterales de no más de 6cm en su mayor dimensión.</p> <p>N3- Metástasis en un nódulo linfático de más de 6 cm en su mayor extensión.</p> <p>Nota: Los nódulos de línea media son considerados Ipsilaterales</p>	<p>Mx- Metástasis distante que no puede ser evaluada.</p> <p>M0- Sin metástasis distante.</p> <p>M1- Metástasis distante.</p>

Ésta tabla fue obtenida de: Slootweg, Evenson JW. Tumors of oral cavity and oropharynx: Introduction. 166-167 En: Barnes L, Evenson JW, Reichart P, Sidransky D. (Eds) World Health Organization Classification of tumors Pathology and Genetics Head and Neck Tumors. IARC Press: Lyon 2005.³



TABLA 3: AGRUPACIÓN (Los nódulos linfáticos regionales son los cervicales)			
GRADO 0	Tis	N0	M0
GRADO I	T1	N0	M0
GRADO II	T2	N0	M0
GRADO III	T1,T2,	N1	M0
	T3	N0,N1	M0
GRADO IVA	T1,T2,T3,	N2	M0
	T4a	N0,N1,N2	M0
GRADO IVB	CUALQUIER T	N3	M0
	T4b	CUALQUIER N	M0
GRADO IVC	CUALQUIER T	CUALQUIER N	M1

Tabla obtenida de Slootweg, Evenson JW. Tumors of oral cavity and oropharynx: Introduction. 166-167 En: Barnes L. Evenson JW, Reichart P, Sidransky D. (Eds) World Health Organization Classification of tumors Pathology and Genetics Head and Neck Tumors. IARC Press: Lyon 2005.³

Según en su artículo, Lucinei determinó que en Sao Paulo los índices de supervivencia de pacientes con COCE a 5 años son bajos, 28.6%, especialmente si se compara con otras neoplasias⁴

3.3.7. TRATAMIENTO.

El tratamiento para el cáncer está propuesto en guías elaboradas por Instituciones y organizaciones nacionales e internacionales, basadas en acuerdos mediados por autoridades locales e internacionales, las cuales proponen planes de tratamiento basados en tres directrices fundamentales que son, resección, radioterapia y quimioterapia, aplicadas en diferentes combinaciones o en conjunto según sea necesario para la extensión y la región anatómica afectada.



Las recomendaciones son de carácter general por lo que no definen un curso único de conducta clínica, las variaciones establecidas en las guías, al ser aplicadas, deben basarse en el juicio clínico de quien las emplea, según las necesidades específicas de cada caso, así como los recursos disponibles al momento de la atención y la normatividad establecida por cada institución. A continuación se presenta un ejemplo nacional y uno internacional.¹⁹

IMSS-323-10 Guía de práctica clínica para el diagnóstico y tratamiento del cáncer epidermoide de cavidad oral en pacientes mayores de 18 años.¹⁹

NCCN Version 1 . 2015 Clinical Practice Guidelines in Oncology. Head and Neck Cancers. (NCCN Guidelines®) ²⁴

3.4. CULTIVOS PRIMARIOS

Se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de células *in vitro*, preservando al máximo sus propiedades fisiológicas bioquímicas y genéticas. Las células son capaces de dividirse y crecer hasta ser limitadas por algunas variables como el consumo total de nutrientes o la limitación del espacio físico (inhibición por contacto).²⁵

Se denominan cultivos primarios a aquellos cultivos preparados directamente a partir de un tejido u órgano. Pueden iniciarse con o sin micro-disección previa para separar los distintos tipos celulares. En estos cultivos las células están vivas, conservan sus características originales y su proliferación es limitada. Pueden ser removidas del recipiente de cultivo para formar cultivos secundarios.²⁶

Las células primarias suelen utilizarse más que las líneas celulares porque se consideran más parecidas a las células *in vivo*, muchas líneas celulares han sido cultivadas por periodos superiores a los 10 años y suelen presentar



diferencias significativas tanto con el cultivo original como entre distintos cultivos de las mismas células en laboratorios diferentes, y esta divergencia de fenotipos puede ocasionar problemas en la interpretación y comparación de resultados. Un ejemplo de esto lo constituye la bien conocida observación de que la tasa de crecimiento celular aumenta al prolongar el periodo de cultivo.²⁶

Para el cultivo celular se utilizan contenedores de plástico con medios líquidos nutritivos que contienen pequeñas cantidades de una serie de moléculas necesarias para la proliferación celular, tales como: sales, glucosa, aminoácidos, vitaminas, etc. Además, incluyen una mezcla poco definida de macromoléculas adicionadas bajo la forma de suero fetal bovino, equino, o extracto crudo de embriones de pollo, como consecuencia se han desarrollado medios químicamente definidos llamados “libres de suero” que poseen componentes nutricionales específicos para cada propósito. En general los medios están tamponados para mantener un pH de 7.4 y tienen indicadores de pH como el rojo fenol que cambian de color a medida que aparecen catabolitos ácidos. Se suelen agregar antibióticos y antimicóticos para evitar la contaminación.²⁶ Un objetivo o utilidad de los cultivos celulares es la aplicación de ensayos para el análisis de la diferenciación, migración o proliferación de las células de interés. Cada ensayo aporta información particular de la conducta celular. Por ejemplo, la determinación de la proliferación celular sugiere cual sería la velocidad de recambio celular o potencial de crecimiento del tejido u órgano de origen.



