

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA III (MEDICINA Y
CIRUGÍA BUCO-FACIAL)**



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LOS REGULADORES DEL CICLO CELULAR
ASOCIADOS AL DESARROLLO DE CANCER ORAL EN UNA
MUESTRA DE LA PROVINCIA DE ÁLAVA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

José Carlos Rodríguez Gutiérrez

Directores:

**Antonio Bascones Martínez
Miguel Angel González Moles
José Antonio Gil Montoya**

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-7731-4

© José Carlos Rodríguez Gutiérrez, 2010



**ESTUDIO DE LOS REGULADORES DEL CICLO CELULAR
ASOCIADOS AL DESARROLLO DE CANCER ORAL EN UNA
MUESTRA DE LA PROVINCIA DE ÁLAVA**

TESIS DOCTORAL

José Carlos Rodríguez Gutiérrez

Madrid, 2010

Directores:

Dr. Antonio Bascones Martínez

Dr. Miguel Ángel González Moles

Dr. José Antonio Gil Montoya

AGRADECIMIENTOS

La elaboración y finalización de la presente tesis no habría sido posible sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que a continuación se citan.

Primero y antes que nada, mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis, el Dr. Antonio Bascones Martínez, el Dr. Miguel Ángel González Moles y el Dr. José Antonio Gil Montoya, a quienes debo la realización del doctorado en unas Universidades tan prestigiosas como son la Universidad Complutense de Madrid y la Universidad de Granada. Gracias por sus sugerencias e ideas, y por el tiempo que me han dado.

A Yudi, de la Universidad de Granada, por su colaboración brindada sobre todo en la fase de la técnica inmunohistoquímica.

Un agradecimiento especial a Rosa María, Esmeralda y Pepi por su colaboración en la elaboración de la presente tesis.

A Vanessa, que me ha brindado siempre una sonrisa.

Todo esto nunca hubiera sido posible sin el amparo incondicional de mi familia, mi madre María José y mi hermano Enrique, y en especial a mi padre Enrique y a mi hermano Joaquín.

Esta tesis es también vuestro premio.

ÍNDICE

1. Introducción	5
1.1. Generalidades sobre el cáncer oral	6
1.2. Clasificación	7
1.3. Epidemiología	11
1.4. Etiología	13
1.5. Lesiones precancerosas	22
1.5.1. Concepto y clasificación	22
1.5.2. Etiología	28
1.5.3. Tratamiento	28
1.6. Diagnóstico precoz, quimioprevención y tratamiento	30
1.6.1. Diagnóstico precoz	30
1.6.2. Quimioprevención	37
1.6.3. Tratamiento	38
1.7. Características fisiopatológicas del cáncer oral	45
1.8. Aspectos moleculares del cáncer oral	55
1.8.1. El ciclo celular	55
1.8.1.1. Fases del ciclo celular	55
1.8.1.2. Control del ciclo celular	62

1.8.2. Cancerización de campo -----	67
1.8.3. Alteraciones genéticas del cáncer oral -----	70
1.8.4. Marcadores pronóstico de cáncer oral -----	81
1.8.4.1. Expresión tumoral -----	82
1.8.4.2. Metástasis-----	83
1.8.4.3. Marcadores -----	83
2. Hipótesis -----	92
3. Objetivos -----	94
4. Pacientes, material y métodos -----	96
5. Resultados-----	106
5.1. Estadística descriptiva -----	107
5.2. Análisis estadístico -----	111
5.3. Iconografía -----	125
5.3.1. Expresión de la proteína p53 -----	126
5.3.2. Expresión de la proteína caspasa 3 -----	128
5.3.3. Expresión de la proteína Bcl-2 -----	131
5.3.4. Expresión de la proteína Ki-67 -----	133
6. Discusión -----	135
7. Conclusiones -----	146
8. Bibliografía -----	149
9. Anexo -----	169

1.-INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades sobre el cáncer oral

Bajo el término de cáncer se engloban lesiones de muy diversa naturaleza que pueden originarse en cualquier tipo celular del organismo. Cada uno de ellos posee un comportamiento y una respuesta distinta a los tratamientos.

La mayoría de los cánceres se incluyen en uno de los tres siguientes grupos: Carcinomas, sarcomas, linfomas y leucemias. Los carcinomas son el 90% de los cánceres humanos y su origen está en las células epiteliales. Las leucemias y los linfomas suponen el 8% y se desarrollan a partir de las células germinales sanguíneas y del sistema inmune respectivamente, siendo los sarcomas tumores sólidos del tejido conectivo. Aunque hay descritos más de cien tipos de neoplasias, sólo unos pocos se dan con cierta frecuencia. Trece localizaciones constituyen el 85% de la incidencia total de la enfermedad, de ellas las más comunes son próstata, mama, pulmón y colon. El carcinoma de pulmón es, con mucho, el más letal, siendo responsable del 30% de las muertes por cáncer.

La Clasificación Internacional de Enfermedades de la Organización Mundial de la Salud (OMS) define el cáncer oral como la neoplasia originada en los labios, cavidad oral, orofaringe, nasofaringe e hipofaringe.

El cáncer es el resultado de fallos “fundamentales” en los mecanismos de control celular. Las células neoplásicas se dividen de manera incontrolada, pueden extenderse al resto del organismo e interfieren en las funciones de los tejidos normales donde asientan.

Los conocimientos sobre esta enfermedad a nivel celular y molecular, distan mucho de ser completos, sin embargo sabemos que existe un número cada vez mayor de moléculas implicadas en su desarrollo. Muchos de estos elementos se han visto que son proteínas clave en la regulación del ciclo celular y en la muerte programada o apoptosis.

1.2 Clasificación del cáncer oral.

Existen varios tipos de carcinomas en la cavidad oral:

- El carcinoma de células escamosas: es la entidad maligna que se presenta con mayor frecuencia en la región orofacial (alrededor del 90%), y aunque la incidencia es menor que en otros cánceres humanos, su importancia radica en su mortalidad y las secuelas físicas y psicológicas que origina ^(1, 2). Los carcinomas orales de células escamosas (COCE) pueden ser invasivos o no. Se usa el término carcinoma *in situ* para los COCE no invasivos. Desde el punto de vista histológico, los carcinomas invasivos pueden estar bien diferenciados, moderadamente diferenciados, poco diferenciados o indiferenciados.

- Carcinoma verrucoso: representa entre el 2 – 12% de los carcinomas orales. Es un tumor epitelial exofítico, bien diferenciado, de evolución muy lenta, con gran crecimiento papilar y solo invasivo en fases tardías.
- Otros tumores malignos derivados del epitelio: carcinoma de células fusiformes y melanomas.
- Tumores malignos derivados del tejido conectivo: fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, liposarcoma, angiosarcoma, neurosarcoma, rabdomiosarcoma y leiomiosarcoma.
- Metástasis en las partes blandas de la cavidad oral: las metástasis son muy poco frecuentes en la mucosa oral, ya que del total de las neoplasias del organismo sólo un 1% metastatizan en la cavidad oral. Los tumores primarios suelen estar localizados en pulmón, riñón e hígado.

Existe una clasificación anatomoclínica según el criterio del American Joint Comité on Cáncer (AJCC) del año 1997 y de la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) del año 1997, la cual se representa en la siguientes tablas (tablas 1 y 2):

Tabla 1: Clasificación TNM y Estadaje	
Tumor primario (T)	
TX	Sin información sobre el tumor primario.
T0	Sin evidencia del tumor primario.
TIS	Carcinoma in situ.
T1	Tumor de menos de 2 cm. de diámetro.
T2	Tumor entre 2 y 4 cm. de diámetro.
T3	Tumor de más de 4 cm. de diámetro.
T4	Tumor de más de 4 cm. de diámetro que invade estructuras adyacentes: huso cortical, nervio alveolar inferior, suelo de la boca o piel, músculo pterigoideos, base de la lengua o piel.
Nódulos linfáticos regionales (N)	
NX	No se dispone de condiciones mínimas para evaluar los ganglios linfáticos regionales.
N0	Sin nódulos clínicamente positivos.
N1	Un nódulo clínicamente positivo, homolateral y de menos de 3 cm. de diámetro
N2a	Un nódulo clínicamente positivo, homolateral de entre 3 y 6 cm. de diámetro
N2b	Múltiples nódulos homolaterales clínicamente positivos, ninguno mayor de 6 cm. de diámetro
N3a	Nódulos positivos homolaterales.
N3b	Nódulos positivos clínicamente bilaterales.
N3c	Nódulos positivos clínicamente contralaterales
Metástasis a distancia (M)	
MX	Metástasis a distancia no fueron valoradas
M0	Sin evidencia de metástasis a distancia
M1	Con metástasis a distancia
Estadio / TNM	
I	T1N0M0
II	T2N0M0
III	T3N0M0 T1, T2 o T3 N1M0
IV	Cualquier T4 Cualquier N2oN3 Cualquier M1

GX	No se puede establecer el grado de diferenciación.
G1	Bien diferenciado.
G2	Moderadamente diferenciado.
G3	Pobrementemente diferenciado.
G4	Indiferenciado.

En cuanto a su localización, la Clasificación Internacional de Enfermedades, en su Segunda Adaptación a la Odontología divide el cáncer oral en:

- 140 Tumor maligno de labios.
- 141 Tumor maligno de la lengua.
- 142 Tumor maligno de glándulas salivares mayores.
- 143 Tumor maligno de encía y reborde alveolar desdentado.
- 144 Tumor maligno de suelo de la boca.
- 145 Tumor maligno de otras partes y de las no específicas de la boca, entre las que se incluyen mucosa del carrillo, vestíbulo bucal, paladar duro o blando, úvula y área retromolar.
- 146 Tumor maligno de la bucofaringe.
- 147 Tumor maligno de la nasofaringe.
- 148 Tumor maligno de la laringofaringe.
- 149 Tumor maligno de otros sitios y de los mal definidos de los labios, cavidad bucal y faringe.

Para la Escuela Europea de Oncología se ha de separar tanto el cáncer de labio (140) como los de glándulas salivales (142) y los de faringe (146 al 148), ya que su epidemiología es diferente. Este grupo limita el cáncer oral a cáncer de lengua (141) y cáncer de la cavidad bucal (143 al 145 de la Clasificación Internacional de Enfermedades, en su Segunda Adaptación a la Odontología ^(3,4).

1.3 Epidemiología

El carcinoma epidermoide oral (COCE) se considera el quinto cáncer en frecuencia para el hombre y el séptimo para las mujeres a nivel mundial, pero presenta unas cifras variables en el mundo, siendo su prevalencia en Estados Unidos, Europa y Australia del 2 - 4% de todos los tumores malignos, mientras que en el sur de Asia llega hasta el 30% ⁽⁵⁾.

En España presenta un porcentaje entre el 3 y el 5% de todos los tumores malignos, pero la tendencia es al alza. Las cifras son en general superiores a la media europea, sobre todo en lo referente al cáncer de lengua y boca, no así en el de orofaringe que es menos relevante en nuestro país. Dentro de España se observan diferencias importantes entre provincias con una frecuencia mayor en el norte que en el sur, siendo el País Vasco y Asturias las comunidades que presentan las cifras más elevadas.

En el País Vasco el cáncer oral representa una neoplasia frecuente, mostrando una tasa bruta de 13,24 casos por 100.000 habitantes que es, junto con la zona de Calvados en Francia de las más altas de Europa ⁽⁴⁾. La incidencia acumulada de 0 a 74 años (por 100) del cáncer de lengua es 0,54 para los hombres y 0,04 para las mujeres, la del cáncer de boca es 0,59 para los hombres y 0,06 para las mujeres.

La zona de máxima incidencia son los labios, seguidos por la lengua y el suelo de la boca. Sin embargo, si excluimos los labios, la lengua es el lugar más frecuentemente afectado (25,1%), seguida a continuación por el suelo de la boca (10,2%) ⁽⁶⁾.

En función de la localización, podemos precisar algunos detalles epidemiológicos:

▪ ***Tumores Labiales***

Los tumores labiales son más frecuentes en los individuos de raza blanca que en los de raza negra. En cuanto al sexo, su aparición es mucho más frecuente en los hombres que en las mujeres, con una relación 30/ 1. La edad media de aparición se sitúa entre los 60 y los 65 años de edad. Estos tumores se localizan preferentemente en el labio inferior (85%) y en más raras ocasiones en el labio superior (5%), se trata de carcinomas de epitelio plano estratificado, aunque en el labio superior predominan los basaliomas.

▪ ***Tumores de la cavidad oral propiamente dicha y la lengua móvil***

Su aparición es mucho, más frecuente en los hombres que en las mujeres, con una relación de 7/3, aunque depende de diversos factores. La edad media de aparición se sitúa entre los 50 y los 60 años de edad, y en el 85% de los casos se combina el consumo elevado de tabaco y de alcohol. En el 95% de los casos se trata de carcinomas epidermoides bien diferenciados de aspecto ulcerado e infiltrante, y en cuanto a su localización, el 75% se sitúa entre el suelo de la boca y el borde lateral de la lengua.

Es un hecho comprobado que la incidencia de los tumores de la cavidad oral aumenta con la edad, el 95% de los tumores aparecen en pacientes mayores de 40 años de edad y la media de edad de presentación es la de 60 años. Seguramente sucede que a mayor edad se produce un mayor tiempo de exposición a los diferentes agentes etiológicos, por lo que termina produciéndose una patología tumoral. No obstante existe

actualmente una tendencia a aumentar la incidencia de estos tumores en los pacientes jóvenes, observándose que en el 8% de los casos se trata de pacientes menores de 40 años de edad ⁽⁷⁻¹⁰⁾.

En cuanto al sexo, este juega un papel importante en la incidencia del cáncer oral, de modo que ésta es mucho mayor en los hombres (80,7%) que en las mujeres (19,3%). Así, los tumores de la cavidad oral suponen el 4% de todos los cánceres en el hombre y solo el 2% de los tumores en la mujer ⁽⁹⁻¹²⁾.

1.4 Etiología del cáncer oral

La etiología del cáncer oral es desconocida. Se han identificado varios agentes que tienen una asociación con el desarrollo del cáncer oral, bien por medio de un efecto directo sobre la mucosa o bien haciéndola más sensible a virus oncogénicos u otros agentes carcinogénicos. Parece que los factores externos y los internos o intrínsecos se combinan de manera que magnifican su potencial para provocar un cambio inicial irreversible (iniciación) que únicamente da lugar a un tumor cuando se estimula la división celular. Entre los distintos factores etiológicos se encuentran:

- Tabaco
- Alcohol
- Factores genéticos
- Agentes infecciosos
- Radiaciones
- Lesiones cancerizables
- Nutrición
- Factores orales
- Factores ocupacionales

▪ **Tabaco**

La relación entre el tabaco y cáncer oral, está firmemente establecida. Existe la duda en cuanto al efecto físico del calor añadido al efecto químico del tabaco, el principal, ya que es el factor etiológico más importante. La mayor evidencia se ha observado en diferentes estudios realizados en la India y Sri Lanka (13-16). Un fumador de 20 cigarrillos tiene un riesgo 6 veces mayor que un no fumador. Así mismo, el riesgo de desarrollar un segundo cáncer primario se eleva del 6% en los no fumadores al 40% en los que continúan fumando. El cese en el consumo de tabaco disminuye drásticamente el riesgo de padecer cáncer, aunque tienen que transcurrir al menos 10 años desde el cese de este hábito para que la disminución sea apreciable.

La forma de consumir el tabaco también es importante en relación con la localización de la lesión. De este modo el fumar con la candela para dentro es responsable de la aparición de carcinomas palatinos.

Se ha señalado que el riesgo de padecer cáncer oral es superior en los fumadores de cigarrillos puros que en los de pipa y cigarrillos. También se ha demostrado que los cigarrillos hechos a mano tienen mayor riesgo de producir cáncer orofaríngeo que los convencionales (17).

En cuanto a dosis el efecto del tabaco es dosis-dependiente en relación al tiempo y a la cantidad fumada (18-20).

No está claro cuáles de los numerosos componentes del humo del tabaco son carcinogénicos para el tejido oral. Los productos de combustión del tabaco son los implicados en el humo de tabaco inhalado. Se han aislado nitrosaminas específicas del tabaco en productos tabáquicos sin humo (para masticar). Algunas de estas sustancias, tales como la N-nitrosornicotina y la 4-metilnitrosamino-1-3-piridil-1-butanona, se encuentran con niveles muy elevados. Son potentes carcinógenos animales y se ha comprobado que su implantación oral experimental va seguida de un aumento del riesgo de cáncer de cavidad oral ⁽²¹⁾.

- ***Alcohol***

El consumo excesivo de cualquier tipo de alcohol juega un papel muy importante en la carcinogénesis oral, dependiendo de la dosis consumida y jugando un papel independiente. En regiones donde se consumen grandes cantidades de alcohol (Francia, Calvados, Bajo Rin) se observa una mayor incidencia de cáncer oral. Es importante señalar que el actual incremento en el número de casos de cáncer oral en los países occidentales puede deberse al aumento en el consumo de alcohol. Los sujetos fumadores y no bebedores tienen de 2 a 4 veces menos riesgo de padecer cáncer oral comparado con aquellos que son fumadores y bebedores. El riesgo entre los fumadores que además eran fuertemente bebedores es de 6 a 15 veces mayor que los que eran abstemios ⁽²²⁻²⁵⁾.

La combinación alcohol-tabaco tiene un efecto multiplicativo para el cáncer orofaríngeo y está fuertemente asociado al cáncer de suelo de boca y de la lengua. No existen evidencias claras de que un tipo concreto de bebida alcohólica represente

mayor riesgo cancerígeno que otro. Se ha señalado que la acción carcinógena del alcohol es apreciable a partir de un consumo diario superior a 45ml.

La utilización mantenida de colutorios orales con alcohol y otras sustancias potencialmente carcinogénicas como los emolientes y colorantes, se ha implicado en la carcinogénesis oral. No obstante, aunque todavía no se ha establecido una relación verdadera causa-efecto, estos productos deben emplearse con precaución y con sus indicaciones terapéuticas precisas ⁽²⁶⁾.

Las personas que consumen alcohol suelen cursar con déficit de vitamina B por malabsorción y malnutrición habitual en los alcohólicos, lo que hace a la mucosa oral más susceptible a la agresión. Los cirróticos tienen mayor frecuencia de cáncer oral que la población normal. El etanol no es un carcinógeno a nivel experimental animal y no se sabe cuál es el mecanismo por el que favorece la carcinogénesis oral. Bajo sospecha se encuentran diferentes posibilidades. Una de ellas es la malnutrición (una interacción con carencias de ciertos nutrientes), dado que el efecto del alcohol es mayor en las personas malnutridas que en las que tienen un nivel nutricional adecuado. Las bebidas también pueden estar contaminadas con sustancias carcinogénicas (nitrosaminas, hidrocarburos) que sean las responsables. El alcohol induce la activación enzimática mediada por el citocromo P450, que puede afectar a la activación metabólica de ciertos carcinógenos. De manera similar, el daño hepático provocado por el alcohol puede reducir la detoxificación de carcinógenos y así aumentar la exposición celular a ellos.

Resulta interesante señalar que la tasa de cáncer oral en Francia disminuyó durante la segunda guerra mundial en la que hubo un descenso en el consumo de alcohol, a pesar de que no hubo cambio en el tabaquismo.

También se ha relacionado al alcohol en la penetración en la mucosa oral de productos carcinogénicos procedentes del tabaco, de tal forma que se puede observar que el alcohol produce una permeabilización local de estos tejidos permitiendo así la penetración de productos carcinogénicos a través de la mucosa oral.

- ***Factores genéticos***

Dada la importancia de este tema para la elaboración de esta tesis doctoral este apartado será desarrollado con mayor profundidad en el punto 1.7.3. de la introducción (Alteraciones genéticas del cáncer oral).

- ***Agentes infecciosos***

Se han sugerido varios tipos de infecciones como agentes etiológicos potenciales del cáncer oral, principalmente la sífilis y la candidosis crónica ⁽²⁷⁾, así como el papilomavirus ^(28, 29) y el virus de Epstein-Barr ⁽³⁰⁾.

Se conoce la asociación entre la infección por *Candida*, lesiones precancerosas y la alta tasa de transformación maligna de estas lesiones. La *Candida albicans* es capaz de producir metabolitos carcinogénicos y podría transferir oncogenes a los queratinocitos.

Se conoce desde hace muchos años la existencia de cáncer oral en pacientes con sífilis. No obstante en la actualidad ha perdido valor como enfermedad que predispone al cáncer oral ya que se ven en pocas formas evolucionadas. Actualmente se considera que la única relación existente es entre la glositis atrófica de la sífilis terciaria y el carcinoma de lengua, quizás debido a la mayor sensibilidad a los carcinogénicos del epitelio atrófico.

No existen evidencias concretas de la relación entre el virus del herpes simple y el cáncer oral ⁽³¹⁾.

▪ *Alteraciones inmunológicas*

Se cree que el sistema inmunitario podría tener un papel en reconocer a los tumores y reaccionar contra ellos, Teóricamente las reacciones inmunes pudieran ser importantes en cuanto a impedir la aparición inicial de los tumores (idea de la inmunovigilancia), o bien intervenir tras su comienzo con limitación en su desarrollo.

El concepto de inmunovigilancia, sugería que un papel destacado de la inmunidad mediada por las células T, es el de eliminar las células tumorales a medida que surgen, y que ello ocurre debido a que son reconocidas como extrañas. Varios hechos parecen apoyar la existencia de la inmunovigilancia, por ejemplo, la frecuencia de aparición de los tumores malignos, que es máxima en la niñez y en la ancianidad, épocas en las cuales el sistema inmunitario no alcanza su máximo funcionalismo. Los programas de trasplantes y el uso consiguiente de fármacos inmunosupresores, demostró que la incidencia de los procesos malignos, aunque limitada a unos pocos tipos de tumores, era

más alta en los pacientes inmunodeprimidos. Plenamente relacionada con el concepto de inmunovigilancia está la hipótesis de que las células malignas expresan nuevos antígenos (antígenos tumorales).

El fenómeno por el cual la tumoración con capacidad inmunogénica elude la respuesta inmunitaria se denomina escape inmunológico.

Algunos de estos factores que favorecen el escape inmunológico son:

- a) Modulación antigénica: Los antígenos de superficie en presencia de anticuerpos son modulados y eliminados dificultando el reconocimiento de la célula como tumoral.
- b) Factores bloqueantes: Consisten en antígenos solubles circulantes que bloquean los receptores de las células T.
- c) Tolerancia previa a los antígenos tumorales.

Los pacientes con SIDA presentan mayor tendencia a desarrollar cáncer de labio, linfoma no Hodking y sarcoma de Kaposi, este último con notable tendencia a afectar a la mucosa palatina.

▪ **Radiaciones**

La radiación actínica, sobre todo en la longitud de onda de los ultravioletas B (290-320 nm), pueden provocar queilitis exfoliativa o queratosis solar, sobre todo del labio superior. Ambos procesos son cancerizables en alto grado. De hecho, la mayoría de los cánceres de labio se originan sobre queilitis actínicas ⁽³²⁾.

