

5 01484



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

Determinación de AgNORs, p53 y bcl-2
como marcadores de malignidad
en liquen plano y carcinoma epidermoide de cavidad bucal

TESIS QUE PRESENTA LA ALUMNA
ROJO BOTELLO NORMA REBECA

PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTORADO EN ODONTOLOGIA

295645

TUTOR: DRA. ELBA LEYVA HUERTA

México D. F. 2001



FACULTAD DE
ODONTOLOGIA



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

**Determinación de AgNORs, p53 y bcl-2 como marcadores de malignidad
en liquen plano y carcinoma epidermoide de cavidad bucal**

APROBADA POR

Dra. Elba Leyva Huerta

Tutor

Dr. Higinio Arzate

Comité tutorial

Dr. Juan Carlos Hernández Guerrero

Comité tutorial

MC. Elisa Vega Memije

Asesor

RECONOCIMIENTOS

Al Programa de Becas Nacionales para Estudios de Posgrado por su apoyo durante estos tres años.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a los profesores de la División de Estudios de Posgrado e Investigación que de alguna u otra manera hicieron posible la realización de este trabajo.

A los Médicos y Residentes del Departamento de Dermatología del Hospital General Manuel Gea González por su disposición en la elaboración de este trabajo.

A mi Tutor y Asesores por su ayuda en la realización de esta tesis.

Al Biólogo Agustín Vargas por su asesoría estadística.

Al QFB Celedonio Gómez Ruiz, al Técnico Teodomiro P. por el apoyo brindado para la realización de esta tesis.

A mis Padres, Hermanos y Chabely (q.e.p.d.) por alentarme para seguir adelante.

Contenido

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Antecedentes	5
Planteamiento del problema	72
Justificación	73
Hipótesis	74
Objetivos	
Objetivo general	74
Objetivos específicos	74
Materiales y método	
Selección de los sujetos de estudio	75
Tipo y tamaño de la muestra	75
Variables, definición operacional y escala de medición	76
Método de recolección de datos	79
Materiales y equipo a emplear	86
Métodos de registro y procesamiento	88
Consideraciones metodológicas	89
Análisis de los datos	89
Resultados	91
Discusión	113
Conclusiones	124
Recomendaciones	125
Propuestas de investigación	126
Referencias bibliográficas	127
Anexos	138

Contenido de Antecedentes

Liquen plano	5
Patogenia	5
Etiología	8
Tipos	9
Características histológicas	13
Inmunohistoquímica	14
Diagnóstico diferencial	15
Asociación con otras enfermedades	15
Transformación maligna	16
Carcinoma epidermoide	20
Etiología	21
Características clínicas	23
Distribución	24
Características histológicas	25
Metástasis	26
Diagnóstico diferencial	27
Pronóstico	27
Criterios de Jakobsson	29
El ciclo celular y patogénesis del cáncer	30
Carcinogénesis y agentes carcinogénicos	34
Oncogenes y antioncogenes	37
Apoptosis	39
bcl-2	41
p53	43
Nucléolo	58
Ciclo nucleolar	62
Organizador nucleolar (cromatina asociada al nucléolo)	64

Contenido de figuras

Figura 1 Patogénesis del liquen plano	7
Figura 2 Etapas del crecimiento del tumor y metástasis	27
Figura 3 Etapas del ciclo celular	31
Figura 4 Fases de la mitosis y la citocinesis	32
Figura 5 Actividad de las ciclinas y las ciclinas dependientes de cinasas en el ciclo celular	32
Figura 6 Etapas de la carcinogénesis	36
Figura 7 Secuencia de cambios ultraestructurales en la apoptosis	40
Figura 8 Traslocación t (14;18) del gen bcl-2	43
Figura 9 Modelo de acción propuesto del p53 normal y mutante	46
Figura 10 Función de p53	47
Figura 11 Componentes del núcleo	59
Figura 12 Ciclo nucleolar	64
Figura 13 Parámetros evaluados relacionados a los AgNORs	67
Figura 14 Forma de conteo de los AgNORs	86

Figura 15	
Tejido sano teñido con H y E, p53, bcl-2 y AgNORs a 100x	100
Figura 16	
Liquen plano teñido con H y E, p53, bcl-2 y AgNORs a 100x	100
Figura 17	
Carcinoma epidermoide teñido con H y E, p53, bcl-2 y AgNORs a 100x	101

Contenido de tablas

Tabla 1	
Cuantificación de las células positivas a p53 en liquen plano	93
Tabla 2	
Cuantificación de las células positivas a p53 en carcinoma epidermoide	94
Tabla 3	
Cuantificación de AgNORs en liquen plano	96
Tabla 4	
Cuantificación de AgNORs en carcinoma epidermoide	98
Tabla 5	
Cuantificación de AgNORs en el tejido normal	99
Tabla 6	
Tipo de liquen plano que presentaron los pacientes al examen clínico	103
Tabla 7	
Expresión de p53 y tipo clínico de liquen plano	104
Tabla 8	
Expresión de p53 en carcinoma epidermoide y grado de malignidad	106
Tabla 9	
Cuantificación de las células positivas a p53 de acuerdo al grado de malignidad en los carcinomas epidermoides	107
Tabla 10	
Cuantificación de AgNORs de acuerdo a los criterios de Jakobsson	109

Contenido de gráficas

Gráfica 1	
Expresión de p53 en liquen plano	92
Gráfica 2	
Expresión de p53 en carcinoma epidermoide	92
Gráfica 3	
Expresión de p53 en las lesiones en estudio	94
Gráfica 4	
Porcentaje de AgNORs en liquen plano	97
Gráfica 5	
Porcentaje de AgNORs en carcinoma epidermoide	98
Gráfica 6	
Promedio de AgNORs en las lesiones en estudio	99
Gráfica 7	
Expresión de p53 en los diferentes tipos de liquen plano	105
Gráfica 8	
Promedio de AgNORs en los diferentes tipos de liquen plano	105
Gráfica 9	
Promedio de células positivas a p53 en los casos de carcinoma epidermoide de acuerdo al grado de malignidad	108
Gráfica 10	
Promedio de AgNORs en los casos de carcinoma epidermoide de acuerdo al grado de malignidad	109

RESUMEN

Los objetivos de este estudio fueron determinar la relación de 2 proteínas bcl-2 y p53 involucradas en los mecanismos de malignidad en liquen plano y carcinoma epidermoide de boca con un marcador indirecto de síntesis de proteínas AgNORs, así como determinar la expresión de p53 y AgNORs con los factores asociados a estas lesiones, en 21 casos de liquen plano y 16 de carcinoma epidermoide, estos fueron teñidos con H y E, Anticuerpo monoclonal (NCL-p53DO-7), (NCL-bcl-2DO-124) y Plata coloidal. Los resultados con p53 fueron una inmunexpresión leve en el 47.6% con promedio de 8.52 ± 2.78 en liquen plano; inmunexpresión intensa en el 43.8% con un promedio 29.30 ± 13.75 en carcinoma epidermoide; encontrando diferencia significativa entre ambas expresiones ($p < 0.001$), con respecto a los AgNORs se obtuvo un promedio de 3.5 ± 0.8 en tejido sano, de 4.9 ± 0.6 en liquen plano y en carcinoma epidermoide de 6.4 ± 0.4 encontrando una diferencia significativa ($p < 0.001$). Bcl-2 se expreso únicamente en el tejido sano. En relación con los factores asociados se encontraron diferencias significativas entre el promedio de AgNORs y el color en liquen plano, también existió correlación positiva entre el grado de malignidad y la inmunexpresión a p53.

En conclusión debe considerarse que p53 esta involucrada en la génesis del liquen plano y carcinoma epidermoide, la cantidad de AgNORs puede ser un marcador pronóstico ya que el número de estos es mayor en tejidos malignos que en normales.

Palabras clave: liquen plano, carcinoma epidermoide, p53, bcl-2, AgNORs.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the relationship of two proteins bcl-2 and p53 involved in mechanisms of malignancy in lichen planus and squamous cell carcinoma of mouth with the indirect marker of the proteins synthesis AgNORs as well as to determine the expression of p53 and AgNORs with the factors associated with these lesions in 21 cases of lichen planus and 16 squamous cell carcinoma. The biopsias were stained with H and E, antibody monoclonal (NCL-P53DO-7), (NCL-BCL-2DO-124) and colloidal Silver. The results with p53 show mild immunoexpresion with 47.6% with average of 8.52 ± 2.78 cells in lichen planus; intense immunoexpresion with 43.8% with average 29.30 ± 13.75 cells in squamous cell carcinoma; finding significant differences between both expressions ($p < 0.001$). With respect to the AgNORs was obtained an average 3.5 ± 0.8 AgNORs in healthy tissue, 4.9 ± 0.6 in lichen planus and in squamous cell carcinoma of 6.4 ± 0.4 finding a significant difference ($p < 0.001$). Bcl-2 was expressed only in the healthy tissue. In relationship to the associated factors were found significant differences between the average of AgNORs and the color in lichen planus, also positive correlation was observed between the degree of malignancy and the immunoexpresión to p53.

In conclusion, must be considered that p53 is involved in the genesis of lichen planus and squamous cell carcinoma, the quantity of AgNORs can be a pronostic marker because the number of these is greater in malignant tissue that in normal tissue.

Key words: lichen planus, squamous cell carcinoma, p53, bcl-2, AgNORs.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo del carcinoma epidermoide en un liquen plano (LP) preexistente ha sido postulado y debatido por muchos años, actualmente se estima que esta asociación puede ocurrir especialmente cuando esta presente por más de 5 años; esta transformación maligna clasifica al LP como una condición premaligna. Aunque el riesgo de transformación maligna es real pero no-alta, deben tomarse en cuenta parámetros clínicos de importancia en el LP como: el sitio afectado, presencia de eritroplasia, induración, lesiones elevadas, edad, sexo del paciente, factores etiológicos, historia familiar de cáncer e historia previa de cáncer y deberán tenerse revisiones periódicas de los pacientes para la detección temprana de alguna transformación displásica, estas consideraciones son particularmente importantes en el caso de LP atrófico, erosivo y en placa, especialmente cuando involucran el dorso de la lengua.

Al ser desconocidos los eventos moleculares que conducen a la transformación maligna de los queratinocitos, resulta atractivo determinar la existencia de factores genéticos que puedan servir como marcadores para determinar su potencial maligno. Poco se conoce de la naturaleza exacta de los cambios apoptósicos durante la transformación de un tejido normal a maligno existiendo datos los cuales son contradictorios aunque actualmente se sabe que este proceso es mediado por la interacción de proteínas y receptores de superficie celular, algunos genes codifican proteínas específicas que pueden encontrarse en sitios

precisos de las células teniendo efectos estimuladores o inhibidores de la apoptosis, algunas de las proteínas asociadas incluyen bcl-2 y p53.

Con respecto a las características propias del tumor se ha estudiado la función del nucléolo y el papel de las Regiones de Organizadores Nucleolares (NORs) (por sus siglas en inglés) para estimar el comportamiento de los tumores basándose en su capacidad de reflejar la actividad proliferativa de la células de una neoplasia. En condiciones normales, la células no neoplásicas expresan cuando mucho 2 puntos o manchas nucleolares, en contraste con las lesiones malignas en las que se encuentra incrementado el número de puntos por lo que las células malignas contienen más NORs comparadas con células benignas, además las lesiones con alto grado de malignidad con frecuencia contienen más NORs que las correspondientes al bajo grado, por lo que se ha reportado el valor de la cuantificación de NORs como auxiliar diagnóstico en la detección de alteraciones celulares tempranas que no pueden ser evidenciadas en las preparaciones de rutina. En base a lo anterior el propósito de este trabajo fue determinar la inmunexpresión de las 2 proteínas antes mencionadas, en una condición premaligna y en carcinoma epidermoide así como determinar la cuantificación de NORs como un método auxiliar cuantitativo de diagnóstico.

ANTECEDENTES

Liquen plano (LP)

Es una enfermedad autoinmune mucocutánea, Erasmus Wilson, en 1869, describió por primera vez la involucración bucal del LP y Dubreuil, en 1906, los hallazgos histológicos. Se describe como una enfermedad inflamatoria crónica, no alérgica, no infecciosa, no contagiosa, recurrente, (cursa con períodos de remisión y agudización de carácter impredecible)¹⁻². Afecta aproximadamente al 0.9%-1.2% de la población³. La mayoría de los pacientes tienen entre 30 y 65 años de edad, raramente afecta a niños y adolescentes, con mayor frecuencia se presenta en el sexo femenino⁴ y aparece en cualquier grupo étnico³. En ocasiones hay remisión espontánea, sin embargo menos del 20% presenta remisión completa². Puede afectar la piel (piel cabelluda y uñas) y/o la mucosa bucal y vaginal^{3,5}, así mismo se ha reportado que involucra la mucosa de la laringe, esófago, estómago, ano, vejiga, mucosa nasal y conjuntiva²⁻³. Las lesiones pueden afectar a la superficie cutánea y bucal en un 40%, exclusivamente a la superficie cutánea en un 35% o tan solo a la mucosa bucal en un 25%. Las áreas más comúnmente afectadas son la mucosa bucal, bordes laterales de la lengua y los labios en menor porcentaje el paladar, encías y piso de boca⁵⁻⁷.

Patogenia

Actualmente no se conoce el mecanismo por el cual se inicia el LP⁷⁻⁸, sin embargo las investigaciones sobre su patogenia han postulado a los linfocitos T

como los iniciadores o estimuladores; centrándose en que es un desorden inmunológico persistente mediado por linfocitos en donde los queratinocitos basales son las células blanco de los linfocitos T, células de Langerhans y macrófagos^{5,8}; la salida focal de linfocinas se considera que retienen y reclutan a los linfocitos, principalmente a los CD4 y CD8 y regulan la muerte de los queratinocitos basales. Se cree que las citocinas pueden actuar como un mecanismo importante en la destrucción de las células basales, característica morfológica elemental del LP⁹. Es decir que el γ interferón, producido por las células T puede inducir la expresión monocítica de la función linfocitaria asociada al antígeno que ayuda a éstas células a unirse a los queratinocitos. Las células inmunológicas activadas y queratinocitos causan la destrucción de los últimos³.

Se ha propuesto que los pacientes con LP pueden tener antígenos leucocitarios humanos (ALH)¹⁰. Como ya se menciono los linfocitos T secretan interferón, que a su vez induce la producción de ALH-DR por los queratinocitos. El linfocito T4 produce mayor cantidad de interleucinas activando al linfocito T8 siendo estos y los ALH-DR los encargados de alterar la función del queratinocito³, la expresión ALH-DR puede explicar, en parte, la citotoxicidad de los linfocitos T8 contra los queratinocitos basales. La información antigénica se transfiere desde las células de Langerhans y macrófagos hasta los linfocitos donde hay una expresión recíproca de los antígenos ALH-DR¹¹.

También se ha postulado que las citocinas, proteínas elaboradas por las células que actúan como mensajeros, pueden influenciar la expresión de LP. De éste modo algún tipo de antígeno (viral, farmacológico o celular) interactúa con el queratinocito o con la célula de Langerhans de manera normal o anormal. Se produce interferón 1, que es una monocina y promueve la interleucina 2 elaborada por los linfocitos. Así los linfocitos aumentan su producción de γ e interferón, estimulando al ALH-DR el queratinocito que actúa como antígeno.

Así las células T cooperadoras y citotóxicas destruyen las células epidérmicas interactuando con el ALH-DR. Las linfoquinas pueden causar daño celular por sí mismas, prefiriendo las células basales⁴. Se ha propuesto también que el LP comienza con la alteración o suma de sustancias antigénicas en los queratinocitos. La molécula de adhesión intercelular (MAIC-1) es considerada otro antígeno de los queratinocitos y puede expresarse bajo la influencia de γ e interferón. Esta molécula representa un sitio de unión para la función linfocitaria, asociada al antígeno y como consecuencia aumenta la capacidad citotóxica^{3,12-13} (figura 1).

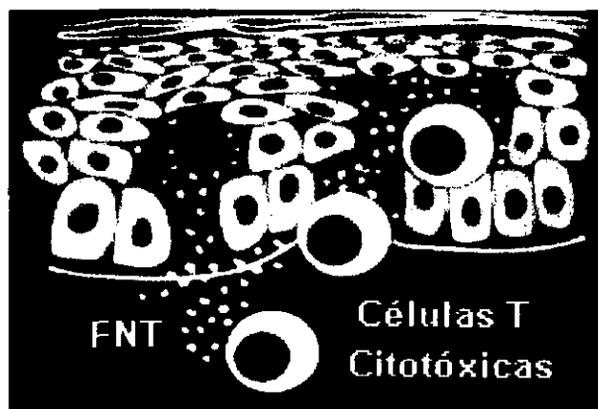


Figura 1. Muestra la patogénesis del LP. La secreción de Factor de Necrosis Tumoral (FNT) contribuye a la degeneración del epitelio, por linfocitos T citotóxicos, estimulados por las células de Langerhans intraepiteliales⁶.

Etiología

Se han planteado varias teorías para explicar la etiología y la interrelación de esta lesión con otras enfermedades. Si bien se desconoce la etiología, actualmente el LP es considerado como una enfermedad de etiología multifactorial, muchos casos se vinculan con drogas y químicos, trauma psíquico o emocional, stress^{10,14}, predisposición genética^{3,10,11}, fenómenos inmunológicos¹⁰, debilidad general¹⁵, infecciones bacterianas, virales o micóticas, traumatismos y factores irritativos¹⁰.

Existen varios agentes exógenos capaces de causar lesiones en la mucosa bucal que presentan imágenes histológicas similares a la del LP. Estas lesiones son agrupadas bajo el nombre de reacciones liquenoides; estos agentes inducen los cambios de la mucosa bucal por contacto entre los más frecuentemente mencionados están: la hipersensibilidad a medicamentos, como los antibióticos, (tetraciclina, penicilina), antiinflamatorios no esteroideos (ácido acetilsalicílico, naproxen, ibuprofeno), los cuales pueden agravar o precipitar el LP; antihipertensivos diuréticos (captopril, propranolol, metildopa, enalapril), antimicóticos (ketoconazol) antimaláricos (cloroquina)¹⁶, psicotrópicos (carbamazepina y clorazepam) así como la obturación de amalgama (principalmente debido al mercurio), el oro y metacrilato, son conocidos como inductores de reacciones liquenoides¹⁷.

Así mismo las lesiones liquenoides de la mucosa bucal son similares a las descritas producidas por drogas o LP idiopático pueden ser parte de la amplia gama de manifestaciones orales asociadas con el virus del Síndrome de Inmunodeficiencia

Adquirida (SIDA), sin embargo se sugiere también una posible asociación entre la zidovudina y el ketoconazol tratamiento de muchos pacientes con SIDA¹⁸.

Tipos

Tiene gran variedad de presentaciones clínicas, estas se basan en datos morfológicos, topográficos y evolutivos, las lesiones varían de modo considerable presentando desde mm a cm de diámetro y van desde lesiones que pueden aparecer como gingivitis descamativa¹⁹, lesiones queratósicas, de apariencia atrófica 12.6 %, papular 12.6%, bulosa 8.3%, reticular, lineal, anular o tipo placa 51.5%, hasta otras erosivas o ulcerativas 27.6%, las lesiones casi siempre son bilaterales, pueden aparecer separada o simultáneamente, es frecuente la combinación de la forma reticular y erosiva^{2,20}. Las diferencias clínicas se relacionan con la intensidad de la agresión autoinmunitaria²¹.

La presentación más frecuente es la forma reticular, que se caracteriza por la presencia de numerosas líneas queratósicas entrelazadas o estrías elevadas y finas denominadas estrías de Wickham que producen un patrón anular o en forma de encaje sobre un fondo eritematoso, suele ser bilateral. La blancura de las lesiones es debido al incremento en la queratinización. Pueden ocasionalmente aparecer pápulas en particular en la intersección de 2 estrías. El sitio afectado con mayor frecuencia es la mucosa bucal. También pueden observarse estrías en la lengua y con menor frecuencia en encía y labios. Esta forma es asintomática o bien presenta síntomas clínicos mínimos y con frecuencia se descubre de modo accidental²². Una

variante clínica de la forma reticular es conocida como anular que se caracteriza por presentar círculos y anillos entrelazados de estrias blanquecinas que pueden ser formados por la distribución papular, además casi siempre es bilateral en mucosa bucal. Los síntomas pueden estar presentes en los casos de LP reticular que sufren erosión o atrofia. Las manifestaciones bucales pueden seguir por varios días, semanas o meses. Las recurrencias son comunes²⁰.

El liquen en forma de placa simula una leucoplasia de distribución multifocal. Las placas varían de lisas, ligeramente elevadas hasta superficies con irregularidades. Por lo general se localizan sobre el dorso de la lengua y la mucosa bucal^{17,22}. Es más frecuente entre pacientes que usan tabaco²³.

La forma erosiva o ulcerativa se observa con mayor frecuencia en la mucosa bucal y en la parte dorsal y lateral de la lengua, la superficie es granular, eritematosa, brillante y puede sangrar con la manipulación más leve. Las zonas donde la erosión es severa suelen estar cubiertas por una pseudomembrana o placa fibrinosa. Es un fenómeno dinámico en el que los patrones de presentación y alteración varían de semana a semana. El examen cuidadoso muestra un componente queratósico localizado en la periferia del sitio de erosión que se manifiesta en forma reticular o estrias finas radiadas²⁴. Las lesiones van precedidas por vesículas o ampollas, las cuales, al romperse dejan zonas denudas. Pueden o no exhibir el signo de Nikolsky (formación de vesículas subepiteliales por la aplicación de presión en la mucosa que esta clínicamente normal)²⁵. Los pacientes con este tipo de LP se quejan de sabor metálico irritación y dolor. Presentan molestias al tomar alimentos picantes, muy

condimentados, fríos o calientes así como con bebidas alcohólicas, de la misma forma al cepillarse y utilizar hilo dental, dando como resultado que la placa bacteriana y el cálculo se acumulen en los dientes y en las áreas afectadas. Esto puede resultar un círculo vicioso, donde los factores locales incrementan la cantidad de inflamación, agravando el proceso de erosión²⁵⁻²⁶. En la mayoría de los casos no es posible establecer un diagnóstico correcto sin biopsias del tejido perilesional¹³. Las lesiones de tipo papular y ulcerativo muestran un curso rápido, mientras que las lesiones atróficas parecen ser más persistentes²⁷.

La forma atrófica del LP puede presentarse conjuntamente con las variantes reticular o erosiva o puede ser un estadio transicional entre estas dos formas. La proporción de áreas queratinizadas y zonas atróficas varían de un lugar a otro y también con relación al tiempo en la misma región anatómica; se localiza con frecuencia en la encía insertada donde presentan un patrón denominado gingivitis descamativa. En los márgenes de las zonas atróficas se observan estrías queratósicas que irradian hacia la periferia y se mezclan en la mucosa que las rodea. Las lesiones gingivales se distribuyen en parches simétricos sobre los cuatro cuadrantes de la encía, la encía lingual se afecta en raras ocasiones o con menor gravedad. Esta forma es casi siempre sintomática y produce ardor o dolor en el área de la lesión¹⁷.

La forma menos frecuente es la variante bulosa o ampollosa, en la cual se encuentran bulas o vesículas cuyo tamaño es desde unos pocos mm (2-4) hasta varios cm de diámetro. Estas bulas o ampollas son de corta duración y al romperse

dejan una superficie ulcerada muy molesta, en la cual queda expuesto el tejido conjuntivo subyacente y la lesión se convierte en un LP erosivo. Por lo general estas lesiones se localizan en la mucosa vestibular, en especial en las regiones posteriores e inferiores, adyacentes al segundo y tercer molar. Otro sitio frecuente es el borde lateral de la lengua y en raras ocasiones se encuentran en la encía o en la zona interna de los labios, donde se localiza de manera característica el LP originado por medicamentos o reacciones liquenoides. Si las lesiones se examinan con cuidado, presentan componentes queratósicos estriados o reticulares. Las formas ulcerativa, atrófica y bulosa se asocian frecuentemente con ardor y dolor intenso²⁷.

La gingivitis descamativa (GD) se utiliza como un término inespecífico que puede corresponder a una gran variedad de alteraciones gingivales, es ampliamente aceptado que corresponde a un diagnóstico clínico y no a una enfermedad en particular sino a un patrón de reacción del epitelio gingival²⁸ se caracteriza por ser una lesión eritematosa, descamativa de encía libre e insertada confinada a la mucosa gingival labial, las superficies linguales y del paladar rara vez se encuentran involucradas. La forma leve de la enfermedad se caracteriza por eritema y edema, la forma moderada y severa presenta parestesia, descamación o formación de ampollas provocando erosiones o úlceras²¹. En los últimos años se ha demostrado que la gran mayoría de los casos son manifestaciones de enfermedades mucocutáneas²⁸. La GD usualmente representa una manifestación de penfigoide, pénfigo vulgar y LP. Aproximadamente el 25 % de los casos de lesiones de GD son una manifestación de LP. Otras alteraciones no dermatológicas menos frecuentes relacionadas con lesiones gingivales descamativas, son desequilibrios hormonales

por deficiencia de estrógenos, infecciones crónicas, deficiencias nutricionales, hipotiroidismo, factores irritantes (respuestas anormales a irritación) y alteraciones idiopáticas, las cuales se presentan con menos frecuencia. Es decir que la GD es una manifestación de diferentes enfermedades y por lo tanto de múltiples etiologías^{6,21-22}.

Los cambios observados en la GD se apoyan en los siguientes hallazgos: 1) Liberación de enzimas por las células del infiltrado inflamatorio 2) Proliferación de células basales y liberación de enzimas incluyendo colagenasa 3) Respuesta inmune que altera los componentes celulares²⁹.

Las reacciones liquenoides tienen una presentación clínica similar a la observada en el LP de tipo reticular^{20,27}.

Características histológicas

Varían según el tipo de LP, sin embargo existen parámetros histológicos semejantes en las diversas variantes, como son la hiperortoqueratosis o hiperparaqueratosis, hiperqueratosis, hipergranulosis, hiperplasia epitelial, atrofia epitelial, erosión, acantosis, pudiendo presentar edema inter e intra celular) clavos epiteliales en "dientes de sierra" (las áreas engrosadas se observan clínicamente como estrías de Wickham) papilomatosis, y licuefacción de la capa basal que puede generar hendiduras conocidas como espacios de Max Joseph así como displasia, se observan queratinocitos disqueratósicos llamados cuerpos coloides o de Civatte, los

cuales se encuentran con mayor frecuencia en las capas espinosa y basal. Hay un incremento en el número de células de Langerhans. Se observa un infiltrado de linfocitos T principalmente^{6,22}, junto con un pequeño número de macrófagos y linfocitos B¹². Cuando las lesiones están ulceradas presentan células plasmáticas, hay un infiltrado perivascular profundo de células inflamatorias y la superficie se encuentra cubierta por una membrana de fibrina^{6,12,22}.

Las características histopatológicas del LP son muy similares a las del LP cutáneo. Sin embargo la hiperqueratosis es más común en el LP, pero las interdigitaciones en forma de sierra son más comunes en el LP cutáneo². Así como la presencia de células plasmáticas y melanófagos³.

Inmunohistoquímica

Con inmunofluorescencia se revela que los depósitos globulares, llamados cuerpos citoides o cuerpos de Civatte contienen inmunoglobulinas (IgM, IgG, IgA), depósitos de fibrina, fibrinógeno y complemento (C₃, C₄, C₅) a lo largo de la membrana basal. Los cuerpos citoides son vistos con más frecuencia en estados activos de la enfermedad y son más comunes en lesiones que en tejido normal, el 97% de los casos de LP lo presentan^{30,32}.

Diagnóstico diferencial

Para realizarlo deben considerarse otras enfermedades que presentan un componente queratósico o blanco, como la candidiasis, glositis migratoria benigna, mucositis areata migrans, estomatitis ulcerativa crónica, erupción medicamentosa, lesiones electrogalvánicas, lupus eritematoso discoide y pénfigo cicatrizal, carcinoma epidermoide, psoriasis²⁴⁻²⁵ y leucoplasia³³.

Cuando las lesiones son rojas están confinadas a la encía, es virtualmente imposible de distinguir el LP erosivo y atrófico del penfigoide, penfigoide de las mucosas benigno, penfigoide buloso y raramente pénfigo vulgar, así como del eritema lineal gingival, asociado con la infección por el Virus de Inmuno-deficiencia Humana y la gingivitis de células plasmáticas en la base del examen clínico e histológico²⁴ por lo que se recomienda la técnica de inmunofluorescencia³⁴.

Asociación con otras enfermedades

Ha sido reportada la asociación del LP con diferentes condiciones patológicas como diabetes³⁵, enfermedades de la colágena, reumáticas⁷ y psiquiátricas¹⁴, colitis ulcerativa³⁶, miastenia gravis³⁷, lupus eritematoso, enfermedades virales y bacterianas¹; también se ha relacionado con pacientes a los cuales se les ha realizado transplante de médula ósea considerándose una reacción crónica de injerto - versus - huésped; se ha observado en pacientes con enfermedades autoinmunes como alopecia areata, morfea, pénfigo vulgar y vitiligo³. Así como con enfermedades

crónicas del hígado, en donde los pacientes presentan evidencia clínica, serológica e histopatológica de desórdenes hepáticos³⁸ y en años recientes en pacientes infectados por el virus de la hepatitis C³⁹.

Transformación maligna

La eritroplasia y leucoplasia son las 2 únicas lesiones consideradas como premalignas en cavidad bucal; en general alrededor del 5.4% de las leucoplasias se transformaran en carcinoma epidermoide, si el paciente es fumador esta incidencia puede aumentar al 16%. Así mismo existen condiciones premalignas dentro de la cavidad bucal como la sífilis, disfagia sideropénica, fibrosis submucosa bucal y LP. El desarrollo del carcinoma epidermoide en un LP preexistente ha sido postulado y debatido por muchos años⁴⁰⁻⁴², actualmente se estima que esta asociación puede ocurrir principalmente en el LP erosivo, (o que presenten áreas rojas asociadas) y en el LP penfigoide; en 0.4% a 2% de los casos especialmente cuando este presente por más de 5 años⁴³⁻⁴⁴; este porcentaje de transformación maligna clasifica al LP como una condición premaligna sobre la base de los criterios de la Organización Mundial de la Salud⁴⁵⁻⁴⁶. Debido a esto es importante que pacientes con diagnóstico de LP sean examinados cuidadosamente con regularidad, ya que una displasia epitelial leve lo puede imitar clínica e histológicamente³³.

Al no ser totalmente conocidos los eventos moleculares que conducen a la transformación maligna de los queratinocitos, resulta atractivo especular que la combinación de eventos, incluyendo salida de citocinas con potencial de transformar

las células epiteliales, inmunosupresión local por el uso frecuente de esteroides tópicos (tratamiento usual del LP) y el incremento en la exposición de agentes carcinogénicos o infecciones virales conducen a la proliferación celular aberrante. Estos efectos que interactúan sinérgicamente pueden inducir alteraciones cromosómicas y la desregularización en la función de los oncogenes¹⁷ trayendo como consecuencia el desarrollo de un carcinoma epidermoide en cavidad bucal.

Silverman y cols. en 1985 reportaron los hallazgos clínicos en un grupo de 570 pacientes con LP, la transformación maligna se presentó en 7 pacientes (1.2 %) de los casos, estableciendo, que los pacientes con LP parece que tienen un riesgo mayor, a desarrollar condiciones malignas bucales, que aquellos pacientes con mucosa bucal normal⁴⁷.

Banard y cols. en 1993 publicaron los resultados de una revisión retrospectiva de 241 pacientes, de ellos 9 pacientes (3.7%) desarrollaron carcinoma invasor o carcinoma in situ, la mayoría de los pacientes presentaron carcinoma en áreas de LP de tipo erosivo y atrófico⁴⁸.

Markopoulos y cols. en 1997 realizaron un estudio para determinar el potencial maligno del LP, en 326 pacientes, estos fueron examinados por períodos que iban de los 6 meses a 10 años (con un promedio de 4,8 años), encontrando transformación maligna en 4 pacientes (1,3%); después de 6,5 años del inicio de las manifestaciones de LP, antes de malignizarse, 3 de los pacientes presentaban LP erosivo, y uno presentaba una combinación de la forma papular y atrófica, concluyeron que la

transformación maligna se presentó relacionada a factores evidentes como antecedentes familiares, irritación local, consumo de alcohol y alteraciones nutricionales⁴⁹.