3.5. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE PROLIFERACIÓN CELULAR

El análisis de proliferación es el registro del crecimiento de una población celular en un determinado periodo de tiempo. Para ello se emplean marcadores de proliferación celular, los cuales, han sido clasificados en tres categorías: 1 marcadores de fracción de crecimiento (como el anticuerpo ki-67 y MTT), 2 marcadores de fases específicas del ciclo celular (como BrDU) y 3 marcadores del tiempo del ciclo celular.²⁷

3.5.1. BrDU, Bromo Desoxi-Uridina

Este método tiene como objetivo cuantificar la fracción de las celular en la fase-S del ciclo celular. BrDU actúa como un análogo de la timina y de esta manera se incorpora al ADN recién sintetizado y es detectado usando un anticuerpo inmunofluorescente. Las ventajas de usar BrDU son que permite identificar y analizar la fracción tisular con ciclo celular activo y toda la cinética celular, es decir que, es posible identificar las células viables, y por lo tanto, también es posible cuantificar la proliferación. Además, tiene una gran aplicación para determinar el grado de daño tisular por radiación dado que esto depende de la etapa del ciclo celular en la que se encuentran las células.²⁸

BrDU detecta 5-bromo-2-desoxiuridina incorporada en el ADN durante la proliferación usando un anticuerpo anti BrDU. La magnitud de la absorbancia en el color desarrollado es proporcional a la cantidad de BrDU incorporado a las células, lo cual, es una indicación directa de proliferación celular, este ensayo puede ser usado tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*.²⁹



3.5.2. Ki-67

El antígeno Ki-67 es uno de los marcadores proliferativos más usados actualmente y ha sido de gran ayuda para el diagnóstico y determinación de la agresividad de varios tipos de cáncer. Ki-67 es una proteína nuclear que se expresa en todos los procesos activos del ciclo celular (G1, S, G2 y mitosis) pero está ausente en las células en reposo (G0). Al contrario que muchas otras proteínas asociadas al ciclo celular, el antígeno Ki-67 se encuentra sistemáticamente ausente en las células quiescentes y no es detectable durante los procesos de reparación del ADN.³⁰

Ki-67 es una proteína de las células cuyo nivel aumenta a medida que estas se preparan para dividirse. Mediante un procedimiento de coloración es posible medir el porcentaje de células tumorales que contienen Ki-67 (resultado positivo). Cuantas más células positivas hay, mayor es la velocidad con la que se dividen. Si bien estos datos pueden ofrecer información útil aun no es un procedimiento rutinario por lo que no aparecerá en el informe patológico a menos que se solicite.

3.5.3. MTT

La prueba o ensayo MTT (Metil-Thiazolyl-Tetrasolium) es ampliamente usada en la valoración de citotoxicidad, viabilidad celular y estudios de proliferación en biología celular. Consta de una solución acuosa amarillenta la cual se reduce por la actividad metabólica de la deshidrogenasa mitocondrial presente en células vivas posteriormente es secretado en forma de cristales violeta-azul formados según la concentración de células viables (**Fig. 5**).³¹ Ese ensayo es empleado para análisis *in vitro*, tanto para cultivos primarios como para líneas celulares. Se considera que la cantidad de cristales de formados determinada por la absorbancia, será proporcional a la viabilidad o proliferación celular de la muestra con mayor grado de exactitud.

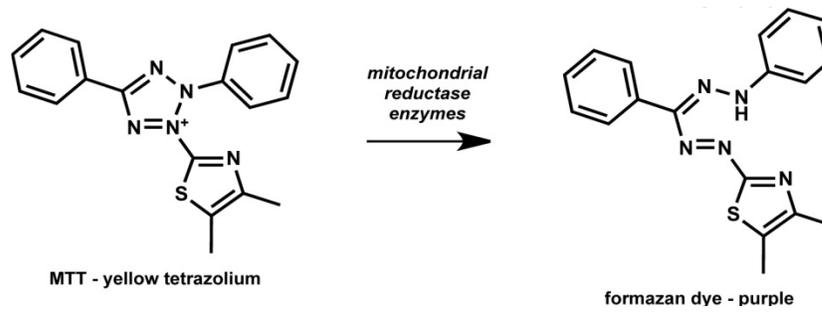


Fig. 5 Reducción del MTT por acción de la enzima Reductasa Mitocondrial.



4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las neoplasias malignas son entidades patológicas de crecimiento celular desorganizado y veloz, ésta última característica es de gran importancia para conocer la velocidad de crecimiento de la lesión primaria. El COCE como neoplasia maligna se considera que tiene una conducta local y regional agresiva. El empleo de métodos para determinar su potencial proliferativo se ha enfocado sobre variables clínicas (TNM) o en el mejor de los casos marcadores tales como Ki-67. Resulta necesario determinar cuál es el potencial proliferativo de los carcinomas para cada caso, ya que esto permitirá estimar la conducta biológica de la neoplasia, en ese sentido posibilitar mejoras a los pronósticos. Las aproximaciones metodológicas empleando técnicas tales como BrDU o MTT, se restringen en muestras fijadas e incluidas para su análisis histológico, sin embargo, las técnicas de cultivo primario pueden favorecer el empleo de las mismas.



5. JUSTIFICACIÓN

Conocer el tiempo y la proporción con la cual se multiplican las células de un caso en particular puede ser muy útil para correlacionarlo con variables clínicas e histológicas como el grado de diferenciación, esto puede permitir complementar el diagnóstico y pronóstico.

