



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XÓCHIMILCO

**“Expresión de E-cadherina y ki67 en mucosa normal, hiperqueratosis sin
displasia, displasia epitelial leve, displasia epitelial severa y carcinoma
escamocelular bien diferenciado. Estudio descriptivo.”.**

Idónea Comisión de Resultados

Que para obtener el grado de
Maestro en Patología y Medicina Bucal

P R E S E N T A

Samantha Rivera Macías.

Comité tutorial:

Codirectora: Dra. Velia A. Ramírez Amador

Codirectora : M. en C. Estela de la Rosa García

Asesor: Dr. Daniel Rivera Daza.

Marzo 2011

1. Introducción

El cáncer bucal (CB) representa un problema de salud pública a nivel mundial, reportándose altas tasas de incidencia en países desarrollados, sin embargo la mayoría de los casos se registran en países en vías de desarrollo. (Warnakulasuriya 2010, Conway 2006).

En México, de acuerdo al registro histopatológico de neoplasias del 2002, se reportaron 2269 casos de neoplasias de cabeza y cuello, el 1% corresponde a cáncer bucal. (Tirado y cols 2007). En nuestro país existen pocos centros de referencia y detección oportuna de cáncer bucal, es por ello que son diagnosticados en etapas tardías y la sobrevivencia de los pacientes se traduce en un importante deterioro en la calidad de vida, el cual impide su desarrollo social y laboral. (Tirado y cols 2007)

En 2005, la OMS y el centro de cáncer y pre cáncer oral establecieron, la terminología y clasificación de las lesiones premalignas, con el objetivo de recomendar el uso del término “desórdenes potencialmente malignos”, ya que no todas estas lesiones evolucionan a lesiones cancerígenas. Los desórdenes potencialmente malignos (DMP) incluyen a todas aquellas lesiones o condiciones que predisponen a cambios epiteliales de la mucosa bucal y que pueden progresar a carcinomas. (Warnakulasuriya y cols 2007) Clínicamente se describe a la leucoplasia y eritroplasia como desórdenes potencialmente malignos que tienen riesgo de transformación a carcinomas.

El aspecto clínico e histológico que presentan los DPM sugieren su capacidad de malignización, sin embargo los datos que aporta el examen clínico y el estudio histopatológico no son totalmente satisfactorios, es por ello que se busca el empleo de nuevos marcadores que contribuyan a determinar el grado de alteración celular y riesgo de malignización. Existen algunos marcadores que sugieren ser de utilidad para

comprobar la progresión o grado de transformación de los DPM. En el presente estudio seleccionamos un marcador de adhesión celular: E-cadherina que juega un papel importante en la histogénesis de las células epiteliales y su función primordial es mantener la integridad y unión del epitelio. (Santos García 2005) Este marcador ha mostrado ser de utilidad para describir la progresión de DPM hasta su transformación en carcinomas, ya que a mayor pérdida de expresión mayor riesgo de transformación e invasión. La pérdida o reducción de la adhesión celular mediada por E-cadherina es un paso importante en el desarrollo de la invasión y metástasis en múltiples carcinomas incluidos los carcinomas bucales. En un estudio Santos-García y cols (2005) se ha reportado la expresión proteica de alteraciones genéticas que tienen lugar en los estadios iniciales de la cancerización de la cavidad bucal, además de la pérdida o reducción de la adhesión celular en desórdenes potencialmente malignos y malignos de la cavidad bucal. Santos-García y cols (2005)

La pérdida de la expresión de E-cadherina se ha descrito en carcinomas bien y poco diferenciados de vejiga, colón, mama, pulmón y manifestando que la pérdida de adhesión celular está relacionada con la invasión y las metástasis de las neoplasias (Frixen y cols 1991). Además se han reportado estudios en cuello uterino en los cuales se ha observado una pérdida de expresión del marcador hasta en un 40% de los carcinomas invasivos, encontrando diferencias estadísticamente significativas, al comparar tejido de cuello uterino normal y carcinomas invasivos de cuello uterino ($p < 0.05$) concluyendo que la pérdida de expresión de E-cadherina está asociada con la invasión en tejido de cuello uterino. (Moon y cols 2003).

El segundo marcador seleccionado en nuestro estudio fue Ki67 se ha asociado con peor pronóstico en la mayoría de los tumores. Santos-García y cols (2005) estudiaron la proliferación celular con el marcador Ki-67 y concluyeron que las técnicas de

inmunohistoquímica y el estudio molecular de los desórdenes potencialmente malignos permiten conocer la expresión proteica de las alteraciones genéticas que pueden ayudar en el diagnóstico y tratamiento tempranos del carcinoma escamocelular (CEC) teniendo especial relevancia el estudio de Ki-67 en estadios tempranos, puede ser empleado para medir la fracción de crecimiento en los tejidos normales y en las neoplasias malignas. (Santos-García 2005)

Ki 67 Es un marcador de proliferación celular, (García García y cols 2005, Torres Rendón y cols 2009, Montebugnoly y cols 2009). Sin embargo, este marcador no se expresa en todas las fases del ciclo celular y puede haber variación de la expresión entre los estratos y la proliferación epitelial, además determina el índice de proliferación en el tejido normal y tiene la capacidad de diferenciar la expresión entre la capa de células epiteliales y el estrato suprabasal, ya que en este ultimo estrato la proliferación es mayor y tiene gran capacidad de diferenciación (Takeda y cols 2006, Costea y cols 2006).

1.1 ANTECEDENTES

1.2 Epidemiología del cáncer bucal

El cáncer bucal (CB) representa un problema de salud pública a nivel mundial, reportándose altas tasas de incidencia en países desarrollados, sin embargo la mayoría de los casos se registran en países en vías de desarrollo. (Warnakulasuriya y cols 2010, Conway y cols 2006)

A nivel mundial el CB ocupa el octavo lugar, con variaciones epidemiológicas entre las diferentes regiones geográficas, es el tercero más común en el sur de Asia y en Estados Unidos representa del 2 al 4% de las neoplasias malignas diagnosticadas por año. (Supic y cols 2009, Scully y cols 2009, Massano y cols 2006)

En México, de acuerdo al registro histopatológico de neoplasias del 2002, se reportaron 2269 casos de neoplasias de cabeza y cuello, el 1% corresponde a cáncer bucal. (Tirado y cols 2007) En nuestro país existen pocos centros de referencia y detección oportuna de cáncer bucal, es por ello que son diagnosticados en etapas tardías y la sobrevida de los pacientes se traduce en un importante deterioro en la calidad de vida, el cual impide su desarrollo social y laboral. (Tirado y cols 2007)

El porcentaje de supervivencia a 5 años es del 40 al 56% y varía de acuerdo a su localización, siendo el cáncer labial el de menor sobrevida en un 70% y 30% en otras localizaciones (García García y cols 2009) El carcinoma escamocelular es la variante más frecuente, relacionada hasta en un 90% de los carcinomas presentados en cavidad bucal y constituye una de las más importantes causas de morbi-mortalidad en el mundo. (Scully y cols 2009)

1.3 Etiopatogenia del cáncer bucal

La displasia epitelial es el resultado de la acumulación de diversas alteraciones genéticas que conllevan al desarrollo y progresión del cáncer bucal. (Scully cols 2008, Samma y cols 2008, Supic G y cols 2009, Scully y cols 2010)

De acuerdo a estudios recientes el proceso de carcinogénesis implica varios eventos, existe un primer suceso, denominado iniciación, donde un agente externo o endógeno coloca a la célula en una situación de mayor susceptibilidad o predisposición para transformarse. Las neoplasias malignas crecen mediante un proceso de evolución clonal dirigida por mutaciones, en donde múltiples mutaciones en una célula son necesarias para desarrollar el cáncer. (Song y cols 2006)

Los modelos más recientes de génesis tumoral describen que es un proceso en el que median múltiples alteraciones moleculares, a través de las cuales se activan protooncogenes que estimulan el crecimiento celular, y genes supresores de tumor que inhiben la proliferación celular en condiciones normales, volviéndose inactivos y conduciendo a la célula hacia una transformación neoplásica (Song y cols 2006, Califano y cols 2004, Califano y cols 2000)

Las mutaciones del DNA afectan un número de genes que interrumpen el control del crecimiento y los acontecimientos epigenéticos, incluyen la expresión y la función aberrante de las moléculas que regulan control del ciclo celular el queratinocito que progresa en una serie de cambios genéticos que van de una célula premaligna a una maligna y se caracteriza por la capacidad de proliferar en una manera incontrolada dando lugar a carcinomas. (Scully y cols 2009)

1.4 Desórdenes potencialmente malignos de la cavidad bucal

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la lesión premaligna como una alteración tisular en la cual puede recobrase la integridad tisular o desarrollarse cáncer, mientras que los estados precancerosos, se definen como un estado generalizado que se asocia significativamente a un riesgo mayor de cáncer. (Axell y cols 1996)

En 2005, la OMS y el centro de cáncer y pre cáncer bucal establecieron, la terminología y clasificación de las lesiones premalignas, con el objetivo de recomendar el uso del término “desórdenes potencialmente malignos”, ya que no todas estas lesiones evolucionan a lesiones cancerígenas. Los desórdenes potencialmente malignos (DMP) incluyen a todas aquellas lesiones o condiciones que predisponen a cambios epiteliales de la mucosa bucal y que pueden progresar a carcinomas. (Warnakulasuriya y cols 2007) Clínicamente se describe a la leucoplasia y eritroplasia como DPM que tienen riesgo de transformación a carcinomas. El potencial de malignización está determinado por la presencia de displasia epitelial, traducida como una serie de desórdenes de la maduración epitelial y alteración de la proliferación celular, descrita como cambios arquitectónicos y celulares. Los cambios arquitectónicos se caracterizan por crestas epiteliales en forma de gota, hiperplasia de la capa basal, hipercelularidad y un patrón alterado. Las alteraciones celulares presentes en la displasia son: aumento del tamaño de los nucléolos; hiper cromatismo nuclear, pleomorfismo nuclear, aumento de la relación núcleo/citoplasma, aumento de la actividad mitótica, figuras mitóticas anormales y pleomorfismo celular. (Reibel 2003, Warnakulasuriya 2007, Van der Waal y cols 2001).