De la misma forma Lo Muzio en 1998 publicó los resultados obtenidos de 263 pacientes con LP, los cuales tuvieron un seguimiento de 10 años, de ellos 156 eran del sexo femenino y 107 del masculino, 14 casos (5.32%) desarrollaron carcinoma epidermoide, 10 (3.8%) en áreas donde existía LP, 3 (1.14%) en otros sitios, en 1 caso el diagnóstico de LP y carcinoma fue simultáneo. Algunos de los carcinomas se presentaron en los tipos de LP reticular y en placa⁵⁰.

Rajenteran en 1999 también en un estudio retrospectivo pública sus resultados después de revisar los registros de 832 pacientes durante el periodo de 1983 a 1996, un total de 7 pacientes (0.8%) desarrollaron carcinoma incluyendo tres casos de carcinoma in situ⁵¹.

Así mismo Hietanen en 1999 da a conocer los resultados de su estudio retrospectivo en un periodo de 10 años, en 8 pacientes que sufrían de LP y subsecuentemente carcinoma epidermoide bucal. El promedio entre el diagnóstico inicial de LP y carcinoma fue de 3.4 años. Reporta la aparición de una úlcera bucal como manifestación de cambios malignos en 7 de los 8 pacientes. Estos 8 pacientes fueron comparados con los 8 pacientes control con LP sin transformación maligna, se estudio edad, sexo y sitio de las lesiones. Así mismo comparó el tipo de LP y observó que la aparición unilateral del tipo atrófico/erosivo más a menudo precedió cambios

malignos, comparado a la situación de los pacientes control, en quienes fue prevalente el tipo reticular bilateral⁵².

Por otro lado en 1999 van der Meij realizó una revisión de la literatura de 1977 a 1999 en búsqueda de transformación maligna de LP. Utilizando los criterios de Kurtchkoff (diagnóstico original, evidencia histopatológica de al menos 2 de las características de hiperqueratosis o paraqueratosis, dientes en sierra, infiltrado superficial de linfocitos, y licuefacción de células basales; historia y seguimiento, información tal como edad, género, localización precisa así como descripción clínica de la lesión y exposición a tabaco)⁵³. De 98 casos reportados sólo 33 (34%) cubrían los criterios y estaban bien documentados. Una vez hecho el análisis el concluye 1) que los casos reportados no tienen los suficientes argumentos clínicos ni histopatológicos 2) la incidencia anual de transformación en cáncer bucal del LP en 5 años es de 2 a 4 por 100,000 personas muy baja 3) que los investigadores deben profundizar en sus argumentos al momento de escribir este tipo de material⁵⁴.

Aunque el riesgo de transformación maligna de LP es real pero no-alto, existen parámetros clínicos de importancia que deben tomarse en cuenta cuando se sospecha de una condición precancerosa en el LP como: el sitio afectado, presencia de eritroplasia, induración, lesiones elevadas, edad, sexo del paciente, factores etiológicos, historia familiar de cáncer e historia previa de cáncer y deberán tenerse revisiones periódicas de los pacientes para la detección temprana de alguna transformación displásica, estas consideraciones son particularmente importantes en

el caso de LP atrófico, erosivo y en placa, especialmente cuando involucran el dorso de la lengua^{4,47,55}.

Carcinoma epidermoide (carcinoma de células escamosas o carcinoma espinocelular)

La forma más frecuente de cáncer en la cavidad bucal es el carcinoma epidermoide, el cual es una neoplasia epitelial queratinizante con potencial de metástasis, representa del 90 a 95% de tumores malignos que afectan la cavidad bucal⁵⁶⁻⁵⁷. Se presenta con mayor frecuencia en hombres⁵⁶ sin embargo la proporción del desarrollo de carcinoma epidermoide entre hombres y mujeres se ha incrementado en los últimos años en una relación de 3:1 a 2:1, se cree que este cambio se relaciona con el aumento de mujeres fumadoras⁵⁸, raramente ocurre antes de los 40 años, su incidencia se incrementa con la edad alcanzando su cima en la década de los 60' y 70's años⁵⁶⁻⁵⁷ se presenta con mayor frecuencia en pacientes blancos⁵⁹. Mundialmente aproximadamente 500,000 nuevos casos de cáncer bucal y faríngeo son diagnosticados cada año y cerca de 65,000 son desarrollados en la India, donde el cáncer bucal comprende del 30-40% del total de lesiones malignas, generalmente asociado con hábitos de tabaco, principalmente masticado⁶⁰. En el Sudeste y Sur de Asia donde la incidencia de carcinoma epidermoide esta asociada con la hoja de betel y tabaco son extremadamente altos los casos de carcinoma epidermoide este es el quinto más común en la población masculina⁶¹. Un alto promedio de mortalidad de cáncer bucal ha sido reportado en Hungría y Hong Kong con más de 14 muertos por 100,000 personas. Israel, Ecuador y Grecia tienen

aproximadamente 2 muertos de cáncer bucal por 100,000 personas. En los Estados Unidos, aproximadamente 8,000 muertes ocurren por año como resultado de cáncer bucal, un promedio de 5 muertes por 100,000 personas⁵⁹.

Etiología

Múltiples factores de riesgo, están asociados al desarrollo del carcinoma como edad, género, raza, estado inmune, nivel socioeconómico, exposición ocupacional a textiles, níquel, arsenicales y productos destilados del carbón, la radiación solar la cual actúa como un cofactor adicional que contribuye al carcinoma en labio; irritación por mala higiene bucal⁶²⁻⁶³, enfermedad periodontal crónica, dentaduras inapropiadas, dientes con bordes cortantes, electrogalvanismo, edentulismo y enjuagues bucales⁶⁴, la dieta donde existe un incremento en el riesgo con la ingesta de carne roja, proteínas, grasas polinsaturadas, grasa total y colesterol mientras que los vegetales, frutas y legumbres, es decir dieta rica en antioxidantes como vitamina E, C, alfa-caroteno actúan como factores protectores⁶⁵; los virus como la presencia del virus papiloma humano ha sido reportada como un factor iniciador⁶⁶, tiene un papel muy importante como factor etiológico de lesiones premalignas y neoplasias epiteliales malignas, no solo de la mucosa anogenital sino también de la mucosa bucal, se ha acumulado evidencia de la implicación de un número variable de genotipos de este virus como posibles agentes causales de lesiones proliferativas escamosas⁶⁷⁻⁶⁸, factores genéticos (se han encontrado frecuentes alteraciones genéticas en los brazos cortos de los cromosomas 3, 9 y 17)⁶⁹ así como el uso del

tabaco inhalado o masticado; en fumar de pipa y puro, provocando mayor riesgo en los dos últimos así como el alcohol.

Los factores de riesgo más importantes son la exposición crónica al tabaco, este se relaciona con el tiempo y la dosis de los carcinogénicos del humo del tabaco y el consumo de alcohol, el cual al parecer aumenta el riesgo de presentar la enfermedad, se considera que el alcohol es promotor y no iniciador, del cáncer, y este efecto se debe a la capacidad de irritación de la mucosa y la de actuar como solvente de los agentes carcinogénicos, cualquiera de los dos, uno por uno o en combinación, para el efecto sinergista pueden desencadenar cambios malignos en una mucosa bucal sistémica y genéticamente condicionada^{68,70-72}. Por lo que la más alta incidencia y mortalidad es en ciudades de Europa donde la producción y consumo de vino ha sido tradicionalmente alto como en: Francia, Italia, Portugal, Luxemburgo y Alemania, así como en Irlanda y Dinamarca ciudades en donde la prevalencia de fumadores es más alta entre mujeres⁷³.

Por otra parte, independientemente de los agentes carcinogénicos existen factores propios del huésped que también se encuentran involucrados en el desarrollo del cáncer dentro de los cuales tenemos factores inmunológicos y/o genéticos. Los genes (reguladores negativos de la proliferación y la diferenciación) que predisponen al cáncer pueden actuar no solo afectando la vía del sistema de vigilancia inmunológica del huésped para reconocer y eliminar tumores incipientes sino que además pueden alterar la habilidad de los genes para reparar el daño al ADN.

Así que el cáncer es una enfermedad de etiología multifactorial en donde los factores de riesgo actúan sobre el genoma de las células como iniciadores o promotores en el complejo proceso de transformación celular hacia formas de mayor complejidad biológica, así mismo se encuentran involucrados múltiples procesos para su iniciación, promoción y progresión tumoral⁶.

Características clínicas

El carcinoma epidermoide clínicamente se caracteriza por iniciar como una mácula o placa eritematosa de superficie lisa aterciopelada ligeramente elevada que presenta un tamaño muy pequeño; observándose en ocasiones leucoplasia así como úlceras crónicas que no cicatrizan o lesiones exofíticas y placas blancas o rojas⁷⁴ así mismo puede aparecer como una úlcera indolora, una masa tumoral o una excrecencia verrucosa (papilar). El carcinoma que ha infiltrado profundamente en el tejido conjuntivo puede tener pocos cambios superficiales, pero aparece como un área indurada firme con pérdida de la movilidad del tejido. En el piso de boca esta lesión produce habitualmente fijación de la lengua e imposibilidad de abrir la boca totalmente. El carcinoma epidermoide que invade la encía hasta el maxilar o la mandíbula subyacente puede llevar a movilidad o pérdida de dientes⁶. En estadio avanzado puede presentarse en tres formas clínicas:

a) tipo exofítico: con crecimiento en forma vegetante, hacia afuera, observándose una tumoración de superficie irregular y dura a la palpación.

b) tipo endofítico: que corresponde a la típica úlcera neoplásica, la cual se caracteriza por tener una forma irregular, con bordes evertidos y fondo sucio. A la palpación se percibe dureza y sensación de infiltración en los tejidos profundos.

c) tipo mixto: aparecen asociadas las dos formas anteriores⁷⁴⁻⁷⁵.

Distribución

El desarrollo del carcinoma epidermoide en diversas localizaciones anatómicas es distinto, algunas áreas parecen ser relativamente inmunes, mientras que otras parecen ser especialmente susceptibles al mismo. Cuando se tienen en cuenta todas las localizaciones anatómicas, el labio inferior es el sitio más propenso, representa del 30 al 40% del total de carcinomas bucales⁷⁶⁻⁷⁷. Intrabucalmente los bordes laterales de la lengua, así como su cara ventral y el piso de la boca son los sitios más comunes, los bordes laterales hacia la base de la lengua constituyen el 50% del total de lesiones intrabucales^{73,76}, el piso de boca constituye aproximadamente un 20% del total de carcinomas bucales, seguidos por la parte posterior del paladar blando, especialmente en las áreas adyacentes a los pilares amigdalinos. Las lesiones en esta localización representan aproximadamente un 15% de los carcinomas intrabucales. Con menor frecuencia, el punto de origen es el área del surco gingival representan del 4 al 6%. La mucosa del carrillo, especialmente por encima de la línea oclusal, se ve afectada raras veces aproximadamente del 1 al 2%. Comparados con otras localizaciones intrabucales,

son relativamente raros los carcinomas originados en el paladar duro y el dorso de la lengua^{6,22,76}.

Las etapas de una lesión individual son determinadas por las siguientes consideraciones:

1. Tamaño y extensión de la lesión primaria
2. Grado de infiltración de la lesión primaria
3. Presencia o ausencia de metástasis de los ganglios linfáticos regionales
4. Presencia o ausencia de metástasis a distancia
5. Ganglios contralaterales involucrados
6. Ganglios fijos o no

El parámetro pronóstico más importante es el estado clínico y es el único que puede ser modificado por la detección temprana, ya que el tratamiento de una lesión pequeña incrementa el promedio de supervivencia y decrece la morbilidad. Los otros factores que influyen el pronóstico son el sitio de la neoplasia, el grado de diferenciación histológica, el grado de respuesta inflamatoria, el modo de invasión⁷⁸⁻

79

Características histológicas

El carcinoma epidermoide así como la displasia epitelial son microscópicamente caracterizadas por un abundante infiltrado linfocitario en el tejido conjuntivo subyacente a los cambios epiteliales. Esta apariencia microscópica es

similar a la que se ve en el LP, por lo tanto muchos casos tempranos de cualquiera de los dos, carcinoma epidemoide y la llamada displasia liquenoide puede ser engañosa de una temprana malignidad o premalignidad desarrollada en un LP. Las características citológicas que constituyen a los cambios displásicos incluyen: pérdida de la polaridad de células basales, presencia de más de una capa de células con apariencia basaloide, pérdida de la relación: núcleo-citoplasma, aumento en el número de mitosis, normales o atípicas, presencia de mitosis en la mitad superficial del epitelio, pleomorfismo celular, hiperchromatismo nuclear, agrandamiento nucleolar, disminución de la cohesión celular, queratinización de células individuales, o en grupos de células del estrato espinoso, procesos del epitelio en forma de "gota". Estas características histológicas y citológicas pueden variar en diversas áreas de la misma lesión^{6,22}.

Metástasis

En general la frecuencia de metástasis⁷⁵ se correlaciona con el tamaño y profundidad de invasión, el sitio de origen, el grado de diferenciación⁷⁴ y grado de respuesta inflamatoria^{74,80} (figura 2).

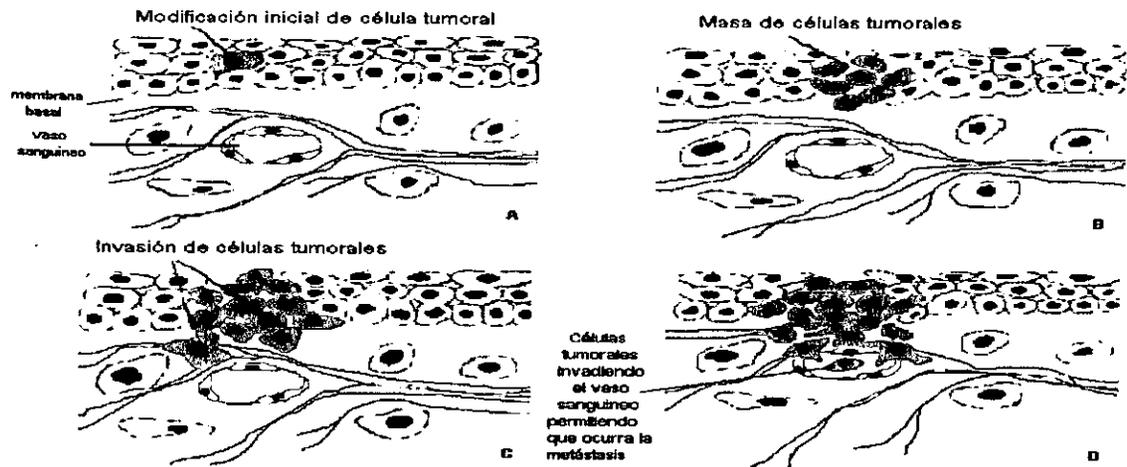


Figura 2. Muestra las etapas del crecimiento del tumor y metástasis. Las células tumorales pueden extenderse a los vasos sanguíneos y distribuirse en otros sitios distantes, en el cuerpo. Lodish H y cols. Molecular Cell Biology.

Diagnóstico diferencial

Se debe hacer con úlceras crónicas que no cicatrizan, cuando los labios están involucrados se debe hacer el diagnóstico con queilitis simple ya que las lesiones tempranas pueden ser parecidas, también se debe hacer con queratosis actínica asintomática, en lesiones avanzadas crateriformes deben ser diferenciadas de queratoacantomas²⁴.

Pronóstico

A pesar del progreso en el diagnóstico y tratamiento el promedio de vida es a 5 años para los blancos 55% (rango 20-81%) y en negros es de 33% (rango 10-68%)⁷⁸.

Se han propuesto algunos sistemas de clasificación histológica para correlacionar la diferenciación del carcinoma epidermoide con los parámetros clínicos particularmente con el pronóstico, Broders en 1926 dividió a los carcinomas en 4 grados dependiendo la proporción de células anaplásicas, Thomson en 1939 uso un sistema más sencillo dividiendo el tumor en 3 estadios; bien diferenciado, moderadamente diferenciado y poco diferenciado, dependiendo del grado de queratinización que presentan las células tumorales y la similitud entre la arquitectura del tejido y el epitelio^{6,78}. Los tumores que producen cantidades importantes de queratina y presentan algunos rasgos de maduración desde las células basales hasta la queratina se consideran bien diferenciados. Los tumores que producen escasa o nula queratina pero en los cuales el epitelio todavía es reconocible como plano estratificado, a pesar de su importante desviación de la normalidad, se consideran como moderadamente diferenciados. Los tumores que no producen queratina tienen poco parecido con el epitelio, muestran una significativa falta de patrón estructural normal y de cohesión de las células y presentan alteraciones celulares extensas se designan como poco diferenciado, este sistema el cual es ampliamente utilizado en la actualidad es un método muy subjetivo para clasificar un tumor⁷⁸ sin embargo, una combinación de estos factores se estableció en la clasificación pronóstica de Jakobsson, quién propuso un sistema de clasificación altamente complejo basado en 8 factores, cuatro relacionados a factores intrínsecos del tumor y cuatro relacionados al tejido huésped; se considera una de los mejores sistemas para evaluar el potencial invasor y metastásico⁸⁰⁻⁸¹. A continuación se describen los criterios de Jakobsson.

Criterios de Jakobsson

Factores intrínsecos a la neoplasia

Grado de queratinización: se evalúa la formación de perlas córneas o zonas con queratinización individual.

Polimorfismo nuclear: se observa el número, tamaño y forma de los núcleos de las células tumorales.

Número de mitosis: se deben observar numerosos campos.

Grado de queratinización	Polimorfismo nuclear	Número de mitosis (en 10 campos a 400x)
I. Neoplasia con queratinización mayor de 50%	I. Más del 75% de las células son maduras	I. 0-1 mitosis
II. Neoplasias moderadamente diferenciadas con queratinización que oscila entre un 20 a un 50%	II. Moderado polimorfismo, del 50 al 75% son células maduras	II. 2-3 mitosis
III. Mínima queratinización de 5 a 10%	III. Abundante polimorfismo nuclear, del 25 al 50% son células maduras	III. 4-5 mitosis
IV. Mínima o nula queratinización individual	IV. Polimorfismo nuclear extremo, del 0 al 25% son células maduras	IV. Más de 6 mitosis

Factores relacionados entre huésped y tumor

Patrón de invasión: se observan las características infiltrativas.

Estado de invasión tumoral: define a la profundidad de la invasión de la neoplasia.

Infiltrado linfoplasmocitario: reflejo del estado inmunológico del huésped frente a la neoplasia, no se debe evaluar zonas ulceradas⁸².

Patrón de invasión	Estado de invasión Tumoral	Infiltrado linfoplasmocitario
I. Areas o mantos sólidos de células con bordes definidos o de tipo empujante	I. In situ o invasión cuestionable	I. Infiltrado abundante de linfocitos o de células plasmáticas en estrecha relación con las células tumorales
II. Neoplasias con infiltración en cordones sólidos, bandas o listones	II. Invasión hasta la lámina propia	II. Infiltrado moderado
III. Grupos pequeños o cordones delgados no mayores de 15 células	III. Invasión por debajo de la lámina propia, en áreas adyacentes de músculo, tejido de glándulas salivales y periostio	III. Infiltrado ligero
IV. Marcada invasión estrómic individual o en grupos menores de 15 células	IV. Invasión a través del hueso o invasión profunda de planos musculares	IV. Infiltrado nulo

Se clasifica de 1 a 4 y el grado de malignidad es la suma de la puntuación. Una alta puntuación indica un pobre pronóstico. Sin embargo este sistema de clasificación es de uso complicado y no se relaciona bien con el pronóstico^{76,81}. No obstante, de alguna manera estos parámetros han permitido identificar grupos de pacientes con riesgo de persistencia y recurrencia tumoral. La necesidad de establecer criterios más precisos para controlar la enfermedad ha estimulado la búsqueda de otros procedimientos capaces de ofrecer información relacionada con el comportamiento del tumor y la respuesta del huésped al tratamiento.

Ciclo celular y patogénesis del cáncer

En la génesis del cáncer se involucran fenómenos complejos, así como la existencia de pasos múltiples propuestos por Beremblum y Shubik, caracterizados por alteraciones biomoleculares en especial las relacionadas con el ciclo celular y su participación en estos fenómenos, por lo que es necesario recordar los eventos del ciclo celular^{73,82}.

El ciclo celular es un conjunto ordenado de eventos que culmina con el crecimiento de la célula y la división en dos células hijas; se puede definir como una secuencia repetitiva de fenómenos bioquímicos y morfológicos al acontecimiento bioquímico clave del ciclo, que es la replicación de los filamentos de ADN que forman los cromosomas. Las células que no están en división no se consideran que estén en el ciclo celular. Si una célula no puede completar el ciclo este impedimento la lleva a la muerte, esto sugiere que en este punto de restricción ocurren procesos

bioquímicos de naturaleza irreversible que comprometen a la célula a completar el ciclo. Las etapas del ciclo celular son dos la mitosis y la interfase, la última esta constituida por, G1-S-G2 (figura 3). G1 es el período de síntesis activa de ARN y proteínas durante la cual las células hijas aumentan de tamaño, ocupa del 30 al 40% del ciclo celular. La fase S representa el período de la síntesis de ADN y se extiende a lo largo del 30 al 40% de la duración del ciclo, esta es la fase donde ocurre la replicación del ADN y la fase G2 es corta y ocupa del 10 al 15% de la duración del ciclo, durante la cual tienen lugar los preparativos para la división⁸³⁻⁸⁴. Por lo que la interfase consiste en el período entre dos episodios sucesivos, intervalo entre el final de una mitosis y el comienzo de la siguiente, la célula esta en actividad metabólica preparándose para la mitosis.

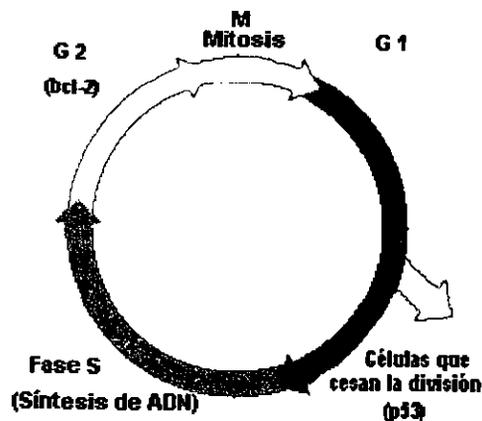


Figura 3. Muestra las dos etapas del ciclo celular. La interfase constituida por G1-S-G2 y la mitosis⁸⁴.

La fase M representa los fenómenos morfológicamente visibles de la "mitosis" y es cuando ocurre la división nuclear (los cromosomas se separan) así mismo la membrana citoplasmática (citocinesis), la mitosis se divide en 4 fases con fines descriptivos (profase, metafase, anafase y telofase)⁸⁴⁻⁸⁵ (figura 4).

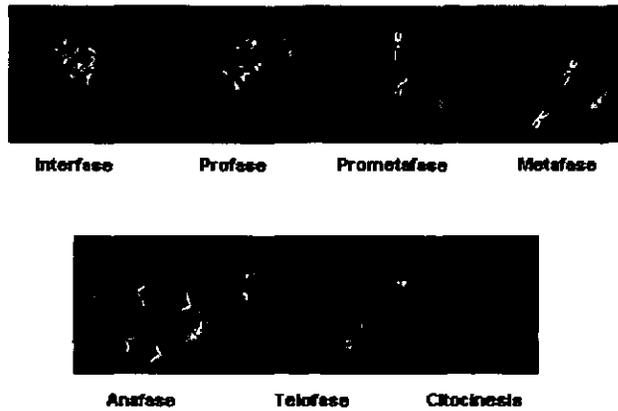


Figura 4. Ilustra las fases de la mitosis y la citocinesis⁸⁴.

La progresión y el control del ciclo celular son realizados por eventos bioquímicos, una familia de cinasas, cuya acción catalítica es dependiente de la unión a proteínas ciclinas, estas son las llaves principales de control del ciclo celular provocando que la célula se mueva de G1 a S o G2 a M (figura 5). La proteína p27 puede ser la más comprometida en la regulación a juzgar por los altos niveles observados en células que disminuyen su activación⁸⁴⁻⁸⁵.

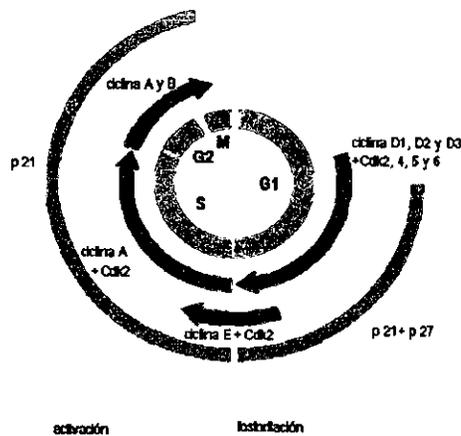


Figura 5. Muestra la actividad de las ciclinas y las ciclinas dependientes de cinasas en el ciclo celular. Santa Cruz Biotechnology Inc. Research antibodies 2000.

Las células que conducen al cáncer pueden mostrar, en su mayoría, alteraciones en las secuencias del ADN que contienen una alteración heredable,

también pueden existir cambios que no afectan directamente el ADN pero sí al patrón de expresión de un gen, en general el cáncer no es causado por un solo evento genético, sino es el resultado de varias alteraciones independientes ocurridas en una célula con efectos acumulativos.

Las mutaciones que dañan los mecanismos reparadores del ADN impiden sus funciones y aumentan el ritmo habitual de mutaciones espontáneas que llevan al cáncer. Se ha observado un aumento de neoplasias en enfermedades con deficiencias en la reparación del ADN, elementos como la proteína p53 detienen el ciclo celular en ciertas fases y permiten la reparación del ADN hasta que sea viable o en su defecto inducen a la muerte celular⁸⁶.

En resumen el cáncer es una enfermedad donde la regulación del ciclo celular esta alterada y el crecimiento normal así como el comportamiento de la célula se pierden. Los cambios ocurridos desde la transformación primaria de la célula hasta el establecimiento de un tumor maligno se acompañan de alteraciones moleculares y morfológicas. La extrapolación de modelos experimentales de la carcinogénesis, el modelo en "*pasos múltiples*", encuentra fundamentación en estos eventos.

Por otra parte las relaciones comprendidas entre las vías del ciclo celular y los factores externos e internos que la modulan han revelado tantas conexiones que hace difícil delimitar los pasos en la formación de tumores; ya que varias vías se afectan a la vez y se descubren constantemente nuevos elementos en el sistema⁸⁶⁻⁸⁷.

Carcinogénesis y agentes carcinogénicos

Existe una relación directa entre la carcinogénesis y mutagénesis inducidas por 3 clases de agentes:

Carcinógenos químicos: que causan cambios locales en la secuencia del ADN.

Carcinógenos biológicos; como los virus: que introducen sus secuencias nucleótidas en el interior de la célula.

Carcinógenos físicos como radiaciones ionizantes y ultravioleta que: provocan translocaciones y rupturas de cromosomas.

Algunos carcinógenos, fundamentalmente químicos, actúan directamente en las células o funcionan indirectamente después de haber sido transformados en metabolitos reactivos.

Cuando se produce alteración del ADN se advierten 3 posibilidades para la célula: pueden actuar los mecanismos de reparación del daño y la célula regresar a la normalidad, la célula puede morir o puede pasar a ser una célula iniciada en la transformación.

En la carcinogénesis se distinguen tres etapas: La etapa de iniciación, donde agentes físicos, químicos y biológicos pueden inducirla. En esta etapa existen cambios reversibles e irreversibles en el genoma de células previamente normales, las cuales se vuelven más susceptibles a una transformación maligna. La iniciación

como cambio molecular heredable no es un evento suficiente, la proliferación de las células alteradas requiere de otro paso: la promoción⁸⁶.

La etapa de promoción se da por los efectos ambientales de las células iniciadas y se manifiesta por la adquisición de los cambios fenotípicos malignos incluyendo una forma celular atípica y un crecimiento progresivo. Algunos grupos de promotores químicos, moléculas y factores de crecimiento pueden inducir a las células iniciadas a pasar a la fase de promoción. Las lesiones proliferativas atípicas focales retroceden cuando el efecto promotor es retirado y reaparecen cuando se vuelve a administrar.

El efecto de los promotores es estimular la división de una célula que sufrió previamente una mutación por la acción de un agente iniciador. La célula iniciada responde ante la acción del promotor con un crecimiento distinto a las células normales. Los agentes promotores pueden ser exógenos o endógenos. Los hidrocarburos policíclicos aromáticos desprendidos en la combustión de tabaco representan un ejemplo de elementos exógenos muy ricos tanto en agentes iniciadores como en promotores, razón por la cual han sido empleados en modelos experimentales de carcinogénesis. Entre los promotores endógenos podemos puntualizar que los agentes promotores no son necesariamente carcinogénicos pero pueden causar cáncer si actúan sobre una exposición previa a un iniciador.

Dentro de los procesos de iniciación-promoción, es conveniente reflexionar sobre la gran susceptibilidad de las poblaciones celulares que han sufrido un daño

inicial en el ADN, las cuales no evidencian aún cambios morfológicos identificables que permitan un diagnóstico precoz y que son blanco fácil de las acciones promotoras de productos químicos o elementos físicos con capacidad de actuar sobre los mecanismos del control y proliferación celular potenciando sus efectos mediante el fenómeno de sinergismo.

La etapa de progresión se caracteriza por la adquisición de cambios fenotípicos malignos incluyendo invasión, metástasis, tendencia a un crecimiento autónomo y a un aumento de un cariotipo inestable. Durante el período de progresión, las células, hasta entonces premalignas, hacen su conversión en células malignas a través de un proceso multifocal donde unas se transforman más rápido que otras. La progresión de clones que han transitado por etapas de iniciación-promoción, puede ocurrir espontáneamente debido a la inestabilidad genética propia de la célula y puede ser acelerado por la exposición de elementos genotóxicos que actúan sobre éstas (figura 6).

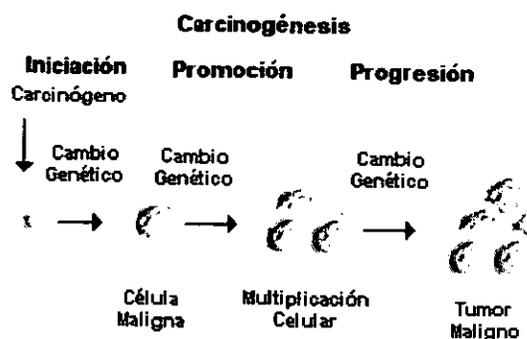


Figura 6. Muestra las etapas de la carcinogénesis, esta comienza cuando una causa carcinógena o un cambio genético alteran el ADN de una célula normal.

Independientemente de los agentes promotores el mecanismo común para la iniciación del cáncer parece ser a través del daño al ADN dando como resultado una

pérdida del control de la proliferación celular donde las células malignas no tienen restricción en el control de crecimiento como las células normales por lo cual el cáncer es considerado una alteración en el material genético. Las alteraciones cromosómicas a menudo están relacionadas estrechamente con genes denominados oncogenes y genes supresores del tumor que parece ser que tienen papeles específicos en la oncogénesis. El concepto moderno de oncogénesis se basa en la interacción de factores que regulan el crecimiento celular y el proceso de diferenciación, existiendo información sobre las alteraciones de los oncogenes y/o sus productos proteicos y el papel que juegan en la génesis de enfermedades premalignas y malignas⁸⁶⁻⁸⁷.

Oncogenes y antioncogenes

Los proto-oncogenes en condiciones normales codifican proteínas que promueven el crecimiento celular, por lo que están presentes en todas las células⁸⁸. Aproximadamente se reconocen 100 proto-oncogenes en el hombre; muchos de ellos codifican elementos como receptores transmembrana, proteínas de secreción, proteínas cinasas y proteínas reguladoras que controlan la conducta "social" de las células⁸⁹. Así mismo codifican para proteínas que normalmente tienen importantes funciones en la regulación del crecimiento y diferenciación de células y tejidos tales como: factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento y reguladores de la expresión de genes⁸⁷. Estos pueden "activarse" por diferentes alteraciones como mutaciones puntuales en la secuencia codificante, amplificación génica o reordenamiento cromosómico que incluye la translocación⁸⁹. La mutación de ellos

frecuentemente perpetua la activación de la cascada constitutiva existente entre el receptor hasta el último eslabón de la división celular. Existen 2 rutas mutacionales: la primera es realizada por genes estimuladores con efecto dominante; la segunda es la de inactivar un gen inhibitorio de carácter recesivo; por lo que los oncogenes o genes causantes de cáncer, derivan de los proto-oncogenes, genes celulares que promueven el crecimiento y la diferenciación normal. Su descubrimiento llevó a la conclusión de que muchas células presentan el potencial de malignidad a través de la activación de genes específicos, una pequeña minoría de ellos parece participar en el desarrollo de los tumores, ellos son requeridos en la función de división y diferenciación celular en condiciones normales. Estos codifican proteínas denominadas oncoproteínas, que se parecen a los productos normales de los proto-oncogenes, con la excepción de que las oncoproteínas carecen de importantes elementos reguladores y que su producción por las células transformadas no depende de factores de crecimiento u otras señales externas. Cada uno de ellos puede activarse en un camino distinto en las células y el subsecuente cambio puede ser complementario a las alteraciones inducidas por otros oncogenes⁸⁷.