Este primer reporte podrá estimar el porcentaje proliferativo de un individuo específico y en un futuro podrá dar la posibilidad de comparar el resultado con otros casos de carcinoma y con tejidos sanos.

En México no existen reportes de análisis de proliferación o viabilidad celular a través del ensayo MTT en COCE por medio de cultivos primarios, siendo creciente la tendencia global en incluir datos de proliferación en los reportes histopatológicos de neoplasias con el fin de entregar un diagnóstico más completo que repercuta directamente en un pronóstico más específico y la asignación de un plan de tratamiento más adecuado a las condiciones particulares de su padecimiento.



6. OBJETIVO GENERAL

Determinar la proporción de proliferación celular del cultivo primario de un caso de COCE.

6.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Llevar a cabo una revisión de la literatura actual sobre conceptos básicos y generales de esta entidad patológica.

Analizar las características clínicas de un caso de COCE.

Determinar la proporción de proliferación celular a través del ensayo MTT.



7. RECURSOS

Este proyecto fue financiado mediante el programa PAPIIT IN223414.

7.1 Equipo e infraestructura.

Los ensayos y experimentos fueron realizados en el laboratorio de Patología Bucal Clínica y Experimental, contando con los siguientes equipos:

Auto Clave (All American, Modelo 25x, EU)

Baño María (Thermo scientific Modelo 2242 EU)

Campana de flujo laminar (Baker, Edge Gard, Maine, EU)

Centrífuga Universal (Sorvall, Modelo: 750044, CHINA)

Incubadora (Queue, Stabil Therm Modelo: QWJ300TABB, EU)

Lector de Placas (Chro-Mate Awareness Technology INC Modelo: 4300, EU)

Microscopio invertido (ZEISS Modelo: 37881, EU)

Refrigerador (Cool lab Modelo 3767 Hertz, EU)

7.2. Recursos humanos.

Asesor de cultivo celular

7.3. Recursos materiales.

Equipo de filtración al vacío (Corning 500ml Bottle Top Filter, EU)

Filtro (Corning Incorporate, 25 mm Syring Filter 431222 Alemania)

Hematocitómetro (Sigma – Aldrich, Bright-Line E.U)

Cajas Petri 100mm



Pipetas 10 ml, 5 ml, 1ml (Exacta Cruz TM Technology, INC.CHINA)

Micropipetas 1 μ l,- 10 μ l, 10 μ l-100 μ l, 100 μ l- 1000 μ l (Exacta Cruz, Technology)

Placas de cultivo celular 96 pozos (Corning incorporate, EU)

Puntas para micropipeta de 10 μ l-100 μ l, 100 μ l- 1000 μ l (Bio Centrix, EU)

Tubos 15 ml (UltraCruz, Santa Cruz biotechnology)

Tubos 50 ml (UltraCruz, Santa Cruz Technology)

Probetas graduadas

Vasos de precipitado

Agua Desionizada

Alcohol al 70%

Azul De Tripán

Medio de cultivo DMEM with 4.5g/L Glucose y L-Glutamine, without Sodium Pyruvate (sc -224478 Santa Cruz Biotechnology)

MTT (Vibrant MTT Molecular Porbes, Invitrogen, EU)

Suero Fetal bovino 500ml (Gibco Life technologies LOT: 1606662 EU)

Solución de PBS 1X, 10X

Tripsina 0.25%–EDTA 1X (Gibco Life technologies LOT: 1391607 EU)



8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Obtención de la muestra y cultivo primario.

Obtención de la Muestra: Se tomó una muestra de tejido de un paciente de 88 años de edad, sexo masculino con una lesión localizada en el reborde alveolar derecho, radiográficamente presentó disminución de la densidad ósea en la porción derecha del cuerpo mandibular así como bordes irregulares.

Se realizó biopsia obteniendo dos fragmentos, uno para análisis histopatológico, procesado convencionalmente para su inclusión en parafina, cortes cada 4µm y tinción con H&E. El segundo fragmento fue empleado para realizar cultivo primario, teniendo una dimensión de 5x5x5mm aproximadamente. Posterior a su obtención quirúrgica, el fragmento fue lavado en solución salina fisiológica 0.9% NaCl para la eliminación de sangre. Seguido de este paso la muestra fue inmersa en PBS, DMEM, SFB 10% antibiótico/antimicótico (penicilina 100u/ml, estreptomicina 100µg/ml y anfotericina B 0.25µg/ml. Posteriormente, este fragmento fue lavado con PBS-antibiótico/antimicótico (penicilina 100u/ml, estreptomicina 100µg/ml). El espécimen fue seccionado en fragmentos de 1x1mm aproximadamente. Posteriormente los fragmentos fueron colocados en un tubo de 15ml estéril para centrifuga, adicionando 3ml de tripsina al 0.25% incubado a 37°C durante 30 minutos, realizando agitación mecánica por inversión de tubo cada 15 minutos. Seguido de esto, fueron adicionados 7ml de DMEM SFB 10% antibiótico/antimicótico para posteriormente fue colocado en una caja de cultivo de 75cm² a 37°C con 5% CO₂.

