



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD.
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

TITULO:

“ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO
DE CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LA
CAVIDAD BUCAL EN 2 GRUPOS DE DIFERENTES
EIDADES”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M en C. FRANCISCO GERMÁN VILLANUEVA SÁNCHEZ

TUTOR:

DR. LUIS ALBERTO GAITÁN CEPEDA.

JEFE DEL LABORATORIO DE PATOLOGÍA CLÍNICA Y EXPERIMENTAL
DE LA DEPEI FACULTAD DE ODONTOLOGÍA UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:

DRA. ELBA ROSA LEYVA HUERTA

LABORATORIO DE PATOLOGÍA CLÍNICA Y EXPERIMENTAL DE LA DEPEI
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., 2016



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.

Contenido

Carcinoma de células escamosas de la cavidad bucal.....	6
Etiología.....	9
Hábito tabáquico y alcohólico.....	9
Virus papiloma humano.....	13
Genoma Viral.....	13
Transmisión.....	14
Mecanismo de infección.....	15
Mecanismos de carcinogénesis.....	16
Asociación de VPH con las lesiones potencialmente malignas(LPM) y el CCECB.....	17
Factor pronóstico.....	17
Bases moleculares del cáncer bucal.....	19
Ciclo Celular.....	20
Genes supresores de tumores.....	21
Gen pRb.....	22
Gen p53.....	22
Gen p73.....	24
Genes BRCA-1 y BRCA-2.....	24
FHIT.....	24
APC.....	25
Oncogenes.....	26
RAS.....	26
EGF.....	26
HER-2/NEU.....	27
Factores Neuroendocrinos.....	27
MYC.....	27
Ciclina D1/Kinasa 4 Ciclín dependiente (CDK4).....	27
CDC25.....	27
Ciclina B1.....	28
Ciclina E.....	28
Apoptosis.....	28
Alteraciones citogénéticas y genéticas; inestabilidad del genoma.....	30

Modificación epigenética del dna por hipermetilación de regiones promotoras.....	32
Actividad de la telomerasa.....	33
Asociación a otros factores.	33
Otros factores etiológicos asociados a pacientes jóvenes.....	34
Desordenes potencialmente malignos.	35
Presentación Clínica.	37
Localización.....	39
Características clínicas de la lesión.....	42
Métodos de diagnóstico	43
Características Histopatológicas	45
Clasificación TNM de los CCECB.....	46
Opciones terapéuticas	46
Calidad de vida y pronóstico de los pacientes con CCECB.....	47
Teoría de las células troncales cancerosas.....	48
Células troncales	48
Células troncales y la cavidad bucal.....	49
Células troncales cancerosas	50
Anticuerpo CD44 como marcador pronostico en cáncer bucal.	52
CD44 como auxiliar diagnóstico en saliva y en sangre.	54
Justificación :	55
Pregunta de investigación.....	55
Objetivos específicos.	56
Materiales y Métodos:	56
Criterios de inclusión:	56
Criterios de exclusión:	57
Criterios de eliminación:	57
Flujograma de trabajo	58
Consideraciones éticas	61
Análisis estadístico.....	61
Resultados.....	61
Fotomicrografías.....	68
Resultados de Inmunohistoquímica	72
Discusión.....	79

Conclusiones.....	85
Bibliografía.....	88
11.- Spitz MR, Fueger JJ et al. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. A case comparison analysis. <i>Cancer</i> 1988 Jan 1;61(1)203-8.....	88
127.- Ponta Helmut, Sherman Larry & Herrlich Peter A. CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. <i>Nature Reviews Molecular Cell Biology</i> 4, 33-45 (January 2003).....	99
128.- David Naor, Shulamit B. Wallach-Dayana, Muayad A. Zahalka, Ronit Vogt Sionov. Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. <i>Seminars in Cancer Biology</i> , Volume 18, Issue 4, Pages 260-267.....	99

"ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO DE CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LA CAVIDAD BUCAL EN 2 GRUPOS DE DIFERENTES EDADES"

Resumen: El cáncer bucal se sitúa dentro de las 10 neoplasias malignas más frecuentes en el ser humano, donde el 95% de los casos corresponden a carcinoma de células escamosas de la cavidad bucal (CCECB). La carcinogénesis oral es un proceso multifactorial asociada a diversos factores de riesgo. Actualmente se ha propuesto una estrecha relación etiológica entre virus asociados como son virus papiloma humano, herpes virus etc. Así mismo se ha tratado de evidenciar la teoría de las células troncales cancerosas (CTC) como iniciadoras en los cambios neoplásicos y comportamiento biológico agresivo de estas entidades patológicas. **Objetivo:** Identificar las características histopatológicas y de inmunoexpresión en 2 grupos de pacientes (jóvenes y adultos) que presentan carcinoma de células escamosas de la cavidad bucal.

Metodología: Se trata de un estudio transversal, descriptivo, comparativo y ambispectivo, se realizó una búsqueda exhaustiva y se revisaron 20804 casos de CCECB existentes en el archivo de histopatología del laboratorio de patología clínica y experimental de la DEPeI Facultad de Odontología, de los cuales se seleccionaron 41 que cumplieron con los criterios de inclusión 20 casos correspondientes a pacientes jóvenes y 21 a pacientes mayores, todos los casos fueron revisados por 2 patólogos bucales expertos y se analizaron sus características histopatológicas de acuerdo a los criterios de Broders y del Frente de invasión tumoral FIT , para posteriormente realizarles técnica de inmunohistoquímica para el anticuerpo CD44.

Resultados: los resultados en general se dividieron en dos grupos el Gpo.1 corresponde a pacientes jóvenes y el Gpo.2 a adultos, en el Gpo.1 la media de edad fue de 29.05 con un 75% de pacientes del sexo masculino, en el Gpo.2 la edad promedio fue de 72.76 con un 57.2% de casos del sexo femenino; el sitio de localización más frecuente en jóvenes fue con un 25% el reborde alveolar y en el de adultos con un 47.6% el borde lateral de la lengua. En lo que corresponde al grado de diferenciación el 85% se clasificó como bien diferenciado en el primer grupo y en el segundo grupo con el mismo grado de diferenciación el 71.42% de los casos; respecto a la inmunoreactividad para el anticuerpo CD44 fue con intensidad fuerte en el 28.5% de los pacientes jóvenes y en un 14.2% en los pacientes adultos. Se realizó X2 para asociación entre variables obteniendo asociaciones estadísticamente significativas entre las variables del sexo masculino y pacientes adultos mayores con una $P=0.03$ IC 95%, localización anatómica del CCECB y el grupo de pacientes jóvenes con una $P=0.01$ IC 95%, Grado de diferenciación moderado entre el grupo de pacientes jóvenes y el de adultos con una $P=0.05$ IC 95% y el grado de inmunoreactividad débil entre el grupo de jóvenes y adultos con una $P=0.03$ IC95%.

Conclusiones: El CCECB no presenta características diferentes significativas entre el grupo de pacientes jóvenes y adultos mayores, si bien tiene algunas específicas como el sitio de localización diferente, el grado de diferenciación histológica es similar en la mayoría de los casos es bien diferenciado lo que nos indica que la neoplasia tiene un comportamiento biológico similar y el grado de inmunoreactividad para el anticuerpo CD 44 es muy parecido en ambos grupos, este anticuerpo es muy útil en la identificación de nichos de CTC sin embargo es poco específico en los tejidos por lo que recomendable utilizarlo en conjunto con otros Oct4 y Sox2.

Carcinoma de células escamosas de la cavidad bucal.

Los tumores de la cavidad bucal y la oro faringe de acuerdo a su estirpe pueden clasificarse en los que se originan del epitelio, mesenquimales y hematolinfoides. Los tumores epiteliales se sub clasifican en los que son originarios del epitelio de recubrimiento de la cavidad bucal y oro faringe y así mismo los de glandulas salivales. Los derivados del tejido hematolinfoide se describen en otro apartado dentro de las enfermedades hematolinfoides a pesar de su localización en cavidad bucal y orofaringe (1).

El cáncer de cabeza y cuello representa uno de los 10 mas frecuentes a nivel mundial, con 500000 nuevos casos diagnosticados anualmente, según la definición y clasificación del mismo dada por la OMS, es una neoplasia localmente invasiva que presenta diferentes grado de histodiferenciación y con una alta probabilidad a producir metastasis de manera temprana y extensiva hacia los ganglios linfaticos, se presenta frecuentemente en adultos mayores entre la quinta y sexta decada de la vida, los factores de riesgo fuertemente asociados es el hábito tabáquico y alcohólico (1).

El carcinoma de células escamosas de la cavidad bucal (CCECB) es el cáncer más frecuente de las neoplasias malignas que se presentan en esta región anatómica representa aproximadamente el 3-4% de las mismas y más del 95% de todos los cánceres de cabeza y cuello. La incidencia del CCECB es variable dependiendo del área geográfica estudiada. En el año 2002 se reportaron 274000 casos de CCECB con mayor predilección por sujetos del sexo masculino casi en dos tercios en comparación con las mujeres. El área geográfica más afectada se localizó en Oceanía específicamente en la Melanesia (31.5 por cada 100000 hombres y 20.2 por cada 100000 mujeres). La tasa en hombres es mayor en el este de Europa (11,3 por cada 100000), sur de Europa (9.2 por cada 100000), sur de Asia (12.7 por 100000), sur de África (11.1 por 100000), Australia y Nueva Zelanda (10.2 por 100000). En mujeres, la incidencia es relativamente mayor en el sur de Asia (8.3 por 100000). (2)

Estos patrones nos muestran la prevalencia de factores de riesgo específicos de cada área geográfica como el uso de tabaco/alcohol en el este y sur de Europa y sur de Asia o el hábito de mascar betel en el sur de Asia y Melanesia o el hábito de fumar con la candela hacia dentro en centro y sur de América.



Australia reporta una alta tasa de cáncer de la cavidad bucal y de tejidos peri bucales como el labio, el cual está directamente relacionados con la exposición a la radiación UV por riesgo laboral en la mayoría de los casos por lo que la mortalidad es por término medio menos que la mitad de la incidencia. En otras regiones como en Taiwán esta neoplasia se convirtió en el sexto cáncer más frecuente en la población general y el cuarto en los individuos del sexo masculino (1). En la India es la neoplasia más frecuente, representando hasta el 40-50% de todos los cánceres. Sin embargo, en EEUU o Europa su incidencia es sólo del 4%. Esta diferencia se debe a los diferentes hábitos en el consumo del tabaco principalmente y alcohol aunque la tasa de incidencia ha aumentado últimamente en la mayoría de las regiones a nivel mundial (3-4).

En lo que respecta al panorama en Estados Unidos, la población afroamericana es la más afectada presenta una tasa elevada de cáncer de la cavidad bucal y oro faringe, presentándose hasta 4 veces más que en blancos y latinos, comprometiendo también la supervivencia a 5 años, la cual es menor en ese grupo etario asociado a un diagnóstico tardío en etapas avanzadas de la enfermedad.

El perfil demográfico del CCECB es típico presentándose con mayor frecuencia entre la 5ª y 7ª década de la vida con una mayor predilección en varones pero el incremento en el hábito tabáquico de la mujer desde finales de los años sesenta ha hecho que la proporción hombre/mujer haya cambiado de 10:1 a 2:1 o llegando incluso a cifras similares en ambos sexos en algunas áreas geográficas en específico. Un país con estas características es España, se estima que la incidencia del cáncer oral es para los hombres de 5.7 a 12.9 casos por 100000 habitantes/año, y entre las mujeres del 0.6 al 2.1 por 100.000 habitantes/año (5).

Hasta hace más de dos décadas el CCECB se presentaba en paciente con un perfil demográfico característico, con mayor frecuencia en varones entre los 60 y 70 años con un historial de hábito tabáquico y enólico crónico, con higiene bucal deficiente y condiciones bucales pobres en general, lo que por lógica suponía a nivel morfológico y molecular que la exposición prolongada a estos factores condicionaban mutaciones a nivel ultra estructural de la célula en el núcleo específicamente ADN, que le confería clínicamente al paciente a lo largo de los años la presencia de lesiones potencialmente malignas como la leucoplasia o eritroplasia o bien el carcinoma in situ o micro invasor o bien invasor lo que se traducía en la ulcera, el aumento de volumen y todas las características clínicas ya conocidas de la lesión. Pero en la actualidad el perfil demográfico ha sufrido cambios importantes, reportándose a nivel mundial una estadística que prende un foco rojo en cuanto al incremento en la incidencia del CCECB que va del 0.4 al 4% en pacientes menores de 40 años que se considera un grupo de individuos jóvenes y en donde los factores de riesgo antes mencionados no están presentes. (6).

En estados unidos se ha reportado una tendencia de porcentaje creciente de CCECB en pacientes jóvenes así como en varios países Europeos y China desde la década de 1970 a la fecha. En el subcontinente Indio donde hay una tasa global mayor de casos de CCECB, se presenta con el mismo comportamiento inclusive el sitio de establecimiento primario en orden de presentación es cavidad bucal y posteriormente la oro faringe. Shiboski reporta un incremento en el carcinoma de amígdala, lengua y base de lengua en pacientes blancos jóvenes en un periodo de tiempo estudiado de 1973 al 2001 en EUA. Datos similares se han detectado en otros países como Inglaterra, Escocia, Suiza, Escandinavia y Eslovaquia (7).

Cabe mencionar que algunos autores han reportado que el CCECB que se presenta en este grupo etario tiene tanto características clínicas, localización, tiempo de evolución diferente al que se presenta en pacientes adultos mayores, así mismo se ha relacionado esta neoplasia con un comportamiento biológico más agresivo y alta capacidad de metastatizar en un periodo de tiempo corto con una

alta tasa de recidivas tanto loco regionales como a distancia importantes, así como un mayor involucro de las cadenas linfáticas asociadas al sitio primario de aparición de la misma. (8)

Otros reportes evidencian que mientras la incidencia del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello ha descendido de manera general en algunas áreas geográficas específicas, la incidencia del cáncer oro faríngeo y de lengua ha aumentado en pacientes jóvenes, a pesar de que en este grupo la exposición a tabaco y alcohol se puede considerar que comprende un periodo corto en comparación con el grupo de adultos mayores la aparición de la lesión primaria en la mayoría de los casos es súbita sin que le antecedan lesiones potencialmente malignas o predictoras de malignidad. (9-10).

Etiología.

Hábito tabáquico y alcohólico.

La primera y más importante causa del cáncer de las vías aerodigestivas superiores es el hábito tabáquico. Se estima que entre el 85 y 90% de los casos con cáncer de las vías aerodigestivas superiores son explicados por la exposición al tabaco y el riesgo proporcional a la intensidad de la exposición; así los fumadores intensos tienen un riesgo superior respecto a los fumadores ocasionales (11). Desafortunadamente se prevé un incremento en la incidencia de estas neoplasias, ya que recientemente se ha registrado un importante incremento en la frecuencia del tabaquismo principalmente en individuos jóvenes. De acuerdo al Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI) en México, entre los adolescentes (12-17 años) se ha observado un incremento en los patrones de consumo, no obstante a que a esta edad es ilegal el uso de tabaco; además, reconoce que su consumo se hace cada vez a edades más tempranas. (12)

De los 13.7 millones de personas de 12 a 17 años reportados por el INEGI, 16.1% había consumido tabaco; de este porcentaje, 9% fumó en el año previo a la entrevista y 7.1% lo hizo alguna vez en la vida, abandonándolo después. Aunque el tabaquismo pasivo se asocia principalmente al cáncer pulmonar, es importante mencionar que la cantidad de fumadores pasivos (5.2 millones) que conviven con personas que fuman, entre la población de 12 a 17 años es mayor al total de fumadores y ex fumadores en esta edad (2.2 millones). Cabe subrayar que los fumadores pasivos entre los 12 a 17 años representan el 38.3% de la población de este grupo de edad. Por otra parte, según el área de residencia, la proporción de adolescentes que viven en zona urbana y que han fumado, fumadores y ex

fumadores (17.2%) es mayor a la de quienes habitan en áreas rurales (13.1%). (12)

Por género, entre adolescentes existe un mayor porcentaje de hombres (15.4%) y mujeres (4.8%) en áreas urbanas que fuman, comparado con quienes viven en localidades rurales (11.3% de varones y 1% de mujeres). (12)

En el caso de los fumadores pasivos, la mayoría (78.5%) tiene residencia urbana, el resto se localizan en zonas rurales. Cabe agregar que uno de cada cinco varones ya había consumido tabaco (fumadores y ex fumadores) al término de los 17 años de edad.

Por otra parte, sólo poco más de siete de cada 100 varones de residencia urbana usó tabaco al menos una vez en su vida y lo dejó (ex fumadores); en el caso de los que habitan en áreas rurales, casi 11 de cada 100 presento la misma condición. (12)

En el panorama mundial el tabaco y el alcohol son los responsables del 75% de los cánceres orales y oro faríngeos en Europa, América y Japón. El aumento en la incidencia del CCECB se ha atribuido al aumento del consumo de alcohol en el Norte de Europa y al aumento de tabaco en zonas del Sur de Europa. Aproximadamente el 80% de los pacientes con CCECB han sido fumadores, teniendo estos pacientes un riesgo de 5 a 7 veces mayor de desarrollar tumores de cabeza y cuello que los no fumadores. Además, los pacientes que continúan fumando después del diagnóstico del tumor inicial tienen el riesgo multiplicado por 6 de desarrollar un segundo tumor primario en el tracto Aero digestivo que los pacientes que dejan de fumar (13).

Se han identificado más 300 sustancias consideradas como carcinógenos han derivados de la combustión y de los componentes solubles que se filtran a la saliva. Los más relevantes son los benzopirenos y las nitrosaminas específicas del tabaco, nitroso-nor-nicotina (NNN), nitrosopirrolidina, nitrosodimetilamina y 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK). El benzopireno es un potente carcinógeno que se encuentra en cada cigarro de 20 a 40 nanogramos. Las NNN y NNK se generan durante la pirolisis, pero también de manera endógena en algunos tipos de tabaco sin combustión, de tal forma que actúan localmente sobre los queratinocitos o en varios tejidos del organismo cuando se absorben. Interfieren de manera directa en la replicación del ADN produciendo un daño en la replicación de las células, incluyendo aquellas que intervienen en la respuesta inmune (14).

Sin embargo, gran parte del tabaco consumido en el mundo se hace sin combustión. Este tipo de tabaco está asociado con el desarrollo de CCECB, aunque en una tasa menor que la del tabaco tradicional.

El tabaco sin combustión normalmente se usa en forma de “paan”, “gutka” y “snuff” o rapé (“naswar”). El tabaco “paan” es la hoja de betel rellena de nuez de areca, lima, catecú y tabaco; la “gutka” es una combinación de nuez de betel, tabaco, especias aromáticas con o sin lima e hidróxido de calcio; el “naswar” es principalmente tabaco con una pequeña cantidad de especias, lima, cardamomo y mentol. El “paan” y el “gutka” son masticables mientras que el “naswar” se sitúa en contacto con las membranas mucosas, a través de las cuales la nicotina se absorbe, provocando la degeneración maligna en el sitio de la ubicación del tabaco (15). El tabaco mascado es muy común en los países asiáticos. El “snuff” o rapé son comunes en Escandinavia y en EUA. El “toombak”, la forma usada en Sudán, contiene gran cantidad de nitrosaminas, y los consumidores de este tipo de tabaco muestran un incremento significativo del riesgo de padecer CCECB (14,16). El tabaco mascado (betel) es la mayor causa de carcinoma de células escamosas bucal y oro faríngeo en el continente indio, parte del Sudeste de Asia, China y Taiwán y en comunidades emigrantes, especialmente cuando el betel consumido contiene nuez de areca e hidróxido de calcio. La nuez de areca ha sido declarada como carcinógeno humano por un grupo experto de la International Agency for Research on Cancer (IARC) (2003). En la India, el hábito de mascar tabaco supone el 50% de los carcinomas bucales y oro faríngeos en hombres y más del 90% en mujeres (17).

El alcohol es un factor de riesgo sinérgico al tabaco de los cánceres del tracto digestivo superior. Estudios de laboratorio previos demostraron que el alcohol facilita la penetración de los carcinógenos del tabaco a través de la mucosa bucal. Esto es debido a la capacidad del alcohol de eliminar el componente lipídico que rodea el estrato espinoso epitelial (18,19).

Otros estudios demostraron que el alcohol producía cambios tisulares macroscópicos y microscópicos, incluyendo cambios displásicos con alteraciones tanto estructurales, arquitecturales y morfológicas que van desde la condición leve hasta con menor frecuencia la displasia severa; así mismo queratosis, incremento de la densidad de la capa basal y atrofia (20).

También se ha demostrado que el acetaldehído, primer metabolito del etanol, es el principal carcinogénico. La IARC de la Organización Mundial de la Salud (OMS) concluyó en 1999 que existía suficiente evidencia en animales experimentales, aunque no en humanos, para declarar la naturaleza carcinogénica del acetaldehído (21). Aunque la mayoría del metabolismo del alcohol se produce en el hígado, se ha demostrado científicamente que también se produce a nivel extra hepático, concretamente en la cavidad bucal.

Un estudio previo ha demostrado que los *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus intermedius* y *Streptococcus mitis* son capaces de producir grandes cantidades de acetaldehído, por lo que esto supone una nueva teoría en el mecanismo de la patogénesis del alcohol en el cáncer. (22)

Este mecanismo podría explicar que pacientes con una higiene oral deficiente tengan un riesgo aumentado de desarrollar cáncer oral (22). Hasta el 50% de los pacientes diagnosticados de CCECB refieren en su historia clínica el consumo de alcohol. Estudios que intentan determinar las diferencias entre vino, cerveza y licores fuertes indican que el consumo excesivo de todo tipo de bebida alcohólica aumenta el riesgo.

Aquellos pacientes que consumen más de 100g de alcohol al día tienen el riesgo 30 veces mayor de padecer CCECB que aquellos que consumen menos de 15g de alcohol al día. El riesgo de degeneración maligna es de 100 veces mayor en grandes fumadores y bebedores. Entre el 34% y 57% de los pacientes continúan consumiendo alcohol y tabaco tras el diagnóstico del cáncer oral, hecho que aumenta el riesgo y las complicaciones asociadas con la cirugía y la recurrencia del cáncer, reduciendo además la supervivencia de la enfermedad y comprometiendo en gran medida la calidad de vida(23).

El alcohol también tiene otras funciones dentro de la medicina y odontología se utiliza en los enjuagues bucales como disolvente para otros ingredientes. Sin embargo, al 10-12% actúa como conservante, antiséptico y agente cáustico. Existen diferentes reportes que han demostrado que las altas concentraciones de alcohol en los enjuagues pueden tener efectos adversos bucales como desprendimiento epitelial, queratosis, ulceración de la mucosa, gingivitis, petequias y estomatodinia. Esta posibilidad de que el alcohol de los enjuagues y colutorios bucales pueda contribuir en el desarrollo del cáncer oral no es nueva, existen reportes previos en el año 1983, Wynder y cols. (24) llevaron a cabo un estudio retrospectivo en pacientes que habían desarrollado un cáncer bucal, encontrando mayor riesgo de desarrollarlo en mujeres que habían usado enjuagues con alcohol. Mientras algunos estudios apoyan esta hipótesis (25), otros no encuentran suficiente relación entre el uso diario de enjuagues bucales y el desarrollo del cáncer bucal. (26,27).

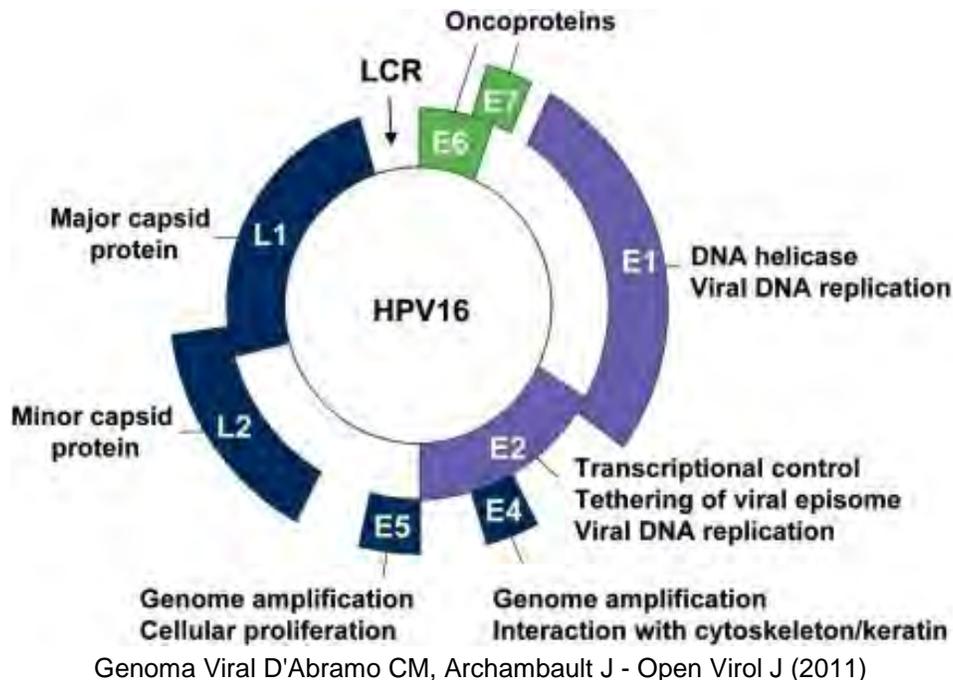
Virus papiloma humano

El virus papiloma humano es un virus de doble cadena de DNA circular con un diámetro de 52 a 55nm. Pertenece a la familia *papilloma viridae*. El genoma del virus codifica aproximadamente ocho marcos de lectura abierta, los cuales se dividen en 3 regiones funcionales : La región temprana (E) que comprende el 45% del genoma, la región tardía (L) que comprende el 40% del mismo y por último la región control o (LCR) EL 15% restante. En la actualidad se identifican más de 200 tipos virales de VPH. Es un virus con afinidad epiteliotrópica y dermatotrópica que produce lesiones verrucopapilares, papilomatosas o planas.

El rol específico del virus papiloma humano en el desarrollo del CCECB aún no se encuentra bien determinado, existen diversas opiniones y controversias en su papel como factor etiológico en una entidad de origen multifactorial como es el CCECB, en comparación con el desarrollo de carcinoma de cérvix en mujeres infectadas con VPH, en donde su participación se encuentra por demás descrita en la literatura mundial. La relación entre el VPH y el CCECB fue descrita por primera vez en 1983 en un estudio realizado por Syrjänen, pero no fue hasta 2 años después que se confirmó su presencia por la técnica de hibridación in situ. (28).

Genoma Viral

Los marcos de lectura abierta antes mencionados codifican para las proteínas E1, E2, E4, E5, E6 y E7 y son necesarias para la replicación, la transformación celular y el control de la transcripción viral. E1 y E2 mantienen el DNA viral en forma episomal así mismo E7 estimula la progresión del ciclo celular. Las proteínas E1, E2, E4 y E5 son requeridas para que la amplificación viral se exprese en células diferenciadas de los estratos superficiales. La región tardía codifica proteínas estructurales y proteínas que serán la capsida del virion. Las oncoproteínas E6 y E7 las más importantes en la carcinogénesis viral se encuentran localizadas entre la región temprana y la región tardía. La LCR o región de control es necesaria para la replicación y transcripción del DNA viral. (29, 30).



Los diferentes tipos están caracterizados por las diferentes variaciones genotípicas en la secuencia de bases de las oncoproteínas E6 y E7. En estas diferencias genotípicas se basa la clasificación que los divide en bajo riesgo y alto riesgo. Los tipos virales de alto riesgo incluyen VPH- 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y los dentro de los de bajo riesgo se encuentran VPH 6, 11, 42, 43, 44. (29,30,31).

Transmisión

La prevalencia de las regiones anatómicas donde se establece el virus incluyen, vagina, vulva, pene, canal anal, cérvix, región peri anal, criptas amigdalinas y oro faringe. La mucosa bucal normal probablemente actúa como un reservorio de nuevas infecciones por VPH o como sitio de establecimiento de lesiones verrucopapilares. La prevalencia de VPH en mucosa normal se distribuye en un rango entre el 0.6 al 81% (32,33). Existen diferentes vías de transmisión e inoculación del virus en cavidad bucal, de las cuales la más aceptada es la transmisión sexual por la relación oro-genital, la auto inoculación, la transmisión perinatal al momento de que el neonato pasa a través del canal del parto, en una madre previamente infectada. La inoculación de la cavidad bucal está fuertemente asociada con el número de parejas sexuales y de relaciones oro-genitales así como de los besos boca abierta, esto en comparación con las parejas sexuales que practiquen relaciones vaginales. (32,33,34).

Mecanismo de infección.

Los virus del papiloma humano tienen características específicas de tropismo epitelial específicamente de las células escamosas del epitelio bucal así como de los queratinocitos. La síntesis del DNA viral así como la expresión de los genes virales están asociados al nivel de diferenciación de los queratinocitos (35,36).

Durante la fase inicial de la infección, el genoma viral sufre una replicación episomal y unas cuantas copias virales de DNA se encuentran en cada célula hospedera del individuo. La forma episomal actúa como reservorio de las células infectadas y es responsable del estado latente de la infección viral. (35).