Los productos de los genes supresores de tumores aplican frenos a la proliferación celular. En cierto sentido el término "genes supresores de tumores" es inadecuado debido a que la función fisiológica de estos genes es regular el crecimiento celular, no prevenir la formación de tumores. Debido a que la pérdida de estos genes es un hecho clave en muchos tumores humanos, posiblemente en todos y dado que su descubrimiento derivó del estudio de tumores, persiste el nombre de supresor de tumor o anti-oncogen⁸⁸⁻⁸⁹.

Los oncogenes se clasifican en: oncogenes relacionados a factores de crecimiento, relacionados a receptores, trasductores de señales, nucleares y reguladores de muerte celular^{75,89-90}.

Apoptosis

La apoptosis es una forma compleja de muerte celular que se caracteriza por cambios tanto morfológicos como bioquímicos mediados genéticamente; irreversible influenciada por el microambiente extracelular (citocinas, hormonas, agentes químicos, físicos o virus)¹⁰⁴⁻¹⁰⁵ se caracteriza por ser el conjunto de cambios citoplásmicos y nucleolares que provoca la autodestrucción activa de células aisladas o de pequeños grupos en los tejidos sin afectar células vecinas, ejerce un papel fundamental en la regulación de las poblaciones celulares que han sido identificadas en un amplio rango de circunstancias fisiológicas y patológicas siendo inducida por una variedad de estímulos, considerándose que juega un papel importante en la carcinogénesis, esta regulada por oncogenes y genes supresores de tumores⁹⁰⁻⁹³.

Morfológicamente se caracteriza porque el núcleo se colapsa, la cromatina se margina, condensándose y formando masas granulares en la periferia. El ADN se fragmenta, se pierden las uniones intercelulares, desapareciendo el contacto con las células vecinas, hay condensación citoplásmica y la célula adquiere una forma con múltiples protuberancias que contienen organelas en su interior llamadas "buds". El núcleo se fragmenta y estos fragmentos son englobados por la membrana citoplásmica, al igual que las organelas intactas, formando varios cuerpos

apoptóticos que después serán fagocitados por los macrófagos y las células vecinas. Este proceso ocurre sin producir una reacción inflamatoria. En el epitelio las células de Langerhans y los macrófagos pueden fagocitar células apoptóticas⁹³⁻⁹⁶ (figura 7).

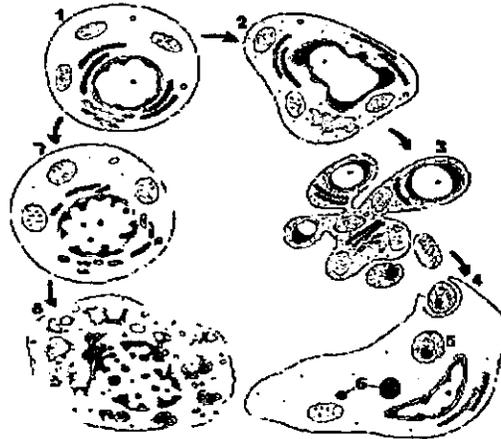
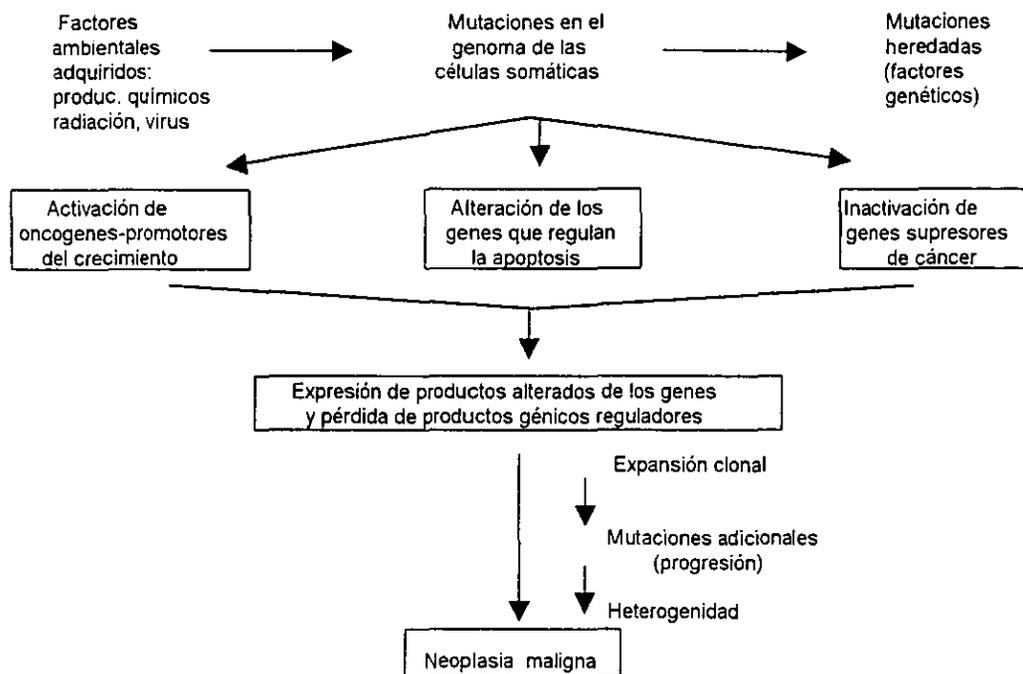


Figura 7. Ilustra una célula normal (1), la secuencia de cambios ultraestructurales en la apoptosis (2-6) y necrosis (7 y 8). La apoptosis temprana (2) es caracterizada por compactación y marginación de la cromatina nuclear, condensación del citoplasma, el perfil celular y nuclear se encuentra alterado. (3) En un estado posterior, los fragmentos del núcleo y protuberancias que se forman en la superficie celular se separan y producen los cuerpos apoptóticos, que (4) son fagocitados por células cercanas y (5 y 6) degradadas por lisosomas. (7) El desarrollo de necrosis es asociada con un grupo irregular de cromatina, marcada, hinchazón del organelo y trastorno focal de las membranas. (8) Las membranas son desintegradas subsecuentemente, pero las células usualmente conservan su forma hasta que son removidas por fagocitos mononucleares⁹⁸.

Las alteraciones relacionadas con la inadecuada supresión de la apoptosis incluyen lesiones premalignas y malignas así como enfermedades autoinmunes; poco se conoce de la naturaleza exacta de los cambios apoptóticos durante la transformación de un tejido normal a maligno existiendo datos los cuales son contradictorios aunque actualmente se sabe que este proceso es mediado por la interacción de proteínas y receptores de superficie celular, algunos genes codifican proteínas específicas que pueden encontrarse en sitios específicos de las células teniendo efectos estimuladores o inhibidores de la apoptosis, algunas de las proteínas asociadas a apoptosis incluyen bcl-2 y p53⁹⁵⁻⁹⁶ (cuadro 1).



Cuadro1. Diagrama de flujo que muestra un esquema simplificado de la carcinogénesis⁷⁵.

Bcl-2

El gen *bcl-2* forma parte de una amplia familia en la que se incluyen otros genes cuyo denominador común es el control de la apoptosis, se dividen funcionalmente en dos grupos antagónicos: genes supresores de la apoptosis como es *bcl-2* y genes promotores como el *Bax*. La relación *bcl-2/Bax* determina si la célula sobrevive o sufre apoptosis como consecuencia de un estímulo apoptótico. Cuando *Bax* predomina se activa la muerte programada suprimiéndose el efecto supresor de *bcl-2*. Es decir en muchas células la apoptosis esta controlada por inhibidores como *bcl-2* (B-cell leukemia/lymphoma-2)⁹⁷ que codifica una oncoproteína describiéndose inicialmente su activación en procesos hematológicos y linfoides, en 80% de linfomas centrolímbulares y en 20% de los linfomas B. La expresión aumentada de esta oncoproteína tiene lugar como consecuencia de la translocación cromosomal t 14;18

q32;q21, esta translocación lleva una parte del gen, en el cromosoma 18 que sitúa al proto-oncogen *bcl-2* en la vecindad de un potente gen promotor (cadena pesada de la inmunoglobulina) en el cromosoma 14 (figura 8)⁹⁸. Codifica para una proteína de 24 a 26 kDa localizada en la membrana plasmática, en la membrana mitocondrial externa, así como en la del retículo endoplásmico y en menor extensión en las membranas nucleares⁹⁸⁻⁹⁹. La muerte de una variedad de células puede ser prevenida por *bcl-2* ya que funciona evitando la muerte celular causada por atrofia⁹⁵. Así mismo esta involucrada en la tumorigénesis por bloqueo de la apoptosis, pues previene la muerte de las células neoplásicas y causa su transformación maligna por supervivencia celular prolongada más que por proliferación celular incrementada⁹⁸.

Por extraño que parezca, ciertas células normales fabrican niveles altos de *bcl-2*. Esta proteína parece proteger a las células cuya pérdida sería devastadora para el cuerpo, pero ese escudo tiene un precio. Si las células en cuestión se tornan neoplásicas, desarrollan tumores más agresivos. Protegidas por *bcl-2*, tienen una probabilidad menor de morir que otras células tumorales. En consecuencia, pueden ser más propensas a desarrollar metástasis en tejidos que no suministran los factores de supervivencia sintetizados por sus tejidos de origen. Las células que carecen de *p53* o que producen niveles elevados de la proteína inhibidora *bcl-2*, pueden por tanto volverse resistentes a los efectos de los tratamientos antineoplásicos⁹¹. Los datos *in vitro* sugieren que la expresión de *bcl-2* puede estar relacionada a la quimioresistencia debido a la inhibición de drogas que inducen apoptosis. Además también ha sido demostrado que *bcl-2* protege a células de mamíferos del efecto de la colchicina y de inhibidores de síntesis de proteína así

como de esteroides, de calor y radiación. En condiciones fisiológicas la expresión de *bcl-2* está relacionada a la embriogénesis y probablemente actúa como regulador morfogénico en varios tejidos humanos¹⁰⁰.

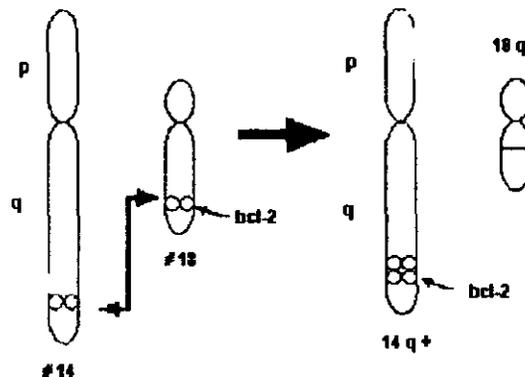


Figura 8. Muestra la translocación t(14;18) del gen *bcl-2*

La expresión de *bcl-2* se observa en células basales de epitelio humano normal, pero no en las células de las capas suprabasales¹⁰¹. Aunque parece tener una actividad más importante en unas células que en otras, se expresa fuertemente en los melanocitos y levemente en los queratinocitos de la piel¹⁰².

Se considera que la transformación maligna puede originarse por la activación de la maquinaria mitogénica de las células e inactivación de los inhibidores del crecimiento y la maquinaria apoptótica por mutaciones múltiples directas. Existen sin embargo, diferentes caminos que conducen a la apoptosis y no todos, son controlados por *bcl-2*¹⁰².

Se han realizado diversos estudios para determinar la expresión de *bcl-2* en diferentes lesiones. Bloor y cols. en 1999 realizaron un estudio con el propósito de

examinar la frecuencia de apoptosis en 26 pacientes con LP de tipo reticular y en 8 pacientes con mucosa bucal normal como control. Utilizaron diversos anticuerpos MIB-1, Bax y bcl-2. En 2 biopsias de mucosa bucal normal, bcl-2 estuvo escasamente expresada en células basales y suprabasales y ausente en el resto de las biopsias de mucosa bucal normal. En 15 casos de LP, bcl-2 también se expresó escasamente en las células basales y suprabasales aunque en niveles más altos que en el epitelio bucal normal, se encontró aproximadamente 1 célula apoptótica por milímetro en la capa basal, en la mayor parte de los casos de LP muchos linfocitos en la parte superficial del corium mostraron reacción en el núcleo para bcl-2. Concluyendo que un número incrementado de apoptosis fue detectado en LP, especialmente en asociación con el infiltrado linfocitario y que la proliferación de las células no se correlaciona con la apoptosis¹⁰³.

De la misma forma Jordan y cols. en 1996 realizaron un estudio sobre la inmunoexpresión de bcl-2 y Bax en 30 carcinomas epidermoides de cavidad bucal correlacionándolos con el grado de diferenciación, encontrando una moderada e intensa inmunoexpresión para bcl-2 en 18/30 de tumores (60%) y en 19/30 para bax es decir 63%. La inmunoreactividad fue intensa en los carcinomas pobremente diferenciados 6/7 (86%), en contraste con la inmunoreactividad para bax la cual fue intensa en los carcinomas bien diferenciados 8/11 (72%). Sus resultados mostraron que alteraciones de bcl-2 y bax pueden jugar un papel en el desarrollo de carcinoma epidermoide lo cual sugiere que la proteína bcl-2 es regulada por medio de una proteína llamada bax que contrarresta sus efectos y promueve la apoptosis⁹⁷.

Así mismo se han publicado reportes relacionados a la expresión de bcl-2 en procesos malignos de próstata, endometrio, mama, carcinoma de células basales, neuroblastomas^{101,104}, así como melanomas malignos cutáneos¹⁰⁴ y nevos intradérmicos; encontrando que no se expresa la proteína en lesiones melanocíticas, sugiriendo que esta oncoproteína puede no estar involucrada en la transformación maligna de células melanocíticas¹⁰³. Así mismo se ha estudiado la expresión de bcl-2 en enfermedades originadas de los queratinocitos como son: dermatitis crónica, psoriasis, queratosis seborreica, carcinoma in situ, queratosis actínica y enfermedad de Bowen encontrando escasa expresión en dermatitis crónica psoriasis y queratosis seborreica, no así en las lesiones premalignas y malignas, en donde hay una fuerte expresión de bcl-2¹⁰⁵.

p53

Existen dos formas de p53, el tipo silvestre y la proteína mutante. Este gen supresor es una proteína con un peso molecular de 53 Kilodaltons¹⁰⁶, está formada por 393 aminoácidos, es codificada por un gen en el cromosoma 17p, esta implicada en la reparación del daño al ADN, regula la replicación del ADN, la división y la muerte celular (figura 9)^{90,107}. El tipo silvestre es una fosfoproteína que puede suprimir la proliferación y es un potente inhibidor de la transformación celular mediada por oncogenes es decir actúa como un supresor de tumor^{75,107}.

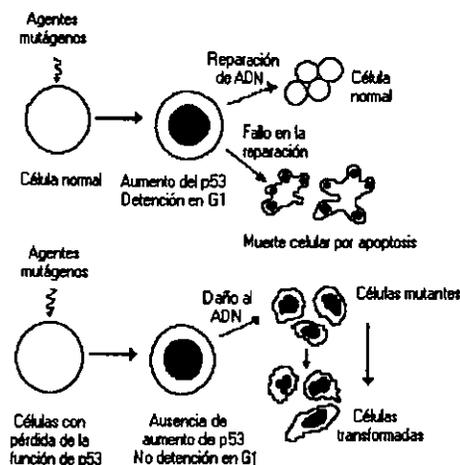


Figura 9. Modelo de acción propuesto del p53 normal y mutante⁷⁵.

En condiciones fisiológicas, p53 tiene una vida media muy corta, aproximadamente de 5 a 6 minutos, está presente en concentraciones mínimas en células normales, existen datos de que esta proteína es necesaria para la división celular normal, y es casi indetectable por técnicas de inmunohistoquímica; una vez que las células son expuestas a agentes carcinogénicos, existen cambios espectaculares en p53. A través de modificaciones posteriores a la transducción, p53 se estabiliza y se acumula en el núcleo donde es su sitio de acción, es decir la forma mutante es más estable y tiene una vida media larga y puede ser visualizada por anticuerpos como PAb1801 Oncogene Science, Pab240 Novocastra así como con el anticuerpo monoclonal anti-p53 Clona Mouse DO-7 Dako^{106,108-111}.

Aunque no se conocen los mecanismos precisos por los cuales p53 actúa como gen supresor del tumor, se ha observado que la tipo silvestre actúa como policía molecular que impide la propagación de las células dañadas genéticamente, puede ser inactivada por mutación en las secuencias genéticas que codifican para

proteínas conduciendo a transformación neoplásica de las células⁹⁸. Es decir el tipo silvestre de p53 regula la duplicación del ADN, bloquea la replicación del genoma cuando este sufre algún daño y acumulado se liga al ADN haciendo que las células se detengan en la fase G1 del ciclo^{90,107}. Así mismo da a la célula una pausa reversible para reparar el daño al ADN. Si por alguna razón los mecanismos de reparación fracasan, p53 parece de alguna manera sentir el riesgo de que las células mutantes se dividan y como una medida extrema, desencadena la muerte celular por apoptosis¹¹² (figura 10).

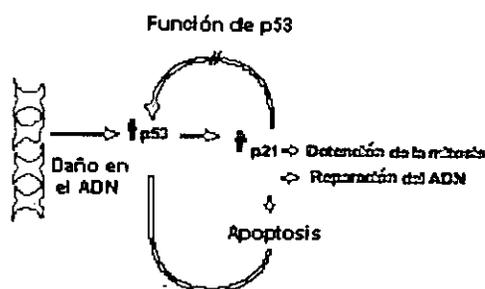


Figura 10. Presenta la función de p53. Santa Cruz Biotechnology Inc. Research antibodies 2000.

Debido a sus funciones protectoras, se ha denominado a p53 como guardián del genoma. Con la pérdida de p53 normal, las células expuestas a agentes mutágenos replican el ADN dañado. Aunque ninguna mutación aislada es capaz de transformar las células, la pérdida de la vía de p53 predispone a las células a mutaciones adicionales y al final, a la transformación maligna^{91,113}.

La forma más frecuente de inactivación del gen p53 se produce por mutaciones sin sentido. Estas proteínas anormales no ligan el ADN pero tienen una vida media llamativamente larga, y por tanto pueden detectarse fácilmente en las

células tumorales por medio de inmunohistoquímica, de hecho; las proteínas p53 detectadas de esta manera casi siempre están asociadas a mutación; carcinógenos exógenos y endógenos son conocidos por causar mutaciones, como daño al ADN incluyendo transición o transversión, inserción y sustitución de bases, además de las mutaciones, existe otro mecanismo por los que puede alterarse la función normal de p53 como son: las proteínas transformadoras de varios virus ADN (adenovirus, virus del papiloma humano) que pueden ligar y secuestrar el p53 normal. Los productos de ciertos oncogenes nucleares se ligan inactivando la actividad supresora de tumor de p53⁹¹.

Existen evidencias que fumar tabaco puede jugar un papel en la tumorigénesis por la mutación específica de ella. Este gen como ya se mencionó transcribe a una proteína nuclear que es importante en la reparación, transcripción y replicación del ADN. Han sido identificados porcentajes significativamente más altos de la forma mutante en fumadores crónicos que en aquellos no fumadores¹¹³⁻¹¹⁴.

La mutación de p53, es la alteración más frecuente que conduce al cáncer; p53 tipo silvestre puede ser inactivada por mutación en las secuencias genéticas que codifican para proteínas conduciendo a transformación neoplásica de las células⁸⁴. Mutaciones o deleciones en el gen alteran la proteína la cual se encuentra sobreexpresada en un alto porcentaje; esta sobreexpresión puede ser el resultado de la mutación genética o de acumulación de p53 tipo silvestre con funciones biológicas alteradas⁹⁸. Ella es bastante versátil y puede funcionar como oncogen, además de cómo gen supresor del cáncer; de hecho, durante muchos años después de su

descubrimiento, se consideraba tan sólo un oncogen, porque ciertas formas de p53 pueden transformar células *in vitro*, como hacen varios oncogenes. Esto es porque las mutaciones convierten a p53 de un gen supresor de tumor recesivo a un oncogen dominante en que está, junto con otros oncogenes activados pueden transformar células. De este modo actúa como un oncogen en la forma mutante y como un gen supresor de tumor en la forma normal¹⁰⁶.

La sobreexpresión de esta proteína sugiere que su mutación o función alterada del tipo silvestre juega un papel importante en el desarrollo de la patogénesis^{98,106}, de neoplasias malignas incluyendo tumores de colon, pulmón, mama y cerebro^{71,115}. La aparición temprana de la expresión de p53 en los procesos premalignos y malignos ha sido reportada en lesiones cutáneas como: queratosis solar, carcinoma de células basales, enfermedad de Bowen y carcinoma epidermoide¹⁰⁹.

Así mismo una relación entre la mutación de p53 y el estado avanzado de los tumores han sido observados en el cáncer de endometrio, cervix, ovario, hígado, próstata y vejiga indicando que en estos tumores la mutación de esta puede ser un evento tardío contribuyendo a la progresión; pero no en cáncer de pulmón, cabeza y cuello y mama en donde las mutaciones son conocidas por ocurrir en estadios tempranos de los tumores y en lesiones precancerosas. Las células pueden también mostrar proliferación incrementada sin involucrar alteraciones en el gen p53 detectables inmunohistoquímicamente¹¹⁶. Así mismo ha sido reportado que la alteración del gen puede ser considerado como un nuevo marcador independiente

asociado con la reducida supervivencia del paciente. En conjunto los tumores que exhiben acumulación de p53 son generalmente más agresivos¹¹⁷.

Ha sido encontrada únicamente en 20-50% de casos, con un máximo de 81% en carcinoma epidermoide de mucosa bucal, 70% en cáncer de células pequeñas de pulmón y 68% en cáncer anaplásico/indiferenciado de tiroides¹⁰⁵. En el 95% de carcinomas nasofaríngeos y en el 79% de lesiones displásicas sugiriendo que la sobreexpresión de él puede estar estrechamente relacionada con el carcinoma nasofaríngeo⁹⁸.

La correlación de fenotipos, como el grado histológico y el porcentaje de proliferación, con eventos moleculares precisos tales como alteraciones de p53 y otros genes, prometen expandir nuevos conocimientos del comportamiento del tumor y quizás establecer nuevos paradigmas de diagnóstico, valoración de riesgo, prevención, detección temprana, determinación de pronóstico y terapias antineoplásicas^{109,111}.

Lagdon y Patridge en 1992 detectaron el producto del gen supresor de tumor p53 en 12/15 casos de carcinoma epidermoide y en dos casos de leucoplasia. Los tumores expresaron la forma mutante por toda la extensión del espécimen o conteniendo áreas focales de células positivas. La expresión fue más intensa en tumores obtenidos de pacientes quienes eran grandes fumadores y bebedores sugiriendo que las alteraciones en el gen p53 pueden ser uno de los sitios de daño genético en este grupo de pacientes¹⁰⁶.

Girod y cols. en 1994 estudiaron la expresión de la mutación del gen en 64 lesiones hiperplásicas entre las que se encontraban pacientes con leucoplasia y LP y 85 con carcinoma epidermoide. Las lesiones hiperplásicas fueron clasificadas de acuerdo así presentaban algún grado de displasia, 39 (61%), no mostraron displasia, 22 (34%) mostraron displasia leve, 2 (3%) moderada y una fue clasificada como displasia severa; de las 39 lesiones sin displasia, 31 (79%) no mostraron ninguna expresión a p53, 8 (21%) presentaron expresión detectable y de estas 7 lesiones fueron diagnosticadas como LP, entre las lesiones displásicas, 17 (36%) presentaron niveles detectables de p53, la única lesión con displasia severa mostró expresión. De las 85 lesiones de carcinoma epidermoide el 54% mostró un nivel detectable, encontrándose una correlación positiva entre la expresión de p53 y el grado de displasia de las lesiones. Sin embargo no se encontró correlación entre el número de células positivas, el grado de displasia y diferenciación de las lesiones. Sugiriendo que podría ser de ayuda la expresión de p53 para predecir el desarrollo de cáncer en leucoplasia y LP¹¹⁸.

Así mismo Ogden y cols. observaron la expresión de la proteína en 37 pacientes con cáncer bucal, de los cuales 20 (54%) mostraron expresión. La proteína no fue identificada en los 54 casos de lesiones no malignas entre las que se encontraban 4 con mucosa normal, 10 con LP, 2 presentaban LP erosivo, 12 queratosis y 27 otras lesiones. El análisis de los pacientes con cáncer bucal se realizó de acuerdo al sitio de localización uso de tabaco y edad. La expresión no fue más prevalente con la edad y apoyan la asociación de fumar tabaco con la expresión de p53 en carcinoma bucal ya que de 16 fumadores 13 mostraron expresión y

únicamente 1 de los 10 pacientes no fumadores mostró expresión a p53. Cuando el sitio fue evaluado la expresión de p53 no se encontró en la región de la mucosa bucal. Aunque la relación entre el fumar y el cáncer de boca es más frecuente en lengua y piso de boca sin embargo pueden desarrollarse en la mucosa bucal y por lo tanto se ha asociado con una intensa expresión a p53. Concluyendo que las células positivas a p53 se encontraron únicamente en lesiones malignas y de este modo puede utilizarse como un marcador para lesiones con cambios malignos¹¹⁹.

De Araújo y cols. estudiaron la relación entre la grado histológico de malignidad propuesto por Anneroth, (en este sistema, la malignidad es basada en criterios morfológicos representativos de la población de células tumorales, criterios adicionales significativos de la relación tumor/huésped; cada parámetro morfológico es clasificado de 1 a 4 puntos y el registro final de cada caso es definido como la suma total de puntos atribuidos a los parámetros evaluados), y la expresión de la proteína p53 en 40 biopsias de carcinoma epidermoide en cavidad bucal. La expresión fue encontrada en el 62.5% de los carcinomas. La positividad de la tinción mostró una correlación con el grado histológico de malignidad, con el grado de queratinización, polimorfismo nuclear y el número de mitosis. No así con el patrón de invasión y el infiltrado inflamatorio¹²⁰.

Warnakulasuriya y cols. estudiaron la expresión de p53 con el anticuerpo PAb1801 específico para el antioncogen p53 en 37 carcinomas de boca, en 12 displasias y 17 tejidos normales, encontraron expresión en 35% de los casos; los casos positivos incluyeron carcinomas bien diferenciados, sugiriendo que la mutación

puede ocurrir en estadios tempranos de transformación maligna; esto fue soportado cuando observaron que la mutación de la proteína fue detectada en cantidades mínimas en 2 displasias; ningún tejido normal fue positivo a p53. Ellos mencionan que las mutaciones del gen están comúnmente involucradas en cáncer bucal pero no es el único factor para la transformación maligna. No obstante como esta mutación es un cambio genético descrito asociado a cáncer en caucásicos es posible que su presencia pueda ser usada como marcador de riesgo en lesiones bucales con alto potencial maligno¹¹⁰.

Así mismo Regezi y cols. realizaron un estudio en pacientes con displasia bucal y carcinoma *in situ*, utilizando biopsias secuenciales con lesiones del mismo sitio anatómico, un total de 19 pacientes fueron evaluados, 3 de estos progresaron a carcinoma invasor, uno avanzó a un grado más severo de displasia y otro desarrolló carcinoma verrucoso mostrando esta expresión negativa. La proteína fue detectada en 6 de 13 pacientes con displasia, así mismo la detección de p53 fue evidente en 4 de 6 pacientes con lesiones *in situ*. Biopsias secuenciales de 3 de estas lesiones no mostraron cambios histológicos o expresión de esta y una lesión progresó a carcinoma y fue positiva a p53. Todas las lesiones que ocurrieron en lengua fueron positivas. Ellos concluyen que la proteína puede ser detectada tempranamente en el desarrollo de carcinoma epidermoide; mencionando que este fenómeno puede ser observado en displasia, en lesiones *in situ* y puede tener implicaciones pronósticas¹²¹.

Por otra parte Dekker y col. en 1997 partiendo de la hipótesis que la pérdida de las células basales se debe a la apoptosis, evaluaron la expresión de bcl-2 y p53, en mucosa normal de 8 pacientes, en encía con inflamación crónica de 5 pacientes y en 10 con LP. Al comparar sus resultados encontraron que la expresión para bcl-2 en los queratinocitos basales de la mucosa bucal normal, gingivitis y LP fue negativa, mientras en los melanocitos y células linfoides la expresión fue positiva; sin embargo la expresión de p53 en los queratinocitos basales fue positiva en todos los casos de LP (10), no así en la gingivitis y mucosa bucal normal. Los patrones de expresión de p53 en LP sugieren sobreexpresión de la proteína de tipo silvestre, un fenómeno que podría detener el ciclo celular para reparar el daño del ADN o desencadenar apoptosis¹²².

Schoelch y cols. en 1999 partiendo de la base de que la regulación de la apoptosis puede estar alterada en el desarrollo del carcinoma epidermoide, realizaron una investigación utilizando tejidos control y 90 lesiones entre las que se encontraban: 7 pacientes con queratosis, 13 con displasia leve, 18 con displasia moderada, 10 con displasia severa y 7 con carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado. Ellos reportan que 10 de las 90 lesiones fueron positivas para bcl-2 (todas fueron displasia y carcinoma), y 30/90 especímenes mostraron expresión positiva a p53, el porcentaje de tejidos positivos se incrementó en las lesiones que progresaron de queratosis focal a displasia leve 1/20 (5%), en los carcinomas epidermoides, displasia moderada y severa 18/35 (51.4%) fueron positivas. Del mismo modo los niveles de expresión de p53 se incrementaron con la progresión de los cambios displásicos; en 1/20 pacientes con queratosis y displasia leve, la

reacción en el núcleo la observaron en < 10% de los queratinocitos. En 18/35 fueron positivos a p53 en los casos de displasia moderada, severa y en carcinomas, 11 de los 18 con displasia moderada mostraron positividad a p53 en 2/3 queratinocitos. Estos datos muestran que las proteínas asociadas a apoptosis están modificadas en patrones variables en lesiones epiteliales bucales tanto premalignas y malignas. Así mismo demostraron que p53 se expresa tempranamente¹²³. Igualmente Kannan y cols. en 1998 partiendo de que los procesos neoplásicos son debido a alteraciones en los oncogenes y genes supresores de tumor que controlan el ciclo celular; estudiaron 39 casos de pacientes con carcinoma epidermoide, valoraron la expresión de la proteína bcl-2, encontrando que el 23% de estos tumores mostraron expresión intensa, 2 mostraron expresión moderada, 19 expresión leve y 9 no se expresaron; en el epitelio normal, la expresión fue indetectable. No encontraron correlación entre la expresión de bcl-2, el estadio clínico, la edad o el sexo. Al realizar el análisis de acuerdo al sitio 44 y 33% de la expresión fue en tumores de mucosa bucal y lengua respectivamente sugiriendo que estos son los blancos preferidos para la expresión de bcl-2; cuando la expresión de esta fue comparada con la expresión de p53, encontraron que no se traslaparon, es decir que estos eventos son mutuamente excluyentes. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de cualquiera de los dos genes puede sustituir al otro en el desarrollo de carcinoma epidermoide bucal, la sobreproducción de la proteína bcl-2 puede anular a p53 e inducir muerte celular, sugiriendo que si existen niveles elevados de bcl-2, entonces la proteína p53 tipo silvestre no puede inducir apoptosis por mucho tiempo¹²⁴.

