



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

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD LEÓN

**INMUNOEXPRESIÓN DE PI3K-AKT-MTOR EN DISPLASIAS EPITELIALES
ORALES**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

KARLA PAOLA MANCERA NAVARRO

TUTOR.

MTRO. FERNANDO TENORIO ROCHA

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

COTUTOR.

DR. LUIS ALBERTO GAITÁN CEPEDA

ROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

CIUDAD UNIVERSITARIA. CD.MX. NOVIEMBRE 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Agradecimientos.....	5
Resumen.....	6
Abstract.....	7
Introducción.....	8

CAPÍTULO 1

1. Antecedentes.....	10
1.1 Vía de señalización PI3K-AKT-mTOR	11
1.2 Variantes de splicing de PI3K-AKT-mTOR	14
1.3 Señalización de la vía PI3K-AKT-mTOR en el crecimiento y supervivencia celular.....	15
1.4 Desregularización de la vía PI3K-AKT-mTOR en cáncer	16
Mutaciones genéticas/pérdida de la función.....	16
Amplificación genética de PIK3CA y AKT1 / 2.....	18
Sobreexpresión de AKT	18
2.Trastornos potencialmente malignos	21
2.1 Displasia epitelial oral	21
2.2 Clasificación de la displasia epitelial oral.....	22
Clasificación clásica.....	24
Clasificación de la OMS.....	25
Clasificación binaria.....	27

CAPÍTULO 2

Planteamiento del problema	30
Justificación.....	31
Hipótesis.....	32
Objetivo General.....	33

Objetivos Específicos.....	33
Materiales y métodos.....	34
Criterios de inclusión.....	34
Criterios de exclusión	34
Criterios de eliminación.....	34
Variables dependientes.....	35
Variables independientes.....	36

CAPÍTULO 3

Metodología	38
-------------------	----

CAPÍTULO 4

Resultados	43
Análisis estadísticos de los resultados.....	59
Discusión.....	66
Conclusiones.....	69
Referencias bibliográficas.....	70
Anexos.....	77

ÍNDICE DE IMÁGENES

Figura 1.....	13
Figura 2.....	14
Figura 3.....	14
Figura 4.....	15
Figura 5.....	25
Figura 6.....	28
Figura 7.....	40
Figura 8.....	48
Figura 9.....	78

Figura 10.....	79
Figura 11.....	80
Figura 12.....	81
Figura 13.....	82

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.....	22
Tabla 2.....	23
Tabla 3.....	24
Tabla 4.....	44
Tabla 5.....	44
Tabla 6.....	45
Tabla 7.....	46
Tabla 8.....	51
Tabla 9.....	51
Tabla 10.....	52
Tabla 11.....	54
Tabla 12.....	54
Tabla 13.....	55
Tabla 14.....	57
Tabla 15.....	57
Tabla 16.....	58
Tabla 17.....	59
Tabla 18.....	60
Tabla 19.....	61
Tabla 20.....	62
Tabla 21.....	63
Tabla 22.....	63
Tabla 23.....	64
Tabla 24.....	65
Tabla 25.....	65

Agradecimientos

Primeramente agradezco a mis padres Lucy Navarro y Carlos Mancera porque siempre me han apoyado en este gran trayecto llamado vida.

Mis hermanas Karen y Daniela por estar conmigo y apoyarme siempre, a Karen porque casi toda nuestra vida académica la hemos pasado juntas, incluso en la maestría como compañera, doy gracias por compartir momentos maravillosos en la universidad.

Mis compañeros del programa de maestría y doctorado de Ciencias Odontológicas: Ángel, Paloma y Paola, por su ayuda y consejos durante el programa de la maestría.

A mis tutores, el Dr. Fernando Tenorio Rocha por su gran apoyo en estos dos años, por toda su paciencia y sobre todo por sus grandes enseñanzas, igualmente al Dr. Luis Alberto Gaitán Cepeda por compartir su conocimiento y tiempo para llevar a cabo este bonito proyecto de investigación.

A Dennis Becker por su gran apoyo, por las experiencias vividas, y sobre todo por creer en mí.

Todos aquellos familiares y amigos que no recordé al momento de escribir esto, pero que han sido parte de mi vida.

Resumen

Las displasias epiteliales orales son trastornos potencialmente malignos de gran relevancia dada su prevalencia, así como su mayor potencial de progresión hacia carcinoma oral de células escamosas.

Actualmente, los biomarcadores son un tema de particular interés ya que pueden ser considerados el componente más importante en el diagnóstico precoz y oportuno. Las proteínas implicadas en la vía de señalización celular PI3K - Akt - mTOR son de gran interés, debido a que participan en el ciclo celular, crecimiento, proliferación celular; además, ser considerados como marcadores potenciales para el diagnóstico de displasias con mayor riesgo de malignización.

Objetivo: Determinar la inmunoexpresión de PI3K, Akt y mTOR en displasias epiteliales orales (DEO) de bajo riesgo, alto riesgo, carcinoma oral de células escamosas (COCE) y mucosa oral normal.

Metodología: Un total de 80 muestras procedentes de 2 laboratorios de histopatología de la UNAM, fueron seleccionadas, se analizaron bajo microscopía, y se realizó inmunohistoquímica con los anticuerpos PI3K, Akt y mTOR; fueron clasificados en 4 grupos: DEO de alto y bajo riesgo, COCE y mucosa sana.

Resultados: Se observó; un 83.3% de positividad en las células en las displasias epiteliales orales de alto riesgo para el anticuerpo AKT con una significancia del 0.017. La inmunoreactividad fue débil tanto para las displasias de bajo y alto riesgo, y para carcinoma oral de células escamosas, el 75% de los casos presentó una inmunoreactividad alta, con una significancia estadística de 0.001. No se observó una gran significancia estadística entre los grupos de estudio para los anticuerpos PI3K Y mTOR.

Conclusiones: La positividad de PI3K, Akt y mTOR, demuestra el papel que tiene esta vía de señalización celular en progresión, específicamente la presencia de Akt, ya que las displasias de alto riesgo mostraron una mayor inmunoexpresión en comparación con las de bajo riesgo, por lo que pueden ser considerados posibles marcadores de diagnóstico.

Abstract

Oral epithelial dysplasias are malignant disorders of great importance given their prevalence, as well as their transformation potential in oral squamous cell carcinoma.

Currently, biomarkers are a subject of particular interest since they can be considered the most important component in early and timely diagnosis. The proteins involved in the cell signaling pathway PI3K - Akt - mTOR are of great interest, because they participate in the cell cycle, cell growth and proliferation; In addition, they are considered as potential markers for the diagnosis of dysplasias with a higher risk of malignancy.

Objective: To determine the immunoexpression of PI3K, Akt and mTOR in oral epithelial dysplasias (OED) of low risk, high risk, oral squamous cell carcinoma (OSCC) and normal oral mucosa.

Methods: A total of 80 samples from 2 histopathology laboratories of the UNAM were selected, analyzed under microscopy, and immunohistochemistry was performed with the PI3K, AKT and mTOR antibodies; They were classified into 4 groups: high and low risk OED, OSCC and healthy mucosa.

Results: It was observed; 83.3% positive cells in oral epithelial dysplasia of high risk for the AKT antibody with a significance of 0.017. Immunoreactivity was weak for both low and high risk dysplasias, and for oral squamous cell carcinoma, 75% of the cases had high immunoreactivity, with a statistical significance of 0.001. No great statistical significance was observed between the study groups for the PI3K and mTOR antibodies.

Conclusions: The positivity of PI3K, Akt and mTOR, demonstrates the role that this cell signaling pathway has in progression, specifically the presence of Akt, since high-risk dysplasias showed greater immunoexpression compared to low-risk epithelial dysplasia, , so they can be considered possible diagnostic markers.

Introducción

A pesar de que ha sido ampliamente estudiado, el proceso de oncogénesis oral no ha sido totalmente entendido. Este hecho adquiere importancia debido a que lesiones potencialmente cancerizables, como la displasia epitelial oral, pudieran ser identificadas precozmente y establecer un tratamiento que incremente la posibilidad de éxito terapéutico. Uno de los objetivos de investigación más abordados con este fin es la expresión de proteínas constitutivas de vías de señalización celular involucradas en procesos asociados a oncogénesis (1,2). Algunos estudios que buscan biomarcadores en cáncer oral están aún en fase de estudio, requiriendo su validación para ser aceptado en la práctica clínica. Actualmente, los biomarcadores son un tema de particular interés porque pueden representar la parte más importante en el diagnóstico (3,4).

Dentro de las vías de señalización se ha sugerido que la vía PI3K-Akt-mTOR pudiera tener gran valor para la detección temprana de lesiones orales con potencial oncogénico (5). Por lo que la posibilidad de utilizar la expresión de algunos de sus componentes como biomarcadores de malignidad se hace atractiva. Se ha establecido a la técnica de inmunohistoquímica como la más adecuada para la identificación de expresiones de este tipo de proteínas celulares (6).

CAPÍTULO 1.

1. Antecedentes

En 1998, el Grupo de Trabajo de Definiciones de Biomarcadores de los Institutos Nacionales de la Salud definió biomarcador como "una característica que se mide y evalúa objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patógenos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica" (7). Después, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró que una verdadera definición de biomarcadores que incluye "casi cualquier medición que refleje una interacción entre un sistema biológico y un peligro potencial, que puede ser químico, físico o biológico. La respuesta medida puede ser funcional y fisiológica, bioquímica a nivel celular o una interacción molecular " (8).

A nivel más de conceptos clínicos, un biomarcador se define por ser una molécula secretada por una célula maligna o una respuesta específica del cuerpo a la presencia de una condición de malignización (9). Los biomarcadores pueden utilizarse para la evaluación del paciente en múltiples entornos clínicos, incluida la estimación del riesgo de enfermedad y la distinción entre los tejidos benignos y los malignos (10). Los biomarcadores de cáncer se pueden clasificar según el estado de la enfermedad, incluidos los biomarcadores predictivos, de diagnóstico y de pronóstico (11).

A pesar de que existen métodos para la identificación de las displasias epiteliales orales, la evaluación histológica, se considera actualmente el estándar de oro para su diagnóstico, sin embargo, su exactitud depende de la calidad del tejido y del sitio de la biopsia (12). Por ello, a nivel clínico es imposible saber si las displasias epiteliales tienen un fuerte potencial de malignizarse, ya que conlleva un fuerte componente subjetivo por parte de los patólogos. Por tal motivo en los últimos años, el enfoque va encaminado a usar biomarcadores con el fin de identificar si el epitelio bucal tiene una probabilidad de malignizarse o no. Existen numerosos tipos de biomarcadores, sin embargo, no se ha podido determinar cuál es el más adecuado para este tipo de lesiones.

1.1 Vía de señalización PI3K-AKT-mTOR

La respuesta mitogénica es la alteración genética y molecular más común que caracteriza al desarrollo de cáncer, y la vía de señalización PI3K - Akt - mTOR se encuentra involucrada en esta respuesta (13). La activación de la vía PI3K -Akt - mTOR puede ser provocada por mutaciones somáticas y estimular receptores como el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR), el Receptor del Factor de Crecimiento similar a la Insulina (IGFR), y receptores acoplados a proteínas G. De estos, el EGFR es probablemente el mejor estudiado. La importancia de PI3K - Akt - mTOR en la carcinogénesis es amplia, ya que está involucrada en la proliferación, diferenciación, supervivencia, motilidad, angiogénesis, y metabolismo celular. La activación de PI3K da como resultado el desencadenamiento secuencial de su receptor serina / treonina asociada a proteínas quinasas, como Akt y mTOR, ambos, moléculas importantes asociadas con el proceso y amplificación de la carcinogénesis (14). De particular relevancia son su promoción y desregulación de las señales inflamatorias y su capacidad para alterar el gen supresor tumoral p53 (15).

Los componentes de la vía PI3K/Akt/mTOR y sus actividades biológicas se han localizado tanto a nivel citoplásmico como nuclear (16-18). Las fosfatidilinositol 3-quininas son quinasas lipídicas, que se dividen en 3 clases. De especial interés para el presente proyecto, son las PI3K de clase IA, ya que su sobreexpresión ha sido involucrada en diferentes variedades de cáncer humano (19), incluyendo carcinoma oral de células escamosas (20-22). Akt es una serina-treonina quinasa que funciona como objetivo de la cadena descendente y efector de PI3K. La expresión de AKT se puede presentar tanto en el núcleo como en el citoplasma de células en las capas epiteliales basal, parabasal y espinosa (23). AKT muestra inmunexpresión citoplasmática y nuclear en carcinoma oral de células escamosas (24). mTOR es uno de los principales objetivos de la Akt activada. Es activada por una variedad de señales celulares, incluyendo factores de

crecimiento y hormonas y controla los procesos fundamentales de la célula como la supervivencia y la proliferación celular (25).

mTOR es una proteína de serina/treonina quinasa que pertenece a la familia de las proteínas quinasas y está relacionada con PI3K . Esta proteína comprende dos complejos los cuales son funcionalmente distintos: el complejo mTOR 1 y el complejo mTOR 2 (26). El complejo mTOR1, es un importante regulador de la biogénesis ribosomal y la síntesis de proteínas, a través de la fosforilación y activación de S6K, la fosforilación y la inactivación del represor de la traducción del mRNA, la proteína 4EBP1 (27-29) (Figura 1). El mTOR2 se activa por factores de crecimiento, fosforilando PKC- α , AKT (en Ser473) y paxillina (proteína adaptadora asociada a la adherencia focal), y regula la actividad de Rho GTPases y Rac relacionados con la supervivencia celular, la migración y la regulación del citoesqueleto de actina (28).