La radiación ionizante puede provocar alteraciones en la cavidad oral de carácter degenerativo como el "nódulo residual de las radiaciones" que puede ser asiento de un cáncer oral. Hasta en el 15% de los cánceres parotídeos puede existir el antecedente de una exposición previa a radiografías diagnósticas.

El intervalo entre la radiación y la subsecuente aparición de una neoplasia maligna puede ser muy largo, y se han informado tumores que aparecen en campos irradiados con latencias de hasta 40 años.

La dosis de fraccionamiento, tasa de administración y distribución (campo) son factores que contribuyen a sus efectos carcinógenos.

- ***Lesiones cancerizables***

El concepto, clasificación, etiología y tratamiento de las lesiones precancerosas se desarrollan en el apartado 1.5. de la introducción (Lesiones precancerosas).

- ***Nutrición***

Es importante el efecto de la dieta en la etiología del cáncer oral. Se ha demostrado un mayor riesgo en personas que consumen ciertas gramíneas o nuez de areca, o tienen una dieta con alto contenido en grasas. Los estados de desnutrición favorecen la oncogénesis bucal y las complicaciones postoperatorias. Se ha sugerido que una dieta pobre en vitamina A y/o vitamina C se asocia a un riesgo mayor para el cáncer oral. Los cromatos, el arsénico, el cadmio y el zinc parecen tener efectos

carcinogénicos, mientras que el selenio, el cobre y el níquel parecen tener efectos protectores. Al déficit de hierro se le ha atribuido un aumento de la susceptibilidad para el cáncer del tracto aerodigestivo superior. El síndrome de Plummer-Vinson que se asocia a déficit de hierro y se presenta en mujeres nórdicas, se relaciona con una mayor incidencia de carcinomas de la mucosa oral, faríngea y esofágica. Una nutrición más equilibrada ha disminuido la incidencia de este síndrome entre las mujeres suecas en los últimos años (33-36).

También se ha señalado el posible papel en el cáncer oral, de los carcinógenos de los alimentos o de sustancias relacionadas como: nitrosaminas, hidrocarburos aromáticos, aflatoxinas, etc., o contaminantes como: asbestos, DDT, etc.

▪ *Factores orales*

Se ha relacionado al cáncer oral con la presencia de una higiene oral deficiente, prótesis mal ajustadas, y restauraciones o dientes con bordes afilados. De hecho, es difícil encontrar pacientes con cáncer oral y una dentición bien preservada. Se ha observado un incremento significativo del riesgo de cáncer oral entre los pacientes con estado dental precario. La irritación crónica favorece la acción de los carcinógenos orales y por tanto implica un riesgo más alto de desarrollar cáncer en los estados dentales deficientes. Se ha comprobado que una "condición dental pobre" con mala higiene oral y pérdida de dientes es un marcador de riesgo para el cáncer oral, de tal modo que la pérdida sin reemplazo de 11 dientes o más se asocia a un riesgo cuádruple. La tríada pérdida dentaria-alcohol-tabaco supone un potente marcador de riesgo para el cáncer oral (37-38).

▪ **Factores ocupacionales**

Se han descrito ciertos factores de riesgo ocupacionales en el desarrollo del cáncer oral, con mayor riesgo en los albañiles (cemento), en los trabajadores metalúrgicos (níquel), textiles (amianto, lana y algodón), plomeros, baristas, de prensa gráfica o relacionados con el gas mostaza, ácido sulfúrico.

También se relaciona el cáncer de labio (sobre todo inferior) con la actividad al aire libre en relación con la exposición solar (labradores o pescadores).

1.5 Lesiones precancerosas en la cavidad oral

1.5.1 Concepto y clasificación.

La OMS define **lesión precancerosa** como un tejido morfológicamente alterado en el que el cáncer oral puede aparecer más fácilmente que en el tejido equivalente de apariencia normal ⁽³⁹⁾.

Una **condición precancerosa** es un estado generalizado del organismo asociado con un incremento significativo del riesgo de desarrollo de cáncer oral ⁽³⁹⁾.

Ambos conceptos implican que en una zona concreta de la mucosa oral es estadísticamente más probable el desarrollo de un cáncer aunque este no sea el final obligado de todas las lesiones o estados precancerosos.

Lesiones precancerosas ⁽⁴⁰⁾

- Clasificación clínica
 - Leucoplasia
 - Eritroplasia
 - Queilitis actínica
 - Queratosis del paladar asociada a fumar invertido

- Clasificación histológica
 - Displasia epitelial
 - Carcinoma in situ

Condiciones precancerosas ⁽⁴⁰⁾

- Disfagia sideropénica
- Liquen plano
- Fibrosis oral submucosa
- Sífilis
- Lupus eritematoso discoide
- Xeroderma pigmentosum
- Epidermolisis bullosa
- Inmunodeficiencia
- Disqueratosis congénita
- Otros (ej. Consumo de marihuana)

La importancia de determinar la existencia de displasia epitelial en el precáncer oral, radica en que se trata de un indicador fundamental para determinar el potencial de malignización de una lesión. La displasia epitelial se concibe como la frontera entre epitelio normal y uno tumoral. No obstante, no es una lesión estática, sino dinámica y progresiva ⁽⁴¹⁾.

Atendiendo a la localización, cantidad e intensidad de las alteraciones observadas en la displasia epitelial, clásicamente, podemos distinguir tres grados:

- a) **Displasia leve.** Las alteraciones epiteliales se producen únicamente en el tercio basal del espesor del epitelio (hilera basal e hileras parabasales).
- b) **Displasia moderada.** Los cambios afectan a los dos tercios inferiores del epitelio oral. Hay presencia de entre dos y cuatro rasgos displásicos.
- c) **Displasia severa o grave.** Los cambios afectan a más de dos tercios del espesor del epitelio, sin llegar a afectarlo por completo. Se pueden afectar más de cinco rasgos displásicos.

Una displasia leve posee un bajo riesgo de progresión a cáncer invasivo, mientras que una displasia moderada a severa resulta en un alto riesgo de progresión cancerosa, planteándose un tratamiento más agresivo. El riesgo de progresión maligna de la displasia oscila entre un 10% y un 14%⁽⁴²⁾.

Cuando la afectación del espesor epitelial es completa, los cambios histológicos ya no son considerados como displasia severa, sino como carcinoma in situ, término que hace referencia a la presencia de un carcinoma intraepitelial que, al menos en apariencia, no ha roto la membrana basal y por tanto no ha penetrado en el corion vascularizado subyacente, por lo que aún no posee capacidad invasora ni metastásica. En ocasiones, es muy difícil discernir entre una displasia y un carcinoma in situ y la experiencia del patólogo va a ser la que determine el diagnóstico final en cada caso⁽⁴¹⁾.

A pesar de que la relación entre la displasia epitelial oral y el desarrollo de un carcinoma continúa siendo sólo parcialmente conocida, se reconoce que el grado de displasia es directamente proporcional al potencial de malignización de una lesión y que las zonas del epitelio con mayor proporción de células atípicas, tienen un mayor riesgo de desarrollar un carcinoma ⁽⁴¹⁾.

Es muy importante señalar que la determinación del grado de displasia de una lesión, debe realizarse siempre en las zonas de la lesión que presentan cambios más severos y que la ausencia de displasia epitelial no implica carencia total de riesgo de transformación maligna en el precáncer oral⁽⁴¹⁾.

El diagnóstico de la presencia o ausencia de displasia epitelial y su gradación van a ser fundamentales e imprescindibles para la elección del tratamiento más adecuado y para establecer el pronóstico de cada lesión⁽⁴¹⁾.

Las lesiones premalignas tienen el potencial de progresar a carcinoma epidermoide invasivo, y estas han sido descritas clínica y patológicamente. La leucoplasia y eritoplasia están profusamente descritas clínicamente y no siempre se corresponden directamente con entidades patológicas específicas.

La leucoplasia se define clínicamente como una placa blanca queratótica que no puede ser eliminada mediante la manipulación manual. Aunque la leucoplasia no se relaciona con la presencia o ausencia de displasia, la leucoplasia oral es el

precursor más común del cáncer en la cavidad oral, y del 14% al 18% de estas lesiones progresan a carcinoma invasivo^(43,44). La leucoplasia es particularmente prevalente entre los fumadores en cualquiera de sus formas.

Histológicamente, la leucoplasia oral puede tener hiperqueratosis (engrosamiento del estrato córneo), paraqueratosis (incremento en el número de células nucleadas cerca de la superficie) o acantosis (alargamiento de los 'rete pegs' en la submucosa). La leucoplasia premaligna oral muestra orientación y proliferación celular anormal. Estas lesiones son tratadas con escisión quirúrgica. La dificultad en la escisión de estas lesiones deriva de su naturaleza multifocal y difusa, por lo que se está introduciendo la técnica de vaporización con láser de estas lesiones (siempre con estudio histopatológico previo) con resultados alentadores.

La eritoplasia es un término usado para describir las lesiones de la mucosa oral que aparecen como rojas. Son placas aterciopeladas que no pueden ser descritas clínica o patológicamente como alguna otra condición predeterminada. Estas lesiones se asocian con mayor riesgo de desarrollo de cáncer que las de leucoplasia⁽⁴⁵⁾.

El liquen plano (LP) es otra condición premaligna mucocutánea que puede derivarse dentro de la cavidad oral. El LP es de causa desconocida, todo se inicia a nivel de las células basales epiteliales, para posteriormente provocar una reacción inflamatoria autolesiva a partir de la respuesta linfocitaria del tipo OKT4. Se habla de ciertos factores genéticos implicados, así

como agentes desencadenantes de las lesiones. También se ha señalado la frecuente asociación del LP con otras enfermedades como son la miastenia gravis, colitis ulcerosa, timoma, síndrome de Sjögren, enfermedades hepáticas crónicas y con la hepatitis vírica C. Existen diferentes clasificaciones del liquen plano, pero se pueden resumir en dos; lesiones reticulares que aparecen como un conjunto de líneas blanquecinas ligeramente sobreelevadas y las lesiones atrófico-erosivas, que las observamos como depilaciones linguales donde han desaparecido en el dorso lingual gran parte de las papilas, dando una apariencia de superficie lisa y eritematosa. Además de la lengua, las zonas atróficas erosivas podemos apreciarlas en cualquier otra zona, siendo especialmente representativas las que aparecen en encías en formas de gingivitis descamativas crónicas. También podemos encontrar una combinación de ambas lesiones. La localización más frecuente es la mucosa yugal y tras ella están la lengua, labios, encías, paladar y suelo de la boca. Las lesiones de mucosa yugal suelen aparecer en los tercios posteriores, y habitualmente son bilaterales y simétricas. El estudio histopatológico muestra degeneración hidrópica de la capa basal, e infiltración en banda subepitelial de linfocitos T. La terapéutica más aplicada es a base de corticoesteroides⁽⁴⁶⁾.

La progresión a carcinoma epidermoide del LPO es baja (4%). Los líquenes atróficos y erosivos de localización lingual son particularmente susceptibles a la degeneración maligna.

1.5.2 Etiología

Aunque parece claro (como se ha comentado en el apartado 1.4. de la introducción) que el tabaco y la ingesta excesiva de alcohol son los principales factores de riesgo, sin embargo se plantea la posibilidad de que los factores nutricionales sean también un factor etiológico. De hecho, el alcohol y el tabaco tienen implicaciones importantes en el estado nutricional del paciente generando malnutrición, aumento de radicales libres (alteraciones en el fenotipo y genotipo, desde mutaciones hasta neoplasias) e inmunosupresión. Un estado nutricional adecuado (vitaminas A, E, C y beta-carotenos) y un sistema inmune competente tienen una actividad fundamental contra el desarrollo de neoplasias ⁽⁴⁷⁻⁵⁵⁾.

1.5.3 Tratamiento

Ante toda lesión precancerosa es preciso eliminar o controlar todos aquellos factores de riesgo, tales como el tabaco, alcohol y traumatismos, que han provocado su aparición y que probablemente desencadenarían su transformación maligna. En segundo lugar, se realizará un tratamiento individualizado que dependerá en esencia del resultado del estudio histopatológico de la lesión.

Ante la ausencia de displasia, displasia leve o displasia moderada, se recomienda revisar al paciente cada 3-6 meses y realizar una nueva biopsia ante alteraciones clínicas (engrosamiento, vascularización anómala, enrojecimiento, ulceración, crecimiento, etc.).

En los casos de displasia severa, la actitud deber ser intervencionista. Los métodos fundamentales de terapia activa son la extirpación quirúrgica, la terapia citotóxica tópica con bleomicina, la terapia sistémica con retinoides, la criocirugía y la laserterapia ⁽⁵⁶⁾.

La quimioprevención (sobre todo en el tratamiento de las leucoplasias), fundamentalmente con agentes antioxidantes (vitamina A -retinoides-, vitamina E -atocoferol-, vitamina C y beta-carotenos), neutralizan los radicales libres, interfieren en la activación de procarcinógenos, previene la unión de carcinógenos al ADN, inhiben aberraciones cromosómicas, reducen la replicación celular e incluso pueden producir regresión de lesiones premalignas (leucoplasias o eritroplasias). Incrementos en la dieta de vitaminas (A y B2) y minerales (Zn) producen una protección, o incluso una regresión, de lesiones precancerosas. En lo que a los beta-carotenos y vitamina E (respuesta demostrada clínica e histológica en leucoplasias) se refiere, parece más lógico emplear éstos que los retinoides, ya que, aunque ambos han demostrado utilidad en estas lesiones, los retinoides tienen una toxicidad demasiado alta y los beta-carotenos y la vitamina E son escasamente tóxicos. Por el contrario, otros agentes quimioterápicos se han mostrado poco útiles o incluso con cierto potencial carcinogénico (Cisplatino + 5-fluorouracilo) ⁽⁵⁷⁾.

Todos los pacientes deben ser revisados durante largos periodos de su vida, cada 6 meses, especialmente si no se consiguen controlar los factores de riesgo.

1.6 Diagnóstico precoz, quimioprevención y tratamiento del cáncer oral

1.6.1 Diagnóstico precoz

La realización de una completa y detallada historia clínica es un apartado fundamental para el diagnóstico de los tumores de la cavidad oral. Es importante analizar los antecedentes familiares y personales. También hay que hacer especial mención a la investigación de todos aquellos hábitos tóxicos cancerígenos los cuales han sido expuestos en el epígrafe previo (1.4.) de etiología de los tumores de la cavidad oral.

▪ *Sintomatología*

Existen una serie de síntomas y signos fundamentales, que orientan hacia la existencia de un tumor de la cavidad oral. Habrá que contemplar la existencia o ausencia de:

- Disfagia, o trastorno o dificultad para la deglución.
- Odinofagia, o dolor a la deglución, u otro tipo de algias de la cavidad oral irradiadas al oído o al cuello.
- Sensación de globo y de quemazón lingual.
- Espujo hemorrágico u otras secreciones sanguinolentas.
- Expectoración purulenta y fiebre.
- Halitosis característica o "fedor ex ore".
- Alteraciones de la secreción salivar.
- Alteraciones del sentido del gusto.
- Insuficiencia respiratoria a través de la cavidad oral.
- Alteración del lenguaje.
- Tumefacción o edema de la cabeza y del cuello, con afectación o no de los ganglios linfáticos de la boca, submaxilares y del ángulo de la mandíbula.

- Trismo o dificultad para la apertura bucal.
- Pérdida de peso y de apetito, que parece que está asociada significativamente con la existencia de un tumor de la cavidad oral.

En relación con estos signos y síntomas hay que determinar el momento de su aparición, el tiempo de evolución, su asociación o no con otros procesos, y su comportamiento hacia la progresión o curación.

▪ ***Inspección***

Se trata de una región anatómica de fácil acceso a la inspección visual convencional, será de gran ayuda el uso de un espejo así como el manejo de uno o dos depresores. Hay que conseguir una correcta inspección de:

- La localización, movilidad, simetría y presencia o no de tumoraciones de la piel y la mucosa de los labios.
- La disposición, movilidad y función de la mandíbula y de la articulación temporomandibular.
- La forma y movilidad de la lengua, así como su superficie, consistencia y función verbal.
- El estado de la mucosa de la cavidad oral y de la cara interna de las mejillas, examinando su coloración, estado de humedad, presencia de exudados, úlceras o tumoraciones y alteraciones de la sensibilidad.
- El estado de los surcos gingivolabiales superior e inferior, suelo de la boca y carúnculas salivares u otros orificios de drenaje de los conductos excretores de las diferentes glándulas salivares.

- El estado del velo del paladar, óseo y blando, sus deformidades y asimetrías.

Por otra parte, la inspección microscópica de las tumoraciones de la cavidad oral también es interesante, especialmente cuando se trata de lesiones todavía pequeñas, de modo que su observación a mayor aumento nos permita orientarnos sobre cuál puede ser su posible etiología tumoral.

- ***Palpación***

Todas las lesiones sospechosas de la lengua y de la cavidad oral deben palparse siempre. La palpación puede ser uni o bimanual, puede realizarse con uno o con más dedos, siendo aconsejable el empleo de guantes. Hay que observar la existencia de induraciones, infiltraciones y ulceraciones. Es importante valorar mediante la palpación el tamaño aproximado de estas lesiones, su superficie ulcerada o protuyente, y la intensidad del dolor que se provoca a la presión. La maniobra debe realizarse lentamente, con suavidad y delicadeza. Normalmente, la mayoría de los pacientes la toleran sin dificultad aunque puede ser necesario el empleo de anestesia local mediante aerosoles, aplicación tópica o infiltrado si se precisa.

Por otra parte, también es preceptiva la palpación de todos los ganglios linfáticos de la cabeza y del cuello.

- ***Exploración Radiológica***

La radiografía simple es de escasa utilidad en el diagnóstico de los tumores de la cavidad oral.

El estudio radiológico mediante TAC y RMN, con o sin contraste, se considera imprescindible para evaluar la infiltración en profundidad del tumor, incluida la posible invasión de la mandíbula, maxilar, músculos intrínsecos de la lengua o paladar duro. Así mismo, el TAC y la RMN nos permitirán valorar la extensión extranodal de las metástasis cervicales, que puedan infiltrar la vena yugular interna, las arterias carótidas, los pares craneales IX, X y XI o los nervios simpáticos cervicales, así como los músculos latero y prevertebrales o la columna vertebral. A este respecto, la ultrasonografía también se debe emplear para valorar la posible infiltración del eje carotídeo por las metástasis ganglionares cervicales.

Recientemente, se está empleando la tomografía mediante emisión de positrones (PET) para la detección del tumor primario y de sus recurrencias locales o regionales, y para la valoración de la respuesta a la radioterapia o la quimioterapia, en algunos casos de pacientes con tumores de cabeza y cuello. La PET utiliza un análogo de la glucosa radioactiva, como es el 2 (F-18) fluoro-2deoxi-D-glucosa, que determina imágenes funcionales de la forma de glucosa y de fosforilación. Esta sustancia radiactiva se fija en altas concentraciones en ciertos tumores malignos, pero no lo hace en los tejidos normales. Se ha comprobado que la PET tiene una sensibilidad equivalente con el TAC más RMN (87%

versus 88%), y una especificidad superior (80% versus 50%), en detección de los carcinomas primarios o de las recurrencias. En la localización de las metástasis a distancia tiene una sensibilidad del 90% y una especificidad del 94%.

También se ha utilizado la radioinmunoescintigrafía (RIS) que es otra técnica que también estudia la capacitación de isótopos radioactivos (Tc-99mE48) por los tejidos neoplásicos.

La exploración radiológica en sujetos con riesgo de presentar carcinomas múltiples de las vías aerodigestivas, se recomienda el estudio mediante la fluorescencia espectroscópica. Se trata de una técnica no invasiva, dado que se basa en la energía fotónica generada por una onda excitadora capaz de activar dentro de la célula unas moléculas llamadas fluoróforos (fenilalanina, lipofucsina, triptófano, etc.) que emitirán, a su vez, otra energía luminosa de distinta longitud de onda. Esta se ha empleado en el estudio de lesiones orales utilizando un espectro de emisión de 300 y 340 nm de excitación. El gran inconveniente de esta técnica es que la señal luminosa no penetra con suficiente profundidad, con lo cual solamente analiza la capa más superficial de las lesiones.

Finalmente, en el caso específico de algunos tumores glandulares y vasculares de la cavidad oral estará indicada la práctica de Gammagrafías o Arteriografías ^(58,59).

- ***Importancia del diagnóstico precoz***

Si se observa la tasa de supervivencia del CECO, esta es baja. Se puede hablar de que aproximadamente el 50% de los diagnosticados de cáncer oral fallecen en los 5 primeros años (1, 60-62).

Se aprecia por tanto que la mortalidad es alta, pero cuando se detecta precozmente hay mayor probabilidad de supervivencia que en otros cánceres. Existe una relación inversamente proporcional entre el estadio en el momento del diagnóstico y la supervivencia, siendo la clasificación TNM (tabla 1, pag.7) uno de los indicadores más precisos cuando se pretende analizar la supervivencia prevista a estos pacientes. Así si se diagnostica en el estadio I, la supervivencia es del 86,01%, mientras que en el estadio IV esta disminuye hasta el 38,47% (1, 2, 62-66).

Las causas de demora en el diagnóstico pueden atribuirse a diversos factores:

Los pacientes pueden ignorar la presencia de la lesión, ya que, en muchos casos, es asintomática en sus periodos iniciales. Por lo tanto, si no se realizan controles de rutina la enfermedad seguirá avanzando. Speight observó que más del 50% de la población mayor de 45 años no visita regularmente al odontólogo (67). Otras veces, el paciente es consciente de la lesión, pero se automedica o niega su existencia por temor a que le confirmen su sospecha. En otros casos el desconocimiento de la existencia de servicios especializados de Medicina Oral hacen que los pacientes

pasen por distintos profesionales tales como: otorrinolaringólogos, médicos de cabecera, dermatólogos, etc. Sólo un 35% de los pacientes consultan en un primer momento a su dentista y en el momento del diagnóstico 2/3 de los pacientes presentan metástasis a distancia.

En lo que al profesional se refiere, puede ser que en la rutina del ejercicio de otra especialidad, no inspeccione las mucosas, o minimice la gravedad de las lesiones que considera sin riesgo. Puede ser también que la falta de experiencia en el diagnóstico de este tipo de lesiones suponga un retraso en la derivación del caso al especialista y conlleve una pérdida de tiempo valioso en el tratamiento inmediato de estos pacientes empeorando así el pronóstico de la enfermedad ^(68,69).

En España existen más de 22.000 dentistas, los cuales constituyen la primera línea de defensa en el diagnóstico precoz del cáncer oral. Pero para poder llevar a cabo un trabajo eficaz, deben tener una mínima formación en patología de la mucosa oral, conocer las manifestaciones del cáncer oral, principalmente en sus fases iniciales y practicar de forma rutinaria una exploración completa de la cavidad oral y del cuello. Si esto se complementa con campañas de educación a la población, encaminadas a lograr la autoexploración oral y a acudir a un dentista ante el menor signo de alarma, se habrá generado un cambio radical en el panorama del cáncer oral en España.