Yao y cols. en 1999 analizaron la expresión de bcl-2 y p53 en 52 casos de carcinoma epidermoide del borde lateral de lengua; y fue positiva en 26/52 (50%) de los casos a bcl-2 y 31/52 (60%) de los casos a p53. La inmunoreactividad de p53 fue detectada en el núcleo celular pero no en las células con epitelio histológicamente normal o distante del tumor. Así mismo esta estuvo presente más en las células del frente invasor del tumor que en las células infiltradas o islas del tumor. Los tejidos control no mostraron inmunoreactividad a p53 y a bcl-2; la frecuencia de expresión fue asociada con el grado histológico del tumor, el modo de invasión marginal, el modo de invasión del tumor y los ganglios linfáticos involucrados; encontraron correlación significativa de bcl-2 con el grado histológico del tumor y con el modo de invasión marginal del tumor. Con respecto p53 hubo asociación significativa con el modo de invasión del tumor. Sus resultados sugirieron que la investigación combinada con los dos marcadores biológicos puede tener importancia en la valoración de la agresividad del tumor y el mecanismo de supresión en la regulación del oncogen bcl-2 para mantener la apoptosis en el carcinoma epidermoide de lengua¹²⁵.

Atula y cols. analizaron 39 muestras de carcinoma epidermoide de lengua utilizando anticuerpos para p53 y bcl-2, seleccionaron muestras de pacientes con y sin ganglios involucrados para buscar si existía diferencia entre estos, así mismo correlacionar la expresión de estas proteínas con otros parámetros como tamaño del tumor, grado de diferenciación histológica, hábito de tabaquismo y consumo de alcohol; registraron la inmunoreactividad y la localización de células positivas, como células en la capa basal, parabasal o células expresadas en todas las capas del

epitelio. La inmunoreactividad a p53 fue intensa en 11 (28%) moderada en 7 (18%), leve en 16 (41%) y negativa en 5 (13%) de los tumores. En varios de los carcinomas la inmunopositividad estuvo restringida a la capa basal y parabasal. La expresión de esta fue en el núcleo. Con el tamaño del tumor, grado histológico hábito de tabaquismo y consumo de alcohol no encontraron correlación. En el epitelio normal se expresó en las células de la capa basal. La expresión de bcl-2 fue intensa en 2 (5.1%) de los tumores, moderada en 4 (10.4%), leve en 3 (7.7%) y negativa en 30 (76.8%) la reacción fue siempre citoplasmática; el epitelio proliferativo adyacente a la displasia y carcinoma fue totalmente negativo para bcl-2. En pocas muestras el epitelio atrófico e hiperqueratósico adyacente al área del carcinoma mostró intensa expresión a esta en todas las células basales. Interesantemente había áreas también totalmente negativas en la muestra. Los linfocitos del infiltrado mostraron intensa expresión; en dos tejidos donde la expresión se observó intensa el tejido del carcinoma parecía ser más agresivo. En el epitelio normal células basales dispersas mostraron expresión a bcl-2. Una correlación estadísticamente significativa fue encontrada entre la expresión de bcl-2 y tabaquismo, los 6 grandes fumadores presentaron intensa o moderada inmunoreactividad a bcl-2, no hubo expresión en los tejidos de no fumadores, además estos 6 pacientes murieron en los siguientes 32 meses. No se encontró correlación entre la expresión de bcl-2 y los otros parámetros estudiados; tampoco se encontró correlación en los patrones de expresión de p53 y bcl-2¹²⁶. Es concebible que la expresión incrementada de bcl-2 y la función alterada de p53 jueguen un efecto sinérgico crucial en la carcinogénesis⁹⁸, ya que la expresión alterada de un solo oncogen es generalmente insuficiente para inducir una

transformación completa, en muchos casos la activación de varios oncogenes contribuyen al proceso de la tumorigenesis¹⁰⁶.

Nucléolo

Con respecto a las características propias del tumor se han estudiado en modelos experimentales la función del nucléolo y el papel de las Regiones de Organizadores Nucleolares (NORs) para estimar el comportamiento de los tumores basándose en su capacidad de reflejar la actividad proliferativa de las células de una neoplasia¹²⁷⁻¹²⁹. Para hablar de NORs se revisará la estructura y función del nucléolo.

El núcleo interfásico contiene el nucléolo, constituido principalmente por ribonucleoproteínas y cromatina, que posee desoxirribonucleoproteínas en forma condensada (heterocromatina) o no condensada (eucromatina)¹³⁰⁻¹³¹.

El nucléolo puede definirse como la expresión morfológica de la transcripción del ARN prerribosómico por los organizadores nucleolares (o sus copias) y de la maduración posterior de ese ARN hasta convertirse en ARNr. Por eso, el nucléolo es más visible en los momentos de mayor síntesis de ribosomas y cuando no hay transcripción desaparece, así como durante la mitosis¹³²⁻¹³³. Es una estructura esférica rodeada por nucleoplasma pero no separada de éste por una membrana (figura 11). Cada nucléolo es producido por una región organizadora del nucléolo (NOR) u organizador nucleolar específico localizado en un sitio particular de un cromosoma, un genoma puede incluir uno o más organizadores y por lo tanto puede

haber uno o más nucléolos en un mismo núcleo. Además, dicho organelo permanece adherido a la NOR. Estos corresponden a una constricción secundaria correspondiente a la metafase cromosomal, los cuales son localizados en el hombre, en los brazos cortos de los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22 y cada uno de ellos están decorados con un satélite en el extremo más corto de los dos brazos cromosómicos. En una célula diploide típica humana, debido a la fusión de los cinco pares de nucléolos generalmente el núcleo en interfase sólo tiene un nucléolo grande¹³³. El número, forma y posición de los nucléolos depende del tipo celular y de su actividad metabólica. El número generalmente suele ser de uno por núcleo, aunque algunos tipos celulares suelen presentar dos como las neuronas y hepatocitos. La forma es frecuentemente esférica, aunque se dan casos de nucléolos con formas irregulares. La posición suele ser más o menos céntrica dentro de la esfera nuclear, en caso de que exista más de un nucléolo estos pueden desplazarse e incluso situarse por debajo de la cubierta.

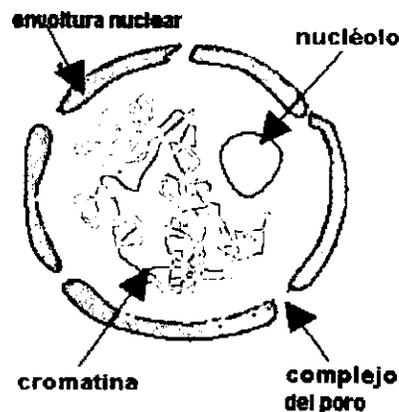


Figura 11. Componentes del núcleo. <http://kidlink.sunet.se/spanish/kidproj-spanish/célula/nucleo.html>

La organización estructural del nucléolo refleja su adhesión cromosómica y sus funciones en la producción de la subunidad del ribosoma. En el nucléolo se

reconocen cuatro componentes característicos: a) zona granular b) zona fibrilar c) matriz o zona amorfa y d) cromatina asociada al nucléolo

Zona granular está formada por agrupaciones de gránulos que contienen ribonucleoproteínas las cuales representan subunidades ribosómicas próximas a completarse, que miden de 150-200 Å de diámetro. Frecuentemente, la zona granular ocupa la parte más periférica del nucléolo que está rodeada por la cromatina asociada.

Zona fibrilar se halla constituida por finas fibrillas mal definidas de transcritos de RNA en forma de nucleoproteínas, de 50-100 Å de diámetro y en general, ocupa la región central del nucléolo; en muchos nucléolos se observa también una masa fibrilar densa que contiene exclusivamente ADN. Es la heterocromatina asociada al nucléolo y corresponde a la heterocromatina telomérica de los organizadores nucleolares.

Zona de cromatina nucleolar asociada al nucléolo consta de asas cromosómicas formadas por fibras gruesas de 100 Å de ancho que lo rodean y pueden penetrarlo, se extienden fuera de su punto de adhesión en la NOR del cromosoma. A veces, ocupan zonas especiales dentro del nucléolo o bien se distribuyen en forma difusa las fibras contienen ADN y son digeridas por la desoxirribonucleasa.

La matriz nucleolar forma el fondo amorfo sin estructura en la cual están distribuidas las zonas fibrilar y granular^{131,133}.

La parte amorfa o nucleoplasma corresponde a los espacios de escasa densidad a los electrones que forman cavidades intercomunicadas en la parte densa, contienen gránulos de ADN.

La parte densa o nucleolonema consiste en la parte fibrilar más densa que la anterior, constituida por fibrillas de unos 8-10nm, también formadas por ribonucleoproteínas

El centro fibrilar es muy evidente en algunos nucléolos, donde puede haber varios centros fibrilares y de densidad inferior a la de las partes granular y fibrilar. Consiste en finas fibrillas de 7-9nm. Contiene ADN y algo de ARN; debido al contenido en ADN, se ha considerado que los centros fibrilares corresponden a organizadores nucleolares en fase activa o de transcripción. Así mismo se le atribuye función de almacén de reservas proteicas para síntesis ribosómica.

El nucléolo puede agrandarse en células activas y reducirse en células inactivas debido principalmente a expansión o reducción de la zona granular; sin duda, estos cambios en dimensiones resultan de velocidades diferentes en la producción de la subunidad ribosómica respecto a actividades celulares biosintéticas¹³¹. La proporción de ARN en el nucléolo es muy variable y depende del tipo celular y del estado funcional. Se estima como valor medio un 10%, aunque en

algunas células puede alcanzar el 30%. Siempre se encuentra entre un 1 a 3% de ADN, que corresponde al centro fibrilar y a la heterocromatina asociada al nucléolo; el componente mayoritario son proteínas, que constituyen prácticamente el resto del nucléolo, se trata de fosfoproteínas ácidas y otras proteínas muy diversas, algunas de las cuales son básicas; entre las proteínas del nucléolo se encuentran las RNPsn (ribonucleoproteínas nucleares pequeñas), que intervienen en la maduración del ARNr y ayudan a la construcción del ribosoma, también se han detectado enzimas necesarias para la síntesis de ARN y su procesamiento^{131,133}.

Ciclo nucleolar

Igual que ocurre con los cromosomas, el comportamiento del nucléolo es diferente según se consideren células interfásicas o mitóticas; en la interfase no se observan grandes cambios en el nucléolo; suele aumentar su volumen con tendencia a la fusión de ellos, fenómeno que ocurre cuando los organizadores nucleolares se sitúan próximos.

Durante la división nuclear los nucléolos experimentan cambios cíclicos; desaparecen en el momento de la metafase y reaparecen durante la reorganización nuclear en la telofase. Toda síntesis de macromoléculas se detiene, incluyendo la de ARN, cuando los cromosomas se condensan y los nucléolos desaparecen de las células en división. Cuando empieza la telofase, en la NOR de cada cromosoma se forman nucléolos pequeños que crecen y se fusionan para formar uno o más nucléolos grandes. La síntesis macromolecular se reanuda y continúa en toda la

interfase entre las divisiones del núcleo celular, en las fases G1, S y G2 del ciclo celular. Por lo que durante la división celular, el nucléolo muestra una serie de cambios que determinan una conducta; el ciclo mitótico típico del nucléolo consiste fundamentalmente en tres procesos:

-Desorganización profásica proceso en el cual el nucléolo presenta: disminución de tamaño, forma irregular (polilobulada o estrellada), disminución de la afinidad tintorial y aparición de pequeñas masas de material nucleolar libres entre los cromosomas profásicos.

-Transporte metafásico y anafásico: en esta etapa el nucléolo ha perdido su individualidad, sus constituyentes se han dispersado por el núcleo profásico y terminan incorporándose a los cromosomas metafásicos.

-Reorganización telofásica: en la primera mitad de la telofase aparecen cuerpos laminares entre los cordones cromosómicos en vías de descondensación; al mismo tiempo, se observan cuerpos más esféricos, resultado de la aglomeración y fusión de los más pequeños. Estos cuerpos presentan todas las características morfológicas y reactivas propias del nucléolo interfásico, denominándose cuerpos prenucleolares; avanzada la telofase, los cuerpos prenucleolares se hacen mayores y comienzan a formar un nucléolo interfásico, por coalescencia y fusión (figura 12)¹³¹.

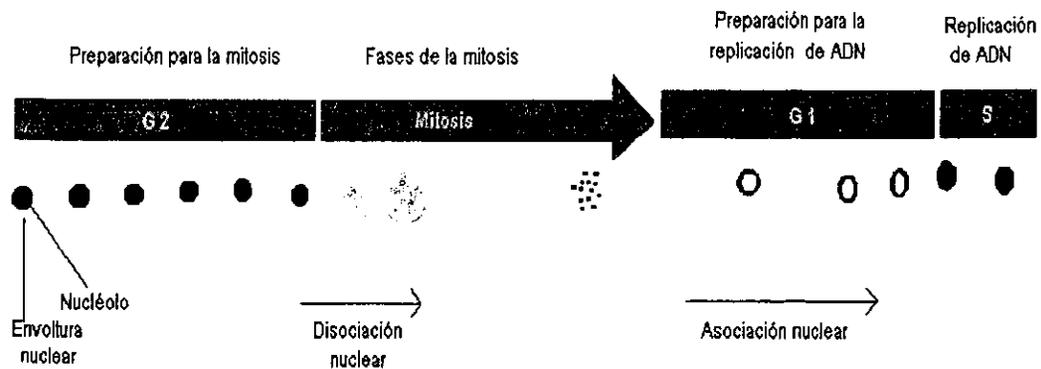


Figura 12. Ciclo nucleolar. Bray A. y cols. Molecular biology of the cell.

Organizador nucleolar (Cromatina asociada al nucléolo)

Son estructuras constituidas por ARN ribosómico y proteínas, formadas como consecuencia de la actividad transcripcional de determinados genes, que en conjunto constituyen el organizador nucleolar. Así pues, representan el lugar en el que está llevándose a cabo la transcripción y maduración de los ARNs ribosómicos¹³¹ y consisten en una región de fibrillas poco densas, más laxas que las de la cromatina, esta constricción posee proteínas semejantes a las del nucléolo; son fibras de cromatina empaquetadas de forma diferente a las del resto del cromosoma. El organizador nucleolar se encuentra separado del resto de la cromatina por heterocromatina telomérica¹²⁷⁻¹²⁸. Ellos consisten en puntos de ADN en el nucléolo que codifican los genes para RNA ribosomal y son importantes en la síntesis de proteínas¹²⁹ constituido por un elevado número de genes todos ellos con la misma información genética^{128,132-133} están típicamente agregados dentro de 1 o 2 nucléolos durante la interfase en la célula normal, los números de NOR visualizados depende de a) el número de NORs presentes en los cromosomas b) el nivel de actividad transcripcional de ARN y c) el estadio del ciclo celular¹³².

Las proteínas NORs son consideradas como marcadores de los genes ribosomales los cuales son activamente transcritos o potencialmente activos, la transcripción de los genes ribosomales, es estrictamente dependiente de la presencia de las proteínas NORs, las principales proteínas son RNA, polimerasa I, C 23 o nucleolina y la proteína B23 o numatrina^{132,134}, es decir los NORs son puntos de ADN que codifican los genes para ARNr y sus proteínas asociadas.

Existen diversos métodos para observar los NORs en secciones histológicas convencionales es decir tejido embebido en parafina¹³⁰, dentro de ellas esta la técnica utilizada por Plotón en 1986 en la cual empleo una tinción con sales de plata coloidal, estabilizando con ácido fórmico, mencionando que podía aplicarse en cromosomas en interfase a 20°C¹³⁵, la importancia de esta técnica es debido al hecho de que todos los cuerpos argirofilos que están presentes en la interfase nuclear son NORs y su número es correlacionado positivamente con la actividad de los genes ribosomales y por lo tanto con la proliferación celular¹³².

Con la tinción de sales de plata se visualiza a los NORs como pequeños puntos o manchas negras en el espacio físico del nucléolo de una célula dada (AgNORs), el conteo promedio está calculado entre 50 y 100 células, la cantidad de depósitos de plata en el núcleo es una reacción citoquímica que refleja la actividad en la síntesis de proteínas¹²⁷, la función exacta de estas proteínas es incierta sin embargo se ha demostrado su correlación con la proliferación celular¹³⁰. En condiciones normales, las células no neoplásicas expresan cuando mucho 2 puntos o manchas nucleolares, en contraste con las lesiones malignas en las que se

encuentra incrementado el número de manchas, por lo que las células malignas contienen más AgNOR comparadas con células benignas, además las lesiones con alto grado de malignidad con frecuencia contienen más AgNORs que las correspondientes al bajo grado¹³².

El conteo de AgNORs se ha utilizado para diferenciar entre linfoma de Hodkin de bajo y alto grado de malignidad, nevos y melanocarcinomas, carcinoma de células basales, en timomas, meningiomas, mesotelio reactivo y mesotelioma así como en hiperplasia prostática y carcinoma de próstata, quistes odontogénicos y ameloblastomas. En muchos se ha relacionado con el patrón histológico, asociación con características clínicas y valoración del tiempo de supervivencia, concluyendo que pueden dar un valor complementario a la clasificación histológica en estos tumores, así como que cuantifican en mayor cantidad en lesiones poco diferenciadas, malignas o con pobre pronóstico, varios reportes han sugerido que las variaciones en el número de AgNORs pueden reflejar el estado de activación o el grado de malignidad de las lesiones involucradas. Otros reportes sugieren que el número de estos son una reflejo de la proliferación del tumor más que el grado de malignidad^{128-129,133,136-137}. Por lo que el número de AgNORs, en un núcleo en interfase puede reflejar la actividad celular y el grado de transformación maligna de ciertos tejidos, así mismo los AgNORs reflejan el grado de proliferación y diferenciación celular^{132,138}.

Se ha reportado el valor de la cuantificación de AgNORs como auxiliar diagnóstico¹³⁸ en la detección de alteraciones celulares tempranas que no pueden

ser evidenciadas en las preparaciones de rutina. Los métodos para valorarlos incluyen la cantidad de AgNORs, la determinación del área, volumen, patrón y distribución (figura 13) así mismo en lesiones de mucosa bucal se han utilizado parámetros con criterios morfométricos poco convencionales que proporcionan información en cuanto al tamaño, perfil y distribución de estos¹³².

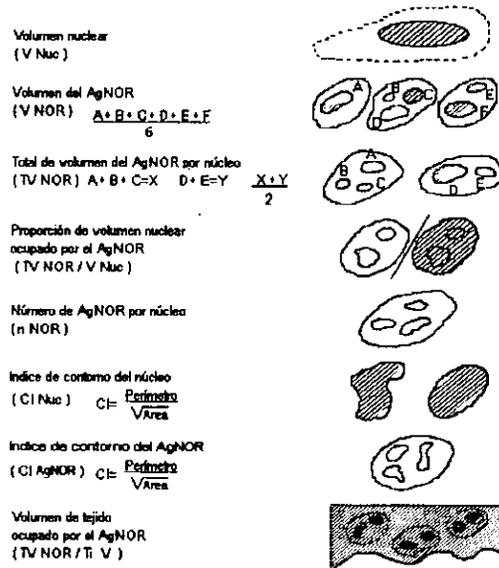


Figura 13. Representación esquemática de los parámetros evaluados relacionados a los AgNORs¹²⁷.

Crossen y Goodwin en 1985 demostraron que las células neoplásicas no solo tienen rearreglo para los genes NORs sino también amplificación y en algunas células malignas los NORs pueden estar amplificados en relación con el aumento del tamaño de los mismos, se sabe que el tamaño de las zonas teñidas para NORs esta en relación con su grado de transcripción, la importancia de la transcripción del gen ARNr por sí misma no es muy clara, sin embargo puede ser un indicador importante del tiempo de replicación de un tumor dado, es decir el número de AgNORs refleja el grado de proliferación y de transformación maligna o diferenciación celular^{127,132}. Cabrini y cols. realizaron un estudio morfométrico de las NORs para analizar la

distribución, volumen, número y forma en diferentes estratos, del epitelio de mucosa bucal normal, papiloma y en carcinoma epidermoide; concluyendo que el conteo de AgNORs puede contribuir al diagnóstico y que la evaluación de uno o varios parámetros relacionados a los NOR pueden proveer de valores para evaluar la probabilidad de transformación maligna. Así mismo mencionan que los parámetros relacionados a los NORs muestran diferencias entre el epitelio de la mucosa bucal y las diferentes lesiones en estudio cuando existe asociación con los parámetros de displasia estableciendo el grado de transformación maligna¹²⁷.

En otro estudio realizado por Xie y cols. determinaron el porcentaje y promedio de AgNORs por núcleo en el epitelio normal, displasia y carcinoma epidermoide, encontraron que en el epitelio normal el 70% de los núcleos muestran sólo 1 o 2 AgNORs y en el carcinoma epidermoide más del 60% presentaron más de 4 AgNORs, concluyendo que hubo un incremento en el número de AgNORs, asociado con el incremento de la agresividad de un tumor, ya que el promedio del número de AgNORs por núcleo es más alto en tejidos malignos que en normales por lo que la cantidad de AgNORs puede ser un buen marcador pronóstico para pacientes con carcinoma epidermoide¹³⁹. También Warnakulasuraya y cols. cuantificaron los NOR con tinción de plata en 40 biopsias entre las que se encontraban lesiones benignas, displasias y carcinoma epidermoide, el promedio del conteo de AgNORs fue en queratosis de 4.51 en displasias 5.61 y en carcinomas de 8.37, demostrando una vez más que estos aumentan en lesiones malignas. Concluyendo que las lesiones displásicas con cantidades más altas representan un mayor riesgo de transformación maligna¹²⁸.

Así mismo Schwint y cols. cuantificaron los valores de los NORs en 20 carcinomas epidermoides, epitelio adyacente al carcinoma y en mucosa normal obteniendo un promedio de 6.56 AgNORs en el carcinoma, 4.81 en el epitelio adyacente al carcinoma y 2.95 en el epitelio normal, encontrando diferencias significativas entre el epitelio adyacente al carcinoma y en el carcinoma; estudiaron los siguientes parámetros volumen y forma por área del núcleo, perfil, distribución y promedio de AgNORs por núcleo y por área. Las características de los AgNORs en el carcinoma epidermoide bucal mostraron que fueron irregulares, más pequeños y abundantes. Concluyendo que basados en sus estudios podría considerarse a los AgNORs un auxiliar cuantitativo discriminativo, para detectar alteraciones celulares incipientes; estos hallazgos contribuyen al diagnóstico temprano y al conocimiento del crecimiento de células tumorales^{134,138}.

Sano y cols. también cuantificaron los NORs por medio de la tinción con plata, en 39 casos de carcinoma epidermoide bucal, 19 con pobre pronóstico, 20 de buen pronóstico; evaluaron la relación entre la cantidad de AgNORs y la clasificación histológica del tumor, la correlación entre la cantidad y el pronóstico. El promedio de la cantidad de AgNORs en el grupo de pobre pronóstico fue más alto que en las de buen pronóstico, aunque la diferencia no fue significativa. La tasa de supervivencia de casos con ≥ 6.5 fue significativamente más baja que aquellos con baja cantidad de AgNORs < 6.5 . Concluyendo que un número elevado de NORs es sumamente sugestivo de un pobre pronóstico en carcinoma epidermoide bucal¹⁴⁰.

De la misma forma Donofrio y cols. determinaron la presencia de AgNORs en 6 casos de leucoplasia con displasia leve, 9 con moderada, 9 con severa y 6 con carcinoma epidermoide, encontrando diferencias en cada grupo de las patologías con respecto al número absoluto de NORs por núcleo. Estos datos sugieren que los valores altos de AgNORs, de displasia bucal moderada y severa, pueden representar un signo de alarma de un mal pronóstico¹³².

Piffko y cols. en 1997 evaluaron el promedio del número de AgNORs, por área, el coeficiente de variación del número y el coeficiente de variación por núcleo. El análisis fue realizado en el frente invasor y parte central del tumor así como en la displasia adyacente y mucosa bucal normal, encontrando una disminución gradual estadísticamente significativa en el coeficiente de variación del número de AgNORs del frente invasor del tumor y de la parte central de los carcinomas, de la mucosa displásica y en el epitelio normal. El aumento observado de estos en el frente invasor del carcinoma epidermoide parece indicar un subgrupo de células tumorales con aumento en la actividad biosintética y potencial maligno; las características observadas en los AgNORs pueden ser un parámetro reproducible para la cuantificación de estos¹⁴¹.

Migaldí y cols. realizaron un estudio comparando un marcador de proliferación nuclear denominado p120 con los AgNORs como factores pronósticos, utilizaron 10 casos de queratosis epitelial hiperplásica, 10 con displasia epitelial y 15 con carcinoma epidermoide, encontraron correlaciones altamente significativas en la expresión de p120 y la cantidad de AgNORs en las diferentes lesiones así como en

los diferentes grados histológicos de los carcinomas. Sugiriendo un papel como factor pronóstico para estos marcadores¹⁴².

El carcinoma epidermoide de cavidad bucal se comporta como una enfermedad agresiva independientemente de su grado de diferenciación; se considera que la presencia de un promedio de 9.5 puntos nucleolares es un marcador significativo, lo que refleja un incremento en la actividad en la síntesis de proteínas. Los estudios que muestran datos con diferencias significativas han sido en tumores malignos y benignos y por lo tanto las extensas observaciones de la cantidad de AgNORs ha cuestionado el valor de este método en la determinación del comportamiento biológico de los tumores¹³⁰.

Aunque es de gran ayuda la detección de Organizadores Nucleolares como auxiliar en la técnica histopatológica no constituye un parámetro específico como factor pronóstico. Sin embargo se ha descrito que los NORs reflejan indirectamente el grado de diferenciación de las neoplasias permitiendo establecer el índice de proliferación y el grado de diferenciación de una célula transformada, por lo que la técnica AgNORs es propuesta como un marcador de proliferación celular y un procedimiento adicional para el pronóstico de evaluación de tumores humanos^{137,141,143}. Así mismo la técnica es barata y reproducible y no se requiere de un especialista experto¹³⁰.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las características propias de la cavidad bucal así como la exposición a agentes químicos, físicos y virales la tornan vulnerable para el desarrollo de un sin número de patologías, el diagnóstico específico de lesiones premalignas constituye uno de los mayores problemas de detectar en las poblaciones de alto riesgo y por ende la implementación del diagnóstico precoz y de medidas terapéuticas que permitan la disminución de estas entidades en la población.

La carcinogénesis bucal es un proceso complejo que puede involucrar una serie de oncogenes activados por factores físicos, químicos y biológicos seguido de la inactivación de mecanismos genéticos responsables de la supresión de crecimientos anormales. Por lo que diversas metodologías y marcadores se han empleado en el estudio de lesiones premalignas y malignas; como el empleo de anticuerpos monoclonales contra p53 y bcl-2 aunado a una técnica sencilla (AgNOR) que refleje indirectamente el aumento en la síntesis de proteínas permitirán valorar y cuantificar los cambios sugestivos de malignidad en una condición considerada como premaligna.

Porque si bien únicamente un pequeño porcentaje de lesiones de LP progresan a carcinoma epidermoide es necesario analizar marcadores de malignidad que puedan servir para determinar el potencial maligno en el LP.

JUSTIFICACION

Los cambios morfológicos tisulares observados bajo microscopía de luz son considerados como una consecuencia tardía de eventos moleculares claves que han iniciado cambios patológicos. Un mayor conocimiento de los mecanismos de control celular y de los procesos biológicos involucrados en la génesis de una condición premaligna y una lesión maligna permitirá conocer el comportamiento biológico y el significado pronóstico de diversas entidades de difícil tratamiento, utilizando marcadores específicos en los diversos estadios de diferenciación y manifestación clínica.

Si se pudiera determinar la expresión de marcadores de malignidad en lesiones como el LP se podría detectar que estas lesiones están involucradas en el desarrollo de cáncer. Por lo que deberán ser monitoreadas ya que ellas pueden ocultar un carcinoma epidermoide incipiente.

El diagnóstico específico de condiciones y lesiones premalignas de cavidad bucal en etapas incipientes constituye uno de los mayores problemas para detectar las poblaciones de alto riesgo, así como la implementación del diagnóstico precoz y medidas terapéuticas, que permitan la disminución de estas entidades en nuestra población. Las diversas metodologías y la utilización de anticuerpos monoclonales contra p53 y bcl-2 aunados a una técnica sencilla de plata que refleje indirectamente el aumento en la síntesis de proteínas, nos permitirá valorar de manera indirecta los eventos moleculares en diferentes lesiones de la cavidad bucal.

HIPOTESIS

La cuantificación de Regiones de Organizadores Nucleolares es proporcional a la inmunexpresión de p53 y bcl-2 en las dos lesiones en estudio.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación de 2 proteínas (bcl-2 y p53) en los mecanismos de transformación maligna con un marcador indirecto de la síntesis de proteínas (NORs) en LP y carcinoma epidermoide de boca.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar las características histológicas del LP y el grado histológico del carcinoma epidermoide.

Determinar la inmunexpresión de bcl-2 en los queratinocitos basales del LP.

Determinar la inmunexpresión de p53 como indicador de malignidad en epitelio normal, LP y carcinoma epidermoide.

Evaluar la inmunexpresión de bcl-2 y p53 como posibles indicadores pronósticos de transformación maligna.

HIPOTESIS

La cuantificación de Regiones de Organizadores Nucleolares es proporcional a la inmunexpresión de p53 y bcl-2 en las dos lesiones en estudio.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación de 2 proteínas (bcl-2 y p53) en los mecanismos de transformación maligna con un marcador indirecto de la síntesis de proteínas (NORs) en LP y carcinoma epidermoide de boca.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar las características histológicas del LP y el grado histológico del carcinoma epidermoide.

Determinar la inmunexpresión de bcl-2 en los queratinocitos basales del LP.

Determinar la inmunexpresión de p53 como indicador de malignidad en epitelio normal, LP y carcinoma epidermoide.

Evaluar la inmunexpresión de bcl-2 y p53 como posibles indicadores pronósticos de transformación maligna.

Cuantificar el número de AgNORs en epitelio normal, LP y carcinoma epidermoide como indicadores de transformación maligna.

Correlacionar el número de AgNORs con la expresión de p53 y bcl-2 en epitelio normal, LP y carcinoma epidermoide de boca.

Relacionar los aspectos clínicos con los hallazgos histológicos.

MATERIALES Y METODO

a) Selección de los sujetos de estudio

Pacientes de ambos sexos, de cualquier edad con lesiones sugestivas de LP y carcinoma epidermoide.

b) Tipo y tamaño de la muestra, datos de la población

Se seleccionaron a 37 pacientes; a los cuales se les diagnóstico clínica e histopatológicamente LP y carcinoma epidermoide. La selección se realizó en aquellos pacientes que acudieron de Febrero de 1999 a Junio de 2000, al Departamento de Dermatología del Hospital General Manuel Gea González el criterio para determinar este período de tiempo fue la maximización de tiempo y recursos.

Cuantificar el número de AgNORs en epitelio normal, LP y carcinoma epidermoide como indicadores de transformación maligna.

Correlacionar el número de AgNORs con la expresión de p53 y bcl-2 en epitelio normal, LP y carcinoma epidermoide de boca.

Relacionar los aspectos clínicos con los hallazgos histológicos.

MATERIALES Y METODO

a) Selección de los sujetos de estudio

Pacientes de ambos sexos, de cualquier edad con lesiones sugestivas de LP y carcinoma epidermoide.

b) Tipo y tamaño de la muestra, datos de la población

Se seleccionaron a 37 pacientes; a los cuales se les diagnóstico clínica e histopatológicamente LP y carcinoma epidermoide. La selección se realizó en aquellos pacientes que acudieron de Febrero de 1999 a Junio de 2000, al Departamento de Dermatología del Hospital General Manuel Gea González el criterio para determinar este período de tiempo fue la maximización de tiempo y recursos.

c) Variables, definición operacional y escalas de medición

Variables

Variable Independiente

p53
bcl-2
AgNOR
Edad
Sexo
Tabaquismo
Alcoholismo
Tipo de LP
Grado de malignidad
Sitio de localización
Tiempo de evolución
Ganglios linfáticos involucrados

Variable Dependiente

Liquen plano bucal
Carcinoma epidermoide

Definición operacional y escala de medición

p53:

Es un regulador negativo del crecimiento y división celular.

(escala de medición semicuantitativa)

bcl-2:

Proteína inductora de apoptosis.

(escala de medición ordinal)

AgNOR:

Indicador indirecto de síntesis de proteínas.

(escala de medición ordinal)

Edad:

En años cumplidos.

(escala de medición razón)

Sexo:

Femenino y Masculino.

(escala de medición nominal)

Tabaquismo:

Intoxicación aguda o crónica, debido al abuso del tabaco.

(escala de medición nominal)

Alcoholismo:

Abuso de bebidas alcohólicas. Enfermedad ocasionada por tal abuso.