El análisis de las alteraciones genéticas han demostrado incrementos en las pérdidas alélicas que progresan desde diversos grados de displasia hacia carcinoma *in situ* y cáncer invasivo (Supic G 2009 Scully cols 2008, Scully y cols 2010 Shamma y cols

2008). Actualmente la única herramienta con la que se cuenta para determinar el comportamiento de los DPM es la exploración clínica y la toma de biopsia, concluyendo que el riesgo de transformación maligna se asocia con el tipo de lesión histológica que se presente. Sin embargo el diagnóstico depende de la calidad de la biopsia y de la información clínica recabada. (Shamaa y cols 2008, Scully y cols 2010) Existen estudios de seguimiento hasta por 20 años como el de Gowan (2001) que describen transformación maligna en 15% de casos de displasia epitelial y 1% en pacientes sin displasia. (Gowan y cols 2001)

Otros autores como (Epstein y cols 2003, Rosin y cols 2002) describen la localización y cambios clínicos que se presentan en los desórdenes potencialmente malignos, y proponen el uso de nuevos marcadores moleculares para el diagnóstico de lesiones incipientes. (Epstein y cols 2003, Rosin y cols 2002)

1.5 Clasificación histológica de displasia epitelial.

Warnakulasuriya y cols (2007) describen a la displasia epitelial como una combinación de las alteraciones celulares individuales y de la estructuración normal del epitelio observada en la transición gradual hacia la malignidad. (Warnakulasuriya 2007). Los signos displásicos del epitelio son caracterizados por crestas epiteliales en forma de gota, hiperplasia de la basal, hiper celularidad y un patrón alterado, así como aumento del tamaño de los nucléolos; hiper cromatismo nuclear, pleomorfismo nuclear, aumento de la relación núcleo/citoplasma, aumento de la actividad mitótica, figuras mitóticas anormales y pleomorfismo celular. (Reibel 2003, Warnakulasuriya 2007, Van der Waal y cols 2001)

El grado de severidad de la displasia depende de la frecuencia de los cambios epiteliales y de la afectación de los estratos profundos de forma aislada, de los estratos profundos e intermedios o de la totalidad del epitelio. Así se clasifica la displasia como leve,

moderada o severa. Cuando los signos displásicos involucran todo el espesor del epitelio estaremos ante un carcinoma *in situ*, esta lesión no se considera reversible, sin embargo puede transcurrir un largo periodo de tiempo hasta la invasión o desarrollo de metástasis (Warnakulasuriya y cols 2007, Van der Waal I y cols 2009) Por otra parte, la sobrevida de los pacientes después de su diagnóstico es en promedio de 5 años, lo cual sugiere que debemos descubrir métodos de detección de cáncer bucal temprano y continuar con búsqueda de marcadores moleculares ya que son varios los factores que contribuyen al desarrollo de carcinomas y metástasis a distancia. (Scully y cols 2010.)

1.6 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares pueden ser de utilidad en el diagnóstico de los DPM, si bien hasta el momento los resultados de diferentes estudios no han sido concluyentes, estos nuevos marcadores pudieran considerarse como un complemento en la evaluación de dichas lesiones. (Pitiyage y cols 2009)

En la actualidad se han realizado estudios orientados hacia nuevos marcadores que contribuyan a determinar el grado de alteración celular y permitan una aproximación al conocimiento de la transformación maligna, existen distintas clasificaciones de marcadores moleculares para displasia epitelial y carcinoma escamocelular. (Pitiyage y cols 2009, Kutser y cols 2004) Kutser (2004) agrupa por familias a los marcadores moleculares en: marcadores de crecimiento tumoral, de supresión y respuesta antitumoral, de angiogénesis, invasión y metastatizantes. (Pitiyage y cols 2009, Kutser y cols 2004)

Pande y cols 2002 estiman que la escasez de marcadores moleculares que definan claramente, el pronóstico de los DPM retrasa el diagnóstico y transformación de dichas lesiones, actualmente se han descrito marcadores de diferenciación epitelial y marcadores genómicos que pueden contribuir a la evaluación pronóstica de los precursores de los DPM. (Warnakulasuriya y cols 2009) La inclusión de estos marcadores de biología molecular para evaluar el potencial maligno de los casos de displasias epiteliales puede mejorar la detección de alteraciones poco visibles al microscopio. En el Cuadro 1, se describen algunos marcadores moleculares utilizados en DPM (2010 González Moles y cols), (2009 Torres y cols) (Smith 2009 y cols) (Gayani y cols 2009)

Cuadro 1. Marcadores moleculares utilizados en desórdenes potencialmente malignos y carcinoma escamocelular.

Año	Autor	Pacientes	Marcador	Lesión	Expresión
2003	Muzio y cols	46	Survivina	Displasia	53%
2003	Macabeong y cols	33	Catepsina	Displasia	94%
2004	Jordan y cols	34	MMP1,2,9	Displasia	78%
2004	Chen y cols	50	P73	Displasia	100%
2005	Zhou y cols	27	LOH 8p 11p	Displasia	92%
2006	Cruz y cols	18	P53	Displasia	100%
2007	Kovesi y cols	40	Ciclina D1	Displasia	45%
2008	Gurkiran y cols	20	E-cadherina	CEC	21%
2009	Torres y cols	40	Mcm2	Displasia/CEC	40%
2010	González Moles y cols	83	Ki 67	Displasia/CEC	50%

1.7 E-cadherina

La familia de moléculas de adhesión está compuesta por más de 100 miembros, las cadherinas clásicas se nombraron dependiendo del tejido donde fueron localizadas la cadherina-E (epitelial), la P (placenta) y la N (neural). (Cailliez y cols 2006)

Una molécula de cadherina está formada por tres regiones: la región extracelular que contiene un grupo amino, por lo tanto, también se le conoce como amino-terminal (N-terminal); esta región contiene los sitios que determinan la especificidad de la molécula para unirse a otras moléculas y los encargados de la unión de calcio. Inmediatamente después del N-terminal se encuentra la región transmembranal que atraviesa la membrana celular. En el citoplasma de la célula se ubica la región intracelular o carboxi-terminal (C-terminal), esta región conecta las cadherinas con los filamentos de actina del citoesqueleto, unión que es necesaria para estabilizar la adhesión intercelular dependiente de cadherinas. Una característica importante de las cadherinas es su capacidad para unirse a moléculas de adhesión celular idénticas, que se encuentran en células vecinas, por ejemplo: E- cadherina con E-cadherina, proceso conocido como adhesión homofílica. La existencia de dos tipos de interacciones: lateral o cis y de adhesión o trans, durante la formación de uniones dependientes de cadherina fue uno de los primeros avances en el conocimiento del mecanismo estructural de la adhesión homofílica. Las principales funciones de las cadherinas son: formación de uniones entre células adyacentes, separación histogénica, migración de las células y diferenciación de los tejidos embrionarios; las moléculas de adhesión también tienen un papel importante en el comportamiento maligno de las neoplasias. (Cailliez y cols 2006 Halbleib y cols 2006) Estas proteínas no tienen una misión con consecuencias únicamente mecánicas para la célula, sino que también actúan como mecanotransductores cuando se unen a sus ligandos extracelulares, los dominios citosólicos de las proteínas de adhesión pueden

desencadenar procesos internos que afectan a la fisiología celular. Así, pueden interactuar con ciertas vías de señalización interna, afectar a la movilidad celular, provocar cambios en la expresión de genes, alterar el ciclo celular, e incluso, determinar la supervivencia de la propia célula; así mismo, defectos en la adhesión celular provocan numerosas patologías en los organismos que en algunos casos son letales, la mayoría de las células no se diferencian, proliferan o sobreviven si no están adheridas correctamente a un sustrato, y la metástasis en los procesos cancerosos necesita un cambio previo de adhesión celular. Se produce por tanto un flujo de información desde el exterior celular que se transmite al citoplasma gracias a las proteínas de adhesión, similar al que se da en los receptores clásicos de la membrana plasmática. (Gordon y cols 2006, Wheelock y cols 2006)

La capacidad para el crecimiento sin control, la invasibilidad local y la metástasis se relacionan con la ausencia o la presencia de estas moléculas. Las células tumorales adquieren motilidad al reducir la producción de proteínas de la matriz extracelular, se ha demostrado que la inactivación de la adhesión mediada por la E-cadherina se asocia con una progresión de los tumores, como se ha observado en el cáncer de próstata, mama, cavidad bucal y en la neoplasia de células transicionales de vejiga, también se ha observado que al utilizar anticuerpos anti E-cadherina se induce o se incrementa la capacidad invasora de las células tumorales, mientras que, al transfectar dichas células con el gen de la E-cadherina se pierde el fenotipo agresivo de las neoplasias de vejiga. (Shiozaki y cols 2006, Cohen y cols 2004)

La pérdida o reducción de la adhesión celular mediada por E-cadherina es un paso importante en el desarrollo de la invasión y metástasis en múltiples carcinomas incluidos los carcinomas bucales. Santos-García y cols (2006) investigaron la expresión proteica de alteraciones genéticas que tienen lugar en los estadios iniciales de la

cancerización de la cavidad bucal, estudiaron además la pérdida o reducción de la adhesión celular en desórdenes potencialmente malignos y malignos de la cavidad bucal, encontrando que el 20% de los casos de carcinoma in situ presentaron pérdida de expresión de E-cadheina, mientras que en CEC, el 90% de los casos. Así mismo encontraron diferencias estadísticamente significativas entre un grupo de epitelio normal y carcinoma micro invasor. (Santos-García 2006)

Existen estudios que sugieren que la pérdida o reducción de E-cadherina se incrementa en invasión y metástasis de CEC. (Santos-García 2005)

