



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

P53 EN DISPLASIA EPITELIAL ORAL. ANÁLISIS
HISTOLÓGICO Y MOLECULAR.

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

ELIZABETH BARBARITA NARVÁEZ GARCÍA

TUTOR: Dr. LUIS FERNANDO JACINTO ALEMÁN

ASESOR: Mtro. EMILIANO JURADO CASTAÑEDA



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.

MIRA QUE TE MANDO QUE TE ESFUERCES Y SEAS VALIENTE; NO TEMAS NI DESMAYES, PORQUE JEHOVÁ TU DIOS ESTARÁ CONTIGO DONDE QUIERAS QUE VAYAS. JOSÚE 1:9

Esta tesina es un trabajo cual inspiración es mi Dios, quien con su protección constante y sabiduría me han ayudado a terminar esta misma.

A mis padres, Elizabeth y Bonifacio, cuyo amor, cuidado, y apoyo es el resultado de haber terminado mis estudios en la facultad de Odontología, gracias mami, gracias papi, sin ustedes no hubiese podido con esta meta que me propuse llegar.

A mi hermano Yazer, con sus consejos de aliento en los momentos difíciles, siempre me dieron un impulso a seguir luchando por mi sueño.

A mi tía Esther, cual preocupación y oraciones siempre estuvieron al pendiente de mi seguridad. A mi tío Reuel por sus oraciones.

A mi tía Aurelia Guerrero.

A la iglesia Adonái, por sus oraciones constantes y por creer en mí.

A mis profesores, gracias por sus enseñanzas y amor a la odontología, por motivarme a ser mejor humana, para trabajar con ética y profesionalismo.

A mis pacientes de la facultad de Odontología y clínica periférica, su paciencia, cooperación y la esperanza en mí, me ayudaron a terminar mis materias.

A mis amigos trabajadores de la facultad, por su apoyo en el área de biblioteca, cañones, trámites escolares, enfermeras y de limpieza.

A mis amigas Diana Laura, Jennifer, Diana Karen y Carmen su apoyo siempre estuvo presente.

A mi mejor amigo, Carlos Iván, por tu amistad y tu apoyo como un colega.

A mi novio Eduardo, gracias porque aun en la distancia tus llamadas me daban ánimo.

A mi tutor, el Dr. Jacinto Alemán, por toda la paciencia, por el conocimiento compartido y, sobre todo, por haberme transmitido el amor que le tiene a lo que hace, sin usted no hubiera sido lo mismo. Gracias.

Y, por último, pero no menos importante, a mi universidad, quien me abrió las puertas del conocimiento, del aprendizaje y me acogió como mi segundo hogar. Gracias por enseñarme a aprender, a hacer y a ser.

POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU

“En la vida todo viene y va, ya se sabe. Uno siempre sale adelante, aunque le cueste su tiempo.”
Mathias Malzieu

ÍNDICE

I.INTRODUCCIÓN	5
II. MARCO TEÓRICO	6
2.1 Trastornos potencialmente malignos en cavidad bucal	6
2.1.2 Leucoplasia	7
2.1.3 Eritroplasia	10
2.1.4 Displasias epiteliales orales	13
2.2 PROTOONCOGENES, ONCOGENES Y GENES SUPRESORES DE TUMORES	16
2.2.1 Gen p53	18
2.2.2 Antecedentes	18
2.2.3. Familia del p53	19
2.2.4 Expresión del p53 en displasias epiteliales orales	19
3. APOPTOSIS CELULAR	20
3.1. Apoptosis vía intrínseca	21
3.1.2 Bcl-2	22
3.1.3. Bax	23
III. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	24
IV. JUSTIFICACIÓN	25
V.OBJETIVOS	26
VI. METODOLOGÍA	27
VII RESULTADOS	30
VIII.DISCUSIÓN	33
IX.CONCLUSIONES	35
X.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

I.INTRODUCCIÓN

El término trastornos potencialmente malignos o lesiones potencialmente malignas, conlleva a un riesgo mayor en la progresión del cáncer.

El cáncer oral se ha convertido en un problema de salud bucal, se ha convertido en el 6to lugar de todos los carcinomas en el cuerpo humano.

La leucoplasia y la eritroplasia se han convertido en las lesiones hacia la transformación maligna, ya que estas lesiones tienen histológicamente características desde displasias de bajo grado hasta un carcinoma in situ.

Su importancia es que su comportamiento es incierto, un 40% puede permanecer sin cambios 20% involucionar y otro 20% evolucionar a maligno, pero no es una directriz, y no se puede dar una proyección porque no se conoce la historia natural de la enfermedad, y no quiere decir que una displasia de bajo grado tiene que evolucionar a un carcinoma.

Las herramientas para poder diagnosticar, son las biopsias y su estudio histopatológico.

El estudio de estas displasias implica un proceso de alteraciones genéticas y participación de las diversas vías de señalización celular las cuales son de ayuda para ver los grados de severidad de estas lesiones.

El resultado de una acumulación de alteraciones genéticas, puede terminar en un estado de carcinogénesis. Recordando que las mutaciones de los genes supresores de tumores pueden producir cáncer, como el p53 en su forma mutada. El gen P53 se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13.1), contiene 11 exones ubicados en un dominio cromosómico de 20 Kb, Es el gen más comúnmente mutado en el cáncer humano. Desde su descubrimiento en 1979, este gen y su proteína se han convertido en el centro de intensos estudios; un hallazgo importante es que más de 50% de las neoplasias humanas presentan mutación.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Trastornos potencialmente malignos en cavidad oral

Es sabido que el cáncer oral puede desarrollarse en lesiones pre-existente de la mucosa en la cavidad oral. En la literatura, estas lesiones se han denominado por términos tales como “pre- cáncer”, “lesiones precancerosas/ premalignas” y “neoplasia intraepitelial”. Un término más preciso, “trastornos orales potencialmente malignos” el término en precisión define un grupo de lesiones que conlleva un mayor riesgo de la progresión del cáncer y pone de relieve la complejidad y frustración para los clínicos, patólogos y sus pacientes sobre la evaluación de riesgo a cáncer. ¹