Cuando la infección empieza la fase productiva, los genes virales son expresados secuencialmente iniciando con los genes tempranos hasta los tardíos, acto seguido la diferenciación de las células escamosas del epitelio bucal, iniciando este proceso en las células basales y para basales donde las porciones tempranas del genoma viral están más activas hasta que alcanzan los estratos superficiales una vez completada la formación del virión (35,37). En las células basales infectadas por VPH las proteínas E1 y E2 se expresan de manera temprana regulando la transcripción del DNA viral. Cuando la expresión de E2 es más exponencial, E2 reprime la replicación del DNA viral bloqueando los factores de transcripción celular; estos controlan el número de copias virales de VPH DNA en el estrato basal por un proceso análogo de retroalimentación negativa (38,39). En los casos de VPH de alto riesgo E6 y E7 se expresan de manera importante en células basales infectadas y posteriormente el epitelio entra en fase proliferativa, caracterizado por un incremento en el número de copias virales y de células basales infectadas, que con el tiempo se traducirá en una neoplasia intra epitelial o invasiva.(38,40).

Durante la división de las células del estrato basal, E2 media la distribución del número de copias virales de DNA a las nuevas células hijas como DNA episomal. (38,41) Así conforme la células epiteliales maduran y se diferencian, el ciclo de la infección por VPH progresa hasta tener una replicación productiva, De esta manera en el epitelio infectado por VPH las células epiteliales maduras expresan las oncoproteínas E6 y E7 en el estrato supra basal. E6 inhibe la apoptosis vía ubiquitinación afectando directamente al gen P53 y E7 activa la replicación del DNA celular permitiendo que las células epiteliales maduras se reprogramen e ingresen nuevamente en fase S del ciclo celular y permiten una replicación de células mutadas e inmortales descontroladas. Existen factores celulares específicos asociados a la maduración de las células epiteliales, este promotor viral se activa de manera tardía y se encuentra localizado entre el gen E7 y los marcos de lectura, al activar esta expresión las proteínas L1 y L2 permiten que el virus se distribuya y salga de los estratos basal y supra basal a los estratos

superficiales consolidado como virón. (38,39,40,41)

Mecanismos de carcinogénesis

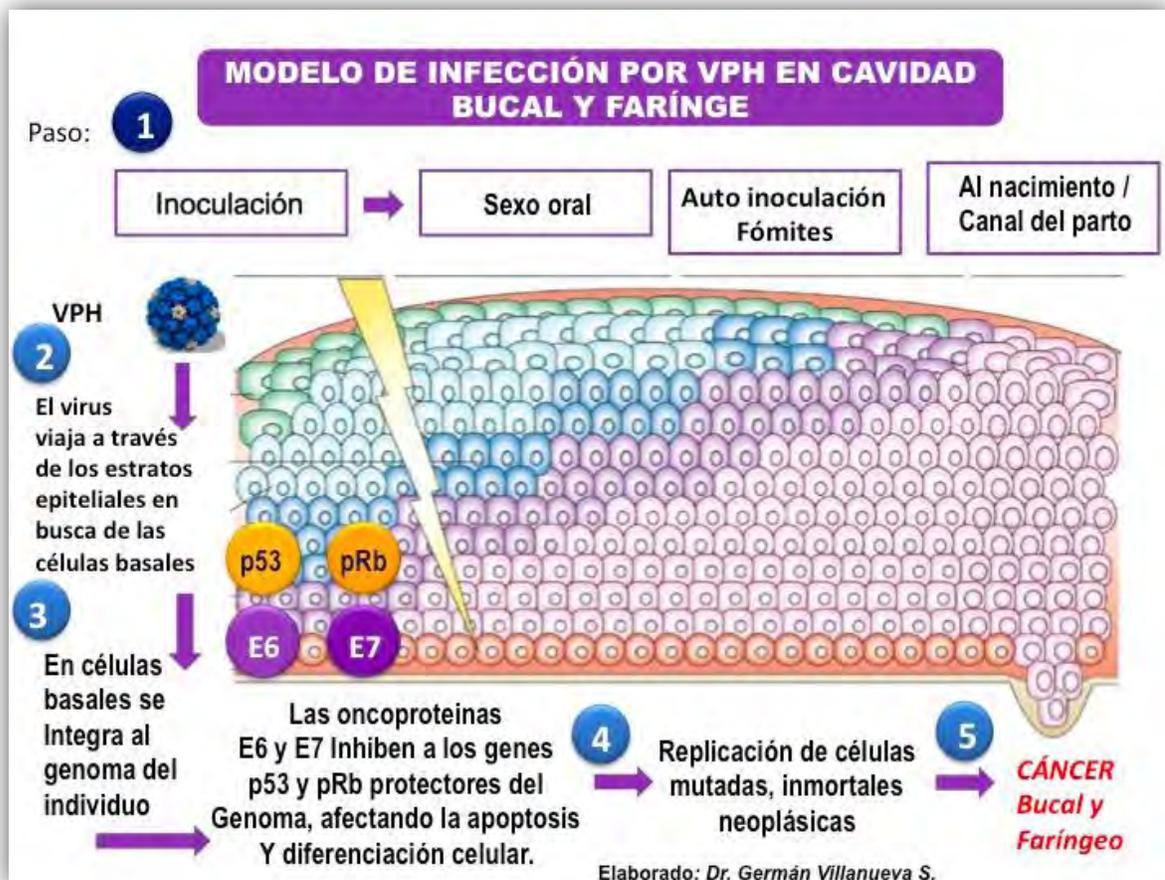
La posibilidad de que la infección viral progrese y condicione la aparición de una neoplasia maligna depende del tipo viral adquirido, así como de diferentes factores del hospedero como son los físicos, químicos, agentes biológicos sinérgicos, constitución genética así como los mecanismos de defensa inmune tanto sistémicos como loco regionales, todos pueden modificar el curso natural de la infección por VPH. Durante el proceso de integración de genoma viral circular, como se mencionó con anterioridad la pérdida de E2 produce una pérdida de control de las oncoproteínas E6 y E7.(29,30,31)

La oncoproteína E6 promueve la degradación de p53 por ubiquitinación lo que permite una interacción directa con otras proteínas como son E6AP. p53 es considerado un gen supresor de tumores cuyas funciones principales es el arresto del crecimiento celular así como la apoptosis posterior al daño celular. En adición a esta la proteína E6 interfiere con la síntesis de otras proteínas proapoptóticas como Bak, la procaspasa 8; recientemente el producto del gen Notch1 ha sido identificado como un objetivo clave de p53.(43,44,45)

La oncoproteína E7 se une a pRb gen conocido como supresor de retinoblastoma y su familia de proteínas asociadas como p107 y p130. En un estado hipofosforilado, estas proteínas pueden unirse a los factores de transcripción así como las E2F pueden reprimir la transcripción particularmente de los genes involucrados en la síntesis de DNA y la progresión del ciclo celular. (43,48,49)

Debido a que E7 es capaz de unirse a la forma no fosforilada de pRb, esta unión probablemente induce de manera prematura que las células entren en la fase S por disrupción del complejo pRb-E2F. La proteína E7 permite la replicación del virus en los estratos superficiales del epitelio, donde las células hijas epiteliales aún realizan una diferenciación normal y salir por completo del ciclo celular por el gen P16. El cual previene la fosforilación de los miembros de la familia de pRb. Este está sobre expresado cuando pRb es inactivado por la oncoproteína E7. La sobre expresión de P16 sugiere que puede ser un buen biomarcador útil para evaluar la patogenicidad y virulencia del VPH. (43,49)

De igual forma estas dos proteínas E6 y E7 cooperan con las oncoproteínas del ciclo celular como son ras y myc que permiten que el virus actúe a nivel de los factores de crecimiento, a nivel nuclear y celular; estos promueven la producción de células oncogénicas.(43)



Asociación de VPH con las lesiones potencialmente malignas (LPM) y el CCECB.

Los VPH de bajo riesgo como el 6, 11 y el 13 se encuentran estrechamente relacionados lesiones papilomatosas y verrucopapilares de características benignas como el papiloma escamoso, la verruga vulgar bucal, el condiloma acuminado y la hiperplasia epitelial multifocal.(29) Los VPH considerados de alto riesgo como el 16 y 18 son asociados con las LPM y el CCECB, específicamente VPH 16 y 18 están asociados al desarrollo de CCECB; VPH 16 con leucoplasia bucal, incluyendo la leucoplasia verrucosa proliferativa. (35)

Factor pronóstico.

Dentro de todo el espectro de alteraciones, que provoca la infección viral, en el epitelio bucal, numerosos estudios han confirmado que aquellos tumores de cabeza y cuello que están infectados con el VPH, tienen un mejor pronóstico en comparación con aquellas neoplasias malignas que son negativas para VPH, Independientemente del tratamiento el pronóstico inclusive tiene una tasa de éxito mayor en aquellos carcinomas de células escamosas infectados por el tipo 16. (50).

El carcinoma de células escamosas es un proceso multiseccional que implica una serie de alteraciones discretas, irreversibles y complementarias en los genes que controlan el crecimiento, la muerte y la diferenciación celular. (51)

El CCECB se desarrolla siguiendo uno de estos dos caminos:

1.- "De Novo", desarrollándose directamente a partir de mucosa sana sin previa lesión.

2.- Siguiendo la secuencia de lesiones potencialmente cancerizables que son la antesala del desarrollo del CCECB; como la displasia epitelial independientemente de su gradificación.(52,53)

Aproximadamente un 50% de los carcinomas de células escamosas se desarrollan a partir de un epitelio previamente alterado, con cambios ultra estructurales, morfológicos, arquitecturales y citológicos. Las lesiones potencialmente malignas se pueden definir como un tejido morfológicamente alterado en el cual el desenlace más probable es la aparición del cáncer que la regresión a un estado de normalidad.

Una condición precancerosa es un estado sistémico generalizado que predispone al individuo a un riesgo mayor de desarrollar alguna neoplasia maligna. El potencial de malignización de estos estados llamados "Lesiones potencialmente cancerizables".(53)

Es bien aceptado que al menos algunos casos de CCECB se desarrollan a partir de lesiones denominadas "**potencialmente cancerizables**". **Las lesiones potencialmente cancerizables se define como** como un tejido alterado en lo que respecta a su morfología y arquitectura, donde existe más probabilidades de desarrollarse una neoplasia maligna que en otros tejidos contiguos aparentemente sanos, denominándose a estos cambios histopatológicos Displasia Epitelial Bucal. (54,55).

La organización mundial de la salud establece los criterios para clasificar las displasias tomando en cuenta cambios arquitecturales, morfológicos de atipa celular. De manera que, displasia epitelial leve sería aquella donde las alteraciones displásicas mínimas estén confinadas a la capa basal del epitelio, moderada cuando los cambios displásicos se observen en las 2/3 partes del epitelio y severa cuando las células displásicas representen más de las 2/3 partes del epitelio, pero no afectando todo el espesor de lo contrario sería un Carcinoma in situ. La progresión de DEB hacia la malignidad oscila entre el 15.8% - 48% dependiendo del grado de displasia. Así se ha sugerido que se malignizaran el 3% de las displasias leves, 4% de las moderadas y un 43% de las severas. De tal forma que tomando la presunción de que algunos CCECB son productos de la

malignización de las DEB, entonces surge la pregunta de investigación de si existen casos de CCECB en sujetos jóvenes y muy jóvenes, pudieran existir DEB en este mismo grupo de edades. (52,53)

A pesar de que existe la posibilidad biológica de que este suceso ocurra, en nuestro conocimiento, la prevalencia de DEB en población joven y muy joven, así como sus características clínicas, epidemiológicas e histopatológicas no han sido descritas en la literatura mundial. (53).

Bases moleculares del cáncer bucal.

La carcinogénesis es el mecanismo a través del cual se desarrolla una neoplasia maligna desde sus estadios iniciales hasta la culminación de la enfermedad, existe una falta de conocimiento a ciencia cierta en este tema desde la mutación inicial hasta que el progreso de la enfermedad se traduce en una lesión clínica.

La génesis y desarrollo tumoral son el resultado de numerosas alteraciones moleculares que se producen directamente al DNA y en donde están implicados los oncogenes, que a través de las variaciones que se presentan en su secuencia de nucleótidos adquieren capacidades generadoras de tumores. Los protooncogenes son secuencias génicas que codifican proteínas que controlan el crecimiento y la diferenciación celular. El resultado de la alteración de la secuencia génica del protooncogén por mutación, amplificación o reordenamiento cromosómico, se conoce con el nombre de encogén. (57)

La iniciación o activación del tumor empieza cuando el DNA de la célula o de una población de células se daña por la exposición a factores carcinogénicos, tanto endógenos como exógenos; la sensibilidad de las células mutadas respecto a su microambiente puede alterarse e iniciarse un crecimiento más rápido que las células no alteradas. (57)

La promoción tumoral se caracteriza por una expansión clonal selectiva de las células iniciadoras, como resultado de la expresión alterada de los genes. Los productos de dichas células se asocian a una hiperproliferación, inflamación y remodelación tisular.

La progresión del tumor se producirá cuando coincidan los factores implicados en la iniciación y promoción del mismo. Al parecer el cáncer se desarrolla de forma gradual, a partir de células ligeramente aberrantes o con cambios mínimos, y se caracteriza por una acumulación de alteraciones en los genes encargados de la regulación de la homeostasis celular, como los oncogenes, genes supresores de tumores y los genes reparadores de DNA. (57).

Ciclo Celular.

La acción de diversos oncogenes, se encuentra implicada en fenómenos de proliferación, diferenciación y supervivencia celular, así como en la capacidad de diseminación y metástasis de las células neoplásicas. (58)

Los oncogenes codifican proteínas llamadas oncoproteínas, similares a los productos normales de los protooncogenes, salvo que las oncoproteínas carecen de algunos elementos reguladores importantes y su producción no depende de los factores de crecimiento ni de otras señales externas. (58)

Los factores de crecimiento estimulan la proliferación de las células normales y se cree que muchos de ellos intervienen en la tumorigénesis (mutaciones) y de esta manera la proliferación celular sigue una serie de pasos:

- 1.- Unión de un factor de crecimiento a su receptor específico existente en la membrana celular.
- 2.- Activación del receptor de factor de crecimiento que a su vez, activa varias proteínas transductoras de señales existentes, en la capa interna de la membrana plasmática.
- 3.- Transmisión por el citosol de la señal transducida hasta que llega al núcleo y lleva a cabo la inducción y activación de los factores reguladores de los núcleos que inician la transcripción de ADN.
- 4.- Paso de la célula al ciclo celular, por el que progresa hasta que se produce la división celular. (58)

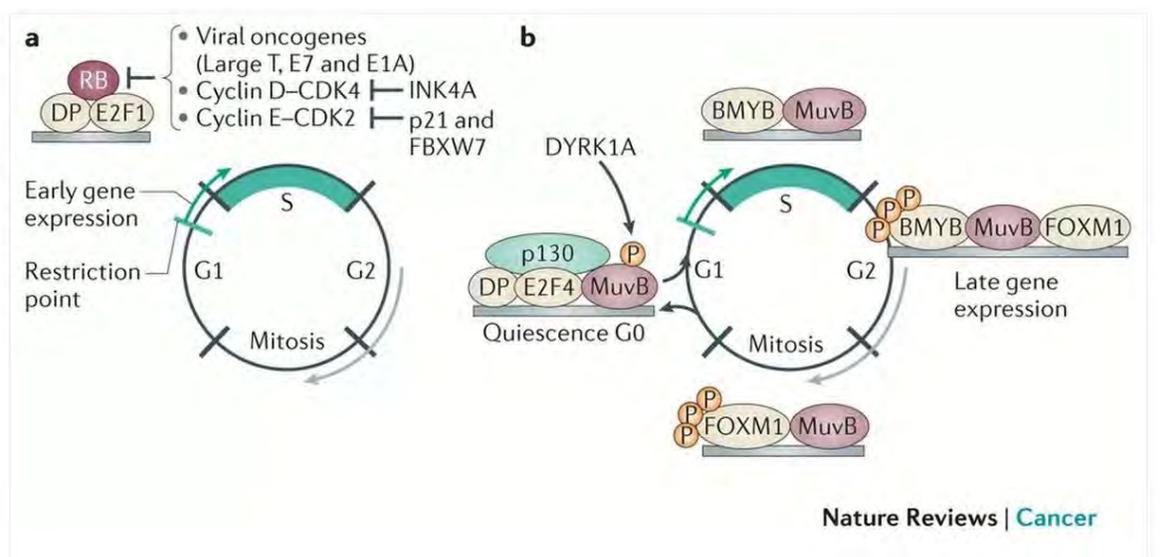
Los receptores de crecimiento son proteínas transmembrana que sufren una activación transitoria cuando el receptor capta a su factor de crecimiento específico, a lo que le sigue rápidamente la mitosis.

Las versiones oncogénicas de estos receptores sufren activaciones persistentes sin necesidad de unirse al factor de crecimiento correspondiente. De esta forma, el receptor mutante libera hacia la célula continuas señales que estimulan la mitosis. (58,59)

Recientemente se ha intensificado el interés de los investigadores en esta área específica en la expresión de receptores de factores de crecimiento codificados por protooncogénos c-erb B en el desarrollo de cáncer bucal. Uno de estos receptores, es el receptor para el Factor de Crecimiento Epidérmico, que se une a ErbB-3, mientras que el factor de diferenciación neural (NDF) es el ligando preferente para ErbB-3 y ErbB-4. Estos receptores están involucrados en la proliferación y diferenciación celular y su activación aberrante o su sobre-expresión puede contribuir al desarrollo y progresión tumoral. (59)

Todas las rutas estimuladoras e inhibitoras del crecimiento y proliferación celular convergen en un complejo aparato molecular presente en el núcleo denominado reloj del ciclo celular. Dicho reloj se descontrola en prácticamente todos los tipos de cáncer en humanos. (55)

La progresión ordenada de las células a través de las distintas fases del ciclo celular depende de las ciclinas, de las quinasas dependientes de ciclinas (CDK) y de sus inhibidores. Las mutaciones que alteran la regulación de la actividad de las ciclinas y de las CDK favorecen la proliferación celular. (58)



Subhashini Sadasivam & James A. DeCaprio; Nature Reviews Cancer 13, 585–595 (2013)
doi:10.1038/nrc3556

Genes supresores de tumores.

Los genes supresores de tumores están implicados en diversos procesos de división celular: la regulación de la expresión génica, el control del ciclo celular, programación de la apoptosis y la estabilidad del genoma. La pérdida de actividad de estos genes provoca la incapacidad de respuesta de los mecanismos de control que regulan la división celular; de modo que se produce una proliferación más o menos incontrolada de la célula, lo cual conduce, en ocasiones, al desarrollo de neoplasias y a la evolución de las mismas hacia procesos tumorales biológicamente agresivos y metastásicos. (60)

Gen pRb

El gen de retinoblastoma es el primer gen supresor de tumores que se encuentra descrito, produce la proteína pRb que actúa como un freno (freno) al progreso de la célula desde la fase G1 a la fase S del ciclo celular. Cuando la célula recibe el estímulo de los factores de crecimiento, la proteína Rb se inactiva, por lo que el freno desaparece y la célula atraviesa el punto de control G1-S. Si falta la proteína Rb o si una mutación altera su capacidad, el freno molecular del ciclo celular desaparece y la célula avanza despreocupadamente a la fase S.(58)

La ciclina D1 es una proteína inestable fundamental para la progresión de G1 mediante la activación del complejo CDK4/6 que lleva a fosforilación a la proteína pRb. La fosforilación de esta es esencial para la continuación del ciclo celular. Si pRb no está fosforilada se bloquea el ciclo celular, Se ha encontrado sobreexpresión de Ciclina D en carcinomas de células escamosas de la cavidad bucal.(55, 62,63). pRb fosforilada libera un factor de transcripción que induce a la activación de los genes que regulan la síntesis de ciclina E y ciclina A. La síntesis de ciclina E comienza en la fase G1 tardía. Esta ciclina se une a CDK2, formando un complejo activo que induce la síntesis de las enzimas y proteínas necesarias para la producción de DNA. La ciclina A tiene la misión de activar a la CDK1 durante la fase S. El complejo ciclina A/CDK1 promueve, durante la fase G2, la síntesis de las proteínas implicadas en la mitosis. Estas proteínas conducen finalmente a la división de la célula en la fase M.

Las CDK también son reguladas por los llamados inhibidores de las CDK (CDKI), de los cuales encontramos dos familias de mamíferos la familia p21 (p27, p57) y la familia INK4 (p15, p16, p18, p19). (62). La p16 se une al complejo CDK4/CDK6 impidiendo su asociación con la ciclina D1 dando como resultado la detención del ciclo celular en G1 mediante la fosforilación de pRb.

El CDKI p27 comparte secuencia homóloga con p21 y actúa como regulador negativo del ciclo celular implicado en la detención en la fase G1 mediante un mecanismo independiente de p53. (62, 63, 64)

Gen p53

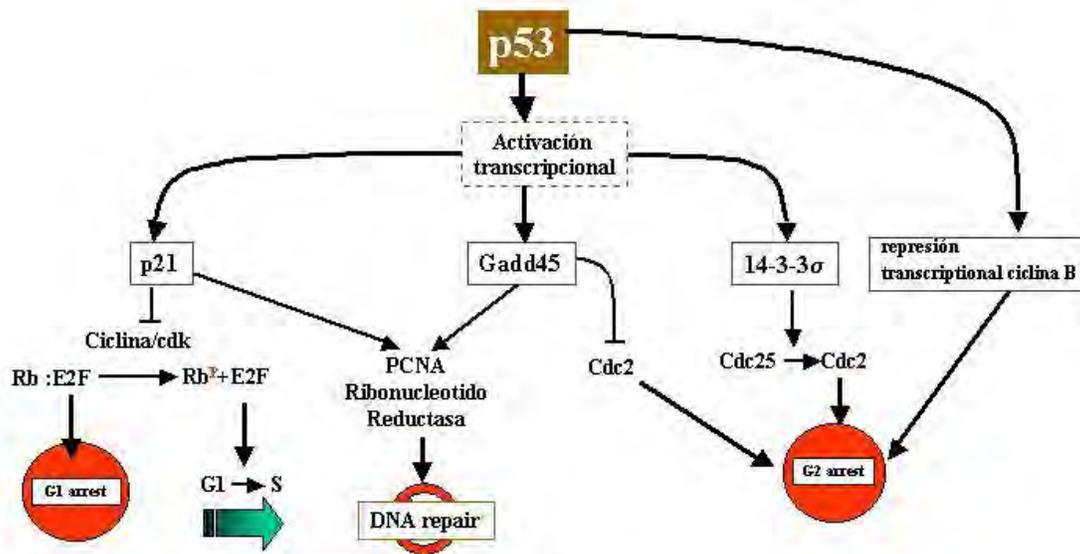
Este gen en condiciones de normalidad, codifica una fosfoproteína nuclear (Proteína natural o salvaje) que actúa como regulador negativo de la proliferación celular mediante acción compleja, puesto que al mismo tiempo actúa como factor de transcripción, interruptor del ciclo celular e inductor de apoptosis. Cuando ocurre alguna mutación en p53, se produce una síntesis anormal de la proteína, proteína p53 mutada, que tiende a estabilizarse y acumularse en el núcleo.

Esta proteína mutada pierde la capacidad supresora de crecimiento celular. La replicación negativa de p53 sobre la replicación ocurre ante diferentes tipos de agresiones en el DNA, aumentando entonces la cantidad de proteína nuclear p53. La consecuencia inmediata de incremento de p53 es la detención del ciclo celular en G1, actuando mientras los mecanismos de reparación del DNA. (61)

Si la reparación del DNA es satisfactoria, p53, activará un gen denominado mdm2, cuyo producto se une e inhibe a la propia p53, levantando así el bloqueo celular. (58) Si las alteraciones del DNA son muy extensas y el daño no puede ser reparado, la proteína p53 puede inducir el inicio de apoptosis. De esta forma la proteína salvaje de p53 actúa como un verdadero guardián de la integridad del genoma, estableciendo la posibilidad de que las células dañadas reparen su DNA previniendo la inestabilidad genómica.

La proteína p53 bloquea el ciclo celular mediante inducción de la proteína p21, inhibidora de las CDK. La p21 bloquea la transición de G1-S y bloquea también directamente la replicación del DNA en la fase S del ciclo celular mediante la inhibición de la actividad de la proteína PCNA sobre la DNA polimerasa δ . También otro mecanismo que se ha observado como p21 puede actuar por otro mecanismo independiente de la p53. (55, 62)

El gen p53 bloquea también la angiogénesis, la trombospondina-1 (TSP-1) es posiblemente la favorecedora del desarrollo y diseminación tumoral. A través de la secreción de la misma por parte de los fibroblastos; de esta forma, en las células transformadas, la ausencia de p53 favorecería la inducción de la angiogénesis mediante la disminución de la secreción de TSP-1. (61)



Estructura, regulación y funciones del gen supresor de tumores p53/Augusto Silva, Ana Gutiérrez del Arroyo, Carmen Arias e Iciar Lazaro.CIB. CSIC

Gen p73

En condiciones adecuadas de igual manera que en el gen p53, puede detener el ciclo celular y provocar apoptosis. (58)

Genes BRCA-1 y BRCA-2

Son genes supresores de cáncer. Ni el BRCA-1, ni el BRCA-2 se encuentran inactivados en la mayoría de los carcinomas de células escamosas, por lo que se cree, que existen nuevos genes supresores de tumores implicados. (58) Tal es el caso del gen supresor de tumores FHIT que ha aparecido recientemente alterando algunas líneas celulares de carcinomas de cabeza y cuello, aunque todavía no está muy claro este papel y se necesitan más estudios para corroborarlo.(63)

FHIT

El descubrimiento del gen FHIT (Fraile Histidine Trial) localizado en la región cromosómica 3p14.2, ha traído una gran atención desde que se observó que va acompañado de una región cromosómica frágil comúnmente conocido como FRA3B. Estas zonas muestran cierto número de características de inestabilidad puesto que son lugares donde ocurre preferentemente deleciones cromosómicas. (62,63)

APC

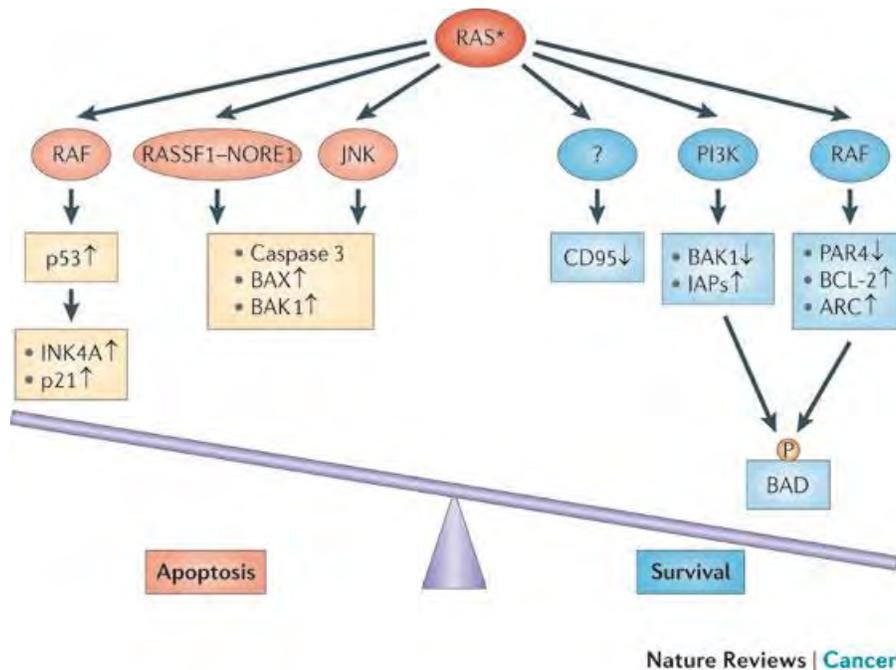
El cromosoma 5q contiene al menos 2 regiones independientes en las que se han descrito PDH (pérdida de heterocigosidad). Son la 5q33-35 y 5q21. La región 5q21 contiene a su vez 2 genes supresores de tumores (APC y MCC). El gen APC (Adenomatous Polyposis Coli) juega un papel importante en el punto de control G1 a S. Pérdidas alélicas en 5q21 han sido reportadas en laringe, esófago y estómago. (63,64,65)

Gen supresor	Cromosoma	Modo inactivación	% tumor microcítico	% tumor no microcítico
p53	17p13.1	PDH+ mutación	80-100%	50-80%
Rb	13Q14	PDH+ mutación	80-90%	20-30%
p16	9P21	PDH+ mutación, metilación	<10%	60%
SMAD2	18q21	PDH+ mutación	<10%	<10%
SMAD4	18q21	PDH+ mutación	<10%	<10%
PTEN	10q23	PDH + mutación	10%	<10%
FHIT	3p14.2	PHD	75%	75%
PPP2R1B	11q23	PDH+ mutación	Desconocido	Desconocido

Oncogenes

RAS.

La mutación de los protooncogenes Ras puede ser identificada frecuentemente en varios tipos de tumores incluyendo los que se presentan en las vías aerodigestivas. K-Ras es la mutación más encontrada y representa aproximadamente el 90% de las mutaciones Ras identificadas. La mutación H-Ras y N-Ras son menos habituales suponiendo un 1 % de los cánceres de pulmón por ejemplo. Casi un 70% de las mutaciones de Ras son transversiones G a T en el codón 12. (61)



Yuliya Pylayeva-Gupta, Elda Grabocka & Dafna Bar-Sagi; /Nature Reviews Cancer 11, 761-774 (November 2011)

EGF.