Por último es importante recordar que según la Asociación Americana del Cáncer, se debe practicar una exploración para descartar la presencia de un cáncer oral en personas de 21 a 39 años, y anualmente para los pacientes de más de 40 años.

1.6.2 Quimioprevención

Actualmente se considera a la carcinogénesis como un proceso que recorre diversas fases, sobre las cuales también inciden múltiples causas. Podemos dividir la carcinogénesis en tres etapas:

- 1) Inicial, que está definida por los cambios genéticos.
- 2) de promoción, que implica la existencia de lesiones premalignas.
- 3) de progresión, en la cual existe ya una transformación maligna que evoluciona inexorablemente hacia la muerte del huésped.

La quimioprevención, la terapia génica y la antiangiogénesis tratan de bloquear la evolución de los fenómenos carcinogénicos en las distintas etapas de progresión hacia la malignización. Las dos primeras tratan de mantener el ciclo biológico celular normal. La antiangiogénesis, en cambio es una terapia que se instaura en una fase avanzada del tumor.

Ciertos compuestos derivados de plantas, así como algunas vitaminas, han sido utilizados en la prevención de los carcinomas de la cavidad oral. Así se han analizado la posible acción

protectora de la vitaminas C y E como generadoras de sustancias antioxidantes que actuarían como basureros de los radicales libres (factores carcinógenos que inducen la mutación génica cancerígena).

Los dos fármacos más empleados en el tratamiento de las lesiones orales han sido la epigallocatequin-3-gallate (EGG) y el ácido retinoico. El primero, que es un principio activo del té verde, ha adquirido gran importancia por la multiplicidad de sus mecanismos de acción dado que posee propiedades antioxidantes, estabilizantes de la actividad del ADN y bloqueantes de los receptores celulares carcinogenéticos y del ciclo celular en la fase temprana G1. El EGCG induce un descenso de la proteína PRB, impidiendo la hiperfosforilización del complejo activo de ciclina D o E y la liberación de los factores de transcripción que permitirían progresar el ciclo celular de la fase temprana a la tardía de G1 y, de ahí, a la S₂. En cuanto al ácido retinoico, éste parece que actúa frenando la acción de la proteína p53, aunque también posee conocidos fenómenos de toxicidad ^(56, 70, 71).

1.6.3 Tratamiento

Intentar definir un enfoque terapéutico óptimo para la cavidad oral es complicado. La selección de la terapia definitiva dependerá de la revisión cuidadosa de cada caso individual, prestando atención a la clasificación del tipo de tumor, la condición física general del paciente, así como el grado en que se encuentre la lesión.

- El pronóstico del tumor empeora a medida que ascendemos de estadio (tabla1, pág. 7). Los ganglios más comúnmente afectados son los submandibulares y los de la cadena cervical, tanto superficial como profunda. En cuanto a las metástasis por vía sanguínea no son muy frecuentes (7-12%), pero cuando ocurren, los órganos que más se afectan son los pulmones, hígado y huesos ⁽¹⁾.
- Respecto al tratamiento, la escisión que se realiza en un tumor de menos de 2 cm. suele ser muy eficaz, eliminando el tumor totalmente, y mejorando el pronóstico de supervivencia en comparación con tumores de mayor tamaño o que presenten metástasis. Por tanto las lesiones precoces de cáncer oral tienen un tratamiento efectivo, cumpliendo uno de los requisitos postulados por Wilson y Junger para poder realizar un screening ⁽⁷²⁾.
- En lesiones moderadas o avanzadas se siguen protocolos consensuados de cirugía y radioterapia ^(3,73,74). Como tratamientos paliativos, para lesiones no extirpables, se usa la radioterapia con o sin quimioterapia ⁽⁷⁴⁻⁷⁶⁾.

- ***Terapia génica***

El concepto básico de la terapia génica es que los genes normales pueden ser introducidos en los tejidos para tratar una enfermedad ocasionada por una alteración o déficit génico. Un ejemplo significativo es el de la hemofilia, enfermedad provocada por la pérdida del factor VIII de la coagulación, donde la introducción del gen normal de dicho factor en las células endoteliales o en el sistema retículo endotelial corregiría la coagulopatía. El mecanismo por el cual una molécula exógena de DNA se incorporaría al núcleo

de otra célula se basa en la existencia de un vector de DNA o quimera. Este vector se construye mediante técnicas de recombinación del DNA, lo que significa que es el primer paso para clonar el gen. En el pasado se utilizaron métodos físicos o químicos para introducir el DNA exógeno, y últimamente se emplean vectores virales, en especial los retrovirus.

En lo que se refiere a los cánceres de cabeza y cuello la terapia génica se basa en los supuestos déficit moleculares celulares que actúan como factores carcinogénicos. Así, por ejemplo, los oncogenes RAS podrían ser inhibidos por un virus RNA, dado que la inhibición de la expresión de estos oncogenes alteraría su fenotipo deteniendo su actividad maligna. Hasta el momento presente, éste método únicamente se ha empleado en el tratamiento de la leucemia promielocítica. Con respecto al gen p53 alterado, se podría conseguir su regeneración mediante la infección de las células tumorales con vectores virales o liposomales que tratasen de recuperar la actividad normal de este gen. En los tumores de cabeza y cuello se han utilizado adenovirus humanos atenuados del grupo C que carecen de expresión E1B. Estos virus tienen la facultad de replicar el gen p53 exclusivamente en las células deficitarias. También se han empleado adenovirus asociados a un p53 normal con el objeto de promover la apoptosis de las células cancerosas. Por último, también se han empleado en estos tumores vectores transferrinaliposomales, como métodos para transferir la proteína normal p53 a las células radios resistentes.

▪ ***Antiangiogénesis***

En general, se han propuesto tres mecanismos antiangiogénicos:

- 1) Acción directa sobre las células tumorales de carácter angiogénico.
- 2) Desactivación de las moléculas angiogénicas que actúan sobre el endotelio o sobre la matriz extracelular.
- 3) La actuación directa sobre el órgano diana, es decir, las células endoteliales.

Propiedades antiangiogénicas se han demostrado en diversas moléculas tales como la protamina, el factor plaquetario 4, los sustitutos de la heparina, la fumagallina (macrólido fúngico), los análogos de la prolina, el interferón, etc.

Por último, la relación entre los esteroides y la vascularización tumoral ha sido estudiada en dos vertientes:

- 1) En cuanto a la acción antiangiogénica de los esteroides, se ha demostrado el efecto inhibitor de la angiogénesis de la cortisona en el carcinoma de pulmón en el ratón.
- 2) En cuanto al empleo de antagonistas esteroideo, se han comprobado las propiedades antiangiogénicas de diversos antiestrógenos (clomifeno, tamoxifeno, nafoxidine) sobre tumores experimentales en la membrana corioalantoidea del pollo.

▪ *Propuestas futuras en el tratamiento del cáncer oral*

En el momento actual, el tratamiento de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello (CECC) presenta un carácter multidisciplinar, implicando la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. En los últimos 10 años se han logrado avances en la calidad de vida de los pacientes afectados, y mejoras en su supervivencia. Con la aparición de los nuevos regímenes de tratamiento, que combinan quimio y radioterapia, los porcentajes de conservación de órgano han alcanzado cifras próximas al 80%. Sin embargo, un gran porcentaje de los pacientes diagnosticados en estadios III y IV, así como la gran mayoría de los pacientes con recidiva suelen tener un peor pronóstico. La introducción de nuevas terapias dirigidas por los crecientes conocimientos en la biología molecular de estos tumores debería contribuir a mejorar el pronóstico de estos pacientes. Bajo este planteamiento se han propuesto varias estrategias como potencialmente eficaces, y un número importante de éstas se han incluido en ensayos clínicos.

El desarrollo de las nuevas dianas moleculares para el tratamiento de los diferentes tipos de tumores ha adquirido un carácter exponencial en los últimos años. Algunas estimaciones dan cifras superiores a 1.000 moléculas diferentes en distintas fases de desarrollo como potenciales fármacos antitumorales. El interés por estas nuevas aproximaciones terapéuticas se han reavivado con los espectaculares resultados obtenidos en el tratamiento de los tumores del estroma gastrointestinal (GIST) o las leucemias mieloides crónicas, donde el imatinib (inhibidor de las tirosinas

- quinasas BCR – ABL, c-kit y PDGFR) ha hecho que una enfermedad fatal, con supervivencias libres de enfermedad no superiores al 5% a los dos años, haya cambiado radicalmente su pronóstico, presentando cifras, en el momento actual, próximas a un 90% de pacientes libres de enfermedad a los tres años.

La biología molecular de estos tumores sugiere que determinadas rutas de señalización intracelular son fundamentales para la génesis y posterior progresión de esta enfermedad. Estas rutas van desde los factores de crecimiento y sus receptores hasta las proteínas implicadas en el control del ciclo celular, pasando por otras implicadas en la transducción de señales, en el control de la muerte celular programada (apoptosis), de la angiogénesis o de los fenómenos inflamatorios intratumorales. Muchas de estas rutas han servido, y sirven, como objetivos para los nuevos tratamientos.

Una de las grandes ventajas que ofrecen los CECC, frente a tumores de otras localizaciones, para el desarrollo y aplicación de nuevos tratamientos, es su accesibilidad para la toma de biopsias, así como para la aplicación de terapias intratumorales.

- ***Factores de crecimiento y sus receptores***

Entre las moléculas que han despertado un mayor interés en el campo de las nuevas terapias se encuentran la familia de proteínas con actividad tiroxina-quinasa, así como sus ligandos y efectores. Las proteínas con actividad quinasa, es

decir, con capacidad para fosforilar aminoácidos, induciendo así cambios en la estructura y actividad de las proteínas fosforiladas, regulan la mayoría de rutas de señalización intracelular presentes en las células eucariotas y, por lo tanto, potencialmente pueden encontrarse implicadas en el control de procesos importantes en la carcinogénesis. En el genoma humano existen más de 90 genes que codifican proteínas-quinasa, 58 de ellos corresponden a receptores transmembrana con actividad tiroxina-quinasa. Cuando estos receptores se encuentran mutados o alterados estructuralmente, se pueden convertir en potentes oncogenes capaces de inducir, o al menos colaborar, en la transformación maligna de las células afectadas.

- ***EGFR***

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un receptor transmembrana de la familia de las tirosina-quinasa ErbB (también denominada HER), familia de receptores frecuentemente alterada en múltiples tumores de origen epitelial. Su activación, tras la dimerización de los receptores y las consiguiente autofosforilación de residuos de tirosina, tendrá como consecuencia el desencadenamiento de una cascada de señalización intracelular, que, en el contexto de una célula tumoral, puede favorecer el desarrollo y la progresión del tumor. Entre el 80% y el 100% de los CECC sobre expresan EGFR, y este aumento de expresión se ha asociado con un peor pronóstico ⁽⁷⁷⁾.

En el momento actual existen, en distintas fases de su desarrollo, más de 20 moléculas capaces de inhibir el EGFR. Éstas se pueden dividir en dos grandes grupos:

- 1) Los anticuerpos monoclonales dirigidos frente al dominio extracelular del receptor, que competirían con los distintos ligandos por su unión al EGFR (fármacos de administración todos ellos intravenosa).
- 2) El otro grupo de inhibidores está constituido por aquellos fármacos que actuarían impidiendo la unión del ATP (molécula donante del grupo fosfato necesario para la autofosforilación) con el dominio tirosina-quinasa del receptor, compitiendo así el inhibidor y el ATP por el mismo sitio de unión al EGFR, impidiendo así su actividad quinasa (todos ellos de administración vía oral).

1.7 Características fisiopatológicas del cáncer oral

A lo largo de las últimas décadas, se ha avanzado en el campo de la investigación sobre el cáncer en temas que han permitido un mejor conocimiento de la patogénesis celular y molecular y de la progresión del cáncer de la cavidad oral. La célula cancerosa es aquella que ha adquirido características que le confieren una ventaja selectiva de crecimiento sobre sus células vecinas. El trabajo de Fearon y Vogelstein ⁽⁷⁸⁾ ha conducido a la identificación de sucesos genéticos discretos que ocurren en la progresión del cáncer de colon a partir de pólipos precancerosos hasta tumores invasivos. Aunque el orden y número preciso de eventos todavía es desconocido, una reciente serie de experimentos desarrollados por Hahn y cols. y por Hanahan y

Weinberg ^(80,81) demostraron que para el desarrollo del cáncer se necesita que se cumplan 6 pasos:

- 1 Adquisición de proliferación autónoma.
- 2 Inhibición de señales de crecimiento inhibitorias.
- 3 Evasión de la muerte celular programada.
- 4 Inmortalización.
- 5 Adquisición de una fuente de nutrientes sanguíneos (angiogénesis).
- 6 Adquisición de la habilidad de invadir tejidos adyacentes.

1. Adquisición de Proliferación autónoma:

Durante la maduración de las células epiteliales normales, la capa de células basales se replica de forma autónoma, y las células resultantes finalmente diferenciadas, migran a la superficie, se aplanan, se queratinizan y mueren. La renovación de la capa basal celular requiere de la señalización mitogénica por señales de crecimiento extracelulares, interacciones con la matriz celular y/o contactos intercelulares. Estas señales extracelulares son trasducidas por receptores ligados a la membrana a través del citoplasma hasta el núcleo, lo que hace que las células pasen de un estado quiescente a una proliferación activa. Alteraciones cuantitativas o cualitativas en la expresión de las moléculas que trasducen esas señales de crecimiento pueden activar vías proliferativas. Los "oncogenes" se definen como aquellos genes cuyos productos proteicos son importantes para la señalización de crecimiento celular normal y cuya sobreexpresión o mutación lleva a un crecimiento celular descontrolado y a tumorigénesis ^(79,80).

Una de las primeras conexiones de la regulación del crecimiento celular normal con la tumorigénesis viene de la secuenciación del gen c-erbB retroviralmente codificado, que se descubrió que codificaba una forma truncada del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGF-R)⁽⁸¹⁾. El EGF-R ha demostrado ser un receptor tirosín-kinasa ligado a la membrana que trasduce señales de ligandos extracelulares difundibles, incluyendo EGF y el factor de crecimiento transformante- α (TGF- α).

El EGF-R y su ligando se han estudiado extensamente en el carcinoma de células escamosas de la cavidad oral y de cabeza y cuello. La mayoría de estos estudios han correlacionado el nivel de expresión del receptor y/o su ligando al ADN, ARN, o nivel proteico en líneas celulares o tejidos frescos con resultados clínicos. En uno de esos estudios Grandis y Twardy⁽⁸²⁾ han evaluado sistemáticamente la cantidad de ARN mensajero codificando EGF-R y TGF- α en tumores y en mucosa normal. Se encontró que la cantidad de ARN mensajero del TGF- α es 5 veces mayor en el 96% del tejido histológicamente normal de pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y cinco veces mayor en el 87.5% de tumores cuando se compararon con la mucosa normal. El ARN mensajero para el EGF-R estaba elevado 29 veces en el 91% de los tejidos histológicamente normales de pacientes que sufren un tumor y estaba elevada a 69 veces en el 92% de los tumores cuando se compararon con la mucosa normal. Los mayores niveles tanto de ligando como de receptor en tumores y en mucosa normal de pacientes con cáncer de cabeza y cuello sugieren que la

influencia de los factores ambientales, como consumo de tabaco y alcohol, llevan a una sobrerregulación de la producción de factores de crecimiento y expresión de receptores que puede jugar un papel en el desarrollo del tumor. Un análisis subsecuente por este grupo ha mostrado una correlación significativa entre la expresión de estas dos moléculas, con disminución en las tasas de supervivencia de pacientes libres de enfermedad y por causa específica.

2. *Inhibición de señales de crecimiento inhibitorias:*

Aunque la estimulación constitutiva de proliferación celular a través de factores de crecimiento normales es necesaria para el desarrollo tumoral, es insuficiente para, y por si misma, causar transformación oncogénica de células normales ⁽⁷⁹⁾. Otro paso importante relacionado en la tumorigénesis es la pérdida de señales anticrecimiento que mantienen las células progresando a través del ciclo celular autónomamente. Varias moléculas importantes para la inhibición celular de su progresión a través del ciclo celular han sido identificadas y también se han encontrado alteradas en carcinomas epidermoides de cabeza y cuello. El producto del gen retinoblastoma (pRb) en su estado hipofosforilado se fija al factor de transcripción E2F. Cuando se fosforiliza, el pRb libera E2F, lo cual lleva a la transcripciones de genes críticos para la progresión de células de la fase G1 a la fase S del ciclo celular ⁽⁷⁹⁾. La trascendencia de la funciones de pRb y de su vía reguladora permite comprender que constituyan dianas moleculares críticas en la progresión maligna.

Un ejemplo de este tipo de alteración es la mutación del gen p16. El gen p16 se encuentra localizado en el cromosoma 9p21. Este gen codifica la síntesis de la proteína p16 relacionada con el ciclo celular. Su función es la inhibición de las ciclinas dependientes de quinasas 4 y 6, impidiendo la fosforilación de la pRb e impidiendo la progresión del ciclo celular desde la fase G1 a la fase S. Las alteraciones del gen p16 pueden dar lugar a la falta de proteínas, o a proteínas no funcionantes, perdiendo la célula este importante mecanismo de control del ciclo celular.

3. *Evasión de la muerte celular programada (apoptosis).*

Se conoce por apoptosis el fenómeno de muerte celular programada. (Barry MA et Al., 1990; Cohen JJ 1993; Birchal M et Al., 1996). Este proceso es regulado fisiológicamente y las células que mueren por esta vía juegan un papel activo en su propia destrucción; mediante este proceso se impide la perpetuación de estirpes celulares con ADN severamente lesionado, en los que otros eventos carcinogénicos sumatorios podrían conducir al fenotipo maligno.

La apoptosis se caracteriza morfológicamente por la aparición de condensaciones nucleares y citoplasmáticas que concluyen en la formación de cuerpos apoptóticos, que se mantienen cerrados, conservando un gradiente osmótico. No se produce por tanto derramamiento de contenidos intracelulares y así, el proceso de muerte por apoptosis, al contrario que en la necrosis celular, cursa sin inflamación.

Hay cada vez mayor evidencia de que la muerte programada celular (apoptosis) es un paso crítico en el recambio celular y la homeostasis de los tejidos. Se ha encontrado que la muerte programada celular se trata de una serie de pasos organizados precisamente y desencadenados por estímulos fisiológicos que llevan a la disolución de la membrana, rotura de los esqueletos nuclear y citosómico, degradación cromosómica, y fragmentación del núcleo. Se necesitan múltiples moléculas reguladoras y efectoras para obtener éxito tanto para el inicio como para la conclusión de este proceso ⁽⁷⁹⁾.

Un ejemplo de estas mutaciones es la del gen p53. En más del 60% de los carcinomas escamosos de la cavidad oral se han detectado mutaciones del gen p53. Parece, por tanto, que la presencia de la proteína p53 está estrechamente asociada a la malignidad, ya que en la mucosa oral normal o con lesiones benignas, la expresión de la proteína p53 es frecuentemente negativa. Sin embargo, la demostración inmunohistoquímica de la proteína p 53 no se debe asumir como un marcador absoluto de mutaciones del gen p53 en el cáncer oral, puesto que esta expresión puede ser el resultado de la estabilización de la proteína p53 no mutada. Esta última está producida en respuesta a las órdenes del gen p53, localizado en el brazo corto del cromosoma 17. Se sabe que un número importante de genes implicados en el control del crecimiento son transcritos (activados) de manera dependiente de p53. P53 induce la transcripción del gen p21 y del gen bax, y se sabe que los productos proteicos de estos genes juegan papeles clave en el control de la proliferación

celular y de la apoptosis. Aunque el ARN mensajero del gen p53 está presente en todos los tejidos adultos, la proteína p53 salvaje (normofuncionante) es virtualmente indetectable por técnicas inmunohistoquímicas debido principalmente a su corta vida media. No obstante existe un marcado aumento de la proteína p53 de tipo salvaje tras sucesos en los que se produce un daño en el ADN, tal como acontece tras la radiación ultravioleta de la epidermis humana. Este incremento de p 53 salvaje inhibe la entrada de la célula con ADN lesionado de la fase S del ciclo celular, anulando el ciclo celular. Por este mecanismo se previene la acumulación de ADN lesionado en las generaciones siguientes. Además, la detención del ciclo celular vía incremento de la proteína p53 salvaje confiere una ventaja proliferativa a las células de la vecindad que no tienen dañado su ADN y que presentan bajos niveles de p53. De esto se deduce que cuando la proteína p53 funciona normalmente constituye un sistema muy eficaz en la protección de la integridad del ADN del organismo.

El arresto del ciclo celular mediado por p53 se produce en los puntos de transición de G1 a S y en el paso de G2 hacia M. Estos puntos de chequeo del ciclo celular son esenciales para prevenir tanto la replicación del ADN dañado (arresto en G1) como en la reparación de cromosomas dañados (arresto en G2), aunque este último punto está menos demostrado. Además de esta función de inhibición de la proliferación celular, permitiendo la reparación del ADN, la proteína p53 también es responsable de la inducción de apoptosis en células con lesiones irreparables en el ADN.

4. *Inmortalización:*

Las células normales pueden replicarse en número finito de veces, después de las cuales se convierten en senescentes, entran en un estado de "crisis", y por último mueren ⁽⁸⁰⁾. Las células tumorales, en contraste, adquieren la capacidad de eludir este proceso, lo cual les permite replicarse indefinidamente. Recientemente se ha investigado los mecanismos de inmortalización tumoral, y se ha descubierto que los finales de los cromosomas (telómeros) juegan un papel importante en la senescencia celular ⁽⁷⁹⁾. Una vez que los telómeros se han perdido, los finales cromosómicos no se protegen por más tiempo, y esto lleva a la fusión de cromosomas y anomalías cariotípicas que finalmente precipitan la muerte celular. Casi todas las células tumorales han adquirido uno u otro mecanismo para mantener su longitud telomérica. Lo que más se ha estudiado de estos mecanismos es la expresión de la enzima telomerasa, que extiende la longitud de los telómeros.

Varios grupos han investigado la actividad de la telomerasa en carcinomas epidermoides de cabeza y cuello. En un análisis de 16 líneas celulares de estos carcinomas, 29 especímenes tumorales, y mucosa normal displásica adyacente, la actividad de la telomerasa no fue detectada en ninguno de los tejidos normales pero se encontró en el 100% de las líneas celulares, en el 90% de los cánceres invasivos, y en el 100% de las lesiones displásicas ⁽⁸³⁾.