Se conservó la caja en incubación por 7 días, retirando los fragmentos de tejido y realizando el cambio de medio de cultivo fresco. Una vez obtenida la confluencia del 80%, se realizó el subcultivo. Se retiró el medio de cultivo presente para realizar el lavado con PBS/EDTA 0.04% a 37°C, se incubó con



tripsina al 0.25% durante 10 minutos, se colocó DMEM SBF 10% antibiótico/antimicótico, se recuperó el contenido para centrifugar a 1800rpm durante 3 minutos, el botón celular fue dividido en tres cajas de 25cm². Las poblaciones celulares analizadas para los ensayos subsecuentes fueron las pertenecientes del tercer al decimo pase o subcultivo.

8.2. PREPARACION DEL CULTIVO EN LOS POZOS

Para calcular la cantidad de células que serán colocadas en los pozos para realizar el ensayo MTT se realizó procedimiento de conteo celular por el método de exclusión con azul tripano (Cabe mencionar que el azul tripano solo tiñe a las células que presentan daños en la membrana plasmática y no las células viables).³²

Se retiró el medio de cultivo y se enjuago el interior del contenedor de 25 cm² con PBS estéril (solución buffer de fosfatos), posteriormente se añadió 1.2ml de solución de tripsina para eliminar la adherencia celular a las paredes del contenedor, posteriormente se neutralizó la acción de la tripsina agregando el doble del volumen de medio de cultivo fresco, se llevó toda la mezcla formada a un tubo de ensayo para ser centrifugada a 1800 rpm durante 3 minutos, y así, separar las células de la mezcla de medio de cultivo y tripsina; se obtuvo un botón sedimentario en el fondo del tubo de ensayo, se retiró la fase líquida, dejando el botón y un sobrenadante de 1ml, se formó una suspensión aspirando y liberando suavemente el contenido del tubo con ayuda de una micropipeta y se tomó el 1% del total de la mezcla, lo que equivale a 10µl, se mezcló con 90µl de azul tripano, mezclando el contenido. Se colocó 10µl de un lado de la cámara de Neubauer, también conocida como hemocitómetro se cuantificaron únicamente los cuatro cuadrantes externos con la ayuda de un microscopio óptico invertido ZEISS Primo Vert. Con un aumento de 10x. **(Fig. 6).**

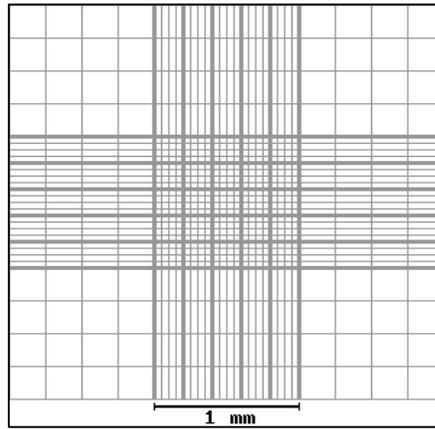


Fig. 6 Campos de observación en cámara de Neubauer

Se determinó el total de células presentes en los campos de observación, a este valor se aplicó la siguiente fórmula para obtener un número estimado del total de células que hay por mililitro. $\text{Total de células observadas} \div 4 (10) (10) (10^4) = \text{células / ml}$. Se colocó un promedio de 10,000 (diez mil células) en una placa de 96 pozos usando tres de ellos para cada control de la siguiente manera (**Fig. 7**).

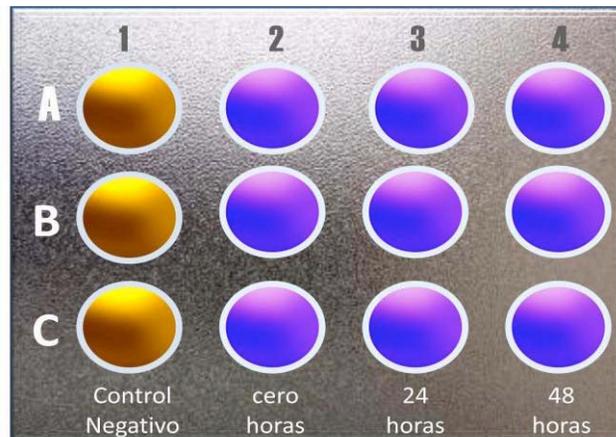


Fig.7 Disposición de los cultivos celulares en placa de 96 pozos para toma de lectura de absorbancia.



8.3. ENSAYO DE VIABILIDAD POR MTT

Para este procedimiento se utilizó el sistema Vibrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit V-13154. Se agregaron 10µL de la solución de 12 mM de MTT cada pozo correspondiente al ensayo de 0(cero) horas, después se Incubó a 37°C y 5%CO₂ durante 4 horas. Posteriormente se adicionó 50µl de DMSO y se mezcló el contenido de cada pozo de usando una pipeta para formar una suspensión y se incubó por 10 minutos a 37°C y 5%CO₂ y se tomó lectura de la absorbancia a 540nm, repitiéndose el proceso con las muestras de 24 y 48 horas respectivamente.

El control negativo se constituyó de 100µl de DMEM y 10µl de reactivo MTT, sin presencia de células.³³

8.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

De las medidas de absorbancia obtenidas se determinó la media y la desviación estándar correspondientes a cada tiempo.

9. RESULTADOS

9.1. DESCRIPCIÓN DEL CASO CLÍNICO.

Se presentó a la clínica de patología bucal de la DEPEI de la Facultad de Odontología UNAM un paciente masculino de 88 años de edad, de ocupación campesino, exfumador y exbebedor (tiempo y cantidad de cigarrillos no especificado en la HC) sin antecedentes heredo-familiares y personales patológicos de relevancia para el padecimiento actual, argumentando como motivo de la consulta... (no especificado en la HC).