El receptor del EGF factor de crecimiento epidérmico junto con HER-2/neu, c-erbB3 y cerbB4 son miembros de la familia EGF tipo I. El EGF y factor de crecimiento alfa (TGF-alfa) son ligandos de EGFR. La sobreexpresión de EGF y TGF alfa ha sido encontrada en un 60% de los tumores no microcíticos. Aproximadamente el 70% de los tumores epidermoides y el 40% de los adenocarcinomas sobreexpresan EGFR. Estos datos sugieren que la disrupción de la cascada de señales de la vía EGF, juega un papel importante en los tumores no microcíticos.(61,63)

HER-2/NEU.

En el cáncer de pulmón este protooncogen se ha sobreexpresado y se ha encontrado en estos tumores en un 4.3 a 37%.(63)

Factores Neuroendocrinos.

La expresión de factores neuroendocrinos incluyendo péptido gastrina bombesina (GRP/BN) y sus receptores ha sido informada en cánceres de las vías aerodigestivas. Este está asociado con un espectro de efectos fisiológicos, incluyendo la regulación de la secreción, crecimiento y neuromodulación. Al menos 3 receptores de GRP/BN han sido identificados. Solo la mitad de los tumores microcíticos expresan GRP. La expresión de este gen se activa precozmente en mujeres fumadoras y quizá actué como un factor en el incremento de susceptibilidad de la mujer al cáncer.(63,65)

MYC.

La familia MYC (c-myc, n-myc, l-myc) codifica fosfoproteínas involucradas en la regulación de la transcripción de otros genes responsables de la proliferación celular. En contraste a los oncogenes Ras, los cuales están activados por mutaciones puntuales, las mutaciones de los oncogenes myc son raras en los cánceres de vías aerodigestivas. Pero si hablamos de amplificación, éste es más frecuente. Se ha descrito que la amplificación de los oncogenes myc puede ser importante para evaluar el papel de la quimioresistencia de los tumores de pulmón. Se ha observado amplificación en tumores recurrentes después de la quimioterapia. (63,64)

Ciclina D1/Kinasa 4 Ciclina dependiente (CDK4).

La ciclina D1 juega un papel importante en la regulación del ciclo celular. Su sobreexpresión se encuentra de forma mayoritaria en líneas celulares de tumores no microcíticos y es principalmente ocasionada por amplificación anormal del gen. En tumores no microcíticos, un 12-40% de los tumores sobreexpresan ciclina D1 pero solo una pequeña proporción de ellos, juega algún papel trascendente sospechando que tiene que haber otros mecanismos implicados en la sobreexpresión de las proteínas. En cuanto a la quinasa CDK4 se ha encontrado anormalmente sobreexpresada en los tumores no microcíticos, sugiriendo que juega algún papel importante en el desarrollo de la tumorigénesis. (61,63,65)

CDC25.

CDKs (Quinasas dependientes de ciclina) pueden ser activadas por CDC25, el cual anula los fosfatos inhibidores procedentes de residuos de tirosina y treonina. Al menos 3 genes de CDC 25 han sido identificados en humanos (CDC25A, el

CDC25B y CDC25C.) Wu et al. Encontraron sobreexpresión del CDC25A en un 60% de los tumores no microcíticos, 45% del CDC 25B y 0% en CDC 25C, notificado que la sobreexpresión del CDC25A y CDC25B está asociada a la pobre diferenciación histológica en lo que respecta al graditaje del tumor. (64)

Ciclina B1

Es una molécula clave para la fase de transición G2-M durante el ciclo celular. Soria et al, (140) analizaron la expresión de ciclina B1 en tumores no microcíticos en estado precoz, describiendo que un 22 % de los tumores expresaban ciclina B1 en niveles altos. Los pacientes que sobreexpresaban ciclina B1 tienen una supervivencia menor respecto a los que pacientes que expresaban niveles bajos de la misma. De forma interesante la sobreexpresión de ciclina B1 es más frecuente en tumores escamosos que en otros subtipos histológicos. Así mismo puede ser un factor adverso para pronóstico sólo en pacientes con tipo histológico escamoso. Estos datos indican que en el subtipo escamoso, la ciclina B1 puede estar disregulada y que niveles altos sean marcador pronóstico en estadios tempranos de la enfermedad.(63,65)

Ciclina E.

La sobreexpresión de la ciclina E ha sido informada al menos en el 50% de los tumores no microcíticos de pulmón y de forma predominante en el tipo histológico escamoso. (63,64).

Apoptosis

Existen básicamente dos formas de muerte celular, la apoptosis y la necrosis. La primera es un término griego que hace referencia a la caída de los pétalos de las flores o de las hojas de los árboles. El proceso de apoptosis tarda aproximadamente 30 minutos. Los fenómenos que se producen son la rotura del citoesqueleto y las organelas, el encogimiento celular, condensación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos que son fagocitados por macrófagos o las células vecinas.

La necrosis, por el contrario que la apoptosis, provoca una respuesta inflamatoria debido a que la célula se hincha, provocando la rotura de la membrana celular y liberando todo su contenido. (64)

La apoptosis es un proceso activo, genéticamente controlado y destinado a la autoeliminación celular. Es un fenómeno imprescindible para mantener la homeostasis, ya que el crecimiento celular mediante la proliferación debe ser equivalente a la degradación tisular mediante muerte celular o apoptosis. Distinguimos 3 fases en el proceso apoptótico: iniciación, ejecución y degradación. (64) La fase de iniciación es activada por una gran variedad de señales que

incluyen el daño al DNA, hipoxia, falta de nutrientes, factores de crecimiento u hormonas y la activación de los receptores de la muerte. Las señales que estimulan las dos fases siguiente son menos variadas. La apoptosis es regulada por un gran número de moléculas como la familia de bcl-2, el factor de necrosis tumoral TNF, genes supresores de tumores, oncogenes, factores mitocondriales y la familia de las caspasas. Por el momento se conocen dos mecanismos para llevar a cabo la apoptosis:

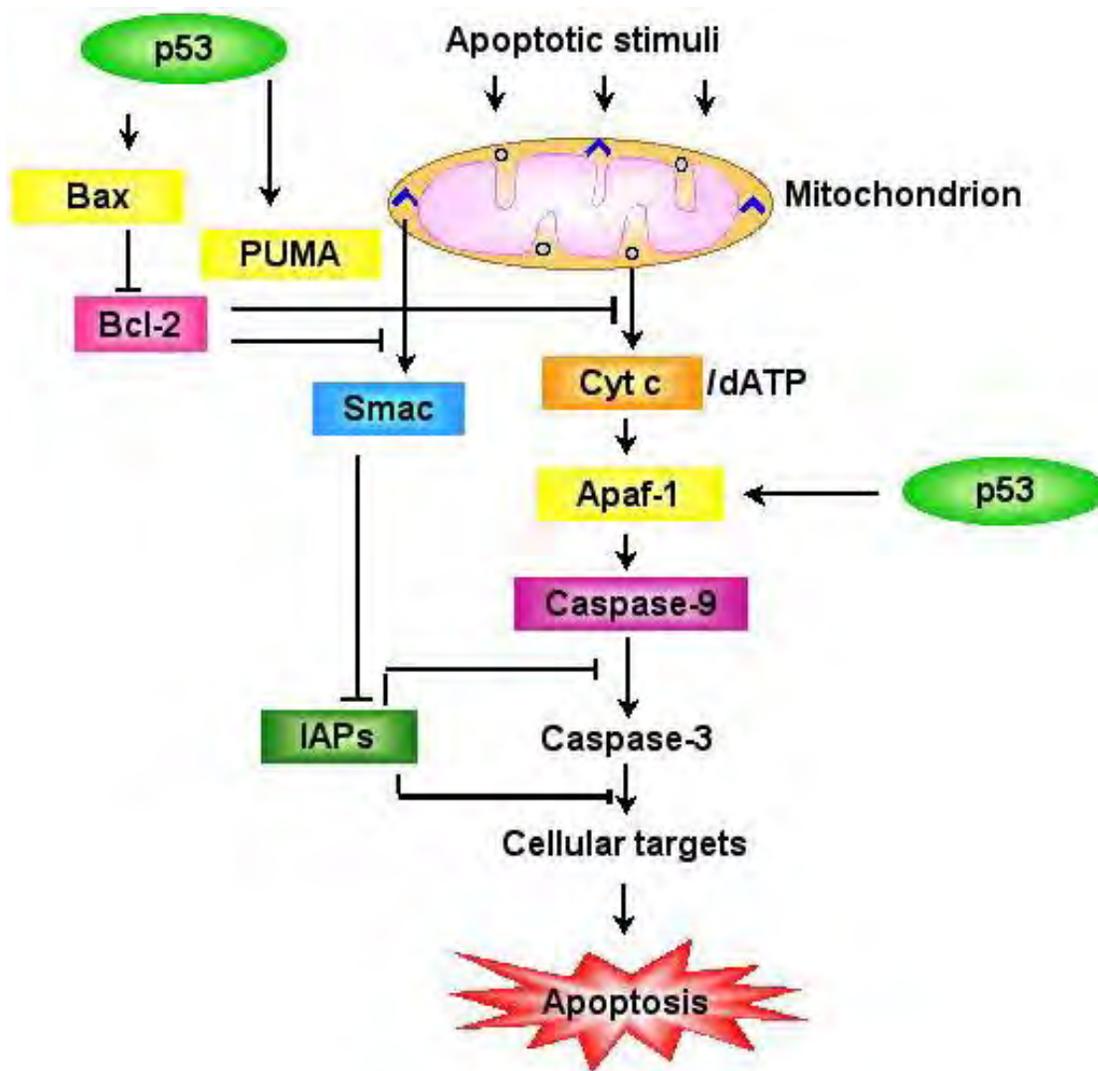
Mecanismo extrínseco: que corresponde a la activación de la transmembrana de los receptores de muerte de la super familia del TNF que lleva a la activación de la caspasa -8. La unión del TNF alfa al receptores Fas (miembro de la familia de los receptores de TNF) conduce al reclutamiento de la forma zimógena de la caspasa -8 para formar un complejo llamado "Complejo de inducción a la señal de muerte"(DISC). Este se activa la caspasa -8 comenzando la cadena de proteólisis de las caspasas 3, 6, 7 y terminando en la apoptosis. Por otro lado la activación de Fas hace que la caspasa-8 provoque la escisión de Bid en tBid, lo que inducirá cambios apoptogénicos mitocondriales.

Mecanismo intrínseco: Inducido por estrés celular. Implicando la mitocondria que libera factores apoptogénicos como el citocromo c, el factor inductor de apoptosis (AIF) ATP, proteínas del shock calórico y Diablo/Smac. El citocromo c junto con el ATP y el factor activador de la proteasa apoptótica Apaf-1 forman un complejo llamado apoptosoma, que regula la activación de la caspasa 9 que a su vez activará como mecanismo extrínseco a las caspasas 3, 6 y 7.(64)

Junto con estos mecanismos de activación apoptótica hay que traer a colación la existencia de moléculas inhibitoras de apoptosis (IAPs) que son : NIAP, CIAP1, CIAP2 y la proteína apoptótica inhibidora del cromosoma X (XIAP). También se ha visto como el factor nuclear kappa B aumenta el proceso cancerígeno mediante la disminución de la apoptosis mediada por TNF. (64,65)

La survivina es una IAP recientemente descubierta. Se encuentra sobre expresada en un gran número de neoplasias, pero suele ser indetectable en la mayoría de los tejidos sanos diferenciados.

La p53 elimina selectivamente las células estresadas o dañadas mediante apoptosis protegiendo al organismo del desarrollo de neoplasias y tumores. p53 puede mediar la apoptosis a partir de la regulación de bcl-2, de la superfamilia del receptor TNF y también de un modo independiente mediante la regulación de Fas o afectando al potencial de la membrana mitocondrial. (64,65)



Laboratory of David Givol

Alteraciones citogenéticas y genéticas; inestabilidad del genoma.

La inestabilidad del genoma es un fenómeno universalmente encontrado en los cánceres. Es una característica fundamental de la iniciación y progresión tumoral. Sin embargo, son pocos conocidos los mecanismos necesarios para llegar a la inestabilidad.

La inestabilidad es un fenómeno al que se llega mediante diferentes vías, en una pequeña proporción de tumores de vías aerodigestivas priman las deficiencias en el mecanismo de reparación por inestabilidad microsatélite, En otros tumores el anormal número de cromosomas (aneuploidia) es el hecho dominante.(66)

Por tanto en las células neoplásicas se conocen 2 formas distintas de inestabilidad genética. La inestabilidad del cromosoma que conduce a aneuploidia y la inestabilidad microsatélice, que conduce a frecuentes errores durante la replicación de nucleótidos, es decir, que el número de bases repetidas en la nueva cadena de DNA es diferente de la original, resultando la aparición de bucles pequeños en una de las 2 hebras. La inestabilidad microsatélice conduce a mutaciones o silenciamiento de los genes reparadores del DNA (MLH1, MLH2, PMSL1, PMSL2 Y MSH6). Actualmente está poco clara la importancia del papel que juegan los defectos específicos en genes reparadores del DNA en la carcinogénesis. (65,66)

Se entiende como microsatélice a una secuencia repetida de 1 a 6 pb (pares de bases) constituyendo una fracción del DNA no codificante. Son relativamente raros en regiones que codifican proteínas. La distribución de estos microsátélites no es aleatoria. Se caracteriza por tener niveles altos de polimorfismos. Con el uso de la PCR (reacción en cadena de polimerasa) el microsatélice se convirtió en un versátil marcador genético. El microsatélice ha probado ser extremadamente útil para mapear el genoma de muchos organismos, y actualmente puede ser usado como herramienta de cribado genético en estudios de epidemiología molecular.

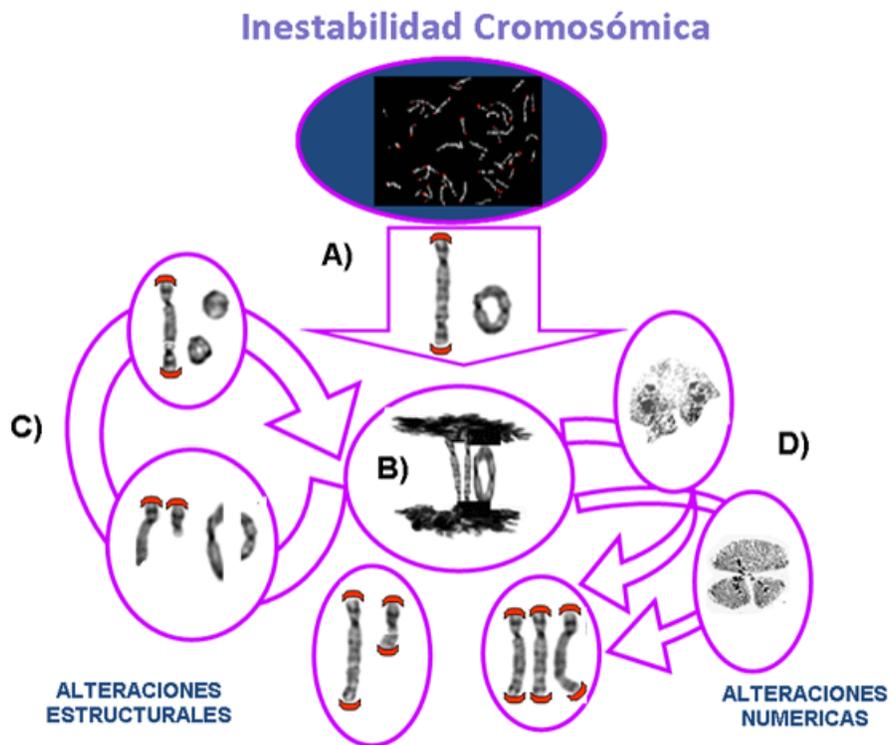
La inestabilidad microsatélice fue descrita por primera vez en el síndrome de Lynch (cáncer colorectal hereditario no polipoideo). Este fenómeno también se ha explicado en otras patologías como cáncer de pulmón, sarcoidosis, EPOC y asma. Se ha sugerido que la inestabilidad microsatélice causa mutaciones a nivel nucleotídico como mutaciones puntuales y de este modo facilita la inactivación de los genes supresores de tumores como p53 resultando en una disregulación del ciclo apoptótico celular. (66)

La inestabilidad cromosómica puede conducir a la alteración de la estructura o del número de cromosomas. Es frecuente encontrar en células tumorales, deleciones y amplificaciones cromosómicas. En cuanto a otras modalidades de cambios cromosómicos como son las translocaciones, son menos frecuentes en el cáncer de vías aerodigestivas. Las translocaciones cromosómicas modifican la función del gen a través de la disregulación de la expresión celular de los protooncogenes, sin alterar la estructura del producto proteico.

Aunque en la actualidad se han podido identificar, con nuevas tecnologías, diversas deleciones en regiones cromosómicas como 1p, 2p, 3p, 4p, 4q, 5q, 6q, 8p, 9p, 10q, 13q, 17p, 18p, 19q, 21q y 22q, las alteraciones más comunes implicadas son las pérdidas de regiones cromosómicas también conocidas como pérdidas de heterocigosidad (PDH) en regiones microsatélice de 3p21 y 9p21, deleciones del brazo cromosómico 5q21, mutaciones de p53 asociadas a PDH en 17p y mutaciones puntuales de K-ras. Las pérdidas de regiones cromosómicas en

3p y 9p han sido reconocidas como eventos precoces e incluso identificadas en lesiones pre invasivas y tejido epitelial bronquial aparentemente sano de fumadores. (64,65)

En el caso de los últimos, los cambios cromosómicos quizás desaparecen después de dejar el hábito tabáquico y son remplazados por células sin daño, pero hasta la fecha la dinámica de este proceso es aún una incógnita. Así mismo la PDH en región cromosómica 8p es uno de los cambios más precoces que se desarrollan por ejemplo en el cáncer pulmonar.



http://www.geneticaycancer.es/Area_Molecular/Tecnicas_de_diagnostico_molecular/Deteccion_de_mutaciones_cromosomicas.html

Modificación epigenética del DNA por hipermetilación de regiones promotoras.

La metilación del DNA tiene una implicación directa en la regulación de la expresión genética. El status de metilación cambia significativamente en los cánceres y se piensa que contribuye a la tumorigénesis. La hipermetilación ha sido descrita como un escalón precoz de progresión tumoral por causar pérdida de control del ciclo celular, pérdida de los mecanismos de reparación y pérdida de la interacción celular (e-cadherinas). El mecanismo exacto por el cual la hipermetilación causa progresión tumoral es todavía desconocido, pero ha sido

propuesto como un excelente marcador tumoral. Los tumores exhiben normalmente una hipometilación en general sin embargo se presenta una hipermetilación en regiones promotoras que se asocian con silenciamiento de la expresión genómica. El descubrimiento de numerosas regiones hipermetiladas en genes supresores de DNA, a falta de un mejor entendimiento de los mecanismos de silenciamiento génica, indica que es un mecanismo alternativo de inactivación de genes supresores tales como p16, GSTP1, MGMT, TIMP y Kinasa DAP. (64,65,66)

Actividad de la telomerasa.

Los Telómeros localizados en los extremos de los cromosomas son importantes mantenedores de la estabilidad de los mismos. Las células troncales germinales tienen actividad de Telomerasa en orden a compensar el acortamiento de la cadena de DNA que ha sufrido debido a la fase de replicación, cuando la mayoría de las células normales del adulto no exhiben actividad de Telomerasa. La actividad de Telomerasa es detectable en la mayoría de los cánceres y es responsable de la tumorigénesis y la inmortalidad celular. Una alta actividad de Telomerasa ha sido asociada con un incremento de la proliferación celular y estadio avanzado de la enfermedad. La actividad de Telomerasa puede ser detectada incluso en lesiones precancerosas o potencialmente cancerizables, reflejando a sí mismo una implicación precoz en la tumorigénesis.(66).

Asociación a otros factores.

El mantener un estado de salud bucal óptimo, con una oclusión adecuada evitando en lo posible cualquier tipo de irritación crónica como pueden ser la presencia de restos radiculares con aristas agudas que continuamente estén traumatizando la mucosa o restauraciones obsoletas, fracturadas que tengan bordes cortantes y que estén traumatizando la mucosa bucal en cualquier sitio anatómico por su uso constante, provocando con esto en primer instancia una hiperqueratosis y posteriormente grados de displasia desde su grado inicial hasta severa o carcinoma in situ. La adecuada extracción quirúrgica de los restos radiculares y sustitución de prótesis disfuncionales, pueden prevenir en gran medida el desarrollo de lesiones pre malignas o malignas. (67,68)

Así mismo es importante mencionar el estado de salud periodontal, el hábito y técnicas de cepillado adecuado así como el uso de auxiliares como engujaes bucales e hilo dental, se ha demostrado que una cavidad bucal séptica, con periodontopatías y patogenicidad de microorganismos residentes de la cavidad bucal como el Streptococcus produce acetaldehído a partir del metabolito etanol, mediante la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa, implicando de este modo una higiene dental pobre con acumulo de placa dentobacteriana, calculo etc. como factor de riesgo.(69)

Se ha relacionado la ingesta de dietas bajas en vegetales, frutas, semillas en pacientes que presentan CCECB, la organización mundial de la salud hace referencia a que algunos estados policarenciales así como desequilibrios en la dieta están relacionados en aproximadamente 15% de los cánceres orofaríngeos; por el contrario un factor protector es la ingesta adecuada de una dieta rica en antioxidantes, frutos rojos, café, taninos etc.

La relación de la carcinogénesis asociada a los malos hábitos alimenticios se puede analizar desde algunos puntos de vista, el primero nos identifica que el efecto de la comida y los aditivos alimenticios en donde podemos mencionar; las hormonas que ingieren los animales de consumo humano para favorecer un crecimiento rápido y mayor masa corporal, las frutas y legumbres transgénicas y todo aquel alimento con manipulación genética o aditiva. En segundo lugar la síntesis in vivo de los carcinógenos atribuida a los cambios en el metabolismo debido a alteraciones de los hábitos alimenticios. Como medidas de intervención se ha propuesto una dieta rica en frutas y verduras, así como una reducción en la ingesta de grasas monosaturadas, carne roja, en cuanto a la preparación de alimentos evitar el uso de microondas, hornos de combustión mediante leña, uso de aluminio etc. Se han recomendado dietas balanceadas pero con una ingesta rica en micronutrientes como la vitamina C, E, carotenos, folatos y antioxidantes. (70)

Otros factores etiológicos asociados a pacientes jóvenes.

- Polimorfismos genéticos.
- Inestabilidad y fragilidad cromosómica.
- Inestabilidad micro satelital (expresión de p53, pRb, p21, MDM2)

- Estados de inmunodeficiencia (Síndrome de Bloom, Wiskott Aldrich, Protocolo de trasplante).
- Anemias asociadas a Síndrome de Patterson Kelly, Plummer Vinson.

La anemia ferropénica junto con la disfagia (conocido como síndrome de Plummer-Vinson o Paterson-Kelly) está asociada a un elevado riesgo de desarrollar carcinoma de la cavidad bucal, oro faríngeo y de esófago (1,71,72) .

La inmunosupresión parece predisponer a algunos individuos a un aumento del riesgo de cáncer, así por ejemplo, los carcinomas de labio se han observado en pacientes trasplantados de riñón que reciben tratamiento inmunosupresor y los carcinomas orales sido documentados en pacientes jóvenes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (1,72,73).

La fibrosis submucosa es una enfermedad crónica, de etiología desconocida, que se puede localizar en cualquier área de la cavidad oral. En ella se produce una

destrucción del tejido conjuntivo seguido de una fase de resolución cicatricial en la que se depositan densas bandas de colágeno, desapareciendo la elasticidad normal de la mucosa oral que se torna rígida y provoca limitaciones funcionales. Debido a la reducción de la vascularización, el epitelio se atrofia y queda más susceptible a la posible acción de los carcinógenos. Con frecuencia se encuentran signos de displasia epitelial, lo cual apoya el carácter precanceroso de esta enfermedad (1,72,74).

El lupus eritematoso discoide es una enfermedad inflamatoria del tejido conjuntivo producida por la aparición de auto anticuerpos pero de etiología desconocida. La frecuencia de malignización de la lesión discoide es del 0,1% al 4,2 %, siendo el borde bermellón del labio inferior el lugar más frecuente de transformación maligna (1,72,75).

Recientemente se ha relacionado la diabetes mellitus con el CCECB. La base molecular que relaciona ambas patologías involucra al sustrato 1 del receptor de la insulina (IRS-1) y a la kinasa de adhesión focal (FAK) (76,77).

Desordenes potencialmente malignos.

La organización mundial de la salud define a los desórdenes potencialmente malignos como aquellas lesiones que presentan un tejido morfológicamente alterado, con más susceptibilidad de transformación maligna que el tejido equivalente con apariencia normal. Así de esta forma podemos definir un estado de pre cáncer como un proceso generalizado y sistémico que presenta un riesgo inminente y mayor de presentar cáncer.

Se consideran de esta forma que las lesiones potencialmente malignas son la leucoplasia, la eritroplasia y el componente eritroleucoplasico y un estado pre canceroso condiciona y favorece para el riesgo de presentar cáncer, dentro de los estados precancerosos se encuentran la sífilis, la disfagia sideropénica, la fibrosis submucosa bucal, el liquen plano oral y el lupus eritematoso discoide.

La leucoplasia bucal (LB) es la lesión precancerosa más frecuente de la mucosa bucal. Se define como una lesión predominantemente blanca, que no se desprende al raspado, que no puede clasificarse como ninguna otra lesión y en la que existe un riesgo inminente de desarrollar cáncer bucal. La incidencia reportada a nivel mundial es del 0,4% algunos reportes mencionan una disminución importante en comparación con años anteriores. Aparece frecuentemente en varones entre la cuarta y la quinta década de la vida; el sitio anatómico de predilección es la encía y la mucosa yugal (78,79).

En lo que respecta a su etiología se clasifica en 2 grupos principales: las

asociadas al tabaco y las idiopáticas, siendo estas últimas de etiología desconocida. El tabaco fumado es el agente etiológico más destacable, pero otras formas de tabaco como el “snuff” o el betel están igualmente relacionados con la LB. También se ha descrito la relación con el uso de Viadent®, tanto en pasta como en colutorio (80). Existen dos tipos de leucoplasias, las homogéneas y las no homogéneas. La no homogéneas se subdividen en eritroleucoplasias, nodulares y exofíticas, las cuales tienen el espectro tanto leucoplasico como eritroplastico.

La leucoplasia homogénea se caracteriza por ser una lesión predominantemente blanca, uniforme y plana. Por el contrario, la leucoplasia no homogénea es una lesión blanca o roja con una superficie irregular, nodular o exofítica. Histológicamente las leucoplasias pueden tener o no displasia epitelial. Existen una serie de factores que van a indicar el mayor o menor riesgo de malignización de una leucoplasia. Así, la localización en el piso de boca y cara ventral de lengua, la presencia de displasia epitelial y el tipo de leucoplasia (no homogénea) conllevan mayor riesgo de malignización.(71,81).

La eritroplasia se define como una lesión de la cavidad bucal que presenta áreas eritematosas o rojas y que no puede ser clasificada como otra condición. La eritroplasia es menos frecuente que la leucoplasia, la prevalencia va del 0,02 y 0,83%. Es más frecuente en pacientes de mediana edad con un ligero predominio en hombres. La etiología de la eritroplasia ha sido poco estudiada, siendo los factores predisponentes el alcohol y el tabaco. La localización más frecuente es el paladar blando y el piso de boca, aunque pueden verse afectadas otras áreas como la zona retro molar y el labio. La lesión puede ser lisa, granular o moteada. En ocasiones se encuentra asociada a otras patologías, como el liquen plano oral. El grado de malignización de la eritroplasia es muy elevado siendo frecuente la presencia de un carcinoma in situ (1,71).

La leucoplasia verrugosa proliferativa (LVP) fue descrita por Hansen (82) en 1985 como una enfermedad de origen idiopático que presenta una gran tendencia a desarrollar áreas de carcinoma. Es una forma especialmente agresiva de LB que se inicia como una simple placa blanca homogénea pero con tendencia a extenderse y a hacerse multifocal. La etiología es desconocida y no se conocen factores desencadenantes. Según estudios realizados, a diferencia de la LB, no parece tener relación con el tabaco. Se han propuesto diferentes agentes etiológicos como el VPH, la Candida Albicans, oncogenes y factores de crecimiento. Es más frecuente en mujeres con una edad media de 70 años. La LVP puede manifestarse en muchos lugares de la mucosa oral, siendo la mucosa yugal donde suele iniciarse, seguida del paladar duro y blando, la mucosa alveolar, la lengua, el piso de boca, encía y labios. Las lesiones empiezan como

una simple placa blanca homogénea que con el tiempo se extiende, haciéndose multifocal, exofítica y verrugosa. Presenta una alta tendencia a la recurrencia tras el tratamiento y un alto índice de desarrollar CCECB (70-75%), además de una alta proporción de cancerización de campo. La localización de los CCECB desarrollados en pacientes con LVP no suele ser la típica de los carcinomas orales convencionales, sino que es frecuente encontrarlos en encía.