5. *Adquisición de una fuente de nutrientes sanguíneos (angiogénesis):*

Según crecen los tumores, invaden y metastatizan, la formación de nuevos vasos sanguíneos es crítica. El proceso de angiogénesis es en sí mismo un proceso de múltiples pasos que parece está regulado tanto por factores estimulatorios como por factores inhibitorios ⁽⁷⁹⁾. Pasos críticos para esta neovascularización incluyen la degradación de la matriz extracelular, proliferación endotelial celular, migración y acúmulo de células en estructuras ordenadas mayores. Las moléculas que regulan la angiogénesis pueden afectar a uno más de esos pasos.

El complejo que interacciona tanto con los reguladores negativos como con los positivos del proceso angiogenético, determina el grado de formación de nuevos vasos dentro del tumor y en la periferia. Así de este modo, la densidad de microvasos dentro del tumor puede servir como un marcador útil de la vascularidad del tumor, y puede medirse fácilmente con el uso de un tinte de anticuerpos para un marcador celular vascular endotelial, como es el factor VIII, CD31, y CD34. Se ha encontrado que la densidad de microvasos es un indicador independiente de pronóstico para pacientes con carcinoma de mama, ovario, próstata y de estómago ⁽⁸⁴⁾.

Varios estudios han examinado la angiogénesis medida por la densidad de microvasos en el tumor en relación con los resultados clínicos de pacientes con carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, pero estos estudios han mostrado resultados conflictivos. Un estudio de 25 pacientes

con lesiones T1 de la cavidad oral mostró correlación entre elevada densidad microvascular, determinada por tinción con factor VIII, y el desarrollo de metástasis cervicales ⁽⁸⁵⁾. Otro grupo encontró que pacientes que tuvieron carcinoma epidermoide de cabeza y cuello con incremento de densidad microvascular tuvieron mejor pronóstico (supervivencia media: 10 meses) ⁽⁸⁶⁾. Dos estudios adicionales de 106 y 19 pacientes no mostraron correlación entre la densidad microvascular y los resultados clínicos ^(87,88).

6. *Adquisición de la habilidad de invadir tejidos adyacentes.*

Se cree que la proteólisis de la matriz extracelular es un paso crítico para la invasión de tejidos por los tumores ⁽⁸⁹⁾. Se ha evaluado una amplia variedad de proteasas en muchos tipos de tumores, y la literatura sobre esto se expande atendiendo al papel potencial de varias enzimas proteolíticas y sus inhibidores específicos en el desarrollo de invasión tisular metástasis regional del carcinoma epidermoide de la cavidad oral.

La regulación de cada uno de estos pasos es compleja y requiere un balance de múltiples mediadores positivos y negativos. Las alteraciones adquiridas en la estructura y/o nivel de expresión de estas moléculas reguladoras se cree que juegan un papel esencial en el desarrollo de los cánceres orales. Nuevos métodos sofisticados para evaluar estas alteraciones moleculares (gene chip microarrays) ofrecen un mejor conocimiento de la carcinogénesis oral y progresión tumoral y permitirán identificar nuevos objetivos terapéuticos ⁽⁹⁰⁾.

La fusión de los estudios epidemiológicos tradicionales y los nuevos métodos moleculares han originado una imagen clara de cómo la susceptibilidad genética heredada para sufrir daño en el ADN, combinada con carcinógenos ambientales pueden causar múltiples alteraciones moleculares necesarias para el desarrollo tumoral ⁽⁹¹⁻⁹⁴⁾.

1.8. Aspectos moleculares del cáncer oral

1.8.1 El ciclo celular

1.8.1.1 Fases del ciclo celular

Desde los primeros tiempos de la microscopía óptica se había observado que la división de una célula iba precedida de una serie de acontecimientos que se llamaron en su conjunto mitosis. Asimismo, se sabía que había un periodo de tiempo entre una mitosis y la siguiente denominado interfase, en el que aparentemente la célula no experimentaba más cambio que un aumento de tamaño.

A principios de los 50 se comenzó a utilizar la incorporación de P³² y técnicas de autorradiografía en los estudios sobre el DNA, descubriendo su duplicación, produciéndose este hecho en la interfase. Este hallazgo fue fundamental en la introducción del concepto de ciclo celular.

Se entiende por ciclo celular la secuencia de procesos por los que una célula duplica su contenido y se divide en dos. Clásicamente se distinguen cuatro fases ⁽⁹⁵⁾ (grafico 1):

activas, no se dividirán a menos que sean apropiadamente estimuladas por señales extracelulares ⁽⁹⁵⁾.

Durante la interfase las células transcriben genes, sintetizan proteínas y crecen en tamaño. Tanto la fase G1 como la G2 conceden un tiempo adicional para que se realice la duplicación de los orgánulos citoplasmáticos; si en la interfase solo se duplicara el contenido de DNA, las células hijas resultantes serían en cada división más pequeñas ⁽⁹⁵⁾.

El primer signo visible de que una célula está a punto de entrar en mitosis es la condensación de los cromosomas en el núcleo, acontecimiento que marca el final de la fase G2 ⁽⁹⁵⁾.

Fase M: la división celular

El ciclo celular de las células eucariotas culmina con la división celular en dos células hijas, que comprende la división nuclear o mitosis y la división citoplásmica o citocinesis.

La mitosis es una secuencia continua de acontecimientos que clásicamente se divide en cinco etapas:

- a) La profase en la cual los cromosomas replicados se condensan y el huso mitótico comienza a formarse fuera de la membrana nuclear.
- b) La prometafase se caracteriza por la desaparición de dicha membrana.

- c) La metafase a lo largo de la cual los cromosomas se colocan en el ecuador del huso mitótico formando la placa mitótica.
- d) La anafase en la que las dos cromátidas hijas se separan y emigran hacia polos opuestos de la célula guiadas por los microtúbulos que componen el huso mitótico.
- e) La telofase que es el final de la mitosis, en ella se forma una membrana nuclear alrededor de cada grupo cromosómico resultante de la anafase.

Estas cinco etapas junto con la citocinesis o división citoplásmica forman la fase M del ciclo celular.

- o **Profase**

La mayoría de las células animales tienen una estructura en su citoplasma llamada centrosoma integrada por un par de centriolos rodeados por un material pericentriolar electrodenso y amorfo que es el centro organizador de microtúbulos del que, al inicio de la profase, emergen microtúbulos a modo de radiaciones que constituyen el denominado "áster". En la fase S del ciclo el centrosoma se duplica, y al comenzar la profase los dos centrosomas hijos se separan y emigran a polos opuestos de la célula. Cada centrosoma arrastra su propio sistema de microtúbulos en la migración y, de la interacción de ambos sistemas, resulta el huso mitótico también llamado huso acromático. Además en esta fase desaparecen los nucléolos y se inicia la condensación de la cromatina en forma de cromosomas, integrados por dos cromátidas que son filamentos de DNA unidos por el centrómero. Las cromátidas van acortándose y engrosándose

a medida que progresa la profase debido a la espiralización creciente de la molécula de DNA.

Durante la profase, en los cromosomas, aparece una estructura proteica llamada cinetocoro que será la encargada de que se produzca la unión de los cromosomas al huso. Cada cromosoma replicado consiste en dos cromátides hijas unidas entre sí a lo largo de su longitud que poseen una zona de constricción que se corresponde con una secuencia especializada de DNA llamada centrómero. Cada centrómero o constricción primaria del cromosoma, posee dos cinetocoros, uno a cada lado del mismo. Los cinetocoros experimentan atracción por los microtúbulos del huso y esta atracción hace que los cromosomas avancen hacia el huso mitótico y queden conectados a él. Cada cromátida establece conexión con uno de los polos del huso a través de los llamados microtúbulos cromosómicos o cinetocóricos (en contraposición a los microtúbulos polares que conectan ambos centrosomas confluyendo en la zona ecuatorial).

o **Prometafase**

Durante esta etapa del ciclo las proteínas encargadas de estabilizar la membrana nuclear denominadas láminas nucleares sufren una fosforilación por acción de una quinasa que es Cdk mitótica, Cdk 1, llamada también p34^{cdc2}. Como resultado, la envoltura se transforma en pequeñas vesículas desapareciendo como tal. Este hecho hace posible el contacto físico entre el huso mitótico y los cromosomas duplicados, hasta entonces separados por la membrana. Los

cromosomas migran al ecuador de la célula. Se forma el huso mitótico integrado por los microtúbulos de ambos centrosomas que están en contacto con los cromosomas. Dicho contacto se realiza a través del cinetocoro, estructura proteica que envuelve a los cromosomas a nivel de sus centrómeros. Cada cromátide establece conexión con uno de los polos a través de los llamados microtúbulos cromosómicos o cinetocóricos (en contraposición con los microtúbulos polares que conectan ambos centrosomas confluyendo en la zona ecuatorial).

o **Metafase**

La condensación cromosómica alcanza el máximo desapareciendo por completo la envoltura nuclear y los microtúbulos del cinetocoro se disponen paralelamente al huso. Los cromosomas alcanzan el ecuador del huso mitótico formándose la placa metafísica. La naturaleza de las fuerzas que llevan a los cromosomas hasta ese punto no son del todo conocidas, pero parece que en este proceso están implicados una serie de movimientos que experimentan los microtúbulos de estiramiento y contracción en los que intervienen mecanismos moleculares como incorporación de tubulinas en los microtúbulos que unen los cromosomas al polo más próximo, y desprendimiento de tubulinas en aquellos microtúbulos en relación con el polo más alejado de los cromosomas. Una vez ahí los cromosomas oscilan ajustando continuamente su posición reflejo de la tensión a la que se ven sometidos que tiene como fin su perfecta alineación.

o **Anafase**

Al comienzo de esta fase por la acción de enzimas proteolíticas se rompen las conexiones existentes entre las dos cromátidas hijas que componen cada cromosoma duplicado. Cada una de ellas avanza, traccionada por los microtúbulos asociados al cinetocoro que se acortan perdiendo moléculas de tubulina, hacia los polos opuestos de la célula de manera sincrónica. El resultado del proceso son dos conjuntos de cromosomas situados uno en cada polo de la célula que darán lugar a los núcleos de las células hijas.

o **Telofase**

La última etapa de la mitosis se inicia cuando los cromosomas hijos alcanzan los respectivos polos. Los microtúbulos de los cinetocoros desaparecen. La membrana nuclear se ensambla alrededor de cada grupo de cromosomas formándose los núcleos de las células hijas. Para ello, es necesario que proteínas del tipo de láminas de la envoltura nuclear que se fosforilaron durante la profase se defosforilen. Los cromosomas condensados se descondensan, se han formado dos nuevos núcleos y solo resta la citocinesis para completar la división.

o **Citocinesis**

El primer signo visible de la citocinesis en células animales es la aparición de un pliegue en la membrana citoplasmática. Esta invaginación se produce en un plano perpendicular al eje longitudinal del huso mitótico. Durante la anafase se forma un anillo contráctil, compuesto de actina y miosina, en relación a la invaginación de la membrana, esta estructura es transitoria,

se ensambla al comenzar la citocinesis y a lo largo de la misma se hace cada vez más pequeño, para desensamblarse una vez que la célula se ha separado en dos ⁽⁹⁶⁾.

1.8.1.2 Control del ciclo celular

Todo lo que ocurre en el ciclo celular tiene una secuencia determinada. Después de la mitosis y citocinesis (fase M) viene la fase G1, tras ésta comienza la replicación del DNA (fase S) seguida de la fase G2, así una y otra vez. Estos acontecimientos deben estar sujetos a un riguroso control. El sistema de control del ciclo celular se encarga de la activación de sistemas enzimáticos y otras proteínas que hacen que cada proceso se dé en su justo momento, de igual manera, los desactiva una vez que se ha completado, asegurando que no comience una fase sin haber finalizado la anterior.

Dentro del sistema de control se deben tener en cuenta las condiciones internas de la célula así como señales extracelulares que en ocasiones provienen de otras células vecinas. Entendido de esta forma, el control del ciclo celular juega un papel fundamental en la regulación del número de células de los tejidos del organismo y cuando éste falla, puede dar como resultado el desarrollo de neoplasias.

El conocimiento acerca de los mecanismos moleculares que controlan el desarrollo del ciclo celular ha avanzado de un modo espectacular en los últimos quince años.

Los puntos de chequeo del ciclo celular

El ciclo de división de una célula consiste en una secuencia de acontecimientos que se repite de forma ordenada y constante. Nunca debe comenzar un proceso sin que el anterior se complete, para ello existe todo un sistema de control que por diversos mecanismos asegura el correcto paso de la célula de una fase a la siguiente.

Uno de estos mecanismos de control consiste en una serie de "frenos moleculares" que detienen el ciclo en determinados puntos con el fin de chequear las condiciones celulares externas e internas. Cuando dichas condiciones son favorables la célula continúa su avance a través del ciclo, en caso contrario, la progresión se detiene para dar tiempo a que cambie el entorno celular o para que se produzca la reparación de los defectos internos detectados.

Estos puntos son los "puntos de chequeo", también conocidos como "checkpoints". Actualmente están definidos tres:

- 1) Al final de la fase G1 se encuentra el llamado punto de chequeo de G1. En él se verifica que la célula reciba el estímulo de factores de crecimiento necesarios para la activación del ciclo, que no haya defectos en el DNA que podrían transmitirse a las células hijas y que su tamaño es el adecuado antes de que comience la fase S.
- 2) Otro punto de chequeo ocurre en la fase G2. Aquí se comprueba si la replicación del DNA se ha completado y si el tamaño celular es el adecuado para que comience la mitosis.

- 3) En la fase M existe un tercer punto de chequeo capaz de detener el ciclo en caso de que los cromosomas no se encuentren adecuadamente alineados en el huso mitótico.

El punto de regulación de G1 se definió gracias a los estudios de Lee Hartwell y su equipo (1974) ⁽⁹⁷⁾ en la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae*. Se supo que en el ciclo celular de estas levaduras había un punto que se denominó START que, una vez rebasado, hacía completar a la levadura irremisiblemente una división. El punto START está regulado tanto por el tamaño celular como por señales externas que, en el caso de las levaduras, están representadas por la cantidad de nutrientes que tiene el medio. Si son insuficientes para completar un ciclo éste se detiene, lo que significa que START supone un punto en el que la célula decide si puede afrontar o no una nueva división y donde se revisa si el tamaño que ha alcanzado es el suficiente para dividirse en dos, de manera que si es demasiado pequeña hará durar más tiempo la fase G1 para "darse" tiempo a crecer.

En las células animales ocurre algo parecido, a "START" se le conoce como punto de restricción o punto de chequeo de G1. En contraste con las levaduras los factores externos que lo regulan son las señales que provienen de los "factores de crecimiento" que se encuentran en el medio. Una vez que la célula recibe el estímulo adecuado de dichos factores su destino es pasar a la fase S del ciclo, y seguirá avanzando a través de él incluso en su ausencia.

Cuando no recibe el estímulo de los factores de crecimiento, la célula se detiene en el punto de restricción y entra en una fase de quiescencia denominada G₀, donde puede permanecer durante mucho tiempo sin proliferar y, aunque continúa siendo metabólicamente activa, su crecimiento y el porcentaje de proteínas que sintetiza es menor.

Algunos tipos celulares poseen un ciclo cuyo punto de regulación más importante ocurre al final de G₂. Los estudios de Paul Nurse (1975) ⁽⁹⁸⁾ en levaduras de fisión (*Schizosaccharomyces pombe*) demostraron que en la transición de las fases G₂ y M la célula chequeaba su tamaño y otra serie de factores que determinan la finalización o no del ciclo. Los ovocitos de los vertebrados representan a este tipo de células. Pueden permanecer detenidos en la fase G₂ durante décadas hasta que la situación hormonal sea favorable y se desencadene la primera división mitótica.

Un requisito para superar el punto de chequeo G₂ es que la célula haya completado la replicación del DNA. El DNA no replicado genera una señal que detiene el ciclo para dar tiempo a que se complete el proceso.

Otro estímulo que en el punto de chequeo G₂ retrasa la entrada en mitosis es la existencia de DNA dañado. En este caso, la demora en la entrada en mitosis es utilizada por la célula para poner en marcha la maquinaria de reparación de DNA. Sin embargo, los mecanismos que hacen posible este hecho en G₂ permanecen sin aclarar. En el punto de chequeo G₁, donde el daño del DNA también constituye una

señal que detiene el ciclo, se sabe que esta parada está mediada por la proteína p53. Recientemente algunos autores han relacionado a p53 también con el punto de chequeo de G2 (Zhan y Antinone, 1999) ⁽⁹⁹⁾.

El DNA dañado induce la síntesis de p53. El gen que codifica esta proteína se encuentra mutado en muchos cánceres humanos (Vogelstein, 1990) ⁽¹⁰⁰⁾. La proteína resultante de esta mutación no tiene capacidad para detener el ciclo al final de G1 en respuesta al DNA dañado, de manera que el material genético anormal se replica y pasa a las células hijas, aumentando en ellas la frecuencia de mutaciones y la inestabilidad génica, lo cual contribuye a facilitar el desarrollo de neoplasias.

Otro punto de chequeo menos conocido es el que ocurre al final de la mitosis (M checkpoint). Su importancia reside en que contribuye a mantener la integridad del genoma. En este punto se monitoriza la alineación de los cromosomas en el huso mitótico. Cuando la alineación no es perfecta no se puede asegurar la distribución por igual de los mismos entre las dos células hijas, por ello, el ciclo se detiene en metafase para dar tiempo a que la placa mitótica se forme antes de que ocurra la segregación de los recién duplicados cromosomas. Para esta segregación es necesaria la proteólisis de proteínas que mantienen unidas las cromátides (cohesinas). En esta proteólisis interviene el complejo APC (Anaphase Promoting Complex). Finalmente, si todo el proceso previo se ha realizado correctamente, la salida de mitosis se produce gracias a la destrucción de la ciclina B.

1.8.2 Cancerización de Campo

El concepto de cancerización de campo sugiere que las mucosas del tracto aerodigestivo superior de un determinado paciente, sometidas de forma similar a los agentes cancerígenos habituales, tienen un mayor riesgo de desarrollar nuevos carcinomas. Desde su acuñamiento, el término se ha empleado para describir múltiples terrenos de enfermedad premaligna, con una prevalencia mayor de la esperada de aparición de múltiples tumores primarios o secundarios locales y la presencia de tumores distantes sincrónicos. Las técnicas moleculares han permitido profundizar en el conocimiento de la relación entre estas lesiones. Si bien hay diferencias metodológicas en la forma de identificar los orígenes clonales de las lesiones, suele ser frecuente la extensión clonal lateral de la enfermedad premaligna o maligna. Ante esta patología, se están investigando diversas alternativas preventivas y terapéuticas, como el screening poblacional, los retinoides o la terapia génica, que pueden aportar beneficios a los pacientes con lesiones premalignas y malignas en la región de cabeza y cuello.

La importancia de la cancerización de campo radica tanto en su frecuencia, como en la influencia negativa que ejerce la aparición de un segundo tumor. La frecuencia de aparición de estos segundos tumores en pacientes diagnosticados de carcinomas oscila entre el 3 % y el 30% de los casos. El problema parece acentuarse en el cáncer oral, puesto que en el 50% de estos enfermos los dos tumores se presentan en

la misma zona anatómica de la cavidad oral. La invasión local extensiva y las metástasis ganglionares regionales son, en gran parte, responsables de la pobre clínica resultante de estos tumores, por cuanto esos pacientes tienen mayor riesgo de desarrollar cánceres secundarios o múltiples cánceres primarios, en base al principio de cancerización de campo en el tracto digestivo superior ^(101,102).

Antes de iniciar una etapa de crecimiento aparente, en la que la sospecha clínica de cáncer oral es clara, esta neoplasia pasa por una fase de desarrollo clínico poco manifiesta, con frecuencia inadvertida. Los signos clínicos de la enfermedad en estas fases de la evolución tumoral pueden recordar a los que acontecen en las lesiones benignas o lesiones precancerosas. Es frecuente que las neoplasias con estas características pasen desapercibidas y evolucionen hacia formas más avanzadas, en las que la supervivencia del paciente disminuye drásticamente, puesto que incluso los tumores que presentan escaso grado de crecimiento invasivo pueden producir metástasis en los ganglios linfáticos regionales. El análisis de las manifestaciones clínicas del cáncer incipiente puede realizarse mediante el seguimiento de las lesiones precancerosas o a través del estudio de carcinomas de tamaño pequeño. En el primer caso se ha comprobado que la transformación maligna de una lesión precancerosa suele presentarse como una zona de induración localizada en una leucoplasia no homogénea. Por el contrario los datos resultantes que analizan la clínica de cáncer incipiente indican que la presentación más habitual es un área roja. Con mucha frecuencia aparecen pequeñas

ulceraciones o áreas granulares, como expresión de neoplasias en fases iniciales de crecimiento.

Después de la resección de un COCE (Carcinoma Oral de Células Escamosas) hay un alto riesgo de que se desarrolle un nuevo cáncer en la misma zona anatómica ⁽¹⁰³⁾. En algunos pacientes, este nuevo carcinoma se explica por la recurrencia del tumor inicial, resecado de forma incompleta. Sin embargo, cuando el estudio histopatológico ha demostrado claramente que la resección del carcinoma primario ha sido radical, existe la posibilidad de que el nuevo tumor se desarrolle sobre un campo genéticamente alterado, cuya presencia confiere al paciente un riesgo continuo y elevado de desarrollo de nuevos tumores⁽¹⁰⁴⁾. Los campos premalignos de cavidad oral y orofaringe probablemente tienen su origen en las células progenitoras, que se ubican en la capa basal del epitelio y son las responsables de su renovación en un proceso que ocurre continuamente en la mucosa oral. Cuando las células progenitoras, se dividen en *forma asimétrica*⁽¹⁰⁵⁾, una célula hija es completamente idéntica y retiene la capacidad de multiplicarse, mientras que la otra evoluciona a través de un número limitado de divisiones celulares dando lugar a una población de células con diferenciación terminal. Las células progenitoras junto a su familia de células hijas forman una unidad clonal ⁽¹⁰⁶⁾. La mayoría de los tumores humanos son clonales en su origen y se estima que son necesarios 5 eventos oncogénicos para la transformación de una célula normal en neoplásica ⁽¹⁰⁷⁾ (véase apartad 1.7. Características fisiopatológicas del cáncer oral). Así, sólo las células que persistan durante largo

tiempo en el epitelio, presumiblemente las células progenitoras, tendrán la capacidad de acumular el número de alteraciones necesarias para la formación de un clon maligno. Por tanto, el COCE probablemente procede de las células progenitoras del epitelio oral ⁽¹⁰⁸⁾. Mediante análisis de secuenciación y por inmunohistoquímica se ha demostrado que las células progenitoras pueden desarrollar mutaciones del gen p53, con expresión alterada de la proteína, que pueden ser transferidas a las células hijas formando agrupaciones de células portadoras de la alteración genética, denominadas *parches* (<200 células). La aparición de un parche con mutación de p53 en el epitelio oral presumiblemente es la primera manifestación del COCE ⁽¹⁰⁹⁾. La pérdida del control del ciclo celular mediada por la mutación de p53 confiere una ventaja proliferativa a las células del parche ⁽¹¹⁰⁾ que da lugar a la expansión de una población clonal de células progenitoras ⁽¹⁰⁵⁾ ampliando el número de células diana sobre las que pueden actuar nuevos eventos oncogénicos. De esta forma el parche se expande lateralmente transformándose en un *campo precanceroso genéticamente alterado* que, por definición, no es invasivo ⁽¹⁰³⁾ y puede extenderse a áreas muy amplias de la cavidad oral⁽¹¹¹⁾.