El acuerdo subyacente es que estas lesiones tienen el potencial de convertirse en malignos, por lo que, en su estado actual, es decir, antes de la transformación maligna, todavía son pre malignas (potencialmente).¹

Los trastornos potencialmente malignos como la leucoplasia, eritroplasia, liquen plano y fibrosis submucosa, encontrados durante un examen de mucosa oral de rutina representan hallazgos clínicos significativos, más aún cuando se observa displasia desde el punto de vista histológico. De los trastornos mencionados, los mayormente asociados con la transformación a carcinoma oral de células escamosas son la leucoplasia y eritroplasia. ¹

2.1.2 Leucoplasia

Una leucoplasia es una lesión que se diagnostica por exclusión, es decir, toda placa blanca cuyo diagnóstico no puede ser asociado con algún factor etiológico. El término leucoplasia fue utilizado clínicamente para denotar cualquier lesión blanca en la mucosa oral. Durante varias décadas, los médicos se dieron cuenta de que todas las manchas blancas que surgen en la cavidad oral no deben ser etiquetadas como leucoplasia oral.¹

Aspectos clínicos

La leucoplasia por lo general puede ser asintomática o mostrar un aspecto clínico benigno por lo que es difícil diferenciarla de trastornos comunes reactivos, su tasa de aparición es de 1.5 a 12%, en función de la población concreta estudiada.¹⁵

Las leucoplasias generalmente se diagnostican después de la cuarta década de la vida. Son más comunes en los hombres y son 6 veces más común entre los fumadores que entre los no fumadores. El consumo de alcohol es un factor de riesgo independiente. La leucoplasia no está asociada a ningún agente químico o físico, excepto el tabaco o alcohol. En una minoría de las leucoplasias, los virus del papiloma humano pueden tener un papel potencial en su etiología (Figura 1).¹



Figura 1 Leucoplasia en zona ventral de lengua

Aspectos histológicos

Dado que el término <<leucoplasia>> no indica la naturaleza de los cambios tisulares, es preciso realizar una valoración microscópica del espectro de alteraciones que pueden encontrarse en el epitelio mucoso.

Los cambios de tejido conjuntivo subyacente también dan un aspecto blanquecino a la mucosa oral, este se debe por lo general a una reducción de la vascularización. Un hallazgo significativo en el pronóstico de los pacientes es la displasia, la cual puede estar o no presente. ¹

Evaluación y diagnóstico

En general, la mayoría de las leucoplasias son asintomáticas y se detectan durante un examen visual de rutina por un médico. Los síntomas, si está presente, se asocian con la variedad moteada no homogénea e incluyen malestar, hormigueo y sensibilidad al tacto, bebidas calientes o picantes. Para un diagnóstico más seguro es obtener una o más biopsias de la lesión y solicitar una evaluación histopatológica a un patólogo especialista. ¹⁵

Pronósticos y tipos

El pronóstico del diagnóstico es reservado. La derivación de un especialista, y la intervención adecuada puede reducir la tasa de progresión de estas enfermedades a cáncer.

Dos tipos principales de la leucoplasia son la leucoplasia homogénea y la no homogénea. La distinción se basa en las características de color de la superficie y morfológicas (espesor y textura). Leucoplasias homogéneas son uniformemente delgadas, y suelen tener una superficie lisa y pueden presentar grietas poco profundas y variedades no homogéneas que comprenden 3 tipos clínicos y con generalmente asintomáticos. ¹

- A) Moteado-mezclado, blanco y de color rojo (también denominado eritroleucoplasia) pero conservando coloración predominante blanca.
- B) Excrecencias polipoides nodulares- pequeño, redondeado, excrecencias rojas o blancas.
- C) Verrugoso o apariencia de la superficie –exofítico arrugado u ondulado.¹

2.1.3 Eritroplasia

El termino eritroplasia se utiliza de manera análoga a leucoplasia y ha sido definida como “una mancha roja que no puede ser caracterizada clínica o patológicamente como cualquier otra enfermedad”. La eritroplasia es una lesión generalmente irregular, aunque puede ser bien definida y tener una superficie aterciopelada de color rojo brillante. De vez en cuando, la superficie es granular. El sitio más comúnmente involucrado es el paladar blando. ¹

Aspectos clínicos

La eritroplasia de la boca suele ser una lesión asintomática que aparece principalmente en hombres mayores que fuman cigarros.

Puede encontrarse en el suelo de la boca, superficies lateral y ventral de la lengua, paladar blando y mucosa del carrillo. ^{14,15}

El término <<eritroplasia moteada>> se emplea a menudo para describir una lesión predominantemente roja. Esta lesión debería contemplarse con un alto índice de sospecha dada su alta incidencia de transformación premaligna a maligna (Figura 2). ^{14,15,1}



Figura 2 Lesión de Eritroplasia.

Aspectos histopatológicos

La evaluación microscópica de las eritroplasias revela que del 60 al 90% son displasias epiteliales, carcinomas in situ o carcinomas de células planas. En consecuencia, las eritroplasias orales deberían de considerarse con un alto de sospecha y ser sometidas rutinariamente a biopsias para evaluación histopatológica.^{15,16}

Evaluación y diagnóstico

Una biopsia de diagnóstico es esencial para obtener la opinión de un patólogo para distinguir la eritroplasia de la especificación citada y en específico en las lesiones inflamatorias orales. Esto debe llevarse a cabo con urgencia porque en muchos casos, la eritroplasia es una displasia o puede albergar un carcinoma in situ.¹

Pronósticos y tipos

Es importante que todas las lesiones de eritroplasia sean sometidas a biopsia para determinar su naturaleza exacta. Dos ejemplos comunes de entidades confunden a menudo por los médicos como eritroplasia son candidiasis eritematosa (estomatitis dental-asociado) y eritema migratorio. Otras condiciones para incluir en el diagnóstico diferencial son trastornos erosivos, gingivitis descamativa, lupus discoide, liquen plano erosivo, penfigoide u otras condiciones inflamatorias/infecciosas.¹

2.1.4 Displasias Epiteliales Orales

Del prefijo griego dys, dificultad; plasia, modelar: una anomalía en la organización celular de los tejidos. La displasia implica un proceso de alteraciones genéticas y participación de las diversas vías de señalización celular.²