Numerosos estudios han recalcado que el liquen plano oral (LPO), especialmente su forma erosiva, se asocia con un incremento del riesgo de cáncer, sin embargo, otras investigaciones ponen en duda esta asociación debido a la ausencia de un criterio diagnóstico unificado a nivel mundial del LPO (83,84).

Presentación Clínica.

El CCECB se presenta clínicamente como un aumento de volumen irregular, adherido a planos profundos, indurado con presencia de ulcera central con o sin sintomatología dolorosa. De igual manera se puede desarrollar a partir de una placa blanca o roja o bien con el componente mixto a lo que llamamos eritroleucoplasia . En la mayoría de los casos independientemente del tiempo de evolución el paciente suele presentar linfa adenopatías positivas, ipsilaterales o bien de manera bilateral. El tamaño tumoral puede ir desde unos milímetros hasta centímetros dependiendo del estadio, comportamiento biológico de la neoplasia maligna y características inherentes al huésped como sistema inmunológico competente etc. (1,71). La localización más frecuente reportada a nivel mundial es el borde lateral de la lengua, el piso de boca y en la oro faringe la zona del istmo de las fauces y los pilares amigdalinos.

En lo que corresponde al espectro sintomático la mayoría de las neoplasias malignas se desarrollan sin sintomatología dolorosa a expensas de que una vez obtenido un crecimiento exponencial se encuentren involucradas en un fenómeno de compresión nerviosa o bien permeando vaina nerviosa, que dan como resultado el dolor, este se presenta en una frecuencia baja entre el 30 y 40% de los casos y una vez que es identificado en la mayoría de los casos el estadio de la lesión es avanzado por esta misma razón. De esta manera las lesiones incipientes pueden pasar completamente inadvertidas y no es hasta que el aumento de volumen, la ulcera o el cambio morfológico es notable clínicamente; hasta que se solicita la valoración médica. En la cavidad bucal la lesión más franca identificable de una lesión maligna es una ulcera indurada, adherida a planos profundos que no cicatriza en un periodo de tiempo aceptable entre los 8 y 15 días. Es común observar pacientes con una lesión en estadios muy avanzados en donde el dolor está condicionado por ejemplo a una fractura patológica de los maxilares

condicionada por el desarrollo neoplásico, sin que la neoplasia per se hubiese dado ninguna sintomatología. La sintomatología en las lesiones de mayor tamaño puede variar desde una leve molestia hasta un dolor de moderado a severo, sobre todo en las lesiones localizadas en lengua. Otros síntomas incluyen: fracturas patológicas, movilidad dental, trismus, parestesias, disfagia, disfonía, disnea otalgia, entre otras.

Dentro de las localizaciones más frecuentes reportadas en la literatura mundial se encuentran en primer lugar el borde lateral de lengua, la lengua en otro sitio, el piso de boca; generando desde un inicio traumatismos oclusales por su localización o por el simple hecho de la función masticatoria y la deglución. Desde otro punto de vista las neoplasias que se desarrollan en otro sitio anatómico de la cavidad bucal o los tejidos peri bucales como en encía insertada, mucosa yugal, mucosa labial, cáncer labial, la sintomatología dolorosa está ausente en la mayoría de los casos o se presenta en estadios avanzados de la enfermedad. (1,71).

En una proporción menor, existen reportes de neoplasias malignas donde los pacientes no presentaban ninguna lesión bucal franca o por lo menos evidenciada por ellos, sin embargo la cadena linfática ganglionar en el sitio anatómico de desarrollo del tumor primario se encontraba positiva, al momento de realizar la exploración extra oral.

De acuerdo al curso fisiopatológico de la enfermedad, los pacientes con estadios avanzados de neoplasias malignas en región de cabeza y cuello, pueden presentar complicaciones inherentes al área anatómica como aumento de volumen, áreas de ulceración extensa con necrosis central, hemorragias fistulas oro-cutáneas y de manera sistémica presentar alteraciones propias del síndrome neoplásico o paraneoplásico como anemia, caquexia etc. (1,71).

En un estudio realizado en 1425 casos de CCECB, se reportan como principales síntomas reportados por los pacientes la sintomatología asociada a las lesiones ulceradas, así como al aumento de volumen, el dolor, las hemorragias, la limitación del movimiento lingual, la disfagia y la parestesia. (85). En otra cohorte de pacientes con CCECB donde estudiaron 1440 casos, el dolor se presentó en el 19.2% todos los pacientes examinados, de los cuales subdividieron por áreas anatómicas registrando 12 tipos de dolor, el más frecuente lo ocupa la sensación de dolor e irritación faríngeo con un 37.6%, seguido de la glosodinia con un 14%, otros síntomas incluían disfagia, odontalgias, otalgias, boca ardorosa, dolor muscular, dolor facial y contracturas cervicales. De todos los síntomas mencionados el dolor apareció en una proporción del 88.1% en pacientes con

estadios avanzados de la enfermedad, específicamente en los E. III/IV. (86) Mashberg et al. Encontraron en un estudio de 102 casos de CCECB que él la sensación de boca ardorosa y el dolor fueron los síntomas más frecuentes, reportados en estos pacientes (87); de igual manera Jainkitivong et al. Reportaron un estudio donde evaluaron 342 pacientes con CCECB en donde el dolor y/o aumento de volumen se reportaron en un 52.6%. En los tumores que se desarrollan en base lingual o bien piso de boca Gorsky et al (89). Mencionan que la molestia asociada de manera principal era asociada a la lengua en un 66.5%, de estos el 29% evidenciaron la presencia de un aumento de volumen en lengua, así como otalgias, disfonías, disfagia y adenopatías cervicales. Asociado a esto algunos pacientes refirieron pérdida de peso en un 35% de los casos.

Localización

El CCECB puede desarrollarse en cualquier área anatómica de la cavidad bucal sin embargo existen reportes a nivel mundial que hacen referencia a sitios específicos donde la lengua ocupa el primer lugar de frecuencia seguida por el piso de boca, esto en reportes de investigadores occidentales donde se concentran más del 50% de los casos.

Otras regiones anatómicas afectadas incluyen: mucosa yugal, región retro molar encía insertada, oro faringe, paladar blando y menos frecuente paladar duro y dorso lingual, aunque no es extraño que se pudiesen presentar en este sitio. En lo que respecta a los tejidos peri bucales, el cáncer de labio es más frecuente asociado a exposiciones laborales como por ejemplo los agricultores que permanecen bajo la radiación solar por periodos largos de tiempo sin protección y asociado también a algunas áreas geográficas en específico sobre todo, los que se encuentran más cercanos al ecuador terrestre. Existe también el conocimiento de que los hábitos culturales que hemos mencionado con anterioridad como el fumar invertido o con "la candela hacia adentro" en centro y Sudamérica así podemos ejemplificar en los países del sureste asiático el cáncer más común de la cavidad bucal se presenta en la mucosa yugal en un 40% asociado al uso del "paan" es un preparado estimulante psicoactivo de la hoja de betel combinado con nuez de areca o bien tabaco curado en algunas regiones combinado con kata o mukhwás como refrescantes o mentol ; el cual es depositado en la mucosa yugal y mantenido ahí por periodos de tiempo muy prolongados.(89)

En la mayoría de los reportes a nivel mundial se confirma que el sitio de mayor predilección y frecuencia es la lengua, en un estudio realizado en hospitales de las

fuerzas armadas militares en estados unidos, revisaron 478 CCECB donde reportaron que el sitio de localización más frecuente fue la lengua con 40% y un 33% el piso de boca (88). Yi Fan et al. Realizaron un estudio de análisis de sobre vida de pacientes jóvenes con CCECB en Beijing China , revisaron 100 casos de pacientes jóvenes con esta entidad donde el sitio de localización con mayor predilección fue la lengua móvil con 63%, encía insertada 14%, piso de boca 10% y mucosa bucal 7%.(91)



Lesión eritroplásica de borde lateral derecho de la lengua de un varón de 37 años sin antecedentes de tabaquismo y alcoholismo, asintomática, indurada, adherida a planos profundos de 4 meses de evolución según referencia del paciente.

El incremento de número de casos de CCECB en pacientes jóvenes ha sido un dato alarmante a nivel mundial, en la mayoría de los estudios realizados los reportes concuerdan con la presencia de la neoplasia maligna, aún en ausencia de los factores de riesgo convencionales como son el tabaco y el alcohol, más aún en pacientes con hábitos dietéticos libres de grasas e irritantes, balanceados Siriwardena et al comparo la localización de los CCECB en un grupo de pacientes jóvenes y de pacientes adultos mayores encontrando que en el grupo de jóvenes el sitio más frecuente fue la lengua con un 41% mientras que en el segundo grupo el área anatómica más afectada fue la mucosa yugal con un 37.5%, seguido de la encía en un 25% (91). Por otro lado Sasaki et al. Reportan en un estudio realizado en pacientes menores de 40 años considerados como jóvenes encontró una frecuencia de presentación en orden de aparición lengua 51.3%, piso de boca, mucosa yugal y encía insertada por último. (92) Ribeiro por el contrario encontró

en su estudio que los sitios más frecuentes de presentación del CCECB fue el piso de boca con un 30%, lengua 28% y el labio inferior con un 13%. (93). Mallet et al, describen que el sitio anatómico más afectado es el borde lateral de la lengua con un 51%, seguido de la superficie ventral con un 30% y el dorso con un 15%.(94).

Localización de CCECB en pacientes jóvenes / comparados con adultos mayores			
Localización	Número de casos	Grupo etario	Autor
Lengua 41% Mucosa yugal 21% Reborde alveolar 9%	100	<40	Siriwardena et al.
Mucosa yugal 37.5% Lengua 12% Reborde alveolar 25%	100	>50	Siriwardena et al.
Lengua 54.3%	529	<40	Sasaki et al.
Piso de boca 30% Lengua 28% Labio Inferior 13%	46	<40	Ribeiro et al.
Borde lateral 51% Superficie ventral 30% Dorso lingual	52	<40	Mallet et al.
Lengua 37.4% Orofaringe 29.2% Piso de boca 8.8% Encía 5.9%	171	<40	Girod et al.
Lengua 40.2% Encía 32.7% Mucosa yugal 10.1% Piso de boca 9%	1809	>40	Ariyoshi et al.
Encía mandibular 27.6% Lengua 18.4% Piso de boca 16.2%	1723	>40	Chidzonga et al.
Labio 25.6% Lengua 20.4% Reborde alveolar 17.8%	1425	>40	Al- Rawi NH y Talabani

Características clínicas de la lesión.

En lo que corresponde a la presentación clínica; las lesiones incipientes son difíciles de diagnosticar debido a que en la mayoría de las ocasiones el paciente no presenta ninguna molestia y estas evolucionan hasta que se hace evidente la neoplasia. Los desórdenes potencialmente malignos que hemos descrito con anterioridad son las leucoplasias caracterizadas por placas blancas o bien eritropias que clínicamente corresponden a una placa de color rojo o eritematosa, o bien el componente eritroleucoplasico con características de ambas y una predisposición mayor de transformación maligna inminente. De acuerdo a los diferentes tipos de crecimiento tumoral, la mayoría de las lesiones tienen un crecimiento de tipo exofítico, que posteriormente puede o no presentar una ulcera central. O bien presentar un patrón de crecimiento e invasión endofítico que también puede presentar una ulcera irregular, central y deprimida.

Las principales características clínicas incluyen la *forma exofítica* que se caracterizan por presentar crecimiento rápido, con aumento de volumen de tipo tumoral con crecimiento hacia la parte exterior de donde se desarrolla, regularmente presentan una base amplia, multilobulada, infiltrante a planos profundos, mal delimitada, poco sintomática únicamente a la palpación; por otro lado se puede presentar un patrón de *crecimiento endofítico* el mantiene las mismas características de la presentación exofítica con la excepción de que el crecimiento de la masa tumoral y los bordes están evertidos de tal forma que en los estadios incipientes son difíciles de identificar clínicamente inclusive al realizar una palpación de la zona afectada; así mismo la forma ulcerada es frecuente encontrarla en ambos patrones de crecimiento en algunas ocasiones se presenta de manera irregular, con un área central de necrosis o bien con fondo sucio e inclusive en algunas ocasiones sobre infectada. Es frecuente de igual forma una halitosis característica así como una higiene bucal pobre, por las condiciones locales.(71)

En la mayoría de los reportes a nivel mundial el CCECB se presenta como una lesión expansiva, proliferativa que en estadios avanzados presenta una infiltración importante a tejidos profundos y adyacentes invadiendo otras estructuras así como tejidos especializados, algunos autores como Jainkittivong et al entre otros, reportan que la presentación clínica más frecuente en los CCECB son las ulceradas, seguidas por los aumentos de volumen tumorales. (95, 96, 97).

De acuerdo al sitio anatómico donde se desarrolla el tumor, en la lengua pueden aparecer en los estadios iniciales como placas blancas o rojas o bien el componente mixto eritroleucoplasia con el componente tumoral, exofítico y ulcerado, que en la mayoría de las ocasiones compromete tanto la sensibilidad sensorial, gustativa y limita los movimientos funcionales musculares de la fisiología

lingual. (98) como ya hemos mencionado el sitio de predilección de los CCECB es en el borde lateral de la lengua en la mayoría de los reportes a nivel mundial representan hasta un 40-50% de los cánceres que se desarrollan en la cavidad bucal. Los que se presentan en la mucosa de la región retro molar de igual manera suelen presentarse como una masa tumoral de características exofíticas y ulceradas que comúnmente se traumatizan con el órgano dentario antagonista que casi siempre es el segundo o tercer molar. Los que se presentan en la mucosa yugal se caracterizan por un crecimiento exofítico, con bordes infiltrantes evertidos, irregulares, la disolución de continuidad comúnmente se encuentra con algunas zonas de necrosis o bien sucia. Los CCECB que se presentan en el piso de boca suelen presentarse con características similares, lesiones exofíticas pero también con el componente de crecimiento endofítico, con o sin ulceración pero en la mayoría de las ocasiones la limitación motriz es importante, estas lesiones representan entre un 30 al 40 % de los casos de CCECB .Los tumores que corresponden a la región posterior incluyendo paladar blando, úvula, pilares anteriores, pilares posteriores, amígdala, oro faringe a menudo se presentan como un crecimiento de tipo exofítico, es menos frecuente la presencia de ulceración a excepción de que el paciente sea portador de prótesis totales en donde pueden referir una ulcera que no cicatriza; estas lesiones representan entre un 3 a 6% de los CCECB. El carcinoma labial que se considera dentro de las lesiones de neoplásicas extra orales convencionalmente se presenta como una ulcera que puede o no tener una costra serohemática normalmente localizadas en el borde bermellón en la unión mucocutánea en nuestro país es común observar esta lesiones en pacientes con exposiciones laborales como jornaleros, agricultores etc. O bien exposiciones lúdicas o recreativas. (96,97,98)

Métodos de diagnóstico

Según lo reportado en la literatura mundial se debe de sospechar de un desorden potencialmente maligno o de un CCECB cuando el pacientes presenta factores de riesgo inminentes, carga genética en conjunto con la aparición de cualquier lesión de tipo tumoral, leucoplasia, eritroplasia, eritroleucoplasia, lesión de tipo ulcerosa, perdidas de continuidad del epitelio bucal, avulsión dental, parestesia, etc todas estas lesiones deben ser consideradas como sospechosas de desarrollar una neoplasia maligna, hasta que no se evidencie lo contrario.

De tal forma que la valoración del paciente debe de ser exhaustiva, tanto la intraoral, como la extraoral, palpación y evaluación de región pre auricular, retroauricular, parotídea, sublingual, submandibular, región cervical y supra clavicular. El diagnóstico definitivo se realizara mediante biopsia incisional, obteniendo una muestra representativa tanto de tejido sano- área de transición-

neoplasia de tal forma que se puedan evitar tomas poco representativas que incluyan tejido necrótico, dilución de continuidad; si la lesión es de un tamaño considerable es recomendable la toma de biopsia de diferentes áreas de la lesión para que el diagnóstico sea consistente en cada muestra. Según la literatura es recomendable que cuando se sospecha de una lesión incipiente la biopsia debe ser tomada del sitio con mayor característica de alteración y por el contrario en lesiones en estadios avanzados se recomienda tomar la biopsia de los bordes evertidos o bien áreas más induradas con infiltración de planos profundos.

Es importante no dejar a un lado los auxiliares de imagen como son las radiografías convencionales, periapicales, oclusales, panorámica, laterales de cráneo, o bien estudios más detallados como la tomografía axial computarizada TAC y la resonancia magnética dependiendo de cada caso en específico y de la severidad de la neoplasia, estas últimas permiten identificar la diseminación a tejidos adyacentes, así como la identificación de metástasis a distancia. (100).

Es importante mencionar la tomografía por emisión de positrones PET, que permite entre otros usos la detección del tumor primario en estadios incipientes de la enfermedad, así como las metástasis cervicales. Esta técnica se desarrolla de manera general en la identificación de un aumento significativo de la actividad metabólica del tejido tumoral, en donde el aumento de la glicólisis es evidenciado y caracterizado en el estudio. A pesar de que las metástasis a distancia de los CCECB son poco frecuentes es importante valorar una tele de tórax. (101)

Por otro lado un auxiliar de diagnóstico y toma de muestras durante años ha sido el azul de toluidina, como un marcador de desórdenes potencialmente malignos o lesiones sospechosas de malignidad y nos permite identificar la extensión del epitelio que presenta displasia epitelial y elegir el mejor sitio por medio de la reacción en el epitelio bucal (104, 105).

De igual manera se han tratado de utilizar biomarcadores genéticos como predictores de la enfermedad, dentro de estos se encuentra p53, pRb, p16 entre otros, sin que hasta el momento se evidencie una sensibilidad y especificidad en los estudios realizados a nivel mundial, ni su aplicación clínica.(102, 103)

Es importante mencionar que en la actualidad se ofertan productos milagros que pueden diagnosticar desordene potencialmente malignos y cáncer en la mucosa bucal, con solo proyectar una luz fluorescente, en donde en la mayoría de las ocasiones identifica lesiones inclusive por trauma que se encuentran en fase proliferativa por reparación del tejido afectado, sin que necesariamente se trate de una lesión de tipo neoplásica maligna, de tal suerte que su utilidad clínica deja

mucho que desear y nunca sustituye la anamnesis, la valoración intra y extra oral, ni la biopsia que es el estándar de oro. (106)

En lo que respecta al diagnóstico y evaluación de las diseminaciones a ganglios linfáticos, se han utilizado numerosos auxiliares de diagnóstico dentro de los cuales podemos mencionar la determinación del ganglio centinela, el cual se basa en el análisis histopatológico del mismo, se considera que es el sitio primario de derivación linfática desde el área de desarrollo tumoral. (107,108)

Características Histopatológicas

Dentro de las características histopatológicas, las células neoplásicas del epitelio bucal se disponen en la mayoría de las lesiones como proliferación de islas, cordones que se desprenden de la membrana basal y que a menudo infiltran el tejido conjuntivo ya sea como carcinomas micro invasor o bien como carcinoma invasor, desde el punto de vista histopatológico se han tratado de unificar criterios a nivel mundial utilizando diferentes clasificaciones, sin embargo la más aceptada y unificada es la de la organización mundial de la salud, que divide los grados de malignidad según las características de las células identificando pleomorfismo celular, pleomorfismo nuclear, grado de queratinización, queratinizaciones individuales así como actividad de mitosis y mitosis aberrantes. (1,109).

Dentro de esta clasificación se encuentran:

Carcinomas de células escamosas bien diferenciado, el cual se caracteriza por parecerse de una manera fiel a las células que le dieron origen, de tal suerte que la identificación al microscopio es relativamente fácil, así mismo presenta otras características histológicas como, abundante formación de perlas de queratina, queratinizaciones individuales, la atipia celular y las mitosis aberrantes son mínimas y otras características de buen pronóstico es que se presente un infiltrado inflamatorio de predominio linfoplasmocitario.

Carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado, el cual de manera general presenta un menor parecido con las células que le dieron origen, si se realiza una evaluación por campos el número de mitosis y el grado de atipia es mayor que en el bien diferenciado, otra característica importante es que la producción de queratina es menor tanto en perlas como en queratinizaciones individuales.

Carcinoma de células escamosas pobremente diferenciado o indiferenciado, la similitud de las células que le dieron origen es prácticamente nula, de tal manera que se vuelve un reto diagnóstico para el patólogo definir la estirpe celular, en algunas ocasiones es importante y necesario recurrir a tinciones químicas o bien

reacciones de inmunohistoquímica para establecer el origen de la lesión, el pleomorfismo celular es por demás evidente, existe un elevado conteo de mitosis aberrantes, nucléolos evidentes.(109)

Clasificación TNM de los CCECB.

La clasificación TNM sigue siendo una herramienta útil en la clasificación de los tumores de cabeza y cuello en específico los de la cavidad bucal, de tal forma que al evaluar de manera general al paciente en los centros de referencia oncológicos permite elaborar un plan de tratamiento adecuado, prever un pronóstico y calidad de vida del paciente, esta clasificación se encuentra basada en parámetros clínicos, en los auxiliares de imagen en el diagnóstico así como la evaluación post quirúrgica en aquellos pacientes candidatos a cirugía, de tal forma que las siglas significan T tumor primario, las características clínicas, forma, tamaño, adhesión a planos profundos etc, la N nos indica la presencia de adenopatías positivas, y si estas se presentan de manera aislada, local regional, ipsilaterales, bilaterales y la M identifica las posibles metástasis a distancia y se cuantifica de manera si está presente esta o no. Cabe mencionar que en la actualidad las clasificaciones que se encuentran calificadas y aceptadas son las de la American Joint Committee on Cancer y la International Union Against Cancer.(110, 111).

Opciones terapéuticas

Podemos mencionar que como cualquier neoplasia maligna que se desarrolla en otro sitio anatómico de la economía corporal, el CCECB requiere de un tratamiento integral, que involucre la mayoría de las especialidades en oncología, de tal suerte que existen protocolos internacionales para su tratamiento, una vez realizado el diagnóstico y la clasificación TNM, Si bien es cierto que dentro de las herramientas terapéuticas la opción más utilizada es la cirugía oncológica, la radioterapia y la quimioterapia son los métodos más utilizados.

En estadios incipientes de la neoplasia el tratamiento quirúrgico sigue siendo el de primera opción, siempre y cuando se realice de una manera adecuada, segura, con márgenes de seguridad adecuados, puede ser necesario el vaciamiento de la cadena ganglionar afectada o ipsilateral y es poco frecuente la afectación de manera bilateral. Las disecciones de la región cervical incluyen el vaciamiento cervical funcional, el vaciamiento cervical radical modificado y el vaciamiento cervical radical. .(1,71).

La radioterapia es otro método de tratamiento que sigue siendo muy utilizado sobre todo en aquellos tumores con tamaños grandes, que se encuentran adyacentes a estructuras anatómicas de importancia como vasos sanguíneos,

trayectos nerviosos etc. A pesar de que los aparatos actuales permiten un perímetro de radiación más controlados y específicos con una reducción importante del perímetro a radiar, la administración no ha cambiado de igual forma se administra mediante una fuente de radiación alejada del organismos, esta fuente es la bomba de cobalto o bien los aceleradores lineales. El tratamiento de radioterapia por protocolo consiste en una dosis de 10 greys (Gy) semanales, posteriormente 2 Gy diarios durante 5 días y dos o tres días de descanso por un periodo de un mes y medio o dos. El que se administre de esta manera fraccionada permite un grado de seguridad mayor para el paciente respetando las células sanas y discriminándolas de las neoplásicas, disminuye de manera importante la toxicidad , permite la re oxigenación e las células tumorales aumentando su radiosensibilidad.(1) Otra opción terapéutica es la braquiterapia donde técnica involucra radiaciones ionizantes , situando el material radioactivo en el interior del tumor, la más empleada en tumores de cabeza y cuello es la radioterapia intersticial, que consiste en la colocación de pequeños alambres en el interior y en la circunferencia del tumor, marcado son isótopos radioactivos de iridio.

Esta terapia tiene una efectividad mayor ya que elimina la mayor cantidad de células normales pero con la desventaja enorme que también elimina las células sanas, debido a que la emisión es continua y prolongada sin periodos de descanso. Dentro de los agentes quimioterapéuticos más utilizados se encuentran el cisplatino y el 5-fluoracilo.(1,71).

Calidad de vida y pronóstico de los pacientes con CCECB.

El pronóstico de los pacientes con CCECB se establece posterior a la evolución de los factores relacionados con el crecimiento tumoral, la aceptación y efectividad del tratamiento en cada paciente en específico y las características generales del individuo que sufre la enfermedad. Es razonable que la detección de la neoplasia en estadios incipientes condicionara para un tratamiento menos mutilante, con una tasa de éxito por arriba del 70% y una baja tasa de permanencia o recurrencia, por el contrario los pacientes detectados en estadios avanzados de la enfermedad presentan una alta tasa de mortalidad. El pronóstico de igual forma dependerá del tratamiento adecuado si se está considerando como primera opción la resección quirúrgica de la lesión, el llevar a cabo una técnica limpia, con resección con márgenes de seguridad adecuados, vaciamiento de cadena ganglionar afectada, todo esto condicionará la supervivencia a 5 años, en donde en algunos casos baja hasta un 50%. (112).

Algunos factores que pueden tener un peso importante en los factores pronósticos son el tamaño del tumor, cuanto más grande sea compromete el estado general del paciente, así como la calidad de vida por mutilaciones extensas, como ya se ha mencionado en teoría un carcinoma de células escamosas pobremente diferenciado o indiferenciado podría considerarse como biológicamente más agresivo de tal forma que una resección quirúrgica con bordes libres de lesión, tiene un valor predictivo significativo; por otro lado la infiltración peri neural asocia significativamente el comportamiento biológico de la lesión, crecimiento tumoral, la metástasis a estructuras vecinas y afectación de la cadena ganglionar afectada.(109)

Teoría de las células troncales cancerosas

Las células trocales son un subgrupo del total de las células del organismo que presentan como características principales la capacidad de auto renovación, auto regeneración, es decir, producir células nuevas idénticas al ser colocadas en un medio de cultivo apropiado y la capacidad también de auto diferenciación en distintos tipos celulares.

El término de células troncales se adoptó desde el año 1908, acuñado por el histólogo de origen ruso, Alexander Maksimov, durante la reunión de hematología internacional, al estar realizando la descripción de diferenciación de las distintas células sanguíneas. Posteriormente a inicios de la década de los años sesenta, se logró evidenciar la existencia de las células troncales con capacidad de auto renovación y todas sus características a nivel de medula ósea. Así mismo en el año de 1978 se descubre la presencia de las células troncales en el cordón umbilical del ratón y del humano, marcando el inicio del estudio de las células troncales embrionarias. Posteriormente a este hallazgo se han logrado ubicar células madre en tejido adulto prácticamente en todos los tejidos corporales y más interesante aún se ha logrado la manipulación de estas células diferenciadas adultas para producir células madre indiferenciadas razón por la cual se han denominado a este tipo células troncales inducidas.

Células troncales

Las células troncales de acuerdo a su desarrollo y características fisiológicas, se clasifican en embriogénicas y del adulto. Las células troncales embriogénicas se derivan de la masa interna de los blastocitos en la mayoría de los mamíferos con capacidad de diferenciarse en células de las tres capas germinativas y se encuentran distribuidas en todos los tejidos y órganos del cuerpo humano. (113) Las células troncales del adulto son células indiferenciadas con capacidad limitada para autorenovarse y un potencial de diferenciación restringido para los tipos celulares de los tejidos donde se localizan. Las células troncales juegan un rol

importante en la mayoría de los tejidos manteniendo un estado óptimo y una homeostasis general, así como también tienen injerencia en la biología de múltiples enfermedades, incluidas las neoplasias malignas (114).

Células troncales y la cavidad bucal

El patrón jerárquico en el epitelio bucal consta de tres estratos: el estrato basal, el parabasal y el epitelio superficial donde la mayoría de las células han completado su diferenciación.

La proliferación epitelial consiste en una división asimétrica de células troncales, la célula troncal normal persiste en cada división celular y genera una célula transitoria amplificada, esta tiene la capacidad de dividirse entre tres y cinco veces más hasta que todas las células hijas a las que dieron origen terminen de diferenciarse (115). En comparación con las células troncales las células amplificadas transitorias no sufren autorrenovación y su función es incrementar el número de células diferenciadas. Una célula troncal podría únicamente tener una división que generara una sola célula troncal y ocho células transitorias destinadas a terminar su diferenciación.

Las células troncales del epitelio bucal también pueden dividirse simétricamente dando como consecuencia la aparición a dos células amplificadas transitorias, con pérdida de la célula troncal pre-existente, o dos células que conservan las propiedades básicas de las células troncales. Este segundo patrón de división simétrica se involucra con la recuperación basal de la población de células troncales que se pierden por desgaste fisiológico, lesiones o traumatismos (116).

La proliferación jerárquica asimétrica prevé el ordenamiento espacial teórico de la progenie de las células troncales del epitelio bucal en la forma invertida de estructura piramidal, estas células pueden considerarse como unidades proliferativas individuales. El vértice de la unidad proliferativa puede ser una célula troncal en el estrato basal, el estrato de arriba está ocupado por una célula del parabasal, seguidas por dos, cuatro u ocho células transitorias amplificadas en estratos progresivos, se da por hecho que cada unidad proliferativa es mantenida por una célula troncal y que las células del estrato parabasal migran de manera lateral, a esto se le puede considerar como un mecanismo de regulación antitumoral, permitiendo la homeóstasis del epitelio mientras la tasa de proliferación celular de cada célula troncal está controlada y reducida. (117).