1.8.3. Alteraciones genéticas del cáncer oral

El control de la proliferación celular puede alterarse en alguno de los puntos de chequeo o comprobación del ciclo celular provocando una división desmesurada. Las causas que pueden ocasionar esta alteración en las restricciones que

limitan la división celular son en la mayor parte de los casos adquiridas. El proceso de carcinogénesis implica, no obstante, varios eventos. Normalmente, existe un primer suceso, denominado iniciación, donde un agente externo o un error endógeno coloca a la célula en una situación de mayor susceptibilidad o predisposición para transformarse en neoplásica. En un segundo momento se produce la conversión en célula cancerosa de una célula previamente susceptible. En el campo de la carcinogénesis por agentes externos químicos, el dimetilbenzatraccina puede hacer más sensible o susceptible a una célula produciendo un fenómeno de iniciación. No obstante, se necesita la intervención de otro producto, el 12-O-tetradecanoilforbol, para producir la promoción o transformación neoplásica de una célula ya iniciada.

Los genes que codifican las proteínas implicadas en la regulación de la división celular parecen ser los responsables de la transformación neoplásica en sus primeras fases. Los agentes exógenos o errores endógenos pueden inducir la expresión de genes cuyas proteínas activan la entrada de la célula en división celular. Estos genes son los oncogenes promotores, porque desencadenan una proliferación descontrolada dando lugar a una neoplasia. Entre éstos destacan el myc, jun, fos, ras, etc. Asimismo, estos mismos factores exógenos o endógenos pueden simultáneamente bloquear la expresión o dañar otros genes cuyas proteínas tienen una función de inhibición de la proliferación provocando ambos mecanismos conjuntamente una pérdida de las restricciones de la división y un aumento de los factores

promitóticos. Este segundo grupo de genes con actividad de supervisión y control son los oncogenes supresores por su papel regulador de la proliferación evitando el desarrollo de neoplasias. En este grupo el más importante es el gen p53 que actúa como "el guardián de la célula" por excelencia. Estos procesos producen por tanto un aumento muy significativo de proteínas derivadas de oncogenes promotores que tendrían que encontrarse en niveles muy reducidos o nulos y a la vez niveles bajos o alteraciones funcionales de proteínas supresoras (resultado de la traducción de oncogenes supresores) ⁽⁷⁹⁾.

Los puntos de control del ciclo celular son rutas reguladoras que controlan el orden y el tiempo de transición del ciclo celular, y aseguran que etapas críticas, como la replicación del DNA y la segregación de cromosomas, sean completados con alta fidelidad. Los puntos de control responden al daño con parada del ciclo celular para que la célula disponga de tiempo para la reparación e induciendo la transcripción de genes que faciliten la reparación. La pérdida de puntos de control da como resultado inestabilidad genómica y se han implicado en la evolución de células normales en células cancerosas ⁽¹¹²⁾.

Los oncogenes o genes causantes del cáncer, derivan de los protooncogenes. La acción de diversos oncogenes, aparece implicada en fenómenos de proliferación, diferenciación y supervivencia celular, así como en la capacidad de diseminación y metástasis de las células neoplásicas.

▪ ***Productos proteicos de los oncogenes***

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

▪ ***Factores de crecimiento***

Los factores de crecimiento estimulan la proliferación de las células normales y se cree que muchos de ellos intervienen en la tumorigénesis (mutaciones).

La proliferación celular puede seguir los siguientes pasos:

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

▪ ***Receptores de crecimiento***

Los receptores de crecimiento son proteínas transmembrana que sufren una activación transitoria cuando el receptor capta a su factor de crecimiento

específico, a lo que sigue rápidamente la mitosis. Las versiones oncogénicas de estos receptores sufren activación persistentes sin necesidad de unirse al factor de crecimiento correspondiente. De esta forma, el receptor mutante libera hacia la célula continuas señales que estimulan la mitosis.

▪ ***Proteínas de transducción de señales***

La mayoría de estas proteínas se encuentran situadas en la parte interna de la membrana plasmática, donde reciben señales procedentes del exterior de la célula y las transmiten al núcleo celular. Existen varias oncoproteínas con funciones similares a las de las proteínas citoplasmáticas normales que intervienen en la transducción de señales.

El mejor ejemplo de una oncoproteína de transducción es la familia ras. La mutación del gen ras es la anomalía más frecuente de los oncogenes identificada en los tumores humanos. En las células normales, el estado activado de transmisión de señales de la proteína ras es transitorio. Las proteínas mutantes quedan atrapadas en su forma excitada, lo que a su vez causa una activación patológica de la vía de señalización de la actividad mitógena.

▪ ***Proteínas nucleares de transcripción***

Todas las señales de la vía de transducción penetran en el núcleo y entran en contacto con un gran banco de genes que responden a ellas y que orquestan el avance ordenado de la célula hacia el ciclo mitótico.

En el núcleo se ha localizado un lote completo de oncoproteínas, entre ellas los productos de los oncogenes myc, mybm jun y fos. El gen myc es el que con mayor frecuencia está implicado en los tumores humanos. El gen myc, forma un heterodímero con otra proteína, llamada max. Además, mad, otro miembro de la familia myc de reguladores de la transcripción, también puede unirse a max para formar un dímero. El heterodímero myc-max favorece la proliferación, mientras que mad-max inhibe el crecimiento celular.

▪ ***Ciclinas y cinasas dependientes de la ciclina***

El resultado final de todos los estímulos promotores del crecimiento es que las células en reposo entran en el ciclo celular. La progresión ordenada de las células a través de las distintas fases del ciclo depende de las ciclinas, de las cinasas dependientes de las ciclinas (CDK) y de sus inhibidores (entre otros, el p27 y el p16).

La sobreexpresión de p27 (inhibidor de las CDK) puede inducir la apoptosis en células cancerosas a través del aumento de la expresión de bax, de ese modo actuando en contra de la progresión tumoral. Sin embargo, la reducción en la expresión del p27, se correlaciona con una pobre supervivencia en pacientes con varios tipos de carcinomas. La ausencia de p16 en la mayoría de los carcinomas de células escamosas constituye un evento temprano en la tumorigénesis.

Las mutaciones que alteran la regulación de la actividad de las ciclinas y de las CDK favorecen la proliferación celular ⁽¹¹³⁾.

▪ ***Activación de los oncogenes***

Los mecanismos por los que los protooncogenes se transforman en oncogenes puede ser el resultado de diferentes fenómenos, que incluyen pérdidas alélicas, mutaciones puntuales, deleciones, amplificación de genes o reordenamientos cromosómicos.

▪ ***Genes supresores del cáncer***

Los productos de los genes supresores del cáncer actúan frenando la proliferación celular. La función fisiológica del gen consiste en regular el crecimiento celular y no en evitar la formación de tumores.

▪ ***Productos proteicos de los genes supresores del cáncer***

o *Moléculas que regulan la transcripción nuclear y el ciclo celular*

A) Gen Rb. Actúa como un freno al progreso de la célula desde la fase G1 a la fase S del ciclo celular. Cuando la célula recibe el estímulo de los factores de crecimiento, la proteína Rb se inactiva, por lo que el freno desaparece y la célula atraviesa el punto de control G1 → S.

Si falta la proteína Rb o si una mutación altera su capacidad, el freno molecular del ciclo celular desaparecerá y la célula avanzará despreocupadamente hacia la fase S.

La pérdida del control normal del ciclo celular es esencial para la transformación maligna y que en la inmensa mayoría de los cánceres humanos existe una mutación de al menos uno de los cuatro reguladores clave del ciclo celular (p16, ciclina D, CDK4, Rb) (114,115).

- B)** Gen p53. El otro gen supresor del cáncer, se trata de la diana más frecuente de las alteraciones genéticas en el cáncer humano (116).

El gen p53 actúa como policía molecular, impidiendo la propagación de células genéticamente dañadas. El p53 es imprescindible cuando se requiere la aplicación de frenos de emergencia, como cuando la radiación, la luz UV o las sustancias químicas mutágenas dañan el ADN.

El gen p53 bloquea también la angiogénesis. La angiogénesis se relaciona con el grado y el estado del tumor y el pronóstico del cáncer. Los tejidos normales y adenomas poseen una angiogénesis baja, mientras que en cáncer la angiogénesis aumenta en relación al estado y grado del tumor (117,118).

Esta pausa permite que la célula tenga tiempo para reparar la lesión del ADN. Además, p53 ayuda a ese proceso de manera directa, induciendo la transcripción de GADD45, una proteína que interviene en la reparación del ADN. Si la reparación del ADN es satisfactoria, p53, activará a un gen denominado mdm2, cuyo producto se une e inhibe a la propia p53, levantando así el bloqueo del ciclo celular. Si no se logra reparar la lesión del ADN, la proteína p53 normal, enviará a la célula al cementerio, induciendo la activación de los genes promotores de la apoptosis. Los genes que responden a las órdenes de muerte celular emanadas de p53 son bax e IGF-BP3. Bax se une y contrarresta a la proteína bcl-2, un inhibidor de la apoptosis. Se ha demostrado que en los carcinomas orales de células escamosas existe un descenso de la expresión de bcl-2 (119,120).

Existen mecanismos que pueden inactivar las funciones del gen p53. Las proteínas transformadoras de varios virus DNA, entre ellas la proteína E6 de los virus del papiloma humano, el virus de Epstein-Barr y el virus del Herpes simple tipo 6 y 8, pueden unirse y degradar a p53.

Usualmente, la p53 se expresa en niveles bajos en los tejidos normales, con unas 5.000 copias por células (121). Las proteínas mutadas tienen una vida más prolongada, de hasta 48 horas, en comparación con

los 5 a 30 minutos de la proteína. Esto favorece la acumulación de la proteína y su detección mediante métodos inmunohistoquímicos. Sin embargo, no todas las mutaciones se acompañan de una sobreexpresión de la proteína. Por todo ello la determinación inmunohistoquímica puede conducir a estimaciones incorrectas, que deben complementarse por métodos moleculares tales como la secuenciación tras la realización de una PCR o un análisis SSCP, el cual, es capaz de detectar eficientemente el 90% de las mutaciones del p53. El que exista inmunorreactividad para el p53 en las lesiones displásicas, en las leucoplasias orales con y sin displasia, en el carcinoma in situ, así como en las áreas mucosas de apariencia normal de los márgenes periféricos de los carcinomas, permite sugerir que la expresión del p53 es un hecho muy precoz en la transformación neoplásica, probablemente en asociación a otros factores tales como la infección HPV o el hábito del tabaco, y que su identificación podría ser de utilidad clínica a la hora de predecir qué pacientes tienen riesgo de progresión neoplásica, estableciéndose como un posible biomarcador en el diagnóstico precoz de esas neoplasias (122-125).

La radiación y la quimioterapia, los dos tipos más frecuentes del tratamiento del cáncer, ejercen sus efectos induciendo una lesión del ADN y la consiguiente apoptosis. Los tumores que conservan

genes p53 normales tienen mayores probabilidades de responder a estos tratamientos que los portadores p53 mutantes ⁽¹²⁶⁾.

c) Gen p73. En condiciones adecuadas, de igual manera que el gen p53, puede detener el ciclo celular y provocar la apoptosis.

d) Genes BRCA-1 y BRCA-2. Son dos genes supresores del cáncer. Ni el BRCA-1 ni el BRCA-2 se encuentran inactivados en la mayoría de los carcinomas de células escamosas, por lo que se cree, que existen nuevos genes supresores tumorales implicados.

o *Moléculas que regulan la transducción de señales*

La regulación a la baja de las señales promotoras del crecimiento es también un área potencial en la que podrían intervenir los productos de los genes supresores del cáncer, como es el caso de los productos de los genes.

o *Receptores de la superficie celular*

Estas moléculas son los receptores de los factores inhibidores del crecimiento, como TGF-B, y proteínas que regulan las adherencias celulares como las cadherinas. Las cadherinas son una familia de glucoproteínas que actúan como adhesivos de las células epiteliales. Su pérdida favorecería al fenotipo maligno, permitiendo una separación más fácil de sus células, que de este modo podrían infiltrar los tejidos y metastatizar con más facilidad.

▪ ***Genes que regulan la apoptosis***

La apoptosis es el punto final de una cascada de acontecimientos moleculares que conducen a la activación de las enzimas proteolíticas responsables de la muerte celular.

Los genes que regulan la apoptosis son el bcl-2, que protege a los linfocitos de la apoptosis, y también otros como bax, bad y bcl-xS que favorecen la muerte celular programada ⁽¹²⁸⁾.

El cociente entre los antagonistas de la muerte (bcl-2, bcl-xL) y sus promotores (bax, bcl-xS, bad, bid) determina la forma en que la célula responde a un estímulo apoptótico. La acción proapoptótica del gen supresor del cáncer p53 parece depender de la regulación en el alza del gen bax.

La activación de p53 provoca un aumento en la síntesis de bax, contrarrestando así la acción antiapoptótica de bcl-2.

1.8.4 Marcadores pronóstico de cáncer oral.

Los carcinomas epidermoides son graduados histológicamente de bajo a alto grado, así como determinados por grado de queratinización, pleomorfismos nuclear, y frecuencia de mitosis. Los tumores de bajo grado muestran queratinización más extensa, mitosis infrecuentes y poco pleomorfismo nuclear y con frecuencia mantiene la orientación de basal hacia las capas queratinizadas, mientras que los tumores de alto grado muestran poca queratina, muchas mitosis, y extremado pleomorfismo nuclear.

1.8.4.1 *Expresión tumoral*

Los investigadores han intentado correlacionar el grado histológico con el pronóstico ^(128,129). La dificultad de dichos estudios en predecir el pronóstico es la amplia variedad de interpretaciones patológicas. Como resultado, el valor práctico de la graduación histológica como factor predictivo esta sin resolver en la actualidad.

Los factores clínicos pronósticos más significativos respecto a la supervivencia en al análisis de regresión de Cox según el análisis multivariante de Pizarro y Cols. ⁽¹³⁰⁾ son el volumen tumoral, la presencia de metástasis linfáticas cervicales, márgenes quirúrgicos positivos, espesor máximo tumoral y el grado nuclear. En una serie de 256 casos de la región de Murcia, Mateo MM y cols. ⁽¹³¹⁾ consideran que el principal factor relacionado con las recidivas locales ha sido el tamaño lesional; con las recidivas regionales la presencia de adenopatías en el momento del diagnóstico, y con la supervivencia la clasificación clínica. Esta opinión es compartida por Martínez y cols. ⁽¹³²⁾ que concluye que la variable que más afectó a la supervivencia en el momento del diagnóstico fue el tamaño tumoral, por supuesto en la relación con el tiempo de evolución hasta la primera consulta.

1.8.4.2 *Metástasis*

Otra información pronóstica importante que está disponible desde la evaluación histopatológica de la biopsia del cáncer primario o de la resección del espécimen, incluye los hallazgos de la invasión perineural, linfática y/o vascular. La invasión perineural (IPN) se ha correlacionado con metástasis de los ganglios linfáticos cervicales (23% IPN vs 9% no IPN), (268,269,270) diseminación extracapsular ⁽¹³³⁾, y supervivencia (54% mortalidad IPN vs 25% mortalidad no IPN) ⁽¹³⁴⁾. La invasión linfática no ha sido correlacionada significativamente con la invasión de los ganglios linfáticos del cuello, mientras que la invasión microvascular se ha correlacionado significativamente con metástasis ganglionar cervical ^(134,135).

1.8.4.3 *Marcadores*

Pande y cols ⁽¹³⁶⁾ estiman que la escasez de marcadores moleculares que definan claramente el pronóstico impide predecir la evolución de los carcinomas epidermoides de la cavidad oral. En su estudio valoran el significado pronóstico de las variaciones en la expresión de las proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular y en la diseminación locoregional del cáncer oral. Las alteraciones en la expresión de las proteínas p53, pRb, p16, MDM2, p21 y Ets-1 fueron determinadas por análisis inmunohistoquímico de las muestras de tejido tumoral. El análisis de los múltiples factores biológicos moleculares arrojó en una muestra de 105 casos una sobreexpresión

de la p53 del 66%, del MDM2 en el 69%, de la p21 en el 54%, en la Ets-1 en el 61% y la pérdida de pRb fue observada en el 55% y la de la p16 en el 69%. Como dato interesante, el análisis multivariable reveló que la pérdida de pRb era el factor de predicción más significativo para los tumores de avanzado estadiaje [p=0.001; OR=3.5] y que la sobreexpresión de la proteína Ets-1 fue un factor de riesgo independiente para la metástasis linfáticas regionales ($P < 10^{-6}$; OR=10.1).

- **P53:**

La proteína P53 se ha convertido desde su descubrimiento en 1979 en la molécula con mayor implicación en el desarrollo de las neoplasias humanas. La detección inmunohistoquímica de p53 en tumores, pero no en tejidos normales indujo a la creencia de que se trataba de un oncogen, pero posteriormente se descubrió que la proteína acumulada en los tejidos tumorales se debía a una mutación en el gen TP53 que estabilizaba la proteína inactivándola y alargando su vida media, lo que permitía su acumulación en el núcleo celular y su detección inmunohistoquímica.

Aunque el mecanismo de acción de la p53 es a través de regulación positiva o negativa de transcripción génica, su papel biológico es probablemente el de proteger a la célula del daño del ADN por agentes físicos y químicos mediante el retraso del ciclo celular hasta que el daño se repare o bien si este mecanismo falla, mediante la inducción de la muerte programada o apoptosis.

Se han detectado mutaciones en el 50% de los cánceres humanos, las mutaciones en p53 son las alteraciones más frecuentes en los carcinomas de cabeza y cuello y si bien la sobreexpresión de la proteína se asocia a la acumulación de la forma mutada de ésta, puede existir mutación sin sobreexpresión y situación inversa.

Las alteraciones de p53 son un fenómeno temprano en la transformación neoplásica en los carcinomas escamosos de la cavidad oral. Se relaciona el consumo de alcohol y especialmente de tabaco con las mutaciones en la secuencia del gen y su mecanismo íntimo estaría mediado por algunos carcinógenos del tabaco como benzopirenos y nitrosaminas que provocarían transversiones de bases nitrogenadas del gen. Las lesiones preneoplásicas también son portadoras de alteraciones de p53, lo que sugiere que las alteraciones de p53 facilitan el fenotipo maligno es un hecho precoz. Hasta la fecha no se ha podido demostrar el valor pronóstico de alteraciones de p53 en el carcinoma escamoso oral ⁽¹³⁷⁾.

Desde el punto de vista clínico también es importante la valoración de p53 de cara a la detección precoz de recidivas, y si aquellos pacientes con la misma mutación en los bordes de resección que en el tumor presentan una mayor tasa de recidivas locales, el determinar la existencia de mutaciones en los bordes de resección indicaría la necesidad o al menos la conveniencia de asociar un tratamiento coadyuvante.

De todos modos y puesto que la mutación no es el único mecanismo que inactiva al p53, la acumulación de la proteína no es un marcador seguro de mutación subyacente de P53 en el carcinoma de cavidad. Por otro lado la unión con oncoproteínas víricas como la proteína E6 del virus del papiloma humano inactivan también la proteína supresora ⁽¹³⁸⁾.

En términos generales se puede decir que la mutación de P53 se correlaciona con un fallo para inducir o bien la parada del ciclo celular en la fase G1 o bien la apoptosis ⁽¹³⁹⁾. Este último mecanismo es el responsable más directo de la resistencia de muchos cánceres a agentes químicos y radioterapéuticos. En consecuencia las células con p53 mutada serían más resistentes a terapias que dependan del daño del ADN, para matar las células cancerosas. Aunque el mecanismo de acción no está totalmente determinado se baraja la posibilidad de que se produzca una ausencia de apoptosis, o que aparezca o no un receptor transmembrana que permita el paso del fármaco al interior de la célula y cuya transcripción depende del p53.

Una nueva perspectiva en el tratamiento de los cánceres de cabeza y cuello se ha abierto al utilizar la transferencia génica de p53 normal vehiculizada mediante adenovirus y los estudios realizados sobre líneas celulares cancerosas orientados a tratar los focos microscópicos tumorales que permanecen tras la

cirugía, mediante la detención del crecimiento tumoral a través de inducción a apoptosis, han sido prometedores en este sentido.

- ***Bcl-2:***

El Bcl-2 al igual que la p53 se ha relacionado con la apoptosis tanto por vías dependientes como independientes. Su sobreexpresión parece conferir a las células resistencias a las drogas citotóxicas presumiblemente por su capacidad para inhibir la apoptosis inducida por quimioterapia. La p53 disminuye la expresión de bcl-2 y por tanto su alteración aumentaría la expresión de bcl-2, su interacción juega un papel crítico en la progresión tumoral y la respuesta al tratamiento ⁽¹⁴⁰⁾.

El gen bcl-2 codifica una familia de proteínas de 25 Kd, que se localizan en la membrana externa mitocondrial, en la envoltura nuclear y en el retículo endoplásmico de las células ^(141,142). Se ha visto una sobreexpresión de bcl-2 en neoplasias hematopoyéticas y en variados tumores sólidos incluyendo cánceres orales.

La proteína bcl-2 se encuentra en muchos linfocitos B y T normales y su expresión disminuye en los centros germinales estimulados para la proliferación. El gen bcl-2 fue identificado por primera vez como el gen implicado en los linfomas B de células foliculares, de los cuales el 85% tiene como característica común la translocación del gen bcl-2 a la posición 14q32 ⁽¹⁴³⁾.

La familia de bcl-2 se divide en dos grupos de proteínas, proapoptóticas como bax, bad y bak y antiapoptóticas como bcl-2, bcl-xL, mcl-1 y A1, según su estructura química ⁽¹⁴⁴⁻¹⁴⁶⁾. Las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas forman heterodímeros en los que se produce la inhibición de la actividad del otro respectivamente. Esta dimerización se ve influenciada por la fosforilación de los residuos terminales de aminoácidos de los miembros proapoptóticos, bax, bak y bik. Así pues, la apoptosis está muy relacionada con la fosforilación de las proteínas de la familia bcl-2 ⁽¹⁴⁴⁾. El protooncogén bcl-2 bloquea una vía común de apoptosis, impidiendo que el ADN dañado actúe como una señal de activación de muerte celular programada o mediante el bloqueo de los propios productos de los genes implicados en la muerte celular programada. Por lo tanto su acción es prevenir la muerte prematura de las células mitóticas y prolongar la supervivencia celular para favorecer la aparición de más mutaciones ⁽¹⁴⁰⁾. La proteína bcl-2 no transforma las células por sí misma, pero las hace susceptibles de ser transformadas por otros oncogenes como myc ⁽¹⁴⁷⁾.