1.8 Ki-67

Por otra parte la estimación de la capacidad proliferativa de los tumores y de la expresión del fenómeno apoptótico, no se ha resuelto, existe una correlación entre apoptosis y proliferación en tejidos sanos, pero también en tumores. Una mayor tasa de proliferación se ha asociado con peor pronóstico en la mayoría de los tumores. Santos-García y cols (2005) estudiaron la proliferación celular con el marcador Ki-67 y concluyeron que las técnicas de inmunohistoquímica y el estudio molecular de los DPM permiten conocer la expresión proteica de las alteraciones genéticas que pueden ayudar en el diagnóstico y tratamiento tempranos de CEC, teniendo especial relevancia el estudio de Ki-67 en estadios tempranos, puede ser empleado para medir la fracción de crecimiento en los tejidos normales y en las neoplasias malignas. (Santos-García 2005)

Ki-67 es una proteína nuclear con un peso molecular que oscila entre 345 y 395 kilodaltones; es un antígeno que se ve expresado en la fase G1,G2,S, del ciclo celular que se cataboliza al final de la fase M y no se sintetiza en fase GO del ciclo celular, también se considera que forma parte del complejo ciclina D-cdk, donde participa en las fases del ciclo celular identificando las células que están proliferando, siendo los tumores con un alto índice de Ki-67 los que tienen un peor pronóstico. Se ha

comprobado que existe una estrecha relación con el grado histológico del CEC (Gruss 2001)

Estudios previos han demostrado que los altos índices de Ki-67 observados en carcinomas escamocelular bien diferenciado, estaban correlacionados con la severidad de la enfermedad y con un mal pronóstico (González-Moles y cols 2010).

La capa basal del epitelio bucal, es la zona donde, en condiciones normales, se ubica el compartimento celular en proliferación, mientras que la capa suprabasal incluye las zonas de maduración celular. La detección de Ki-67 en la capa suprabasal es un marcador objetivo de la presencia de displasia epitelial. (García y cols 2004, González y cols 2000, Tulumur y cols 2002).

Algunos autores (González Moles 2010) han descrito que las células parabasales pueden ser blanco para los cambios oncogénicos y aumentar la proliferación y diferenciación terminal de las células hasta su transformación maligna. (González Moles 2010)

2. Justificación

El diagnóstico clínico e histológico son considerados el estándar de oro para el diagnóstico temprano de cáncer bucal, sin embargo, ninguno de estos procedimientos pueden predecir que lesiones bucales diagnosticadas como desórdenes potencialmente malignos (DPM) progresarán a cáncer. Por otro lado, debido a que existe evidencia de que algunas de las neoplasias malignas de la mucosa bucal se desarrollan de novo, la identificación de marcadores de malignidad que pudieran contribuir a la caracterización de individuos con mayor riesgo de malignización representará una herramienta útil en la detección temprana y oportuna del cáncer bucal.

A pesar del enorme progreso en el campo de la biología molecular, no existe ningún marcador predictor del potencial de transformación maligna de los DPM de la mucosa bucal.

A través del presente estudio se pretende evaluar si el uso de marcadores moleculares como E-cadherina y Ki-67 son útiles para el pronóstico y progresión de los desórdenes potencialmente malignos.

3. Hipótesis

La expresión de E-cadherina disminuirá progresivamente, desde displasia epitelial leve, displasia epitelial severa, hasta carcinoma escamocelular bien diferenciado.

La expresión de Ki-67 aumentará progresivamente desde displasia leve, severa, hasta carcinoma escamocelular bien diferenciado.

4. Objetivo general

Establecer las diferencias en la expresión E-cadherina y Ki-67 en muestras histológicas de mucosa normal, hiperqueratosis sin displasia epitelial, displasia epitelial leve, displasia epitelial severa y carcinoma escamocelular bien diferenciado.

4.1 Objetivos específicos

- Cuantificar la expresión de E-cadherina en mucosa normal, hiperqueratosis sin displasia, displasia epitelial leve, displasia epitelial severa y carcinoma escamocelular bien diferenciado.
- Cuantificar la expresión de Ki-67 en muestras histológicas de mucosa normal, hiperqueratosis sin displasia, displasia epitelial leve, displasia epitelial severa y carcinoma escamocelular bien diferenciado.

5. Material y métodos

5.1 Tipo de estudio

Estudio transversal, retrolectivo y descriptivo en el que se seleccionaron los bloques correspondientes al periodo de 2005 al 2010 con el diagnóstico histológico de mucosa normal, hiperqueratosis sin displasia epitelial, displasia epitelial leve, severa y carcinoma escamocelular bien diferenciado de la mucosa bucal. Los bloques provenían de casos recibidos en el laboratorio de Patología y Medicina Bucal de la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco (UAM-X) y de un laboratorio de práctica privada.

5.2 Criterios de inclusión

- Bloques de parafina con diagnóstico de hiperqueratosis sin displasia epitelial, displasia epitelial leve, displasia epitelial severa y carcinoma escamocelular provenientes del laboratorio de la Universidad Autónoma Metropolitana y de un centro privado (PERIBAC).
- Cortes histológicos con suficiente tejido para realizar el estudio de inmunohistoquímica.

5.3 Criterios de exclusión

- Cortes histológicos que no tenían suficiente tejido para realizar el estudio de inmunohistoquímica.
- Cortes histológicos que presentaban hifas de *candida albicans*
- Cortes histológicos que hayan sido diagnosticadas como carcinoma escamocelular moderadamente diferenciado o poco diferenciado.

5.4 Estandarización de examinadores

Con el fin de unificar los criterios histológicos tres examinadores (VRA, GAS y ERG) realizaron una revisión de 40 cortes histológicos que previamente habían sido diagnosticados como hiperqueratosis sin displasia, displasia epitelial leve, displasia epitelial severa y carcinoma escamocelular bien diferenciado. Para evaluar los criterios histológicos de displasia epitelial, los examinadores se basaron en los criterios descritos por Warnakulasuriya 2007, (Anexo2) los resultados de los tres examinadores se evaluaron por medio de una prueba de Kappa obteniendo 0.92% entre los tres examinadores.

5.5 Procedimientos de laboratorio

Una vez revisados los cortes histológicos se seleccionaron los bloques para realizar técnicas de inmunohistoquímica. De un total de 67 muestras seleccionadas, 25 correspondieron a displasia epitelial leve, 12 a displasia epitelial severa, 10 a hiperqueratosis y 10 a carcinoma escamocelular. Los casos de mucosa normal se tomaron de muestras diagnosticadas como hiperplasias fibrosas, que no presentaran cambios en el epitelio y que además tenían la misma localización anatómica que las muestras de los diferentes grados de displasia epitelial y carcinomas (Anexo 3).

Se realizaron microarreglos de cada uno de los cortes histológicos que tenían un diámetro mayor de 4 mm. Se tomó una zona representativa del tejido con sacabocados de 2 a 3 µm, se colocaron de 10 a 20 muestras en laminillas con poli-lisina y se fundió la parafina de las muestras en la estufa, por 30 minutos a 60°.

La hidratación comenzó eliminando la parafina en 2 baños de Xilol por 5 y 30 segundos, respectivamente; posteriormente, se realizó la hidratación a partir de alcohol absoluto anhidro, 96, 80, 70, 50% y agua destilada.

Para realizar el desenmascaramiento de epitopes se colocaron las muestras en un vaso de coplin de polpropileno de alta densidad con solución de desenmascaramiento de epitopes (citrato de sodio pH 6) antigen retrieval citra plus 1X BioGenex® (HK080-9K).

Se llevó a cabo un precalentamiento por 5 minutos de la olla express para microondas; posteriormente se colocó el vaso de coplin con las muestras, volviéndose a programar el microondas por 5 minutos, hasta escuchar la salida de presión; se dejó 1 minuto para enfriar a temperatura ambiente; se lavó la muestra con agua destilada con dos baños; luego se incubó la muestra con peróxido de hidrógeno al 0.9% por 5 minutos, se lavó con PBST por 4 minutos, se colocaron 100 µl del anticuerpo primario con una dilución 1:50 (2 µl Ac + 98 µl PBST1X) por 30 minutos a temperatura ambiente, al término de este paso se lavó el anticuerpo con TBS. Posteriormente se colocó citrato para revelar los anticuerpos, se esperó 1 minuto y se observó en el microscopio. Una vez teñidos los tejidos se enjuagaron y se tiñeron con hematoxilina de gill. Finalmente se deshidrataron las muestras y se colocó el cubre-objeto sobre ellas.

5.6 Procedimientos microscópicos

Conteo celular

Para la cuantificación celular de los marcadores E-cadherina y Ki-67 se tomaron fotomicrografías de un campo a 40x y se seleccionó una zona representativa para la cuantificación de la expresión del marcador.

E-cadherina

Se contaron las células expresadas por campo. Se colocó una gradilla con 36 celdillas; posteriormente se realizó el conteo celular, calculando el número de membranas positivas entre el total de células por campo, obteniendo así el porcentaje de expresión del marcador, mediante la siguiente fórmula

$$\frac{\text{N Membranas}}{\text{Total de células}} = \% \text{ de expresión del marcador}$$

Total de células

Ki-67

Se contaron las células expresadas por campo. Se colocó una gradilla con 36 celdillas; posteriormente se realizó el conteo celular, calculando el número de núcleos positivos entre el total de núcleos por campo, obteniendo así el porcentaje de expresión del marcador. Cabe señalar que en este conteo se excluyeron las células inflamatorias y células de tejido conectivo (Bologna y cols 2007). Se utilizó la siguiente fórmula

$$\frac{\text{N núcleos Positivos}}{\text{Total de células}} = \% \text{ de expresión del marcador}$$

Total de células

Intensidad

Para E-cadherina se evaluó la intensidad del marcador por medio de cruces. Se asignó la expresión (+) cuando el marcador fue leve; la expresión (++) al encontrarse más del 50% de expresión, y (+++), al presentar una tinción fuerte y completa de las membranas.