Células troncales cancerosas

Es bien conocida la teoría del carcinogénesis derivada de las células troncales cancerosas en cualquier tejido o área anatómica, se cree que un escaso grupo de células, conocidas como "células troncales cancerosas" CTC tienen la capacidad de auto renovación, lo que les permite generar una fenocopia del tumor original (118), siendo las progenitoras de células que conforman la masa tumoral y dirigen el crecimiento y comportamiento biológico de la lesión tumoral. En lo que respecta a la manipulación in vitro, en condiciones de cultivo celular, en condiciones de baja adherencia, las células troncales cancerosas derivadas en líneas celulares de CCECB tienen la capacidad de formar esferoides llamados "oroesferas".

Existen por lo menos dos hipótesis aceptadas en la literatura mundial, que han propuesto explicar la heterogeneidad y capacidad de iniciación de la neoplasia, la hipótesis de las células troncales con cáncer (119). Y la hipótesis de la evolución clonal (120)

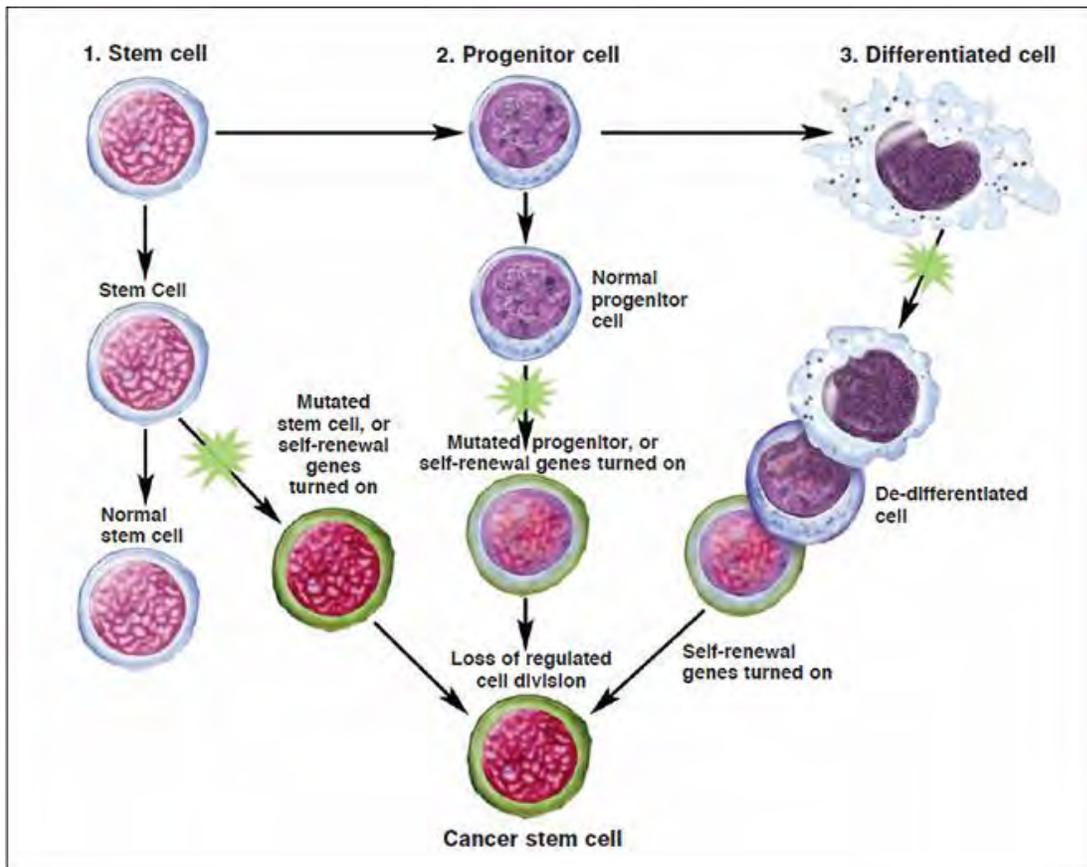
En 1976 Nowell propuso la hipótesis de la evolución clonal, estableciendo que la mayoría de las neoplasias malignas derivan de una sola célula, y que la progresión de la neoplasia resulta de que se adquiere variabilidad genética dentro de la clona original siguiendo una selección secuencial y más sublíneas agresivas. El modelo estocástico sugiere que este se desarrolla por una acumulación de numerosas y variadas mutaciones individuales y señales de microambientes que proveen de una selectiva ventaja a ciertas células del tumor sin embargo todas las células de tumor tienen la habilidad de propagar el mismo (121)

Otras hipótesis proponen como las de Dick y colaboradores proporcionaron evidencia temprana de las CTC utilizando modelos de leucemias (122). El laboratorio de Clarke dio a conocer la presencia de células troncales en neoplasias sólidas, en cáncer de mama (114). Es entonces que surge la hipótesis de las células troncales de cáncer, que crea un modelo jerárquico de iniciación del tumor y progresión el cual sugiere que solo una pequeña subpoblación específica de células tiene la capacidad de autorenovarse y tienen la habilidad de mantener la capacidad de tumor. (121) estas células tienen tres características principales:

- 1.- Potencial de iniciación del tumor es decir sirven como progenitoras de las células troncales cancerosas.
- 2.- Autorrenovación es la capacidad y habilidad para formar nuevas células troncales idénticas, con potencial de proliferación y diferenciación, de este modo se conserva el nicho de células troncales. Esto resulta de una división asimétrica en la cual se produce una copia exacta con potencial de desarrollo idéntico a la progenitora.

3.- Capacidad de diferenciación celular, permitiendo dar la aparición de una progenie heterogénea representada por una fenocopia de células originales del tumor (123) Las CTC pueden ser las responsables del comportamiento del tumor que en la mayoría de los casos es agresivo de un gran número de tumores y tipos de cáncer vía de aprobación de maquinaria molecular de mantenimiento y movilización involucrada en la invasión tumoral y metástasis (124). Las células troncales del cáncer tienen la capacidad de transición epitelio mesénquima (125).

Las células troncales de cáncer podrían ser el origen de un tipo nuevo de división celular la cual es llamada "neosis" división celular que se observa frecuentemente en cáncer en donde el daño al DNA puede generar células multinucleadas seniles que pueden evadir la apoptosis evitando todos los mecanismo de regulación afectando de manera directa a p53 y dando aparición a células con características de células troncales (126).



Charles A. Goldthwaite, Jr., PhD.

Anticuerpo CD44 como marcador pronóstico en cáncer bucal.

CD44 es una glicoproteína de superficie de membrana de la célula, caracterizada por ser el principal receptor de ácido hialurónico en la superficie celular. El gen de cd44 contiene 20 exones, de estos los 10 exones centrales de la secuencia del gen son susceptibles a sufrir splicing alternativo, la isoforma de CD44 denominada estándar no contiene ninguno de estos 10 exones variables. Teóricamente, podrían existir más de 800 isoformas de CD44, aunque aparentemente no todas se expresan. La variabilidad estructural de CD44 se ve aumentada por la presencia de modificaciones post-traduccionales, tales como N y O-glicosilaciones y unión a glicosaminoglicanos. (127)

La estructura proteica de CD44 se puede dividir de manera general en los siguientes dominios.

- a).- Dominio N-terminal, es una región extracelular a través de la cual CD44 puede unirse al ácido hialurónico.
- b).- Región extracelular próxima a la membrana, susceptible de sufrir proteólisis, es la región donde se encuentran los exones variables.
- c) Región de transmembrana
- d) Dominio C-terminal: es la región intracelular, a través de la cual CD44 interacciona con ciertas proteínas citoplasmáticas.

En el extremo N-terminal existe un fragmento de 92 aminoácidos que presentan un 35% de homología con una secuencia de la familia de proteínas englobadas bajo el nombre de hialadherinas por su capacidad de unión al ácido hialurónico. En esta familia encontramos moléculas como proteína de unión del cartílago, agrecano, versicano, proteína 6 inducible por TNF (TSG-6) y el receptor 1 de ácido hialurónico del endotelio de los vasos linfáticos (LYVE.1) (Naor et al.)

Se han descrito tres estados de activación de CD44 (128); activo, presenta capacidad de unión al ácido hialurónico de forma constitutiva, inducible puede unir ácido hialurónico cuando es activado por factores inductores como anticuerpos o citoquinas e inactivo cuando no une ácido hialurónico ni en presencia de inductores. En muchos casos, el patrón de N-glicosilación es el que determina la capacidad de CD44 de unir moléculas de ácido hialurónico esto es a mas nivel de glicosilación, menos activación.

Las funciones que realiza CD44 son muy variadas, gracias a las múltiples interacciones que la molécula puede establecer tanto a nivel extracelular, en la membrana plasmática o a través de la cola citoplasmática. Además de ácido hialurónico, CD44 puede unirse a otras moléculas como lo son el colágeno, fibronectina, fibrinógeno, laminina, cadenas de condroitín sulfato u osteopontina, entre otras. Así mismo puede establecer interacciones con otros receptores y proteínas de membrana así como con proteínas del citoesqueleto. Las principales funciones de CD44 son la participación en interacciones célula-célula y en procesos de crecimiento, adhesión, motilidad y diferenciación celular (127, 128). CD44 también ha demostrado participar de manera importante en numerosos procesos tumorales y de neoplasias malignas.

Desde hace tiempo, se tiene conocimiento de que CD44 participa en los procesos de crecimiento tumoral e invasión metastásica (128). En el análisis de dos líneas celulares de melanoma provenientes del mismo paciente se demostró que la línea obtenida a partir de un nódulo metastásico expresaba CD44, se observó mediante ensayos in vivo que las células presentaban una mayor capacidad de crecimiento y una capacidad importante de metastatizar cuando esta se comparaba con la línea que no expresaba CD44.

Se ha relacionado a CD44 con la progresión y metástasis de diferentes tumores a lo largo de la economía corporal incluyendo las neoplasias de cabeza y cuello y por supuesto las que se desarrollan en cavidad bucal como los CCECB. Este anticuerpo también ha sido identificado como un marcador importante de células troncales cancerosas tanto en CCECB como en otras neoplasias del mismo sitio anatómico. Estudios recientes han demostrado vías de señalización patológica en la activación e influencia del crecimiento, la metástasis y la resistencia a los agentes terapéuticos por protocolo de estas neoplasias, sin embargo esto sigue generando polémica y discusión entre los investigadores de este campo a nivel mundial.

En un estudio realizado en modelo animal por (128). Se realizó un trasplante seriado de células derivadas de un CCECB, en ratones inmunosuprimidos; en estas células previo al ensayo se realizaron pruebas de inmunoreacción para CD44 las muestras con un alto porcentaje de positividad fueron las que se inocularon en los ratones y una vez que se realizó dicho estudio, se identificó que los ratones con este inóculo mostraron una propiedad importante de iniciación tumoral en comparación con las células derivadas de un inmunomarcaje pobre o nulo para CD44.

La expresión de CD44 en CTC tiene una significancia tumoral importante, existe evidencia que demuestra como CD44 se involucra de manera directa en el mantenimiento del CCECB y de las propiedades que tienen las CTC para potencializar este efecto.

La inactivación de CD44 tiene como resultado un incremento en la diferenciación celular que indica una regularización de la regulación de marcadores de control como lo son la calgranulina B y la involucrina. Por otro lado una sobre expresión de CD44 incrementa de manera significativa la proliferación celular y la migración de células en líneas celulares de CCECB, este efecto esta mediado por CD44 que en conjunto con la activación del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) disparan y promueven el crecimiento tumoral y de la misma forma activan otros genes como Ras-MAPK, PI3K-PTEN-AKT, y la fosfolipasa C como vía de señalización. La interacción de CD44 con el hialuronano el primer ligando de las primeras variantes de las isoformas de CD44 activan Rho quinasa y la PI3 quinasa como señalización inicial, promoción y mediación del crecimiento celular tumoral, traducido en una proliferación de células tumorales de manera exponencial con un comportamiento biológico agresivo así como su quimioresistencia a los fármacos convencionales como el cisplatino por ejemplo. (127, 128)

CD44 como auxiliar diagnóstico en saliva y en sangre.

El dominio extracelular de CD44 es liberado de la superficie celular como CD44 soluble (solCD44), mediante la acción de las proteinasas. Existen reportes que demuestran un incremento importante de solCD44 en muestras salivales de pacientes con presencia de displasias bucales y con CCECB en comparación con sujetos sanos voluntarios que decidieron participar en el protocolo. Así mismo se reporta una alta incidencia de permanencia o recaída al tratamiento, en pacientes con niveles altos de solCD44 con CCECB. Así mismo muestras salivales con una expresión baja de solCD44, cuando los niveles de hipermetilación del promotor de CD44 sugiere que tanto los niveles así como el estado de metilación pueden adoptarse como marcadores pronósticos de la neoplasia. Sin embargo en comparación con las muestras tomadas de sangre periférica estas no son sensibles ni específicas en comparación con el test salival. (127, 128)

Justificación:

En la actualidad en nuestro país se desconoce si el carcinoma de células escamosas de la cavidad bucal que se presenta en pacientes adultos mayores en comparación con los casos recientes de pacientes jóvenes tienen una similitud estrecha en lo que corresponde a la presentación clínica, si previo a la neoplasia se desarrollaron desordenes potencialmente malignos o no, si la etiología en pacientes sin factores habituales se atañe a los factores virales, genéticos, epigenéticos, células troncales cancerosas, síndromes u otros, si el comportamiento biológico de la neoplasia es más agresivo en el grupo de jóvenes que en adultos y por ultimo si los tratamientos y el pronóstico marcan diferencias significativas.

Así mismo es importante resaltar que los tratamientos y la expectativa de vida del paciente continúan siendo poco específicos y que las secuelas del tratamiento oncológico cualquiera que haya sido demeritan la calidad de vida del paciente de forma importante.

De igual forma cabe mencionar distintos factores que comprometen ambos resultados como un diagnóstico en estadios avanzados, la recurrencia en el sitio del tumor primario con altas tasas descritas, la habilidad de metastatizar a ganglios linfáticos loco regionales, así como la amplia respuesta al tratamiento tanto de radio como quimioterapia y la resistencia que presentan algunos pacientes.

Por tal motivo el aportar información adicional a estos factores, nos permitirá conocer los mecanismos biológicos, progresión, tratamiento y pronóstico de ambos grupos de pacientes, encaminados a sugerir estrategias terapéuticas específicas a cada grupo.

Pregunta de investigación

¿Existen diferencias en los parámetros y gradificación histopatológica así como en la inmunoexpresión de proteínas (CD44) asociadas a clonas en carcinoma de células escamosas de la cavidad bucal provenientes de pacientes jóvenes, en comparación con carcinomas bucales de células escamosas de pacientes adultos?

Objetivo general.

Identificar las características histopatológicas y de inmunexpresión en 2 grupos de pacientes (jóvenes y adultos) que presentan carcinoma de células escamosas de la cavidad bucal.

Objetivos específicos.

- Describir las características sociodemográficas de cada grupo de pacientes.
- Establecer frecuencia de los principales sitios primarios-anatómicos del CCECB.
- Identificar el grado de diferenciación de los CCECB en ambos grupos de pacientes.
- Describir el frente de invasión tumoral en ambos grupos de pacientes con CCECB.
- Identificar el inmunomarcaje y expresión de CD44 en ambos grupos de pacientes.

Materiales y Métodos:

Diseño de estudio: Transversal, Descriptivo, Comparativo y Ambispectivo.

Universo de estudio: Archivos, de muestras biológicas y expedientes clínicos e histopatológicos provenientes de la clínica y el laboratorio de patología bucal de posgrado de la DEPEI UNAM.

Tamaño de muestra: Muestra total disponible por conveniencia compuesta por 41 casos de carcinoma de células escamosas de la cavidad bucal, 20 correspondientes a pacientes jóvenes <40 y 21 a pacientes adultos >45 años.

Criterios de inclusión:

Se incluyeron aquellos expedientes que estuvieron completos, con datos generales del paciente, datos sociodemográficos, clínicos de la lesión enviada al laboratorio de patología. Así mismo muestras en las que el material biológico embebido en parafina tuviera el suficiente material para realizar cortes adicionales y que las laminillas existentes y teñidas con hematoxilina y eosina estuvieran condiciones adecuadas para su observación y análisis.

Criterios de exclusión:

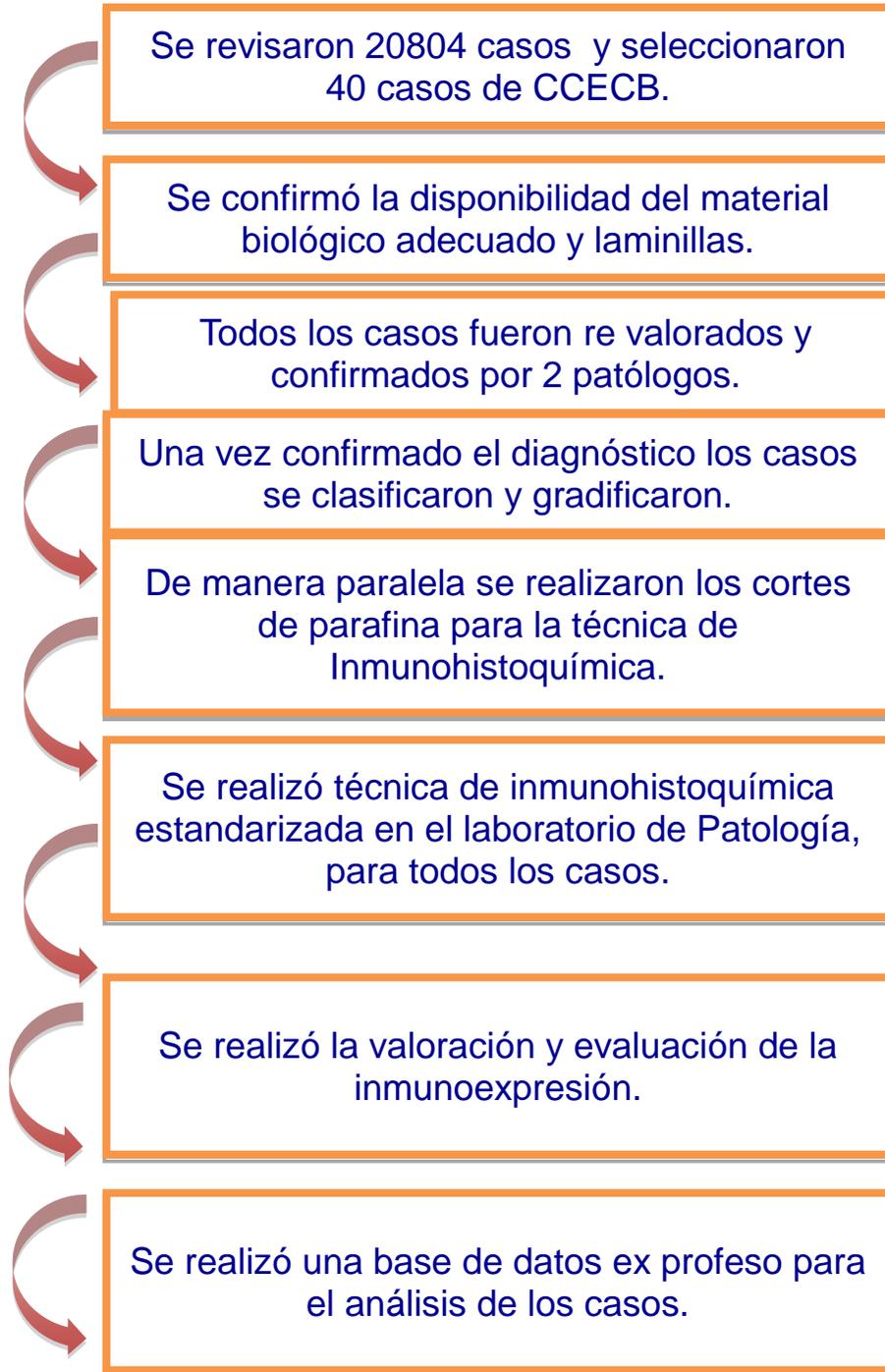
Se excluyeron todos aquellos expedientes clínicos incompletos y los casos de histopatología que estuvieron incompletos.

Se excluyeron todas aquellas laminillas que estuvieron incompletas o en mal estado, así como los bloques de parafina en malas condiciones o con material escaso material biológico.

Criterios de eliminación:

Se eliminaron todos aquellos casos donde por su indiferenciación (completamente anaplasicos) celular fuera necesario realizar estudios complementarios como inmunohistoquímica o en donde los expertos discreparon con los diagnósticos.

Flujograma de trabajo



Variables Dependientes

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Tipo de variable	Escala de medición
Carcinoma de células escamosas	Neoplasia maligna de células escamosas caracterizada por la pérdida de los mecanismos regulatorios, mutación, inmortalización y proliferación celular descontrolada potencialmente invasiva y metastásica.	Paciente con diagnóstico histopatológico de carcinoma de células escamosas de la cavidad bucal, con características morfológicas establecidas por los criterios de la OMS y Broders.	Cualitativa	Ordinal 1.-CCECB bien diferenciado. 2.- CCECB moderadamente diferenciado. 3.- CCECB pobremente diferenciado

Variables Independientes

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Tipo de Variable	Escala de medición
Edad	Tiempo que ha vivido una persona	Edad en años, que tiene la persona al momento de la entrevista	Cuantitativa	Razón discreta.
Sexo	Condición orgánica, masculino o femenino.	Genero asumido y expresado por el paciente al momento de realizar el interrogatorio.	Cualitativa	Nominal/Dicotómica Masculino/Femenino
Estado civil	Condición de una persona según el registro civil en función de si tiene o no pareja y su situación legal respecto a esto	Situación en función de pareja expresada por el paciente al momento del interrogatorio	Cualitativa	Ordinal 1.- Casad@ 2.- Solter@ 3.- Otro.
Sitio anatómico en boca	Localización anatómica topográfica exacta dentro de la cavidad bucal o tejidos peri bucales.	Lugar específico dentro de la cavidad bucal o región peri bucal donde se encuentra la lesión por ejemplo: lengua, encía, trigono retro molar, mucosa, paladar, labio etc.	Cuantitativa	Nominal / Politomica 1.- Lengua 2.- Encía 3.- Trigono retromolar. 4.- Mucosa 5.- Paladar 6.- Labio 7.- Otros

--	--	--	--	--

Consideraciones éticas

El presente estudio se sujetó a las consideraciones bioéticas, se considera con riesgo menor al mínimo, debido a que no fue necesario someter a los sujetos de estudio a intervenciones invasivas, se consideraron todos y cada uno de los postulados del tratado de Helsinki así como las leyes en materia de salud e investigación en humanos de nuestro país.

Análisis estadístico.

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente en el programa SPSS, se realizó estadística descriptiva para el análisis de medidas de tendencia central, valores máximos y mínimos, desviación estándar; para las variables cuantitativas, para variables cualitativas número y porcentaje, χ^2 para asociación de variables.

El nivel de significancia empleado en todos los análisis fue del 95% con $\alpha=0.05$ donde un valor de p menor a 0.05 es indicativo de una relación estadísticamente significativa, por el contrario un valor mayor a 0.05 indica una ausencia de relación significativa.

Resultados

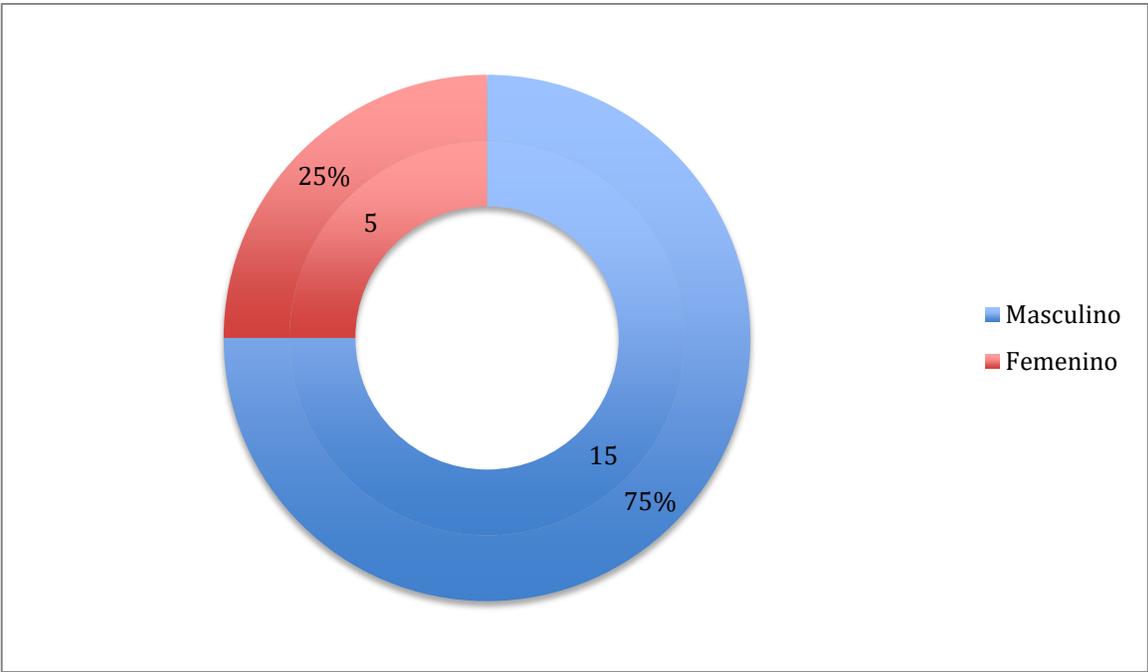
Se revisaron más de 20 804 archivos de 1983 a 2014, del archivo de histopatología del Laboratorio de Patología Clínica y Experimental de la División de Estudios de posgrado e investigación de la Facultad de Odontología UNAM; de los cuales Se aislaron 219 casos de CCECB y de este se identificaron y aislaron 20 casos de pacientes jóvenes (grupo 1) y 21 casos de pacientes adultos (grupo 2) con diagnóstico de CCECB los cuales fueron seleccionados confirmando la presencia de la laminilla y bloque de parafina con adecuado material biológico.

Una vez seleccionados los casos de ambos grupos fueron revisados y re diagnosticados por 2 patólogos la selección de laminillas fue al azar y sin conocimiento del folio o algún dato de cada laminilla, se tomaron en cuenta los criterios de Borders para la clasificación y graditaje de los CCECB así como la clasificación del FIT (frente de invasión tumoral), siguiendo estos parámetros:

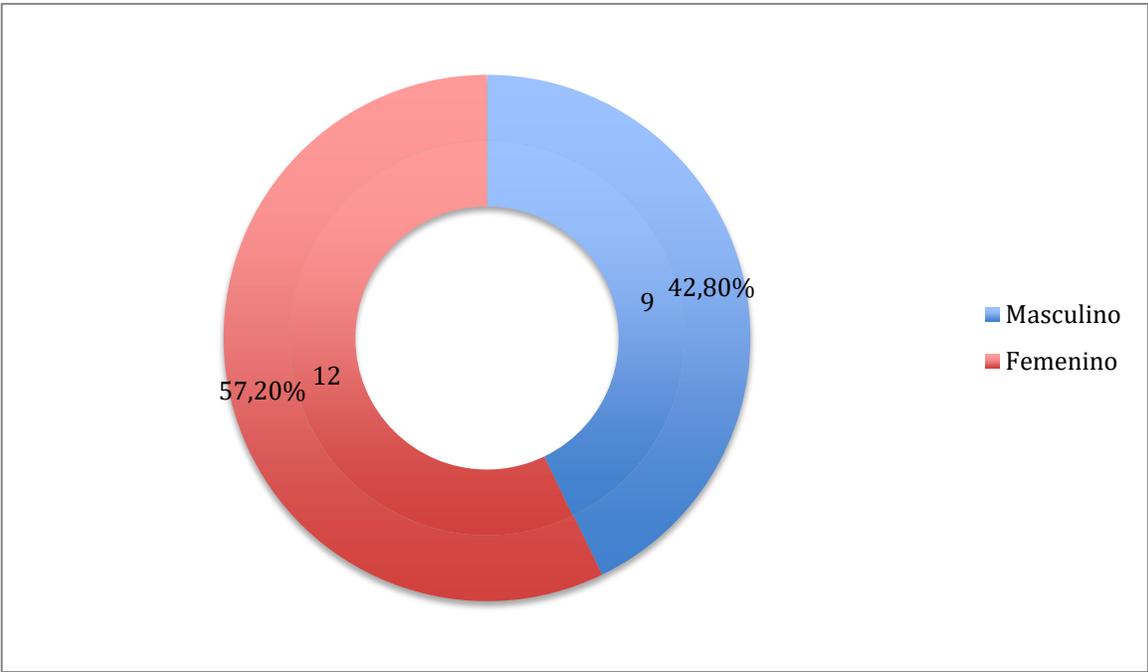
Clasificación de Broders	
Grado I	25% de las células malignas están indiferenciadas
Grado II	50% de las células están indiferenciadas
Grado III	75% o más de las células malignas están indiferenciadas

Frente de invasión tumoral FIT				
Número mitosis	Nulo =0	Leve de 0-1	Moderado 2-5	Severo más de 5
Patrón de invasión.		Cercano al vaso	Rodea vasos y nervios	Infiltra vasos y nervios
Profundidad tumoral de invasión		Lamina propia	Músculo y glándula	Invade Hueso
Grado de queratinización		Más del 75%	Hasta un 50%	Menos del 25%
Pleomorfismo nuclear		Menos del 25%	Del 50 al 75%	Más del 75%
Infiltrado inflamatorio		Intenso	Moderado	Leve

Dentro de las características sociodemográficas en el primer grupo (Jóvenes) se revisaron 20 casos de los cuales 15(75%) fueron del sexo masculino y 5(25%) del sexo femenino, la edad promedio fue de 29.05 con una DVS +/- 6.93; En el segundo grupo (Adultos) se revisaron 21 casos de los cuales 9(42.8%) fueron del sexo masculino y 12(57.2%) del sexo femenino, la edad promedio fue de 72.76 con una DVS +/- 11.51.