- *Caspasa-3:*

Otro grupo de proteínas, las cistein-proteasa son mediadores esenciales de los procesos de apoptosis y también están implicadas en procesos de maduración proteica como en el caso del sistema inmune. Dentro de estas proteínas está la familia de las caspasas formadas por dos grupos el inflamatorio y el apoptótico,

de estas cabría destacar la caspasa-3. Ambos grupos presentan similitudes en cuanto a la especificidad de sustrato, el segundo se caracteriza por el procesamiento de productos que desencadenarían cambios celulares incluyendo degradación del ADN, condensación de cromatina y desintegración de membrana plasmática.

Las caspasas efectoras o iniciadoras una vez activadas, aseguran que la célula inevitablemente sufrirá apoptosis. Fallos en los procesos mediados por las caspasas son algunos de los responsables del desarrollo de los tumores.

Las caspasas pertenecen a una familia de cisteinoproteasas que dividen sus sustratos específicamente después del ácido aspártico. Se han identificado 14 caspasas en mamíferos implicadas en la apoptosis.

Son sintetizadas como proenzimas (zimógenos) de 30-50 KD y requieren un proceso de proteólisis para ser activados ⁽¹⁴²⁾ que comprende una cascada de precursores y coenzimas (similar a las serin-proteasas en la cascada de la coagulación) ⁽¹⁴⁸⁾, en la que las caspasas constituyen los componentes centrales de la maquinaria proteolítica ⁽¹⁴⁹⁾.

De todas las caspasas, la caspasa-3 ha sido caracterizada como la más directamente vinculada a la apoptosis. Se ha sugerido que la expresión de la caspasa-3 aumenta la vulnerabilidad a la apoptosis o activa por sí misma la cascada de la apoptosis o hace ambas cosas a la vez. La caspasa-3 se ha identificado en un amplio número de neoplasias benignas y malignas tales como ameloblastoma, carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón, neuroblastoma y linfoma. Algunas células normales, entre las que no se encuentran las células de Schwann, también expresan la caspasa-3 ⁽¹⁵⁰⁾.

- ***Ki-67:***

Ki-67 es una proteína nuclear no histónica expresada en las células durante las fases activas del ciclo celular (G1,S,G2,M), y ausente en las células en estado de reposo (G0), por lo tanto, el anticuerpo monoclonal ki-67 permite la detección inmunohistoquímica de células que completan un ciclo y su expresión proporciona una medida directa de la fracción de crecimiento celular^(151,152).

Por lo tanto, Ki-67 puede emplearse para medir la fracción de crecimiento en los tejidos normales y en las neoplasias malignas. Estudios previos han demostrado que los altos índices de Ki-67 observados en carcinomas orales de células escamosas estaban correlacionados con la gravedad de la enfermedad y con un pronóstico malo ^(153,154).

La capa basal del epitelio oral 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 (151).

2.-HIPÓTESIS

En la última década se ha producido un enorme avance en el conocimiento de los mecanismos de control de la proliferación celular en los que interviene un complejo engranaje de moléculas que actúan favoreciendo unas e inhibiendo otras, la progresión de la célula a lo largo de su ciclo de división. El cáncer conlleva una alteración de sistema de regulación con la consiguiente proliferación incontrolada. Por tanto conocer las alteraciones en las moléculas que intervienen en el control del ciclo celular en biopsias tumorales contribuirá a comprender la patogenia de este grave problema médico y, tal vez a realizar un diagnóstico, pronóstico, y abordaje terapéutico más adecuados.

Pero el cáncer no es una enfermedad única, sino un conjunto de enfermedades que aunque comparten ciertas características, presentan un comportamiento biológico diferente dependiendo de factores como la localización, el tipo histológico, el estadio clínico e incluso, la denominada "susceptibilidad individual" del paciente. Tumores idénticos en los parámetros referidos en diferentes pacientes puedan presentar diferente evolución. Esto indica que, probablemente, existen factores biológicos, celulares y moleculares aún mal caracterizados, que condicionan el pronóstico.

Nuestra hipótesis de trabajo considera que el análisis inmunohistoquímico de la expresión de la proteína reguladora del ciclo celular p53, del marcador de proliferación celular ki-67, del inhibidor de apoptosis bcl-2 y del marcador de apoptosis caspasa-3 puede aportar información valiosa para el diagnóstico de campos malignos y premalignos de la cavidad oral y para la evaluación del riesgo de desarrollo de tumores múltiples, ya que algunas de ellas derivan de genes que se alteran en los campos premalignos (p53 y bcl-2) y otras trasducen eventos que claramente están implicados en el desarrollo de cáncer, como la proliferación celular (ki-67), y la apoptosis (caspasa-3).

3.-OBJETIVOS

Los objetivos que pretenden este trabajo son:

- 1º Analizar la expresión en el epitelio tumoral así como en el epitelio adyacente no tumoral de los carcinomas escamosos y lesiones premalignas de la cavidad oral de cuatro proteínas claves en el control del ciclo celular, p53, Bcl-2, KI-67 y caspasa-3.
- 2º Observar si alteraciones en la expresión de esas proteínas en los carcinomas escamosos orales podrían estar correlacionados con factores pronósticos, tales como el grado de diferenciación histológica, el estadio clínico de la lesión o su localización.
- 3º Determinar si la expresión de las proteínas estudiadas en las lesiones de la región oral podrían tener un valor pronóstico, condicionando la supervivencia y/o a la recidiva en los carcinomas y la evolución a carcinomas en las displasias.

4.-PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

a. **Diseño del estudio.** Se ha realizado un estudio transversal retrospectivo sobre una selección de 30 pacientes diagnosticados de Carcinoma Oral de Células Escamosas y de los que se tenían material biopsiado en bloques de parafina (Fig. 1). Todos ellos procedían del Hospital de Txagorritxu (Osakidetza - Vitoria) durante el periodo comprendido entre los años 2000 y 2006. El presente trabajo ha obtenido la evaluación positiva del Comité Ético de la Universidad de Granada para la experimentación con humanos.



Figura 1. Bloques de parafina de los 30 casos seleccionados

b. **Toma de datos.** Para la selección y toma de datos del paciente, se cumplimentó un protocolo previamente diseñado, con los datos clínicos más relevantes desde el punto de vista pronóstico. Con todos estos datos se cumplimentó una ficha individual por caso (véase anexo). Los datos y las variables que se registraron fueron los siguientes:

- Número de historia clínica.
- Edad.
- Sexo: Varón, mujer.
- Hábito de fumar: no fuma; fumador de menos de 1 cajetilla/día; fumador de 1 cajetilla o más/día.
- Hábito de beber: no bebe; bebe menos de un litro de vino/día; bebe un litro de vino o más/día.

- Estado de la boca: en buen estado; séptica; faltan piezas; portador de prótesis.
- Motivo de consulta: dolor; presencia de lesión/bulto/úlceras.
- Localización: lengua; frenillo/ suelo de la boca; trigono molar; paladar.
- Aspecto macroscópico: ulceroso; verrugoso; vegetante.
- Tamaño del tumor: de 0 a 1 cm.; de 1 a 3 cm.; más de 3 cm.
- Presencia de adenopatías.
- Scanner: lingual sin afectación ósea; lingual con afectación ósea; trigono molar; paladar duro/blando.
- Estadía: T1N0M0; T2N0M0; T3N0M0; T2N1M0; T3N1M0; T3N2M0; T4N1M0.
- Tratamiento: hemiglosectomía con/sin vaciamiento ganglionar; glosectomía con/sin vaciamiento ganglionar; radioterapia/quimioterapia; resección tumoral.
- Evolución: sin recidiva; alta; falleció.
- Grado de diferenciación: poco diferenciado; moderadamente diferenciado; bien diferenciado; basaloide.

c. **Criterios de inclusión y exclusión.** Los criterios de inclusión y exclusión para ser admitidos en el trabajo fueron los siguientes:

Los **criterios de inclusión:**

- Presentar un carcinoma de células escamosas en la región oral.
- Ser la primera vez que el paciente acudía al centro médico por esa causa.
- No presentar metástasis ganglionares a distancia en el momento diagnóstico (estadios I y II).
- No haber recibido tratamiento radioterápico, quimioterápico o quirúrgico previo.

Los **criterios de exclusión**:

- Historias clínicas incompletas, tanto de filiación del paciente como de datos de la enfermedad.
- Casos donde no se podía asegurar la localización oral del tumor primario.
- Bloques con insuficiente material diagnóstico para realizar el análisis.
- Pacientes que habían fallecido por otra causa distinta al tumor, por lo cual no podremos evaluar la evolución.

d. **Técnica inmunohistoquímica.**

Para el análisis inmunohistoquímico de las muestras se utilizó la "Técnica de la peroxidasa-antiperoxidasa" (Sistema de visualización ratón/conejo), aplicándola a los cuatro Ac de nuestro estudio:

- Bcl-2
- p 53
- Ki 67
- Caspasa 3

Los **pasos** son los siguientes:

Paso 1: Se corta y se deja 24 horas a 37 °C, (la sección de corte del tejido ha de ser de 3 micras de grosor) (Figs. 2 y 3).



Figuras 2 y 3. Corte de los bloques de parafina

Paso 2: Se desparafina con tres lavados de xilol de 15 min cada uno.

Paso 3: Se hidrata mediante tres lavados de 3 minutos de duración cada uno, en una batería de alcoholes decrecientes.

Paso 4: Se hacen lavados en baños de "PBS" (fosfatos)

Paso 5: Se regenera (RECUPERACION ANTIGENICA) (Desenmascaramiento del antígeno) (Fig. 4), en una olla con "Target Retroviral Solution, PH 9", durante 5 minutos a temperatura ambiente.



Figura 4. Muestra nuestras 4 proteínas Bcl-2, ki-67, Caspasa 3 y p53

Paso 6: Se aísla (mediante un lápiz de aceite) (Figs. 5 y 6).

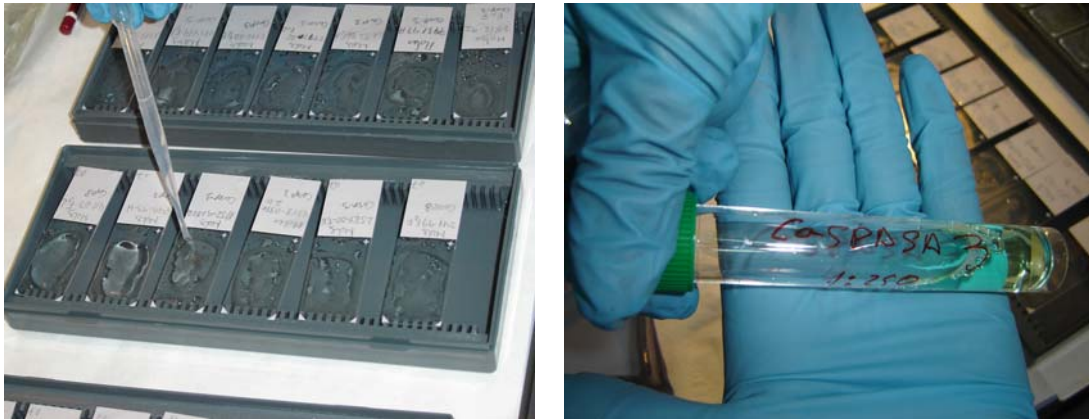


Figuras 5 y 6. Aislamiento de los bloques.

Paso 7: Se lleva a agua destilada

Paso 8: Se hacen lavados en baños de "PBS" (fosfatos)

Paso 9: Añadimos el bloqueante (Bloqueo enzimático) -Bloqueante de peroxidasa endógena - (Figs. 7 y 8), durante 10 min a temperatura ambiente.



Figuras 7 y 8. Una vez aislado realizamos el bloqueo enzimático con nuestras 4 proteínas

Paso 10: Volvemos a lavar, tres lavados en "PBS" durante 5 minutos.

Paso 11: Añadimos el anticuerpo primario en una disolución 1:100 (Fig. 9) e incubación a 4°C durante 24 horas.

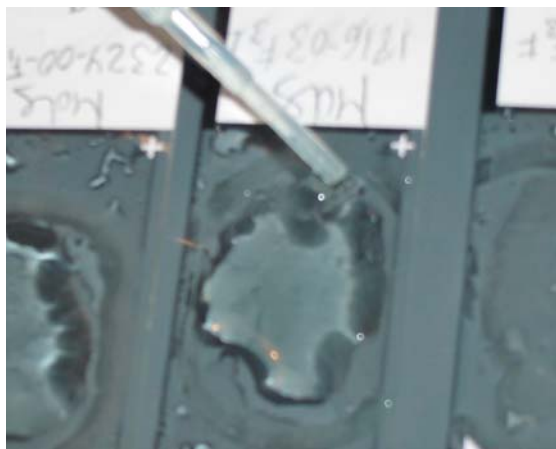


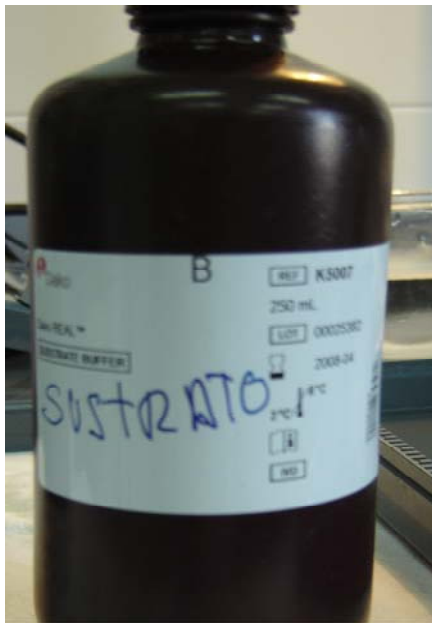
Figura 9. Se añade el Ac primario

Paso 12: Volvemos a lavar, tres lavados en "PBS" durante 5 minutos.

Paso 13: Añadimos el anticuerpo secundario, e incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Paso 14: Volvemos a lavar, tres lavados en "PBS" durante 5 minutos.

Paso 15: Añadimos el sustrato + [DAB (diaminobenzidina –revelador-) + cromógeno] SISTEMA DE REVELADO DE LA PEROXIDASA (Figs. 10 y 11).



Figuras 10 y 11. Procedemos al revelado de las muestras

Paso 16: Lavamos con agua destilada (En este punto lo podemos mirar al microscopio, si se ven puntos negros, es que se ha teñido la peroxidasa, lo que significa que la muestra es positiva a ese Ac.).

Paso 17: Contrateñimos con Hematoxilina de Mayer (Fig 12).

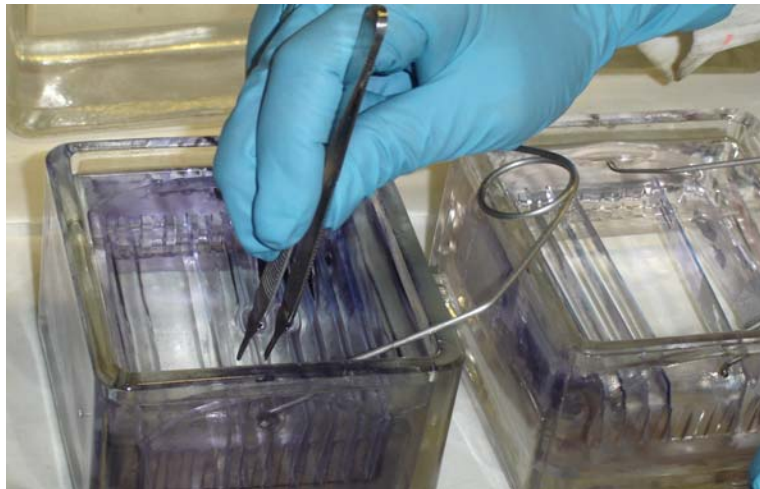


Figura 12. Primero contrateñimos y luego lavamos

Paso 18: Lo dejamos 10 minutos en Agua corriente.

Paso 19: Lo deshidratamos (mediante alcoholes crecientes).

Paso 20: Lo aclaramos (mediante un disolvente) (Fig. 13).



Figura 13

Paso 21: Lo pegamos (mediante un pegamento) (Figs.14 y 15).



Figuras 14 y 15

Estos dos últimos pasos es lo que se denomina "ACLARAR Y MONTAR"

Paso 22: Se deja secar durante 24 horas (Fig 16).



Figura 16

e. **Análisis estadístico:**

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS 17.0 para Windows.

Los métodos estadísticos utilizados fueron los siguientes (*SPSS*, 2007):

- Estadística descriptiva de las variables cuantitativas (procedimiento DESCRIPTIVE) para la descripción de las muestras: media, desviación estándar, máximo, mínimo, mediana, desviación estándar de la media, etc ⁽¹⁵⁵⁻¹⁵⁷⁾.
- Estadística descriptiva de las variables cualitativas (procedimiento FREQUENCIES), con la obtención de frecuencias y porcentajes de las categorías⁽¹⁵⁵⁻¹⁵⁷⁾.
- Tablas de contingencia para la relación entre variables cualitativas (procedimiento CROSSTABS). Test de la chi cuadrado (χ^2) para contrastar la independencia o influencia entre dos variables cualitativas, donde se emplea el test de la chi cuadrado de Pearson con información en cada casilla de la tabla de contingencia del porcentaje en fila⁽¹⁵⁵⁻¹⁵⁷⁾.

5.-RESULTADOS

5.1 Análisis descriptivo

▪ Edad

Obtuvimos los siguientes resultados:

La edad media fue de 59'15 años. Dentro de un rango de 28 a 91 años. La distribución de los rangos la observamos en el gráfico 2.

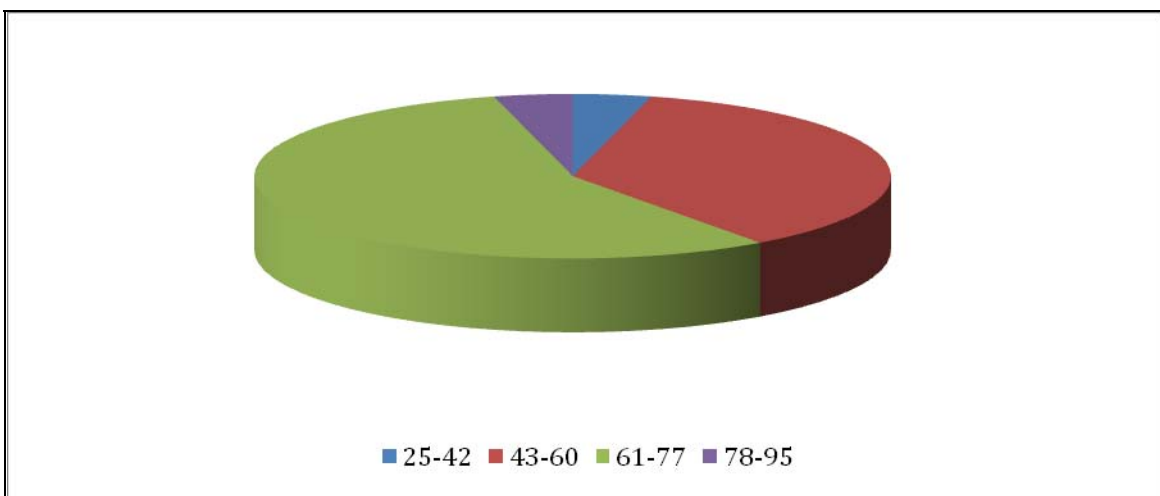


Gráfico 2: análisis descriptivo de la edad

▪ Sexo

De los 30 casos seleccionados, 25 fueron hombres y 5 mujeres.

▪ Motivo de ingreso

El dolor a la deglución fue el motivo de ingreso más frecuente (Grafico3).