A la exploración extraoral presenta un aumento de volumen indurado localizado en la porción derecha del cuerpo mandibular de límites difusos, sin alteración en color y textura de la piel (**Fig. 8**).



Fig. 8 Fotografía de exploración extraoral.

A la exploración intraoral se observa una lesión ulcerativa que abarca la región anterior desde el órgano dental 33 hasta el 47 en el cuadrante inferior derecho con zonas eritematosas, leucoplásicas, necróticas y telangiectásicas (**Fig. 9**).

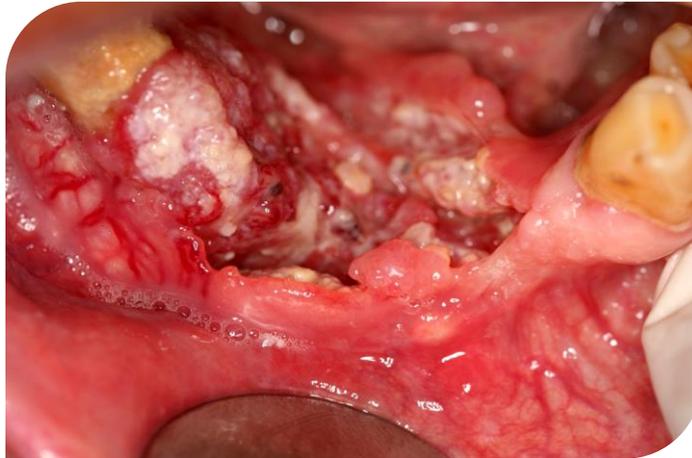


Fig.9 Fotografía de exploración intraoral, se aprecia lesión primaria en cuadrante inferior derecho.

En la Ortopantomografía se observó una zona de resorción ósea que coincide con la región afectada, la cual, muestra un espesor severamente disminuido y una superficie irregular (**Fig. 10**).



Fig. 10 Ortopantomografía, cortesía de la Clínica de Patología Bucal de la FO UNAM.

Se remitió al servicio de cirugía maxilofacial para realizar biopsia y posterior análisis histopatológico en el cual se observó:

Descripción Macroscópica. Se recibe una muestra de tejido blando y duro que en conjunto mide 1.5 x 2.3 x 1.0 cm, el componente de tejido duro correspondiente a OD 43, el tejido blando adherido a la raíz el cual se

desprende de forma y superficie irregular, color blanquecino con áreas negras, al corte se observa sólido de consistencia firme. Se incluye en su totalidad en cápsula FO 280-15 A, B, C; A y B para procesar, C para desmineralizar (**Fig. 11**).



Fig.11 Espécimen obtenido de la biopsia.

Descripción Microscópica: En los cortes histológicos examinados se observó una proliferación de células neoplásicas de estirpe epitelial, que presentan pleomorfismo celular y nuclear, nucléolos evidentes, mitosis anormales y aumentadas organizadas en islas y nidos, queratinizaciones grupales e individuales infiltrando un tejido conjuntivo fibroso denso con presencia de infiltrado inflamatorio crónico peritumoral. También se observa necrosis coagulativa y abundante neoformación vascular. Bordes no evaluables, la totalidad del tejido observado muestra crecimiento tumoral (**Fig.12**).

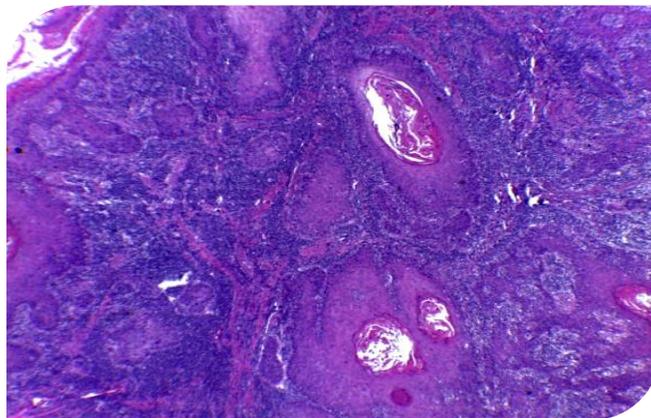


Fig. 12 Microfotografía de corte histológico 100x, cortesía de la Clínica de Patología Bucal de la DEPel de la FO UNAM.



Con estos elementos se reportó el diagnóstico de Carcinoma Oral de Células Escamosas Bien Diferenciado e Invasor.

9.2. RESULTADOS DEL ENSAYO MTT

A las 0 (cero) horas se obtuvo un valor promedio de la absorbancia de 0.732 equivalente a 10,000 células. A las 24 horas el promedio de la absorbancia en los pozos fue 0.581 equivalente a 7,937 células aproximadamente. A las 48 horas el promedio de absorbancia fue 0.684 equivalente a 9,344 células aproximadamente (**Tabla 4**). Haciendo una comparación entre el promedio de las lecturas de 24 y 48 horas se observó un aumento de 17%, que corresponde a un incremento de 1,407 células aproximadamente en 24 horas (**Fig. 13**).