Se caracteriza por un aumento del número de mitosis, una falta de diferenciación celular y de las relaciones intercelulares anormales. La displasia epitelial puede convertirse en un carcinoma in situ y después en un tumor invasivo.²

La Organización Mundial De La Salud (2017) mantiene un sistema de clasificación de 3 niveles para la Displasias Epiteliales Orales (DEO): displasia leve, moderada y severa. El carcinoma in situ es sinónimo de displasia severa en este sistema de clasificación.²

Esta clasificación de las DEO tiene ciertas debilidades, tales como la división subjetiva en 3 tipos, lo cual no implica una progresión continua y no predice su potencial maligno.²

La displasia leve es confinada al tercio inferior del epitelio (capas basales y parabasales) que presenta citología y /o alteraciones arquitectónicas. La displasia moderada exhibe hasta la porción media de la capa espinosa del (tercio medio). Displasia severa/carcinoma in situ revela la maduración anormal que se extiende desde las células basales a un nivel por encima del punto medio del epitelio (figura 3).²

La mayoría de las displasias epiteliales son del tipo queratinizante, y el criterio para la displasia de espesor completo tal como se aplica a la displasia de no queratinizante es inapropiado. ²

Para tener un criterio de diagnóstico de una displasia epitelial se debe de tener en cuenta características de tipo arquitectónica y citológica (tabla 1). ²

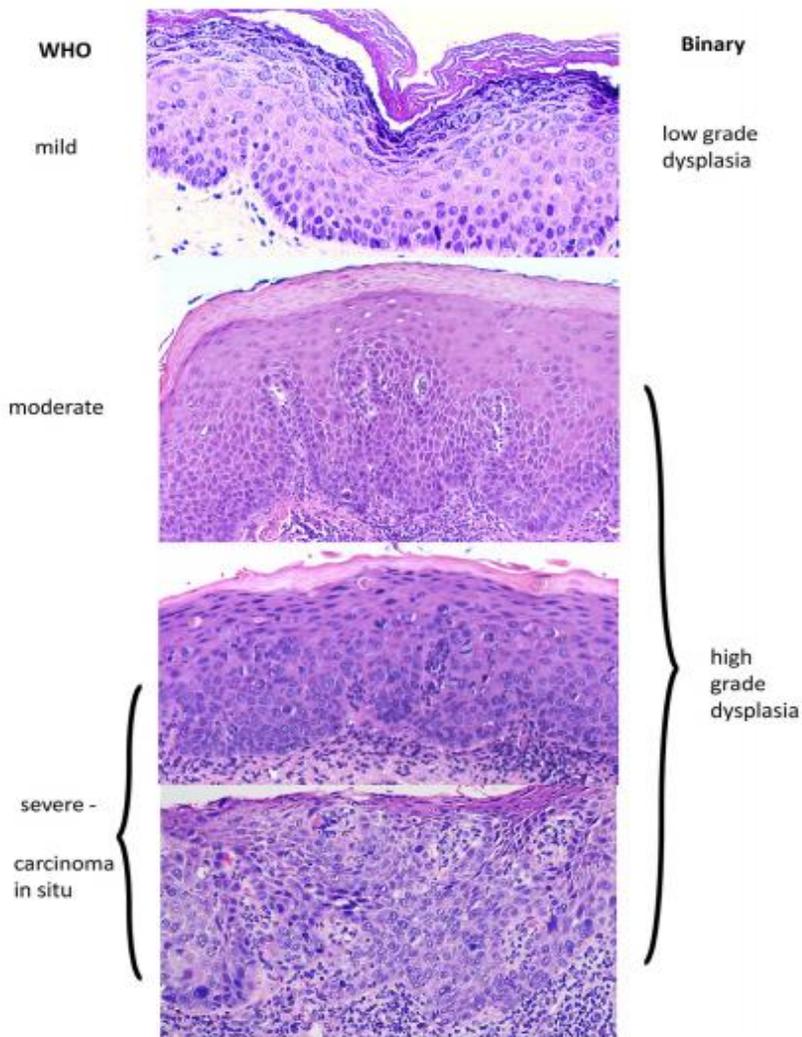


Figura 3 Clasificación histológica de displasia.

Tabla 1 Criterios arquitectónicos y citológicos para el diagnóstico de displasia.

Características arquitectónicas	Características citológicas
<ul style="list-style-type: none"> • Estratificación epitelial irregular • Perdida de la polaridad celular basal • Las crestas epiteliales se encuentran en forma de gota • Aumento del número de figuras mitóticas • Anormalmente mitosis superficiales • Queratinización prematura en células individuales (disqueratosis) • Perlas de queratina dentro de las crestas epiteliales • La pérdida de la cohesión de las células epiteliales 	<ul style="list-style-type: none"> • Variación anormal en el tamaño nuclear (anisonucleosis) • Variación anormal en forma nuclear (pleomorfismo nuclear) • Variación anormal en el tamaño celular (anisocitosis) • Variación anormal en forma de la célula (pleomorfismo celular) • Atípicas figuras mióticas • Aumento del número y tamaño de nucleótidos

La evidencia creciente indica que la transición de epitelio normal a lesiones epiteliales orales potencialmente premalignas a carcinoma de células escamosas invasiva es el resultado de una acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas, este último se refiere a una multitud de equivocaciones, incluyendo reordenamientos cromosómicos, mutaciones, metilación, y otros, que afectan a la expresión y la función de los oncogenes y genes supresores de tumores. Debido a que, por definición, las displasias son vistas como eventos tempranos, se deduce que la explicación de las alteraciones moleculares esenciales para la progresión a la malignidad podría predecir lesiones premalignas con mayor especificidad y sensibilidad cuando se combina con la anotación clínica y la histopatología. ⁵

2.2 PROTOONCOGENES, ONCOGENES Y GENES SUPRESORES DE TUMORES

Las mutaciones de los protooncogenes y los genes supresores de tumores pueden producir cáncer. Un protooncogén es un gen normal que codifica una proteína reguladora del ciclo o de la diferenciación celulares, o una vía de transmisión de señales celulares. Las proteínas protooncogénicas son semejantes a los factores de crecimiento. La versión mutada de un protooncogen (del griego protos, primero; genos, nacimiento) se llama oncogén (del griego onkos, masa).