(escala de medición nominal)

Tipo de LP:

Tiene una gran variedad de presentaciones, las lesiones varían de modo considerable y van desde lesiones queratósicas, de apariencia atrófica, papular, bulosa, lineal, reticular, anular, tipo placa, hasta otras erosivas, ulcerativas, combinaciones, hasta lesiones gingivales descamativas.

(escala de medición nominal)

Grado de malignidad:

El sistema de clasificación histológica de Jakobsson esta basado en criterios morfológicos representativos de la población de células tumorales con criterios adicionales significativos de la relación tumor/huésped, cada parámetro morfológico va de 1 a 4 puntos y el registro final de cada caso es definido como la suma total de

puntos atribuidos a los parámetros evaluados, lo que indicará el grado de malignidad, una alta puntuación indica un pobre pronóstico.

Bajo grado de malignidad: 6-13 puntos

Intermedio: 14-16 puntos

Alto: 17-24 puntos

(escala de medición ordinal)

Sitio de localización:

Área afectada: mucosa bucal, mucosa labial, mucosa masticatoria, mucosa especializada (bordes laterales o cara dorsal de la lengua), cara ventral de la lengua y piso de boca.

(escala de medición nominal)

Tiempo de evolución:

Período que ha transcurrido del inicio de la lesión al momento del examen clínico.

1: <3 meses

2: 6 meses

3: 1 año

4: +1-3 años

5: + 3 años

(escala de medición ordinal)

Ganglios linfáticos involucrados:

Aumento de tamaño de los ganglios haciéndolos palpables, duros, indoloros y fijos al tejido adyacente, la presencia de estos son un signo clínico de mal pronóstico.

(escala de medición nominal)

Liquen plano:

Enfermedad inflamatoria queratósica que afecta a la piel y las membranas mucosas bucales y genitales.

(escala de medición nominal)

Carcinoma epidermoide:

Tumor maligno de origen epitelial consistente en nidos, columnas o bandas irregulares de células epiteliales malignas que infiltran el tejido conjuntivo.

(escala de medición nominal)

d) Método de recolección de datos

Se obtuvo en un formato (anexo 1) la firma del consentimiento del paciente con el fin realizarle un interrogatorio, examen físico, bucal y obtención de la biopsia de la lesión.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

A los pacientes sospechosos de LP y/o carcinoma epidermoide se les realizó la misma historia clínica (anexo 2) en búsqueda de la posible asociación de las lesiones en estudio. En la cual se incluyeron datos de: edad, sexo, si se encontraba bajo tratamiento y por cuanto tiempo había estado; examen clínico general (incluyendo inspección de los ojos y piel), examen bucal (de las mucosas bucales hasta la orofaringe), incluyendo localización, duración, número y forma de las lesiones, dando dos diagnósticos presuntivos (anexo 3). Para la entrevista y el examen clínico el paciente se situaba en una silla con luz natural, el operador se ubicaba a un lado del paciente, utilizando visión directa o indirecta dependiendo de la

zona a examinar, ayudándose del espejo bucal No. 5 para desplazar la mucosa vestibular permitiendo de esta manera observar la zona directamente.

El diagnóstico clínico se realizó previa estandarización de criterios entre las examinadoras de acuerdo a la definición operacional de las lesiones. A los pacientes con diagnóstico clínico de LP o carcinoma epidermoide de boca se les tomó biopsia para corroborar el diagnóstico, los casos de carcinoma epidermoide fueron canalizados al Instituto Nacional de Cancerología. Los diagnósticos de LP tuvieron seguimiento en búsqueda de cambios clínicos como eritroplasia, ulceración, induración, elevación de las lesiones y el sitio afectado, así como la respuesta del paciente al tratamiento administrado por la dermatóloga. En caso de observar cualquier cambio o presencia de nuevas lesiones se tomó biopsia.

Con los datos obtenidos se creó una base de datos, (anexo 4) donde se capturó la información y se analizó.

Técnica para obtener la biopsia de la lesión

Los sitios fueron cuidadosamente seleccionados, la biopsia fue tomada bajo anestesia local sin herir o comprimir la zona de la lesión, se tomó una adecuada cantidad de tejido representativo con una biopsia incisional o excisional ya sea utilizando un mango de bisturí No. 3 y una hoja 15 o un sacabocados del No. 4 o 5 esto con el fin de facilitar la obtención de la biopsia: a) La biopsia en la mucosa masticatoria fue tomada de aproximadamente 1 cm, usando 2 incisiones verticales

paralelas con aproximadamente 3 mm de separación y una incisión horizontal, apical a 1 mm del margen gingival. El epitelio del surco se excluyó, ya que este tejido podría dar, falsos-positivos. Dado que la región intercelular del tejido podría ser teñida alterando los resultados debido al fluido crevicular que contiene inmunoglobulinas y complemento.

b) Con el sacabocados el diámetro de la biopsia fue de 3 a 5 mm, de este modo el examen podría ser correctamente evaluado. Ambas biopsias se tomaron del borde de una lesión, de preferencia de una lesión reciente, incluyendo tejido adyacente clínicamente sano. Una vez que se tomo el tejido si fue necesario la zona de la herida se cubrió con apósito quirúrgico el cual se retiró a los 8 días. La biopsia fue angosta y profunda; si fue muy pequeña menor de 2 mm, si el tejido estaba necrosado se desecho del estudio ya que no daría la información microscópica adecuada.

El tejido ya sea de LP o carcinoma epidermoide se colocó inmediatamente en formalina al 10%, por lo menos 24 hrs. Posteriormente se realizó la técnica de rutina, se obtuvieron 6 laminillas por caso de 5 micras de grosor. De las cuales se prepararon 2 previamente con silano. Se utilizó una laminilla para teñirla con la técnica convencional con Hematoxilina y Eosina para su diagnóstico histológico y corroborar el diagnóstico clínico. Las lesiones que no fueron diagnosticadas histopatológicamente como LP o carcinoma epidermoide se eliminaron del estudio.

Se procedió a observar al microscopio los casos de LP y en los casos de carcinoma epidermoide se procedió a su clasificación de acuerdo a los criterios de Jakobsson previa estandarización de criterios con la patóloga bucal (anexo 5).

Técnica inmunohistoquímica

Para esta técnica se utilizaron 2 laminillas por caso, previamente tratadas antes de los cortes histológicos con poli-L-lisina (silano).

La inmunotinción se realizó usando 2 anticuerpos primarios monoclonales: p53 protein (DO-7) Monoclonal (NCI-953-DO/) clona DO7 y bcl-2 Monoclonal (NCL-bcl-2) clona bcl/100D5.

Para ambos anticuerpos la técnica consistió en:

Colocar las laminillas a la estufa a 60°C durante 30 minutos después se desparafinaron en xilol y alcoholes a diferentes concentraciones para hidratar y se lavaba con agua destilada desionizada.

Posteriormente se colocaron en Buffer de citrato de sodio 0.1 M pH 6, en vasos coplin especiales para horno de microondas, colocándolas sobre una charola con agua destilada, para utilizarla como baño maría, posteriormente se llevaron al horno de microondas durante 10 min a alto poder para recuperación antigénica. Se

enfriaron a temperatura ambiente y se procedió a colocarlas en los Coverplates Shandon, utilizando Phosphate Buffered Saline (PBS) y se colocaron en el rack para tinción para los siguientes pasos:

Se lavaron con PBS por 5 min se procedió al bloqueo con peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3 % durante 5 min a temperatura ambiente y nuevamente se lavaban con PBS durante 5 min. Se bloqueaban sitios inespecíficos con suero normal durante 20 min a temperatura ambiente. El cual se preparaba usando 10 ml de PBS x 3 gotas de suero normal de caballo concentrado, son agitadas y se colocan de 1 a 2 gotas a cada coverplate.

Una vez decantado el suero, se colocaron 2 gotas en cada coverplate del anticuerpo primario (p53/bcl-2) incubándose durante 40 min a temperatura ambiente. Al término de la incubación se lavó el exceso de anticuerpo con PBS y se adicionaron 2-3 gotas del anticuerpo secundario BC (Elite, PK-6102 Mouse IgG) durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con PBS.

Se preparó el cromógeno (Peroxidase substrate Kit DBA. SK4100) con 5 ml de agua destilada, 2 gotas de buffer y 4 gotas de aminobencidine, mezclándose lentamente, ya mezclado; se agregaron 2 gotas de peróxido y se adicionaron 2 gotas del cromógeno a cada coverplate, dejándolo durante 5 min. Para observarlos al microscopio, se realizó la contratinción con Hematoxilina de Meyer, se filtro la hematoxilina y se lava las laminillas posteriormente se deshidrataron en alcohol, xilol y se montaron (anexo 6).

Los especímenes se evaluaron para la inmunoexpresión de p53 y bcl-2 con un microscopio de campo claro; se revisaron microscópicamente en aumento de 10x y 40x para evaluar la expresión de acuerdo a una escala ordinal donde 0 = nula, + = leve, ++ = moderada y +++ = intensa.

La cuantificación de las células se realizó previa estandarización de 2 examinadores, entre las que no existía diferencia significativa ($p < 0.05$) entre sus cuantificaciones, utilizando el objetivo de 100x y aceite de inmersión, se revisaron 5 campos con un área de 31416 micras por campo con un aumento de 1250x; se cuantifico el total de las células por campo, tanto las células que presentaban expresión así como las negativas, para posteriormente obtener por medio de una regla de tres el porcentaje de células expresadas por caso; utilizando los criterios de Nakagawa, donde la expresión (3) intensa es cuando hay un 50% de células expresadas, (2) moderada entre 25 y 50%, (1) leve entre el 5 y 25% y (0) negativa cuando la expresión era de menor del 5% para esta cuantificación se realizó una cédula (anexo 7).

Técnica histoquímica para AgNOR

La técnica para tinción con sales de plata para Regiones de Organizadores Nucleolares fue de acuerdo a la descrita por Plotón en 1986, con la siguiente fórmula: Gelatina al 2% en ácido fórmico acuoso al 1% posteriormente se mezclaron una parte de la solución con 2 partes de Nitrato de plata al 50%, para esta técnica se

utilizó una laminilla por caso, se desparafinaron e hidrataron los tejidos en agua destilada, xiloles y alcohol.

Se colocaron los tejidos en vasos de Coplin y se hidrataron durante 1 min mientras se preparó la solución de trabajo que consistió en mezclar la gelatina al 2% con ácido fórmico acuoso 1%, ya preparada; posteriormente se mezclaron una parte de la solución con 2 partes de Nitrato de plata acuoso al 50% esta se preparó justo antes de teñir los tejidos debido a que la Plata tiende a precipitarse.

La tinción de los tejidos se realizó sumergiendo las laminillas en vasos de Coplin con la Solución de trabajo durante 35 min en cuarto oscuro a una temperatura de 20 a 25°C. Una vez transcurrido el tiempo se lavaron las laminillas con agua bidestilada y se deshidrataron en alcoholes y xiloles (anexo 8).

Una vez realizada la técnica se montaron las laminillas para su observación al microscopio de campo claro.

La observación y cuantificación de las manchas nucleolares fue realizada por 2 examinadores no existiendo diferencia significativa ($p < 0.05$) entre sus cuantificaciones, se utilizó un objetivo de 100x y aceite de inmersión, estableciendo la observación de 25 campos con un área de 230 micras² cada uno, con un aumento de 4000x (cctv con un monitor de 20") obteniendo los siguientes datos por caso: número de células por campo, número de AgNORs, promedio de AgNORs así como el número de nucléolos.

Para esta cuantificación se considero lo siguiente (figura 14) se realizó una cédula para la recolección en la cual se registraban los datos obtenidos (anexo 9).

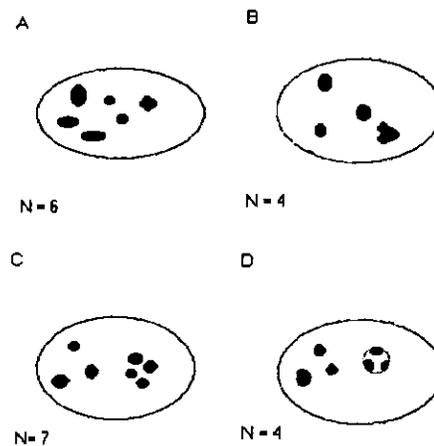


Figura 14. Forma de conteo de los AgNORs: A) El número de puntos negros fue registrado, B) Donde los puntos no estuvieron separados por un halo de nucleoplasma, los puntos unidos fueron registrados como uno, C) Cuando los puntos estaban unidos pero separados por un halo de nucleoplasma los puntos fueron registrados por separado, D) El contenido nuclear separado con puntos discernibles fueron registrados como uno¹²⁹.

e) Materiales y equipo a emplear

Recursos humanos

Tutor (Patóloga Bucal)
 Dermatóloga
 Investigador

Material

Formatos de autorización
 Historias clínicas generales
 Historias clínicas de patología bucal
 Lápices
 Silla para la exploración
 Cama de exploración
 Autoclave
 Pares de guantes
 Cubrebocas
 Pijamas quirúrgicas
 Gasas
 Hojas de bisturí No. 15

Sutura seda negra 000
Anestesia (Xilocaina con epinefrina, y sin epinefrina citanest)
Agujas para anestesiar (cortas, largas)
Jeringa para anestesiar tipo carpulle
Sondas Michigan con Graduaciones Williams
Mango de Bisturí Bard Parked No. 3
Espejos bucales del No. 5
Bisturí de Kirkland
Tijeras para encía
Portagujas

Equipo para tinción con Hematoxilina y Eosina

Frascos con formalina amortiguada al 10%
Balanza Analítica
Microtomo
Histokinette
Matraces
Vasos de Coplin de vidrio
Vasos de Coplin de plástico
Micropipetas (10,100 200 ml)
Puntas de pipetas
Portaobjetos
Cubreobjetos
Parafina para histología
Xilol
Alcohol
Resina sintética
Microscopio de campo claro

Reactivos para la técnica de H y E

Hematoxilina de Gill
Eosina
Solución de Scott

Reactivos para la técnica de AgNOR (anexo 8)

Nitrato de Plata
Gelatina Bacteriológica
Acido Fórmico

Equipo para Inmunohistoquímica

Potenciómetro Beckman
Horno de microondas 500-1000w
Cámara húmeda Shandon

Estufa de temperatura ambiente 100°C
Rack para tinción de 10 laminillas Shandon
Coverplates Shandon Cat No 7211013

Reactivos para Inmunohistoquímica (anexo 9)

Pol-1-lisina Sigma (100ml)
Tri-sodio citrato 2-hidrato para análisis Merck
Peróxido de Hidrógeno al 30%
K₂HPO₄
KHPO₄
NaCl
Hematoxilina de Harris
Pap-pon (marcador hidrofóbico) DAKO
Hidróxido de amonio
Medio de montaje Entellan

Anticuerpos (anexo 9)

p53 protein (DO-7) Monoclonal (NCL-953-DO7) clone DO-7
Proteína monoaplano, mouse IgG 2b DO7 Biogenex
bcl-2 Monoclonal (NCL-bcl-2) clone bcl/100D5
ABC (Elite, PK-6102 Mouse IgG VECTOR
Cromógeno Peroxidase substrate Kit DAB. SK4100 VECTOR
SS Multilink LG Volume Kit (500 slide)
DAB Substrate pack Biogenex (2000 slides)

f) Métodos de registro y procesamiento

La información obtenida a partir de la historia clínica, examen general, examen bucal, hallazgos de laboratorio y la metodología empleada fue capturada previa elaboración de una base de datos creada con el programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS V.10) para su análisis.

Para la inmunoexpresión de p53 y bcl-2 se utilizó una escala semicuantitativa donde 0 = nula, + = leve, ++ = moderada y +++ = intensa. La cuantificación de las

células se realizó utilizando criterios; donde la expresión 3 "intensa" es cuando había un 50% de células expresadas; 2 "moderada" entre 25 y 50%; 1 "leve" entre el 5 y 25% y 0 "negativa" cuando la expresión era de menor del 5%.

La observación y cuantificación de las manchas nucleolares se realizó obteniendo los siguientes datos por caso: número de células, número de AgNORs, promedio de AgNORs y número de nucléolos por campo.

g) Consideraciones metodológicas

Se eliminó el tejido que no presentó lesión histológica, el que no se manejó adecuadamente, así como aquellos casos en que al examen clínico aparentaron ser LP o carcinoma epidermoide pero a la observación microscópica no cumplió con el patrón histológico de las lesiones en estudio.

h) Análisis estadístico de los datos

El número de pacientes que acudieron al Departamento de Dermatología del Hospital General Manuel Gea González, fue de 5921 de los cuales 1875 fueron de primera vez y los restantes 4046 subsecuentes; de ellos un 0.47% presentó LP o carcinoma epidermoide.

Con los resultados obtenidos se realizaron tablas y gráficas de las variables así como porcentajes, promedio y desviación estándar, se realizó cruce de las

variables: edad, sexo, tabaquismo, alcoholismo, sitio de localización, grado de malignidad, ganglios linfáticos involucrados en liquen plano y carcinoma epidermoide con la expresión de p53, bcl-2 y número de AgNORs, además se realizaron pruebas de X^2 , t'Student, análisis de varianza y correlación con el paquete estadístico SPSS V. 10.

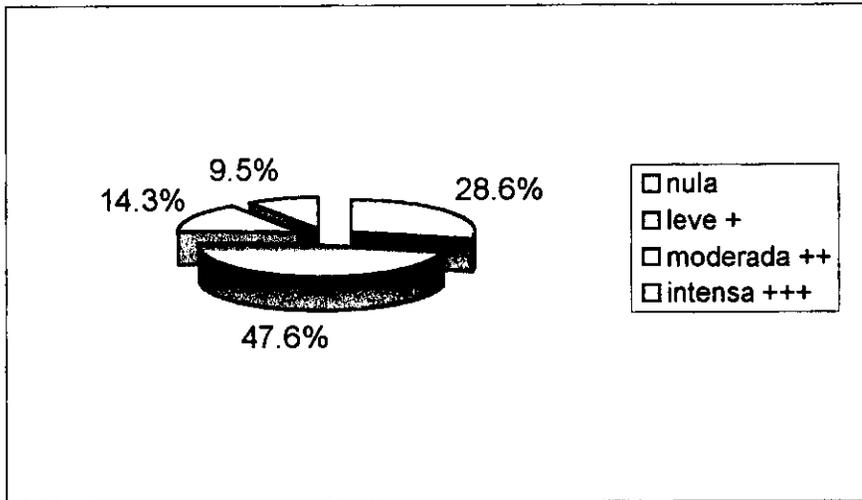
RESULTADOS

De los resultados obtenidos encontramos que la mayor frecuencia de pacientes a los que se les tomo biopsia fue de LP con 21 pacientes, 16 con carcinoma epidermoide y 5 con tejido sano, uno de estos pacientes con LP presentó recidiva a los 8 meses.

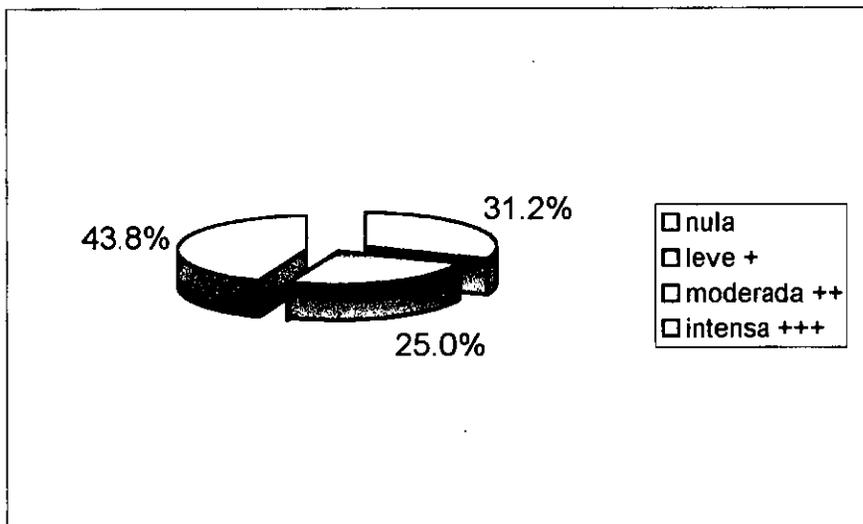
Inmunoexpresión a p53

La mayor frecuencia de la reacción inmunohistoquímica nuclear de p53 en los casos de LP observada microscópicamente fue la expresión leve (+) con 10 casos (47.6%) y la menor en la intensa (+++) con 2 (9.5%), 6 (28.6%) no mostraron expresión y con respecto a el carcinoma epidermoide, la mayor frecuencia fue en la expresión intensa (+++) con 7 (43.8%) y la menor fue en la expresión leve (+) con 4 (25%), 5 (31.2%) no mostraron expresión (gráfica 1 y 2), el caso de recidiva presentó una expresión moderada (++). Los 5 casos de tejido de mucosa normal no mostraron expresión a p53 figura 15 (B). En la figura 16 y 17 (B) se observa la expresión de p53 en LP y carcinoma epidermoide respectivamente.

Gráfica 1. Expresión de p53 en liquen plano



Gráfica 2. Expresión de p53 en carcinoma epidermoide



En las tablas 1 y 2 se puede observar la inmunexpresión de p53 en las lesiones en estudio cuyo número mayor fue de 101 y 317 respectivamente con un porcentaje de 56.74% y 87.81% y el menor fue de 17 y 23 con un porcentaje de 7.87% y 10.95% respectivamente. Se encontraron diferencias significativas entre el promedio de expresión de los casos de LP 8.52 ± 2.78 y los de carcinoma

epidermoide 29.30 ± 13.75 $t=2.063$ $p<0.001$ (gráfica 3). El caso de recidiva de LP presentó 65 células positivas que correspondieron a 40% de la inmunexpresión, con un promedio de 13 ± 3.46 células.

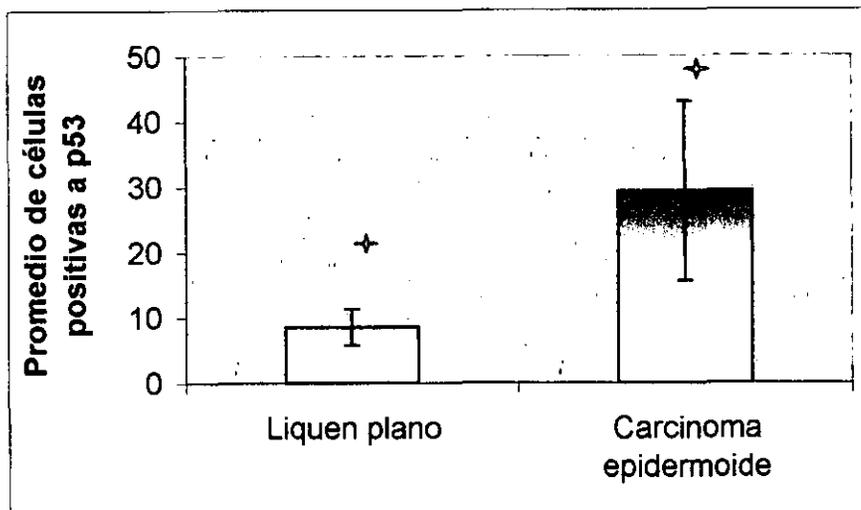
Tabla 1. Cuantificación de las células positivas a p53 en liquen plano

CASO	Células positivas por caso	Porcentaje de células positivas	Promedio	Error estándar
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	9	9.27	1.80	0.37
4	43	46.23	8.60	3.78
5	30	21.73	6.0	0.71
6	0	0	0	0
7	25	16.33	5.0	2.66
8	17	7.87	3.40	1.12
9	24	13.95	4.80	0.92
10	53	12.99	10.60	1.75
11	68	18.73	13.60	1.91
12	0	0	0	0
13	0	0	0	0
14	71	54.19	14.20	1.28
15	21	25.60	4.20	0.73
16	101	56.74	20.20	2.18
17	0	0	0	0
18	76	38.57	15.20	2.84
19	33	10.21	6.60	1.83
20	40	16.73	8.0	1.10
21	28	24.77	5.60	0.68

Tabla 2. Cuantificación de las células positivas a p53 en carcinoma epidermoide

CASO	Células positivas por caso	Porcentaje de células positivas	Promedio	Error estándar
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	218	76.22	43.60	4.34
4	317	87.81	63.40	4.15
5	221	80.07	44.20	3.83
6	130	76.02	26.00	1.79
7	153	56.76	30.60	6.61
8	29	8.05	5.80	0.37
9	33	20.88	6.60	1.29
10	38	8.46	7.60	2.04
11	160	68.66	32.00	3.58
12	0	0	0	0
13	0	0	0	0
14	23	10.95	4.60	0.68
15	0	0	0	0
16	290	76.31	58.00	5.89

Gráfica 3. Expresión de p53 en las lesiones en estudio



Inmunoexpresión a bcl-2

Las 2 lesiones en estudio no tuvieron inmunoexpresión a bcl-2 figura 17 y 18 (C), no así dos de los 5 especímenes de tejido sano en las que se observaron células positivas a bcl-2, figura 15 (C), la expresión mayor fue de 50 células (11.06%) y la menor de 21 con (11.35%). En los dos casos de tejido normal en los que existió expresión esta fue leve.

Tinción con Plata

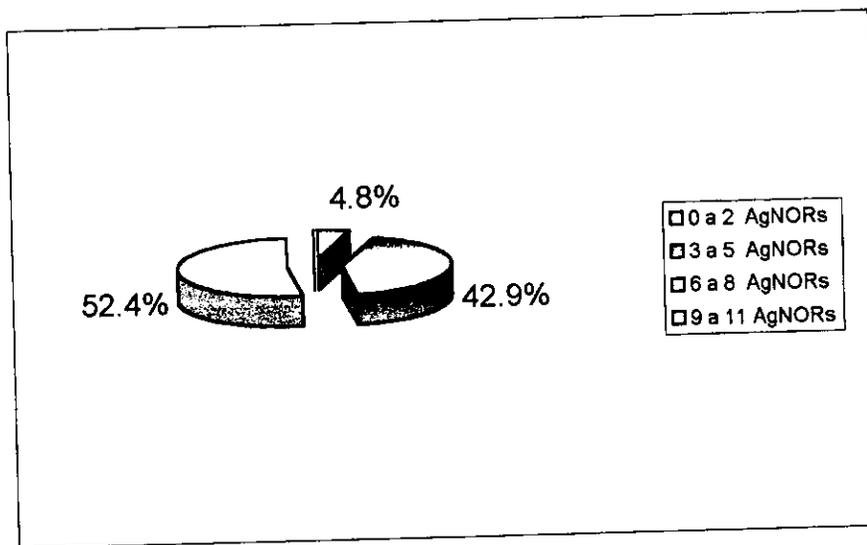
En la revisión microscópica de los especímenes tratados con plata se cuantificaron el número de células, los AgNORs así como el promedio de estos; en los casos de LP figura 17 (D), el número mayor de células contadas fue 262, el número mayor de AgNORs fue de 1535 y el promedio mayor de AgNORs fue de 7.4 ± 0.92 (tabla 3). El caso de recidiva mostró un total de 1198 AgNORs con un promedio de 7.9 ± 0.82 .

Tabla 3. Cuantificación de AgNORs en líquen plano

Caso	Total de células	Total de AgNORs	Promedio de AgNORs	Error estándar
1	170	816	4.8	0.64
2	188	1125	5.9	0.73
3	151	732	4.7	0.35
4	213	615	2.8	0.69
5	167	1249	7.4	0.92
6	232	935	4.0	0.32
7	158	874	5.5	0.56
8	205	1016	4.9	0.68
9	239	1308	5.4	0.64
10	230	388	1.6	0.56
11	248	954	3.8	0.34
12	173	764	4.4	0.29
13	145	742	5.1	0.64
14	169	1109	6.6	0.49
15	222	1253	5.6	0.58
16	140	954	6.8	0.52
17	144	769	5.3	0.65
18	223	793	3.5	0.63
19	262	1535	5.8	0.74
20	191	790	4.1	0.58
21	163	1026	6.2	0.46
Total	4033	19747	4.9	0.62

De acuerdo a la cantidad de puntos nucleolares contados en el LP, 11 casos (52.4%) presentaron de 6 a 8 AgNORs, 9 casos (42.9%) de 3 a 5 AgNORs y un caso (4.8%) de 0 a 2 (gráfica 4). El 66.7% de los casos con LP presentaron puntos gruesos. El caso de recidiva de LP presentó células únicamente con 6 8 AgNORs.

Gráfica 4. Porcentaje de AgNORs en líquen plano

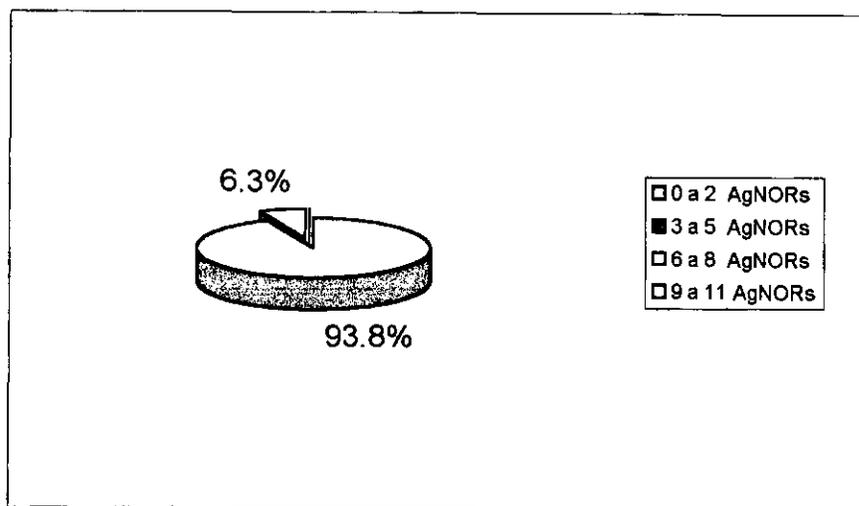


Con respecto a la cuantificación de puntos nucleolares en los carcinomas epidermoides figura 17 (D), el número mayor de células cuantificadas fue de 233, con 1613 AgNORs y un promedio de 6.9 ± 0.69 por célula. El promedio más alto fue de 8.4 (tabla 4). En base a la cantidad de puntos nucleolares 15 casos (93.8%) presentaron de 6 a 8 AgNORs, un caso (6.3%) tuvieron de 9 a 11 puntos nucleolares (gráfica 5). Del total de los casos con carcinoma epidermoide 15 casos (93.8%) presentaron puntos finos y únicamente un caso (6.3%) presentó puntos gruesos.

Tabla 4. Cuantificación de AgNORs en carcinoma epidermoide

Caso	Total de células	Total de AgNORs	Promedio de AgNORs	Error estándar
1	161	946	5.8	0.56
2	233	1613	6.9	0.69
3	227	1492	6.5	0.54
4	204	1356	6.6	0.35
5	147	839	5.7	0.59
6	145	979	6.7	0.52
7	148	1183	7.9	0.42
8	181	1002	5.5	0.31
9	149	906	6.0	0.49
10	217	1201	5.6	0.46
11	185	1360	7.3	0.34
12	186	1149	6.2	0.48
13	166	999	6.1	0.47
14	167	1410	8.4	0.92
15	162	847	5.2	0.32
16	147	966	6.5	0.54
Total	2825	18248	6.4	0.46

Gráfica 5. Porcentaje de AgNORs en carcinoma epidermoide



La cuantificación de las células y número de AgNORs en los casos de tejido normal figura 15 (D) se obtuvo que el número mayor de células fue de 253 con un total de 1181 AgNORs y un promedio de 4.6 ± 0.85 (tabla 5). En estos solamente se encontraron células que presentaban de 3 a 5 AgNORs.

Tabla 5. Cuantificación de AgNORs en el tejido normal

Caso	Total de células	Total de AgNORs	Promedio de AgNORs	Error estándar
1	245	916	3.7	0.81
2	192	705	3.6	0.78
3	208	696	3.3	0.79
4	253	1181	4.6	0.85
5	219	600	2.7	0.45
Total	1117	4098	3.5	0.83

Se encontraron diferencias significativas aplicando la prueba de ANOVA ($p < 0.001$). Cuando se aplicó la prueba SLD se encontraron diferencias entre el promedio de AgNORs en LP 4.9 ± 0.6 y carcinoma epidermoide 6.4 ± 0.4 y tejido sano 3.5 ± 0.8 y carcinoma epidermoide ($p < 0.001$), gráfica 6.