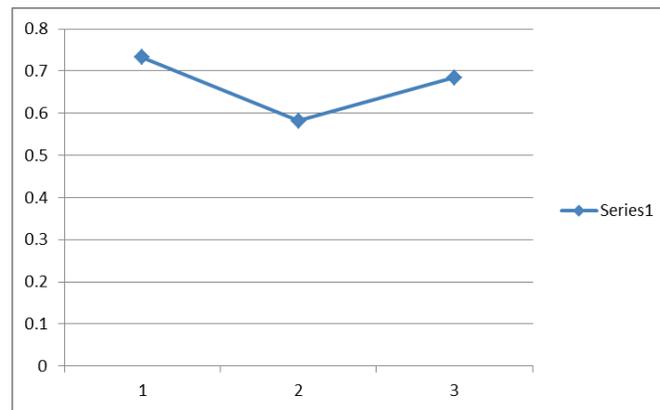


Fig. 13 Gráfica de registro del promedio de las lecturas de absorbancia

TABLA 4: MEDIA Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR			
Tiempo	0hrs	24hrs	48hrs
Promedio de absorbancia y D.E.	0.732 (±0.08)	0.581 (±0.16)	0.684 (±0.03)
Numero células	10,000	7,937	9,344



10. DISCUSIÓN

El COCE es una neoplasia común en personas a partir de la quinta y sexta década de la vida.³ En nuestro caso clínico la edad del paciente fue de 88 años. El diagnóstico a tan elevada edad puede derivar de varios factores que suelen retrasar el diagnóstico oportuno, como menciona Bendan Noonan en su artículo (2014)³³ y Katayoun Sargeran (2013)³⁴ donde factores tales como, socioeconómicos, educativos, psicológicos, creencias locales, disponibilidad de servicios odontológicos, médicos y tratamiento alternativo de los síntomas pueden ser los responsables de dicho retraso.

En la historia clínica de nuestro paciente se reportaron datos de toxicomanía tales como tabaquismo y alcoholismo previos. Dentro de los factores de riesgo comúnmente asociados al COCE estos dos factores son los más reportados. Según Yuan Chin Amy Lee (2014)³⁵ la interacción entre tabaco y alcohol está muy bien establecida en cáncer de cabeza y cuello con un efecto multiplicativo de 3.08 según datos de la International Head and Neck Cancer Epidemiology INHANCE, sin embargo la mayoría de los casos reportados han sido atribuidos en mayor frecuencia al consumo de tabaco solo, seguido de la combinación con alcohol y muy pocos casos han sido atribuidos solo al consumo de alcohol.

La zona anatómica más común para el desarrollo del COCE es en borde lateral de lengua, sin embargo, se puede presentar en encía tanto en maxilar como en mandíbula. En nuestro paciente la apariencia clínica y los estudios imagenológicos indicaron una gran extensión del COCE. Esta extensión puede derivar del retraso en el diagnóstico o bien por la falta de atención oportuna. La calidad de vida de la persona se ve comprometida según la extensión de la lesión, previa, y posterior a una intervención terapéutica, como indica Johannes Van Gemert en su artículo (2015)³⁶ y Shinivas Rathod (2015)³⁷ los aspectos de mayor impacto en la calidad de vida antes y



después de la resección se dividen en un componente funcional y otro de carácter emocional subjetivo, en cuanto a lo funcional están: el habla, la masticación y la deglución, y en cuanto a la parte emocional está el impacto sobre las áreas social, psicológica, cognitiva y emotiva. Estos factores son prioridad para guiar la toma de decisiones en muchas situaciones oncológicas asociadas al tratamiento de elección.

Respecto al grado de diferenciación, no hay consenso sobre el grado de diferenciación más frecuente dado que algunos autores como Sánchez Maya en su artículo de (1999)³⁸ reporta al pobremente diferenciado como la variante más frecuente mientras que Meza-García y Cols. (2009)³⁹ refieren al bien diferenciado como el más frecuente, estos dos datos corresponden a la población mexicana, sin embargo, otros autores como Aliyah A. y Cols.⁴⁰ reportan en su artículo de (2014) sobre población egipcia (Cairo) un predominio de carcinoma pobremente diferenciado. Ermer MA, en su artículo de (2015)⁴¹ sobre población alemana (Freiburg) reporta al moderadamente diferenciado como el más frecuente, esto refuerza que las variables del grado histológico dependen epidemiológicamente de la población analizada.

El reporte histopatológico derivado del servicio de diagnóstico del laboratorio de patología bucal, presento un carcinoma oral de células escamosas bien diferenciado e invasor. El grado de diferenciación se ha asociado con la agresividad de la neoplasia, es decir, los COCE pobremente diferenciados son más agresivos. En este caso, a pesar de ser un COCE bien diferenciado la extensión de la neoplasia fue muy amplia, nuevamente podemos asociar este criterio a factores derivados del retraso en el diagnóstico.

En nuestro ensayo MTT se observó que en el periodo comprendió entre las 0 y 24 horas existió una reducción de la población celular, lo cual que corresponde a un fenómeno de adaptación al contenedor, en el cual algunas células no lograron sobrevivir dada su incapacidad para fijarse a las paredes



del pozo. Sin embargo, en el periodo comprendido entre las 24 y 48 horas se registró un aumento en la población celular (17%) dada la adaptación y estabilidad lograda, así como al potencial propio de la población celular.