Las mutaciones de protooncogenes son dominantes debido a que la mutación de un único alelo puede conducir a la transformación celular. A diferencia de la mutación de un gen supresor que es recesivo, donde ambos alelos de un gen supresor de tumor deben mutar para que tenga lugar la transformación celular. ¹⁷

Los oncogenes expresan productos activos constantemente; esto conduce a la diferenciación y a un crecimiento celular no regulado; dos propiedades importantes en las células cancerosas. Las mutaciones pueden afectar a la secuencia del gen (mutaciones puntuales, deleciones, inserciones o amplificación de genes) o ser consecuencia de una translocación o fusión cromosómica (mediante la colocación de un gen en un entorno regulador diferente). Cabe reseñar que los términos protooncogenes y oncogenes no son intercambiables. ^{17, 18}

Los otros participantes del proceso carcinogénico son los genes supresores tumorales. Estos se encargan de regular y limitar la proliferación celular cuando existe daño genómico que comprometa una transformación maligna. Es decir, mientras los oncogenes son proteínas activas como un resultado de mutaciones con ganancia de función, existe un grupo de genes con un comportamiento recesivo que se genera por mutaciones con pérdida de función de ambos alelos. Los genes supresores dirigen la expresión de proteínas vitales que participan en el control de la proliferación celular con una función complementaria a la de las proteínas codificadas por los proto-oncogenes. Mientras que los proto-oncogenes activan la proliferación, las proteínas codificadas por genes supresores de tumores actúan como sus frenos. ^{17,18,19}

Esto explica que su contribución a la carcinogénesis depende de que los dos alelos estén afectados, generando una pérdida total de los mecanismos de freno tanto de las vías de señalización como del control del ciclo celular en sí (LISKER). De forma general estos pueden dividirse en “caretakers o de reparación”, “gatekeeper o de vigilancia” y “landscaper o reguladores del entorno”. Los más conocidos son el gen p53 y el gen retinoblastoma (Rb). Su función es la de regular el ciclo celular. ^{17, 18}

2.2.1 Gen p53

El gen supresor p53 actúa como regulador del ciclo celular, involucrando la integridad genética y es conocido popularmente como el guardián del genoma. El control de la maquinaria del ciclo celular, la apoptosis y la reparación del ADN, son las actividades críticas del gen supresor que provoca una respuesta anti-cáncer. La activación de p53 se realiza por eventos como el daño al ADN, hipoxia, choque térmico y varias otras señales de estrés. ^{3,4}

Las mutaciones que afectan a la estructura tridimensional del p53 han sido que causa un disparo en el núcleo del citoplasma, la retención citoplasmática o mala localización, lo que resulta en la pérdida de sus funciones supresores de tumores. ³

2.2.2 Antecedentes

El gen TP53 se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13.1), contiene 11 exones ubicados en un dominio cromosómico de 20 Kb, Es el gen más comúnmente mutado en el cáncer humano. Desde su descubrimiento en 1979, este gen y su proteína se han convertido en el centro de intensos estudios; un hallazgo importante es que más de 50% de las neoplasias humanas presentan mutaciones somáticas en TP53. ¹⁷

2.2.3. Familia del p53

La familia de factores de transcripción p53 comprende los productos génicos de genes TP53, TP63 Y TP73. Estas proteínas comparten un alto grado de homología en la estructura, ya que han evolucionado a partir del ancestro común en curso de la evolución. La mutación del p53 desarrolla varios tipos de cáncer, incluidos los carcinomas de mama, sarcomas, tumores cerebrales, carcinomas corticales adrenales, de Li-Fraumeni.^{3,6}

Los miembros de la familia del p53 no sólo se encuentran en los vertebrados, sino también en muchos invertebrados superiores, p63 y p73 han asumido nuevas funciones en el desarrollo de tejidos y órganos, mientras que p53 se ha convertido en el guardián del genoma somático y un supresor de tumores también.³

Las mutaciones del p63 se asocian con trastornos en el desarrollo, como el paladar hendido, anomalías esqueléticas, patologías en la piel, pero que no desarrollan cáncer a tasas altas.^{3,6}

El p73 está implicado en el desarrollo del sistema nervioso central y el sistema inmune. Es de notar que p73 puede actuar como un respaldo para p53 en respuesta a diversas señales de estrés y puede iniciar apoptosis.³

2.2.4. Expresión del p53 en displasias epiteliales orales

Como ya se mencionó las displasias implican un proceso de alteraciones genéticas y participación de las diversas vías de señalización celular.²

La organización del tejido y, en definitiva, la del cuerpo como unidad, puede alterarse debido a la presencia de un clon de células anormales que se expande en forma inexorable, y esta catástrofe es el suceso que produce cáncer.²

Las células cancerosas tienen menos probabilidades de autodestruirse por apoptosis.

Esta aversión al suicidio suele deberse a la presencia de mutaciones en genes que regulan el programa de muerte intracelular, un claro ejemplo, es que alrededor del 50% de todos los pacientes con cáncer ha perdido o ha sufrido una mutación en el gen p53. En condiciones normales la proteína p53 actúa como parte de un mecanismo de control que determina si la célula debe dejar de dividirse o morir por apoptosis cuando su DNA está dañado. ¹⁸

3. APOPTOSIS CELULAR

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular inducido por un proceso de suicidio programado, estrechamente regulado, en el que las células que van a morir activan enzimas intrínsecas que degradan el ADN nuclear y las proteínas del núcleo y el citoplasma. ²⁰

Las células apoptóticas se disgregan en fragmentos, llamados cuerpos apoptóticos, que contienen porciones del citoplasma y el núcleo. Las membranas plasmáticas de las células y los cuerpos apoptóticos permanecen intactos, pero su estructura se altera, siguiendo un patrón que atrae a los fagocitos. La célula muerta y sus fragmentos son rápidamente ingeridos, antes de que su contenido se vaya extravasado, por lo que la muerte celular que sigue de esta vía no da lugar a reacción inflamatoria en el anfitrión. El proceso fue identificado en 1972, por el característico aspecto de los fragmentos rodeados de membrana derivado de las células, y se les asignó nombre, que en griego significa <<caída>> o <<desprendimiento>>. Pronto se constató que la apoptosis era un mecanismo singular de muerte celular distinto de la necrosis, caracterizada por pérdida de la integridad de la membrana, digestión enzimática de las células, extravasación del contenido celular y, con frecuencia respuesta de anfitrión. Dado que es regulada genéticamente, a veces la apoptosis se denomina muerte celular programada. Como ya se ha apuntado ciertas formas de necrosis, las llamadas necroptosis, también son

programadas según pautas genéticas, aunque por un grupo de genes distintos.²⁰

La apoptosis se produce normalmente durante el desarrollo y el envejecimiento y como un mecanismo homeostático tomando en cuenta las poblaciones de células que producen tejidos.