Grafica 1 distribución del sexo pacientes jóvenes



Grafica 2 de distribución de sexo adultos mayores

En lo que respecta al sitio de localización de la neoplasia, en el grupo de jóvenes el más frecuente fue el reborde alveolar 5(25%) casos, cuerpo mandibular 3(15%), maxilar región anterior 2(10%), borde lateral de lengua 2(10%), mucosa yugal 2(10%), paladar 2(10%), piso de boca 1(5%), auricular superior 1(5%).

En el grupo de adultos el sitio de localización más frecuentes fue el borde lateral de la lengua con 10(47.6%) casos, reborde alveolar 3(14.2%), mucosa yugal 2(9.5%), paladar 2(9.5%), maxilar 2(9.5%), piso de boca 1(4.7%), región nasogeniana 1(4.7%).

Sitio de localización			
Región anatómica	Jóvenes	Región anatómica	Adultos
Reborde alveolar	5 casos (25%)	Borde lateral de lengua	10 casos (47.6%)
Cuerpo Mandibular	3 (15%)	Reborde alveolar	3 (14.2%)
Maxilar anterior	2 (10%)	Mucosa yugal	2 (9.5%)
Borde lateral de lengua	2 (10%)	Paladar	2 (9.5%)
Mucosa yugal	2 (10%)	Maxilar	2 (9.5%)
Paladar	2 (10%)	Piso de boca	1 (4.7%)
Piso de boca	1 (5%)	Región nasogeniana	1 (4.7%)
Auricular posterior	1 (5%)		

En lo que corresponde al grado de diferenciación, utilizando la clasificación de Broders en el grupo de jóvenes se gradifico de la siguiente manera 17(85%) CCECB bien diferenciados, 2(10%) CCECB pobremente diferenciado y 1(5%) CCECB moderadamente diferenciado; En el grupo de adultos el más frecuente fue el CCECB bien diferenciado con 15(71.42%) casos y 7(28.58%) de CCECB moderadamente diferenciado en este grupo no se observó ninguno pobremente diferenciado.

Grado de diferenciación		
Grado	Jóvenes	Adultos
Bien diferenciado	17 casos (85%)	15 casos (71.42%)
Moderadamente diferenciado	1 (5%)	7 (28.58%)
Pobremente diferenciado	2 (10%)	0

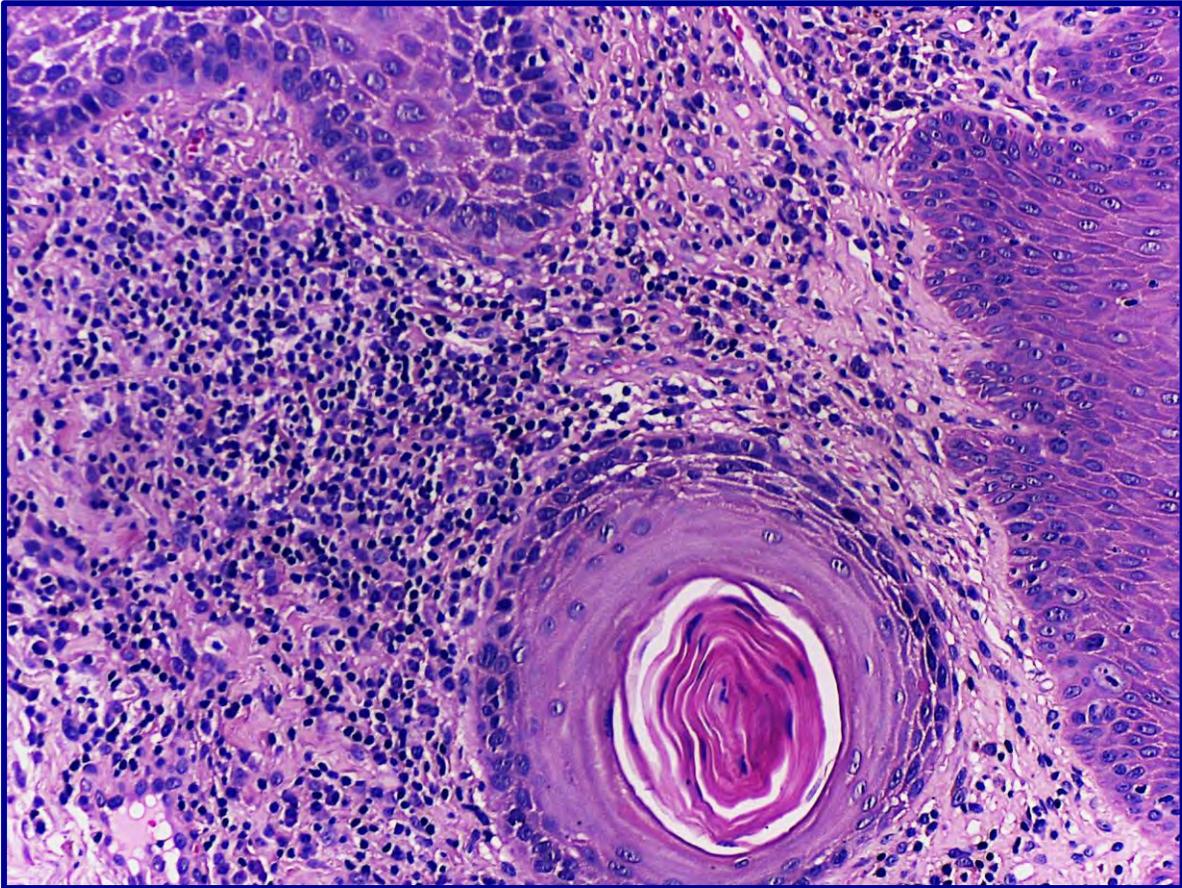
En lo que concierne al frente de invasión tumoral en el grupo de jóvenes de acuerdo a su clasificación en un 85% de los casos (17); presentaron mitosis leves (0-1), el patrón de invasión tumoral fue cercano al vaso, la profundidad tumoral se limitó a la lámina propia, el grado de queratinización fue más del 75%, el pleomorfismo nuclear menos del 25%, el infiltrado inflamatorio intenso y en el grado de diferenciación de las células neoplásicas el 25% se encontraron indiferenciadas; 2 casos (10%) presentaron mitosis severas más de 5, el patrón de invasión tumoral las células neoplásicas infiltraban vasos y nervios, la profundidad tumoral las células invadieron el hueso, el grado de queratinización fue menos del 25%, el pleomorfismo nuclear fue más del 75%, el infiltrado inflamatorio leve y más del 75% de las células indiferenciadas; y solo un caso (5%) presento mitosis moderadas de 2 a 5, el patrón de invasión tumoral las células rodeaban los vasos y paquetes nerviosos, la profundidad tumoral involucro músculo y glándula , el grado de queratinización fue hasta de un 50%, el pleomorfismo nuclear se presentó del 50 al 75%, el infiltrado inflamatorio fue moderado y el grado de indiferenciación de las células fue del 50%. Todos estos criterios fueron evaluados en 2 campos al azar por cada patólogo.

FIT frente de invasión tumoral en pacientes jóvenes			
Mitosis	Leve 0-1	Moderadas de 2-5	Severas más de 5
Patrón de Invasión	Cercanos al vaso	Rodean vasos y nervios	Infiltran vasos y nervios
Profundidad tumoral	Lamina propia	Músculo y glándula	Invaden hueso
Grado de queratinización	Más del 75%	Hasta un 50%	Menos del 25%
Pleomorfismo nuclear	Menos del 25%	Del 50 al 70%	Más del 75%
Infiltrado Inflamatorio	Intenso	Moderado	Leve
Número de casos	17	1	2
Porcentaje	85%	5%	10%

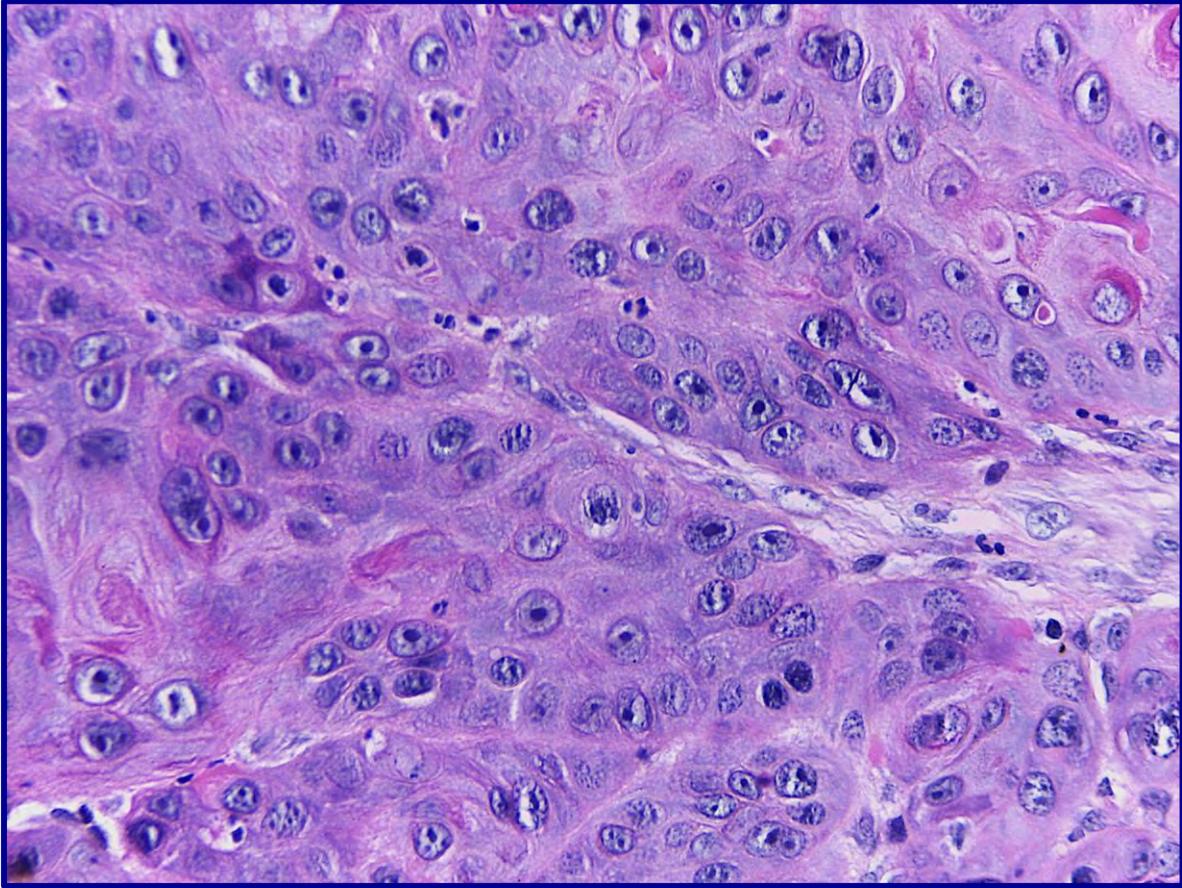
En el segundo grupo de adultos, 15 casos (71.4%) presentaron mitosis leves (0-1), el patrón de invasión tumoral fue cercano al vaso, la profundidad tumoral se limitó a la lámina propia, el grado de queratinización fue más del 75%, el pleomorfismo nuclear menos del 25%, el infiltrado inflamatorio intenso y el 25% de células indiferenciadas; 6 casos (28.57%) presentaron mitosis moderadas de 2 a 5, el patrón de invasión tumoral las células rodeaban los vasos y paquetes nerviosos, la profundidad tumoral involucro músculo y glándula, el grado de queratinización fue hasta de un 50%, el pleomorfismo nuclear se presentó del 50 al 75%, el infiltrado inflamatorio fue moderado y el 50% de células indiferenciadas, no se observó en este grupo ningún caso de CCECB pobremente diferenciado.

FIT frente de invasión tumoral en pacientes adultos			
Mitosis	Leve 0-1	Moderadas de 2-5	Severas más de 5
Patrón de Invasión	Cercanos al vaso	Rodean vasos y nervios	Infiltran vasos y nervios
Profundidad tumoral	Lamina propia	Músculo y glándula	Invaden hueso
Grado de queratinización	Más del 75%	Hasta un 50%	Menos del 25%
Pleomorfismo nuclear	Menos del 25%	Del 50 al 70%	Más del 75%
Infiltrado Inflamatorio	Intenso	Moderado	Leve
Número de casos	15	6	0
Porcentaje	71.4%	28.57%	0%

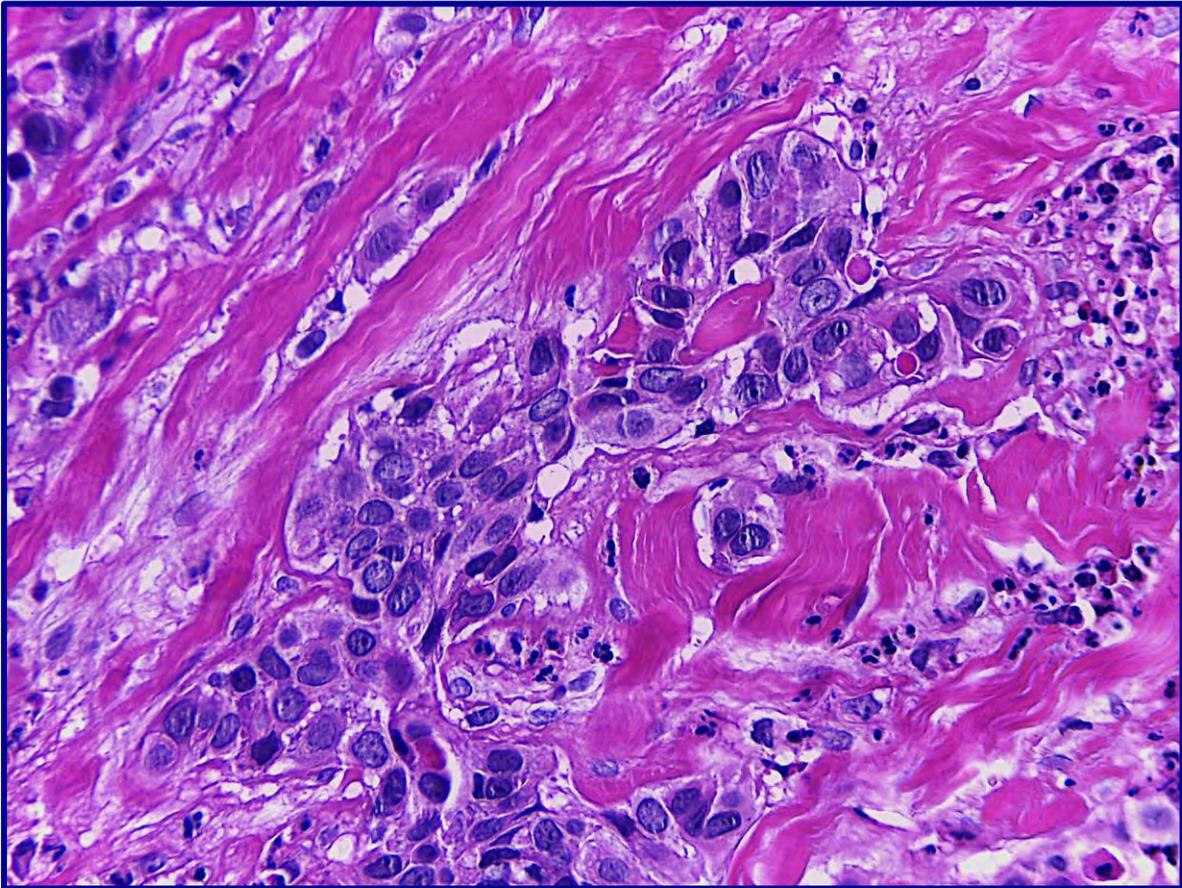
Fotomicrografías



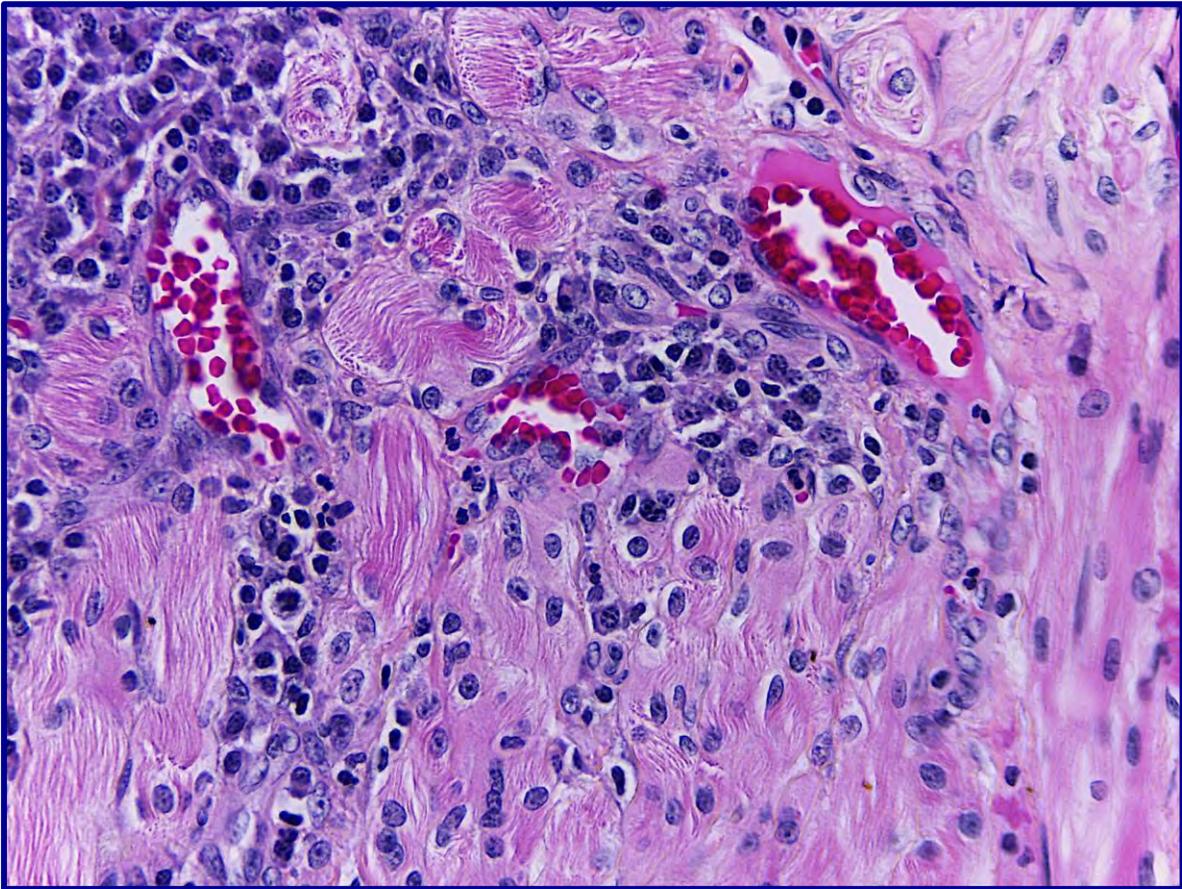
En esta fotomicrografía a 4x, se observa un epitelio escamoso estratificado con pérdida de los estratos epiteliales, pleomorfismo celular y nuclear, mitosis aberrantes, pérdida de la relación núcleo citoplasma, nucléolos evidentes, pérdida de la continuidad de la membrana basal, perlas de queratina dispuestas en el tejido conjuntivo, así mismo infiltrado inflamatorio abundante dispuesto de manera irregular de manera subepitelial.



En esta fotomicrografía a 40x se observan células con marcado pleomorfismo celular y nuclear, núcleos hipercromáticos, nucléolos evidentes, pérdida de la relación núcleo-citoplasma, mitosis, queratinizaciones individuales, áreas de hialinización, escaso tejido conjuntivo subepitelial.



En esta fotomicrografía a 40x se observan cúmulos de células pleomórficas de origen epitelial involucrando tejido muscular dispuestas de manera irregular entre los haces de fibras musculares, con características de pleomorfismo celular y nuclear, pérdida de la relación núcleo citoplasma, núcleos hipercromáticos, nucléolos evidentes, infiltrado inflamatorio escaso dispuesto entre los haces y las células.



En esta fotomicrografía a 40x se observan células de origen epitelial, pleomórficas infiltrando tejido conjuntivo, músculo y permeando vasos sanguíneos, las células se distribuyen de manera irregular rodeando las estructuras mencionadas, con un infiltrado inflamatorio escaso, pericitos alargados y engrosados así como eritrocitos en la luz del vaso.

Resultados de Inmunohistoquímica

De los 41 casos de CCECB, se realizó la técnica de inmunohistoquímica en solo 35 casos en general, 20(57.17%) casos de cáncer en pacientes adultos y 15(42.85%) casos de pacientes jóvenes; los cuales fueron evaluados por 2 patólogos de manera independiente, se tomaron fotografías de 2 campos a x400 aumentos de cada uno de los casos, con una cámara Leica profesional y las células positivas a la inmunoreacción fueron contabilizadas utilizando el método de Kokko et al, basado en la intensidad de la inmunoreacción se clasificó de la siguiente manera: negativo (-, 0) 0%, positivo (+,1) y positivo con intensidad fuerte (++, 2).

Del grupo de pacientes adultos 8 presentaron inmunoreacción positiva (+,1) y 12 positivos con intensidad fuerte (++, 2), y del grupo de pacientes jóvenes 10 presentaron inmunoreacción positiva (+,1) y 5 positivos con intensidad fuerte (++,2) en ninguno de los grupos se presentaron casos negativos.

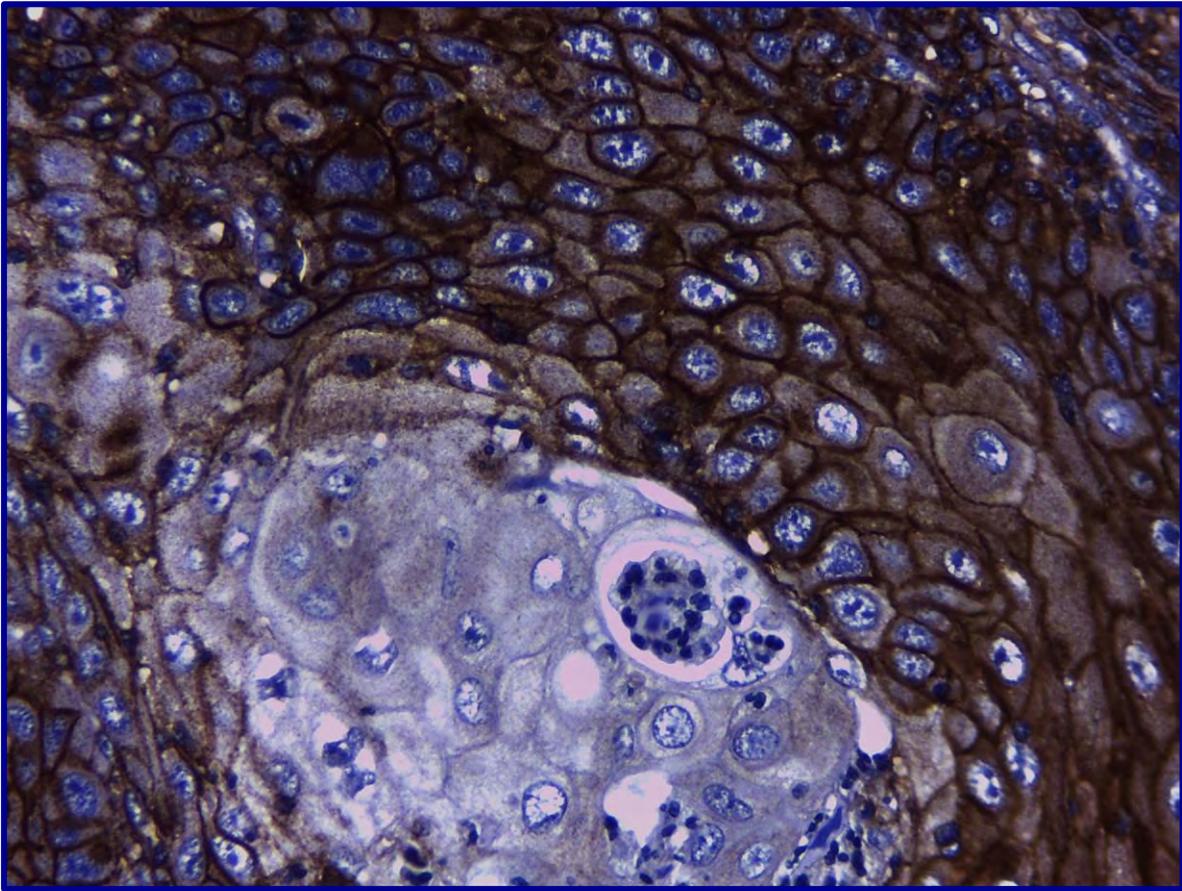
Inmunoreacción general		
Grupos	Adultos	Jóvenes
(0)	0	0
(+, 1)	8 (22.8%)	12(34.2%)
(++, 2)	5 (14.2%)	10 (28.5%)

En lo que respecta al grado de diferenciación en relación con la inmunoreacción , en el grupo de adultos 16 carcinomas bien diferenciados y clasificados como positivos con intensidad fuerte (++, 2) , y 4 CCECB moderadamente diferenciados, clasificados como positivos (+,1). En el grupo de jóvenes 10 carcinomas bien diferenciados clasificados como positivos con intensidad fuerte, 3 moderadamente diferenciados y 2 pobremente diferenciados ambos clasificados como positivos (+; 1).

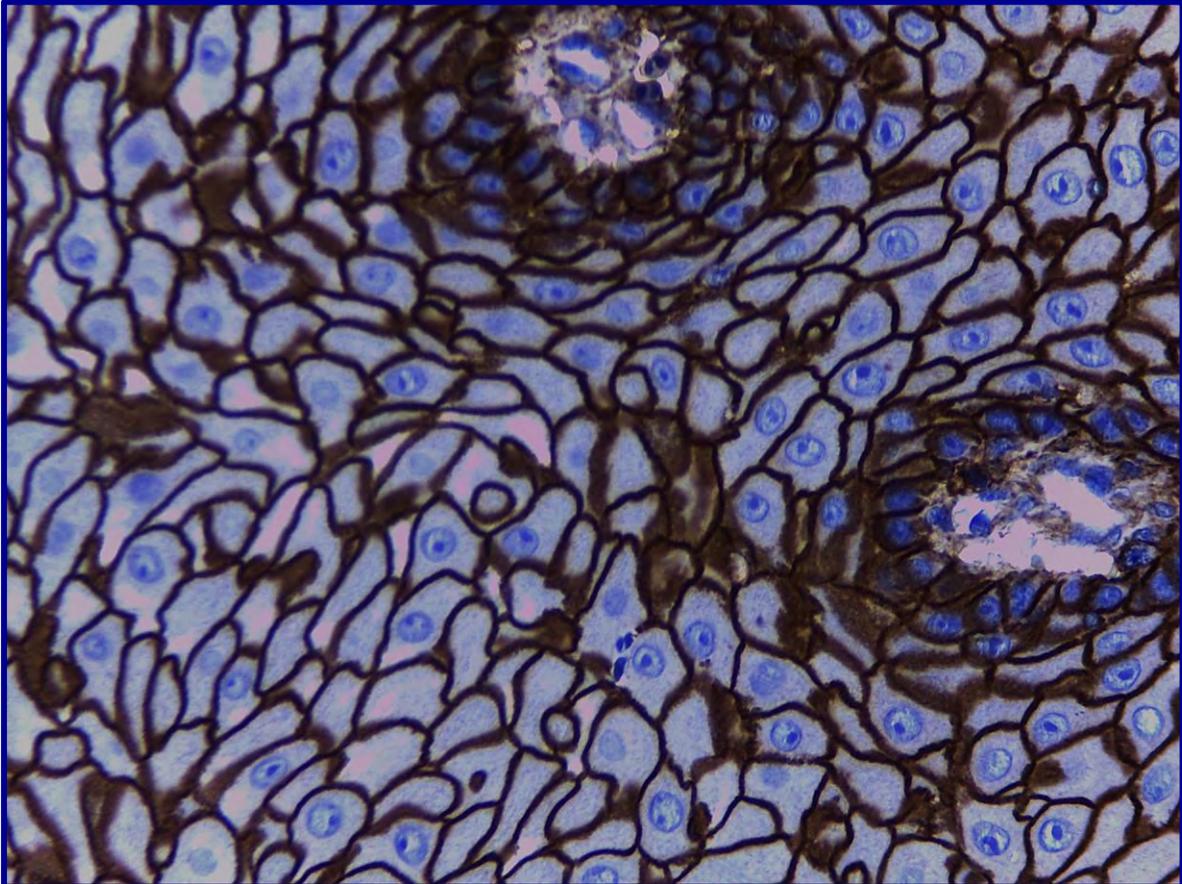
Grupo	Adultos	Jóvenes
	Casos / Reacc	Casos /Reacc.
Bien Dif.	16 (++, 2)	10 (++, 2)
Moderada Dif.	4 (+,1)	3 (+, 1)
Pobrementemente	0	2 (+, 1)

En el tejido tumoral el patrón de reactividad presento diferentes variaciones dependiendo del grado de diferenciación, se observó una expresión severa de CD44 en los carcinomas de células escamosas de cavidad bucal bien diferenciados, la reacción es evidente en la periferia de las islas de células neoplásicas con o sin queratinizaciones individuales, así mismo el patrón de reactividad se confino a la membrana plasmática, las superficies y bordes celulares.