6 Análisis estadístico

Se estimaron los porcentajes de las células positivas para cada caso de E-cadherina y Ki- 67, se generaron medidas de resumen (medias y medianas) y medidas de dispersión (desviación estándar y cuantiles).

Para comparar los porcentajes de la expresión de los marcadores en el conteo celular de los cinco grupos, se realizó un análisis de varianza de rangos a través de la prueba de Kruskal-Wallis. El nivel de significancia estadística fue de α 0.05

Para el análisis entre las diferentes lesiones por pares se utilizó la prueba de Tukey-Kramer. Se calculó la especificidad y la sensibilidad de E-cadherina en los casos de carcinoma escamocelular. El análisis de datos se llevo a cabo mediante el programa estadístico JMP7.0

7. Resultados

Características demográficas y clínicas

Se incluyeron un total de 67 muestras histológicas correspondientes a 39 (58%) mujeres y 28 (42%) hombres, con un promedio de edad de 53.6 ± 5.1 años. De los 67 casos, 10 (14.9%) fueron tejido normal, 10 (14.9%) a hiperqueratosis sin displasia epitelial, 25 (37%) a displasia epitelial leve, 12 (17.9%) a displasia epitelial severa y 10 (14.9%) a carcinoma escamocelular bien diferenciado. En el Cuadro 2, se presentan las características de sexo y edad de los pacientes de los que provenían las muestras. La localización anatómica de los casos de hiperqueratosis fue la siguiente: dorso de lengua 4 (4%), borde lateral de lengua 2 (2%), mucosa yugal, encía, paladar y piso de boca en un caso cada uno (10%), para displasia epitelial leve fue 12 (48%) de dorso de lengua, 10 (40%) en borde lateral de lengua, 2 (8%) de encía y 1 (4%) de proceso alveolar superior. Para displasia epitelial severa los sitios anatómicos fueron dorso de lengua 6 (50%), borde lateral 3 (25%), y un caso mucosa yugal, encía y proceso alveolar (8.3%). Los casos de carcinoma escamocelular correspondieron a borde lateral de lengua 6 (60%), encía en 2 casos (20%) mientras que de mucosa yugal y dorso de lengua solo se presentó un caso para cada uno (10%).

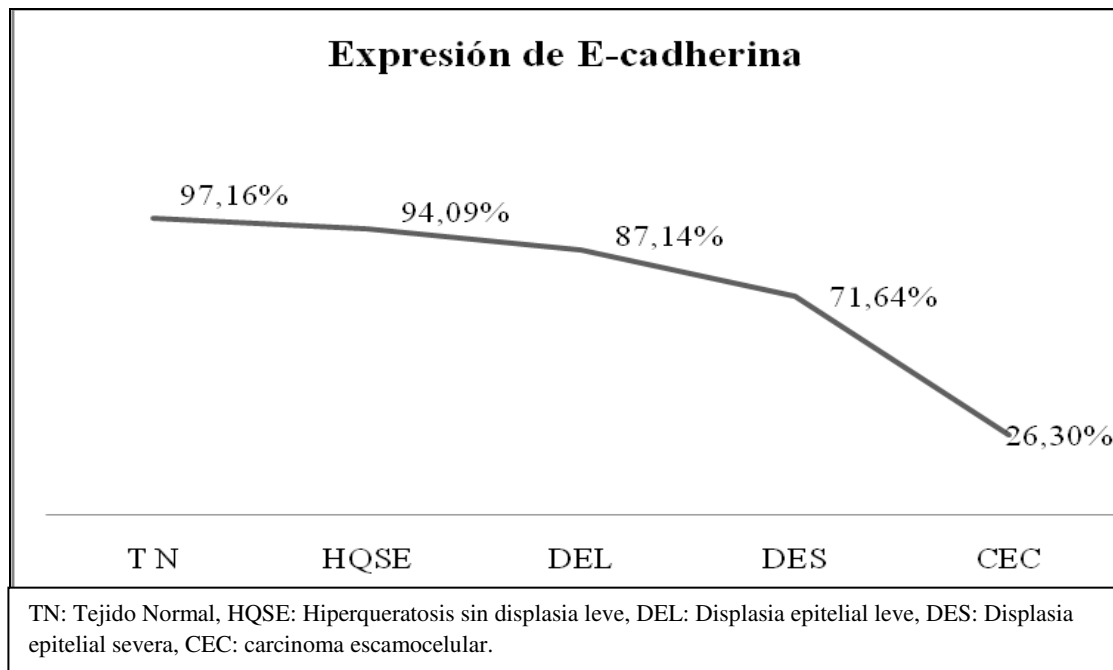
En el Cuadro 3 se describen los diagnósticos clínicos de las lesiones bucales estudiadas. La leucoplasia bucal fue el diagnóstico clínico que se presentó con mayor frecuencia (60%); la mayor parte de estos casos (64.7 %) correspondió a displasia epitelial leve, en contraste con los 12 casos de eritroleucoplasia en los que ocho (66.7 %), presentaron displasia epitelial severa y tres (25%) eran ya carcinoma escamocelular histológicamente.

Expresión de E-cadherina

Conteo celular

Como se describe en el Cuadro 4 y la Gráfica 1, la expresión positiva a E-cadherina disminuyó progresivamente de tejido normal (97.1%, ± 3.4) e hiperqueratosis sin displasia epitelial (94.0%, ± 10.6), a displasia epitelial severa (71.6% ± 22.9) severa y carcinoma escamocelular (26.3% ± 10.1) ($p < 0.0001$). Al contrastar la expresión de E-cadherina entre los diferentes diagnósticos histológicos, únicamente se observó una diferencia significativa al comparar el grupo de tejido normal con el grupo de displasia epitelial leve ($p = 0.0304$) y el grupo de displasia epitelial leve contra el grupo de carcinoma escamocelular ($p = 0.031$)

Gráfica 1. Pérdida de expresión de E-cadherina en muestras de tejido normal, hiperqueratosis sin displasia, displasia epitelial leve, severa y carcinoma escamocelular.



Intensidad de E-cadherina

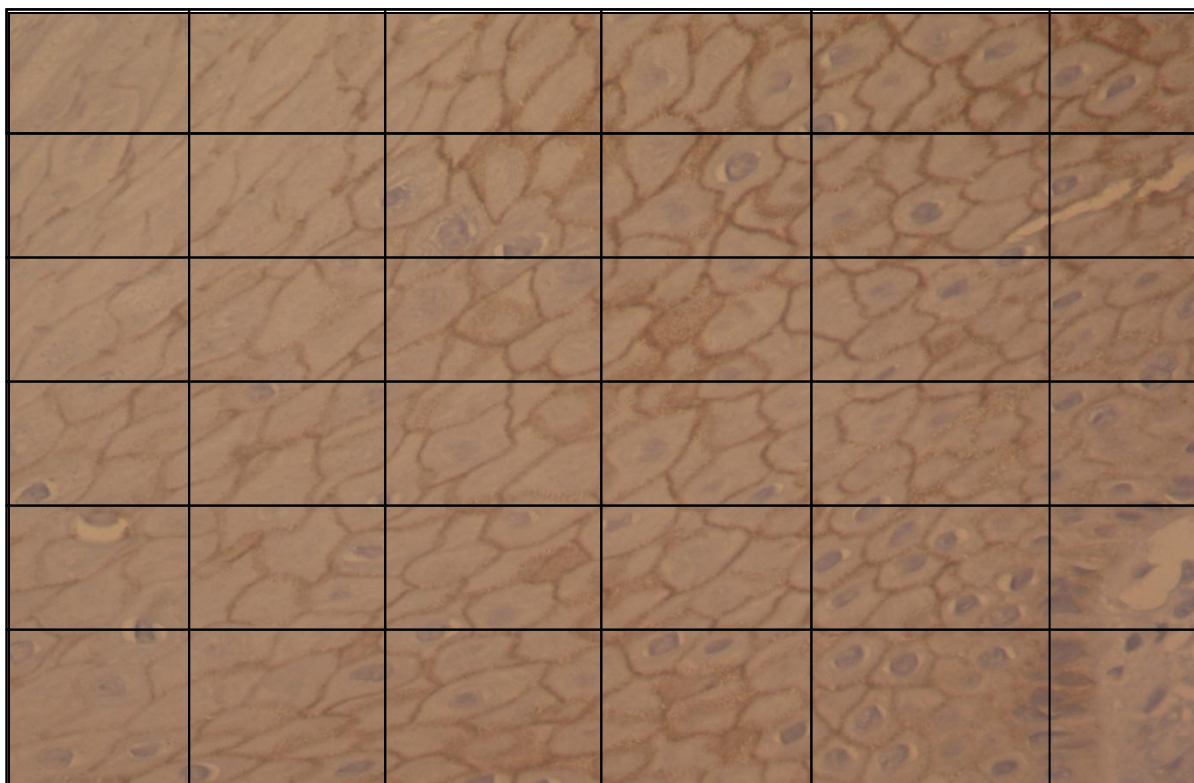
Por otro lado se evaluó la intensidad de E-cadherina por medio de cruces. Se asignó la expresión (+) cuando el marcador fue leve; se asignó como (++) cuando más del 50% de las membranas se encontraba teñida finalmente se asignó (+++), al presentar una tinción fuerte y completa de las membranas. Observándose una disminución gradual de la intensidad del marcador en los casos de carcinomas observamos una intensidad de (+), en displasia epitelial leve y severa (++) y en los casos de hiperqueratosis y tejido normal (+++).