La apoptosis actúa como un mecanismo de defensa como en las reacciones inmunitarias o cuando las células son dañadas por enfermedad o agentes nocivos.²⁰

Los mecanismos de la apoptosis son muy complejos. Hasta la fecha, las investigaciones indican que hay dos principales vías de apoptosis: la vía del receptor extrínseco o la muerte y la vía intrínseca o mitocondrial. En ambas vías participan enzimas denominadas caspasas (así denominadas porque son cisteína proteasas que escinden proteínas después de los residuos de ácido aspártico). Como muchas proteasas, las caspasas existen como proenzimas inactivas o zimógenos, y han de ser sometidas a escisión enzimática para activarse. La presencia de caspasas activas escindidas al igual que otros marcadores pueden ser considerados como marcadores de apoptosis e incluso de la vía que se está activando.¹⁰

3.1. Apoptosis vía intrínseca

Los estímulos que dan inicio a la vía intrínseca producen señales intracelulares que pueden actuar y ya sea en una manera positiva o negativa. Las señales negativas implican la ausencia de ciertos factores de crecimiento, hormonas y citoquinas que pueden conducir a apoptosis.

La vía mitocondrial es el principal mecanismo de apoptosis en todas las células de mamíferos. Es consecuencia del aumento de la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial, con liberación de moléculas inductoras de muerte (proapoptóticas) del espacio intermembrana mitocondrial al citoplasma, tal como el citocromo c, cuya salida es regulada por la familia de proteínas bcl-2.²⁰

3.1.2 Bcl-2

Dentro de las células, orgánulos citoplasmáticos se renuevan continuamente mediante un proceso que implica la destrucción y reconstrucción.

Cuando una célula se divide dando lugar a dos células hijas, otra célula tiene que morir para mantener constante la población.

Por lo tanto, dada la importancia de la muerte celular y la degradación celular en la homeostasis del tejido, parece probable que los mecanismos han evolucionado para regular coordinadamente estas dos vías. Apoptosis y autofagia. ^{7,8,13}

La autofagia se caracteriza por el secuestro de material citoplasmático en las vacuolas de la degradación a granel por enzimas lisosomales. ⁸

La liberación de proteínas proapoptósicas mitocondriales es estrechamente controlada por la familia de proteínas BCL2. Dicha familia debe su nombre al gen BCL2, a menudo sobreexpresado por las translocaciones cromosómicas y reordenamientos en algunos linfomas de linfocitos b, también desempeña un doble papel en el control de la apoptosis y la autofagia. Aunque las proteínas de la familia Bcl-2 se caracterizaron inicialmente como reguladores de la muerte celular, se ha visto recientemente que también controlan la autofagia. Existen más de 20 integrantes de la familia BCL, que se dividen en grupos en virtud de su función pro-o antiapoptósica y de los dominios de homología BCL2. ^{7,8,13}

Los miembros llamados antiapoptósicas se encuentra la BCL2, BCLX Y MCL1 son los principales miembros de este grupo y poseen cuatro dominios BH (llamados BH1-4). Estas proteínas se localizan en las membranas mitocondriales externas, así como en el citosol y las membranas del RE. Su función es el mantener la regulación de la permeabilidad en la membrana mitocondrial externa, evitan el escape del citocromo c al citosol y otras proteínas inductoras de la muerte. ^{8,20}

3.1.3. Bax

Las llamadas proteínas proapoptosicas tales como el BAX y BAK, tienen dominios BH, cuatro para ser exactos. Tras su activación, la BAX y BAK se oligomerizan en la membrana mitocondrial externa, ayudando a su permeabilidad. El mecanismo preciso por medio del cual BAX/BAK permeabilizan las membranas no se ha establecido completamente, sin embargo, se sabe que forman un canal en la membrana mitocondrial externa, permitiendo el paso del citocromo c desde el espacio intermembrana.²⁰

El citocromo c promueve el ensamblaje y reclutamiento de procaspasa específicas y forma un complejo proteico llamado apoptosoma, que desencadena una cascada de caspasas que inician la apoptosis.²⁰

III. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

Una de las principales complicaciones en el estudio de las displasias, es su mismo sistema de clasificación, es decir, lo que para algunos autores una displasia podría ser leve para otra moderada o viceversa. Esta clasificación podría ser considerada como subjetiva además de no ser lineal respecto a su evolución, es decir, una displasia severa no necesariamente debe proceder de una moderada. Los factores de riesgo para el desarrollo de lesiones potencialmente malignas y el cáncer inciden de manera diferencial en cada humano. Esto obedece a los múltiples mecanismos moleculares responsables de la transformación maligna diferencial. La función de proteínas y genes supresores, es encargarse del mantenimiento de la integridad genómica bloqueando el paso de células dañadas en su ADN de G1 a fase S y activar la apoptosis a través de la regulación de proteínas de la familia bcl2. En displasias es importante determinar cuál es su expresión como una forma de comprender por qué no existe un patrón o secuencia lineal en este tipo de lesiones.

IV. JUSTIFICACIÓN

Las DEO conllevan a un riesgo mayor en la progresión del cáncer y pone en relieve la complejidad para los clínicos, patólogos y para los pacientes en la evaluación de riesgo de cáncer.

Por medio de las características histopatológicas de las DEO y los marcadores estudiados como el p53, Bcl2 y Bax podríamos entender un poco más la conducta de estas.