Es importante comparar este tipo de estrategias contra lo reportado en muestras procesadas convencionalmente. Aliyah A, (2014) ⁴⁰ reporta que en su estudio utilizó Ki-67, dado que es una proteína nuclear humana asociada al ciclo celular cuya expresión esta estrictamente asociada a la proliferación, por esa razón, los anticuerpos contra la proteína Ki-67 son ampliamente usados por patólogos en diferentes tipos de neoplasia, como una herramienta de diagnóstico. El reporte patológico debe incluir información acerca de la tasa de crecimiento celular. Un porcentaje alto sugiere un crecimiento veloz, por lo tanto, cáncer más agresivo. Las pruebas como Ki-67 pueden incluir la fracción celular en fase S, lo que nos dirá el porcentaje de células que están en proceso de copiado de ADN. (Por ejemplo) en tejido mamario un resultado menor de 6% es considerado bajo, de 6-10% intermedio y mayor del 10% es considerado alto. Este tipo de estrategia puede ser empleado en cáncer oral, y de ser posible en COCE.⁴²

Para lograr que funcione a gran escala la correlación entre diagnóstico histopatológico y datos de proliferación celular es imprescindible comparar contra tejido sano y otros casos de la patología correspondiente, así como validarlo con otras técnicas de medición ya empleadas como Ki-67 y BrDU.

El resultado de este estudio únicamente se puede correlacionar con el diagnóstico particular de este caso. Es necesario incluir todos los grados de diferenciación, así como todas las variantes histológicas para poder establecer parámetros generales de valor diagnóstico.



11. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos se concluye que el caso clínico presentado fue un COCE bien diferenciado invasor de un paciente masculino de 88 años con antecedentes de tabaquismo y alcoholismo. El ensayo de análisis proliferativo a través de la técnica de MTT en la medición realizada entre las 24 y 48 horas registro un aumento del 17% en la viabilidad de las células, lo cual representa la proporción proliferación-tiempo directamente relacionado al diagnóstico reportado de COCE bien diferenciado e invasor de nuestro paciente.

EL reporte histopatológico debe incluir información sobre la tasa de proliferación de las neoplasias para diagnosticar y pronosticar de manera más precisa su conducta biológica en cada caso particular.

Existe una gran cantidad de condiciones y cuidados que se deben seguir para obtener resultados de valor, y gracias a esta experiencia se han hecho evidentes, la realización de este trabajo ha resultado en una aproximación didáctica valiosa, un acercamiento, al rigor, seriedad y meticulosidad con que se deben abordar y elaborar los protocolos experimentales, aun mas, cuando del cuidado de la vida de otros seres se trata, ya que los profesionales de la salud llevamos la responsabilidad de dar respuesta oportuna a las necesidades de la población, dado que esta deposita su confianza en nuestros conocimientos.



12. REFERENCIAS

1. Lee L, Lipincott, Histología de Bolsillo, Williams & Wilkins, Wolters Kluwer, 2014;11-24.
2. Leeson T, Leeson R. Histología, Ed. Interamericana. universidad de Alberta, Edmonton Canada, 1984;328-329.
3. Slootweg, Evenson JW. Tumors of oral cavity and oropharynx: Introduction. 166-167 Barnes L. Evenson JW, Reichart P, Sidransky D. (Eds) World Health Organization Classification of tumors Pathology and Genetics Head and Neck Tumors. IARC Press: Lyon 2005.
4. Arriagada CO, Venegas RB, Cantin LM., Zabando MD, Manterola DC, Sauzo GI. Rol de las características clínicas e histológicas como factores pronósticos par la sobrevida de pacientes con carcinoma de células escamosas de la cavidad oral. Rev. Chilena de Cirugía, 2010;vol-62, N-5, 441-448.
5. Geneser F. Histología, Ed. Panamericana, tercera edición 2000;468-471.
6. Kühnel W. Taschen Atlas der zytologie und mikroskopischen anatomie, 5ta ed. Ediciones Omega SA, Barcelona 1982;176-177.
7. Liebgott. The anatomic basis of dentistry, 2da. Ed. 2001, St. Louis Missouri, 396-400.
8. Williams P, Warwick R. Gray Anatomía. Alhambra Longman. 1era ed. Madrid.1982;842-847.
9. Romanes GR. Cunningham-Tratado de Anatomía. 12va edición, Mcgraw-Hill 1991.
10. García Gómez J, Alva LF, García Rena JC, Ortega Nayeli, Espinosa V, Arias G, Caracterización de cadenas ganglionares por US y PET-CT, RevInvest Med Sur Mex, 2013;20(3):136-145 www.medicasur.org.mx/pdf-revista/RMS133-AO01-PROTEGIDO.pdf.
11. Neville B D, Dam D. Oral and maxilofacial pathology, 2a edición. Elsevier Science. 2001;356-367.
12. Costa A, Araujo Junior RF, Ramos CC. Correlation between TNM classification and malignancy histological feature of oral squamous cell carcinoma, Rev. Braz. Otorrinolaringol, 2005;71:181-187.
13. Gracia Sarrión Pérez M, Servei de Publicacions, Universitat de Valencia, Tesis doctoral, 2011;16-22.
14. Oliveira L R, Riveiro Silva A, Costa J P, Simoes A L, Matteo M A, Zucoloto S, Pronostic factors and survival analysis in a simple of oral quamous cell carcinoma. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology, 2008; 106: 685-695.
15. Pérez MA, Raimondi AR, Itoiz ME. An experimental model to demonstrate the carcinogenic action of oral chronic raumatic ulcer. J Oral Pathology. Med 2005;34:17-22.