Por otra parte se realizaron tablas de contingencia de dos por dos para determinar la sensibilidad y especificidad de E-cadherina encontrando que es la pérdida de expresión del marcador tiene una sensibilidad del 90% y una especificidad del 91.7% , lo cual indica que es un marcador de utilidad pronóstica para carcinoma escamocelular

Expresión de Ki-67

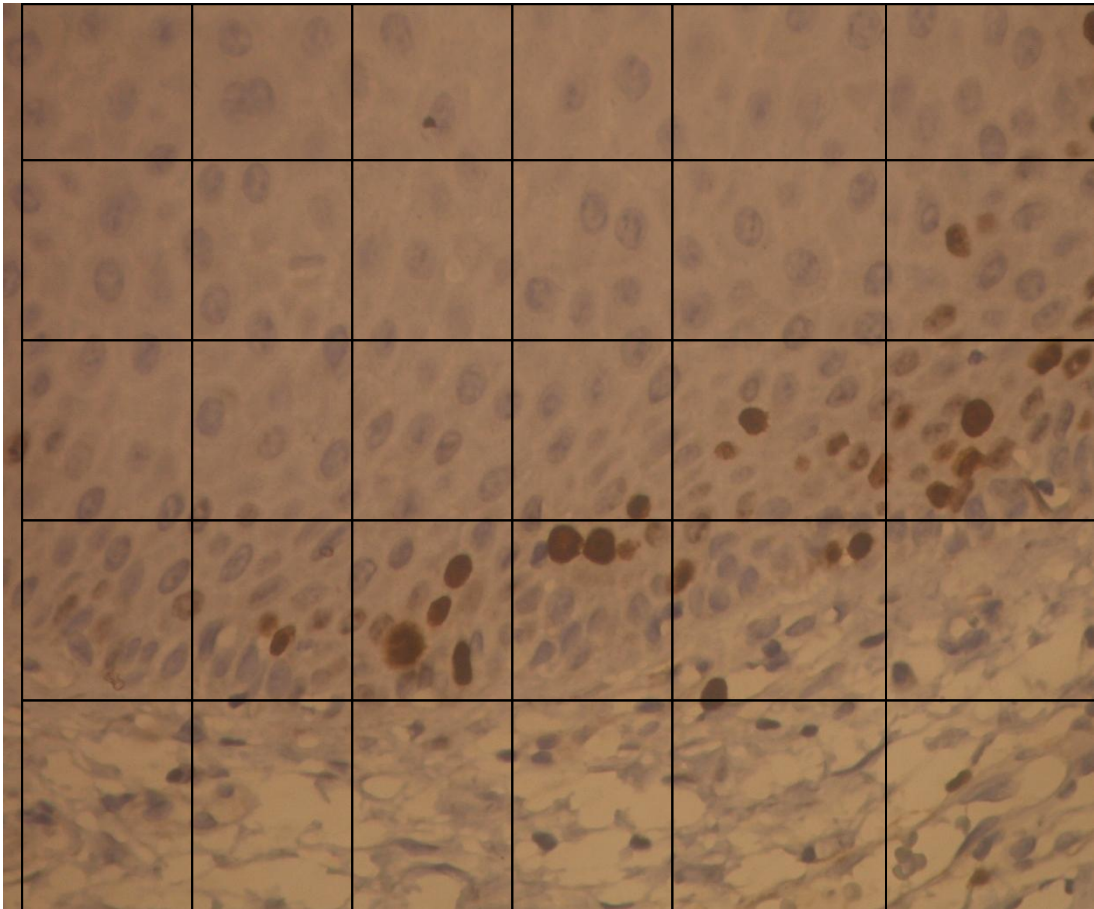
Conteo celular: Como se describe en el Cuadro 5, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de Ki-67 de tejido normal a carcinoma escamocelular ($p = 0.750$), tampoco se encontraron diferencias significativas al comparar los diferentes grupos histopatológicos.

Fig. 1 Expresión de intensidad de E-cadherina



Expresión completa de E-cadherina (+++)

Fig. 2 Expresión de proliferación celular con Ki-67

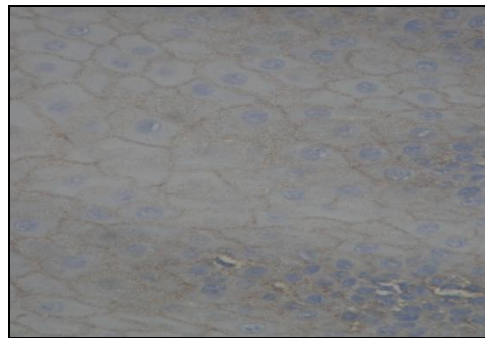


Tinción nuclear del marcador Ki-67

Fig. 3,4 Intensidad de E-cadherina en T normal e hiperqueratosis sin displasia epitelial.

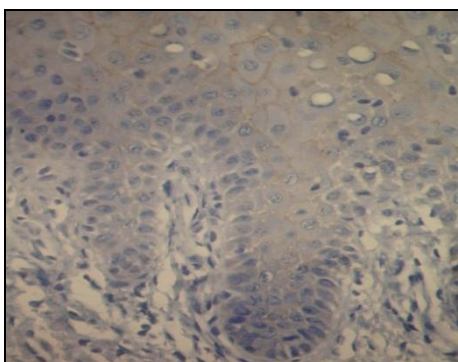


Fotografía 40X Tejido normal

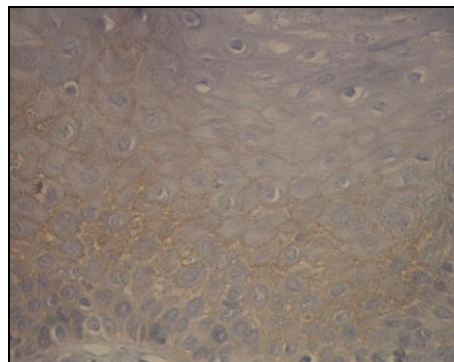


Fotografía 40X Hiperqueratosis sin displasia

Fig 5,6 Intensidad de E-cadherina Displasia epitelial leve y severa

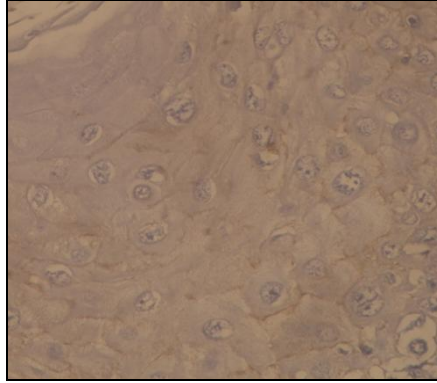


Fotografía 40x Displasia epitelial leve



Fotografía 40x Displasia epitelial severa

Fig.6 Intensidad de E-cadherina en carcinoma escamocelular



Fotografía 40X carcinoma escamocelular

Cuadro 2. Edad y sexo en los 67 individuos de quienes se obtuvieron los especímenes estudiados.

	Sexo				Edad		
	Femenino	(%)	Masculino	(%)	Min- Max	Promedio	DE±
Hiperqueratosis sin displasia	3	(30)	7	(70)	31-61	46.1	± 11.4
Displasia epitelial leve	14	(56)	11	(44)	30-75	52.2	± 12.4
Displasia epitelial severa	6	(50)	6	(50)	30-69	55.3	± 11.1
Carcinoma escamocelular	7	(70)	3	(30)	53-79	59.1	± 12.2

DE: Desviación estándar

Cuadro 3. Diagnóstico clínico e histopatológico de los especímenes estudiados.

Diagnóstico clínico	Diagnóstico histopatológico							
	Hiperqueratosis sin displasia		Displasia leve		Displasia severa		Carcinoma escamocelular	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Leucoplasia (n = 34)	8	(23.5)	22	(64.7)	4	(11.8)	-	
Eritroleucoplasia (n = 12)	-		1	(8.3)	8	(66.7)	3	(25.0)
Líquen plano (n = 4)	2	(50.0)	2	(50.0)	-		-	
Úlcera (n = 3)	-		-		-		3	(100)
Carcinoma escamocelular (n = 4)	-		-		-		4	(100)

Cuadro. 4 Expresión de E-cadherina en tejido normal, hiperqueratosis sin displasia, displasia epitelial leve, severa y carcinoma escamocelular.

Características histológicas	Media	DE	P	P Global
Tejido normal (1)	97.1	3.4		≤0.0001
1 vs. 2			0.5458	
1 vs. 3			0.0304	
1 vs. 4			0.2799	
1 vs. 5			0.9945	
Hiperqueratosis sin displasia (2)	94.0	10.6		
2 vs. 3			0.1415	
2 vs. 4			0.6502	
2 vs. 5			0.5504	
Displasia epitelial leve (3)	87.1	16.5		
3 vs. 4			0.3064	
3 vs. 5			0.0310	
Displasia epitelial severa (4)	71.6	22.9		
4 vs. 5			0.2831	
Carcinoma escamocelular (5)	26.3	10.1		

1: Tejido normal, 2: hiperqueratosis sin displasia epitelial, 3: displasia epitelial leve, 4: displasia epitelial severa, 5: carcinoma escamocelular, vs. = comparación.

Cuadro. 5 Expresión de Ki 67 en tejido normal, hiperqueratosis sin displasia, displasia epitelial leve, severa y carcinoma escamocelular.

Características histológicas	Media	DE	P	P Global
Tejido normal(1)	8.3	5.8		0.7520
1 vs. 2			0.6666	
1 vs. 3			0.7759	
1 vs. 4			0.1037	
1 vs. 5			0.6566	
Hiperqueratosis sin displasia (2)	7.8	5.6		
2 vs. 3			0.6959	
2 vs. 4			0.9537	
2 vs. 5			0.7859	
Displasia epitelial leve (3)	6.0	3.8		
3 vs. 4			0.6.676	
3 vs. 5			0.7859	
Displasia epitelial severa (4)	4.2	4.4		
4 vs. 5			0.10437	
Carcinoma escamocelular (5)	8.7	6.1		

1:Tejido normal, 2:Hiperqueratosis sin displasia epitelial, 3:Displasia epitelial leve, 4:Displasia epitelial severa, 5:Carcinoma escamocelular.

8 Discusión

En el presente estudio se observó una pérdida progresiva en la expresión de E-cadherina de hiperqueratosis sin displasia epitelial (94.09%) hasta carcinoma escamocelular bien diferenciado (26.30%) ($p < 0.001$). Igualmente, al realizar la comparación de los grupos histológicos pudimos observar cambios estadísticamente significativos al contrastar tejido bucal normal contra displasia epitelial leve ($p = 0.0304$) y displasia epitelial leve frente a carcinoma escamocelular ($p = 0.0310$).