P53 es el gen diana mayormente reportado con alteraciones tumores. Las mutaciones somáticas del p53 se encuentran en el 50 a 60% de todos los cánceres del ser humano, incluidos los carcinomas de células escamosas y carcinoma basocelular. Sin embargo, su estudio y función en DEO aun es controversial.

Dentro de las funciones de gen p53 es frenar el ciclo celular y activar la reparación del daño génico o inducir a la apoptosis cuando no es factible la reparación. En la vía intrínseca de la apoptosis los miembros de la familia Bcl-2 juegan un papel preponderante. La molécula Bax y Bcl-2 como proapoptótico y antiapoptótico, respectivamente, puede ser de ayuda en lo antes mencionado, brindar más información respecto a la conducta de las DEO.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la inmunoexpresión de P53, BAX y BCL2 en Displasias Epiteliales Orales.

Objetivos específicos

Determinar la inmunoexpresión de P53, BAX y BCL2 en relación con el grado de severidad histológica de las DEO.

Determinar la inmunoexpresión de P53, BAX y BCL2 en relación género de los pacientes con DEO.

VI. METODOLOGÍA

Se obtuvieron 6 muestras provenientes de los archivos del Departamento de Patología y Medicina Bucal, de División de Estudios de Posgrado e Investigación, de la Facultad de Odontología, UNAM. Las características clínico demográficas se detallan en la tabla 2.

Tabla 2 Muestras de DEO				
MUESTRA	GRADO	LOCALIZACIÓN	EDAD	GÉNERO
DL1	LEVE	BORDE LATERAL DE LA LENGUA	62 AÑOS	M
DL2	LEVE	ENCÍA INSERTADA	63 AÑOS	M
DM1	MODERADA	BORDE LATERAL DE LA LENGUA	56 AÑOS	F
DM2	MODERADA	DORSO DE LA LENGUA	44 AÑOS	F
DS1	SEVERA	DORSO DE LA LENGUA	54 AÑOS	M
DS2	SEVERA	BORDE LATERAL DE LA LENGUA	74 AÑOS	M

Previo a la realización de la técnica de IHQ se estandarizó la técnica para el anticuerpo y se determinó la dilución a utilizar. Primero las laminillas se desparafinaron en baños de xilol y alcohol de manera convencional. Posteriormente se lavaron con agua corriente y se realizó la recuperación antigénica utilizando un buffer de citratos al 0.01M mediante ebullición en baño maría dentro de horno de microondas durante 4 minutos a potencia de 700 W. Se realizaron 3 lavados con TBS por 3 minutos cada uno para limpiar los residuos y se inhibió la actividad de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrogeno al 3% incubandolo durante 20 minutos en cámara húmeda; y transcurrido el tiempo se hicieron 3 lavados más de TBS por 3 minutos. Se delimitó la muestra con un lápiz hidrofóbico y enseguida se bloqueó fondo inespecífico por incubación con albumina al 1% en cámara húmeda por 20 minutos, se lavó con TBS y permeabilizó con Tritón X100 por 20 minutos. Nuevamente se lavó con TBS para enseguida colocar el anticuerpo primario p53 (sc-126), Bcl-2 (sc-492) y BAX (sc-6236) todos a una dilución 1:200 de la marca Santa Cruz Biotechnology, incubando por una hora a 37°C. Después de la incubación con el anticuerpo se realizaron 3 lavados de 3 minutos. Se incubo por 20 minutos con SuperEnhancer (Súper Sensitive Polymer-HRP kits) a temperatura ambiente y después se realizaron 3 lavados por 3 minutos con solución TBS. Se prosiguió a colocar el polímero HRP por 20 minutos a 37°C seguido de 3 lavados por 3 minutos Se utilizó diamenobencidina (DAB) como cromógeno y se colocó a cada tejido por 3 minutos. Después de aplicar el cromógeno se lavaron las laminillas con agua corriente, se dejaron en agua destilada desionizada por 5 minutos. Se realizó la contratinción con hematoxilina durante 2 minutos y posteriormente se lavaron con agua corriente y se colocó en agua desionizada. Se realizó la deshidratación de los tejidos con alcohol de diferentes concentraciones y xilol para realizar el montaje con

resina hidrofóbica. Y se dejaron secar 12 horas para después poder observar en el microscopio Leica DM750 tomando fotomicrografías a 400 aumentos con la cámara Leica ICC50HD.

La inmunexpresión fue interpretada mediante el método semicuantitativo indicando el nivel de expresión (-/negativo, leve/+, moderado/++ e intenso/+++) y zona de localización celular (c/citoplasma, n/núcleo, m/membrana). Se realizó un análisis estadístico de correlación de Spearman para determinar la relación con severidad y genero respecto al nivel de inmunexpresión ($p < 0.05$).

VII. RESULTADOS

La edad promedio de los casos estudiados fue de 58.8 ± 10 años. Cinco de los 6 casos se localizaron en lengua. Respecto al género 4 casos fueron masculinos y 2 femeninos.

La inmunexpresión de Bax fue predominantemente negativa tanto para el estrato basal como en los suprabasales para los tres grados de severidad de DEO. Bcl-2 en las DEO leves presento un nivel de expresión leve citoplasmático en estrato basal, en un caso se observó expresión moderada en estrato suprabasal. En las DEO moderadas y severas se observó expresión nuclear y citoplasmática a nivel basal, en estratos suprabasales se observó un nivel de expresión moderado membranal. P53 en las DEO leves se observó expresión nuclear moderada en estrato basal e intensa en los suprabasales de una muestra mientras que en la otra DEO leve fue negativa. En las DEO moderadas fue expresión leve a moderado a nivel citoplasmático y nuclear en estrato basal, en los estratos suprabasales fue de negativo a intensa a nivel citoplasmático. Las DEO severas en estrato basal fue expresión leve a nivel nuclear y citoplasmático, en suprabasal fue expresión citoplasmática en ambos casos (tabla 3). Nuestro análisis estadístico no mostro significancia entre la severidad de la DEO y genero respecto al nivel de inmunexpresión.

La tabla 3 muestra de datos obtenidos de la inmunexpresión.