16. Scully C, Bagan J, Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol.* 2009;45:301-8.26.
17. Ben Slama L. Precancerous lesions of the bucal mucosa. *Rev Stomatol Cir Maxilofac.* 2001;102:77-108.
18. Natori T, Koga M, Aneqawa E, Nakashima Y, Tetsuka M, Yoh J, et al. Usefulness of intraoral ultrasonography to predict neck metastasis in patients with tongue carcinoma. *Oral Dis.* 2008;14:591-9.
19. Martinez G, Resendiz Colosia J A, Reyes Vivanco C A. Diagnóstico y tratamiento del cáncer epidermoide de la cavidad oral en pacientes mayores de 18 años, México, 2010 Secretaría de Salud, www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.html.
20. Gandolfo S, Pentenero M, Broccoletti R, Pagano M, Carrozzo M, Scully C. Toluidine blue uptake in potentially malignant oral lesions in vivo: clinical and histological assessment. *Oral Oncol.* 2006;42:89-95.
21. Union for International Cancer Control (UICC). www.uicc.org/index.php?id=508. <http://www.uicc.org/about-uicc>. Consultado en: Octubre 2015.
22. Howald HP, Kainz M, Euler B, Vorast H. Proposal for modification of the TNM staging clasification for cáncer of the oral caity. *DOSAK, Craniomaxilofac Surg* 1999; 27:275-88.
23. Lucinei Oliveira R, Ribeiro Silva A, Oliveira Costa JP. Prognostic Factors and survival analysis in a simple of oral squamous cell carcinomapatients, *Orasl Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, Vol 106, No, 5, 2008, 685-695.
24. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®). http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp. Consultado en: Octubre 2015.
25. Castaño M E. Cultivos celulares. Ed. Biogénesis. udea.edu.co/index/php/biogénesis/article.
26. Pietrasanta L, Von Bilderberg C. Tópicos en Biofísica Molecular, users.df.uba.ar/catalina/TBM/TBM_labo4.pdf.
27. Morgan S, Darling D. *Animal cell culture*, BIOS scientific publishers 1993, 159.
28. Muller X, Slabbert J, P. Comparison of two different cell cycle proliferation analysis methods using Brdu. *PhysicaMedica*, 2015 V-32, supplement 1.
29. BrdU Cell Proliferation Assay Kit. <http://media.cellsignal.com/pdf/6813.pdf>. Consultado en: Octubre 2015.
30. Da Ros Motta R, Galeano Zettler C, Cambuzzi E, Pereira Jotz G, Brutti Berni R. Ki-67 and p53 correlation prognostic value in squamous cell carcinomas of the oral cavity and tongue, *Braz J Otorhinolarngol*, 2009; 75 (4):544-49.



31. Stockert C J, Blasques Castro A, Cañete M, Horobin W R, Villanueva A. MTT assay for cell viability: intracelular localization of the formazan product in lipid droplets. *Acta Histoquímica* 2012, 114785-796.
32. Jorquera A. Cuantificación de la viabilidad celular con azul tripano, [www.revistabiomedica.org/index.php/biomédica/article/download,2011; 647-651](http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomédica/article/download,2011;647-651).
33. Sargeran K, Murtomaa H, Seied M, Reza S, PP040: The role of socio-economic factors and dental service utilization in treatment delay among oral cancer patients in Tehran, Iran, 2013, *Oral Oncology*, vol. 49, supplement 1; 107.
34. Noonan B. Understanding the reasons why patients delay seeking treatment for oral cancer symptoms from a primary health care professional: An integrative literature review. *European Journal of Oncology Nursing*, 2014, vol 18, issue 1; 118,124.
35. Yuan Chin AL, Hashibe M. Tobacco, alcohol, and cancer in low and high income countries. *Annals Of Global Health*, vol 80, issue 5: 2014; 378-383.
36. Johannes Van G, Holtslag I, Van Der Vilt A, Merx M, Koole R. Health-related quality of life after segmental resection of the lateral mandible: Free fibula flap versus plate reconstruction, 2015, *Journal Of Craniofacial Surgery*, vol. 43, Issue 5; 658-662.
37. Shrinivas R, Livergant J, Klein J, A systematic review of quality of life in head and neck cancer treated with surgery with or without adjuvant treatment. *Oral Oncology*. Issue 51:2015;10; 888-900.
38. Sánchez Maya MP, Díaz Villanueva D y Carasco Aparicio G. Frecuencia de carcinoma epidermoide en cavidad bucal en el Hospital Central Militar de 1987 a1997. *Med Oral* 1999; 1:20-22.
39. Meza-García G, Muñoz Ibarra JJ, Páez Valencia C, Cruz Legorreta B, Aldape Barrios Beatriz, Carcinoma de células escamosas de cavidad bucal en un centro de tercer nivel de atención social en la ciudad de México. Experiencia de cinco años, *Avances en Odontostomatología*, Vol. 5- Num. 1-2009.
40. Aliyha A, Mohamed S, Ehab S. Prognostic significance of KI-67 inmunohistochemical expression in diferent OSCC grades.2014, vol. 6, No. 2;223-235.
41. Ermer MA, Kirsch K, Bittermann G, Fretwurst T, Vach K. Recurrence rate and shift in histopathological differentiation of oral squamous cell carcinoma- A long term retrospective study over a period of 13.5 years.2015, *Journal Of Cranio-Maxilo-Facial Surgery*, 43; 1309-1313.
42. Rate of Cell Growth. http://www.breastcancer.org/symptoms/diagnosis/rate_grade. Consultado en: Octubre 2015.