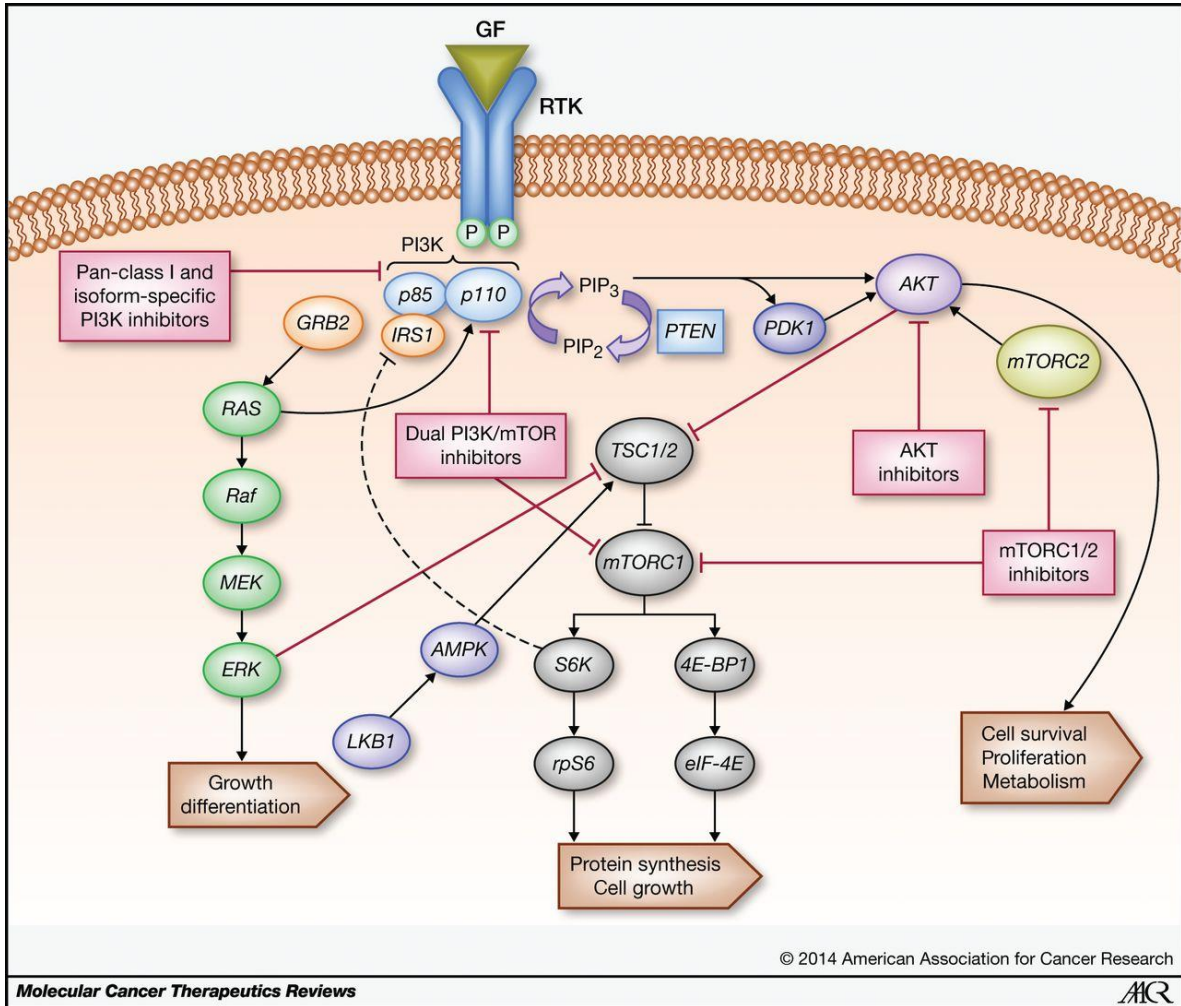


Fig 1. Vía de señalización PI3K-AKT-mTOR. Tomado de Molecular cancer therapeutics reviews.

1.2 Variantes de splicing de PI3K-AKT-mTOR

PIK3CA

*Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa subunidad catalítica alfa

*Localización: Cromosoma 3

*Localización intracelular

Fig 2. Isoformas de PI3K.

<https://www.proteinatlas.org/learn/method/immunohistochemistry>

Variantes de splicing	Tamaño y peso molecular
PIK3CA-001	1068 aa 124.3 kDa
PIK3CA-002	21 aa 2.4 kDa
PIK3CA-005	118 aa 13.8 kDa

AKT serina / treonina quinasa 1

*Localización: Cromosoma 14

*Localización intracelular

Fig 3. Isoformas de AKT.

<https://www.proteinatlas.org/learn/method/immunohistochemistry>

Variantes de splicing	Tamaño y peso molecular
AKT-001	480 aa 55.7 kDa
AKT-002	480 aa 55.7 kDa
AKT-003	480 aa 55.7 kDa
AKT-004	480 aa 55.7 kDa
AKT-005	480 aa 55.7 kDa
AKT-006	480 aa 55.7 kDa
AKT-010	184 aa 20.9 kDa
AKT-014	91 aa 10.9 kDa
AKT-018	170 aa 19.3 kDa

mTOR
 *Mechanistic target of rapamycin
 *Localización: Cromosoma 1
 *Localización intracelular

Fig 4. Isoformas de mTOR.
<https://www.proteinatlas.org/learn/method/immunohistochemistry>

Variantes de splicing	Tamaño y peso molecular
MTOR-001	2549 aa 288.9 kDa
MTOR-002	754 aa 85.9 kDa
MTOR-005	161 aa 18.2 kDa

1.3 Señalización de la vía PI3K-AKT-mTOR en el crecimiento y supervivencia celular

La familia de las quinasas denominada PI3K se considera un regulador clave en procesos celulares como supervivencia, crecimiento y diferenciación celular (30). Esta vía de señalización tiene varios nodos importantes que juegan un papel crucial en esta ruta, lo que resulta en una diversidad de resultados funcionales. La activación mediada por AKT de dianas posteriores, incluida la diana de rapamicina en mamíferos (mTOR), estimula la proliferación celular y la regulación de la traducción en respuesta a los factores de crecimiento mediante la fosforilación de la maquinaria de síntesis de proteínas (Figura 1) (31). Esta promoción traduccional por mTOR incluye la fosforilación de la proteína ribosomal S6 quinasas (S6K) y la proteína de unión a 4E 1 (4E-BP1), la última de las cuales da como resultado la liberación del factor de inicio de la traducción eucariótica 4E (eIF4E), que tiene actividades anti-apoptóticas in vitro (32). Estos efectos son contrarrestados por el complejo de esclerosis tuberosa-1 (TSC1) -TSC2, que tiene efectos inhibidores sobre 4E-BP1 y eIF4E (33). AKT también fosforila e inhibe el TSC2, lo que

demuestra la complejidad de esta vía. La rapamicina y sus análogos pueden inhibir el mTOR, pero esto puede conducir a la activación de proteínas como AKT, debido a la pérdida de un mecanismo de retroalimentación (34).

Además, la vía PI3K-AKT interactúa con el complejo mecanismo molecular que controla la energía celular y el metabolismo de la glucosa. AKT fosforila e inhibe la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK3), la fosfodiesterasa-3B, la proteína fosfatasa 2A y el Raf-1. La señalización PI3K también controla el crecimiento, la proliferación, la senescencia y la angiogénesis. Estos procesos están regulados por la activación transcripcional del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la expresión del factor 1 inducible por hipoxia alfa (HIF-1 α) (35).

1.4 Desregulación de la vía PI3K-AKT-mTOR en cáncer

Alteraciones somáticas de los componentes de la vía PI3K en el cáncer.

a) Mutaciones genéticas / pérdida de función.

Se sabe que varias alteraciones genéticas activan la señalización PI3K-AKT, pero la segunda anomalía genética más común encontrada en el cáncer humano es la inactivación del gen supresor de tumores Proteína Inhibidora de Tumores (PTEN). La señalización de PI3K es inhibida por PTEN a través de la desfosforilación de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), que es el producto de señalización de lípidos de los PI3K de clase I (36,37). La gran mayoría de estas mutaciones PTEN son truncamientos de proteínas, mientras que las mutaciones sin sentido también son comunes. La represión transcripcional y el silenciamiento epigenético de PTEN son otros mecanismos observados de inactivación de PTEN (38). Los estudios preclínicos han demostrado que la pérdida heterocigota de PTEN en ratones dio lugar a una neoplasia epitelial múltiple, incluida la próstata, el intestino y la glándula mamaria (39). La eliminación homocigótica de PTEN en el epitelio de

la próstata puede conducir a un carcinoma de próstata agresivo. Se ha demostrado que los cánceres con altas puntuaciones de Gleason en tumores primarios tienden a estar asociados con la pérdida de PTEN en las metástasis (40,41). Más recientemente, Mueller et al. (42) examinaron las vías de señalización que subyacen a la patogénesis de los gliomas pediátricos y evaluaron la activación de la vía PI3K-AKT-mTOR mediante el uso de inmunohistoquímica. Evaluaron las moléculas de p-S6 fosforiladas, p-PRAS40 y PTEN, así como la metilación del promotor PTEN y el índice de marcaje MIB. Encontraron que la mayoría (80%) de los gliomas de alto grado mostraron activación de la vía PI3K-AKT-mTOR y que el 50% tenía metilación del promotor PTEN. El grado tumoral se correlacionó negativamente con la expresión de PTEN y positivamente con los niveles de p-S6 y p-4EBP1. También se observaron tendencias hacia una correlación inversa de la metilación del promotor PTEN con la expresión de la proteína PTEN y una correlación directa de los niveles de p-S6 y p-4EBP1 con resultados clínicos pobres, según lo medido por la supervivencia libre de progresión. Se concluyó que la mayoría de los gliomas pediátricos muestran activación de la vía PI3K-AKT-mTOR, siendo la metilación del promotor PTEN una característica común de estos tumores (43). Las mutaciones de la línea germinal en el gen PTEN pueden provocar la enfermedad de Cowden y el síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba (asociado con macrocefalia, lipomas múltiples y hemangiomas), afecciones que se asocian con un alto riesgo de desarrollo de tumores malignos. A diferencia de otros genes supresores de tumores, como p53, la inactivación bialélica no es necesaria para la supresión de la actividad de PTEN; más bien, la haplo-insuficiencia puede ser suficiente para promover la carcinogénesis. Esto sugiere que la reducción de la expresión de la proteína PTEN sin mutaciones reales puede ser otro mecanismo que conduce al desarrollo del cáncer.

b) Amplificación genética de PIK3CA y AKT1 / 2.

Estudios recientes han demostrado que las mutaciones somáticas en PIK3CA son comunes en una variedad de tumores humanos, incluyendo cáncer de mama, colon, endometrio y glioblastoma (44). Las dos regiones de mutación comunes se agrupan en los exones 9 y 20, que codifican los dominios helicoidal y catalítico de p110 α , respectivamente. También se encuentra un pequeño grupo de mutaciones en el dominio que interactúa con p85 en el extremo N, que puede aumentar la actividad de p110 α . Sin embargo, estas mutaciones no alteran la interacción entre las subunidades p110 α y p85 α (45). Las mutaciones de PIK3CA aumentan la actividad in vitro de PI3K, y la expresión de mutantes p110 α que confiere la activación de AKT en ausencia de estimulación del factor de crecimiento, que a su vez conduce a la oncogénesis. Hasta ahora, no se han identificado otras isoformas mutadas de p110, lo que indica que p110 α alberga el potencial oncogénico principal (46,47).

c) Sobreexpresión de AKT

Existe una creciente evidencia de que diferentes isoformas AKT tienen funciones no superpuestas en el cáncer. Se ha identificado una única sustitución de aminoácidos, E17K, en el dominio PH de unión a lípidos de AKT-1 en diversos tipos de cáncer humano, incluidos los de mama, colorrectal, endometrial y ovárico (44). Se ha observado sobreexpresión de AKT-2 en cáncer colorrectal y metástasis. Se propone que AKT-2 promueve la supervivencia y el crecimiento celular. Se ha observado que la pérdida de AKT-1 promueve la invasión celular y las metástasis, posiblemente al cambiar el equilibrio de la señalización a través de AKT-2 (48).

El hecho de que la vía PI3K - Akt - mTOR responde a vías de señalización conocidas por ser asociado con el Carcinoma Oral de Células Escamosas como TGF- β , WNT/ β -catenina y STAT3 proporciona pruebas adicionales de su papel central en la carcinogénesis (48).

Clark y cols. (2009), evaluaron la inmunexpresión de pmTOR y p4EBP1 en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, mostraron que pmTOR era más sensible y específico para diferenciar tumores benignos de malignos (49).

Clauditz (2013) estudió la expresión de mTOR en tumores de glándulas salivales y observó que la proteína mTOR fosforilada en Ser2448 está presente en un gran subconjunto de tumores de glándulas salivales benignos y malignos. La positividad inmunohistoquímica de mTOR se observó en todos los subtipos de tumores examinados, mientras que el 51% de los casos de adenoma de glándula salival y 47% de los casos de carcinoma de glándula salival fueron positivos, lo que sugiere que la vía de AKT / mTOR puede tener relevancia funcional en los tumores de glándula salival (50).

Prodomidis y cols. (2013), estudiaron la presencia de pmTOR, pAKT, y pS6 en liquen plano oral, en comparación con carcinoma oral de células escamosas, displasia epitelial oral y mucosa normal; encontraron un mayor porcentaje de casos positivos de displasia epitelial oral para pmTOR, correspondiendo al 63.2% (51).

Martins y cols. (2016) realizaron un análisis inmunohistoquímico para pAKT, pmTOR, pS6, y p4EBP1 en displasias epiteliales orales, carcinoma oral de células escamosas y tejidos epiteliales no displásicos y encontraron una evidente inmunexpresión de las proteínas pAKTy pmTOR en displasias epiteliales y carcinoma oral de células escamosas en comparación con los tejidos no displásicos, lo cual fue asociado significativamente con el proceso de carcinogénesis de la mucosa oral, ya que la pAKT fosforila directamente a proteínas implicadas en la modulación del ciclo y la muerte celular (52).