Por otra parte, Santos García y cols (2005), encontraron una baja expresión de E-cadherina en los casos de displasia epitelial leve y moderada (20%) y alta en los casos de carcinomas escamocelulares bien diferenciados (90%) ($p < 0.01$).

Adicionalmente, la pérdida de expresión de E-cadherina ha sido reportada en diferentes estudios que han comparado carcinomas escamocelulares vs. tejido normal (Bankavalfi y cols 2002) y carcinomas bien diferenciados contra los pobremente diferenciados (Tapia y cols 2004, Kaur y cols 2010). Tapia y cols 2004 al analizar 50 casos de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, señalan que la expresión de E-cadherina se encuentra reducida en carcinomas poco diferenciados y con metástasis ganglionares. Los autores sugieren que los carcinomas bien diferenciados mantienen la adhesión intercelular, en comparación con los poco diferenciados en los que se pierde completamente esta adhesión y por lo tanto muestran una mayor tendencia invasiva.

En un estudio realizado en 42 cortes histológicos de carcinoma escamocelular se encontró que los carcinomas escamocelulares bien diferenciados expresan E-cadherina de manera similar a lo observado en las membranas de tejido normal, mientras que en los casos de carcinomas poco diferenciados, la tinción se encontraba ausente o en el citoplasma y en los moderadamente diferenciados se observó una tinción heterogénea

en las membranas celulares, observando diferencias estadísticamente significativas al comparar los bien y moderadamente diferenciados contra los pobremente diferenciados ($p = 0.001$ y $p = 0.004$), respectivamente. Los autores sugieren que la pérdida de adhesión celular y de E-cadherina tienen un papel importante en la progresión de los carcinomas, ya que la disminución de su expresión se asocia con de-diferenciación y metástasis.

Adicionalmente, (Wang y cols 2008) describen una pérdida de expresión del 56% de E-cadherina en el frente invasor de los carcinomas escamocelulares, en comparación con el 75% reportado en las áreas centrales del epitelio ($p < 0.05$), sugiriendo que la pérdida de expresión del marcador es un factor predictivo para la progresión de carcinomas y está asociado con la baja sobrevida en pacientes con tumores invasivos.

Otros autores, al comparar la expresión de E-cadherina y P-cadherina en mucosa normal, carcinoma *in situ* y carcinoma escamocelular, no encontraron una relación entre el grado de diferenciación y la pérdida de la expresión del marcador. Sin embargo reportan diferencias estadísticamente significativas entre la expresión de E-cadherina y la recurrencia de la enfermedad ($p = 0.03$). Los autores concluyen que la reducción de E-cadherina está probablemente asociada con la progresión de la enfermedad independientemente del grado histológico y que este marcador puede ser considerado predictor de recurrencia de la enfermedad (Muñoz y cols 2005).

Estudios en líneas celulares de carcinomas de cabeza y cuello, reportan una expresión similar del marcador en carcinomas bien diferenciados y tejido normal, sin embargo, no describen la expresión del marcador en carcinomas pobremente diferenciados ni metástasis, por lo que sugieren que E-cadherina probablemente juega un papel

importante en la diferenciación histológica e invasión de carcinomas de cabeza y cuello. (Schipper y cols 1991)

Una limitante para comparar los hallazgos del presente estudio con otros, es la gran variación en los métodos utilizados para valorar la expresión de E-cadherina. Cabe mencionar que en el presente trabajo la estimación de la expresión del marcador se realizó usando un método cuantitativo en el que se calculó el porcentaje de expresión de las membranas teñidas en cada campo (Bologna y cols 2007).

Algunos autores han utilizado otros métodos en los que la expresión del marcador se estima de acuerdo a la proporción de células positivas y se representa utilizando cruces: 3+ tinción completa de las membranas celulares y más del 50% de células teñidas, 2+ tinción mayor al (10 % y menos del 50% de las células teñidas), 1+ tinción menor de 10% de células teñidas y 0 ausencia del marcador (Santos García y cols 2005).

Por otro lado, algunos trabajos sólo valoran la intensidad del marcador como: 3+ tinción fuerte, 2+ tinción moderada 1+ muy baja tinción y 0 cuando no existe tinción de las membranas (Williams y cols 1998, Kaur y cols 2010). Otros autores (Bankfalvi 2002, Wang 2008) utilizan un método de valoración expresado por letras: a) expresión no detectable o sin membranas teñidas, b) débil expresión detectada en menos del 10% de las células (1+), c) de moderada a fuerte tinción en el 10% hasta el 75% de las membranas (2+) y d) fuerte y homogénea expresión en más del 75% de las membranas celulares (3+). (Bankfalvi y cols 2002 y Wang y cols 2008).

Adicionalmente, se ha descrito un método en el cual se asigna una puntuación que se basa tanto en la intensidad de la tinción de la membrana (0-4) como en el porcentaje de las células teñidas (0-100%), posteriormente los dos componentes son multiplicados obteniéndose una puntuación total, que varía entre cero y 400 y se comparan las medidas de puntuación entre los diferentes grupos. (Tapia y cols 2004)

En el presente estudio, además de la proporción de células positivas, se evaluó la intensidad E-cadherina por medio de cruces; encontrando intensidad leve (+) en los casos de carcinoma escamocelular, moderada (++) en los casos de displasia epitelial severa y fuerte (+++) en los casos de tejido normal, hiperqueratosis sin displasia epitelial y displasia epitelial leve. En contraste, otros han descrito una intensidad fuerte en los casos de displasia epitelial leve y moderada similar al epitelio normal, observándose una reducción en los casos de carcinoma bien y moderadamente diferenciados y una intensidad leve o ausente en los carcinomas pobremente diferenciados (Williams y cols 1998).

Así mismo se realizaron pruebas de sensibilidad (90%) y de especificidad de (91.7%) lo que indica que la pérdida de expresión del marcador E-cadherina es un marcador de gran utilidad para valorar los cambios progresivos de displasia epitelial leve a carcinoma escamocelular.

Si bien en diferentes tipos de cáncer la actividad proliferativa ha demostrado tener un alto significado, los estudios de Ki-67 en cáncer bucal han brindado resultados contradictorios (Pich y cols 2004). Algunos informes han mostrado que Ki-67 tiene un valor pronóstico (Girod y cols 1999, Sittel y cols 1999 Xin Xie y Cols 1999, Pich y cols 2004, Freudisperger y cols 2010), sin embargo otros autores han descrito que su expresión no tiene relevancia predictiva (Pikko y cols 1996, Stoll y cols 1999 Lee y cols 2009, Shah y cols 2009).

Un estudio retrospectivo en el que incluyeron 53 muestras histopatológicas de pacientes con el diagnóstico clínico de leucoplasia bucal, describe el incremento en la expresión de Ki-67 de acuerdo a los grados de alteración histopatológica (Santos García y cols 2004). En el estudio citado se encontraron diferencias significativas al comparar tejido normal contra displasias leves y moderadas ($p < 0.05$), y carcinoma escamocelular

($p < 0.03$), en consecuencia los autores sugieren que Ki-67 es un marcador adecuado de proliferación celular que permite diferenciar los diferentes grados de displasia epitelial. (Santos García y cols 2004).

De igual manera, la expresión de distintos marcadores de inmunohistoquímica (Ki-67, p63, CK19 y p53) se analizó en 62 casos de displasia epitelial, encontrando que los marcadores se ven expresados en las células basales, para basales y supra basales del epitelio (Takeda y cols 2006). La expresión de Ki67 aumentó de acuerdo al grado de displasia epitelial de los casos, reportando diferencias estadísticamente significativas al comparar tejido normal contra displasia severa ($p < 0.01$). La expresión de los marcadores p63, p53 y CK19 si bien se observó en las células basales, no se encontraron diferencias significativas al comparar los distintos grados histológicos de displasia epitelial, por lo que los autores concluyeron que la relación que existe entre los grados de displasia epitelial y la transformación maligna es controversial

Un aumento de expresión de Ki-67 de tejido normal (22.95%) a displasia epitelial leve (45.2%) o carcinomas bien diferenciados de (43.9%) se detalla en un estudio en el que se examinó también otro marcador de proliferación celular (Germinina) y una proteína de replicación del DNA en el ciclo celular (Mcm2), en 134 cortes histológicos de displasia epitelial y carcinomas de cabeza y cuello. Sin embargo, únicamente el análisis simultáneo de Mcm2 y Ki-67 y Germinina y Ki-67 brindaron un resultado estadísticamente significativo ($p = 0.04$, $p = 0.02$, respectivamente). Si bien Mcm2 es considerado como un marcador de proliferación celular superior a Ki-67, se sugiere que los tres marcadores pudieran ser de valor pronóstico en las displasias epiteliales (Torres Rendón y cols 2009).

Por otro lado, se ha sugerido que Ki-67 es un marcador pronóstico para la recurrencia y sobrevida de los pacientes (Montebugnoli y cols 2009). En un estudio prospectivo para valorar la recurrencia en el que se analizó la expresión de Ki-67 en tejido normal distante del carcinoma primario de pacientes tratados quirúrgicamente, los autores reportaron una asociación entre el promedio de expresión de Ki-67 en tejido normal en 11 casos y en 36 carcinomas ($p < 0.01$). En conclusión el estudio mostró que una proliferación epitelial anormal en áreas distantes del tumor primario puede ser un factor pronóstico a largo plazo para el desarrollo de nuevos carcinomas (Montebugnoli 2009).

En cuanto a la expresión de Ki-67, en este estudio no se observaron cambios en la expresión del marcador en los distintos grados histológicos analizados ($p = 0.75$). De manera similar, Xin Xie y Cols 1999 no encuentran diferencias estadísticamente significativas al comparar la expresión de Ki67 y carcinoma escamocelular. Un estudio reciente (Lee y cols 2009) describe la expresión CXCR-4, metaloproteasas y Ki-67 concluyendo que la expresión de los marcadores sirve para valorar la sobrevida pero no la progresión de los carcinomas.