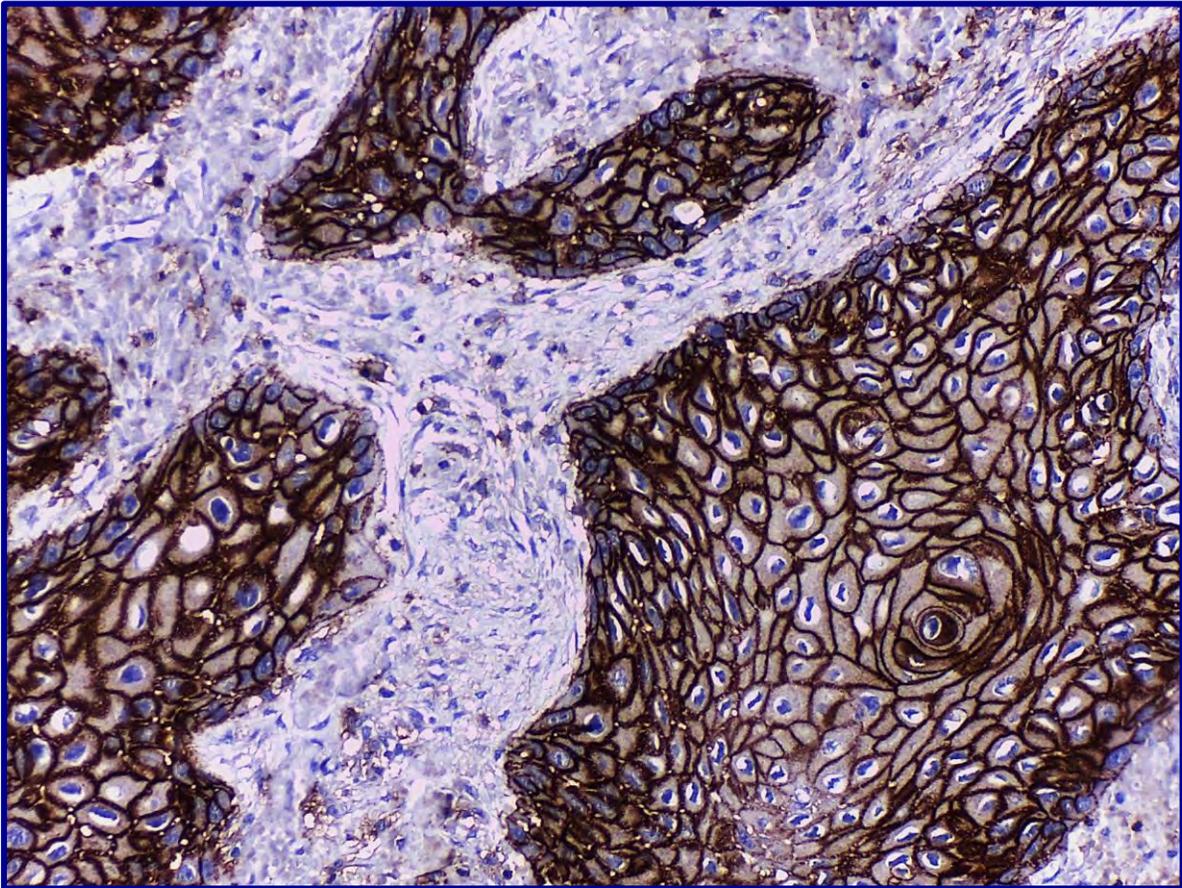
Así mismo la intensidad de la reacción se vio disminuida en los carcinomas moderadamente así como pobremente diferenciados, en donde la reacción se limitó únicamente a algunas proliferaciones celulares en donde el patrón fue discontinuo en la membrana plasmática, inclusive en el citoplasma así mismo la inmunoreacción estuvo presente de manera severa en la membrana plasmática de linfocitos y células plasmáticas que infiltraban el estroma tumoral en todos los casos.



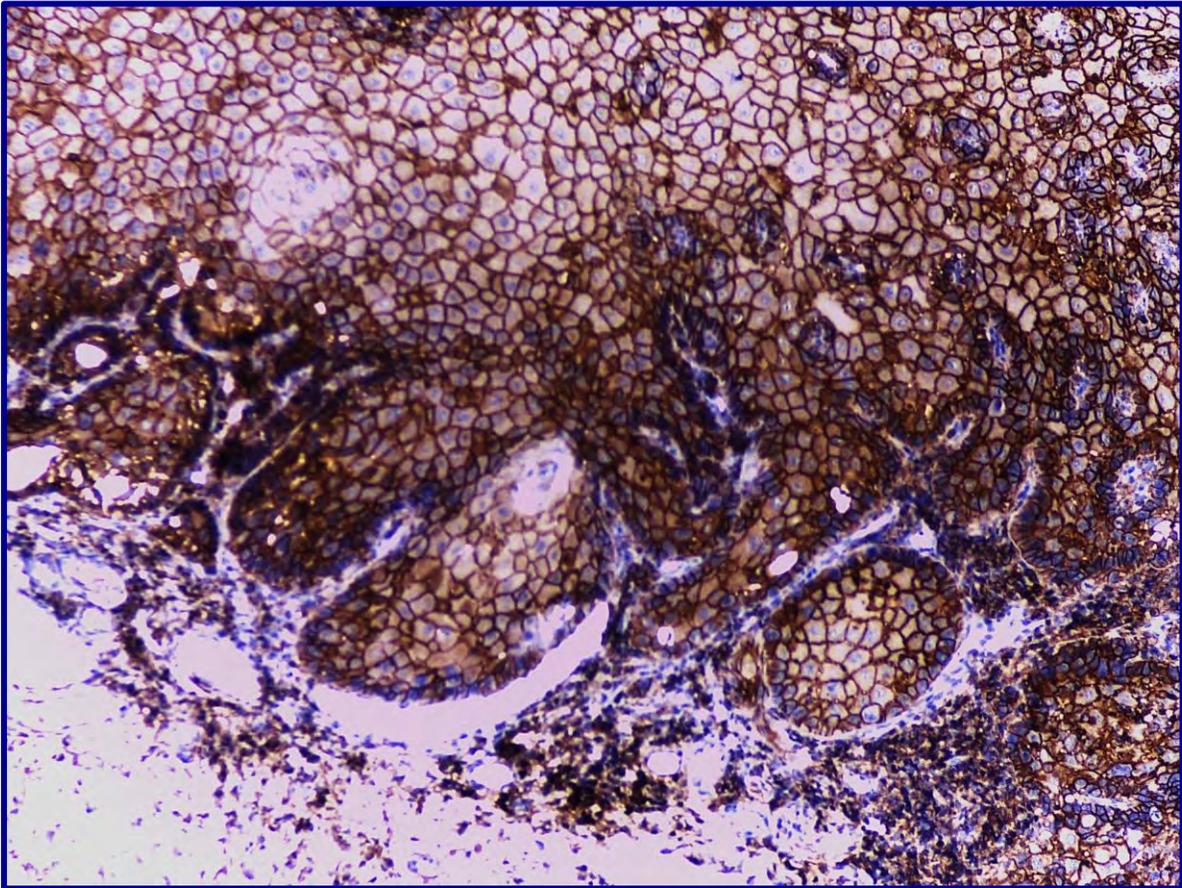
En esta fotomicrografía a 40x observamos células epiteliales pleomórficas, con núcleos hipercromáticos, nucléolos evidentes, conformando nidos, se distribuyen de manera irregular mitosis evidentes, inmunopositivas a CD44 en su mayoría en este campo, queratinizaciones individuales involucrando el estrato basal v parabasal.



En esta fotomicrografía a 40x observamos inmunomarcaje positivo para el anticuerpo CD44, en la mayoría de las células epiteliales, pertenecientes al epitelio parabasal y basal, marcando la superficie de la membrana, núcleos evidentes, pleomorfismo nuclear y celular.



En esta fotomicrografía a 10x se observan islas epiteliales neoplásicas dispuestas en tejido conjuntivo, positivas para CD44, queratinizaciones individuales y elementos de tejido conjuntivo aislados positivos también al anticuerpo.



En esta fotomicrografía a 4x observamos un epitelio escamoso estratificado con pérdida de la estratificación epitelial, células pleomórficas, pérdida de la membrana basal, islas epiteliales dispuestas en el tejido conjuntivo, como podemos observar el inmunomarcaje es intenso tanto en la región basal como parabasal, hacia los estratos superficiales es más tenue.

Análisis estadístico

Se realizó χ^2 para tratar de establecer asociación entre nuestras variables, obteniendo los resultados mostrados en la siguiente tabla:

		Jóvenes	Adultos Mayores	χ^2
Genero	Femenino	5 (25%)	12 (57.1%)	NS
	Masculino	15 (75%)	9 (42.9%)	0.03
Localización	Labios	3 (15%)	1 (4.8%)	NS
	Mucosa bucal	2 (10%)	2 (9.5%)	NS
	Paladar	2 (10%)	2 (9.5%)	NS
	Lengua	2 (10%)	9 (42.9%)	0.01
	Piso de boca	1 (5%)	1 (4.8%)	NS
	Encía	10 (50%)	6 (28.6%)	NS
Graditaje	Bien	17 (85%)	15 (71.4%)	NS
	Moderadamente	1 (5%)	6 (28.6%)	0.05
	Indiferenciado	2 (10%)	cero	NS
Inmunorreacción Anti- CD44	Débil	6 (40%)	2 (10%)	0.03
	Moderado	4 (26.6%)	5 (25%)	NS
	Fuerte	5 (33.3%)	13 (65%)	NS

En lo que respecta a estos resultados se observa una asociación estadísticamente significativa con una $P=0.03$ (IC 95%) entre el género masculino y los pacientes adultos mayores esto se puede deber en primer lugar porque existe una mayor cantidad de varones en el grupo de jóvenes en contraste con el de adultos mayores, pero si bien es cierto la cultura de prevención y asistencia a recibir servicios de salud ha venido cambiando; hasta hace algunas décadas las mujeres eran las principales usuarias sin embargo en la actualidad cada vez más varones acuden de manera preventiva a valoraciones generales inclusive sin presentar

algún estado morbosos a diferencia de otras generaciones anteriores de varones que asistían prácticamente en estados avanzados de cualquier patología, que comprometía de manera importante tanto su diagnóstico, tratamiento y pronóstico.

Así mismo se encontró una asociación significativa en la localización del carcinoma de células escamosas y el grupo de jóvenes con una $P=0.01$ (IC 95%), si bien se tienen reportes a nivel mundial donde se estima que el sitio anatómico de mayor predilección tanto en jóvenes como en adultos mayores es el borde lateral de la lengua, en este grupo de jóvenes de nuestra población se presentaron únicamente 2 (10%) casos lo que difiere de manera importante con el grupo de adultos mayores y de lo esperado en este sentido podemos atribuir que el cambio de algunos hábitos como masticar tabaco, o frotar algunos derivados como marihuana, nuez de betel etc. en la encía puede ser un factor predisponente para el desarrollo de la neoplasia en este sitio específico.

En lo que corresponde a la evaluación y valoración histopatológica se encontró una relación estadísticamente significativa entre el grado de diferenciación celular con una $P=0.05$ (IC 95%) con los casos diagnosticados como moderadamente diferenciados así mismo con el grado de inmunoreacción y el grupo de adultos mayores con una $P=0.03$ (IC 95%) ya que la mayoría de casos de este grupo presento una inmunoreacción fuerte a diferencia del grupo joven donde los casos de distribuyeron en los 3 grados de inmunoreacción, los resultados anteriores muestran cierta contradicción con lo reportado en la literatura que menciona que el cáncer de células escamosas es una entidad independiente en cada grupo etario e inclusive pone en duda la teoría de que en el grupo de jóvenes se presenta con un comportamiento biológico más agresivo por lo que la mayoría de casos de este grupo debió clasificarse como indiferenciados sin embargo la mayoría de los mismos se clasificaron como bien diferenciados y así mismo se esperaba una inmunoreacción de células troncales fuerte en el grupo joven la cual se presentó en el grupo contrario.

Discusión.

El CCECB es la neoplasia maligna de origen epitelial que se presenta con mayor frecuencia en la cavidad bucal. Según cifras del Registro Histopatológico de Neoplasias en México (RHNM), presenta una frecuencia del 37% de todas las neoplasias malignas de las vías aéreas superiores. (12).

En México el cáncer bucal se presenta con una incidencia aproximada de 0.6 a 0.8 por cada 100,000 habitantes, con una edad promedio de presentación entre los 50 y 70 años, afectando a hombres en un 67% y a mujeres con un 33%, ocasionando aproximadamente 623 muertes al año.(129).

Sin embargo es importante mencionar que recientemente se ha reportado un incremento en la incidencia de pacientes con CCECB en pacientes menores de 40 años a los que se les considera pacientes jóvenes y más aún señalar que existen reportes que evidencian un aumento en la población de mujeres sin factores de riesgo habituales como el tabaco y el alcohol (4).

En nuestro estudio, la edad promedio dentro del grupo de pacientes jóvenes fue de 29.05% con una desviación estándar de (+/- 6.93), el paciente más joven tenía 19 años y el mayor 40 en este grupo específico y el segundo grupo que pertenece a los adultos mayores la edad promedio fue de 72.76% con una desviación estándar de (+/- 11.51) edades que concuerdan con otros reportes como el de Udeabor et al.(130), donde en un estudio retrospectivo a 20 años en la Escuela de Medicina de Hannover en Alemania seleccionó un total de 977 de pacientes con CCECB de estos el 3.9% se encontraba en una edad por debajo de los 40 años donde el paciente más joven de este grupo fue una mujer de 19 años, seguido por un varón de 24 años, y la edad en general de los pacientes por arriba de los 40 años fue de 57.6; edades que concuerdan con nuestro reporte tanto en el grupo de pacientes jóvenes como adultos.

En un estudio retrospectivo de 3 años Samreen Naz et al,(131) seleccionaron 87 pacientes del Hospital Memorial Khanam Shouket en Pakistán donde 19 casos pertenecían al grupo joven menores de 40 años y 68 casos al grupo de adultos donde la media de edad en general fue de 51 años y en el grupo de jóvenes la media fue de 34 años y de 56 años en el grupo de adultos, si comparamos las medias de edad en nuestro estudio los pacientes jóvenes presentan una edad menor en comparación con este estudio. En otro estudio realizado por Farnaz Falaki et al.(132) en la Escuela de Medicina Dental de Mashhad en Iran, la media de edad del grupo joven fue de 30.19 con una DS 4.42, media de edad que se encuentra más cercana a la reportada en nuestro estudio.

El CCECB se ha considerado por décadas una enfermedad más incidente y prevalente en varones, sin embargo en la literatura mundial se reportan una prevalencia en aumento de mujeres afectadas por la enfermedad, en un estudio de cohorte de 32,776 casos de CCECB realizado por Sagar C. Patel et al.(133) se evaluó la incidencia de CCECB y de cáncer en lengua en mujeres blancas en edades entre 18 y 44 años en la Universidad del norte de Carolina en USA, la media de edad en el momento del diagnóstico fue 65 años, la proporción hombre mujer fue de 2.2:1 y de individuos de raza blanca y negros de 8.5:1 respectivamente, la edad de adultos jóvenes oscilo entre los 18 y 44 años de edad, y la proporción hombre mujer fue de 3.1:1, sin embargo la incidencia de casos en mujeres blancas fue estadísticamente significativa en un periodo de evaluación del año 1975 al 2007 donde se observó con un porcentaje de cambio

de 22, un porcentaje anual de 1.5 y una $P < .05$ en comparación con los hombres blancos donde se presenta un decremento en la incidencia con un PC de -62, APC -2.9 y $P < .05$.

Estos datos y otros reportes indican que las proporciones hombre-mujer llegaron a ser muy similares e inclusive las mujeres presentan prevalencias mayores en algunas áreas geográficas en específico, autores como Jankittivong et al (95) encuentran una proporción hombre mujer 1:1, de igual manera Ortholan et al (134) en una cohorte de 260 pacientes de 80 o más años. Otros autores como Andisheh-Tadbir et al (135) reportan una proporción hombre mujer 3:2. Por lo tanto estos datos nos demuestran que a pesar de que se ha presentado un aumento significativo de casos de CCECB en mujeres, el varón sigue siendo más afectado, sin embargo se cree que en algunas décadas la proporción pueda ser similar en número crudos y existen algunos autores que mencionan que las mujeres presentarán una proporción mayor que los varones.

En lo que corresponde a la etiología del CCECB sabemos que es multifactorial, involucrando factores habituales como el tabaco y el alcohol, así como infecciones virales como VPH, VEB, entre otros una dieta pobre en frutas, vegetales, antioxidantes, los cambios genéticos y epigenéticos así como la teoría de las células troncales cancerosas CTC. En la mayoría de los reportes a nivel mundial independientemente del grupo afectado sean pacientes jóvenes o adultos el tabaco sigue ocupando el primer lugar en combinación con el metabolito del etanol. Nemes et al (137), reporta que el 65.5% los pacientes refirieron el hábito tabáquico al momento del realizar el diagnóstico, por otro lado Ortholan et al (134) demostraron que el tabaco y el alcohol fueron los principales factores de riesgo en el 66% de los hombres y en el 16% de las mujeres. Otros autores como Poveda et al, evaluaron una cohorte de 123 pacientes con CCECB donde evidenciaron que el 50% de los pacientes eran fumadores y de estos más del 67% consumían más de una cajetilla de cigarros al día.

En lo que respecta al virus de papiloma humano en México existen reportes que evidencian la presencia o seropositividad en pacientes con CCECB, a pesar de que en nuestro estudio no se realizó la genotipificación de VPH en los casos, de pacientes jóvenes y adultos mayores, se tiene el antecedente por un estudio previo de nuestro grupo de investigación en la clínica de patología y medicina bucal de Posgrado de la DEPEI FO UNAM, que la frecuencia de positividad del VPH en una población abierta de más de 132 pacientes fue de 35%, los reportes que se han realizado en México de CCECB con infección por VPH corresponden a Ibieta en el años 2003 quien reporta una frecuencia del 42% de VPH tipo 16 determinado por técnica de PCR y por otro lado Anaya et al reporta en el año 2008

una frecuencia del 43% de los tipos virales 16, 18 y 33 determinados por técnica de PCR.

La localización anatómica más frecuente en nuestro estudio en el grupo de pacientes jóvenes fue el reborde alveolar con un 25%(5 casos), seguido por el cuerpo mandibular 15%(3), maxilar región anterior 10%(2), borde lateral de la lengua 10% (2), mucosa yugal 10% (2), paladar 10% (2), piso de boca 5% (1), región auricular superior 5%(1).

En el grupo de adultos mayores el sitio de localización más frecuente fue el borde lateral de la lengua con 47.6% (10), reborde alveolar 14.2% (3), mucosa yugal 9.5% (2), paladar 9.5% (2), piso de boca 4.7% (1), región nasogeniana 4.7% (1).

En el estudio realizado por Udeabor et al,(130) el sitio de localización del CCECB más común fue el piso de boca en la población general incluyendo el grupo de adultos y jóvenes se presentó en un 42.2% y en el grupo de adultos jóvenes en un 39.5%, solo un 1.3% se presentó en la oro faringe en el grupo de adultos y en el grupo de jóvenes no se presentó ninguno asociado a oro faringe.

En otro reporte realizado por Farnaz Falaki et al.(132) En una cohorte de 21 pacientes jóvenes con CCECB el sitio más frecuente fue la lengua con un 66%, a diferencia de lo encontrado en nuestro estudio no coincidimos con el sitio de mayor frecuencia ya que en nuestra población de jóvenes fue la mucosa del reborde alveolar con un 25% de los casos.

Así mismo Yi Fan et al,(90). reportaron que el sitio de mayor predilección en su estudio, en una muestra de 100 pacientes menores de 45 años en el Hospital Universitario en el Departamento de Estomatología de Beijing China, fue la lengua móvil con un 63%, seguido de la mucosa de la encía insertada con un 14%, el piso de boca con un 11% y la mucosa bucal con un 7.0%, datos que concuerdan con el reporte de Farnaz Falaki (132) en cuanto al primer sitio de predilección que fue la lengua, pero nuestro reporte no difiere de lo encontrado con Yi fan que en segundo lugar presenta la mucosa del reborde alveolar o encía insertada con un 14 % y en nuestro reporte con un 25%.

Hablando de la población en general, lo reportado en la literatura mundial en cuanto al sitio de localización más frecuente como ya lo hemos mencionado es la lengua, seguido por el piso de boca, estos datos pueden variar dependiendo del área geográfica y de las costumbres de cada país autores como Dalhstrom et al (137), Rivera et al; Oliveira et al coinciden con sus reportes de que el sitio anatómico más afectado en América es la lengua, en otros países como Irán Andesheh-Tabdid encontraron un 53% de frecuencia de afectación de la lengua en

su estudio así como Favia et al y Brandizzi et al , reportan en sus estudios una alta prevalencia de aparición del CCECB en lengua.

Jainkittivong et al (95) reporta en un estudio realizado en Tailandia una frecuencia alta en la afectación de la encía insertada con un 50% en comparación con otros estudios, sin embargo coincide con nuestros resultados en donde el sitio más afectado es el reborde alveolar con un 25%.

Respecto al graditaje histológico en nuestro estudio en el grupo de pacientes jóvenes el más frecuente fue el CCECB bien diferenciado con un 85%, seguido por el pobremente diferenciado con un 10% y seguido por el moderadamente diferenciado con un 5%, en comparación con nuestro grupo de adultos el bien diferenciado se presentó de igual forma con un 71.42% de carcinomas bien diferenciados y 28.58% de carcinomas moderadamente diferenciados en este grupo no se presentó ningún carcinoma de células escamosas pobremente diferenciado.

A pesar de que en algunos reportes en pacientes jóvenes sugieren que la neoplasia se presenta con un comportamiento biológico más agresivo a nivel mundial el tipo histológico más frecuente es el bien diferenciado en este grupo y en el de adultos mayores, así esto concuerda con el reporte del estudio de Yi Fan et al.(90) Donde en su estudio de CCECB en paciente jóvenes 51 casos fueron diagnosticados como carcinomas bien diferenciados y 46 moderadamente diferenciados, no se presentó ningún caso de pobremente diferenciado, en comparación con nuestro estudio coincidimos en el más frecuente sin embargo nosotros si reportamos 1 caso de carcinoma de células escamosas pobremente diferenciado.

En el estudio realizado por Udeabor (130) reporta que el 63.2% de sus CCECB en jóvenes fueron diagnosticados con carcinoma de células escamosas de la cavidad bucal moderadamente diferenciado, 18.4% bien diferenciado y 13.2% pobremente diferenciado, datos que contrastan los estudios anteriores y nuestro reporte en cuanto a la gradificación más frecuente obteniendo ellos el graditaje de moderadamente diferenciado en primer lugar.

Otros autores como Jainkittivong et al, encontró un 78.6% de carcinoma bien diferenciado (95), Al-Rawi et al reporta un 70.7% (85) y los que presentan una frecuencia menor son los reportes realizados por Ortholan (134) et al con un 84% seguido por Andisheh-Tadbir est al. Encontraron un 55.3% de pacientes con carcinomas bien diferenciados.

De acuerdo al Frente de invasión tumoral FIT, Cuevas-González et al. considera que los criterios para determinar el grado de displasias, la clasificación de Broders

y el frente de invasión tumoral son parámetros que deben estandarizarse para una valoración histológica con menor grado de variabilidad entre patólogos, razón por la cual evaluamos el frente de invasión tumoral en nuestro estudio, en el grupo de jóvenes de acuerdo a su clasificación en un 85% de los casos (17); presentaron mitosis leves (0-1).el segundo grupo de adultos, 15 casos (71.4%) presentaron mitosis leves (0-1).

En tanto a la inmunoreacción para el anticuerpo CD44 en el presente trabajo, del grupo de pacientes adultos 8 presentaron inmunoreacción positiva (+,1) y 12 positivos con intensidad fuerte (++, 2), y del grupo de pacientes jóvenes 10 presentaron inmunorreacción positiva (+,1) y 5 positivos con intensidad fuerte (++,2) en ninguno de los grupos se presentaron casos negativos.

En lo que respecta al grado de diferenciación en relación con la inmunorreacción , en nuestro estudio el grupo de adultos 16 carcinomas bien diferenciados y clasificados como positivos con intensidad fuerte (++, 2) , y 4 carcinomas moderadamente diferenciados, clasificados como positivos (+,1). En el grupo de jóvenes 10 carcinomas bien diferenciados clasificados como positivos con intensidad fuerte, 3 moderadamente diferenciados y 2 pobremente diferenciados ambos clasificados como positivos (+; 1).

Zenko Noto et al.(138) reporta en su análisis de inmunohistoquímica para el anticuerpo CD44, que las áreas pobremente diferenciadas obtuvieron un inmunomarcaje mayor, que los campos que mostraban áreas de carcinoma bien diferenciado y en los carcinomas bien diferenciados y moderadamente diferenciados las regiones del epitelio más representadas e inmunomarcadas fueron las asociadas a la membrana basa y parabasal. Cong-Fa Huang et al.(139) Quien utiliza el método de Kokko ET para cuantificar y evaluar la inmunorreacción positiva en CCECB CD44 fue positivo y mayormente detectado en la membrana basal de los casos revisados 23 de ellos correspondientes al 34.8% fueron negativos, 17 casos 25.8% fueron positivos y 26 casos 39.4% positivos con intensidad fuerte. Al igual que lo reportado en la literatura tanto por Zenko como por Cong-Fa Huang et al. En nuestro estudio el tejido tumoral en el patrón de reactividad presento diferentes variaciones dependiendo del grado de diferenciación, se observó una expresión severa de CD44 en los carcinomas de células escamosas de cavidad bucal bien diferenciados, la reacción es evidente en la periferia de las islas de células neoplásicas con o sin queratinizaciones individuales, así mismo el patrón de reactividad se confino a la membrana plasmática, las superficies y bordes celulares.

Así mismo la intensidad de la reacción se vio disminuida en los carcinomas moderadamente diferenciados y pobremente diferenciados, en donde la reacción

se limitó únicamente a algunas proliferaciones celulares en donde el patrón fue discontinuo en la membrana plasmática, inclusive en el citoplasma así mismo la inmunorreacción estuvo presente de manera severa en la membrana plasmática de linfocitos y células plasmáticas que infiltraban el estroma tumoral en todos los casos.

Conclusiones.

Podemos concluir que el presente estudio nos muestra un panorama general entre las principales diferencias y similitudes en dos grupos de edad, el primero correspondiente a pacientes jóvenes y el segundo a adultos mayores, en lo que respecta a la edad en los pacientes jóvenes se está presentando en el límite entre la segunda y tercera década de la vida, mientras que en los adultos mayores la edad de presentación es entre la séptima y octava década de la vida.

Concordamos con los reportes de la literatura a nivel mundial en cuanto al sitio de presentación más frecuente sigue siendo la lengua, seguido del piso de boca, sin embargo en el grupo de pacientes jóvenes el sitio anatómico más frecuente en nuestro estudio fue la mucosa del reborde alveolar; sin embargo los sitios anatómicos son muy parecidos tanto en los estudios realizados en América como en otros continentes con sus variantes pero consistentes.

A pesar de que se ha tratado de caracterizar como dos entidades patológicas diferentes a los carcinomas de células escamosas que se presentan en pacientes jóvenes y los que se presentan en pacientes adultos, las características clínicas de presentación siguen siendo similares en ambos grupos, con una mayor proporción por las lesiones de crecimiento exofítico, bordes indurados, adheridos a planos profundos, asintomáticos.

En cuanto a la Gradificación del tumor en ambos grupos prevalece el carcinoma de células escamosas bien diferenciado, aunque algunos reportes mencionan que el CCECB que se presenta en jóvenes tiene características de comportamiento biológico más agresivo en comparación con los que se presentan en adultos mayores, esto no se ha reflejado en la mayoría de los reportes ya que la presentación más frecuente a nivel mundial independientemente del grupo de edad en donde se presenta el CCECB sigue siendo el carcinoma de células escamosas bien diferenciado, seguido por el moderadamente diferenciado y en última instancia el pobremente diferenciado.