Gráfica 6. Promedio de AgNORs en las lesiones en estudio

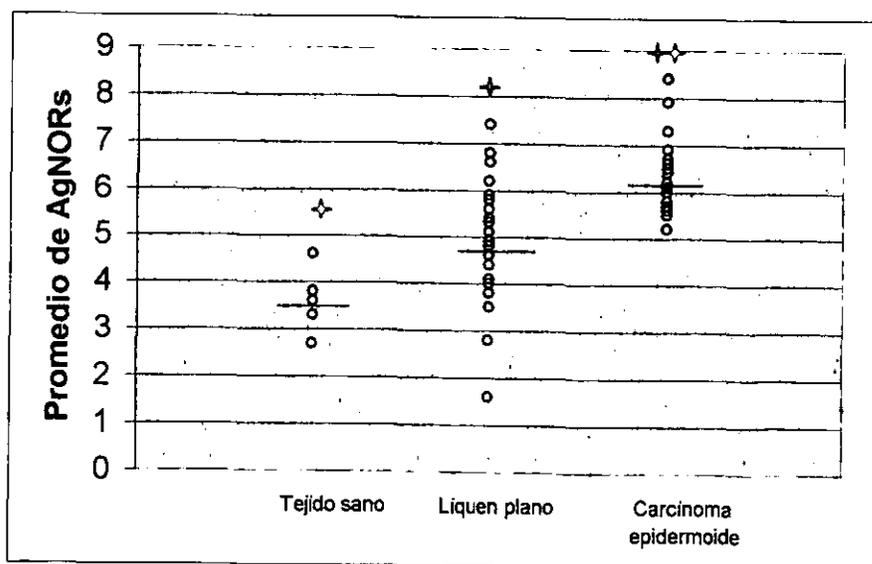


Figura 15. Tejido sano: A) Teñido con H y E, B) p53 C) bcl-2 y D) AgNORs a 100x



Figura 16. Liquen plano: A) Teñido con H y E, B) p53 C) bcl-2 y D) AgNORs a 100x

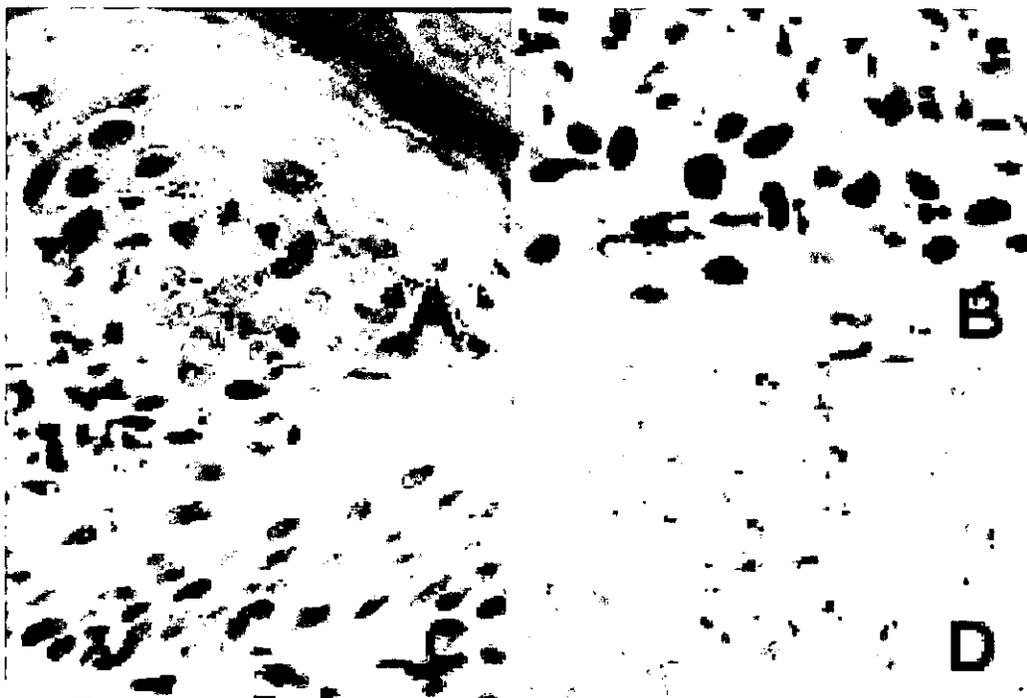
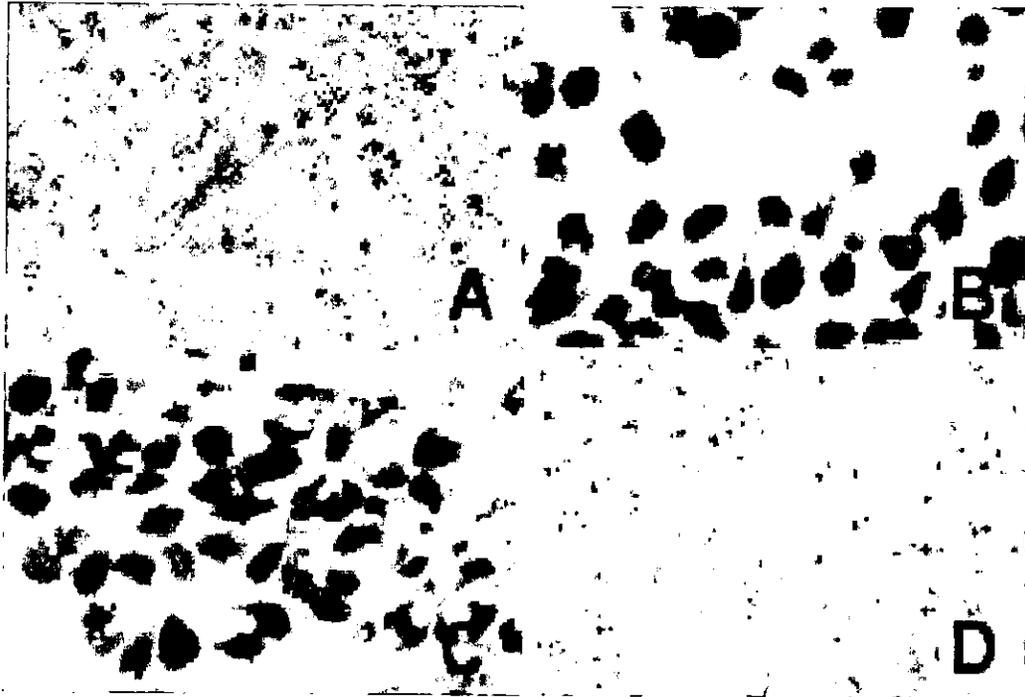


Figura 17. Carcinoma epidermoide A) Teñido con H y E, B) p53 C) bcl-2 y D) AgNORs 100x



Factores asociados al desarrollo de LP y carcinoma epidermoide, con la inmunoexpresión de p53 y cuantificación de AgNORs

Edad, sexo, p53 y AgNORs,

Los pacientes con LP presentaron un promedio de edad de 56 ± 12.3 años con un rango de 22 a 74 años, y los de carcinoma epidermoide, un promedio de edad 66.8 ± 14.4 años con un rango de 33 a 93 años. En cuanto a la distribución por sexo en los pacientes con LP se encontró que el predominio fue por el sexo femenino con un 76.2%, no así en el carcinoma epidermoide que tuvo un predominio por el sexo masculino en un 75%.

No se encontró una relación significativa al aplicar la correlación de Pearson ($p > 0.05$) entre la expresión de p53 y la cuantificación de AgNORs con la edad de los pacientes. Así mismo no se encontraron diferencias estadísticas significativas en la expresión de p53 y AgNORs en relación con el sexo al aplicar X^2 ($p > 0.05$) por lo que no existe una asociación entre la edad y el género de los sujetos del estudio y la inmunoexpresión a p53 y los AgNORs.

Tabaquismo, alcoholismo, p53 y AgNORs

El 28.6% de los pacientes con LP presentaron el hábito de tabaquismo y el 14.3% alcoholismo, no así los de carcinoma epidermoide en donde el 62.5% presentaron tabaquismo positivo y el 43.8% alcoholismo.

No se presentaron diferencias significativas entre la expresión de p53 y la cuantificación de AgNORs con el hábito de tabaquismo y alcoholismo, X^2 ($p>0.05$) por lo tanto la inmunoexpresión a p53 y la cuantificación de AgNORs en las lesiones son independientes de estos.

Tipos clínicos de LP, p53 y AgNORs

Con respecto a los tipos clínicos de LP el que se presentó con mayor frecuencia fue el erosivo con un 47.6% (tabla 6), el 28.6% de los pacientes en el momento del diagnóstico estaban asintomáticos. En cuanto al color 12 (57.1%) presentaban color combinado (rojo-blanco) 5 (23.8%) rojo y 4 (19%) blanco.

Tabla 6. Tipo de liquen plano que presentaron los pacientes al examen clínico

Tipo de liquen plano	Frecuencia	Porcentaje
Atrófico		
Reticular	4	19.0
Placas		
Erosivo	10	47.6
Buloso		
Combinado (placa-erosivo)	7	33.3
Total	21	100

Los dos casos de LP que presentaron expresión intensa (+++) fueron del tipo erosivo, sin embargo no se encontró diferencia significativa entre los diferentes tipos de LP con la expresión de p53 X^2 ($p>0.05$) (tabla 7 y 8) y en la cuantificación de AgNORs (tabla 9). Por lo que podemos decir que la expresión de p53 y la cantidad de AgNORs se presentan independientemente del tipo de LP. En cuanto al color de las lesiones y la expresión de p53 las lesiones con inmunoexpresión intensa (+++)

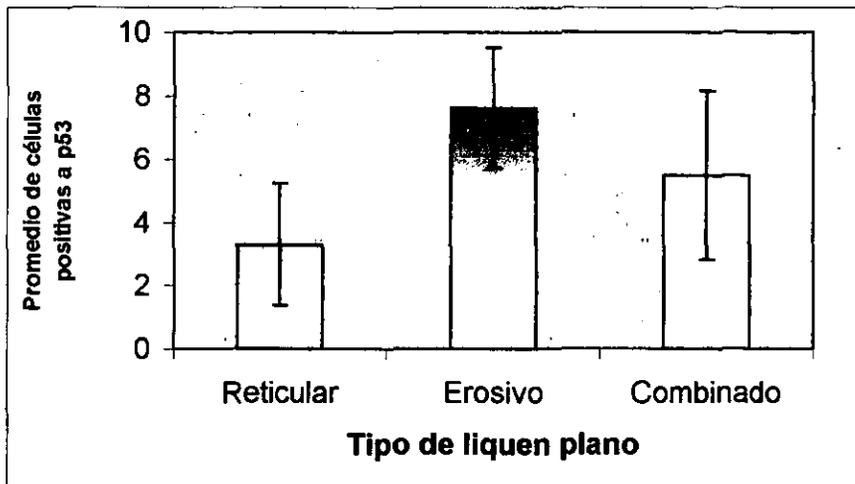
presentaron color rojo sin embargo no se encontró diferencia entre la inmunoexpresión a p53 y el color de las lesiones, 8 casos con color combinado (rojo-blanco) presentaron de 6-8 AgNORs y 4 de 3-5 AgNORs y en las de color rojo 3 casos presentaron de 3-5 AgNORs y al aplicar la $X^2=9.72$ ($p<0.05$) se encontró que existía diferencia significativa. Por lo tanto podemos decir que con respecto a la cuantificación de AgNORs estos incrementan en las lesiones con color combinado.

Tabla 7. Expresión de p53 y tipo clínico de liquen plano

Tipo de liquen plano	Expresión de p53				Total
	Nula	+	++	+++	
Atrófico Reticular Placas	1	3			4
Erosivo Buloso	3	3	2	2	10
Combinado(placa-erosivo)	2	4	1		7
Total	6	10	3	2	21

El promedio de células positivas a p53 en los diferentes tipos de LP se muestran en la gráfica 7, el LP erosivo tuvo un promedio 7.62 ± 1.90 , el combinado 5.48 ± 2.67 , el reticular de 3.3 ± 1.94 células positivas, no hubo diferencias significativas al análisis de varianza en las células positivas en los diferentes tipos de LP ($p>0.05$).

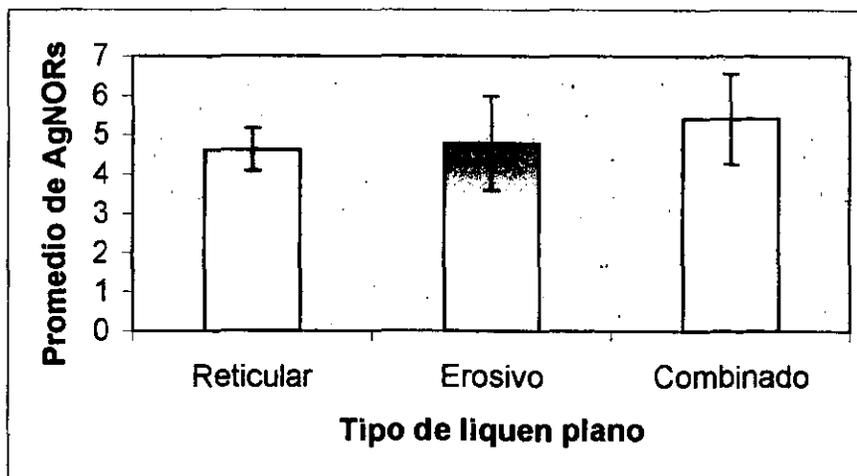
Gráfica 7. Expresión de p53 en los diferentes tipos de liquen plano



Cuantificación de AgNORs y tipo de LP

El promedio de AgNORs de acuerdo al tipo de LP, fue el siguiente en el combinado 5.41 ± 1.15 , erosivo 4.78 ± 1.2 , reticular 4.62 ± 0.54 , al análisis de varianza ($p > 0.05$) no se encontró diferencia significativa entre los diferentes tipos de LP y el promedio de AgNORs (gráfica 8).

Gráfica 8. Promedio de AgNORs en los diferentes tipos de liquen plano



Grado de malignidad de carcinoma epidermoide, p53 y AgNORs

Con respecto a la clasificación histológica de los carcinomas encontramos que el 62.5% fue de bajo grado de malignidad, el 31.3% intermedio y únicamente un caso (6.3%) presentó un alto grado de malignidad.

La expresión que existió de p53 en relación al grado de malignidad de los carcinomas se observa en la (tabla 8). El tipo de expresión que predominó fue la leve (+), en el de bajo grado de malignidad, el único caso que se encontró con alto grado de malignidad presentó una expresión intensa (+++). El grado de malignidad que presentó mayor frecuencia de expresión intensa (+++) fue intermedio.

Al realizar el coeficiente de correlación de Pearson entre la expresión de p53 y el grado de malignidad de acuerdo a los criterios de Jakobsson se encontró que el valor de la correlación fue $r=0.5370$ con una significancia de $p=0.039$ lo que indica una relación positiva estadísticamente significativa entre el grado de malignidad y la expresión de las células a p53.

Tabla 8. Expresión de p53 en carcinoma epidermoide y grado de malignidad

Grado de malignidad	Expresión de p53				Total
	nula	+	++	+++	
Bajo	3	4		3	10
Intermedio	2			3	5
Alto				1	1
Total	5	4	0	7	16

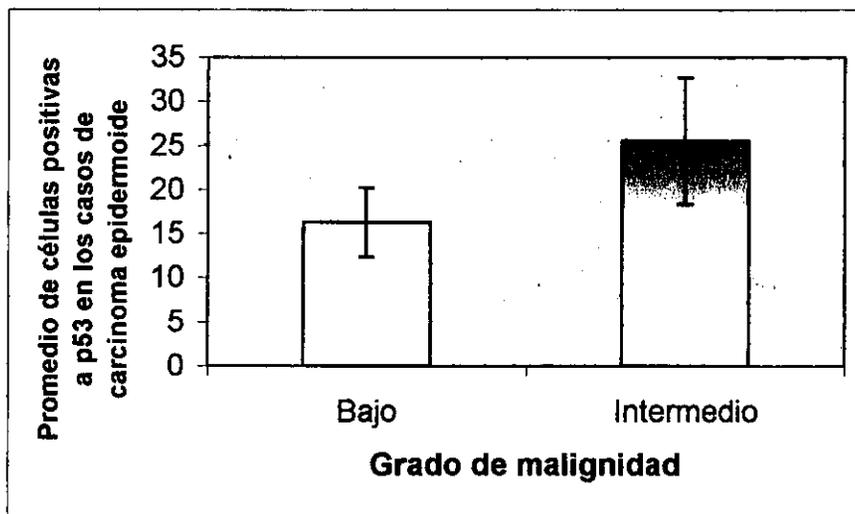
Los resultados obtenidos de la cuantificación de la expresión de p53 en los casos de carcinoma epidermoide de acuerdo al grado de malignidad se presentan en

la (tabla 9 y gráfica 9). En los casos de bajo grado de diferenciación el total del número de células positivas fue de 814 con un promedio de 16.28 ± 3.93 con un rango mínimo de 0 y un máximo de 317 en el de alto grado el total de células fue de 160 con un promedio de 32 células por caso, no habiendo diferencias significativas $p > 0.05$ entre ellos.

Tabla 9. Cuantificación de las células positivas a p53 de acuerdo al grado de malignidad en los carcinomas epidermoides

Grado de malignidad (caso)	Células positivas por caso	Promedio	Error estándar
Bajo			
2	0	0	0
4	317	63.40	4.15
5	221	44.20	3.83
7	153	30.60	6.61
8	29	5.80	0.37
9	33	6.60	1.29
10	38	7.60	2.04
12	0	0	0
13	0	0	0
14	23	4.60	0.68
Total	814	16.28	3.93
Intermedio			
1	0	0	0
3	218	43.60	4.34
6	130	26	1.79
15	0	0	0
16	290	58	5.89
Total	638	25.52	7.20
Alto			
11	160	32	8.0
Total	160	32	

Gráfica 9. Promedio de células positivas a p53 en los casos de carcinoma epidermoide de acuerdo al grado de malignidad



Cuantificación de AgNORs de acuerdo al grado de malignidad

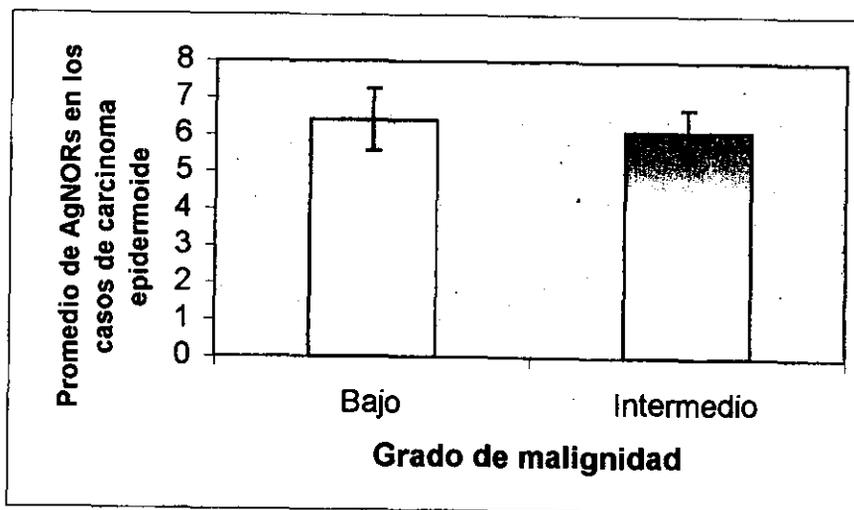
El promedio del número AgNORs más alto fue de 8.4 ± 0.92 que correspondió a un carcinoma de bajo grado de malignidad, el grado alto de malignidad correspondió a un promedio de 7.3 ± 0.34 (tabla 10 y gráfica 10). No se encontró correlación significativa Pearson ($p > 0.05$) entre el promedio de AgNORs y el grado de malignidad.

Tampoco se presentaron diferencias significativas t-Student ($p > 0.05$) entre el promedio de AgNORs de los carcinomas de bajo grado de malignidad 6.4 ± 0.85 y los de intermedio 6.1 ± 0.63 .

Tabla 10. Cuantificación de AgNORs de acuerdo a los criterios de Jakobsson

Caso	Promedio de AgNORs	Grado de malignidad
2	6.9	bajo
4	6.6	bajo
5	5.7	bajo
7	7.9	bajo
8	5.5	bajo
9	6.0	bajo
10	5.6	bajo
12	6.2	bajo
13	6.1	bajo
14	8.4	bajo
Total	6.4	+ 0.85
1	5.8	intermedio
3	6.5	Intermedio
6	6.7	intermedio
15	5.2	intermedio
16	6.5	intermedio
Total	6.1	+ 0.63
11	7.3	alto

Gráfica 10. Promedio de AgNORs en los casos de carcinoma epidermoide de acuerdo al grado de malignidad



Localización de las lesiones, p53 y AgNORs

En los casos de LP 14 pacientes (66.7%) presentaron lesiones solamente en boca, 5 casos (23.8%) presentaron lesiones en boca y en piel y únicamente 2 casos (9.5%) presentó lesiones en boca y genitales. Estas lesiones se encontraron en mucosa bucal en 6 casos (28.6%), en mucosa masticatoria y mucosa bucal en 9 casos (42.9%), 2 casos (9.5%) presentaron lesiones en los tres tipos de mucosa y 4 (19.0%) presentaban lesiones en mucosa especializada y mucosa de revestimiento. La biopsia fue tomada en mucosa bucal en 11 casos (52.4%), 8 (38.1%) en mucosa labial, un caso fue tomado de la cara dorsal de la lengua y otro de paladar duro.

Los carcinomas se presentaron 8 casos (50%) en mucosa labial, 4 (25%) en bordes laterales de la lengua, 2 (12.5%) en mucosa bucal, uno (6.3%) en mucosa masticatoria, así como un caso (6.3%) de carcinoma invasor que abarcaba la mucosa masticatoria y la mucosa bucal.

Con respecto a la expresión de p53 y la cuantificación de AgNORs de acuerdo así el LP se encontraba asociado a piel, genitales o únicamente se presentaba en boca, así como en los diferentes sitios donde se tomo la biopsia o al sitio donde se presentaban las lesiones no se encontró diferencia estadísticamente significativa X^2 ($p>0.05$). El LP que presentó color combinado (rojo-blanco) presentó mayor cantidad de AgNORs, que los que presentaban únicamente color rojo o color blanco, esta diferencia fue estadísticamente significativa $X^2=9.72$ ($p<0.05$).

En los casos de carcinoma epidermoide el sitio de localización que presentó una mayor frecuencia de inmunoexpresión intensa (+++) a p53 fue la de mucosa labial, así mismo la mayor cantidad de AgNORs se presentó en mucosa labial, sin embargo no se encontró diferencia significativa X^2 ($p>0.05$) ni a la expresión de p53, a la cuantificación de AgNORs en los diferentes sitios de localización de la lesión.

Detección de p53 y AgNORs de las lesiones en estudio de acuerdo al tiempo de evolución de las lesiones

En 6 casos (28.6%) de LP el tiempo de evolución fue menor a 3 meses, en 8 (38%) fue de 6 meses a un año, y solamente 2 casos (9.5%) presentaron un tiempo de evolución mayor a 3 años.

Con respecto al carcinoma epidermoide 6 casos (37.5%) tuvieron un tiempo de evolución menor a 3 meses, así mismo 6 casos (37.5%) 6 meses de evolución y 4 casos (25%) de uno a tres años.

Las lesiones que presentaron una expresión intensa (+++) tenían un tiempo de evolución que iba de uno a tres años, sin embargo no se encontró diferencia significativa entre la expresión a p53 la cuantificación de AgNORs y el tiempo de evolución del LP X^2 ($p>0.05$), tampoco el tiempo del carcinoma epidermoide se relaciono a una mayor expresión de p53 y evolución y cantidad de AgNORs, por lo tanto la expresión de p53 y los AgNORs en las lesiones son independientes al tiempo de evolución.

Ganglios linfáticos involucrados, p53 y AgNORs

Únicamente 2 casos (12.5%) de carcinoma epidermoide presentaron ganglios linfáticos involucrados.

No se encontró diferencia significativa entre la expresión de p53 y el número de AgNORs con la presencia de ganglios linfáticos involucrados X^2 ($p > 0.05$), por lo que podemos decir que no por presentar ganglios involucrados la expresión a p53 el número de AgNORs es mayor.

DISCUSION

Actualmente las investigaciones sobre cáncer humano han sido enfocados a sus aspectos moleculares y a sus bases genéticas donde los genes que codifican para diferentes proteínas involucradas en los mecanismos que regulan el ciclo celular y la diferenciación celular parecen estar asociados al desarrollo del cáncer; uno de los genes estudiados en diferentes tipos de tumores son p53 y bcl-2, ellos han sido involucrados en la transformación maligna de las células normales; siendo estudiados en boca en lesiones benignas, premalignas y malignas del epitelio; dentro de estas el LP, debido a su posible transformación maligna; aunque únicamente un pequeño porcentaje desarrollan un carcinoma epidermoide, ha sido considerado por diferentes investigadores como una condición precancerosa donde el tiempo de permanencia de la lesión es posiblemente el factor que desencadena la transformación maligna; por lo que la mutación de p53 en LP teóricamente esta relacionada a un riesgo mayor de transformación maligna¹¹⁸.

Girod y cols. en 1994 reportaron la inmunoexpresión de p53 en 39 lesiones sin displasia; 31 (79%) no mostraron expresión, 8 (21%) mostraron expresión leve y de estas, 7 lesiones fueron diagnosticadas como LP por otra parte, Ogden y cols. en 1992 analizaron la inmunoexpresión en 12 casos de LP donde dos de ellos eran del tipo erosivo, a diferencia de esta investigación donde 15 (71.5%) casos de LP mostraron inmunoexpresión, de estos 10 casos eran del tipo erosivo por otra parte existe mayor información con respecto al papel de p53, en carcinoma epidermoide de boca, la inmunoexpresión de ella ha sido observada en el 20 a 50% de los casos;

llegándose a reportar hasta en un 81%. Langdon y cols. 1992, Girod y cols. 1994, Ogden y cols. 1992, De Araújo y cols. 1997 y Warnakulasuriya y cols. 1992 observaron expresión en 80%, 46%, 54% 62.5% y 35% respectivamente; nosotros obtuvimos que el 68.8% de nuestros casos fueron positivos a p53. Si comparamos los porcentajes, la mayor parte de los resultados obtenidos por todos incluyéndonos están por arriba del 50% lo cual puede ser indicativo de que la expresión de esta proteína puede o no expresarse en este tipo de cáncer y que existen factores aún desconocidos que regulan su expresión.

Uno de los factores asociados al carcinoma epidermoide de boca es el tabaquismo, han sido descritos porcentajes significativamente más altos de inmunoexpresión de p53 en fumadores crónicos que en no fumadores¹¹³⁻¹¹⁴. Ogden y cols. en 1992 mencionaron que de 16 pacientes fumadores, 13 presentaron inmunoexpresión de p53 y únicamente uno de diez no fumadores mostraron expresión. En ese mismo año Lagdon y cols. observaron que la expresión fue más intensa en tumores obtenidos de pacientes quienes eran fumadores crónicos y bebedores; sugiriendo que el gen p53 puede ser uno de los sitios de daño genético en este grupo de pacientes, en esta investigación siete de diez fumadores presentaron inmunoexpresión leve e intensa, y cuatro de seis no fumadores mostraron inmunoexpresión intensa. Así mismo cinco de nueve pacientes no bebedores presentaron expresión intensa. Nosotros no consideramos en el análisis el tiempo y frecuencia de los hábitos sólo se consideró si los presentaban o no, por lo que no podemos considerar en este momento a estos 2 hábitos como factores inductores y promotores al menos en este estudio.

El pronóstico del carcinoma epidermoide en boca es variable de acuerdo a la etapa clínica, clasificación histológica y localización de las lesiones, siendo esta última de gran importancia pronostica Regezi y cols. 1995 mencionan que todas las lesiones que ocurrieron en lengua fueron positivas a p53. Los hallazgos de nosotros fueron variables, revelando que la inmunexpresión se presenta indistintamente tanto en las lesiones de mucosa bucal como de lengua. Sin embargo Ogden y cols. 1992 no observaron inmunexpresión a p53 en la región de la mucosa bucal.

Al relacionar el grado de malignidad con la inmunexpresión de p53 Araújo y cols. 1997 encontraron relación con el grado histológico de malignidad. Así mismo Warnakulsuriya y cols. 1992 hallaron que los casos positivos a p53 eran carcinomas bien diferenciados, sugiriendo que la mutación puede ocurrir en estadios tempranos de transformación maligna. Esto fue apoyado cuando la proteína fue detectada en cantidades mínimas en 2 displasias. Nosotros obtuvimos una relación estadísticamente significativa entre el grado de malignidad y la expresión de las células a p53, sugiriendo que al aumentar el grado de malignidad aumenta el número de células expresadas, por lo que consideramos que la participación de esta proteína en el desarrollo del carcinoma epidermoide es uno de los aspectos moleculares que deberían de estudiarse en un futuro con la expresión génica de esta.

De acuerdo con lo reportado en la literatura^{110,119} no se obtuvo relación entre la edad y el género con la expresión de p53, así mismo tampoco existió inmunexpresión de la proteína en mucosa bucal normal, esto puede ser debido como se menciona en la literatura a que en condiciones normales, p53 silvestre tiene

una vida media muy corta sucediendo lo contrario cuando se encuentra mutada y puede expresarse.

Por otra parte la inhibición de la apoptosis otorga un crecimiento selectivo o desarrollo ventajoso a las células neoplásicas permitiendo su crecimiento⁹⁷. La inmunexpresión de bcl-2 en diversos tumores ha sido reportada^{98,101,104-105}. Bloor y cols. en 1999 determinaron la inmunexpresión de bcl-2 en mucosa normal y LP de tipo reticular obteniendo que 2 y 15 casos respectivamente presentan expresión leve; en la mayor parte de los casos de LP, contrario a lo esperado ellos mencionan que los linfocitos de la parte superficial del corion mostraron reacción en el núcleo para bcl-2. Al igual que ellos obtuvimos que existió expresión leve de bcl-2 en 2 casos de mucosa bucal normal, pero ninguno de nuestros casos de LP expresó la proteína. Jordan y cols. en 1996 encontraron una inmunexpresión moderada e intensa en el 60% de los carcinomas, 6/7 de los pobremente diferenciados, presentaron inmunexpresión intensa, 3/11 fueron bien diferenciados y 2/12 moderadamente diferenciados. Ellos defienden sus resultados argumentando que el aumento de la expresión de bcl-2 en el grupo de los carcinomas pobremente diferenciados se debe a la pérdida de capacidad de los queratinocitos malignos para la diferenciación final y sugiriendo que aquellas células que sobreexpresan bcl-2 tienen un fenotipo de la célula madre. Los resultados obtenidos por nosotros fueron negativos a bcl-2 en los casos de carcinoma epidermoide, consideramos que el hecho de que bcl-2 no se expresara en nuestros casos, puede ser por 2 factores el primero es que indirectamente nos está indicando que está inhibida la apoptosis; y el 2 factor es

porque es posible que el gen que codifica para esta proteína no este involucrado en el desarrollo de las lesiones epiteliales de boca.

Teóricamente se ha descrito en la literatura que la expresión alterada de un solo oncogen es generalmente insuficiente para inducir una transformación completa, por lo que se han asociado la sobreexpresión de bcl-2 y la función alterada de p53 estableciéndose que juegan un efecto sinérgico crucial en la carcinogénesis⁹⁸. Dekker y cols. en 1997; reportaron que no existe expresión de bcl-2 en mucosa bucal normal, contrario a lo observado por nosotros, donde se expresaron dos de cinco casos. Con respecto al LP el resultado fue el mismo ya que ningún caso se expresó. Por otra parte la expresión a p53 fue positiva en todos los casos estudiados por Dekker y cols. cuyos resultados son semejantes a los nuestros ya que 15 casos fueron positivos, sin obtener expresión en ninguno de los 2 trabajos en la mucosa normal. Los patrones de expresión de p53 en LP sugieren la participación de esta proteína, contrario a la expresión de bcl-2 que posiblemente no participe en el desarrollo de esta lesión; este fenómeno nos indica que p53 es una proteína que tiene una función en este tipo de lesiones y que probablemente tengan una estrecha relación con el comportamiento biológico de la lesión.