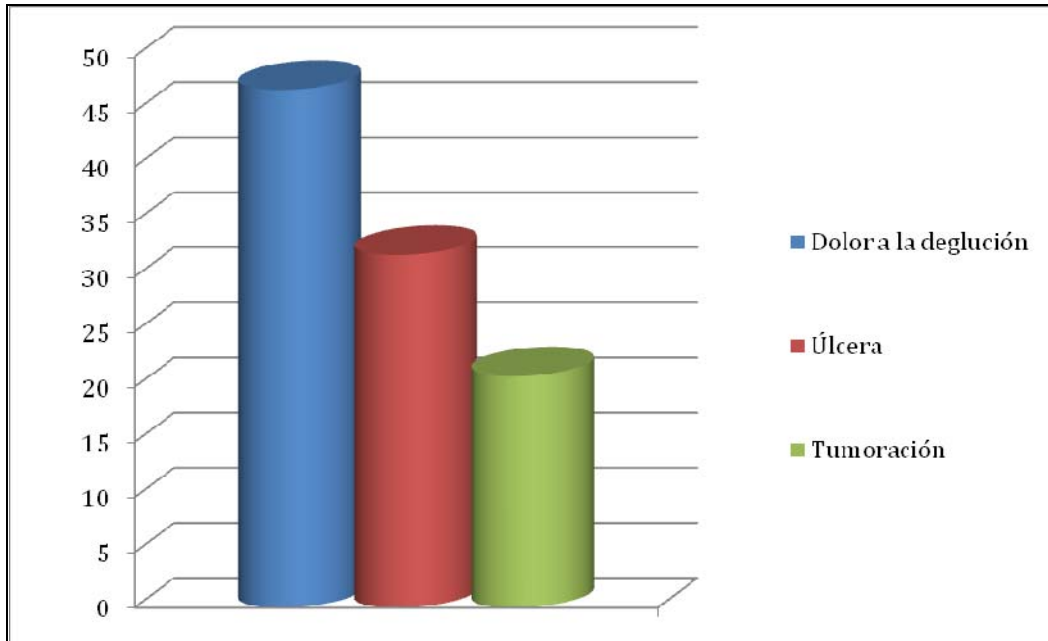


Grafico 3: análisis descriptivo del motivo de ingreso

▪ Localización

La lengua fue la zona de localización de la lesión más frecuente (Grafico 4)

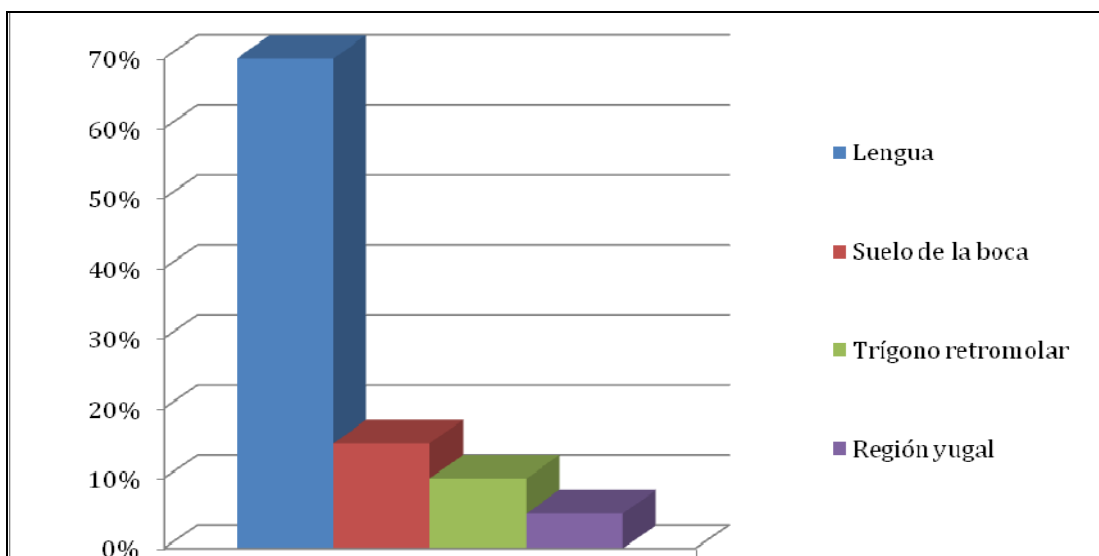


Grafico 4: análisis descriptivo de la localización

▪ Tamaño

El tamaño medio de las lesiones de los 30 casos fue de 2,21cm (Grafico 5)

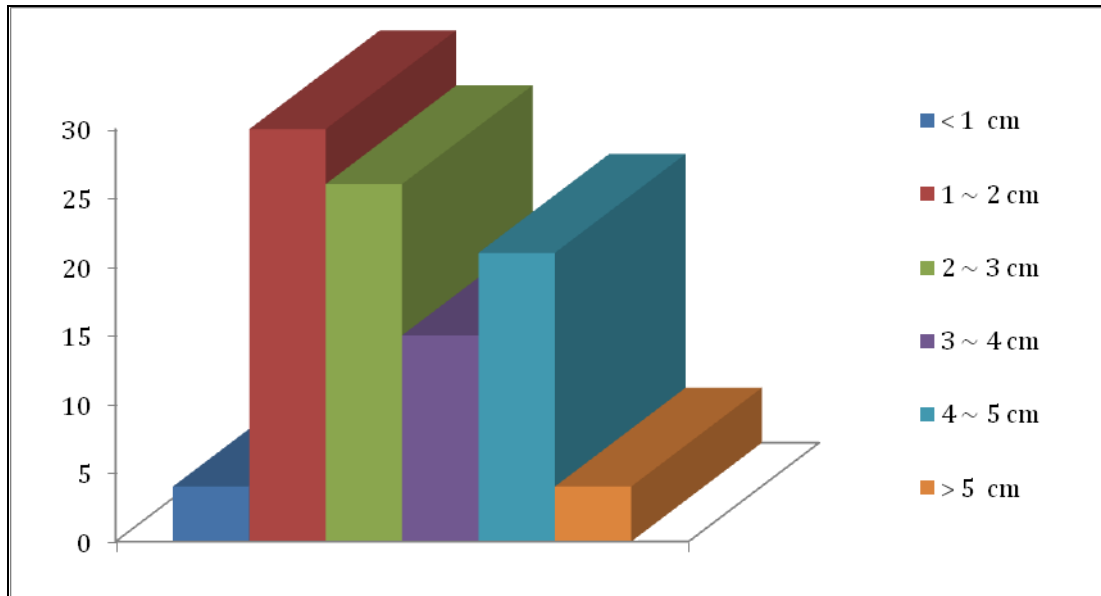


Grafico 5: análisis descriptivo del tamaño

▪ Factores

La mayor parte de los casos se trataba de pacientes fumadores y bebedores (Grafico 6).

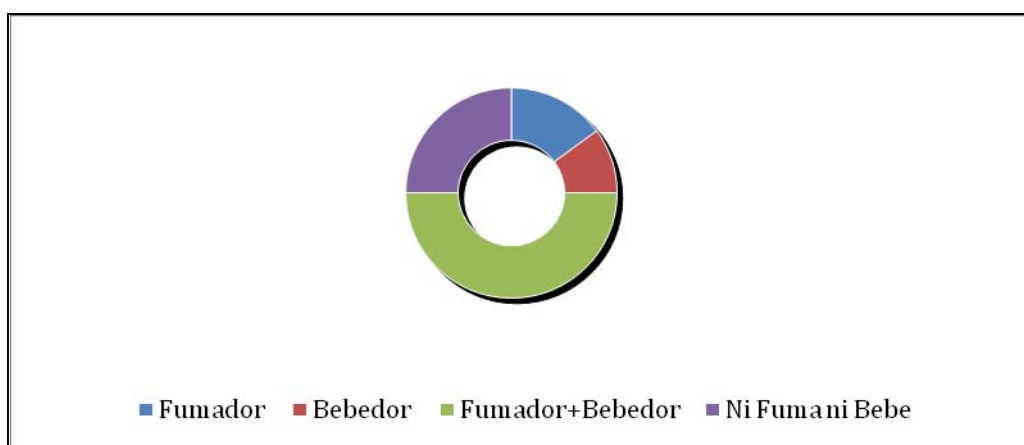


Grafico 6: análisis descriptivo de los factores

▪ Estadio

El estadio que presento un mayor número de casos fue T1N0M0 (Grafico 7).

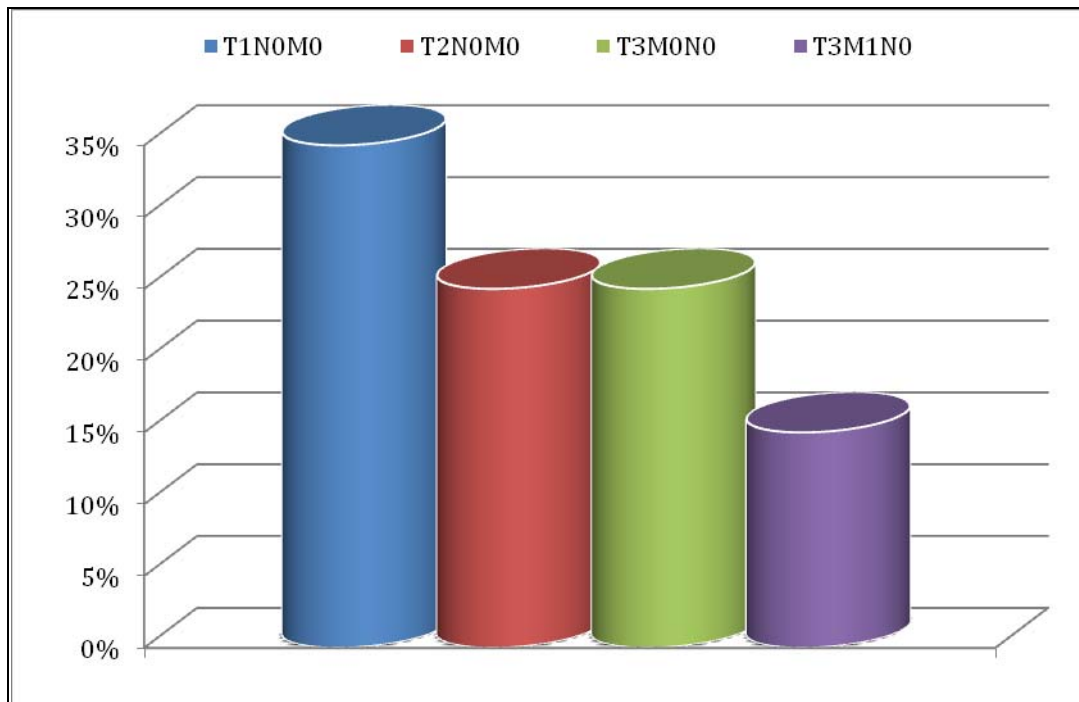


Grafico 7: análisis descriptivo de los diferentes estadios

▪ Tratamiento

La resección quirúrgica fue el tratamiento de elección en la mayoría de los casos (Grafico 8).

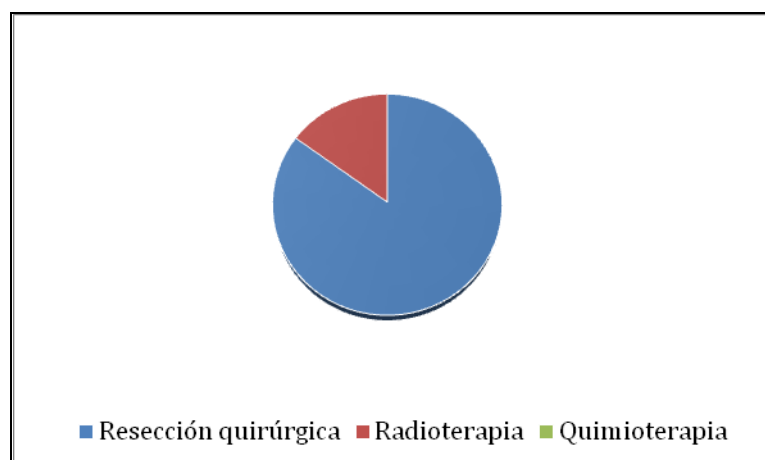


Grafico 8: análisis descriptivo de las distintas opciones terapéuticas

▪ Evolución

Los resultados fueron similares en los pacientes que presentaron recidiva y los que no (grafico 9).

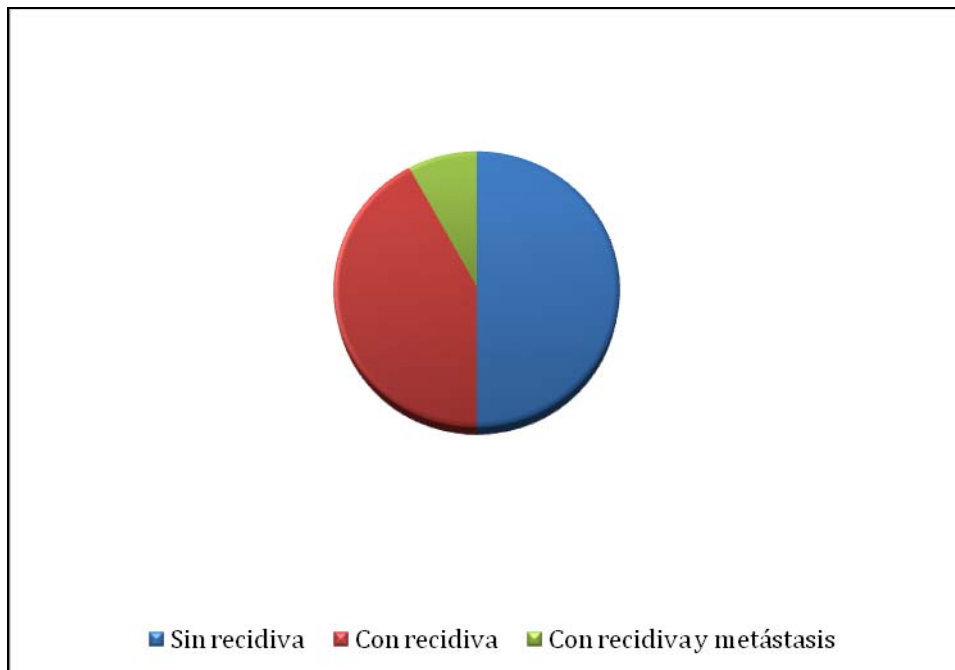


Grafico 9: análisis descriptivo de la evolución

5.2 Estadística analítica

A) Asociaciones entre la expresión de las 4 proteínas de nuestro estudio, P-53 (Fig 17-20), Caspasa3 (Fig 21-29), Bcl2 (30-35) y Ki67 (36-40) en el epitelio tumoral frente al epitelio no tumoral adyacente (Tabla 3-6). Podemos observar como la expresión de las proteínas en el epitelio tumoral presentaba una asociación estadísticamente significativa frente a la expresión en el epitelio no tumoral, excepto para ki-67.

Tabla 3. Asociación entre la expresión de **p53** en el epitelio tumoral y en el epitelio no tumoral adyacente al tumor (n=40)

p53 en tumor	p53 ENTA			p
	No hay epitelio n(%)	Negativo n(%)	Positivo n(%)	
Negativo	1(7.7)	11(84.6)	1(7.7)	p=0.035
I	1(25.0)	3(75.0)	0	
II + III + IV	5(25.0)	7(35.0)	8(40.0)	
III + III nuclear y citoplasmático	2(66.7)	1(33.3)	0	

Tabla 4. Asociación entre la expresión de **caspasa3** en el epitelio tumoral y en el epitelio no tumoral adyacente al tumor (n=28)

Caspasa3 en tumor	Caspasa3 ENTA			p
	No hay epitelio n(%)	Negativo n(%)	Positivo n(%)	
0-25%	7(31.8)	15(68.2)	0(0)	p=0.016
>25%	2(33.3)	2(33.3)	2(33.3)	

Tabla 5. Asociación entre la expresión de **Bcl2** en el epitelio tumoral y en el epitelio no tumoral adyacente al tumor (n=28)

Bcl2 en tumor	Bcl2 ENTA			p
	No hay epitelio n(%)	Negativo n(%)	Positivo n(%)	
0-25%	5(16.1)	26(83.9)	0(0)	p=0.001
>25%	4(40)	2(20)	4(40)	

Tabla 6. Asociación entre la expresión de **Ki67** en el epitelio tumoral y en el epitelio no tumoral adyacente al tumor (n=27)

Ki67 en tumor	Ki67 ENTA			p
	No hay epitelio n(%)	Negativo n(%)	Positivo n(%)	
0-25%	2(18.2)	3(27.3)	6(54.5)	NS
>25%	7(43.8)	1(6.3)	8(50)	

NS: No existe asociación estadísticamente significativa

B) Asociaciones entre la expresión de las 4 proteínas de nuestro estudio (P-53, Caspasa3, Bcl2 y Ki67) en el epitelio tumoral frente al epitelio infiltrado inflamatorio (Tablas 7-9). Observamos como no existieron asociaciones estadísticamente significativas entre la expresión de las proteínas en el epitelio tumoral frente a la expresión de las proteínas en el infiltrado inflamatorio, excepto para ki-67.

Tabla 7. Asociación entre la expresión de **caspasa3** en el epitelio tumoral y en el infiltrado inflamatorio (n=84)

Caspasa3 en tumor	Caspasa3 en infiltrado inflamatorio		p
	0-25% n(%)	>25% n(%)	
0-25%	18(28.6)	45(71.4)	NS
>25%	6(28.6)	15(71.4)	

NS: No existe asociación estadísticamente significativa

Tabla 8. Asociación entre la expresión de **Bcl2** en el epitelio tumoral y en el infiltrado inflamatorio (n=81)

Bcl2 en tumor	Bcl2 en infiltrado inflamatorio		p
	0-25% n(%)	>25% n(%)	
0-25%	27(47.4)	30(52.6)	NS
>25%	6(25)	18(75)	

NS: No existe asociación estadísticamente significativa

Tabla 9. Asociación entre la expresión de **Ki67** en el epitelio tumoral y en el infiltrado inflamatorio (n=81)

Ki67 en tumor	Ki67 en infiltrado inflamatorio		p
	0-25% n(%)	>25% n(%)	
0-25%	24(80)	6(20)	p=0.01
>25%	21(41.2)	30(58.8)	

C) Asociaciones entre la expresión de las 4 proteínas de nuestro estudio (P-53, Caspasa3, Bcl2 y Ki67) en los epitelios tumorales entre sí (Tablas 10-15). Únicamente existía una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de p53 y ki-67 en los epitelios tumorales.

Tabla 10. Asociación entre la expresión de **p53** y de **caspasa3** en el epitelio tumoral (n=28)

P53 en tumor	Caspasa3 en tumor		p
	0-25% n(%)	>25% n(%)	
Negativo	8(88.9)	1(11.1)	NS
I	3(75)	1(25)	
III+III nuclear y citoplasmático	8(61.5)	5(38.5)	
IV	2(100)	0(0)	

NS: No existe asociación estadísticamente significativa

Tabla 11. Asociación entre la expresión de **p53** y de **Bcl2** en el epitelio tumoral (n=29)

P53 en tumor	Bcl2 en tumor		p
	0-25% n(%)	>25% n(%)	
Negativo	8(88.9)	1(11.1)	NS
I	3(75)	1(25)	
III+III nuclear y citoplasmático	9(69.2)	4(30.8)	
IV	1(33.3)	2(66.7)	

NS: No existe asociación estadísticamente significativa

Tabla 12. Asociación entre la expresión de **p53** y de **Ki67** en el epitelio tumoral (n=28)

P53 en tumor	Ki67 en tumor		p
	0-25% n(%)	>25% n(%)	
Negativo	7(77.8)	2(22.2)	p=0.007
I	2(66.7)	1(33.3)	
III+III nuclear y citoplasmático	1(7.7)	12(92.3)	
IV	1(33.3)	2(66.7)	

Tabla 13. Asociación entre la expresión de **caspasa3** y de **Bcl2** en el epitelio tumoral (n=28)

Caspasa3 en tumor	Bcl2 en tumor		p
	0-25% n(%)	>25% n(%)	
0-25%	17(81)	4(19)	NS
>25%	4(57.1)	3(42.9)	

NS: No existe asociación estadísticamente significativa

Tabla 14. Asociación entre la expresión de **caspasa3** y de **Ki67** en el epitelio tumoral (n=27)

Caspasa3 en tumor	Ki67 en tumor		p
	0-25% n(%)	>25% n(%)	
0-25%	10(47.6)	11(52.4)	NS
>25%	1(17.6)	5(83.3)	

NS: No existe asociación estadísticamente significativa

Tabla 15. Asociación entre la expresión de **Bcl2** y de **Ki67** en el epitelio tumoral (n=28)

Bcl2 en tumor	Ki67 en tumor		p
	0-25% n(%)	>25% n(%)	
0-25%	9(45)	11(55)	NS
>25%	2(25)	6(75)	

NS: No existe asociación estadísticamente significativa

D) Asociaciones entre la expresión de las 4 proteínas de nuestro estudio (P-53, Caspasa3, Bcl2 y Ki67) en los epitelios no tumorales adyacentes entre sí (Tablas 16-21). Todas las asociaciones fueron estadísticamente significativas, especialmente importante la asociación entre p53 y ki-67, y la de caspasa3 y ki-67 en los epitelios no tumorales adyacentes al tumor.

Tabla 16. Asociación entre la expresión de **p53** y de **caspasa3** en el epitelio no tumoral adyacente al tumor (n=27)

p53 ENTA	caspasa3 ENTA			p
	No hay epitelio n(%)	Negativo n(%)	Positivo n(%)	
No	8(100)	0(0)	0(0)	p=0.000
Negativo	1(7.1)	11(78.6)	2(14.3)	
Positivo	0(0)	5(100.0)	0(0)	

Tabla 17. Asociación entre la expresión de **p53** y de **Bcl2** en el epitelio no tumoral adyacente al tumor (n=40)

p53 ENTA	Bcl2 ENTA			p
	No hay epitelio n(%)	Negativo n(%)	Positivo n(%)	
No	9(100)	0(0)	0(0)	p=0.000
Negativo	0(0)	19(86.4)	3(13.6)	
Positivo	0(0)	8(88.9)	1(11.1)	

Tabla 18. Asociación entre la expresión de **p53** y de **Ki67** en el epitelio no tumoral adyacente al tumor (n=28)

p53 ENTA	Ki67 ENTA			p
	No hay epitelio n(%)	Negativo n(%)	Positivo n(%)	
No	8(88.9)	0(0)	1(11.1)	p=0.000
Negativo	1(6.7)	5(33.3)	9(60.0)	
Positivo	0(0)	0(0)	4(100)	

Tabla 19. Asociación entre la expresión de **Caspasa3** y de **Bcl2** en el epitelio no tumoral adyacente al tumor (n=27)

Caspasa3 ENTA	Bcl2 ENTA			p
	No hay epitelio n(%)	Negativo n(%)	Positivo n(%)	
No	8(88.9)	1(11.1)	0(0)	p=0.000
Negativo	0(0)	15(93.8)	1(6.3)	
Positivo	0(0)	0(0)	2(100)	

Tabla 20. Asociación entre la expresión de **Caspasa3** y de **Ki67** en el epitelio no tumoral adyacente al tumor (n=21)

Caspasa3 ENTA	Ki67 ENTA			p
	No hay epitelio n(%)	Negativo n(%)	Positivo n(%)	
No	7(77.8)	1(11.1)	1(11.1)	p=0.020
Negativo	1(9.1)	4(36.4)	6(54.5)	
Positivo	0(0)	0(0)	1(100)	

Tabla 21. Asociación entre la expresión de **Bcl2** y de **Ki67** en el epitelio no tumoral adyacente al tumor (n=28)

Bcl2 ENTA	Ki67 ENTA			p
	No hay epitelio n(%)	Negativo n(%)	Positivo n(%)	
No	8(88.9)	0(0)	1(11.1)	p=0.000
Negativo	1(5.6)	5(27.8)	12(67.6)	
Positivo	0(0)	0(0)	1(100)	

E) Asociaciones entre la expresión de las 4 proteínas de nuestro estudio (P-53, Caspasa3, Bcl2 y Ki67) en los epitelios tumorales con el estadiaje (Tablas 22-26). Se observa como las cuatro proteínas se asociaron de una forma estadísticamente significativa con el estadiaje.

Tabla 22. Asociación entre el **Estadiaje** y la expresión de **p53** en el epitelio tumoral (n=87)

Estadiaje	P53 en Tumor				p
	Negativo n(%)	I n(%)	II + III + IV n(%)	III + III Nuclear y citoplas n(%)	
T1N0M0	12(36.4)	3(9.1)	18(54.5)	0(0)	p=0.000
T2N0M0	3(11.1)	6(22.2)	15(55.6)	3(11.1)	
T2N1M0	3(100)	0(0)	0(0)	0(0)	
T3N0M0	6(66.7)	0(0)	3(33.3)	0(0)	
T3N1M0	3(33.3)	3(33.3)	0(0)	3(33.3)	
T4N1M0	0(0)	0(0)	3(50)	3(50)	

Tabla 23. Asociación entre el **Estadía**je y la expresión de **Caspasa3** en el epitelio tumoral(n=84)

Estadíaje	Caspasa3 en tumor		p
	0-25% n(%)	>25% n(%)	
T1N0M0	24(72.7)	9(27.3)	p=0.019
T2N0M0	15(55.6)	12(44.4)	
T2N1M0	3(100)	0(0)	
T3N0M0	9(100)	0(0)	
T3N1M0	6(100)	0(0)	
T4N1M0	6(100)	0(0)	

Tabla 24. Asociación entre el **Estadía**je y la expresión de **Bcl2** en el epitelio tumoral(n=87)

Estadíaje	Bcl2 en tumor		p
	0-25% n(%)	>25% n(%)	
T1N0M0	18(54.5)	15(45.5)	p=0.010
T2N0M0	24(88.9)	3(11.1)	
T2N1M0	3(100)	0(0)	
T3N0M0	9(100)	0(0)	
T3N1M0	6(66.7)	3(33.3)	
T4N1M0	3(50)	3(50)	

Tabla 25. Asociación entre el **Estadía**je y la expresión de **Ki67** en el epitelio tumoral(n=84)

Estadíaje	Ki67 en tumor		p
	0-25% n(%)	>25% n(%)	
T1N0M0	9(27.3)	24(72.7)	p=0.000
T2N0M0	6(25)	18(75)	
T2N1M0	3(100)	0(0)	
T3N0M0	9(100)	0(0)	
T3N1M0	3(33.3)	6(66.7)	
T4N1M0	3(50)	3(50)	

F) Asociaciones entre la expresión de las 4 proteínas de nuestro estudio (P-53, Caspasa3, Bcl2 y Ki67) en los epitelios tumorales con la evolución (Tablas 26-29). Las cuatro proteínas se asociaron de una forma estadísticamente significativa con la evolución.