Tabla 3 Inmunoexpresión de marcadores Bax, Bcl-2 Y P53				
MUESTRA		Bax	Bcl-2	P53
DL1	Basal	+/C	+/C	++/N
	Suprabasal	-	+/C	+++/N
MUESTRA		Bax	Bcl-2	P53
DL2	Basal	-	+/C	+/N
	Suprabasal	-	++/C	-
MUESTRA		Bax	Bcl-2	P53
DM1	Basal	+/N	+/N	++/N
	Suprabasal	-	-	-
MUESTRA		Bax	Bcl-2	P53
DM2	Basal	-	+/C	+/C/ N
	Suprabasal	-	++/M	+++/C
MUESTRA		Bax	Bcl-2	P53
DS1	Basal	+/C	+/C	+/N
	Suprabasal	-	-	++/C
MUESTRA		Bax	Bcl-2	P53
DS2	Basal	-	+/C	+/C/N
	Suprabasal	-	++/M.	++/C
Negativo (-), Leve (+), Moderado (++) , Intensa (+++) , Citoplasma (C), Nuclear (N) y Membranal (M).				

Conforme a las muestras histológicas en la tabla 3 Se observan los grados de severidad y sus expresiones en las capas basales y suprabasales.

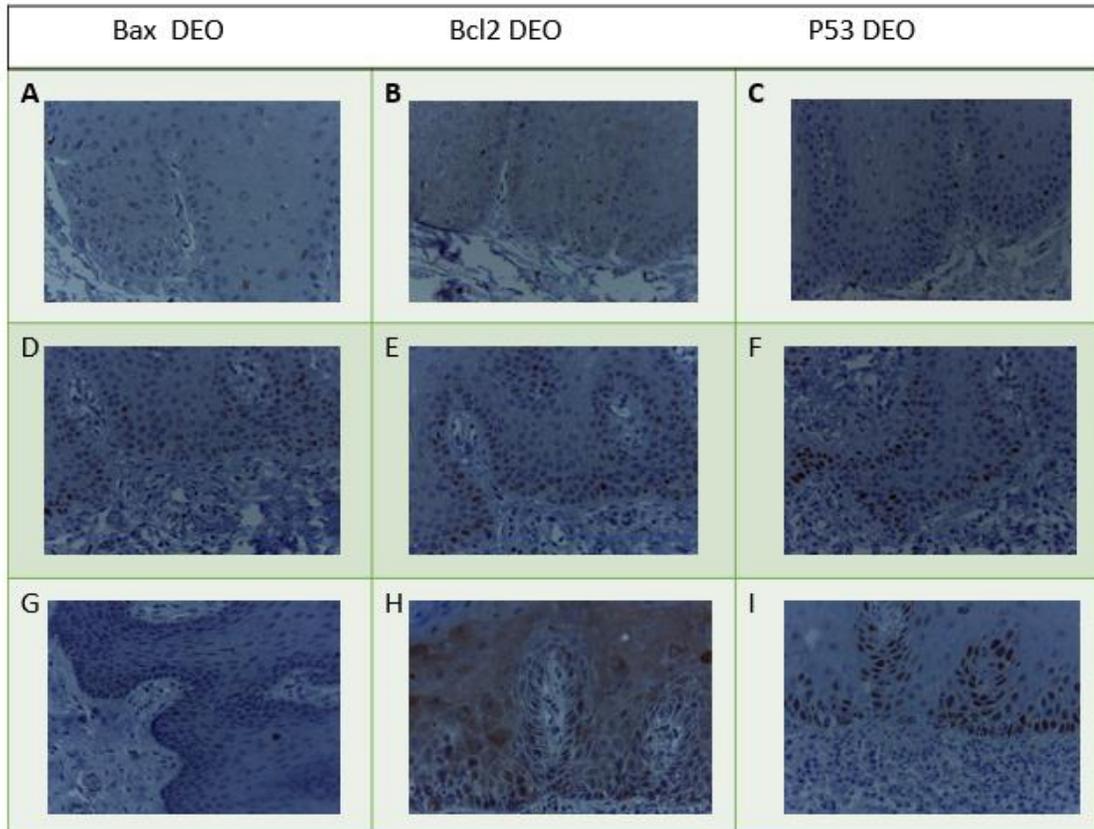


Figura 4 Fotomicrografía de inmunexpresión de marcadores Bax, Bcl2 Y p53 en DEO. A) Bax en DEO leve, B) Bcl2 en DEO leve, C) p53 en DEO leve, D) Bax en DEO moderada, E) Bcl2 en DEO moderada, F) p53 en DEO moderada, G) Bax en DEO severa, H) Bcl2 en DEO severa, I) p53 en DEO severa. ^{F.D.}

VIII. DISCUSIÓN

Las DEO forman parte de los “trastornos orales potencialmente malignos”. Su estudio ha arrojado diversos puntos de vista, desde su cuestión clínica hasta sus implicaciones moleculares. Es este ensayo observamos que la zona anatómica más frecuente fue lengua (5 de 6 casos). López Jornet y Cols. reportaron que para este tipo de trastornos la lengua es el sitio de predilección.⁹ Esto toma importancia por el hecho de que durante la exploración oral esta zona anatómica debe ser examinada detalladamente, más aún si se considera que debido a esto algunos de estas lesiones se podrían convertir en un carcinoma. Adicionalmente, se debe tomar en cuenta que la mucosa oral ante el envejecimiento se atrofia, se vuelve un poco más delgada, lisa y seca, haciendo el área de la lengua más susceptible a lesiones pre malignas.

De los 6 casos estudiados la edad promedio fue de 58 años. Se ha reportado que más del 90% de los cánceres orales se diagnostican en mayores de 40 años y más del 50% en individuos de más de 65 años.¹¹ Este dato es útil y se debe considerar durante la elaboración de la historia clínica, principalmente cuando observamos otros factores de riesgo en pacientes de esta edad, es decir, cuando el paciente tiene antecedentes de consumo de tabaco y alcohol. Respecto al género, observamos mayor distribución en el género masculino. Existen reportes donde se considera que la relación hombre-mujer es 3 a 1 mientras otros consideran que el género femenino tiene mayor frecuencia.¹² Este cambio en la distribución de la relación hombre-mujer puede deberse a modificaciones en los hábitos o exposición a factores de riesgo, es decir, en la actualidad tanto hombres como mujeres pueden fumar o beber alcohol u exponerse a otros factores.