Ferreia y cols. (2017) hicieron el primer informe sobre la expresión de PI3K / AKT de carcinoma oral de células escamosas en encía, paladar duro y cresta alveolar, y observaron una alta frecuencia de tinción positiva para PI3K, p-AKT, p-mTOR y p-MAPK. Sin embargo, la mayoría de los casos mostraron una pérdida de expresión del gen supresor tumoral PTEN, lo que sugiere que la activación de la

vía PI3K / AKT se produjo después de la PTEN. La expresión nuclear de p-mTOR se relacionó significativamente con la supervivencia general, y la translocación nuclear de mTOR tiene un papel importante en la activación de su señalización citoplásmica. Sin embargo, el mecanismo de transporte nuclear de mTOR y la función de mTOR nuclear siguen sin estar claros. Ferreira concluyó que pmTOR puede funcionar como un biomarcador de supervivencia en los carcinomas de células escamosas orales y podría ser un objetivo terapéutico prometedor para este tipo de lesiones (53).

Marco teórico

2. Trastornos potencialmente malignos

Los trastornos potencialmente malignos son todos aquellos tejidos de morfología alterada más propensos a malignizarse que los tejidos equivalentes de aspecto normal (54). Entre los trastornos potencialmente malignos destaca por su prevalencia la displasia epitelial oral ya que muestra un mayor potencial para progresar hacia carcinoma oral de células escamosas que el tejido epitelial normal (55). Con el objetivo de intentar asignar un factor pronóstico a las displasias epiteliales orales, la OMS propuso una clasificación de las displasias epiteliales orales basada en criterios histopatológicos que las clasifican en displasia leve, moderado y severo (56, 57), proponiéndose que la displasia epitelial oral severa posea el mayor potencial de malignización.

2.1 Displasia epitelial oral

La displasia epitelial oral es una lesión potencialmente maligna que se caracteriza por cambios morfológicos en el epitelio y se define como una lesión del epitelio escamoso estratificado caracterizado por atipia celular y la pérdida de la maduración normal de las células, así como la pérdida de la estratificación del epitelio oral. (58)

Pindborg en su trabajo de "Cáncer y Precáncer Bucal" expuso el listado de características o parámetros que debían ser valoradas para el diagnóstico de la displasia epitelial oral (59):

Arquitectura	Citología
Estratificación irregular	Variación en el tamaño nuclear
Pérdida de la polaridad	Variación en la forma nuclear (pleomorfismo nuclear)
Crestas epiteliales bulbosas	Variación en el tamaño celular
Incremento de figuras mitóticas	Variación en la forma celular (pleomorfismo celular)
Mitosis anormales superficiales	Incremento del radio núcleo-citoplasmático
Queratinización de las células	Incremento en el tamaño nuclear
Perlas de queratina	Figuras mitóticas atípicas
	Incremento en el número de nucleólos
	Hipercromatismo

Tabla n.1 Parámetros de diagnóstico de las displasias epiteliales orales

2.2 Clasificación de la displasia epitelial oral

Clasificación de Smith y Pindborg (60)

El primer intento de estandarizar la clasificación de las displasias fue hecha por Smith y Pindborg en el año 1969. Este sistema se basó en el análisis imágenes con diferentes cambios histológicos. Se asignaron 13 características histológicas y se calificó a la displasia epitelial oral como ausente, ligeramente o marcado y le dio una puntuación de 0 a 75 (Tabla 2).

Tipo de cambio	Gravedad de la displasia		
	Ninguna	Ligera	Marcada
Crestas epiteliales en forma de gota	Ninguna	Ligera	Marcada
Estratificación epitelial irregular	Ninguna	Ligera	Marcada
Queratinización de las células debajo de la capa queratinizada	Ninguna	Ligera	Marcada
Hiperplasia de células basales	Ninguna	Ligera	Marcada
Pérdida de adherencia intercelular	Ninguna	Ligera	Marcada
Pérdida de polaridad	Ninguna	Ligera	Marcada
Núcleos hipercromáticos	Ninguna	Ligera	Marcada
Aumento de la relación nuclear-citoplásmica en capa basal y espinosa	Ninguna	Ligeramente incrementada	Marcada incrementada
Anisocitosis y Anisonucleosis	Ninguna	Ligera	Marcada
Células y núcleos pleomórficos	Ninguna	Ligera	Marcada
Actividad mitótica normal	Normal	Ligeramente incrementada	Marcada incrementada
Nivel de actividad mitótica	Ninguna	Ligera	Marcada
Presencia de mitosis bizarras	Ninguna	Ligera	Marcada

Tabla n 2. Características histológicas de acuerdo a la clasificación de Pindborg

Puntuaje

0-10	No displásico
11-25	Displasia leve
26-45	Displasia moderada
Por encima de 45	Displasia severa

Tabla n 3. Puntuaje establecido para determinar el tipo de displasia

Clasificación clásica.

Para la clasificación de las displasias epiteliales orales, clásicamente se ha realizado siguiendo el modelo inicialmente propuesto para el cérvix uterino en: leve, moderada y severa (61).

*Displasia leve.

Se caracteriza por la alteración del epitelio bucal solo en el tercio inferior, acompañada por una atipia celular mínima.

*Displasia moderada

La alteración arquitectónica se extiende hacia el tercio medio del epitelio, seguido de atipia celular. Sin embargo, la presencia de atipia marcada puede indicar que una lesión debe categorizarse como displasia grave a pesar de no extenderse hacia el tercio superior del epitelio.

*Displasia severa

Se caracteriza por la presencia de alteración del epitelio en más de dos tercios, sin embargo, no llega a sobrepasar la membrana basal, es decir no hay invasión de la membrana, como en el carcinoma in situ.

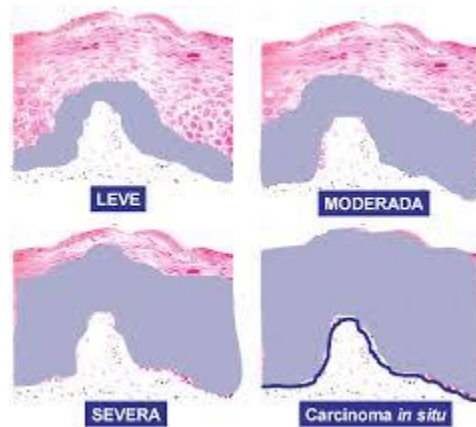


Fig 5. Clasificación de las displasias de acuerdo al espesor del epitelio afectado

Clasificación de la OMS, 2005 (62).

En el año 2003, la OMS clasificó a la displasia epitelial oral como leve, moderada, severa y carcinoma in situ según la presencia y severidad de la atipia celular y las características arquitectónicas.

Características arquitectónicas

- Estratificación epitelial irregular

- Pérdida de polaridad de las células basales

- Cresta en forma de gota

- Mayor número de figuras mitóticas

- Mitosis anormales superficiales

- Perlas de queratina dentro de los clavos epiteliales.

Características celulares

- Anisonucleosis

- Anisocitosis

- Pleomorfismo nuclear

- Pleomorfismo celular

- Aumento de la relación nuclear-citoplasmática

- Disqueratosis

- Figuras mitóticas atípicas

- Mayor número y tamaño de nucleolos

1. Displasia leve: cambios arquitectónicos limitados a el tercio inferior del epitelio junto con atipia celular.

2. Displasia moderada: cambios arquitectónicos que se extienden a el tercio medio del epitelio. Grado de atipia celular.

3. Displasia severa: más de 2/3 del epitelio exhibe alteraciones arquitectónicas y el aumento de número de la atipia celular es evidente.

4. Carcinoma in situ: espesor total del epitelio afectado. Exhibe alteraciones arquitectónicas anormales y se observan mitosis superficiales y figuras atípicas (63).

Clasificación binaria.

Debido a que existe un poco de conflicto en la valoración de las displasias consideradas como moderadas, Kujan y cols. realizaron una valoración de los parámetros de la OMS para la displasia epitelial oral, definiendo dos tipos de displasias. Una de "Bajo Riesgo" para aquellas lesiones displásicas que presentan menos de 4 datos arquitecturales y menos de 5 citológicos y otra de "Alto Riesgo" para las lesiones displásicas que presentaban más de 4 datos arquitecturales y más de 5 citológicos. Analizando esto, observaron que únicamente el 15,1% de las lesiones de bajo riesgo se transformaron en un carcinoma oral de células escamosas frente al 80% en las de alto riesgo, por lo que esta clasificación es más conveniente de utilizar para poder determinar junto con estudios complementarios, la probabilidad de que las displasias epiteliales de alto riesgo tengan el potencial de malignizarse (64).



Fig 6. Comparación de la clasificación de la OMS y el sistema binario.

CAPÍTULO 2

Planteamiento del problema

A pesar de que la displasia epitelial oral es considerada como una lesión potencialmente maligna, a la fecha es prácticamente imposible identificar con certeza, ya sea clínica o histopatológicamente, cual lesión, en que paciente y bajo qué circunstancias va a progresar hacia carcinoma oral de células escamosas. Se ha propuesto que las displasias epiteliales clasificadas como severas tendrán una mayor probabilidad de progresar hacia cáncer oral. Sin embargo, los parámetros para clasificar las displasias epiteliales orales histopatológicamente tienen un fuerte componente subjetivo por parte del observador lo que disminuye su certeza. Se han llevado a cabo diversos estudios sobre la inmunexpresión de diversas proteínas en lesiones malignas como lo es p53, p63, p21, p16, ciclina D1, COX-2, factor de crecimiento epidérmico (EGFR), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), CD44 y e-cadherina, los cuales son las más estudiadas, sin embargo la utilidad de proteínas que regulan y promueven la proliferación celular como marcadores de riesgo a malignidad todavía falta por estudiarse más a profundidad, por lo que la necesidad de contar con el uso de biomarcadores en lesiones premalignas como las displasias epiteliales orales se hace evidente (65,66). Las proteínas de vías de señalización celular involucradas en el control del ciclo así como durante la proliferación, maduración y adhesión celular parecen ser candidatas idóneas como posibles biomarcadores. Por lo cual se propone la siguiente pregunta de investigación: ¿la inmunexpresión de proteínas de la vía de señalización PI3K-Akt-mTOR puede ser útil como potencial biomarcador de malignidad en las displasias epiteliales orales?

Justificación

El cáncer oral ocupa la octava posición de mayor frecuencia de toda la economía corporal, además de que en las últimas décadas se ha documentado un incremento en los casos de cáncer oral, específicamente carcinoma oral de células escamosas. A pesar de su accesibilidad clínica, la mayoría de los casos son diagnosticados en etapas avanzadas por lo que el cáncer oral se sitúa dentro de los 5 tipos de cáncer con mayor índice de mortandad. Debido a que algunos de los carcinomas orales de células escamosas proceden de displasias epiteliales orales, se hace indispensable identificar cuáles de estos casos progresará a carcinoma oral de células escamosas. Numerosos estudios han sido publicados sobre lesiones de la cavidad bucal, mostrando la expresión de diversas proteínas que regulan el ciclo celular y promueven la proliferación celular, sin embargo, se requieren más informes sobre el estudio de la expresión inmunohistoquímica de proteínas que promueven la proliferación celular en lesiones premalignas de la cavidad bucal. Por lo que contar con una herramienta confiable de inmunoexpresión de proteínas como PI3K-Akt-mTOR en displasias epiteliales orales, coadyuvará a un diagnóstico precoz y por lo tanto a un tratamiento temprano que indudablemente incrementará la posibilidad de éxito terapéutico, así como la calidad de vida de los pacientes y, eventualmente, disminuir el índice de mortandad asociado directamente a carcinoma oral de células escamosas.

Hipótesis

El índice de inmunexpresión de PI3K, Akt y mTOR será mayor en displasias epiteliales orales de alto riesgo que en displasias epiteliales orales de bajo riesgo; así mismo el nivel de Inmunexpresión de las displasias epiteliales orales catalogadas como de alto riesgo será similar al índice de inmunexpresión de estas proteínas observadas en carcinomas orales de células escamosas.

Objetivos

General.

* Determinar el índice de inmunexpresión de PI3K, Akt y mTOR en casos de displasias epiteliales orales de alto riesgo y compararlo con aquel encontrado en casos de displasias epiteliales orales de bajo riesgo; así como en con casos de carcinomas orales de células escamosas.

Específicos.

* Observar y clasificar histopatológicamente los casos de displasia epitelial oral.

* Determinar el nivel de inmunexpresión de PI3K, Akt y mTOR en displasias epiteliales orales de alto y bajo riesgo.

* Determinar el nivel de inmunexpresión de PI3K, Akt y mTOR en carcinoma oral de células escamosas.

* Determinar el nivel de inmunexpresión de PI3K, Akt y mTOR en mucosa oral normal.

*Comparar los niveles de inmunexpresión de cada una de las moléculas PI3K, Akt y mTOR obtenidos de los diferentes grupos de estudio.

Tipo de estudio: transversal, retrospectivo, observacional, descriptivo y comparativo.

Criterios de inclusión:

*Muestras con el suficiente material biológico embebido en parafina, así como cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina.

*Muestras correspondientes a displasias epiteliales orales, carcinoma oral de células escamosas y mucosa oral normal (sin importar edad, género y localización).

Criterios de exclusión:

Muestras con conflicto de diagnóstico interobservador al igual que aquellos en los que no se confirmó el diagnóstico serán descartados del estudio.

Criterios de eliminación:

Todos aquellos casos que durante su procesamiento sufrieron daño o pérdida que impidieron su estudio.

Variables:

Dependientes: inmunoreactividad de las células de las proteínas PI3K, AKT, mTOR.

Independientes: grado de riesgo de la displasia epitelial oral, edad, género.