La falta de asociación de la expresión de Ki-67 con el pronóstico de los tumores, se debe en parte a que la expresión de Ki 67, se refleja en el total de las fracciones de células con diferente capacidad de proliferación, tanto las células que en su diferenciación terminal no desarrollan características fenotípicas que empeoran el pronóstico, como el subgrupo de células proliferativas responsables del persistente crecimiento maligno (González Moles y cols 2010). En consecuencia, una gran parte de los estudios considera que Ki-67 no es un marcador de utilidad para valorar la progresión de DPM a carcinomas de la cavidad bucal ya que puede estar presente en varios estratos y con diferentes grados de expresión (González Moles y cols 2010 Takeda y cols 2006, Torres Rendón y cols 2009)

Al igual que con E-cadherina, los métodos para evaluar la proliferación celular no están estandarizados. Algunos autores han utilizado métodos semi cuantitativos para evaluar la expresión de Ki-67, (a) obteniendo el porcentaje de tinción del marcador y así considerando como valor de positividad más del 20% de núcleos teñidos (Santos García y cols 2004, Montebugnoli y cols 2009). (b) utilizando una graticula de 6x6 en la cual cuantifico el número total de células positivas entre el número de núcleos teñidos (Torres Rendón y cols 2010), (c) por medio de cruces dependiendo el porcentaje de expresión, asignando + (1-25%), ++ (26-50%), +++ (51-75%). ++++ (76-100%) (González Moles y cols 2010) (d) utilizando un software en el cual se incluye una fotografía a 150x en el cual se cuantifican los núcleos totales y los núcleos teñidos en un radio de 1mm de la fotografía. Robinson y cols 2007 .En el presente estudio al igual que en un estudio previo (Torres Rendón y cols 2009) utilizamos una graticula de 6x6 en la que se cuantificó el número total de células entre el número de núcleos positivos teñidos obteniendo así el porcentaje de la expresión de Ki-67.

Con la finalidad de unificar los criterios histológicos para evaluar los grados de displasia epitelial (leve, moderada y severa) se llevó a cabo la valoración de 40 laminillas previamente diagnosticadas, con displasia epitelial, de forma ciega por tres examinadores, obteniéndose un coeficiente kappa del 92%, que significa una correlación importante entre los tres observadores

9. Conclusiones

El aspecto clínico e histológico que presentan los desórdenes potencialmente malignos sugiere su capacidad de malignización, sin embargo los datos que aporta el examen clínico y el estudio histopatológico no son totalmente satisfactorios. Es por ello que surge la necesidad de buscar técnicas que sean de utilidad para evaluar la progresión de los desórdenes potencialmente malignos a carcinomas escamocelulares. En nuestro estudio pudimos observar que la pérdida de expresión de E-cadherina juega un papel importante en la progresión de DPM hasta su transformación a carcinoma escamocelular. Por lo que puede ser considerado un marcador de utilidad pronóstica en el desarrollo de cáncer en cavidad bucal. Debido a la gran variedad de métodos usados para evaluar la expresión del marcador se sugiere el uso de un software (soft Imaging System, Germany) para facilitar la cuantificación de las membranas celulares

Nuestros resultados respecto a Ki-67 sugieren que no es un marcador de utilidad para valorar la progresión de DPM a carcinomas de la cavidad bucal. Ya que se expresa en todas las células que se encuentran en etapa proliferativa por lo que es difícil distinguir las células normales y las que presentan cambios displásicos. Por otro lado se ha descrito que Ki-67 es un marcador de utilidad para la progresión de los DPM cuando se ha combinado otros marcadores moleculares. Es por ello que se propone la búsqueda nuevos marcadores de inmunohistoquímica que pueden determinar si existe progresión de DPM a carcinomas de la cavidad bucal y establecer la asociación entre los cambios histológicos y la proliferación celular.

A pesar del enorme progreso en el campo de la biología molecular, en la actualidad no se cuenta con un marcador predictor del potencial de transformación maligna de los DPM de la mucosa bucal. Por lo cual se sugiere que en estudios futuros se realice una

búsqueda de marcadores o la combinación de distintos marcadores, que contribuyan en la detección temprana y oportuna del cáncer bucal.

9. Bibliografía

- 1.-Axell T, Pindborg JJ, Smith CJ, Waal I. International collaborative Group on oral White Lesion Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco-related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala Sweden ,may 18-2 1994. *J Oral Pathol Med* 1996; 25:49-54.
- 2.-Agnes B, Krabort M et al. Deranged expression of the Ecadherin Bcatenin complex and the epidermal growth factor receptor in the clinical evolution and progression of oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 2002; 31: 450-457.
- 3.-Balaram P, Sridhar H, Rajkumar et al. The influence of smoking, drinkinkg, paan chewing and oral higiene. *Int J Cáncer* 2002; 98:440-5.
- 4.-Bologna R, Mosqueda T A. López C E. et al. Syndecan-1 (CD138) and Ki-67 expression different subtypes of ameloblastomas. *J Oral Oncol* 2008: 44; 805– 81.
- 5.-Cailliez F, Lavery R et al Dynamics and stability of E-cadherin dimers. *Biophys Journal*. 2006; 91; 11:3964-71.
- 6.-Califano J, Van der Riet P, Westra W, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field Cancerization. *Cancer Res* 2006: 56; 2488-92.
- 7.-Califano J, Westra WH, Meininger G, et al. Genetic progression and clonal relationship of recurrent premalignant head and neck lesions. *Clin Cancer Res* 2000:6; 347-52.
- 8.-Cohen MB, Griebeling TL, Ahaghotu CA, et al. Cellular adhesion molecules in urologic malignancies. *Am J Clin Pathol* 2004: 107; 56-63.
- 9.-Conway DI, Stockton DL, Warnakulasuriya S, et al. Incidence of oral and oropharyngeal cancer in United Kingdom (1990-1999) Recent trends and regional variations. *Oral oncol*. 2006: 42; 586-592.
- 10.-García-García V, González Moles MA, Bascones Martínez A. Bases moleculares del cáncer oral Revisión Bibliográfica. *Av. odontoestomatolog*. 2005; 21-6:287-95
- 11.-García-García V, Bascones Martínez A. Cáncer oral: Puesta al día. *Avances en Odontoestomatología* 2009; 25 5: 239-248.
- 12.-García P Vallejo M.J. et al. Estudio comparativo de la expresión del Ki-67 en el liquen plano oral y la leucoplasia oral. *Análisis cuantitativo*. *Med Oral* 2001: 6; 364-70.
- 13.-Gayani P, Tilakaratne W, Mahvash T, Warnakulasuriya: Molecular markers in oral epithelial dysplasia. *Journal of Oral Pathology*.2009; 38:737-752.
- 14.-González M.A., Rodríguez A. et al Suprabasal expression of Ki-67 antigen as a marker for the presence and severity of oral epithelial dysplasia. *Head and Neck* 2000; 22: 658-61.

- 15.-González Moles MA, Bravo M, Ruiz A, et al. Ki67 expression in non-tumor epithelium adjacent to oral cáncer as risk marker for multiple oral tumors. *Oral disease* 2010; 16:68-75
- 16.-Gordon MD, Nusse R. et al signalling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *The journal of biological chemistry.* 2006; 281:22429-22433
- 17.-Gruss C, Herlyn M. et al Role of cadherins and matrixins in melanoma. *Curr Opin Oncol* 2001; 13:117-123.
- 18.-Halbleib J. M., y Nelson W et al Cadherins indevelopment: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev.* 2006; 20:23, 3199-214
- 19.-Hirohashi S. Inactivation of E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* 2008; 153:333-339?
- 20.-Kustner CE, Costa IF, Lopèz LJ. Riesgo de cáncer oral y marcadores moleculares. *Med Oral Patol Cir Bucal* 2004; 9:377-84.
- 21.-Massano J, Regateiro F, Januario G, et al Oral Squamous cell carcinoma: Review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102:67-76.
- 22.-McCullough, M Jaber, M Barrett, et al Oral yeast carriage correlates with presence of oral epithelial dysplasia. *Oral Oncol.* 2002 384:391-3.
- 23.-Moon HS, Choi EA, Park HY et al. Expression and tyrosine phosphorylation of E-cadherin, beta and gamma catenin, and epidermal growth factor receptor in cervical cancer cell. *Gynecol Oncol* 2001; 81:355-359.
- 24.-Pande P, Soni S, Kaur J, Agarwal S, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R. Prognóatic factors in betel and tobacco related oral cancer. *Oral Oncol* 2002; 38:491-99.
- 25.-Petti S, Lifestyli J. Risk factors of oral cancer *Oral oncol*2009; 45:340-450.
- 26.-Pitiyage W, Tilakaratne M, Tavassoli M, Warnakulasuriya S Molecular markers in oral epithelial dysplasia: review. 2009 *Journal of oral pathology and Medicine.* 2009; 38: 737–752.
- 27.-Reibel, J Estrella L. et al. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2003; 14(1):47-62.
- 28.-Rosin MP, ChengX, PohC, Lam WL, Huang Y Lovas J. et al. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. *Clinic Cancer Res.* 2000; 6:357-62.
- 29.-Santos A, Hernández MM, Fonseca-Sánchez et al Med Expresión de E-cadherina, laminina y colágeno IV en la evolución de displasia a carcinoma Epidermoide *Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 10: 100-5.