El análisis de la inmunoexpresión de Bax, Bcl-2 y p53 no mostró significancia estadística al intentar correlacionar su expresión con el grado de severidad y/o el género. Shailaja y Cols. en un estudio inmunohistoquímico de 30 DEO reportó significancia para Bcl-2 y p53, indicando que la expresión de estos marcadores es mayor en displasias comparados con tejido normal. ¹³ Esta diferencia puede obedecer de primera instancia al número de muestras incluidas. Nuestro estudio podría quizá ser catalogado como un piloto, por lo cual su primera debilidad a cubrir es aumentar el número de especímenes a analizar. El seguir investigando sobre estos marcadores es importante, ya que su estudio nos podría aportar más información sobre la conducta/transformación de las displasias epiteliales orales.

IX. CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos podemos concluir que las DEO son más frecuentes en lengua, en pacientes masculinos cuya edad sea superior a los 50 años. En relación a la inmunexpresión no observamos una correlación significativa, sin embargo, para p53 de expresión nuclear y un cierto caso citoplasmático nos sugiere la posibilidad de alteraciones en su funcionar, lo cual nos motiva a investigar mayormente. Esto también aplica para el caso de Bax y Bcl-2, donde el patrón de expresión debería ser analizado en una población mayor de DEO.

La complejidad de las displasias respecto a la linealidad en la transformación, las variables de edad, sexo y zona anatómica nos hacen creer en la importancia del estudio de este tema, ya que con los resultados obtenidos podríamos saber con más certeza que y porque se existen diferentes grados de displasia.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) Warnakulasuriya Saman, Clinical features and presentation of oral potentially malignant disorders, *Crossmark*, Vol. 125 No. 6 June 2018; Pages 582- 590.
- 2) Müller Susan, Oral epithelial dysplasia, atypical verrucous lesions and oral potentially malignant disorders: focus on histopathology, *Crossmark* Vol. 125 No. 6 June 2018; Pages 591-602.
- 3) Saha Taniya, Kar Rajiv K, Sa Gaurisankar, Structural and sequential context of p53: A review of experimental and theoretical evidence, *Rev. Elsevier, Progress in Biophysics and molecular Biology xxx (2015) 1-14*
- 4) Joerger Andreas C., Fersht Alan R, The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches, *Annu. Rev. Biochem. 2016.85:375-404.*
- 5) Nikitakis Nikolaos G., Pentenero Monica, Georgaki Maria, Poh Catherine F., Peterson Douglas E., Edwards Paul, Lingen Mark, Sauk John J., Molecular markers associated with development and progression of potentially premalignant oral epithelial lesions: Current knowledge and future implications, *Crossmark* Vol. 125 No. 6 June 2018; Pages 650-669.
- 6) Zhang Bian, Golding Bernard T, Hardcastle Ian R, Small-molecule MDM2-p53 inhibitors: recent advances, *Future Science, Future Med. Chem. 2015 Pages; 631-645.*
- 7) Seon-Yong Jeong, Dai-Wu Seol, The role of mitochondria in apoptosis, *BMB reports, mini review, 2008, pages 11-22.*
- 8) Levine Beth, Guido Kroemer Sangita Sinha, Bcl-2 family members: Dual regulators of apoptosis and autophagy, *Landes Bioscience, 2008 July 1, 4(5): 600–606.*

- 9) López Jornet, A.. Saura Ingles, A.. Cozar Fernández. Estudio de las lesiones precancerosas de la mucosa bucal en el paciente geriátrico. Revista Española de Geriatria y Gerontología Vol. 34. Núm. 3. Mayo 1999 Páginas 123-188
- 10) Elmore Susan, Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death, Society of Toxicologic Pathology, Vol. 35, No. 4, 2007
- 11) . García-García V, Bascones Martínez A. Cáncer oral: Puesta al día. Av. Odontostomatol; Vol. 25 Núm.5. Pages 239-248. 2009.
- 12) Nadeau C, Kerr AR. Evaluation and Management of Oral Potentially Malignant Disorders. Dent Clin North Am. Vol. 62 Núm. 1 Pages :1-27; 2018 Jan
- 13) Shailaja G, Kumar JV, Baghirath PV, Kumar U, Ashalata G, Krishna AB. Estimation of malignant transformation rate in cases of oral epithelial dysplasia and lichen planus using immunohistochemical expression of Ki-67, p53, BCL-2, and BAX markers. Dent Res J (Isfahan).; Vol. 12. Núm 3. Pages 235-42. 2015 May-Jun.
- 14) DeLong Leslie, W. Burkhart Nancy, Patología Oral y general en Odontología, 2da. Edicion, Philadelphia, Wolters Kluwer Helth, 2013. (Pág. 367- 375)
- 15) Sapp J. Philip, Eversole Lewis R., P. Wysocki George. Patología Oral Y Maxilofacial contemporánea, segunda edición, Barcelona España , Elsevier Mosby, 2010. (Pág. 180- 199).
- 16) Stevens Alan,. Lowe James S, Young Barbara, Histopatología Básica. Atlas y texto en color. Cuarta edición. Madrid, España, Churchill Livinstone an imprit of Elsevier Science, 2003. (Pág. 66-70)
- 17) L. Kierzenbaum Abraham, Tres Laura L, Histología y biología Celular introducción a la anatomía patológica, cuarta edición, Barcelona España, Elsevier, 2016. (Pág. 99-121)
- 18) Alberts Bruce, Bray Dennis, Hopkin Karen, Johnson Alexander, Lewis Julian, Raff Martin, Roberts Keith, Walter Peter, Introducción a la

Biología Celular, tercera edición, Buenos Aires, editorial medica paramericana, 2011. (Pág 621-709)

19) Lisker Rubén. Zentella Dehesa Alejandro. Grether González Patricia, Introducción a la Genética Humana, tercera edición, México, editorial el manual moderno, 2013. (Pág.189-210)

20) Cotran, R.S.; Kumar, V. y Collins T.: Robbins Patología Estructural y Funcional. 9ª edición, Editorial Elsevier, Madrid. 2015.