Variables dependientes

Variable	Definición	Definición operacional	Tipo	Escala y unidad de medición
PI3K	Proteína de la familia de las quinasas	Se determinará la presencia o ausencia de inmunexpresión por el pigmento café en las células	Cualitativa	Nominal Intensidad 0=negativo 1=débil 2=moderado 3=fuerte
			Cuantitativa	De razón n.células positivas 0=0% 1=1-10% 2=11-30% 3=31-50% 4=51-80% 5=81-100%
AKT	Proteína de la familia de las quinasas	Se determinará la presencia o ausencia de inmunexpresión por el pigmento café en las células	Cualitativa	Nominal Intensidad 0=negativo 1=débil 2=moderado 3=fuerte
			Cuantitativa	De razón n.células positivas 0=0% 1=1-10% 2=11-30% 3=31-50% 4=51-80% 5=81-100%
mTOR	Proteína de la familia de las quinasas	Se determinará la presencia o ausencia de inmunexpresión por el pigmento café en las células	Cualitativa	Nominal Intensidad 0=negativo 1=débil 2=moderado 3=fuerte
			Cuantitativa	De razón n.células positivas 0=0% 1=1-10% 2=11-30% 3=31-50% 4=51-80% 5=81-100%

Variables independientes

Variable	Definición	Definición operacional	Tipo	Escala y unidad de medición
Grado de displasia epitelial oral	Clasificación de las displasias orales basada en criterios histopatológicos	Se utilizará el método de gradificación propuesta por Kujan y cols (alto y bajo riesgo)	Cualitativa	Nominal (alto y bajo riesgo)
Edad	Años que tiene la persona desde la fecha de nacimiento hasta el momento de la historia clínica	Registrado en la historia clínica	Cuantitativa discreta	Razón, en años
Género	Término de biología que denota el sexo masculino o bien al femenino	Registrado en la historia clínica	Cualitativa	Nominal, Masculino o Femenino

CAPÍTULO 3

Metodología

I. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS.

Para el presente proyecto se utilizaron 20 muestras por cada grupo de estudio, teniendo contemplado el estudio de 4 grupos: Displasia epitelial oral de bajo riesgo; displasia epitelial oral de alto riesgo; carcinoma oral de células escamosas y mucosa oral normal. Se obtuvieron las muestras, de los expedientes del archivo del Departamento de Patología y Medicinal Bucal de la División de Estudios de Posgrados e Investigación de la F.O. UNAM; así como del Laboratorio de Diagnóstico en Patología Oral y Maxilofacial de la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León, UNAM; se identificaron, en el período de tiempo comprendido de enero de 2004 a diciembre de 2016 en el caso del servicio de diagnóstico Histopatológico de la Facultad de Odontología, UNAM, y de enero de 2012 a diciembre de 2016 para el caso del Laboratorio de Diagnóstico en Patología Oral y Maxilofacial de la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León, UNAM de todos los casos con diagnóstico correspondiente a los grupos de estudio. Para las muestras de mucosa normal se identificaron casos de lesiones no-epiteliales que presentaron suficiente cantidad de epitelio como para ser estudiado (e.g. Mucocele, hiperplasia).

II. VALORACIÓN DE LOS ESPECÍMENES INCLUIDOS EN PARAFINA

Se valoraron los especímenes para ser incluidos en el presente estudio, tomando en cuenta los siguientes criterios: muestras que tuvieron el suficiente material biológico embebido en parafina, así como cortes histológicos teñidos con Hematoxilina y Eosina. Así mismo muestras que correspondieron a displasias epiteliales orales, carcinoma oral de células escamosas y mucosa oral normal.

III. OBTENCIÓN DE DATOS DE LAS MUESTRAS.

De los expedientes clínicos de los pacientes se obtuvieron los siguientes datos: Edad, género y localización de la lesión, y se construyó una base con los datos obtenidos.

IV. VALORACIÓN DE LAS MUESTRAS POR MEDIO DE MICROSCOPIA DE LUZ.

Los casos seleccionados fueron evaluados y re-diagnosticados por 2 expertos en Patología Oral con el fin de confirmar el diagnóstico, éstos fueron observados bajo el microscopio de luz, para clasificación de los tejidos siguiendo la clasificación binaria propuesta por Kujan y cols. (64)

La clasificación se basó en los parámetros de la arquitectura y citología del epitelio oral, previamente ya descritos. Los casos con conflicto de diagnóstico interobservador al igual que aquellos en los que no se confirmó el diagnóstico fueron descartados del estudio.

Para establecer un nivel de concordancia interobservador se realizó una prueba Kappa, considerándose un valor kappa de 0.85 como confiable.

V. INMUNOHISTOQUÍMICA.

Para la realización de la técnica de inmunohistoquímica, se realizaron cortes adicionales de 4 μm a todos los especímenes incluidos en parafina. Se utilizaron anticuerpos monoclonales anti- PI3K; anti-AKT y anti-mTOR (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). La técnica de inmunohistoquímica se desarrolló de forma convencional (ver Anexo 2)

VI. OBTENCIÓN DE LAS MICROFOTOGRAFÍAS DE LOS CORTES HISTOLÓGICOS Y CONTEO CELULAR .

Se analizaron las laminillas por parte de los 3 observadores, y se obtuvieron tres imágenes de cada laminilla a un aumento de 40X, y se posteriormente se obtuvo el conteo celular siguiendo el método propuesto por el Dr. Ronell Bologna, el cual consistió en los siguientes pasos: primero se obtuvieron las imágenes a analizar a un aumento de 40x por medio del fotomicroscopio óptico, se abrieron los archivos en diapositivas del programa Microsoft Office Power Point (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EE.UU.) y con la función "tabla", se colocó una cuadrícula de 6x6 sobre la imagen, y se realizó el conteo empezando desde la celda superior izquierda y siguiendo un patrón en espiral hacia el centro; finalmente se determinó el porcentaje de las células inmunoexpresadas, dividiendo el número células teñidas entre el número total de células.

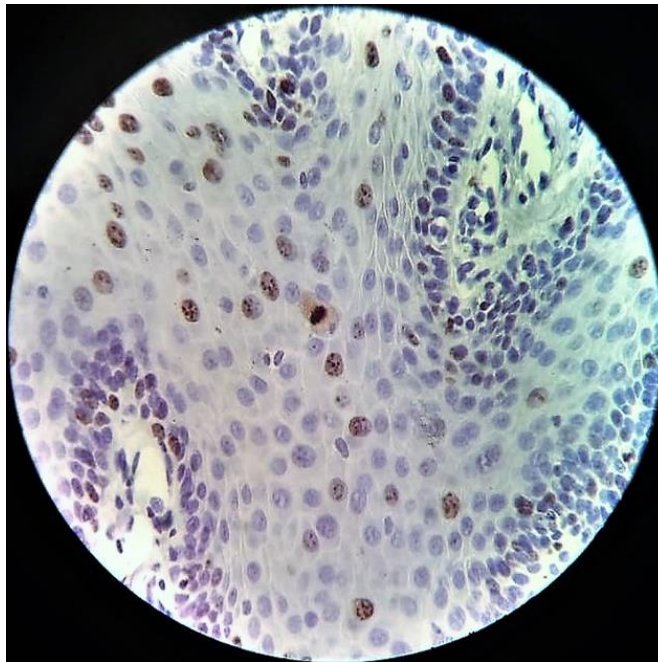


Fig. 7. Imagen de 40x (inmunopositividad del anticuerpo AKT)

VII. OBTENCIÓN DEL ÍNDICE DE INMUNOREACTIVIDAD.

Para la determinación de la inmunorreactividad de las muestras, se obtuvo siguiendo el método propuesto y modificada por Rodrigo, JP y colaboradores. En resumen, se realizó el conteo celular de cada una de las laminillas para poder obtener un porcentaje de cada una de las imágenes y posteriormente obtener un porcentaje del promedio de las células teñidas de los 3 campos obtenidos. Ya teniendo los porcentajes, se va obtener una puntuación que va de 0 a 5; 0 para cuando no existe inmunoexpresión, 1 que representa del 1% al 10% de células teñidas, 2 del 11% al 30%, 3 para 31% al 50%, 4 para el 51% al 80%. y 5 del 81% al 100% de las células que fueron positivas. La intensidad de la tinción se clasificó en una escala de 0 a 3 (0 = negativo, 1 = débil, 2 = moderado y 3 = fuerte). Después para el cálculo del índice de inmunoreactividad, los datos de la puntuación inmunorreactiva se multiplicaron por las puntuaciones de intensidad de tinción. De tal manera que la puntuación mínima posible era 0, mientras que la puntuación máxima era 15; las puntuaciones por encima de 7 se consideraron de alta reactividad y de 0 a 6 débiles (67).

Con los datos obtenidos se construyó una base de datos ex profeso. Se determinó las medidas de tendencia central del índice de inmunoreactividad para posteriormente establecer posibles asociaciones entre inmunoexpresión de anticuerpos PI3, anti-Akt y anti-mTOR con algún o algunos grupos de estudio, utilizando para tal fin prueba estadística Chi-cuadrada con un nivel de confiabilidad del 95% ($p < 0.05$).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

Descripción de los datos demográficos de los grupos:

Control: el grupo control estuvo formado por 13 muestras provenientes de 7 mujeres (promedio de edad 57.8 años) y 6 varones (promedio de edad de 37.5 años). El promedio de edad del total del grupo es de 48.4 años con un rango de 5-87 años.

Las muestras provinieron de las siguientes áreas: mucosa yugal 7 casos (53.8%), reborde alveolar 3 casos (23.1%) y paladar, encía y lengua 1 caso cada uno.

Displasias: el grupo de displasias estuvo formado por 24 muestras provenientes de 13 mujeres (promedio de edad de 46.7 años) y 11 varones (promedio de edad de 51.0 años). El promedio de edad del total del grupo es de 48.7 años \pm 17.9 y un rango de 22-86 años.

Con respecto a la localización, los casos se distribuyeron de la siguiente manera:

Lengua con 8 casos (33.3%), mucosa yugal y mucosa labial 4 casos cada uno (16.7% cada uno), encía y reborde alveolar 3 casos cada uno (12.5% cada uno), y zona retromolar con 1 caso (4.2%). En un caso no fue posible identificar la localización de origen.

Carcinoma oral de células escamosas: el grupo de carcinoma oral de células escamosas estuvo formado por 12 casos, 7 mujeres (promedio de edad de 67.1 años) y 5 varones (promedio de edad de 77.8 años). El promedio de edad del grupo fue de 71.5 años \pm 14.9, con un rango de 50-89 años.

Con respecto a la localización, los casos correspondieron a:

Lengua 5 casos (41.7%), paladar, encía y reborde alveolar con 2 casos cada uno (16.7% cada uno), y 1 caso en mucosa yugal (8.3%).

SEXO

GRUPO DE ESTUDIO		Frecuencia	Porcentaje
CONTROL	FEMENINO	7	53.8
	MASCULINO	6	46.2
	Total	13	100.0
DISPLASIA	FEMENINO	13	54.2
	MASCULINO	11	45.8
	Total	24	100.0
COCE	FEMENINO	7	58.3
	MASCULINO	5	41.7
	Total	12	100.0

Tabla n 4. Distribución del sexo en los grupos de estudio

EDAD

GRUPO DE ESTUDIO		N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
CONTROL	EDAD	13	5	87	48.46	24.919
		13				
DISPLASIA	EDAD	24	22	86	48.75	17.979
		24				
COCE	EDAD	12	50	89	71.58	14.963
		12				

Tabla n 5. Distribución de edad en los grupos de estudio

LOCALIZACIÓN

GRUPO DE ESTUDIO	Frecuencia	Porcentaje	
CONTROL	PALADAR	1	7.7
	MUCOSA YUGAL	7	53.8
	ENCÍA	1	7.7
	LENGUA	1	7.7
	REBORDE	3	23.1
	ALVEOLAR		
	Total	13	100.0
DISPLASIA	MUCOSA YUGAL	4	16.7
	ENCÍA	3	12.5
	LENGUA	8	33.3
	REBORDE	3	12.5
	ALVEOLAR		
	ZONA	1	4.2
	RETROMOLAR		
	MUCOSA LABIAL	4	16.7
	NO	1	4.2
	ESPECIFICADO		
Total	24	100.0	
COCE	PALADAR	2	16.7
	MUCOSA YUGAL	1	8.3
	ENCÍA	2	16.7
	LENGUA	5	41.7
	REBORDE	2	16.7
	ALVEOLAR		
Total	12	100.0	

Tabla n 6. Distribución de la localización en los grupos de estudio

Descripción histopatológica y gradificación de las displasias epiteliales.

Se analizaron los datos citológicos y citoarquitectónicos, y se obtuvieron los siguientes resultados:

Se gradificaron 12 casos como de bajo riesgo y 12 casos como alto riesgo. Los parámetros más frecuentemente identificados fueron: en el caso de las displasias de bajo riesgo: pérdida de la estratificación con 9 casos (75%), pleomorfismo celular identificado en 5 casos (41.7%), nucleólos prominente en 7 casos (58.3%), e hiper cromatismo nuclear en 11 casos (91.7%).