- 30.-Santos A, Fonseca-Sánchez E, Cruz-Hernández et al A. Proteic expression of p53 and cellular proliferation in oral leukoplakias. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005; 10:1-8.
- 31.-Schliephake H. Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer -A review. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; 32:233-45.
- 32.-Scully C Moles D. Oral cáncer in *Encyclopedia of public Health*. Edinburgh, 2008 Elseiver.
- 33.-Smith J, Rattay T, McConkey C et al. Biomarkers in dysplasia of the oral cavity: Asistematic Review. *Oral Oncol*. 2009; 45:647-653
- 34.-Scully C, Bagan JV. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral dis* 2009; 15: 388-399.
- 35.-Scully C, Stefano P: Overview of cancer for the healthcare team: Aetiopathogenesis and early diagnosis. *Oral Oncol*. 2010; 46:402-406.
- 36.-Secretaria de salud, Subsecretaria de prevención y control de enfermedades, Coordinación de Vigilancia Epidemiológica, Dirección general de Epidemiología Registro histopatológico de neoplasias malignas Compendio Morbilidad y mortalidad 2002.
- 37.-Shamma A, Zyada M, Wagnert M, et al The significance of Epstein Barr Virus & DNA topoisomerase II alpha (DNA-Topo II alpha immunoreactivity in normal Oral Mucosa, Oral 30. Epthelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Diagnostic pathology Biomed Central*.2008 3:45.
- 38.-Shiozaki H, Oka H, Inoue M, et al E-cadherina mediated adhesion system in cancer cells. *Cancer* 2006; 77: 1605-1613.
- 39.-Song JI, Grandis JR. Signaling in head and neck cancer. *Oncogen* 2004; 19:2489-95.
- 40.-Supic G, Kozomara R, Mirjana B et al Gene Hypermethylation in tumor tissue of advanced oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol* 2009; 25:1051-1057.
- 41.-Tirado L, Granados M. Epidemiologia y Etiología del cáncer de cabeza y cuello. *Cancerología* 2007; 2:9-17.
- 42.-Torres Rendon A, Roy S, Craig GT, Speight PM. Expression of Mcm2 germinin and,ki67in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasia and their corresponding squamous cell carcinomas. *Br J Cancer* 2009; 100:1128-34
- 43.-Waal Van der I. Axel T. Oral leucoplasia: a proposal for uniform reporting. *Oral Oncol*. 2002; 38:521-526
- 44.-Waal Van der I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa, terminology, classification and present concepts of management. *Oral oncol*. 2009; 45:317-323.

45.-Warnakulasuriya S, Johnson NW, Van der Wall I. et al Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 2007; 36:575–580.

46.-Warnakulasuriya S. Living with Oral Cáncer: Epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. *Oral Oncol.* 2010; 46:407-410.

47.-Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, et al Cadherin Switching. *Journal of cell Sciences.* 2008. 121:727-735.

48.-Williams HK, Sanders DS, Jankowki JA, Landini G, Brown AM. Expression of cadherins and catenins in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1998; 27:308-17

9. ANEXOS

Anexo 1 Cronograma

ACTIVIDADES	EN	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGOS	SEPT	OCT	NOV	DIC
Elaboración y presentación del protocolo	X	X	X									
Revisión, discusión y aprobación del protocolo	X	X	X									
Selección y recolección de muestras			X	X								
Calibración de los examinadores			X	X	x							
Aplicación de pruebas de Inmunohistoquímica						x						
Toma de fotografía de IHQ							X					
Cuantificación y recopilación de los resultados obtenidos								X	X			
Análisis de los resultados								X	X			
Elaboración y presentación de los resultados									X			
Informe final										X	X	x
Inicio de la elaboración de la publicación										x	X	X

Anexo 2 Criterios histológicos Warnakulasuriya

Criterios histológicos	Displasia leve	Displasia moderada	Displasia severa
cambios arquitecturales	Procesos epiteliales alterados en 1/3 bajo	Procesos epiteliales anchos tercio /medio del epitelio se encuentra dañado	Procesos epiteliales en forma bulosa, 3/3 del epitelio se encuentran dañados
Cambios celulares	Mínima atipia celular	Moderada atipia celular	Marcada atipia celular
Variación del tamaño del núcleo (anisonucleosis)	no	si	si
Hipercromatismo	no	si	si
Anisocitosis/pleomorfismo	si	si	si
Perdida relación núcleo citoplasma	si	si	si
Aumento de número mitosis	no	si	si
Mitosis aberrantes	no	si	si
Multinucleación	no	si	si

Anexo 3 Cuadros de localización anatómica de Micro arreglos de tejido normal, hiperqueratosis displasia leve, severa

TABLA MICRO ARREGLOS T.NORMAL , HIPERQUERATOSIS

A	B	C	D	E
M.Y	V.L	D.L	M.Y	M.Y
D.L	D.L	B.L	B.L	D.L
B.L	D.L	P.L	D.L	ENCIA
MY.	M.Y	D.L	B.L	P.A
D.L	D.L	D.L	D.L	D.L

TABLA MICRO ARREGLOS D.L

A	B	C	D	E
B.L	B.L	B.L	D.L	S.V .I
M.Y.I	D.L	B.L	B.L	B.L
M.Y.I	D.L	D.L	D.L	B.L
ENCIA	ENCIA	D.L	B.L	B.L
B.L	B.L	D.L	B.L	B.L

TABLA MICRO ARREGLOS D.S

A	B	C	D	E
B.L	D.L	D.L	D.L	D.L
ENCIA	M.Y	B.L	B.L	D.L
B.L	D.L			

Anexo 3 Cuadros Conteo celular E-cadherina y Ki 67 de tejido normal, hiperqueratosis displasia leve, severa y carcinoma escamocelular.

Cuadro 1. Conteo celular E cadherina y ki 67 Tejido Normal

E- CADHERINA		KI67					
CASO	INTEN	C .TOTAL	POS	%	C.TOTAL	POS	%
1	3	244	235	(96)	268	52	(19)
2	3	209	192	(91)	291	34	(8)
3	3	215	196	(91)	357	17	(4)
4	3	161	161	(100)	304	51	(16)
5	3	265	256	(96)	398	41	(10)
6	3	210	210	(100)	256	28	(11)
7	3	232	22	(95)	129	4	(3)
8	3	192	192	(100)	171	2	(1)
9	3	245	245	(100)	197	9	(4)
10	3	274	274	(100)	247	18	(7)
Total				774			161
Promedio				96.4			8.3
Min max				91-100			1.19

Cuadro 2. Conteo celular E cadherina y ki 67 Hiperqueratosis sin displasia							
E- CADHERINA					KI67		
CASO	INTEN	C .TOTAL	C.POS	%	C.TOTAL	C.POS	%
1	3	331	243	(73)	146	20	(13)
2	3	285	285	(100)	308	44	(14)
3	3	267	255	(95)	345	53	(15)
4	3	271	263	(97)	295	10	(3)
5	3	232	232	(100)	256	11	(4)
6	3	267	200	(74)	203	4	(1)
7	3	211	211	(100)	396	59	(14)
8	3	222	222	(100)	276	22	(7)
9	3	185	185	(100)	214	14	(6)
10	3	265	265	(100)	161	3	(1)
Total				939			78
Promedio				94.1			7.8
Min Max				73-100			1-15

Cuadro 3. Conteo celular E cadherina y ki 67 Displasia epitelial Leve							
CASO	E- cadherina				Ki67		
	Intensidad	C .total	Pos	(%)	C.total	Pos	(%)
1	3	350	295	(84)	338	6	(1)
2	3	260	231	(88)	299	33	(11)
3	3	325	314	(96)	269	35	(13)
4	3	298	244	(81)	304	44	(14)
5	3	362	235	(64)	222	8	(3)
6	3	245	219	(89)	189	19	(10)
7	3	212	193	(91)	195	12	(6)
8	3	210	203	(96)	216	19	(8)
9	3	196	171	(87)	135	4	(2)
10	3	171	159	(92)	246	25	(10)
11	3	329	305	(92)	267	13	(4)
12	3	288	266	(90)	206	18	(8)
13	2	196	181	(92)	249	11	(4)
14	3	292	241	(82)	179	1	(5)
15	3	197	183	(92)	270	13	(4)
16	3	282	247	(87)	339	8	(2)
17	3	227	213	(93)	221	11	(4)
18	3	284	262	(92)	253	26	(10)
19	3	890	140	(15)	231	13	(5)
20	2	279	279	(100)	217	3	(1)
21	3	742	718	(96)	210	9	(4)
22	3	240	210	(87)	351	36	(10)
23	3	780	750	(96)	198	12	(6)
24	3	259	218	(84)	230	8	(3)
25	3	216	211	(97)	661	17	(2)
Total				2256			138
Promedio				87.1			6
Min- Max				15.100			1-14

Cuadro 4. Conteo celular E cadherina y ki 67 Displasia epitelial Severa							
E- cadherina					Ki67		
CASO	Intensidad	C .total	Pos	(%)	C. total	Pos	%
1	3	197	177	(89)	253	7	(2)
2	3	255	219	(85)	525	49	(9)
3	2	176	143	(81)	315	19	(6)
4	2	327	261	(79)	534	87	(16)
5	1	252	199	(78)	244	9	(3)
6	1	321	-	-	166	3	(1)
7	0	269	181	(67)	209	7	(3)
8	1	320	177	(53)	261	10	(3)
9	2	411	251	(61)	244	5	(2)
10	1	437	331	(75)	255	3	(1)
11	1	334	216	(64)	305	5	(1)
12	1	242	135	(55)	293	9	(3)
Total				787			50
Promedio				71.2			4.2
Min - Max				0-89			1-16

Cuadro 5. Conteo celular E cadherina y ki 67 C.E.C

Cuadro 5. Conteo celular E cadherina y ki 67 C.E.C								
E- cadherina					Ki67			
CASO	Intensidad	C .total	Pos	(%)	C. total	Pos	(%)	
1	1	325	74	(22)	251	60	(23)	
2	2	209	58	(27)	244	36	(16)	
3	2	220	40	(18)	277	21	(7)	
4	0	204	30	(14)	270	17	(6)	
5	2	154	48	(31)	283	31	(10)	
6	3	231	105	(45)	200	4	(5)	
7	1	383	67	(17)	267	15	(5)	
8	1	125	20	(16)	283	13	(5)	
9	2	105	35	(33)	167	8	(4)	
10	0	235	85	(36)	149	9	(6)	
Total				259			87	
Promedio				26.3			8.7	
Min-Max				14-45			4-231	