Al mismo tiempo en 1999 Schoelch y cols. partiendo de que la regulación de la apoptosis puede estar alterada en el desarrollo del carcinoma epidermoide, estudiaron queratosis, displasia y carcinoma epidermoide, encontrando que 10/90 lesiones fueron positivas para bcl-2 (todas fueron displasia y carcinoma epidermoide) 30/90 especímenes mostraron expresión positiva a p53. Los niveles de

inmunoexpresión de p53 se incrementaron directamente proporcional a los cambios displásicos, sin embargo sus resultados no son predictivos ya que sus porcentajes de positivos son muy bajos a ambas proteínas.

Previamente Kannan y cols. en 1998 estudiaron 39 casos de carcinoma epidermoide, encontrando que el 76% de ellos mostraron expresión intensa a bcl-2; en la mucosa normal la expresión fue indetectable, no encontraron relación entre la expresión de bcl-2, el estadio clínico, la edad o el sexo. Al realizar el análisis de acuerdo al sitio, la expresión fue; 44% en tumores de mucosa bucal y 33% en lengua respectivamente, sugiriendo que estos son los blancos preferidos para bcl-2. Cuando la expresión de esta fue comparada con la expresión de p53 ellos encontraron que no se traslaparon, es decir que estos eventos son mutuamente excluyentes, en base a esto podemos considerar que la expresión de las proteínas pueden tener afinidad por ciertos tejidos de la boca sin poderlo asegurar.

Sin embargo en 1999 Yao y cols. analizaron la expresión de bcl-2 y p53 en 52 casos de carcinoma epidermoide de borde lateral de lengua, la expresión de bcl-2 fue de 26 (50%) casos y 31 (60%) de los casos a p53. Los tejidos control no mostraron inmunoreactividad a p53 y a bcl-2. Reportaron que existe una relación significativa de bcl-2 con el grado histológico del tumor, modo de invasión marginal del tumor y ganglios linfáticos involucrados. Con respecto a p53 hubo asociación significativa con el modo de invasión del tumor, consideramos que las cifras obtenidas por ellos contrario a lo reportado por otros incluyéndonos nosotros es debido a la agresividad del carcinoma epidermoide cuando se presenta en lengua.

Atula y cols. en 1996 encontraron inmunoreactividad a p53 en 87% de los casos de carcinoma epidermoide de lengua. No obtuvieron relación entre la expresión de p53, el tamaño del tumor, grado histológico, hábito de tabaquismo, consumo de alcohol y metástasis. En este estudio si se encontró relación significativa con el grado de malignidad y la expresión de p53, sugiriendo que al aumentar el grado de malignidad aumenta el número de células expresadas, no así con los otros factores considerados. Atula y cols. 1996 muestran una relación estadísticamente significativa entre la expresión de bcl-2 y tabaquismo, los 6 fumadores crónicos presentaron moderada o intensa inmunoreacción a bcl-2, no hubo expresión en los tejidos de no fumadores.

Por otra parte los métodos para valorar los NORs que se han utilizado en diversos estudios incluyen el conteo de los AgNORs^{127,139-140} donde han determinado el área, volumen, patrón y distribución de acuerdo a los criterios morfométricos establecidos por cada investigador¹²⁷⁻¹²⁸ considerando los AgNORs como un marcador cuantitativo de alteraciones celulares incipientes y con transformación maligna sugiriendo su uso potencial para valorar la actividad celular.

Los resultados de este estudio coinciden con trabajos previos en los que el promedio de AgNORs permite discriminar entre epitelio normal y otras lesiones como displasia, queratosis y carcinoma epidermoide de la cavidad bucal. Donde pudo observarse, que existen diferencias en el promedio de AgNORs entre epitelio normal, LP y carcinoma epidermoide. Encontrando un incremento en el número de ellos al comparar epitelio normal y carcinoma, por lo que demostramos una vez más que los

AgNORs aumentan en las lesiones malignas; las lesiones de LP con cantidades altas podrían representar un mayor riesgo de transformación maligna, sobre todo el tipo erosivo y combinado ya que presentaron un promedio mayor de AgNORs, lo que coincide con lo mencionado en la literatura donde los tipos de LP que presentan mayor riesgo de transformación maligna son el erosivo y el tipo combinado^{48-50,53,56}, por lo que los pacientes con este tipo de LP presentan un riesgo mayor a desarrollar lesiones malignas que aquellos con mucosa bucal normal considerando que estos pacientes deben ser monitoreados a largo plazo.

Cabrini y cols. en 1992 cuantificaron el número de AgNORs en mucosa normal, papiloma y carcinoma epidermoide obteniendo un promedio de 2.95, 4.53 y 8.04 AgNORs respectivamente. Xin Xie y cols. 1997 encontraron en el epitelio normal que el 70% de los núcleos presentaron de 1 a 2 AgNORs y en carcinoma epidermoide más del 60% presentaron más de 4 AgNORs, con un promedio de 6.2, a diferencia de este estudio en el que el 100% de los casos con carcinoma epidermoide presentó más de 6 AgNORs. Warnakulasuriya y cols. en 1993 reportaron en displasia un promedio de 5.61 AgNORs y en carcinoma de 8.37, Schwint y cols. en 1994 encontraron en mucosa normal un promedio de 2.95 AgNORs, en epitelio adyacente al carcinoma 4.81 y en carcinoma epidermoide 6.56 AgNORs. En esta investigación se obtuvo que el promedio de AgNORs en mucosa normal, en LP y en carcinoma epidermoide fue de 3.5, 4.9 y 6.4 AgNORs respectivamente, observándose un número mayor de AgNORs en mucosa bucal normal (3.5 vs 1 a 2, 2.95 AgNORs) que en los trabajos antes mencionados, esto podría considerarse debido a que los tejidos control se tomaron de mucosa

masticatoria, la cual se encuentra en constante recambio. En los casos de carcinoma epidermoide el número es inferior al de estudios previos (6.4 vs 8.04, 8.37), excepto con los de Schwint y cols. 1994 y Xie y cols. en 1997 en los que la cantidad es semejante (6.4 vs 6.2, 6.5) esta similitud con Xie y cols. 1997 puede deberse a que se consideró no realizar el conteo de los AgNORs en áreas con necrosis y respuesta inflamatoria severa y daño artificial; se coincidió con Schwint y cols. en 1994 en que los AgNORs en el carcinoma epidermoide se observaron dispuestos irregularmente, pequeños y abundantes.

Así mismo Donofrío y cols. en 1995 determinaron la presencia de AgNORs en 6 casos de leucoplasia con displasia leve, 9 con moderada 9 con severa y 6 con carcinoma epidermoide, algunos de ellos con presencia del virus papiloma humano, encontraron diferencia significativa entre el número de AgNORs entre la displasia de bajo y alto grado, no encontrando diferencias significativas en el número de AgNORs en las lesiones con o sin presencia del virus. Piffko y cols. 1997 evaluaron el número de AgNORs en el frente invasor del tumor, parte central del tumor, mucosa con displasia y epitelio normal observando un aumento de estos en el frente invasor, lo que parece indicar un subgrupo de células tumorales con actividad biosintética y potencial maligno.

En 1991 Sano y cols. cuantificaron los NORs en 39 casos de carcinoma epidermoide 19 con pobre pronóstico y 20 con buen pronóstico, realizaron la clasificación histológica de los carcinomas, de acuerdo a los criterios de la OMS encontrando 35 casos grado 1, con un promedio de 6.39 ± 1.67 AgNORs, 3 grado 2

con 9.74 ± 1.72 , 1 grado 3 con 6.19 ± 2.37 . El número más alto de AgNORs fue en el grado 2 mientras que el número más bajo fue en el grado 1 encontrándose diferencia significativa entre los del grado 1 y 2. El promedio de la cantidad de AgNORs en el grupo de pobre pronóstico fue más alto que en los de buen pronóstico aunque la diferencia no fue significativa, concluyendo que un número elevado de NORs es sugestivo de un pobre pronóstico en carcinoma epidermoide bucal. En este trabajo se encontró que el carcinoma de alto grado de malignidad presentó mayor cantidad de AgNORs 7.3 ± 1.2 , los de bajo 6.4 ± 0.98 y los de moderado fueron los que presentaron el promedio más bajo de AgNORs 6.1 ± 0.62 , sin embargo no se encontró diferencia significativa entre los de bajo y moderado grado de diferenciación.

No existió diferencia significativa entre la cantidad de AgNORs con la edad, sexo, tabaquismo, alcoholismo, ganglios linfáticos involucrados y tiempo de evolución de las lesiones en estudio y no existen reportes previos con la cuantificación de AgNORs que relacionen estos factores.

Las diferencias encontradas con otros reportes, pueden deberse a varias consideraciones como: el grosor del corte del tejido el cual varía desde $2\mu^{141}$ a $4\mu^{127,138-139}$ para este estudio se obtuvieron cortes de 5μ ; el número de campos que se observaron, en 2 estudios^{127,138} observaron 10 campos, Xie y cols. 1997, observaron 5 campos, en este estudio se cuantificaron 25 campos, en algunos estudios se cuantifican los AgNORs utilizando un número mínimo de $100^{128,132}$, o 200

células¹⁴⁰. El método que se ha utilizado en la cuantificación a variado entre los diferentes autores, algunos han utilizado analizador de imágenes^{127,138}, y microfotografías amplificadas, para utilizarlas en el analizador de imágenes^{127,138}. El aumento del objetivo en el que han sido analizadas las muestras a variado desde 1000 aumentos (con aceite de inmersión) para amplificar a 2000 por medio de las microfotografías^{127,138}, a 1060 aumentos¹³². En esta investigación se utilizó una magnificación de 100x, con un aumento a 4000x por medio de cctv con un monitor de 20", otra variante es el número de examinadores que realizaron la cuantificación 1^{128,139} o 2^{132,141} y si estos estaban enterados^{128,138} o no^{132,139} a que correspondía cada tejido, así como si se excluyeron áreas necróticas, con respuesta inflamatoria severa, daño artificial y o si los sitios fueron escogidos por movimientos al azar por medio de controles coaxiales¹³⁹. En el estudio la cuantificación fue realizada por dos examinadores, uno de ellos estaba enterado a que correspondía cada tejido, seleccionando las áreas de acuerdo a los criterios de Xie y cols.

Uno de los posibles errores que se manejan dentro de esta técnica, es la manera en que se conservan los tejidos ya que el desarrollo de las estructuras que se tiñen con plata, ha sido demostrado que son sensibles al método de fijación del tejido¹²⁸, otras determinantes pueden también contribuir en la técnica como el pH, la temperatura de incubación y el tiempo de la reacción^{127-128,138}. Así mismo Piffko y cols. en 1997 concluyen que se deben meter las laminillas al autoclave antes de realizar la técnica de tinción con plata para que de esta manera no se observen artefactos y así evitar una importante e imprevisible sobreestimación del número de AgNORs.

Conclusiones

- En los casos de liquen plano la expresión mayor a p53, fue en el tipo erosivo; el tipo combinado y erosivo presentaron el mayor promedio de AgNORs, estas lesiones mostraron un patrón nucleolar indicativo de gran actividad celular. En las lesiones combinadas (rojo-blanco) se encontró un incremento en el número de AgNORs.
- El carcinoma epidermoide presentó mayor expresión a p53 y mayor número de AgNORs que el liquen plano y la mucosa normal. Así mismo se descubrió que existió una relación estadísticamente significativa entre la expresión de p53 y el grado de malignidad, es decir a mayor grado de malignidad mayor expresión de p53. Lo que nos indica que p53 si se expresa en las lesiones bucales por lo que debe considerarse como una proteína involucrada en la génesis del liquen plano tipo erosivo y combinado y en carcinoma epidermoide.
- No existió expresión a bcl-2 en liquen plano y carcinoma epidermoide, lo que es indicativo que esta proteína no esta involucrada en este tipo de lesiones.
- La cantidad de AgNORs puede ser un marcador pronóstico ya que se ha observado que el número de estos es más alto en tejidos malignos que en normales y que un incremento en el número de NORs esta asociado al aumento de la agresividad del tumor. El 33.3% de los casos de liquen plano presentaron puntos finos y dispersos, patrón similar al del carcinoma epidermoide, en donde el 93.8% de ellos los

presentaron. Por lo que es importante considerar la forma y tamaño de los puntos para determinar en forma indirecta la actividad celular.

- La técnica de AgNORs es fácil y económica por lo que podría utilizarse de forma rutinaria en el laboratorio de patología, aunada a los cambios displásicos observados en los casos de liquen plano, para predecir la conducta biológica de esta lesión, así como servir de marcador de proliferación celular en una lesión.
- Nuestros resultados al igual que los de la literatura son inconstantes y no concluyentes por lo que es necesario estudiar la inmunexpresión conjuntamente con la expresión génica de ambas proteínas p53 y bcl-2.

Recomendaciones

- Utilizar una población más amplia para relacionar el número de sujetos por sexo, tipo de liquen plano, grado de diferenciación del carcinoma, tabaquismo, alcoholismo así como ganglios linfáticos involucrados, con la finalidad de que las condiciones de estudio sean lo más homogéneo posible.
- Con la finalidad de relacionar la presencia de cambios displásicos, monitorear a largo plazo los pacientes diagnosticados con liquen plano, con la expresión de p53 y la cuantificación de AgNORs.

presentaron. Por lo que es importante considerar la forma y tamaño de los puntos para determinar en forma indirecta la actividad celular.

- La técnica de AgNORs es fácil y económica por lo que podría utilizarse de forma rutinaria en el laboratorio de patología, aunada a los cambios displásicos observados en los casos de liquen plano, para predecir la conducta biológica de esta lesión, así como servir de marcador de proliferación celular en una lesión.
- Nuestros resultados al igual que los de la literatura son inconstantes y no concluyentes por lo que es necesario estudiar la inmunoexpresión conjuntamente con la expresión génica de ambas proteínas p53 y bcl-2.

Recomendaciones

- Utilizar una población más amplia para relacionar el número de sujetos por sexo, tipo de liquen plano, grado de diferenciación del carcinoma, tabaquismo, alcoholismo así como ganglios linfáticos involucrados, con la finalidad de que las condiciones de estudio sean lo más homogéneo posible.
- Con la finalidad de relacionar la presencia de cambios displásicos, monitorear a largo plazo los pacientes diagnosticados con liquen plano, con la expresión de p53 y la cuantificación de AgNORs.

- Utilizar un analizador de imágenes, para ayudar a reducir la variabilidad inter e intraexaminador así como permitir la cuantificación y evaluación de los diferentes parámetros de los AgNORs

Propuestas de investigación en el futuro

- Realizar estudios con una muestra mayor, incluyendo tejidos de mucosa normal y de diferentes tipos de mucosa.
- Realizar seguimiento mínimo de 5 años en pacientes con liquen plano para monitorear una posible transformación maligna.
- Realizar estudios longitudinales comparativos para probar el valor pronóstico de p53, bcl-2 y AgNORs.
- Tener seguimiento de los pacientes tratados con carcinoma epidermoide para determinar si la expresión de p53, bcl-2 o el número de AgNORs se relaciona con el pronóstico y la supervivencia del paciente.
- Considerar incluir en los hábitos de tabaquismo y alcoholismo variables como frecuencia y tiempo del hábito.
- Estudiar la expresión génica de las 2 proteínas conjuntamente con el aspecto inmunohistoquímico.

- Utilizar un analizador de imágenes, para ayudar a reducir la variabilidad inter e intraexaminador así como permitir la cuantificación y evaluación de los diferentes parámetros de los AgNORs

Propuestas de investigación en el futuro

- Realizar estudios con una muestra mayor, incluyendo tejidos de mucosa normal y de diferentes tipos de mucosa.
- Realizar seguimiento mínimo de 5 años en pacientes con liquen plano para monitorear una posible transformación maligna.
- Realizar estudios longitudinales comparativos para probar el valor pronóstico de p53, bcl-2 y AgNORs.
- Tener seguimiento de los pacientes tratados con carcinoma epidermoide para determinar si la expresión de p53, bcl-2 o el número de AgNORs se relaciona con el pronóstico y la supervivencia del paciente.
- Considerar incluir en los hábitos de tabaquismo y alcoholismo variables como frecuencia y tiempo del hábito.
- Estudiar la expresión génica de las 2 proteínas conjuntamente con el aspecto inmunohistoquímico.

Referencias Bibliograficas

- 1.-Vincent SD. Diagnosis and mananging. Oral lichen planus. J Am Dent Assoc.1991;122:93-96
- 2.-Scully C, El-Kom M. Lichen planus:review and update on pathogenesis. J Oral Pathol. 1985: 14: 431-458.
- 3.-Boyd AD, Neldner KH. Lichen planus. J Am Acad Dermatol. 1991;25(4):593-619.
- 4.-Silverman S. Jr. Gorsky M, Lozada-Nur R. Giannotti K. A prospective study of findings and management in 214 patients with oral lichen planus. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1991; 72:665-670.
- 5.-Bermejo A, Bermejo MD, Roman P, Botella R, Bagan JV. Lichen planus with simultaneous involvement of the oral cavity and genitalia. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1990; 69, 209-216.
- 6.-Sapp Philip J, Eversole R, Lewis, Wysocri PG. Patologia Oral y Maxilofacial Contemporanea. Harcourt Brace. 1998. pp.170-180,250-254.
- 7.-Bricker SL. Oral lichen planus:a review. Semin Dermatol.1994;13:87-90.
- 8.-Samir AG, Bennett JA, Hartmann D, Bottomley WK. Lichen planus: possible mechamisms of pathogenesis. J Oral Medicine.1985;40:56-59.
- 9.-Lacy MF, Reade PC, Hayde KD. Lichen planus: a theory and pathogenesis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1983;56:521-526.
- 10.-Watanabe T, Ohishi M, Tanaka K, and Saato H. Analysis of HLA antigens in Japanese with oral lichen planus. J Oral Pathol. 1986;15:529-533.
- 11.-Porter SR. Kirby A, Olsen I, Barrett W. Immunologic aspects of dermal and oral lichen planus. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1997;83:358-366.
- 12.-Walton LJ, Thornhill MH, Forthing, VCAM-1 AND ICAM-1 are expressed by Langherhans cells macrophages and endotelial cells in oral lichen planus. J Oral Pathol Med. 1994; 23, 262-268.
- 13.-Herrera F, Montañas M. Expresión del ICAM-1 en el liquen ruber plano. Actas Dermosifilio.1990;81:299-303.
- 14.-Moreno JL, Bagan J. Psychologic factors and oral lichen planus. A psychometric evaluation of 100 cases. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1998;86:687-691.

- 15.-Jolly M, Nobile S. Vitamin status of patients with oral lichen planus. Aust Dent J. 1972;446-452.
- 16.-Potts AJC, Path MRC, Hamburger J, Scully C. The medication of patients with oral lichen planus and the association of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with erosive lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1987;64:541-543.
- 17.-Jim Lowe. Instructor. Sedano Heddie.
Lichen Planus. <http://www.dent.ucla.edu:81/pic/members/bmmp/index.html> June 24th 1996.
- 18.-Ficarra G, Flaitz MC, Gaglioti D, Piluso S, Milo D, et al. White lichenoid lesions of the buccal mucosa in patients with HIV infection. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1993;74:460-466.
- 19.-Vázquez DJ, et al. Liquen plano oral manifestado como gingivitis descamativa. Actas Dermosifiliogr. 1989;80:832-836.
- 20.-Thorn JJ, Holmstrup P, Rindum J, Pindborg JJ. Course of various clinical forms of oral lichen planus. A prospective follow-up study of 611 patients. J Oral Pathol. 1988;17(5):213-218.
- 21.-McCarthy FP, McCarthy PL, Shklar G. Chronic desquamative gingivitis. A reconsideration. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1960;13:1300-1313.
- 22.-Cawson RA. Oral Pathology and diagnosis, color atlas with integrated text. Gower Medical, London New York, 1992: pp.4.14, 11.17-11.18, 12.17, 13.6-13.14, 14.25, 15.14.
- 23.-Neumann-Jensen B, Holmstrup P, Pindborg JJ. Smoking habits of 611 patients with oral lichen planus. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1977;43:410-415.
- 24.-Wood NK, Goaz WP. Differential Diagnosis of oral lesions. 4 edic. Edit. Mosby Year Book. St. Louis Missouri. 1991. pp. 204-207, 607-608.
- 25.-Murray VA, Perez LM. Oral Lichen Planus: Parameters Affecting Accurate Diagnosis and Effective Management. Oral Pathol. 1997; Vol. 9, No. 6: 613-620.
- 26.-Holmstrup P, Schiotz AW, Westergaard J. Effect of dental plaque control on gingival lichen planus. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1990;69 (5):585-590.
- 27.-Jungell P. Oral lichen planus. A review. Int J Oral Maxillofac Surg. 1991; 20(3):129-135.
- 28.-Sklavounov A, Laskaris G. Frequency of Desquamative gingivitis in skin diseases. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1983; 56:141-143.

- 29.-Nisengard RJ, Alpert AM, Krestow V. Desquamative gingivitis: immunological findings. *J Periodontol.* 1978; 49: 27-32.
- 30.-Regezi JA, Deegan MJ, Hayward JR. Lichen planus: immunologic and morphologic identification of the submucosal infiltrate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1978;46:44-52.
- 31.-Glickman I & Smulow JB. Histopathology and histochemistry of chronic desquamative gingivitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1966: 21:325-329.
- 32.-Schiodt M, Holmstrup P, Dabelsteen E, Ullman S. Deposits of immunoglobulins, complement, and fibrinogen in oral lupus erythematosus, lichen planus and leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1981;51:603-608.
- 33.-Lovas JGL, Harsanyi BB, Geneidy AK. Oral lichenoid dysplasia: a clinicopathologic analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1989;68:57-63.
- 34.-Firth NA, Rich AM, Rodden BG, Reade PC. Assessment of the value of immunofluorescence microscopy in the diagnosis of oral mucosal lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 1990;1987:295-297.
- 35.-Margot L, Van Dis ET, Parks D. Prevalence of oral lichen planus in patients with diabetes mellitus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1995;79:696-700.
- 36.-Wyatt EH. Lichen planus and ulcerative colitis. *Br J Dermatol.* 1976;93:465-468.
- 37.-Mineo TC, Biancari F. Myasthenia gravis, psychiatric disturbances, idiopathic thrombocytopenic purpura and lichen planus associated with cervical thymoma. *The J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996;11:486-487.
- 38.-Bagán JV, Aguirre JM, del Olmo JA, Milián A, Peñarrocha M, et al. Oral lichen planus and chronic liver disease: A clinical and morphometric study of the oral lesions in relation to transaminase elevation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994;78:337-342.
- 39.-Mignogna MD, Lo Muzio L, Lo Russo L. Oral lichen planus: different clinical features in HCV-positive and HCV-negative patients. *Int J Dermatol.* 2000; 39 :134-139.
- 40.-Fulling HJ. Cancer development in oral lichen planus: a follow-up study of 327 patients. *Arch Dermatol.* 1973;108:667-669.
- 41.-Marder MZ, Deesen KC. Transformation of oral lichen planus to squamous cell carcinoma: a literature review and report of case. *J Am Dent Assoc.* 1982;105(1):55-60.

- 42.-Voute AB, de Jong WF, Schlten EA, Snow GB, van der Waal I. Possible premalignant character of oral lichen planus. The Amsterdam experience. *J Oral Pathol Med.* 1992;21(7):326-329.
- 43.-Murti PR, Daftary DK, Bhansle RB, Gupta PC, Mehta FS, Pindborg JJ. Malignant potential of oral lichen planus: observation in 722 patients from India. *J Oral Pathol.* 1986;15:71-77.
- 44.-Katz Rw, Brahim JS, Travis DW, Bethesda. Oral squamous cell carcinoma arising in a patient with long-stading lichen planus. A case Report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1990;70:282-285.
- 45.-Holmstrup P, Thorn JJ, Rindum J, Pindborg JJ. Malignant development of lichen planus-affected oral mucosa. *J Oral Pathol Med.* 1988;17:219-225.
- 46.-Brown RS, Bottomley WK, Abramovitch K, Langlais RP. Immediate biopsy versus a therapeutic trial in the diagnosis and treatment of vesiculobullous/vesiculoerosive oral lesions. Opposing view points presented. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1992;73:694-497.
- 47.-Silverman S. Jr. Gorsky M., Lozada-Nur R. A prospective follow-up study of 570 patients with oral lichen planus: Persistence, remission and malignant association. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985; 60;30-34.
- 48.-Banard NA, Scully C, Eveson JW, Cunningham S, Porter SR. Oral cancer development in patients with oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 1993;22(9):421-424.
- 49.-Markopoulos AK, Antoniadis D, et al. Potencial Maligno Do Liquen Plano Oral: Um Estudo de Follow-up Em 326 Doentes. *Oral Oncol.* 1997;33(4):263-269.
- 50.-Lo Muzio L, Mignogna MD, Favia G, Procaccini M, Testa NF, Bucci E. The possible association between oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma: a clinical evaluation on 14 cases and a review of the literature. *Oral Oncol.* 1998;34(4):239-246.
- 51.-Rajentheran R, McLean NR, Kelly CG, Reed MF, Nolan A. Malignant transformation of oral lichen planus. *Eur J Surg Oncol.* 1999;25(5):520-523.
- 52.-Hietanen J, Paasonen MR, Kuhlefelt M, Malmstrom M. A retrospective study of oral lichen planus patients with concurrent or subsequent development of malignancy. *Oral Oncol.* 1999;35(3):278-282.
- 53.-Krutchkoff DJ, Cutler L, Laskowski S. Oral lichen planus: the evidence regarding potential malignant transformation. *J Oral Pathol.* 1978;7:1-7.

- 54.-van der Meij EH, Schepman KP, Smeele LE, van der Wal JE, Bezemer PD, van der Waal I. A review of the recent literature regarding malignant transformation of oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*1999;88(3):307-310.
- 55.-Holmstrup P. The controversy of a premalignant potential of oral lichen planus is over. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.*1992;73(6):704-706.
- 56.-Krolls SO, Hoffman S. Squamous cell carcinoma of the oral soft tissues: a statistical analysis of 14,253 cases by age, sex and race of patients. *J Am Dent Assoc.*1976;92:571-574.
- 57.-Krutchkoff DJ, Chen J, Eisenberg E, Katz RV, Farmington C. Oral cancer: A survey of 566 cases from the University of Connecticut Oral Pathology Biopsy service, 1975-1986. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.*1990;70:192-198.
- 58.-Ord RA, Blanchaert RH. Oral Cancer:The Dentist's Role in Diagnosis, Management, Rehabilitation, and Prevention. Quintessence.Publishing. Inc.Chicago.2000.pp.7-9.
- 59.-Boring CC, Squires TS, Tong T, Montgomery S. Cancer statistics. 1994. *CA Cancer J Clin.* 1994;44:7-26.
- 60.-Daftry DK, Murti PR, Bhonsle RB, Gupta PC, Mehta FS, Pindborg JJ. Risk factors and risk markers for oral cancer in high incidence areas of the world In: Johnson NW, editor. *Oral Cancer. Vol.2 Cambridge University Press, Cambridge, 1991.p29-63.*
- 61.-Ko YC, Huang YL, Lee CH, Chen MJ, Lin LM, Tsai CC. Betel quid chewing, cigarette smoking and alcohol consumption related to oral cancer in Taiwan. *J Oral Pathol Med.* 1995;24:450-453.
- 62.-Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, Wilson DF. The epidemiology of mouth cancer: a review of global incidence. *Review Oral Oncology. Oral Diseases.* 2000;6:65-74.
- 63.-Wynder EL, Bross IJ, Feldman RM. A study of etiologic factors in cancer of the mouth. *Cancer.*1957;10:1300-1323.
- 64.-Blot WJ, Winn DM, Fraumeni JF Jr. Oral cancer and mouthwash. *J National Cancer Institute.*1983;70:251-253.
- 65.-De Stefani E, Deneo-Pellegrini H, Mendilaharsu M, Ronco A. Diet and risk of cancer of the upper aerodigestive tract-I.Foods. *Oral Oncol.*1999;35:17-21.
- 66.-Miller CS, White DK. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions and squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.*1996;82:57-68.

- 67.-Mork J, Lie KA, Glattre E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, Moller B, Pukkala E, Schiller JT, Youngman L, Lehtinen M, Dillner J. Human Papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.*2001;344:1125-1131.
- 68.-Ostwald C, Muller P, Barten M, Rutsatz K, Sonnenburg M, Milde-Langosch K, Loning T. Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas and normal mucosa. *J Oral Pathol Med.* 1994;23:220-225.
- 69.-Todd R, Donofrio B, Wong DTW. The molecular biology of oral carcinogenesis:towards a tumor progression model. *J Oral Maxillofac Surg.*1997;55:613-623.
- 70.-Mashberg A, Boffetta P,Winkelman R. Garfinkel L. Tobacco smoking, alcohol drinking, and cancer of the oral cavity and oropharynx among U.S. veterans. *Cancer.* 1993;72:1369-1375.
- 71.-Barasch A, Morse DE, Krutchkoff DJ, Eisenberg E. Smoking, Gender, and Age as Risk Factors for Site-Specific Intraoral Squamous Cell Carcinoma. A Case-Series Analysis.*Cancer.*1994;73:509-513.
- 72.-Llewelyn J, Mitchell R. Smoking, alcohol and oral cancer in South East Scotland: a 10 year experience. *Br J Oral Maxillofac Surgery.*1994;32:146-152.
- 73.-Jensen O, Esteve, Moller H et al. Cancer in the European Community and its Member States. *Eur J Cancer.* 1990;26:1167-1252.
- 74.-Auclair PL. Oral Squamous Cell Carcinoma. Department of Oral Pathology Armed Forces Institutes of Pathology. Washington DC.1996;pp:1-22
- 75.-Robbins KC. Patología estructural y funcional, vol. I y II. Ed. Interamericana Mc Graw Hill. Cuarta. ed. Madrid España,1990;pp298-302,864-865,1191.
- 76.-Suei Y, Tanimoto K, Taguchi A, Wada T. Mucosal Condition of the Oral Cavity and Sites of Origin of Squamous Cell Carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg.*1995;53:144-147.
- 77.-Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, Wilson DF. The epidemiology of tongue cancer: a review of global incidence. *Oral Diseases.* 2000;6:75-84.
- 78.-Jones S.A. Prognosis in Mouth Cancers Tumour Factors. *Oral Oncol, Eur J Cancer.*1994;30B (1):8-15
- 79.-Bundgaard T, Bentzen SM, Wildt J. The prognostic effect of tobacco and alcohol consumption in intra-oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol Eur J Cancer.*1994;30B(5):323-328.

- 80.-Shinohara M, Nakara S, Harad T, Shimada M, Oka M. Mode of tumor invasion in oral squamous cell carcinoma improved grading based on immunohistochemical examination of extracellular matrices. *Head & Neck* 1996;18:153-159.
- 81.-Jakobsson PA, Eneroth CM, Killander D, Moberger G, Martensson B. Histologic classification and grading of Malignancy in Carcinoma of the Larynx. *Therapy physics biology*.1973;12:1-8.
- 82.-Flores FG. *Patología Oncológica*. ed. Mc Graw-Hill Interamericana. México.1997.pp.1-7,28-31.
- 83.-Goodger NM, Gannon J, Hunt T, Morgan PR. Cell cycle regulatory proteins-an Overview with relevance to Oral Cancer. *Oral Oncol*.1997;33:61-73.
- 84.-El proyecto Biológico. The University of Arizona. 1998. Guía sobre el ciclo celular & mitosis. <http://www.biologia.arizona.edu/cell/tutor/mitosis/cells3.html>
- 85.-Zentella DA, López MR, Gómez GE, Paredes GR, Ibarra SM. El ciclo celular y su regulación:La interacción entre las proteínas cinasas CDKs y la familia de las ciclinas. *Bol Educ Bioq*.1996;(1):4-12.
- 86.-Bernal BAE. Consideraciones Biomoleculares en el proceso de Carcinogenesis. <http://www.encolombia.com/consideraciones1-odonto.htm>
- 87.-Scully C. Oncogenes, onco-suppressors, carcinogenesis and oral cancer. *Br Dent J*. 1992; 173:53-59.
- 88.-Scully C. Oncogenes, tumour suppressors and viruses in oral squamous carcinoma. *J Oral Pathol Med*.1993;22:337-347.
- 89.-Burkhardt A. Oncogenes and growth factor receptors as diagnostic and prognostic markers in precancers and cancers of the oral mucosa. *Current Topics in Pathology*.1996;90:224-239.
- 90.-Colvin RB, Bhan AK, McCluskey RT. *Diagnostic Immunopathology*. Raven Press.2ed.Ed. Singapores.1995.pp.669-681.
- 91.-Duke RC, Ojcius DM, Young JD. Suicidio celular en la salud y en la enfermedad. *Investigación y Ciencia*.1997(2):44-52.
- 92.-Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis:The Biochemistry and Molecular Biology of Programmed Cell Death. The Endocrine Society. *Endocrine Reviews*.1993;14(2):133-151.
- 93.-Teraki Y, Shiohara T. Apoptosis and the skin. *Eur J Dermatol*. 1999;9:413-420.