En el caso de las displasias de alto riesgo, los parámetros citológicos y citoarquitectónicos más frecuentemente identificados fueron: pérdida de la estratificación en el 100%, clavos epiteliales bulbosos en 11 casos (91.7%), pleomorfismo celular en 10 casos (83.3%), pleomorfismo nuclear en 11 casos (91.7%), mitosis atípicas en 9 casos (75%), nucleólos prominente en 10 casos (83.3%), e hiper cromatismo en 100% de los casos

VARIABLE	BAJO	ALTO
CITOLÓGICA/CITOARQUITECTÓNICA	RIESGO	RIESGO
PÉRDIDA DE LA ESTRATIFICACIÓN	9 (75%)	12 (100%)
CLAVOS EPITELIALES BULBOSOS	7 (58.3%)	11 (91.7%)
PLEOMORFISMO CELULAR	5 (41.7)	10 (83.3%)
PLEOMORFISMO NUCLEAR	4 (33.3%)	11 (91.7%)
MITÓISIS AUMENTADAS	1	6

	(8.3%)	(50%)
MITÓSIS ATÍPICAS	4 (33%)	9 (75%)
NUCLEÓLOS PROMINENTES	7 (58.3%)	10 (83.3%)
HIPERCROMATISMO	11 (91.7%)	12 (100%)
PÉRDIDA DE LA POLARIDAD	0	2 (16.7%)
QUERATINIZACIÓN	3 (25%)	6 (50%)

Tabla n 7. Distribución de los parámetros cito-arquitectónicos en las displasias epiteliales orales

Microfotografías de la inmunoreactividad de los anticuerpos

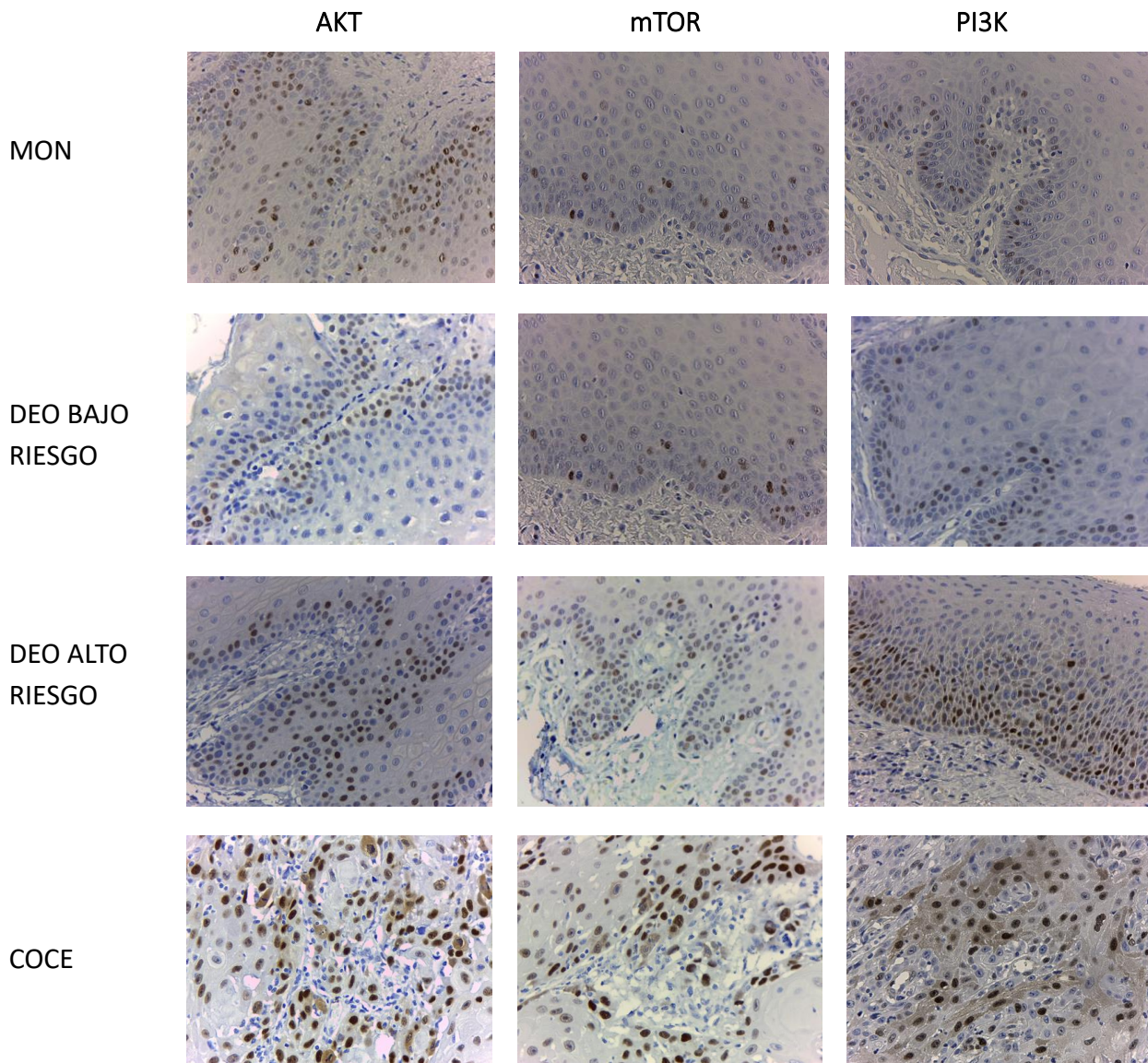


Fig. 8. Microfotografías a 40X aumentos, donde se observa positividad a los anticuerpos AKT, mTOR y PI3K en los grupos de estudio de mucosa oral normal (MON), displasia epitelial de bajo riesgo (DEO BAJO RIESGO), displasia epitelial de alto riesgo (DEO ALTO RIESGO) y carcinoma oral de células escamosas (COCE).

Descripción- resultados de inmunoreactividad de los anticuerpos

Debido a razones técnicas (cantidad suficiente de material biológico, pérdidas durante el procesamiento, entre otras), para el análisis inmunohistoquímico se procesaron 12 muestras de displasias de alto y de bajo grado. Debido a que el objetivo principal del proyecto fue determinar la posible utilidad de un biomarcador de progresión a malignidad se decidió aparear por número tanto el grupo displasias epiteliales de bajo y alto riesgo, así como el grupo COCE. Por lo anterior se quedaron conformados los grupos en 12 muestras.

Se obtuvieron 3 laminillas con 2 cortes cada uno por caso por anticuerpo, por lo que se obtuvieron, procesaron, observaron y analizaron 864 cortes.

ANTICUERPO AKT

Control AKT.

El 53.8% de los casos tuvo una inmunoreactividad de negativa (7 casos), por lo que el índice de inmunoreactividad obtenido para el anticuerpo AKT en el grupo control fue de cero en la mayoría de los casos (53.8%). De tal forma y siguiendo la fórmula propuesta en los materiales y métodos, el índice de inmunoreactividad para AKT en el grupo control fue débil en el 100% de los casos.

Displasias AKT.

El 70.8% de los casos (17casos) tuvo un SCORE de inmunoreactividad de dos, mientras que la intensidad de inmunoexpresión fue moderada en el 54.2% de los casos (13 casos), por lo que el índice de inmunoreactividad obtenido para el anticuerpo AKT en el grupo de displasias fue de 4 en la mayoría de los casos (10 casos) (41.7%). El índice de inmunoreactividad para AKT en el grupo de displasias fue Débil en el 100% de los casos.

***Displasias de bajo riesgo AKT**

El 58.3% de los casos (7 casos) tuvo un SCORE de inmunoreactividad de dos, mientras que la intensidad de inmunoexpresión fue moderada en el 50% de los casos (6 casos), por lo que el índice de inmunoreactividad obtenido para el anticuerpo AKT en el grupo de displasias de bajo riesgo fue de 4 en la mayoría de los casos (5 casos) (41.7%). El índice de inmunoreactividad para AKT en el grupo de displasias fue Débil en el 100% de los casos.

***Displasias de alto riesgo AKT**

El 83.3% de los casos (10 casos) tuvo un SCORE de inmunoreactividad de dos, mientras que la intensidad de inmunoexpresión fue moderada en el 58.3% de los casos (7 casos), por lo que el índice de inmunoreactividad obtenido para el anticuerpo AKT en el grupo de displasias de alto riesgo fue de 5 y 6 en la mayoría de los casos (5 casos cada uno) (83.4% total). El índice de inmunoreactividad para AKT en el grupo de displasias fue Débil en el 100% de los casos.

Carcinoma oral de células escamosas AKT.

El 58.3% de los casos (7 casos) tuvo un SCORE de inmunoreactividad de cuatro, mientras que la intensidad de inmunoexpresión fue intensa en el 66.7% de los casos (8 casos), por lo que el índice de inmunoreactividad obtenido para el anticuerpo AKT en el grupo de COCE fue de 12 en la mayoría de los casos (6 casos) (50%). El índice de inmunoreactividad para AKT en el grupo de displasias fue Alto en el 75% (9 casos).

GRUPO DE ESTUDIO		CONTROL	DISPLASIA BAJO RIESGO	DISPLASIA ALTO RIESGO	COCE	Total
AKT SCORE	0%	7	2	1	1	11
		53.8%	16.7%	8.3%	8.3%	22.4%
	1-10%	1	1	1	0	3
		7.7%	8.3%	8.3%	0.0%	6.1%
	11-30%	5	7	10	1	23
		38.5%	58.3%	83.3%	8.3%	46.9%
	31-50%	0	1	0	2	3
		0.0%	8.3%	0.0%	16.7%	6.1%
	51-80%	0	1	0	7	8
		0.0%	8.3%	0.0%	58.3%	16.3%
81-100%	0	0	0	1	1	
	0.0%	0.0%	0.0%	8.3%	2.0%	
Total		13	12	12	12	49
		100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla n 8. Distribución del SCORE del anticuerpo AKT en los grupos de estudio

GRUPO DE ESTUDIO		CONTROL	DISPLASIA BAJO RIESGO	DISPLASIA ALTO RIESGO	COCE	Total	
AKT INTENSIDAD	NEGATIVO	7	2	1	1	11	
		53.8%	16.7%	8.3%	8.3%	22.4%	
	LEVE	4	3	0	0	7	
		30.8%	25.0%	0.0%	0.0%	14.3%	
	MODERADO	2	6	7	3	18	
		15.4%	50.0%	58.3%	25.0%	36.7%	
	INTENSO	0	1	4	8	13	
		0.0%	8.3%	33.3%	66.7%	26.5%	
	Total		13	12	12	12	49
			100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla n 9. Distribución de la intensidad de AKT en los grupos de estudio

GRUPO DE ESTUDIO		CONTROL	DISPLASIA BAJO RIESGO	DISPLASIA ALTO RIESGO	COCE	Total
AKT INMUNOREACTIVIDAD	DÉBIL	13	12	12	3	40
		100.0%	100.0%	100.0%	25.0%	81.6%
	ALTO	0	0	0	9	9
		0.0%	0.0%	0.0%	75.0%	18.4%
Total		13	12	12	12	49
		100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla n 10. Distribución de la inmunoreactividad de AKT en los grupos de estudio

ANTICUERPO mTOR

Control mTOR

El 46.2% de los casos (6 casos) tuvo un SCORE de inmunoreactividad de cero, mientras que la intensidad de inmunoexpresión fue negativo en el 46.2% de los casos (6 casos), por lo que el índice de inmunoreactividad obtenido para el anticuerpo AKT en el grupo de control fue de cero en la mayoría de los casos (6 casos) (46.2%). El índice de inmunoreactividad para AKT en el grupo de displasias fue Débil en el 100% (13 casos).

Displasias mTOR.

El 45.8% de los casos (11 casos) tuvo un SCORE de inmunoreactividad de dos, mientras que la intensidad de inmunoexpresión fue moderada en el 41.7% de los casos (10 casos), por lo que el índice de inmunoreactividad obtenido para el anticuerpo mTOR en el grupo de displasias fue de 2 en la mayoría de los casos (11 casos) (45.8%). El índice de inmunoreactividad para mTOR en el grupo de displasias fue Débil en el 100% de los casos.

***Displasias de bajo riesgo mTOR**

El 41.7% de los casos (5 casos) tuvo un SCORE de inmunoreactividad de dos, mientras que la intensidad de inmunoexpresión fue moderada en el 58.3% de los casos (7 casos), por lo que el índice de inmunoreactividad obtenido para el anticuerpo mTOR en el grupo de displasias de bajo riesgo fue de 2 en la mayoría de los casos (5 casos) (41.7%). El índice de inmunoreactividad para AKT en el grupo de displasias fue Débil en el 100% de los casos.

***Displasias de alto riesgo mTOR**

El 50% de los casos (6 casos) tuvo un SCORE de inmunoreactividad de dos, mientras que la intensidad de inmunoexpresión fue LEVE en el 41.7% de los casos (5 casos), por lo que el índice de inmunoreactividad obtenido para el anticuerpo mTOR en el grupo de displasias de alto riesgo fue de 2 en la mayoría de los casos (6 casos cada uno) (50% total). El índice de inmunoreactividad para mTOR en el grupo de displasias fue Débil en el 100% de los casos.

COCE mTOR

El 58.3% de los casos (7 casos) tuvo un SCORE de inmunoreactividad de dos, mientras que la intensidad de inmunoexpresión fue moderado e intenso con 4 casos cada uno en el 66.6% entre los dos , por lo que el índice de inmunoreactividad obtenido para el anticuerpo mTOR en el grupo de COCE fue de 4 en la mayoría de los casos (3 casos) (25%). El índice de inmunoreactividad para mTOR en el grupo de displasias fue Débil en el 75% y alto en el 25%.

GRUPO DE ESTUDIO		CONTROL	DISPLASIA BAJO RIESGO	DISPLASIA ALTO RIESGO	COCE	Total
MTOR SCORE	0%	6	3	2	1	12
		46.2%	25.0%	16.7%	8.3%	24.5%
	1-10%	5	3	4	0	12
		38.5%	25.0%	33.3%	0.0%	24.5%
	11-30%	2	5	6	7	20
		15.4%	41.7%	50.0%	58.3%	40.8%
	31-50%	0	1	0	2	3
		0.0%	8.3%	0.0%	16.7%	6.1%
51-80%	0	0	0	2	2	
	0.0%	0.0%	0.0%	16.7%	4.1%	
Total		13	12	12	12	49
		100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla n 11. Distribución del SCORE de mTOR en los grupos de estudio

GRUPO DE ESTUDIO		CONTROL	DISPLASIA BAJO RIESGO	DISPLASIA ALTO RIESGO	COCE	Total
MTOR INTENSIDAD	NEGATIVO	6	3	2	1	12
		46.2%	25.0%	16.7%	8.3%	24.5%
	LEVE	5	2	5	3	15
		38.5%	16.7%	41.7%	25.0%	30.6%
	MODERADO	2	7	3	4	16
		15.4%	58.3%	25.0%	33.3%	32.7%
	INTENSO	0	0	2	4	6
		0.0%	0.0%	16.7%	33.3%	12.2%
Total		13	12	12	12	49
		100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla n 12. Distribución de la intensidad de mTOR en los grupos de estudio

GRUPO DE ESTUDIO		CONTROL	DISPLASIA BAJO RIESGO	DISPLASIA ALTO RIESGO	COCE	Total
MTOR INMUNOREACTIVIDAD	DÉBIL	13	12	12	9	46
		100.0%	100.0%	100.0%	75.0%	93.9%
	ALTO	0	0	0	3	3
		0.0%	0.0%	0.0%	25.0%	6.1%
Total		13	12	12	12	49
		100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla n 13. Distribución de la inmunoreactividad de mTOR en los grupos de estudio

ANTICUERPO PI3K

Control PI3K.