El frente de invasión tumoral, en conjunto con la clasificación de la OMS, la clasificación de Broders siguen siendo herramientas útiles en el entendido, de unificar criterios diagnósticos y disminuir la variabilidad entre patólogos o

investigadores, lo que se traduce en un adecuado diagnóstico y uso de los datos derivados del mismo.

La utilización del anticuerpo CD44 es de utilidad para identificar células positivas, demarcar el frente de invasión tumoral, así como la parte central de donde se derivan las células tumorales, el inmunomarcaje de las islas epiteliales, así como de la membrana basal y el estrato parabasal, permite una ubicación específica de esta células. Sin embargo debido a que el anticuerpo se une a diferentes células y tejidos como el colágeno, el ácido hialurónico, los linfocitos, eritrocitos, es poco específico para identificar las células troncales cancerosas, razón por la cual creemos importante agregar a este otros anticuerpos como son Oct4, Sox2, Nanog que son factores de transcripción que regulan la autorrenovación y que pudieran ser más específicos en la identificación de estas células CTC.

Debilidades en este protocolo de Investigación

1.- En primer lugar el tamaño de la muestra es pequeña, en el entendido de que se revisaron más de 20 años de archivos clínicos como de muestras con material biológico embebidas en parafina de todas las muestras localizadas con diagnóstico de carcinoma de células escamosas de la cavidad bucal una proporción importante se excluyó debido a que las condiciones de la muestra no eran las adecuadas, el material biológico era escaso o nulo, no se encontró el bloque de parafina etc. Razón por la cual sugerimos como indicador a las autoridades de la División de Posgrado de Odontología y del laboratorio de Patología Clínica y Experimental de la FO UNAM el establecer estrategias para un mejor manejo, cuidado y preservación de este archivo de muestras con fines de próximos proyectos de Investigación , que permitan aprovechar al máximo las muestras y tener un numero de muestra aceptable, sólido y robusto que se traduzca en un protocolo de investigación con respaldo científico.

2.- Dentro de los resultados obtuvimos inmunomarcaje positivo para el anticuerpo CD44 tanto en pacientes jóvenes como en adultos, siempre obteniendo la máxima inmunoexpresión en la membrana basal y parabasal lo que nos indica que están presentes algunos nichos de células troncales cancerosas en estos sitios, sin embargo al ser un anticuerpo que se une a diferentes células y tejidos es poco específico por lo que se recomienda hacer otro panel con Oct4 y Sox2.

3.- A pesar de que en este grupo estudiado fue positiva la inmunohistoquímica en pacientes jóvenes de los cuales algunos no tenían antecedentes de tabaquismo y alcoholismo y la neoplasia se presentó de Novo son pocos los casos y esto no quiere decir que sea igual en todos los individuos, así mismo el afirmar que el uso prolongado del tabaco y el alcohol siguen siendo los principales factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de células escamosas de la cavidad bucal y de las vías aéreas superiores.

4.- La limitación del presupuesto económico para poder realizar 3 o 4 anticuerpos más que nos fortalecieran tanto la sensibilidad como la especificidad.

5.- No podemos extrapolar nuestros resultados a toda la población de la Ciudad de México o de nuestro país puesto que fue una condición que se presentó en este grupo en específico estudiado, sin embargo nos permite dar una estimación de cómo se presenta el fenómeno de estas células troncales en el desarrollo de neoplasias.

Bibliografía

- 1.- Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC; 2005.
- 2.- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005;55:74-108
- 3.- Braakhuis BJ, Visser O, Leemans CR. Oral and oropharyngeal cancer in The Netherlands between 1989 and 2006: Increasing incidence, but not in young adults. *Oral Oncol.* 2009;45:e85-9.
- 4.- Curado MP, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol.* 2009;21:194-200.
- 5.- García-Pola Vallejo MJ. Cáncer oral. Magnitud del problema en España. *RCOE.* 2009;14: 167-70
- 6.- Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people – a comprehensive literature review. *Oral Oncol.* 2001;37:401-18.
- 7.- Annertz K, Anderson H, Biorklund A, Moller T, Kantola S, Mork J, et al. Incidence and survival of squamous cell carcinoma of the tongue in scandinavia, with special reference to young adults. *Int J Cancer.* 2002;101:95-9
- 8.- Toner M, O'Regan E.M. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in the Young: A Spectrum or Distinct Group? Part2. *Head and Neck Pathol* (2009)3:249-251.
- 9.- Sherin N, Simi T, Shameena P, Sudha S. Changing trends in oral cancer. *Indian J Cancer.* 2008;45:93-6.
- 10.- Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RCK. Tongue and tonsil carcinoma – increasing trends in the US population ages 20–44 years. *Cancer.* 2005;103:1843-9.
- 11.- Spitz MR, Fueger JJ et al. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. A case comparison analysis. *Cancer* 1988 Jan 1;61(1)203-8.
- 12.- Tirado-Gómez L, Granados Martín; Epidemiología y Etiología del Cáncer de la Cabeza y el Cuello, *Revista del Instituto Nacional de Cancerología de México* 2 (2007): 9-17.

- 13.- Pelucchi C, Gallus S, Garavello W, Bosetti C, La Vecchia C. Cancer risk associated with alcohol and tobacco use: focus on upper aero-digestive tract and liver. *Alcohol Res Health*. 2006;29:193-8
- 14.- Johnson N. Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J Dent Educ*. 2001;65:328-39.
- 15.- Ali NS, Khuwaja AK, Ali T, Hameed R. Smokeless tobacco use among adult patients who visited family practice clinics in Karachi, Pakistan. *J Oral Pathol Med*. 2009;38:416-21
- 16.- Idris AM, Prokopczyk B, Hoffmann D. Toombak: a major risk factor for cancer of the oral cavity in Sudan. *Prev Med*. 1994;23:832-9.
- 17.- Chen YJ, Chang JT, Liao CT, Wang HM, Yen TC, Chiu CC, et al. Head and neck cancer in the betel quid chewing area: recent advances in molecular carcinogenesis. *Cancer Sci*. 2008;99:1507-14.
- 18.- Squier CA, Cox P, Hall BK. Enhanced penetration of nitrosornicotine across oral mucosa in the presence of ethanol. *J Oral Pathol*. 1986;15:276-9.
- 19.- Howie NM, Trigkas TK, Cruchley AT, Wertz PW, Squier CA, Williams DM. Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. *Oral Dis*. 2001;7:349-54.
- 20.- Maier H, Weidauer H, Zöller J, Seitz HK, Flentje M, Mall G, et al. Effect of chronic alcohol consumption on the morphology of the oral mucosa. *Alcohol Clin Exp Res*. 1994;18:387-91.
- 21.- Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide. Proceedings of the IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, France, 17-24 February 1998. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 1999;71 Pt 1:1-315.
- 22.- Kurkivuori J, Salaspuro V, Kaihovaara P, Kari K, Rautemaa R, Grönroos L, et al. Acetaldehyde production from ethanol by oral streptococci. *Oral Oncol*. 2007;43:181-6.
- 23.- Viswanathan H, Wilson JA. Alcohol--the neglected risk factor in head and neck cancer. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 2004;29:295-300.
- 24.- Wynder EL, Kabat G, Rosenberg S, Levenstein M. Oral cancer and mouthwash use. *J Natl Cancer Inst*. 1983;70:255-60

- 25.- McCullough MJ, Farah CS. The role of alcohol in oral carcinogenesis with particular reference to alcohol-containing mouthwashes. *Aust Dent J.* 2008;53:302-5.
- 26.- Winn DM, Blot WJ, McLaughlin JK, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, et al. Mouthwash use and oral conditions in the risk of oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 1991;51:3044-7.
- 27.- Lachenmeier DW, Gumbel-Mako S, Sohnius EM, Keck-Wilhelm A, Kratz E, Mildau G. Salivary acetaldehyde increase due to alcohol-containing mouthwash use: a risk factor for oral cancer. *Int J Cancer.* 2009;125:730-5.
- 28.- Syrjänen K, Väyrynen M, Castrén O, Yliskoski M, Mäntyjärvi R, Pyrhönen S, Saarikoski S. Sexual behaviour of women with human papillomavirus (HPV) lesions of the uterine cervix. *Br J Vener Dis.* 1984 Aug;60(4):243-8.
- 29.- Syrjänen S, Lodi G, von Bültzingslöwen I, Aliko A, Arduino P, Campisi G, et al. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: A systematic review. *Oral Dis.* 2011;17(Suppl 1):58–72.
- 30.- Prabhu SR, Wilson DF. Human papillomavirus and oral disease – Emerging evidence: A review. *Aust Dent J.* 2013;58:2–10.
- 31.- de Villiers EM, Gunst K. Characterization of seven novel human papillomavirus types isolated from cutaneous tissue, but also present in mucosal lesions. *J Gen Virol.* 2009;90:1999–2004.
- 32.- D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S, Gillison ML. Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *J Infect Dis.* 2009;199:1263–9.
- 33.- Ragin C, Edwards R, Larkins-Pettigrew M, Taioli E, Eckstein S, Thurman N, et al. Oral HPV infection and sexuality: A cross-sectional study in women. *Int J Mol Sci.* 2011;12:3928–40.
- 34.- Kreimer AR, Alberg AJ, Daniel R, Gravitt PE, Viscidi R, Garrett ES, et al. Oral human papillomavirus infection in adults is associated with sexual behavior and HIV serostatus. *J Infect Dis.* 2004;189:686–98.

- 35.- Campisi G, Panzarella V, Giuliani M, Lajolo C, Di Fede O, Falaschini S, et al. Human papillomavirus: Its identity and controversial role in oral oncogenesis, premalignant and malignant lesions (review) *Int J Oncol.* 2007;30:813–23.
- 36.- Femiano F. Papilloma virus. Review of the literature. Note II. Diagnosis and treatment *Minerva Stomatol.* 2000;49:179–86.
- 37.- Santoro V, Pozzuoli ML, Colella G. Role of human papilloma virus in precancerous and cancerous lesions of the oral cavity. Review of the literature. *Minerva Stomatol.* 1997;46:595–601.
- 38.- Feller L, Khammissa RA, Wood NH, Lemmer J. Epithelial maturation and molecular biology of oral HPV. *Infect Agent Cancer.* 2009;4:16
- 39.- Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004;68:362–72.
- 40.- Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 2005;32(Suppl 1):S7–15.
- 41.- Von Knebel Doeberitz M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer.* 2002;38:2229–42.
- 42.- Elgui de Oliveira D. DNA viruses in human cancer: An integrated overview on fundamental mechanisms of viral carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2007;247:182–96.
- 43.- Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci.* 2007;98:1505–11.
- 44.- Thomas M, Banks L. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J Gen Virol.* 1999;80(Pt 6):1513–7.
- 45.- Garnett TO, Filippova M, Duerksen-Hughes PJ. Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis. *Cell Death Differ.* 2006;13:1915–26.
- 46.- Lefort K, Mandinova A, Ostano P, Kolev V, Calpini V, Kolfschoten I, et al. Notch1 is a p53 target gene involved in human keratinocyte tumor suppression through negative regulation of ROCK1/2 and MRCKalpha kinases. *Genes Dev.* 2007;21:562–77.

- 47.- Yugawa T, Handa K, Narisawa-Saito M, Ohno S, Fujita M, Kiyono T. Regulation of Notch1 gene expression by p53 in epithelial cells. *Mol Cell Biol.* 2007;27:3732–42.
- 48.- Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 1998;12:2245–62.
- 49.- Ishikawa M, Fujii T, Saito M, Nindl I, Ono A, Kubushiro K, et al. Overexpression of p16 INK4a as an indicator for human papillomavirus oncogenic activity in cervical squamous neoplasia. *Int J Gynecol Cancer.* 2006;16:347–53.
- 50.- Lassen P, Eriksen JG, Hamilton-Dutoit S, Tramm T, Alsner J, Overgaard J. Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol.* 2009;27:1992–8.
- 51.- Contreras Vidaurre E.G. y cols. Retinoides: su aplicación en las lesiones precancerosas y el cáncer oral. *Medicina Oral* 2001; 6: 114-23.
- 52.- Catherine F. Poh et al. Biopsy and Histopathologic Diagnosis of Oral Premalignant and Malignant Lesions. *J Can Dent Assoc.* 2008 Apr;74(3):283-8.
- 53.- Okazaki Y. y cols. Investigation of environmental factors for diagnosing malignant potential in oral epithelial dysplasia. *Oral Oncology* 38 (2002) 562-73.
- 54.- Axéll T. y cols. Oral white lesions with special referent to precancerous and tobacco-related lesions: conclusions of an international symposia held in Uppsala, Sweden, May 18-21 1994. *J.Oral Pathol Med* 1996; 25: 49-54.
- 55.- Bascones A. y cols. *Cáncer y Precáncer Oral*. 1a Edición. Ediciones Avances. Madrid 2003
- 56.- Mc Alinden RL. y cols. Bcl-2 expression in sequential biopsies of potentially malignant oral mucosal lesions assessed by immunocytochemistry. *Oral Diseases* (2000) 6, 318-26.
- 57.- Jané Salas E. y cols. Importancia de la dieta en la prevención del cáncer oral. *Med Oral* 2003; 8: 260-8.
- 58.- Saiz Rodríguez A. Bases moleculares del cáncer oral. *Med Oral* 2001; 6: 342-9.

- 59.- De Vicente J.C. y cols. Expresión de las proteínas de los proto-oncogenes ErbB-3 y ErbB-4 en el carcinoma oral de células escamosas: estudio piloto. *Med Oral* 2003; 8: 374-81.
- 60.- López –Martínez M. y cols. Aplicaciones clínicas del diagnóstico de las alteraciones de p53 en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello. *Med Oral* 2002; 7: 108-20.
- 61.- Vera Sempere F.J., Navarro Hervás M. Sobreexpresión del gen supresor p53 en el cáncer oral. *Medicina Oral* 1997; 2: 283-96.
- 62.- Schoelch M. y cols. Cell cycle proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 35 (1999) :333-42.
- 63.- Pateromichelakis S. y cols. The FHIT gene in oral squamous cell carcinoma: allelic imbalance in frequent but cDNA aberrations are uncommon. *Oral Oncology* 36 (2000) 180-8.
- 64.- Loro L. y cols. Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance. *J Oral Pathol Med* 2003; 32: 125-38.
- 65.- Muzio L. y cols. Survivin, a Potencial Early Predictor of Tumor Progresión in the Oral Mucosa. *J Dent Res* 2003; 82(11): 923-8.
- 66.- Chernov AV, Sounni NE, Remacle AG, Strongin AY. Epigenetic control of the invasion-promoting MT1-MMP/MMP-2/TIMP-2 axis in cancer cells. *J Biol Chem*. 2009 May 8;284(19):12727-34. doi: 10.1074/jbc.M900273200. Epub 2009 Mar 13.
- 67.- Pérez MA, Raimondi AR, Itoiz ME. An experimental model to demonstrate the carcinogenic action of oral chronic traumatic ulcer. *J Oral Pathol Med*. 2005;34:17-22.
- 68.- Hary M, Buna G, Matekovits G. The role of chronic trauma caused by dental prostheses in the etiology of buccal cancer. *Rev Chir Oncol Radiol O R L Oftalmol Stomatol Ser Stomatol*. 1974;21:425-30
- 69.- Kurkivuori J, Salaspuro V, Kaihovaara P, Kari K, Rautemaa R, Grönroos L, et al. Acetaldehyde production from ethanol by oral streptococci. *Oral Oncol*. 2007;43:181-6.

- 70.- Pavia M, Pileggi C, Nobile CG, Angelillo IF. Association between fruit and vegetable consumption and oral cancer: a meta-analysis of observational studies. *Am J Clin Nutr.* 2006;83:1126-34
- 71.- Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer: Clinical features. *Oral Oncol.* 2010 Apr 16.
- 72.- Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol.* 2009;45:301-8. 26.
- 73.- Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis.* 2009;15:388-99.
- 74.- Yanjia H, Xinchun J. The role of epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma and oral submucous fibrosis. *Clin Chim Acta.* 2007;383:51-6.
- 75.- Keith WD, Kelly AP, Sumrall AJ, Chabra A. Squamous cell carcinoma arising in lesions of discoid lupus erythematosus in black persons. *Arch Dermatol.* 1980;116:315-7.
- 76.- Vairaktaris E, Kalokerinos G, Goutzakis L, Spyridonidou S, Vassiliou S, Derka S, et al. Diabetes alters expression of p53 and c-myc in different stages of oral oncogenesis. *Anticancer Res.* 2007;27:1465-73
- 77.- . Goutzakis L, Vairaktaris E, Yapijakis C, Kavantzias N, Nkenke E, Derka S, et al. Diabetes may increase risk for oral cancer through the insulin receptor substrate-1 and focal adhesion kinase pathway. *Oral Oncol.* 2007;43:165-73
- 78.- Ben Slama L. Precancerous lesions of the buccal mucosa. *Rev Stomatol Chir Maxillofac.* 2001;102:77-108
- 79.- Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin.* 2002;52:195-215.
- 80.- Mascarenhas AK, Allen CM, Moeschberger ML. The association between Viadent use and oral leukoplakia--results of a matched case-control study. *J Public Health Dent.* 2002;62:158- 62

81.- Haya-Fernández MC, Bagán JV, Murillo-Cortés J, Poveda-Roda R, Calabuig C. The prevalence of oral leukoplakia in 138 patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis.* 2004;10:346-8.

82.- Hansen LS, Olson JA, Silverman S Jr. Proliferative verrucous leukoplakia. A long-term study of thirty patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985;60:285-98.

83.- de Sousa FA, Paradella TC, Carvalho YR, Rosa LE. Comparative analysis of cell proliferation ratio in oral lichen planus, epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2009;14:e563-7.

84.- González-Moles MA, Scully C, Gil-Montoya JA. Oral lichen planus: controversies surrounding malignant transformation. *Oral Dis.* 2008;14:229-43.

85.- Al-Rawi NH, Talabani NG. Squamous cell carcinoma of the oral cavity: a case series analysis of clinical presentation and histological grading of 1,425 cases from Iraq. *Clin Oral Investig.* 2008;12:15-8.

86.- Cuffari L, Tesseroli de Siqueira JT, Nembr K, Rapaport A. Pain complaint as the first symptom of oral cancer: a descriptive study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102:56-61.

87.- Mashberg A, Merletti F, Boffetta P, Gandolfo S, Ozzello F, Fracchia F, et al. Appearance, site of occurrence, and physical and clinical characteristics of oral carcinoma in Torino, Italy. *Cancer.* 1989;63:2522-7.

88.- Hirata RM, Jaques DA, Chambers RG, Tuttle JR, Mahoney WD. Carcinoma of the oral cavity. An analysis of 478 cases. *Ann Surg.* 1975;182:98-103.

89.- Gorsky M, Epstein JB, Oakley C, Le ND, Hay J, Stevenson-Moore P. Carcinoma of the tongue: a case series analysis of clinical presentation, risk factors, staging, and outcome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;98:546-52.

90.- Yi Fan , Lei Zheng , et al. Survival Analysis of Oral Squamous Cell Carcinoma in a Subgroup of Young Patients. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15 (20), 8887-889.

91.-Siriwardena BS, Tilakaratne A, Amaratunga EA, Tilakaratne WM. Demographic, aetiological and survival differences of oral squamous cell carcinoma in the young and the old in Sri Lanka. *Oral Oncol.* 2006;42:831-6.

- 92.- Sasaki T, Moles DR, Imai Y, Speight PM. Clinico-pathological features of squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients <40 years of age; J Oral Pathol Med. 2005; 34:129-33
- 93.- Ribeiro AC, Silva AR, Simonato LE, Salzedas LM, Sundefeld ML, Soubhia AM. Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma in young people: a descriptive study in Brazilians. Br J Oral Maxillofac Surg. 2009;47:95-8.
- 94.- Mallet Y, Avalos N, Le Ridant AM, Gangloff P, Moriniere S, Rame JP, et al. Head and neck cancer in young people: a series of 52 SCCs of the oral tongue in patients aged 35 years or less. Acta Otolaryngol. 2009;129:1503-8.
- 95.- Jainkittivong A, Swasdison S, Thangpitivityotin M, Langlais RP. Oral squamous cell carcinoma: a clinicopathological study of 342 Thai cases. J Contemp Dent Pract. 2009;10:E033- 40.
- 96.- Effiom OA, Adeyemo WL, Omitola OG, Ajayi OF, Emmanuel MM, Gbotolorun OM. Oral squamous cell carcinoma: a clinicopathologic review of 233 cases in Lagos, Nigeria. J Oral Maxillofac Surg. 2008;66:1595-9.
- 97.- Martínez-Conde R, Aguirre JM, Burgos JJ, Rivera JM. Clinicopathological factors in early squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth, in Biscay (the Basque Country, Spain). Med Oral. 200;6:87-94.
- 98.-Krupala JL, Gianoli GJ. Carcinoma of the oral tongue. J La State Med Soc.1993;145:421-6.
- 99.- Ghoshal S, Mallick I, Panda N, Sharma SC. Carcinoma of the buccal mucosa: analysis of clinical presentation, outcome and prognostic factors. Oral Oncol. 2006;42:533-9
- 100.- Natori T, Koga M, Anegawa 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.
- 101.- Scully C, Bagan JV. Recent advances in Oral Oncology 2007: imaging, treatment and treatment outcomes. Oral Oncol. 2008;44:211-5.

102.- Motta Rda R, Zettler CG, Cambuzzi E, Jotz GP, Berni RB. 18.Ki-67 and p53 correlation prognostic value in squamous cell carcinomas of the oral cavity and tongue. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2009;75:544-9.

103.- Hitt R, Ciruelos E, Amador ML, Benito A, Sanchez JJ, Ballestin C, et al. Prognostic value of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and p53 in advanced head and neck squamous cell carcinoma patients treated with induction chemotherapy. *Eur J Cancer.* 2005;41:453-60

104.- Epstein JB, Sciubba J, Silverman S Jr, Sroussi HY. Utility of toluidine blue in oral premalignant lesions and squamous cell carcinoma: continuing research and implications for clinical practice. *Head Neck.* 2007;29:948-58.

105.- 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.

106.- Epstein JB, Silverman S Jr, Epstein JD, Lonky SA, Bride MA. Analysis of oral lesion biopsies identified and evaluated by visual examination, chemiluminescence and toluidine blue. *Oral Oncol.* 2008;44:538-44. Erratum in: *Oral Oncol.* 2008;44:615.

107.- Stoeckli SJ, Alkureishi LW, Ross GL. Sentinel node biopsy for early oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2009; 266:787-93.

108.- Burns P, Foster A, Walshe P, O'Dwyer T. Sentinel lymph node biopsy in node-negative squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *J Laryngol Otol.* 2009;123:439-43.

109.- Pereira MC, Oliveira DT, Landman G, Kowalski LP. Histologic subtypes of oral squamous cell carcinoma: prognostic relevance. *J Can Dent Assoc.* 2007;73:339-44

110.- Sánchez López JD, Sicilia Gutiérrez MA, Capitán Cañadas LM, Labrot Moleón I, MartínezVillalobos Castillo S, Valencia Laseca E. Profundidad tumoral en el carcinoma epidermoide lingual. Repercusiones diagnósticas. *Rev Esp Cir Oral y Maxilofac.* 2007;29:33-42.

- 111.- Larsen SR, Johansen J, Sørensen JA, Krogh A. The prognostic significance of histological features in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2009;38:657-62.
- 112.- Montoro JR, Hicz HA, Souza L, Livingstone D, Melo DH, Tiveron RC, et al. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Braz J Otorhinolaryngology.* 2008;74:861-6
- 113.- Kaufman MH, Robertson EJ, Handyside AH, Evans MJ. Establishment of pluripotential cell lines from haploid mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol.* 1983 Feb;73:249-61
- 114.- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Apr 1;100(7):3983-8. Epub 2003 Mar 10. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 May 27;100(11):6890.
- 115.- Janes S.M., Lowell, S. & Hutter C (2002). Epidermal Stem Cell. *The Journal of Pathology*, 197(4), 479-491.
- 116.- Mackenzie, I.C. (2006) Stem cell properties and epithelial malignancies. *European Journal of Cancer*, 42 (9)1204-1212.
- 117.- González-Moises, M, Scully, C, Ruiz-Ávila I. & Plaza-Campillo J, J. (2013). The Cancer stem cell hypothesis applied to oral carcinoma. *Oral Oncology*, 49(8), 738-746.
- 118.- Sampieri, K., & Fodde, R. (2012). Cancer stem cells and metastasis. *Seminars in Cancer Biology*.
- 119.- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., & Weissman, I.L. (2001). Stem Cells, Cancer, Cancer Stem cells. *Nature*, 414(6859), 105-111.
- 120.- Campbell, L.L., & Polyak, K. (2007) Breast tumor heterogeneity: Cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle*.
- 121.- Monroe, M., M., Anderson, E. C., Clayburgh, D.R., & Wong, M.H. (2011) Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Oncology*, 2011, 762-780.
- 122.- Bonnet, D. & Dick, J.E., (1997). Human Acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, 3(7), 730-737.

123.- Ward, R., J., & Dirks, P.B., (2007) Cancer stem cell: at the headwaters of tumor development. *Annual Review of Pathology*, 2, 175-189.

124.- Dewan M.Z, Ahmed, S., Iwasaki, Y., Ohba, K., Toi, M., & Yamamoto N. (2006) Stromal cell- derived factor 1 and CXCR4 receptor interaction in tumor growth and metastasis of breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy= Bomedicine & Pharmacothérapie* 60(6), 273-6.

125.- Albers, A, E., Chen, C., Koberle B, Qian, X, Klussmann, J., P., Wollenberg, B,. & Kaufmman A.M. (2012). Stem Cells in squamous head and neck cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*.

126.- Sundaram, M. , Guernsey, D.L., Rajaraman., M. M., & Rajaraman R(2004) Neosis: A novel type of cell division in cancer. *Cancer Biology and Therapy*, 3(2), 207-218.

127.- Ponta Helmut, Sherman Larry & Herrlich Peter A. CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, 33-45 (**January 2003**)

128.- David Naor, Shulamit B. Wallach-Dayana, Muayad A. Zahalka, Ronit Vogt Sionov. Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. ***Seminars in Cancer Biology***, Volume 18, Issue 4, Pages 260-267

129.-Vinitzky Brener, Ibáñez Mancera, Eljure Eljure, Alba Bravo., Delayed diagnosis of cancer in the oral cavity and adnexa as a key factor in prognosis. *Revista ADM* 2014; 71 (4): 188-191.

130.- Samuel E Udeabor, Majeed Rana., Gerd Wegener, Nils-Claudius Gellrich & André M. Eckardt. , Squamous cell carcinoma of the oral cavity and the oropharynx in patients less than 40 years of age: a 20- year analysis. *Head and Neck Oncology* 2012, 4:28, 1-7.

131.- Samreen Naz, Kanwal Salah, Amna Khurshid, Atif Ali Hashmi, Naveen Faridi,. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma – Comparative Evaluation of Pathological Parameters in Young and Old Patients., *Asian Pac J Cancer Prev*, 16(9), 4061-4063.

132.- Farnaz Falaki., Zohreh Dalirsani., Atessa Pakfetrat., Ali Falaki., Nasrollah Saghravanian, Tahereh Nosratzahi, Mahdi Pazouki., Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma of young patients in Mashhad, Iran: A retrospective study and review of literatures. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011 Jul. 1;16(4):e473-7.

- 133.- Sagar C. Patel, William R. Carpenter, Seth Tyree, Marion Everett Couch, Mark Weissler, Trevor Hackman, D. Neil Hayes, Carol Shores, and Bhishamjit S. Chera. Increasing Incidence of Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma in Young White Women, Age 18 to 44 Years. *J Clin Oncol* 29:1488-1494. © 2011 by American Society of Clinical Oncology.
- 134.- Ortholan C, Lusinchi A, Italiano A, Bensadoun RJ, Auperin A, Poissonnet G, et al. Oral cavity squamous cell carcinoma in 260 patients aged 80 years or more. *Radiother Oncol.* 2009;93:516-23.
- 135.- Andisheh-Tadbir A, Mehrabani D, Heydari ST. Epidemiology of squamous cell carcinoma of the oral cavity in Iran. *J Craniofac Surg.* 2008;19:1699-702
- 136.- Nemes JA, Redl P, Boda R, Kiss C, Márton IJ. Oral cancer report from Northeastern Hungary. *Pathol Oncol Res.* 2008;14:85-92.
- 137.- Dahlstrom KR, Little JA, Zafereo ME, Lung M, Wei Q, Sturgis EM. Squamous cell carcinoma of the head and neck in never smoker-never drinkers: a descriptive epidemiologic study. *Head Neck.* 2008;30:75-84.
- 138.- Zenko Noto., Toshiko Yoshida, Motonori Okabe et al. CD44 and SSEA-4 positive cells in an oral cancer cell line HSC-4 possess cancer stem-like cell characteristics. *Oral Oncology* 49(2013) 787-795.
- 139.- Cong-Fa Huang., Xiao-Rong Xu., Tian-Fu Wu., Zhi-Jun Sun, Wen-Feng Zhang., Correlation of ALDH1, CD44, OCT4, and SOX2 in tongue squamous cell carcinoma and their association with disease progression and prognosis. *J Oral Pathol Med* (2014) 43: 492-498.
- 140.- Soria JC, Jin Jan S, Khuri RF, Hassan K et al. Over expression of Cyclin B1 early stage non-small cell lung cancer and its clinical implication. *Cancer research* 60, 4000-4004, August 1, 2000.