- 94.-Evan GI. Old cells never die, they just apoptose. Trends in cell biology.1994(4):191-192.
- 95.-Osborne BA, Schwartz LM. Essential genes that regulate apoptosis. Trend in cell biology.1994;11:394-398.
- 96.-Kerr JFR, Winterford CM, Harmon VP. Apoptosis its significance in cancer and cancer therapy. Cancer.1994;73:2013-2026.
- 97.-Jordan FCK, Catzavelos GC, Barrett AW, Speight PM. Differential expression of bcl-2 bax in squamous cell carcinomas of the oral cavity. Oral Oncol, Eur J Cancer.1996;32B:394-400.
- 98.-Sheu Lai-Fa, Chen Ann, Meng Ching Liang, Ho Kuo-chieh, Lin Fu-Gong and Lee Weii-Hwa. Analysis of bcl-2 Expression in normal, inflamed, dysplastic Nasopharyngeal Epthelia, and nasopharyngeaal Carcinoma: Association with p53 Expression. Human Pathol. 1997;28:556-562
- 99.-Hockenbery DM, Oltavai ZN, Yin X, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. Cell.1993;75:241-251.
- 100.-Kaiser U, Schilli M, Haag U, Neumann K, Kreipe H, Kogan E, Havemann K. Expresion of Bcl-2 protein in small cell lung cancer. Lung Cancer. 1996;15:31-40
- 101.-Verhaegh Me, Sanders CJ, Areds JW, Neumann HA. Expression of the apoptosis-suppressing protein Bcl-2 in non-melanoma skin cancer. Br J Dermatol 1995;132(5):740-744.
- 102.-Nuñez G, Clarke M. The Bcl-2 family of proteins: regulators of cell death and survival. Trends in cell Biology.1994; Nov.:339-403.
- 103.-Bloor BK, Malik FK, Odell EW, Morgan PR. Quantitative assessment of apoptosis in oral lichen planus. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1999;88:187-195.
- 104.-Sáenz Santamaría MC, Reed JAM McNutt NS, et al. Immunohistochemical expression of Bcl-2 in melanomas and intradermal nevi. J Cutan Pathol. 1994;21:393-397.
- 105.-Nakagawa K, Yamamura K, Maeda S, Ichihashi M. Bcl-2 expression in epidermal keratinocytic diseases. Cancer.1994;74:1720-1724.
- 106.-Langdon JD, Partridge M. Expression of the tumour suppressor gene p53 in oral cancer. Br J Oral Maxillofac Surgery.1992;30:214-220.

- 107.-Somers KD, Merrick MA, Lopez ME, Incognito LS, Schechter GL, Casey G. Frequent p53 mutations in head and neck cancer. *Cancer Research*.1992;52:5997-6000.
- 108.-Levine AJ, Momand J, Finlay C. The p53 tumour suppressor gene. Review Article. *Nature*. 1991;351:453-456.
- 109.-Gusterson BA, Anbazhagan R, Warren W, Midgely C, Lane DP, O'Hare, Stamps A, Carter R, Jayatilake H. Expression of p53 in premalignant and malignant squamous epithelium. *Oncogene*.1991;(6):1785-1789.
- 110.-Warnakulasuriya KAAS, Johnson NW:expression of p53 mutant nuclear phosphoprotein in oral oral carcinoma and potentially malignant oral lesions. *J Oral Pathol Med*.1992;21:404-408.
- 111.-Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene:clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Research*.1994.54:4855-4878.
- 112.-Schoelch ML, Regezi JA, Dekker NP, O.L.Ng I, McMillan A, Ziober BL, Thule Q, Silverman S, Fu KK. Cell cycle proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*.1999;35:333-342.
- 113.-Boyle JO, Hakim J, Koch W, van der Riet P, Hruban RH, Roa RA, et al: The incidence of p 53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res*.1993;53:447-456.
- 114.-Ralhan R, Nath N, Agarwal S, Marthur M, Waasylyk B, Shukla NK. Circulating p 53 antibodies as early markers of oral cancer: correlation with p53 alterations. *Clin Cancer Research*.1998;4:2147-2152.
- 115.-Wynford DT. P53 in tumour pathology: can we trust immunocytochemistry. *Journal of Pathology*.1992;166:329-330.
- 116.-Slootweg PJ, Koole R, Hordijk. The presence of p53 of protein in relation to ki-67 as cellular proliferation marker in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent dysplastic mucosa. *Oral Oncol, Eur J Cancer* 1994;30 B(2):138-141.
- 117.-Lavielle JP, Righini C, Reyt E, Brambilla, Riva C. Implications of p53 alterations and anti-p 53 antibody response in head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 1998;34:84-92.
- 118.-Girod SC, Kramer C, Knutermann R, Krueger GRF. P53 expression in the carcinogenesis in the oral mucosa. *Journal of Cellular Biochemistry*.1994;56:444-448.
- 119.-Ogden G, Kiddie RA, Lunny DP, Lane DP. Assessment of p53 protein expression in normal, bening and malignant oral mucosa. *Journal of Pathology*.1992;166:389-394.

- 120.-De Araújo VC, Loyola AM, Santos Pinto DD, Borra RC Jr, De Araújo NS. P53 biopsies of oral squamous cell carcinoma. A comparative study with a malignancy grading system. *Oral Oncol.* 1997;33 (1):5-9.
- 121.-Regezi JA, Zarbo RJ, Regev E, Pisanty S, Silverman S, Gazit D. P53 protein expression in sequential biopsies of oral dysplasias and *in situ* carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 1995;24:18-22.
- 122.-Dekker NP, Lozada-Nur F, Lagenaur LA, MacPhail LA, Bloom CY, Regezi JA. Apoptosis-associated markers in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 1997;26:170-175.
- 123.-Schoelch ML, Le QT, Silverman S, McMillan A, Dekker NP, Fu KK, Ziober BL, Regezi JA. Apoptosis-associated proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 1999;35:77-85.
- 124.-Kannan K, Latha LPN, Shanmugam G. Expression of bcl-2 oncoprotein in Indian oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 1998;34:373-377.
- 125.-Yao L, Iwai M, Furuta I. Correlations of bcl-2 and p53 expression with the clinicopathological features in tongue squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 1999;35:56-62.
- 126.-Atula S, Kurvinen K, Grenman R, Syrjanen S. SSCP Pattern indicative for p 53 mutation is related to advanced stage and high-grade of tongue cancer. *Oral Oncol, Eur J Cancer.* 1996;32B(4):222-229.
- 127.-Cabrini RL, Sschwint AE, Ménez A, Femopase F, Lanfranchi H, Itoiz ME. Morphometric study of nuclear organizer regions in human oral normal mucosa, papilloma and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 1992;21:275-279.
- 128.-Warnakulasuriya KAAS, Johnson NW. Nucleolar Organizer Region (NOR) distribution as a diagnostic marker in oral keratosis, dysplasia and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 1993;22:77-81
- 129.-Coleman HG, Altini M, Groeneveld HT. Nucleolar organizer regions (AgNORs) in odontogenic cysts and ameloblastomas. *J Oral Pathol Med.* 1996;25:436-440.
- 130.-Pustazi, CE. Cell proliferation in cancer. Edit. Oxford. University Press. Oxford. 1996. pp 3-6, 19-20, 62-67.
- 131.-Tema 26 el nucléolo
<http://www.retina.vmh.es/docencia/biocelular/temas/nucléolo.html>
- 132.-Donofrio L, Lo Muzio MD, Mignogna G, Troncone S, Staibano A, Boscaino G, De Rosa. Prognostic Evaluation of HPV-associated Precancerous and Microinvasive Carcinoma of the Oral Cavity. Combined Use of Nucleolar Organizer Regions

(AgNOR) and Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA). *Oral Oncol Eur J Cancer*.1995; 31, No.3:174-180.

133.-Derezini M, Sirri V, Tere D: Nucleolar Organizer Regions in tumor cell. *The Cancer J*. 1997;2;341-352.

134.-Schiwint AE, Gomez, ME, Itoiz and RL Cabrini. Nucleolar Organizer Regions as Markers of Incipient Cellular alterations in Squamous Epithelium. *Journal Dent Res*. 1993;72 (8):1233-1236.

135.-Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himer G. Improvement in the staining and in the visualisation of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J*. 1986;18:5-14.

136.-De Rosa G, Staibano S, Barra E, Zeppa P. Nucleolar Organizer in Aggressive and Non aggressive Basal Cell Carcinoma of the skin. *Cancer*.1992;69:123-126.

137.-Arumi M, Alameda F, Galitc E, Serrano S. *E J Pathol*.1996;2(4):964-05.txt
<http://psk.amu.edu.pl/czasopis/ejp 2-4/ejp 24-05.htm>

138.-Schwint AE, Savino TM, Lanfranchi HE, Marschoff E, Cabrini RL, Itoiz ME. Nucleolar Organizer Region in Lining Epithelium Adjacent to Squamous cell carcinoma of human Oral Mucosa. *Cancer*. 1994;73:2674-2679.

139.-Xin Xie MD, Ole Petter Fraas C, Jon Sudbo MD and Morten Boysen MD. Diagnostic and Prognostic Value of Nucleolar Organizer Regions in normal Epithelium, Dysplasia and Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. *Cancer*. 1997;79:2200-2208.

140.-Sano K, Takahashi H, Fujita S, Inokuci T, Pe MN, Okabe H, Tsuda N. Prognostic Implication of Silver Binding Nucleolar Organizer Regions (AgNORs) in Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 1991; 20:53-56

141.-Piffko J, Bank falvi A, Ofner D, Rasch D, Joos U, Schmind K. Standardized Demonstration of Silver-Stained Nucleolar Organizer Regions-Associated Proteins in Archival Oral Squamous Cell Carcinomas and Adjacent Non-Neoplastic Mucosa. *Mod Pathol*.1997;10(2):98-104.

142.-Migaldi M, Criscuolo M, Zunarelli E, Lo Bianco L, Martinelli A, Barbolini G. P 120 and AgNOR nucleolar protein expresión. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Endod Radiol*.1998.85:189-196.

143.-Carbonelli DL, Duran HA, Schwint A, Molinari de Rey B. Nucleolar organizaer regions as a marker of incipient transformation in a model of experimental carcinogenesis. *Virchows Archiv*.1994;425:165-170.

Anexo 1

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ODONTOLOGIA**

**DETERMINACION DE p53, bcl-2 y AgNOR, COMO MARCADORES EN
LIQUEN PLANO Y CARCINOMA EPIDERMIOIDE DE CAVIDAD BUCAL**

CARTA DE CONSENTIMIENTO

México D.F., a de

Como una contribución desinteresada de mi parte autorizó y doy amplios poderes a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM, para que se me tome una muestra de tejido de la mucosa bucal para confirmar el diagnóstico clínico y determinar la presencia de p53, bcl-2 y AgNOR, en apoyo a las actividades de investigación para demostrar la efectividad de un nuevo método para detectar dichas proteínas en el tejido de la cavidad bucal.

Estoy de acuerdo con que a las muestras de tejido se les realicen las pruebas necesarias y solo pediré se me de a conocer el diagnóstico histopatológico de mi lesión bucal.

Nombre del paciente

Firma

Anexo 2

Instructivo de aplicación

1.-La historia clínica tuvo como objeto recolectar información de hechos y observaciones a través del interrogatorio. Se le dio una información general sobre el objetivo de la historia clínica y se le pedía la mayor colaboración posible al paciente.

2.-Se leyó en voz alta cada una de las preguntas, haciendo alguna aclaración pertinente en caso de que fuera solicitada, procurando obtener una respuesta inmediata, la cual se anoto oportunamente.

3.-El tiempo que se utilizó en cada historia clínica fue de 10 minutos.

4.-Una vez concluida la historia clínica se procedió a realizar la exploración general y bucal.

Anexo 3

No. de registro _____

No. de biopsia _____

HISTORIA CLINICA GENERAL

FECHA: _____

DIA MES AÑO

NOMBRE: _____ EDAD: _____
APELLIDO PATERNO APELLIDO MATERNO NOMBRE (S)

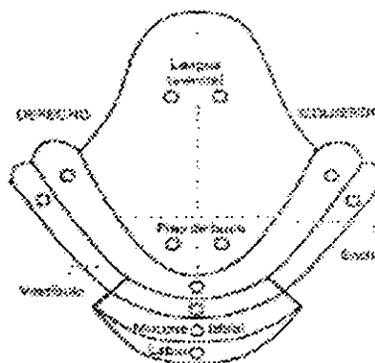
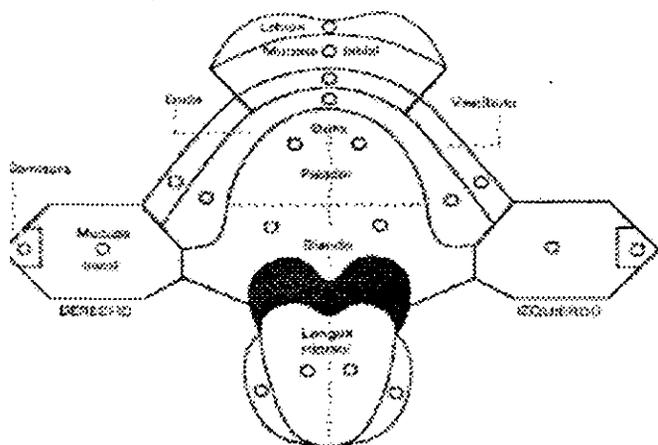
SEXO: F () M ()

ESTADO CIVIL: _____

DIRECCION: _____

	CALLE	NUMERO	COLONIA	DELEGACION	C.P.
ACTUALMENTE SE ENCUENTRA EMBARAZADA				1 2	
MENOPAUSIA				1 2	
ANTECEDENTES PATOLOGICOS					
DIABETES MELLITUS				1 2	
ENFERMEDADES INMUNOSUPRESIVAS					
VIH +				1 2	
HABITOS PERNICIOSOS					
TABAQUISMO				1 2 3	
A QUE EDAD EMPEZO A FUMAR	_____				
CUANTOS AÑOS A FUMADO	_____				
CUANTOS CIGARROS FUMA AL DIA	_____				
HACE CUANTOS AÑOS NO FUMA	_____				
TABAQUISMO INVERTIDO	_____				
MASTICA TABACO				1 2	
ALCOHOLISMO				1 2 3	
A QUE EDAD EMPEZO A TOMAR	_____				
CUANTOS AÑOS HA TOMADO	_____				
CUANTAS COPAS TOMA AL DIA	_____				
CUANTAS COPAS TOMA A LA SEMANA	_____				
HACE CUANTOS AÑOS NO TOMA	_____				
QUE ACOSTUMBRA TOMAR	_____				
FARMACODEPENDIENTE				1 2 3	
MARIGUANA			1		
COCAINA			2		
OTROS			3		

EXAMEN BUCAL



Diagnóstico clínico:

- 1) Liquen plano 2) Carcinoma epidermoide

Liquen plano

Tipo de liquen plano:	1) Atrófico	2) Reticular	3) Placas	4) Erosivo	5) Buloso	6) Mixto
Localización de las lesiones:	1) Encía	2) Muc. Revest	3) Ambas	4) Muc. Especial	5) 3 mucosas	6) Muc. Revest/especializada
Extensión de las lesiones:		1) Piel		2) Genitales	3) Perianales	
Morfología de la superficie:		1) Vesícula/bula	2) Placa roja	3) Placa blanca	4) Erosión	5) Úlcera 6) Otras
Distribución:	1) Única		2) Multifocal	3) Generalizada		
Tamaño aproximado _____						
Color:	1) Normal	2) Blanco	3) Rojo	4) Azul	5) Hiper Cromico	6) Otro
Consistencia:	1) Firme		2) Llena de liquido	3) Otros		
Dolor:				1) Si 2) No		
Evolución:	1) < 3 meses	2) 6 meses	3) 1 año	4) +1-3 años	5) +3 años	
Tratamiento:			1) Si 2) No			
Que tipo:	1) esteroides tópicos	2) esteroides sistemicos	3) sintomático	4) empirico		
1) < 3 meses	2) 6 meses	3) 1 año	4) 1 - 3 años	5) +3 años		

Carcinoma epidermoide

Localización de las lesiones:	1) Encía	2) Muc. Revest	3) Ambas	4) Muc. Especial	5) 3 mucosas	6) Muc. Revest/especializada
Morfología de la superficie:	1) Exofítica	2) Endofítica	3) Placa roja	4) Placa blanca	5) Úlcera	6) Indurada 7) Otras
Distribución:	1) Única		2) Multifocal	3) Generalizada		
Tamaño aproximado _____						
Color:	1) Normal	2) Blanco	3) Rojo	4) Azul	5) Hiper Cromica	6) Otro
Consistencia:	1) Blanda	2) Firme	3) Otros			
Dolor:			1) Si 2) No			
Evolución:	1) < 3 meses	2) 6 meses	3) 1 año	4) +1-3 años	5) +3 años	
Cadenas ganglionares:	1) Si	2) No				
Biopsia:	1) Si	2) No				

Fecha _____

Anexo 4
Clave para la base de datos

VARIABLE	NOMBRE DE LA VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICION	DEFINICION DE CATEGORIAS	RANGO VALIDO	VALOR DE RELLENO	ANCHO	DECIMALES
Regis	Número de identificación	No aplica	No aplica	No aplica	1 - 100	999	3	0
Edad	Edad en años cumplidos	Indep.	Continua	No aplica	4 - 99	999	3	0
Sexo	Características sexuales secundarias	Indep.	Nominal	1 Femenino 2 Masculino	1 - 2	9	1	0
Edo. civi	Estado civil	Indep.	Nominal	0 Soltero 1 Casado 2 Divorciado 3 Unión Libre 4 Viudo	0 - 4	9	1	0
Tabaq	Hábito del tabaquismo	Indep.	Nominal	1 si 2 no	1 - 2	9	1	0
Alco	Hábito del alcoholismo	Indep.	Nominal	1 si 2 no	1 - 2	9	1	0
Farmac	Farmaco-dependiente	Indep.	Nominal	1 Si 2 No	1 - 2	9	1	0
Diag	Diagnóstico clínico	Dep.	Nominal	1 Liquen plano 2 Carc. Epider.	1 - 2	9	1	0
Liquen	Tipo de liquen plano		Nominal	1 atrófico 2 reticular 3 placas 4 erosivo 5 buloso 6 combinado	1 - 6	9	1	0
Liqlo	Localización de las lesiones		Nominal	1 Encía 2 Muc. revest 3 Ambas 4 Muc. Espec. 5 3 mucosas 6 Muc reves-lengua	1 - 4	9	1	0
Liqext	Extensión de las lesiones		Nominal	1 Piel 2 Genitales 3 Perianales	1 - 3	9	1	0

Liqmor	Morfología de la superficie		Nominal	1 Vesícula/bula 2 Placa roja 3 Placa blanca 4 Erosión 5 Úlcera 6 Otras 7 Combinado	1 - 7	9	1	0
Liqdis	Distribución de las lesiones		Nominal	1 Única 2 Multifocal 3 Generalizada	1 - 3	9	1	0
Liqcol	Color de la lesión		Nominal	1 Normal 2 Blanco 3 Rojo 4 Azul 5 Hiperocrómico 6 Otro 7 Combinado	1 - 7	9	1	0
Liqcon	Consistencia de la lesión		Nominal	1 Firme 2 Llena líquido 3 Otro	1 - 3	9	1	0
Liqdol	Dolor en la lesión		Nominal	1 Sí 2 No	1 - 2	9	1	0
Liquevo	Evolución		Ordinal	1 < 3 meses 2 6 meses 3 1 año 4 1 - 3 años 5 + 3 años	1 - 5	9	1	0
Liqtra	Tratamiento		Nominal	1 Sí 2 No	1 - 2	9	1	0
Liqtipo	Tipo de Tratamiento		Nominal	1 ester. tópicos 2 ester. sist. 3 sintomático 4 empírico	1 - 4	9	1	0
Liqtitra	Tiempo de tratamiento		Ordinal	1 < 3 meses 2 6 meses 3 1 año 4 1 - 3 años 5 + 3 años	1 - 5	9	1	0
Carlo	Localización de las lesiones		Nominal	1 Encía 2 Muc. revest 3 Ambas 4 Muc. Espec. 5 3 mucosas 6 Muc reves- lengua	1 - 3	9	1	0
Carmor	Morfología de la superficie		Nominal	1 Exofítica 2 Endofítica 3 Placa roja 4 Placa blanca 5 Úlcera 6 Indurada 7 Otra 8 Combinado	1 - 8	9	1	0

Cardis	Distribución de las lesiones		Nominal	1 Unica 2 Multifocal 3 Generalizada	1 - 3	9	1	0
Carcol	Color de la lesión		Nominal	1 Normal 2 Blanco 3 Rojo 4 Azul 5 Hiperocrómico 6 Otro 7 Combinado	1 - 7	9	1	0
Carcon	Consistencia de la lesión		Nominal	1 Blanda 2 Firme 3 Otro	1 - 3	9	1	0
Cardol	Dolor en la lesión		Nominal	1 Sí 2 No	1 - 2	9	1	0
Carevo	Evolución		Ordinal	1 < 3 meses 2 6 meses 3 1 año 4 1 - 3 años 5 + 3 años	1 - 5	9	1	0
Cartra	Tratamiento		Nominal	1 Sí 2 No	1 - 2	9	1	0
Gangl	Cadenas ganglionares palpables		Nominal	1 Sí 2 No	1 - 2	9	1	0
Biop	Toma de biopsia		Nominal	1 Sí 2 No	1 - 2	9	1	0
Tipobio	Tipo de biopsia		Nominal	1 Incisional 2 Excisional 3 Punch	1 - 3	9	1	0

VARIABLE	NOMBRE DE LA VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICION	DEFINICION DE CATEGORIAS	RANGO VALIDO	VALOR DE RELLENO	ANCHO	DECIMALES
Diaghist	Diagnóstico histológico		nominal	1 liquen plano 2 carc epider	1 - 2	9	1	0
Histiq	Liquen Plano		ordinal	1 leve 2 moderada 3 severa	1 - 3	9	1	0
Histiqliq	Tipo de liquen histológico		nominal	1 atrófico 2 reticular 3 placas 4 erosivo 5 buloso 6 combinado	1 - 6	9	1	0
Histocar	Carcinoma epidermoide		ordinal	1 bajo grado 2 moder grado 3 alto grado	1 - 3	9	1	0
AgNor	Tinción con Plata		ordinal	1 leve 2 moderada 3 severa	1 - 3	9	1	0
p 53	p 53		semicuant	0 no teñido 1 teñido levent 2 teñido moder 3 teñido sever	0 - 3	9	1	0
bcl-2	bcl-2		semicuant	0 no teñido 1 teñido levent 2 teñido moder 3 teñido sever	0 - 3	9	1	0

Anexo 5

Diagnóstico Histopatológico

Liquen plano caso _____

Tipo

1 atrófico 2 reticular 3 placas 4 erosivo 5 buloso 6 mixto

Carcinoma epidermoide caso _____

1 bajo grado 2 intermedio grado 3 alto grado

CRITERIOS DE JAKOBSSON

6-13 bajo 14-16 intermedio 17-24 alto

Caso no.	Biopsia no.
Queratinización	
Polimorfismo nuclear	
Número de mitosis	
Patrón de invasión	
Estado de invasión tumoral	
Infiltrado linfoplasmocitario	
	Puntaje: Grado:

Anexo 6

Reactivos para inmunohistoquímica

PBS

Phosphate Buffered Saline
25x Concentrated
Store at room temperature
General purpose Reagent
Suitable for diagnostic histopathology
Laboratory and research use
Bio Genex
San Famon CA 94583 USA
HK 091-5K 120 ml
Concentrated phosphate buffer with sodium chloride

H₂O₂

Al 3%
50 ml
Cell Marque Corporation
Austin TX 800.665.7282
Store 2-8° C

Diluent

Common Antibody Diluent
Bio Genex laboratories
San Ramon CA 94583 USA
Lot HK 1560696
100ml carier protein and Tween 20 in
PBS with preservative HK 156-5k
Store 2-8° C

Suero N de Caballo

Vectastain
Diluted Normal
Serum
Vector Laboratories

Super Sensitive

Super Sensitive Multi Link

Biotine

Ready-to-use Detection Kit
Catalog. No. QP 900-9L

Anti Immunoglobulins for Mouse, Rabbit, Guinea Pig
and Rat Antibodies

Store 2-8° C

50 ml biotinylated anti-IG in PBS
with carrier protein and preservative

HK 340-9K Rev C 901

Gener Purpose Reagent for diagnostic

Histopatology lab & research use

Lot HK 3400200B 02/02

Super Sensitive Label

Peroxidase Conjugated

Streptavidin

Store at 2-9° C

50 ml peroxidase conjugated

Streptavidin in PBS with

Carrier protein and preservative

HK 330-9K Rev B508

For research use only

Lot HK 3301099x Exp 10/01

Excellence

Bio Genex

Since 1981

4600 Norris Canyon Road

San Ramon CA 94583

Tel (510) 275-0550

Cromógeno

Vector

Peroxidase

Sustrate kit

DAB

Catalogo Number SK 4100

Refrigerate

Anticuerpos

p53 Protein

Clone/Klon DO-7

Code No. M 7001

Dako A/S Denmark

Lot/ch-B 056 (301)

Dist. By

Dako Corporation

6392 Via Real

Carpinteria CA 93013
For research use only 2-8 °C

bcl-2 oncoprotein

Clone/Klon 124

Mouse/Maus/Souris

Anti-Human/Humain

Lot. Ch-B097 (101)

Code No. M0887

Dako A/S Denmark

Dist. By

Dako Corporation

6392 Vía Real

Carpinteria CA 93013

For research use only 2-8 °C

Anexo 7

Formato de p53 y bcl-2

Inmunoexpresión de p53 en liquen plano

Caso _____ Núm. de biopsia _____	Número de células por campo Examinador 1 (Rebeca)			Número de células por campo Examinador 2 (Dra. Leyva)		
Núm. de campo	Células positivas	Células negativas	Total de células	Células positivas	Células negativas	Total de células
1						
2						
3						
4						
5						
Total						
Promedio						

Anexo 8

Reactivos para la técnica de AgNORs

Nitrato de Plata		
Nitrato de Plata Cristal AgNO_3		PM 169.87
Ensayo (AgNO_3)	99.8%	
Claridad de la solución	Pasa prueba	
Sust. No precipitadas		
Por HCL	0.005%	
Sulfato (SO_4)	<0.001%	
Plomo (Pb)	<0.0005%	
Cloruro (Cl)	<5 ppm	
Cobre (Cu)	<1 ppm	
Hierro (Fe)	1 ppm	

Cont. Neto 100g.

Hecho en México por J.T Baker Una div de Mallinckrodt Baker S.S de C.V.

Gelatina Bacteriológica	
Pérdida en el secado	11% o menos
Residuo de Ignición no más de	0.3%
Viscosidad	20-100 mps a 20°C
Fuerza de Gel	100-300 g/cm ²
Ph (solución al 2%)	6.8-7.0

Cont. Neto 450g.

Hecho en México por Bioxon de México

Acido Fórmico	
Reactivo Analítico A.C.S.	No. CAS 64-18-6
Ensayo	HCOOK \geq 88.0%
Color (APHA)	Max 15
Residuos después de evaporac.	Max 0.002%
Acido acético CH_3COOH	Max 0.4%
Amonio (NH_4)	Max 0.005%
Cloruros (Cl)	Max 0.0001%
Sulfatos SO_4	Max 0.002%
Metales pesados como Pb	Max 5 ppm
Fierro Fe	Max 5 ppm

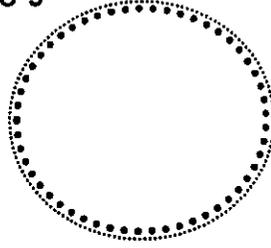
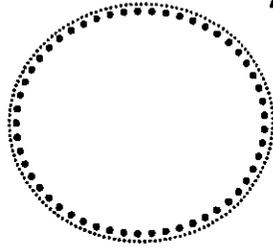
Organos que afecta septo nasal, ojos y piel.

Hecho en México por Analytyka de México SA. De C.V.

Anexo 9

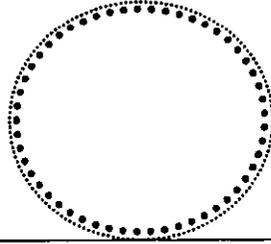
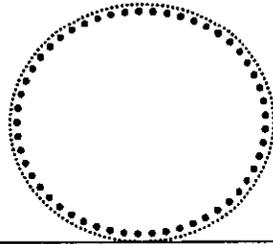
Formato de AgNORs

Liquen plano
 Caso: _____
 Biopsia: _____

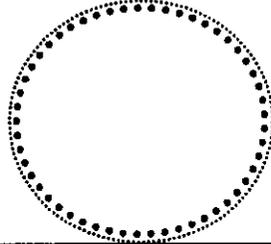
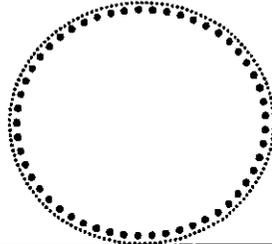


AgNORs
 Total de células _____
 Promedio _____
 Núm. de nucléolos _____

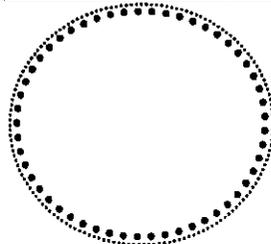
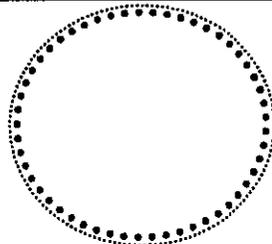
Núm. cél.
 Promedio



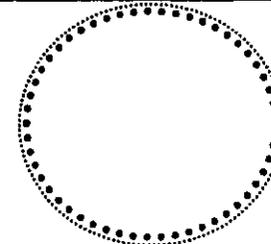
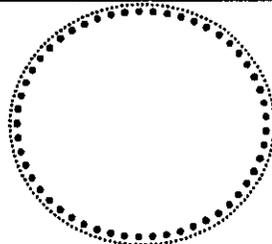
Núm. cél.
 Promedio



Núm. cél.
 Promedio



Núm. cél.
 Promedio



Núm. cél.
 Promedio

CURRICULUM VITAE

DATOS GENERALES:

Nombre: Norma Rebeca Rojo Botello.
Fecha de nacimiento: 2 de julio de 1969
Lugar de nacimiento: México D.F.,
Estado civil: Soltera
Domicilio particular: Norte 15 A # 5233
Col. Nueva Vallejo
Deleg. Gustavo A. Madero
C.P. 07750
México D.F.
Teléfono: 55677281

ESTUDIOS PROFESIONALES:

Licenciatura: Cirujano Dentista
Escuela Nacional de Estudios
Profesionales Iztacala
UNAM
1988-1991

Especialidad: Periodoncia
División de Estudios de Posgrado e Investigación
Facultad de Odontología
UNAM
1994-1995

Maestría: En Odontología
División de Estudios de Posgrado e Investigación
Facultad de Odontología
UNAM
1996-1997

Doctorado: En Odontología
División de Estudios de Posgrado e Investigación
Facultad de Odontología
UNAM
1998-2001

Diplomado en Docencia: Facultad de Odontología
UNAM
1997-1998

DISTINCIONES:

1997-1991 Diploma de Aprovechamiento
Escuela Nacional de Estudios
Profesionales Iztacala
UNAM
Licenciatura Cirujano Dentista

1998 Mención Honorífica
División de Estudios de Posgrado e Investigación
Facultad de Odontología
UNAM
Examen para obtener el Grado de Maestría en
Odontología

MEDALLAS:

1992 Medalla Gabino Barreda
Escuela Nacional de Estudios
Profesionales Iztacala
UNAM

1992 Medalla Diario de México
"A los Mejores Estudiantes de México"
Diario de México
México D.F,

1998-1991 Medalla Gabino Barreda
División de Estudios de Posgrado e Investigación
Facultad de Odontología
UNAM
Especialidad de Periodoncia