El 84.6% de los casos (11 casos) tuvo un SCORE de inmunoreactividad de cero, mientras que la intensidad de inmunoexpresión fue negativa en el 84.6% de los casos (11 casos), por lo que el índice de inmunoreactividad obtenido para el anticuerpo PI3K en el grupo control fue de cero en la mayoría de los casos (11 casos) (84.6%). El índice de inmunoreactividad para PI3K en el grupo control fue Débil en el 100% de los casos.

Displasias PI3K.

El 66.6% de los casos (16 casos) tuvo un SCORE de inmunoreactividad de dos y uno (8 casos cada uno), mientras que la intensidad de inmunoexpresión fue leve en el 41.7% de los casos (10 casos), por lo que el índice de inmunoreactividad obtenido para el anticuerpo PI3K en el grupo de displasias fue de 2 en la mayoría de los casos (6 casos) (25%). El índice de inmunoreactividad para PI3K en el grupo de displasias fue Débil en el 95% de los casos (23 casos).

***Displasias de bajo riesgo PI3K**

El 41.7% de los casos (5 casos) tuvo un SCORE de inmunoreactividad de uno, mientras que la intensidad de inmunoexpresión fue leve en el 33.3% de los casos (4 casos), por lo que el índice de inmunoreactividad obtenido para el anticuerpo PI3K en el grupo de displasias de bajo riesgo fue de CERO en la mayoría de los casos (4casos) (33.3%). El índice de inmunoreactividad para PI3K en el grupo de displasias fue Débil en el 91.7% de los casos.

***Displasias de alto riesgo PI3K**

El 50% de los casos (6 casos) tuvo un SCORE de inmunoreactividad de dos, mientras que la intensidad de inmunoexpresión fue LEVE en el 50% de los casos (6 casos), por lo que el índice de inmunoreactividad obtenido para el anticuerpo PI3K en el grupo de displasias de alto riesgo fue de 2 en la mayoría de los casos (4 casos cada uno) (33.3% total). El índice de inmunoreactividad para PI3K en el grupo de displasias fue Débil en el 91.7% de los casos.

Carcinoma oral de células escamosas PI3K.

El 50% de los casos (6 casos) tuvo un SCORE de inmunoreactividad de cero, mientras que la intensidad de inmunoexpresión fue negativa en el 50% de los casos (6 casos), por lo que el índice de inmunoreactividad obtenido para el anticuerpo PI3K en el grupo de COCE fue de CERO en la mitad de los casos (6 casos) (50%). El índice de inmunoreactividad para PI3K en el grupo de displasias fue DÉBIL en el 83.3%

GRUPO DE ESTUDIO		CONTROL	DISPLASIA BAJO RIESGO	DISPLASIA ALTO RIESGO	COCE	Total	
PI3K SCORE	0%	11	4	1	6	22	
		84.6%	33.3%	8.3%	50.0%	44.9%	
	1-10%	1	5	3	0	9	
		7.7%	41.7%	25.0%	0.0%	18.4%	
	11-30%	1	2	6	4	13	
		7.7%	16.7%	50.0%	33.3%	26.5%	
	31-50%	0	1	2	1	4	
		0.0%	8.3%	16.7%	8.3%	8.2%	
	51-80%	0	0	0	1	1	
		0.0%	0.0%	0.0%	8.3%	2.0%	
	Total		13	12	12	12	49
			100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla n 14. Distribución del SCORE de PI3K en los grupos de estudio

GRUPO DE ESTUDIO		CONTROL	DISPLASIA BAJO RIESGO	DISPLASIA ALTO RIESGO	COCE	Total	
PI3K INTENSIDAD	NEGATIVO	11	4	1	6	22	
		84.6%	33.3%	8.3%	50.0%	44.9%	
	LEVE	2	4	6	2	14	
		15.4%	33.3%	50.0%	16.7%	28.6%	
	MODERADO	0	2	5	1	8	
		0.0%	16.7%	41.7%	8.3%	16.3%	
	INTENSO	0	2	0	3	5	
		0.0%	16.7%	0.0%	25.0%	10.2%	
	Total		13	12	12	12	49
			100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla n 15. Distribución de la intensidad de PI3K en los grupos de estudio

GRUPO DE ESTUDIO		CONTROL	DISPLASIA BAJO RIESGO	DISPLASIA ALTO RIESGO	COCE	Total
PI3K INMUNOREACTIVIDAD	DÉBIL	13	11	12	10	46
		100.0%	91.7%	100.0%	83.3%	93.9%
	ALTO	0	1	0	2	3
		0.0%	8.3%	0.0%	16.7%	6.1%
Total		13	12	12	12	49
		100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

Tabla n 16. Distribución de la inmunoreactividad de PI3K en los grupos de estudio

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Se realizaron los análisis de los datos, utilizando la prueba estadística de Chi-cuadra con un nivel de confiabilidad del 95% ($p < 0.05$).

GRUPO DE ESTUDIO	CONTROL (N=13)	DISPLASIA BAJO RIESGO (N=12)	DISPLASIA ALTO RIESGO (N=12)	COCE (N=12)	
AKT SCORE	0%	7 53.8%	2 16.7%	1 8.3%	
		(0.017)			
	1-10%	1 7.7%	1 8.3%	1 8.3%	0 0.0%
	11-30%	5 38.5%	7 58.3%	10 83.3%	1 8.3%
		(0.000)			
	31-50%	0 0.0%	1 8.3%	0 0.0%	2 16.7%
	51-80%	0 0.0%	1 8.3%	0 0.0%	7 58.3%
		(0.017)			
	81-100%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	1 8.3%
	Total	13 100.0%	12 100.0%	12 100.0%	12 100.0%

P=significancia estadística prueba de Chi-cuadrada. Akt score= número de células positivas/células totales x100 expresado en porcentaje.

Tabla n.17. Score de células positivas al anticuerpo anti-Akt por grupo de estudio.

En el grupo de los casos de la mucosa oral normal, se observó en su mayoría un SCORE del 0%, con una significancia estadística de 0.017, para la mayoría de las muestras analizadas; en las displasias epiteliales orales de alto riesgo, se obtuvo un 83.3% para el SCORE que va del 11 al 30% de células positivas, con una significancia del 0.000 y en los carcinomas orales, la mayoría de los casos presentó un SCORE del 51 al 80%, con una significancia del 0.017. Se observó un notable aumento del SCORE para este anticuerpo a medida que se compara de mucosa oral normal, a displasia epitelial oral y a carcinoma oral de células escamosas.

GRUPO DE ESTUDIO	CONTROL (N=13)	DISPLASIA BAJO RIESGO (N=12)	DISPLASIA ALTO RIESGO (N=12)	COCE (N=12)
AKT INTENSIDAD	NEGATIVO	7 53.8%	2 16.7%	1 8.3%
	LEVE	4 30.8%	3 25.0%	0 0.0%
	MODERADO	2 15.4%	6 50.0%	7 58.3%
	INTENSO	0 0.0%	1 8.3%	4 33.3%
				8 66.7%
				(0.001)
Total	13 100.0%	12 100.0%	12 100.0%	12 100.0%

P=significancia estadística prueba de Chi-cuadrada. Akt intensidad

Tabla n.18. Intensidad del anticuerpo anti-Akt por grupo de estudio.

En el grupo control se observó una intensidad en su mayoría negativa, el grupo de displasias epiteliales de alto riesgo mostró una intensidad en su mayoría moderada con un 58.3% ; y los carcinomas orales, presentaron una significancia estadística de 0.001, para la mayoría de los casos con una intensidad intensa. El patrón de intensidad entre los grupos de estudio fue en aumento a medida que se compara de mucosa oral normal, a displasia epitelial oral y a carcinoma oral de células escamosas.

GRUPO DE ESTUDIO		CONTROL (N=13)	DISPLASIA BAJO RIESGO (N=12)	DISPLASIA ALTO RIESGO (N=12)	COCE
AKT INMUNOREACTIVIDAD	DÉBIL 0-7	13 100.0%	12 100.0%	12 100.0%	3 25.0%
	ALTO 8-15	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	9 75.0%
	(p 0.000)				
	Total	13 100.0%	12 100.0%	12 100.0%	12 100.0%

P=significancia estadística prueba de Chi-cuadrada. Akt inmunoreactividad

Tabla n.19. Inmunoreactividad del anticuerpo anti-Akt por grupo de estudio.

La inmunoreactividad fue débil en el total de los casos para las muestras del grupo control como el grupo de displasias epiteliales orales, sin embargo, la mayoría de los casos de carcinoma oral de células escamosas, presentaron una inmunoreactividad alta con un nivel de significancia del 0.000 para las muestras que presentaron alta inmunoreactividad.

GRUPO DE ESTUDIO	CONTROL (N=13)	DISPLASIA BAJO RIESGO (N=12)	DISPLASIA ALTO RIESGO (N=12)	COCE (N=12)
MTOR SCORE	0%	6 46.2%	3 25.0%	2 16.7%
	1-10%	5 38.5%	3 25.0%	4 33.3%
	11-30%	2 15.4%	5 41.7%	6 50.0%
	31-50%	0 0.0%	1 8.3%	0 0.0%
	51-80%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%
	Total	13 100.0%	12 100.0%	12 100.0%

P=significancia estadística prueba de Chi-cuadrada. mTOR SCORE= número de células positivas/células totales x100 expresado en porcentaje.

Tabla n.20. Score de células positivas al anticuerpo anti-mTOR por grupo de estudio.

En el grupo de los casos de la mucosa oral normal, se observó en su mayoría un SCORE del 0%, con el 46.2% para las muestras analizadas; en las displasias epiteliales orales de bajo riesgo, se observó un 41.7% para el SCORE que va del 11 al 30% de células positivas, y en las displasias epiteliales de alto riesgo se observó que el 50% presentó un SCORE del 11 al 30% y en los carcinomas orales, la mayoría de los casos presentó un SCORE del 11 al 30%, con un porcentaje de las muestras analizadas del 58.3%, y una significancia estadística de 0.042.

GRUPO DE ESTUDIO		CONTROL (N=13)	DISPLASIA BAJO RIESGO (N=12)	DISPLASIA ALTO RIESGO (N=12)	COCE (N=12)
MTOR INTENSIDAD	NEGATIVO	6 46.2%	3 25.0%	2 16.7%	1 8.3%
	LEVE	5 38.5%	2 16.7%	5 41.7%	3 25.0%
	MODERADO	2 15.4%	7 58.3%	3 25.0%	4 33.3%
	INTENSO	0 0.0%	0 0.0%	2 16.7%	4 33.3%
Total		13 100.0%	12 100.0%	12 100.0%	12 100.0%

Tabla n.21 Intensidad del anticuerpo anti-mTOR por grupo de estudio.

Se observó un 46.2% de negatividad en el grupo control, en las displasias epiteliales de bajo riesgo, presentó en su mayoría una intensidad moderada con un 58.3%, y en las displasias epiteliales de alto riesgo presentó un 41.7% de intensidad leve. Y en los carcinomas orales, se observó una intensidad intensa con un 33.3%.

GRUPO DE ESTUDIO		CONTROL	DISPLASIA BAJO RIESGO	DISPLASIA ALTO RIESGO	COCE
MTOR INMUNOREACTIVIDAD	DÉBIL 0-7	13 100.0%	12 100.0%	12 100.0%	9 75.0% 0.02
	ALTO 8-15	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	3 25.0%
Total		13 100.0%	12 100.0%	12 100.0%	12 100.0%

Tabla n.22. Inmunoreactividad del anticuerpo anti-mTOR por grupo de estudio.

Se observó en todos los casos en los grupos control y de displasias epiteliales de bajo y alto riesgo una inmunoreactividad débil, sin embargo, los carcinomas orales que presentaron una inmunoreactividad alta, se observó una significancia estadística de 0.02.

GRUPO DE ESTUDIO	CONTROL (N=13)	DISPLASIA BAJO RIESGO (N=12)	DISPLASIA ALTO RIESGO (N=12)	COCE (N=12)	
PI3K SCORE	0%	11 84.6%	4 33.3%	1 8.3%	6 50.0%
	1-10%	1 7.7%	5 41.7%	3 25.0%	0 0.0%
	11-30%	1 7.7%	2 16.7%	6 50.0%	4 33.3%
	31-50%	0 0.0%	1 8.3%	2 16.7%	1 8.3%
	51-80%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	1 8.3%
	Total	13 100.0%	12 100.0%	12 100.0%	12 100.0%

Tabla n.23. Score de células positivas al anticuerpo anti-PI3K por grupo de estudio.

La mayoría de los casos control presentaron un SCORE del 0%, con un 84.6% de las muestras analizadas para este SCORE, las displasias epiteliales orales de bajo riesgo mostraron un 41.7% para el SCORE del 1 al 10%, así mismo las displasias de alto riesgo mostraron un 50% un SCORE del 11 al 30%. Los casos de carcinoma oral de células escamosas, presentaron un 50% un SCORE del 0%.

GRUPO DE ESTUDIO		CONTROL (N=13)	DISPLASIA BAJO RIESGO (N=12)	DISPLASIA ALTO RIESGO (N=12)	COCE (N=12)
PI3K INTENSIDAD	NEGATIVO	11 84.6%	4 33.3%	1 8.3%	6 50.0%
	LEVE	2 15.4%	4 33.3%	6 50.0%	2 16.7%
	MODERADO	0 0.0%	2 16.7%	5 41.7%	1 8.3%
	INTENSO	0 0.0%	2 16.7%	0 0.0%	3 25.0%
Total		13 100.0%	12 100.0%	12 100.0%	12 100.0%

Tabla n.24 Intensidad del anticuerpo anti-PI3K por grupo de estudio.

En el grupo control se observó un 84.6% de negatividad para PI3K, las displasias epiteliales orales de bajo riesgo presentaron una intensidad leve con un 33.3%, así mismo las displasias epiteliales orales de alto riesgo, presentaron en su mayoría una intensidad leve con un 50% de los casos. Los carcinomas presentaron una negatividad para este anticuerpo con un 50% de los casos.

GRUPO DE ESTUDIO		CONTROL (N=13)	DISPLASIA BAJO RIESGO (N=12)	DISPLASIA ALTO RIESGO (N=12)	COCE (N=12)
PI3K INMUNOREACTIVIDAD	DÉBIL 0-7	13 100.0%	11 91.7%	12 100.0%	10 83.3%
	ALTO 8-15	0 0.0%	1 8.3%	0 0.0%	2 16.7%
Total		13 100.0%	12 100.0%	12 100.0%	12 100.0%

Tabla n.25. Inmunoreactividad del anticuerpo anti-PI3K por grupo de estudio.

No se encontró significancia estadística en los análisis para la inmunoreactividad del anticuerpo PI3K en los grupos de estudio.

DISCUSIÓN

En el presente estudio, se evaluó el patrón inmunohistoquímico de estos tres biomarcadores pAKT, pmTOR y pPI3K, en displasias epiteliales orales de bajo y alto riesgo, comparándolos con carcinoma oral de células escamosas y mucosa oral normal, para evaluar su potencial como biomarcador de progresión a malignidad.

De acuerdo con estudios previos, se observó en este estudio positividad para los tres biomarcadores en células displásicas localizadas en la capas basal (29).

Con respecto a la localización, de Freitas Silva y cols (68) informaron que los casos de mucosa oral normal y leucoplasias orales, mostraron inmunorreactividad de Akt limitada al núcleo, mientras que las células en carcinoma oral de células escamosas expresaron inmunotinción nuclear y citoplasmática. En el presente estudio tanto en los casos de mucosa oral normal, displasias epiteliales orales y carcinoma oral de células escamosas, la tinción inmunohistoquímica se limitó solamente a nivel nuclear.

Positividad inmunohistoquímica para Akt, mTOR y PI3K fue observada en los cuatro grupos de estudio.

Un aumento de la intensidad, así como en el score de mucosa oral normal a displasia epitelial y carcinoma oral de células escamosas fue observado en específico, para el anticuerpo Akt.

En términos de porcentaje del número de células positivas (SCORE), el grupo de carcinoma oral de células escamosas mostró 58.3% de positividad para el rango de SCORE del 51 al 80% de células positivas, las displasias epiteliales orales de alto riesgo presentaron un 83.3% para el SCORE que va del 11 al 30% de células positivas; y la mayoría de los casos de mucosa oral normal (53.8%) para un SCORE del 0%. Nuestros hallazgos de positividad para los casos de carcinoma oral de células escamosas coinciden con el estudio realizado por Martins y cols

(52); en el que la mayoría de los casos de carcinoma oral. (83,3%) mostraron un alto porcentaje de células positivas para pAkt.

Nuestros resultados demostraron que la inmunoreactividad para pAKT en carcinoma oral de células escamosas fue alta, mientras que las muestras de mucosa oral normal y displasias epiteliales orales de bajo riesgo presentaron una inmunoreactividad baja; corroborando la presencia de pAKT en lesiones potencialmente malignas, lo que sugiere que se puede utilizar como biomarcador en el diagnóstico.

Un 50% de las muestras de displasias epiteliales orales de alto riesgo, presentaron un porcentaje de células positivas (SCORE) del 1 al 10%, comparable con los resultados obtenidos en el estudio de Martins y cols (52), en el que observaron una positividad de hasta el 5% en la mayoría de los casos (76.5%), del porcentaje de células positivas para el anticuerpo mTOR, así mismo el mayor número de muestras de carcinoma oral de células escamosas, en el presente estudio, presentó en el SCORE que va del 11 al 30% de positividad con un 58.3% de las muestras observadas.

La inmunoreactividad para mTOR en las muestras de mucosa oral normal y displasias epiteliales orales de bajo riesgo presentaron una inmunoreactividad baja; así mismo, el mayor porcentaje de las muestras de carcinoma oral de células escamosas (75%), también mostró una inmunoreactividad baja, diferente a la esperada, en comparación a la observada en el caso del anticuerpo AKT, en el que la mayoría de los casos de carcinoma oral presentaron una inmunoreactividad alta.

El SCORE para PI3K en mucosa oral normal, fue en su mayoría negativo con un 84.6% de las muestras; un 41.7% de positividad en las células para el rango de SCORE que va del 1 al 10% en las displasias epiteliales orales de bajo riesgo, y para las displasias epiteliales orales de alto riesgo un 50% de positividad para el SCORE que va del 11 al 30% y en carcinoma oral de células escamosas, se observó una mayor parte de las muestras negativas con un 50%.

Se observó una inmunoreactividad baja del anticuerpo PI3K para todos las muestras de los controles y las displasias epiteliales de alto riesgo, así mismo, el mayor porcentaje de las muestras de displasias epiteliales orales de bajo riesgo (91.7%) presentaron una inmunoreactividad baja. En el caso de carcinoma oral de células escamosas, un 16.7% mostraron una inmunoreactividad alta.

En el presente estudio, se observó una positividad inmunohistoquímica intensa para los anticuerpos Akt y mTOR en los grupos de carcinoma oral de células escamosas. Lo cual confirma el mismo patrón que se ha visto en especímenes malignos reportados en la literatura. De acuerdo con los resultados, el anticuerpo AKT mostró una inmunoreactividad alta en la mayoría de los casos de carcinoma oral de células escamosas en comparación con los demás grupos que presentaron una inmunoreactividad baja para el mayor porcentaje de las muestras de displasias epiteliales y mucosa oral normal, lo cual indica que esta proteína desempeña un papel clave muy importante en el proceso de carcinogénesis (47,48).

Se observó una similitud en el porcentaje de la positividad para el anticuerpo mTOR en el presente estudio de las displasias epiteliales orales con un 55%, con los registrados en el estudio de Prodomidis (51) en leucoplasias orales (63.2%).

En nuestros casos, no hubo una gran significancia estadística entre los grupos de estudio para los anticuerpos PI3K Y mTOR, sin embargo, las diferencias entre los grupos de estudio fueron claramente observado durante el análisis de inmunoreactividad y SCORE para AKT entre las displasias epiteliales de bajo grado, alto grado y carcinoma oral de células escamosas en comparación con el grupo de mucosa oral normal, fueron evidentes en relación a los anticuerpos PI3K y mTOR.

CONCLUSIONES

Las diferencias entre los cuatro grupos se observaron claramente durante el análisis de inmunoreactividad, y la positividad para pAKT se observó con mayor frecuencia entre displasias epiteliales orales y carcinoma oral de células escamosas en comparación con la mucosa normal.

La positividad de PI3K, Akt y mTOR, demuestra el papel de esta vía de señalización celular en la progresión, porque las displasias de alto riesgo, así como los carcinomas orales de células escamosas, mostraron una mayor inmunoexpresión en comparación con las displasias de bajo riesgo, por lo que pueden considerarse como biomarcadores de diagnóstico para las displasias epiteliales orales.

Con lo anterior se demostró un aumento en la positividad, así como en la inmunoreactividad de AKT en los grupos de estudio, difiriendo considerablemente entre las displasias epiteliales orales y carcinoma oral de células escamosas, concluyendo que esta biomolécula podría ser el mejor candidato de los tres biomarcadores que se estudiaron para considerarlo como un biomarcador nuclear con potencial de progresión de displasias epiteliales orales.

Bibliografia:

1. Sever R, Brugge JS. Signal transduction in cancer. Cold Spring Harb Perspect Med. 2015 Apr 1;5(4).
2. Prasasya RD, Tian D, Kreeger PK. Analysis of cancer signaling networks by systems biology to develop therapies. Semin Cancer Biol. 2011 Jun;21(3):200-6.
3. Hafian H, Venteo L, Sukhanova A, Nabiev I, Lefevre B, Pluot M. Immunohistochemical study of DNA topoisomerase I, DNA topoisomerase II alpha, p53, and Ki-67 in oral preneoplastic lesions and oral squamous cell carcinomas. Hum Pathol. 2004; 35: 745–751.
4. Shah NG, Trivedi TI, Tankshali RA et al. Molecular alterations in oral carcinogenesis: significant risk predictors in malignant transformation and tumor progression. Int J Biol Markers.2007; 22: 132–143.
5. Clark C, & cols. Teasing out the best molecular marker in the AKT/mTOR pathway in head and neck squamous cell cancer patients. Laryngoscope. 2010 Jun;120(6):1159-65.
6. Pitiyage G1, Tilakaratne WM, Tavassoli M, Warnakulasuriya S. Molecular markers in oral epithelial dysplasia: review. J Oral Pathol Med. 2009 Nov;38(10):737-52.
7. Biomarkers Definition Working Group Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Clin Pharmacol Therapeutics. 2001;69:89–95.
8. WHO International Programme on Chemical Safety Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. 2001.
9. R. Huss. Tissue-based biomarkers. Advances in pharmaceutical cell therapy: principles of cell-based biopharmaceuticals, World Scientific, Singapore .2015, 408.
10. K.V. Ballman. Biomarker: predictive or prognostic?.J Clin Oncol, 33-2015, pp. 3968-397.
11. A. Mishra, M. Verma. Cancer biomarkers: are we ready for the prime time?.Cancers (Basel), 2 (2010), pp. 190-208.

12. Kujan O, Khattab A, Oliver RJ, Roberts SA, Thakker N, Sloan P: Why oral histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia: an attempt to understand the sources of variation. 2007. *Oral Oncol* 43: 224-231.
13. Iglesias-Bartolome R, Martin D, Gutkind JS. Exploiting the head and neck cancer oncogenome: widespread PI3K-mTOR pathway alterations and novel molecular targets. *Cancer Discov* .2013; 3: 722–5.
14. Vander Broek R, Mohan S, Eytan DF, Chen Z, Van Waes C. The PI3K/Akt/mTOR axis in head and neck cancer: functions, aberrations, cross-talk and therapies. *Oral Dis* 2015; 21: 815– 25.
15. Wang H, Wu Q, Liu Z, et al. Downregulation of FAP suppresses cell proliferation and metastasis through PTEN/PI3K/AKT and Ras-ERK signaling in oral squamous cell carcinoma. *Cell Death Dis* 2014; 5: e1155.
16. Chakraborty S, Mohiyuddin SM, Gopinath KS, Kumar A. Involvement of TSC genes and differential expression of other members of the mTOR signaling pathway in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2008;8:163.
17. Kim JE, Chen J. Cytoplasmic-nuclear shuttling of FKBP12-rapamycin-associated protein is involved in rapamycin-sensitive signaling and translation initiation. *Proc Natl Acad Sci*.2000, 97: 14340–14345.
18. Furuya F, Hanover JA, Cheng S-Y . Activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling by a mutant thyroid hormone b receptor. *Proc Natl Acad Sci*. 2006, 103: 1780–1785.
19. Engelman, J. A. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 9.2009, 550–562.
20. Liu, P., Cheng, H., Roberts, T. M., & Zhao, J. J. Targeting the phosphoinositide 3- kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 8. 2009. 627–644.
21. Populo H, Lopes JM, Soares P. The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int J Mol Sci*. 2012, 13: 1886–1918.
22. A. A. Molinolo, P. Amornphimoltham, C. H. Squarize, R. M. Castilho, V. Patel, and J. S. Gutkind, “Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis,” *Oral Oncology*, vol. 45, no. 4-5: 324–334, 2009.
23. Amornphimoltham P. Persistent Activation of the Akt Pathway in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Potential Target for UCN-01. *Clinical Cancer Research*. 2004,10, 4029–4037.

24. Massarelli E. Akt Activation Correlates with Adverse Outcome in Tongue Cancer. *Cancer*. 2005, 104: 2430-2436.
25. Zhang H, Cicchetti G, Onda H, et al. Loss of Tsc1/Tsc2 activates mTOR and disrupts PI3K-Akt signaling through downregulation of PDGFR. *J Clin Invest*. 2003;112:1223-1233.
26. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci*. 2009, 122: 3589–3594.
27. Hay, N.; Sonenberg, N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*. 2004, 18, 1926–1945.
28. Sarbassov, D.D.; Ali, S.M.; Kim, D.H.; Guertin, D.A.; Latek, R.R.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Sabatini, D.M. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr. Biol*. 2004, 14, 1296–1302.
29. Rosner M. Nuclear/cytoplasmic localization of Akt activity in the cell cycle. *Amino Acids* .2007, 32: 341–345.
30. Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer*. 2009;9:550–562.
31. Wendel HG, De Stanchina E, Fridman JS, et al. et al. Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. *Nature*. 2004;428:332–337.
32. Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. *Cell*. 2000;103:253–262.
33. Hengstschlager M, Rosner M, Fountoulakis M, et al. et al. Tuberous sclerosis genes regulate cellular 14-3-3 protein levels. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;312:676–683.
34. Zhang H, Cicchetti G, Onda H, et al. et al. Loss of Tsc1/Tsc2 activates mTOR and disrupts PI3K-Akt signaling through downregulation of PDGFR. *J Clin Invest*. 2003;112:1223–1233.
35. Skinner HD, Zheng JZ, Fang J, et al. et al. Vascular endothelial growth factor transcriptional activation is mediated by hypoxia-inducible factor 1alpha, HDM2, and p70S6K1 in response to phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling. *J Biol Chem*. 2004;279:45643–45651.

36. Li J, Yen C, Liaw D, et al. et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*. 1997;275:1943–1947.
37. Teng DH, Hu R, Lin H, et al. et al. MMAC1/PTEN mutations in primary tumor specimens and tumor cell lines. *Cancer Res*. 1997;57:5221–5225.
38. Sun X, Huang J, Homma T, et al. et al. Genetic alterations in the PI3K pathway in prostate cancer. *Anticancer Res*. 2009;29:1739–1743.
39. Podsypanina K, Ellenson LH, Nemes A, et al. et al. Mutation of Pten/Mrnac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:1563–1568.
40. Sansal I, Sellers WR. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol*. 2004;22:2954–2963.
41. Wang S, Gao J, Lei Q, et al. et al. Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. *Cancer Cell*. 2003;4:209–221.
42. Mueller S, Phillips J, Onar-Thomas A, et al. et al. PTEN promoter methylation and activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in pediatric gliomas and influence on clinical outcome. *Neuro Oncol*. 2012;14:1146–1152.
43. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*. 2008;27:5497–5510.
44. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, et al. et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*. 2004;304:554.
45. Kang S, Bader AG, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:802–807.
46. Samuels Y, Diaz LA, Jr, Schmidt-Kittler O, et al. et al. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell*. 2005;7:561–573.
47. Bleeker FE, Felicioni L, Buttitta F, et al. et al. AKT1 (E17K) in human solid tumours. *Oncogene*. 2008;27:5648–5650.
48. Rychahou PG, Kang J, Gulhati P, et al. et al. Akt2 overexpression plays a critical role in the establishment of colorectal cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:20315–20320.

49. Clark C, Shah S, Herman-Ferdinandez L, et al. Teasing out the best molecular marker in the AKT/mTOR pathway in head and neck squamous cell cancer patients. *Laryngoscope* 2009; 120: 1159–65.
50. Clauditz et. Al. Abundant expression of mTOR kinase in salivary gland tumors – potentials as therapy target?. *Oral Pathol Med* (2013) 42: 769–773.
51. Prodromidis G, Nikitakis NG, Sklavounou A. Immunohistochemical Analysis of the Activation Status of the Akt/mTOR/pS6 Signaling Pathway in Oral Lichen Planus. *Int J Dent* 2013; doi: 10.1155/2013/743456-
52. Martins F, de Sousa SC, Dos SE, Woo SB , Gallottini M. PI3K-AKT-mTOR pathway proteins are differently expressed in oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med*. 2016; 45: 746-52.
53. Ferreira et al. Prognostic implications of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in oral squamous cell carcinoma: overexpression of p-mTOR indicates an adverse prognosis. *Applied Cancer Research* (2017) 37:41.
54. Van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol*. 2009;45(4–5):317–23.
55. Rizzo G, Black M, Mymryk JS, Barrett JW, Nichols AC. Defining the genomic landscape of head and neck cancers through next-generation sequencing. *Oral Dis* 2015; 21: e11– 24.
56. Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med*, 37. 2008, 127-33.
57. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: IARC Press. 2005.
58. Speight P. Update on Oral Epithelial Dysplasia and Progression to Cancer. *Head and Neck Pathol*. 2007, 1:61–66.
59. L. Barnes, J. Eveson, P. Reichart, D. Sidransky (Eds.), World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the head and neck, IARC Press, Lyon 2005.
60. Pindborg JJ, Reichart P, Smith CJ, van der Waal I. World Health Organization: histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa. Berlin:Springer-Verlag.1997.

61. Kramer IR, Lucas RB, Pindborg JJ, Sobin LH. Definition of leukoplakia and related lesions: An aid to studies on oral precancers. WHO Collaborating Centre for Oral Precancerous lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1994;67:22-9.
62. Richard RM. Natural history cervical intraepithelial neo-plasia. *Modern treatment* 5: 1. USA: Harper & Row Publishers, 1968.
63. Branes L, Eveson JW, Reichart P, World DS. Tumours of the oral cavity and oropharynx. *Pathol Genet* 2005;67:177-9.
64. Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol* 2006; 42(10): 987-93.
65. Gonzalez-Moles MA, Scully C, Ruiz-Avila I. Molecular findings in oral premalignant fields: update on their diagnostic and clinical implications. *Oral Diseases* .2012; 18, 40–47.
66. Rivera C, Oliveira AK, Costa RAP, De Rossi T, Paes Leme AF. Prognostic biomarkers in oral squamous cell carcinoma: A systematic review. *Oral Oncology* . 2017;72, 38–47.
67. Rodrigo, J. P., García-Carracedo, D., González, M. V., Mancebo, G., Fresno, M. F., & García-Pedrero, J. (2010). Podoplanin expression in the development and progression of laryngeal squamous cell carcinomas. *Molecular Cancer*, 9, 48.
68. de Freitas Silva B-S, Yamamoto F-P, Pontes F-SC, et al. TWIST and p-Akt immunoexpression in normal oral epithelium, oral dysplasia and in oral squamous cell carcinoma. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*. 2012;17(1):e29–e34.
69. Duraiyan J, Govindarajan R, Kaliyappan K, Palanisamy M. Applications of immunohistochemistry. *J Pharm Bioallied Sci* (2012) 4:S307–9.10.
70. Coons, A. H., Creech, H. J., & Jones, R. N. (1941). Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. *Experimental Biology and Medicine*, 47(2), 200-202.
71. "The Immunohistochemical Staining Methods Education Guide" - a free handbook provided by Dako:http://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/08002_ihc_staining_methods.pdf.

72. Antibodypedia - An open-access database of publicly available antibodies and their usefulness in various applications: <http://www.antibodypedia.com>

73. <https://www.proteinatlas.org/learn/method/immunohistochemistry>

74. Bologna-Molina R, Damián-Matsumura P, Molina-Frechero N: An easy cell counting method for immunohistochemistry that does not use an image analysis program. *Histopathology*. 2011, 59: 801-803.

Anexo 1. Técnica de Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica consiste en una serie de métodos utilizados en histopatología para la localización de moléculas específicas en los tejidos, o células por medio del empleo de antígenos y anticuerpos. Lo relevante de la inmunohistoquímica es la salida visual intuitiva que revela la existencia y localización de la proteína diana en el contexto de diferentes tipos de células, estados biológicos y / o localización subcelular dentro de tejidos que se están analizando. Esta técnica se basa en la detección de epítomos expresados por una única proteína-diana dentro de una muestra de tejido utilizando un "anticuerpo primario" capaz de unirse a aquellos epítomos con alta especificidad. Después del evento de unión del epítomo-anticuerpo, se agrega un "anticuerpo secundario" capaz de unirse al anticuerpo primario con alta especificidad. El anticuerpo secundario se acopla a una molécula informadora y, luego del evento de unión anticuerpo-anticuerpo, se agrega un sustrato químico que reacciona con la molécula informadora que está marcada mediante un enlace químico con una enzima para producir un precipitado coloreado en el sitio de todo el complejo de epítomo-anticuerpo, esto con el fin de que sea visible y pueda ser observado por medio de microscopía de luz óptica (69).

La técnica de inmunohistoquímica se desarrolló durante la década de 1940 y se usa de manera rutinaria como una herramienta importante en el área de la patología. Es de gran utilidad para el diagnóstico y la clasificación de diversas lesiones, para identificar agentes infecciosos en tejidos como virus, bacterias, parásitos; determinación de origen de tumores malignos indiferenciados, así como metastásicos; y también se utiliza como marcadores predictivos y pronósticos de tumores (70).

Anexo 1. Técnica de inmunohistoquímica (71-73).

1. Preparación del tejido.

Después de una fijación adecuada en formol, y el procesamiento del tejido, éste se incluye en parafina, para que se pueda obtener los cortes de 3 a 5 μm y ser transferidos a portaobjetos.

2. Desparafinización a 60°C por 30 minutos en la placa caliente para uso histológico.



Fig. 9. Laminillas sobre una placa caliente de uso histológico.

3. Hidratación.

Las laminillas se sumergen en xileno al 100% y se pasan por diferentes grados de alcohol (100%, 96% y 70%).



Fig. 10. Tren para desparafinar e hidratar .

*Desparafinar laminillas en xilol 100% (10 minutos)

*Desparafinar laminillas en xilol 100% (10 minutos)

*Desparafinar laminillas en xilol 100% (10 minutos)

*Hidratar en alcohol 100% (3 minutos)

*Hidratar en alcohol 100% (3 minutos)

*Hidratar en alcohol 96% (3 minutos)

*Hidratar en alcohol 70% (3 minutos)

*Hidratar en agua

4. Recuperación antigénica.

Sumergir las laminillas en un recipiente con buffer de citrato y pH6, en cámara de presión y calor, a una duración de 15 minutos y programado a alta potencia. Debido a que la fijación previa de los tejidos en soluciones de formaldehído puede causar reacciones cruzadas en las proteínas, y la inclusión en parafina puede alterar la forma de las proteínas; el proceso de

recuperación antigénica revierte algunos de estos problemas, rompiendo las uniones cruzadas, restaurando la conformación de epítotope-antígeno y removiendo los iones de calcio con citrato.

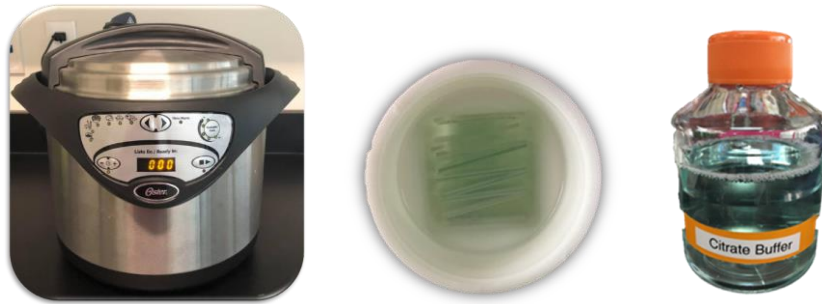


Fig. 11. a) reactor de calor, b) vaso de Koplín con laminillas sumergidas
c) buffer de citrato.

Posteriormente se remueve el recipiente con las laminillas de la cámara de presión y se dejan que se enfríe a temperatura ambiente.

5. Lavado con Buffer de lavado 3 veces por 5 minutos en el Shandon Sequenza Thermo Racks.
6. Bloqueo de peroxidasa endógena por 20 minutos a temperatura ambiente.
7. Lavado con Buffer de lavado 3 veces por 5 minutos.
8. Incubación de los anticuerpos monoclonales por la noche a 4°C en cámara húmeda.



Fig. 12. Incubación de los anticuerpos

9. La tinción fue realizada utilizando el sistema ratón/conejo inmunodetector BIO-SB (BioSB 003HL, Santa Barbara, Ca, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando el cromógeno diaminobenzidina como substrato.

10. Por último los cortes histológicos fueron contrateñidos con hematoxilina de Mayer y se realizó el montaje de las mismas.

Anexo 2. Método de conteo celular propuesto por Bologna y cols.

Debido a que a veces no se puede contar con softwares que realicen el conteo celular directamente desde la PC, el Dr, Ronell Bologna propuso un método sencillo para realizar el conteo de células teñidas en una imagen de un tejido al que se le realizó la técnica de inmunohistoquímica sin la necesidad de contar con costosos softwares, aparte de que el método se puede realizar solo con una computadora personal, como se describe a continuación : 1) se obtiene las imágenes a analizar a un aumento de 40x por medio del fotomicroscopio óptico, 2) se abren los archivos en diapositivas del programa Microsoft Office Power Point (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EE.UU.) y con la función "tabla", se colocó una cuadrícula de 6x6 sobre la imagen, 3) se realiza un conteo empezando desde la celda superior izquierda y siguiendo un patrón en espiral hacia el centro, para poder determinar el porcentaje de las células inmunoexpresadas, dividiendo el número células teñidas entre el número total de células (74).

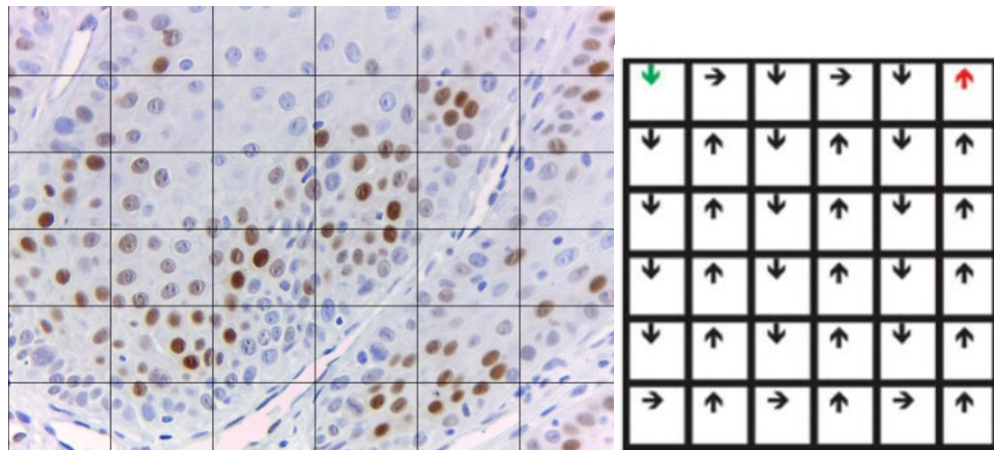


Fig. 13. Esquematización de la gradilla y el orden para el conteo celular.