Tabla 26. Asociación entre la **Evolución** y la expresión de **p53** en el epitelio tumoral (n=87)

Evolución	P53 en tumor				p
	Negativo n(%)	I n(%)	II + III + IV n(%)	III + III Nuclear y citoplas n(%)	
Sin Recidiva	12(23.5)	6(11.8)	30(58.8)	3(5.9)	p=0.007
Alta	0(0)	0(0)	3(100)	0(0)	
Falleció	15(45.5)	6(18.2)	6(18.2)	6(18.2)	

Tabla 27. Asociación entre la **Evolución** y la expresión de **Caspasa3** en el epitelio tumoral (n=84)

Evolución	Caspasa3 en tumor		p
	0-25% n(%)	>25% n(%)	
Sin Recidiva	30(58.8)	21(41.2)	p=0.000
Alta	3(100)	0(0)	
Falleció	30(100)	0(0)	

Tabla 28. Asociación entre la **Evolución** y la expresión de **Bcl2** en el epitelio tumoral (n=82)

Evolución	Bcl2 en tumor		p
	0-25% n(%)	>25% n(%)	
Sin Recidiva	42(82.4)	9(17.6)	p=0.003
Alta	0(0)	3(100)	
Falleció	21(63.6)	12(36.4)	

Tabla 29. Asociación entre la **Evolución** y la expresión de **Ki67** en el epitelio tumoral (n=84)

Evolución	Ki67 en tumor		p
	0-25% n(%)	>25% n(%)	
Sin Recidiva	15(31.3)	33(68.8)	p=0.040
Alta	0(0)	3(100)	
Falleció	18(54.5)	15(45.5)	

G) Asociaciones entre la expresión de las 4 proteínas de nuestro estudio (P-53, Caspasa3, Bcl2 y Ki67) en los epitelios tumorales con el grado de diferenciación (Tablas 30-33). Las cuatro proteínas se asociaron de una forma estadísticamente significativa con el grado de diferenciación.

Tabla 30. Asociación entre el **grado de diferenciación** y la expresión de **p53** en el epitelio tumoral (n=78)

Grado de diferenciación	P53 en tumor				p
	Negativo n(%)	I n(%)	II+III+IV n(%)	III + III Nuclear y citoplas n(%)	
Poco diferenciado	0(0)	0(0)	18(100)	0(0)	p=0.000
Moderadamente dif	12(57.1)	0(0)	6(28.6)	3(14.3)	
Bien diferenciado	12(36.4)	9(27.3)	12(36.4)	0(0)	
Basaloide	0(0)	0(0)	3(50)	3(50)	

Tabla 31. Asociación entre el **grado de diferenciación** y la expresión de **caspasa3** en el epitelio tumoral (n=75)

Grado de diferenciación	Caspasa3 en tumor		p
	0-25% n(%)	>25% n(%)	
Poco diferenciado	12(66.7)	6(33.3)	p=0.000
Moderadamente dif	21(100)	0(0)	
Bien diferenciado	27(81.8)	6(18.2)	
Basaloide	0(0)	3(100)	

Tabla 32. Asociación entre el **grado de diferenciación** y la expresión de **Bcl2** en el epitelio tumoral (n=78)

Grado de diferenciación	Bcl2 en tumor		p
	0-25% n(%)	>25% n(%)	
Poco diferenciado	12(66.7)	6(33.3)	p=0.000
Moderadamente dif	15(71.4)	6(28.6)	
Bien diferenciado	30(90.9)	3(9.1)	
Basaloide	0(0)	6(100)	

Tabla 33. Asociación entre el **grado de diferenciación** y la expresión de **Ki67** en el epitelio tumoral (n=78)

Grado de diferenciación	Ki67 en tumor		p
	0-25% n(%)	>25% n(%)	
Poco diferenciado	0(0)	18(100)	p=0.000
Moderadamente dif	9(42.9)	12(57.1)	
Bien diferenciado	21(63.6)	12(36.4)	
Basaloide	0(0)	6(100)	

H) Asociaciones entre la expresión de las 4 proteínas de nuestro estudio (P-53, Caspasa3, Bcl2 y Ki67) en los epitelios adyacentes no tumorales con el estadiaje (Tablas 34-37). No encontramos ninguna asociación estadísticamente significativa entre las cuatro proteínas del estudio y el estadiaje en el epitelio no tumoral adyacente al tumor.

Tabla 34. Asociación entre el **Estadiaje** y la expresión de **p53** en el epitelio no tumoral adyacente al tumor (n=40)

Estadiaje	P53 ENTA			p
	No hay epitelio n(%)	Negativo n(%)	Positivo n(%)	
T1N0M0	5(38.5)	7(53.8)	1(7.7)	NS
T2N0M0	3(25)	3(25)	6(50)	
T2N1M0	0(0)	1(100)	0(0)	
T3N0M0	0(0)	6(85.7)	1(14.3)	
T3N1M0	0(0)	3(100)	0(0)	
T4N1M0	1(25)	2(50)	1(25)	

NS: No existe asociación estadísticamente significativa

Tabla 35. Asociación entre el **Estadía**je y la expresión de **Caspasa3** en el epitelio no tumoral adyacente al tumor (n=28)

Estadía	Caspasa3 ENTA			p
	No hay epitelio n(%)	Negativo n(%)	Positivo n(%)	
T1N0M0	5(50)	3(30)	2(20)	NS
T2N0M0	3(33.3)	6(66.7)	0(0)	
T2N1M0	0(0)	1(100)	0(0)	
T3N0M0	0(0)	6(100)	0(0)	
T3N1M0	0(0)	1(100)	0(0)	
T4N1M0	1(100)	0(0)	0(0)	

NS: No existe asociación estadísticamente significativa

Tabla 36. Asociación entre el **Estadía**je y la expresión de **Bcl2** en el epitelio no tumoral adyacente al tumor (n=41)

Estadía	Bcl2 ENTA			p
	No hay epitelio n(%)	Negativo n(%)	Positivo n(%)	
T1N0M0	5(38.5)	4(30.8)	4(30.8)	NS
T2N0M0	3(23.1)	10(76.9)	0(0)	
T2N1M0	0(0)	1(100)	0(0)	
T3N0M0	0(0)	7(100)	0(0)	
T3N1M0	0(0)	3(100)	0(0)	
T4N1M0	1(25)	3(75)	0(0)	

NS: No existe asociación estadísticamente significativa

Tabla 37. Asociación entre el **Estadía**je y la expresión de **Ki67** en el epitelio no tumoral adyacente al tumor (n=28)

Estadía	Ki67 ENTA			p
	No hay epitelio n(%)	Negativo n(%)	Positivo n(%)	
T1N0M0	5(50)	2(20)	3(30)	NS
T2N0M0	3(33.3)	2(22.2)	4(44.4)	
T2N1M0	0(0)	0(0)	1(100)	
T3N0M0	0(0)	1(33.3)	2(66.7)	
T3N1M0	0(0)	0(0)	3(100)	
T4N1M0	1(50)	0(0)	1(50)	

NS: No existe asociación estadísticamente significativa

- l) Asociaciones entre la expresión de las 4 proteínas de nuestro estudio (P-53, Caspasa3, Bcl2 y Ki67) en los epitelios adyacentes no tumorales con la evolución (Tablas 38-41). No obtuvimos ninguna asociación estadísticamente significativa entre las cuatro proteínas del estudio con la evolución en el epitelio no tumoral adyacente al tumor.

Tabla 38. Asociación entre la **Evolución** y la expresión de **p53** en el epitelio no tumoral adyacente al tumor (n=40)

Evolución	P53 ENTA			p
	No hay epitelio n(%)	Negativo n(%)	Positivo n(%)	
Sin Recidiva	6(27.3)	10(45.5)	6(27.3)	NS
Alta	1(100)	0(0)	0(0)	
Falleció	2(11.8)	12(70.6)	3(17.6)	

NS: No existe asociación estadísticamente significativa

Tabla 39. Asociación entre la **Evolución** y la expresión de **Caspasa3** en el epitelio no tumoral adyacente al tumor (n=28)

Evolución	Caspasa3 ENTA			p
	No hay epitelio n(%)	Negativo n(%)	Positivo n(%)	
Sin Recidiva	6(33.3)	10(55.6)	2(11.1)	NS
Alta	1(100)	0(0)	0(0)	
Falleció	2(22.2)	7(77.8)	0(0)	

NS: No existe asociación estadísticamente significativa

Tabla 40. Asociación entre la **Evolución** y la expresión de **Bcl2** en el epitelio no tumoral adyacente al tumor (n=41)

Evolución	Bcl2 ENTA			p
	No hay epitelio n(%)	Negativo n(%)	Positivo n(%)	
Sin Recidiva	6(26.1)	15(65.2)	2(8.7)	NS
Alta	1(100)	0(0)	0(0)	
Falleció	2(11.8)	13(76.5)	2(11.8)	

NS: No existe asociación estadísticamente significativa

Tabla 41. Asociación entre la **Evolución** y la expresión de **Ki67** en el epitelio no tumoral adyacente al tumor (n=28)

Evolución	Ki67 ENTA			p
	No hay epitelio n(%)	Negativo n(%)	Positivo n(%)	
Sin Recidiva	7(38.9)	5(27.8)	6(33.3)	NS
Alta	0(0)	0(0)	1(100)	
Falleció	2(22.2)	0(0)	7(77.8)	

NS: No existe asociación estadísticamente significativa

J) Asociaciones entre la expresión de las 4 proteínas de nuestro estudio (P-53, Caspasa3, Bcl2 y Ki67) en los epitelios adyacentes no tumorales con el grado de diferenciación (Tablas 42-45). No se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa entre el grado de diferenciación y las cuatro proteínas del estudio en el epitelio no tumoral adyacente al tumor.

Tabla 42. Asociación entre el **grado de diferenciación** y la expresión de **p53** en el epitelio no tumoral adyacente al tumor (n=36)

Grado de diferenciación	P53 ENTA			p
	No hay epitelio n(%)	Negativo n(%)	Positivo n(%)	
Poco diferenciado	3(42.9)	3(42.9)	1(14.3)	NS
Moderadamente dif.	2(20)	6(60)	2(20)	
Bien diferenciado	2(11.8)	9(52.9)	6(35.3)	
Basaloide	1(50)	1(50)	0(0)	

NS: No existe asociación estadísticamente significativa

Tabla 43. Asociación entre el **grado de diferenciación** y la expresión de **Caspasa3** en el epitelio no tumoral adyacente al tumor (n=24)

Grado de diferenciación	Caspasa3 ENTA		p
	No hay epitelio n(%)	Negativo n(%)	
Poco diferenciado	2(66.7)	1(33.3)	NS
Moderadamente dif.	2(40)	3(60)	
Bien diferenciado	3(20)	12(80)	
Basaloide	1(100)	0(0)	

NS: No existe asociación estadísticamente significativa

Tabla 44. Asociación entre el **grado de diferenciación** y la expresión de **Bcl2** en el epitelio no tumoral adyacente al tumor (n=37)

Grado de diferenciación	Bcl2 ENTA			p
	No hay epitelio n(%)	Negativo n(%)	Positivo n(%)	
Poco diferenciado	3(37.5)	5(62.5)	0(0)	NS
Moderadamente dif.	2(20)	6(60)	2(20)	
Bien diferenciado	2(11.8)	15(88.2)	0(0)	
Basaloide	1(50)	1(50)	0(0)	

NS: No existe asociación estadísticamente significativa

Tabla 45. Asociación entre el **grado de diferenciación** y la expresión de **Ki67** en el epitelio no tumoral adyacente al tumor (n=25)

Grado de diferenciación	Bcl2 ENTA			p
	No hay epitelio n(%)	Negativo n(%)	Positivo n(%)	
Poco diferenciado	2(33.3)	1(16.7)	3(50)	NS
Moderadamente dif.	3(50)	0(0)	3(50)	
Bien diferenciado	2(18.2)	3(27.3)	6(54.5)	
Basaloide	1(50)	0(0)	1(50)	

NS: No existe asociación estadísticamente significativa

5.3 Iconografía

Presentamos las imágenes más representativas de los resultados expuestos anteriormente, clasificadas por el tipo de proteína.

5.3.1 Expresión de la proteína p53

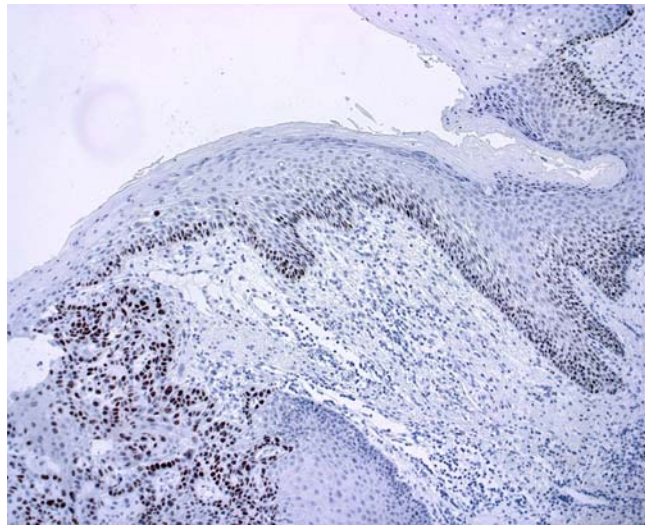


Figura 17. Expresión de p53 en el ENTA al carcinoma invasivo y en el tejido tumoral. Se evidencia una positividad basal y parabasal en el epitelio junto a una marcada positividad.

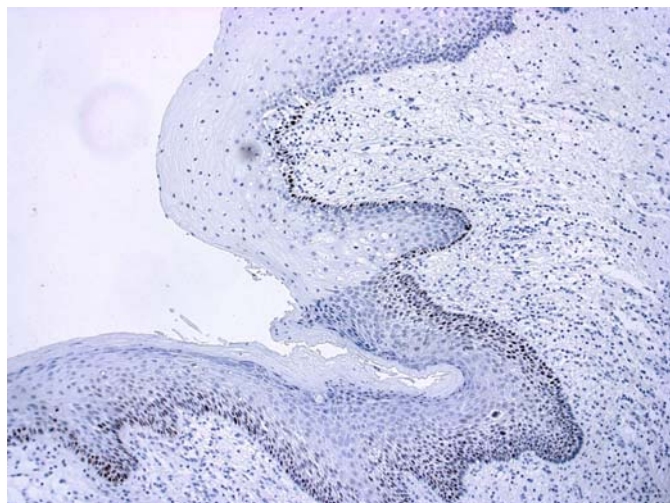


Figura 18. Expresión de p53 en el ENTA al tumor. En un punto concreto del epitelio se inicia la expresión de la proteína.

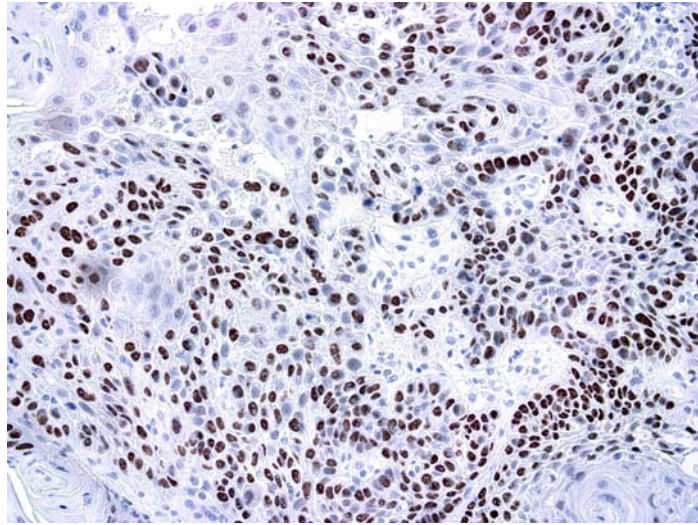


Figura 19. Marcada expresión de p53 en el tejido tumoral.

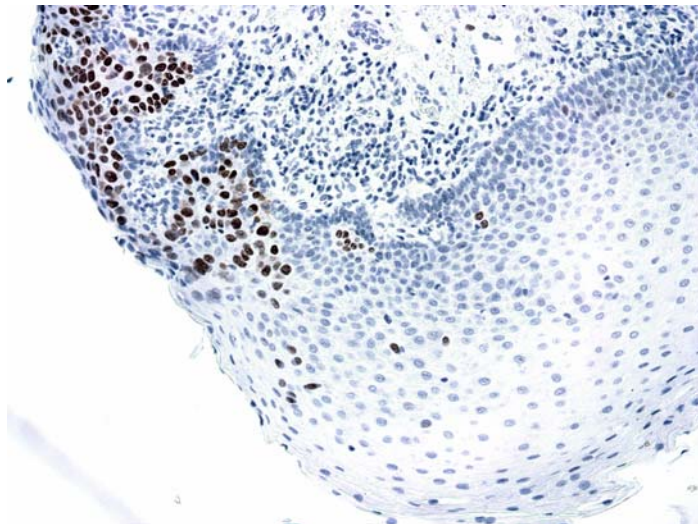
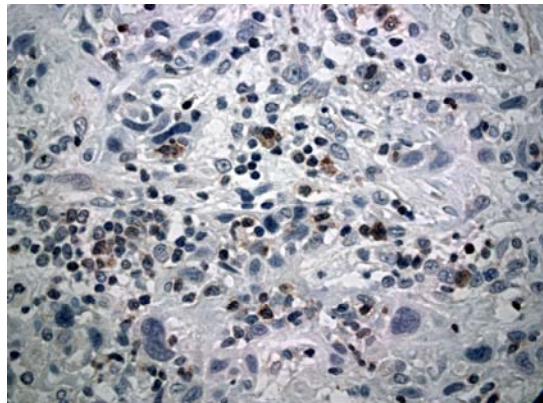
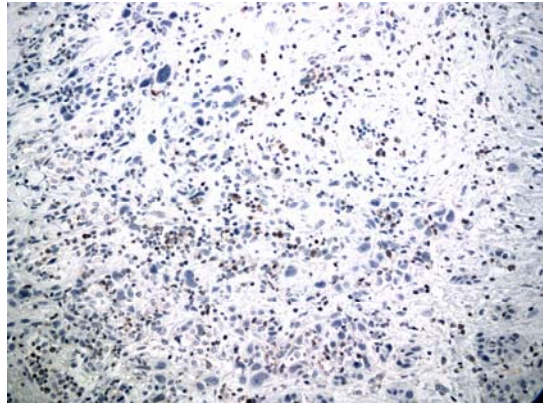


Figura 20. Expresión de p53 en el ENTA cercano al punto de invasión. Se observa la aparición de expresión positiva en la zona cercana a la invasión.

5.3.2 Expresión de la proteína caspasa-3



Figuras 21, 22. Expresión linfocitaria de caspasa-3 con negatividad en células tumorales.

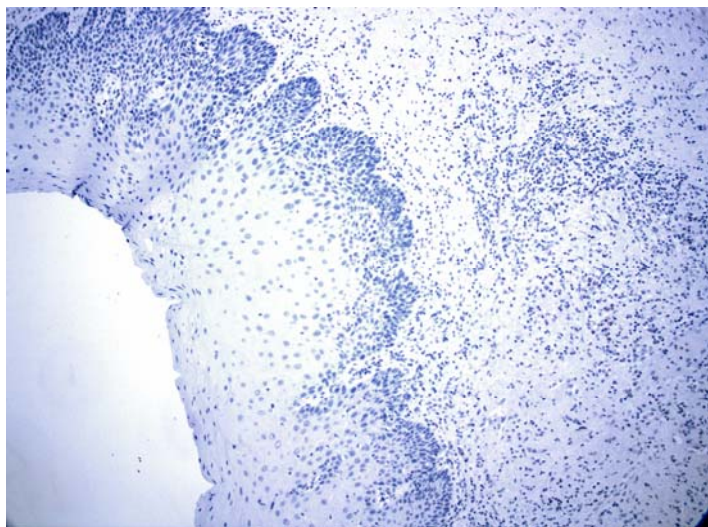


Figura 23. Expresión negativa de caspasa-3 en ENT a carcinoma.

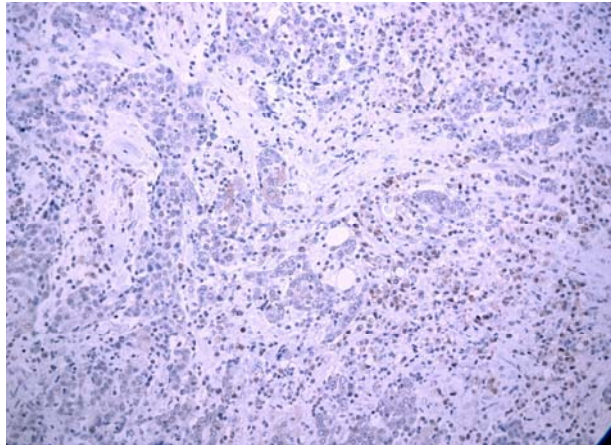


Figura 24. Discreta positividad de caspasa-3 en tejido tumoral con expresión en linfocitos infiltrantes.

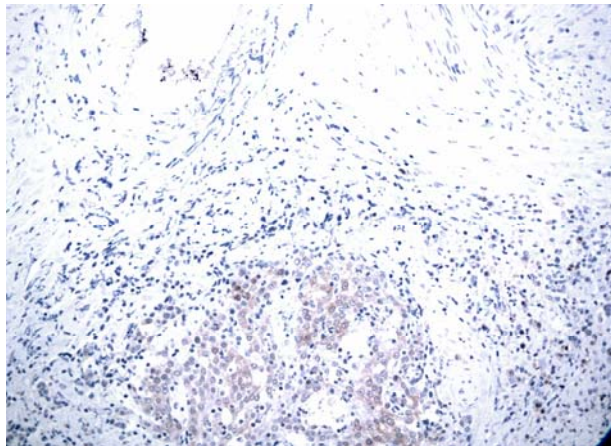


Figura 25. Intensa expresión de caspasa-3 en tejido tumoral.

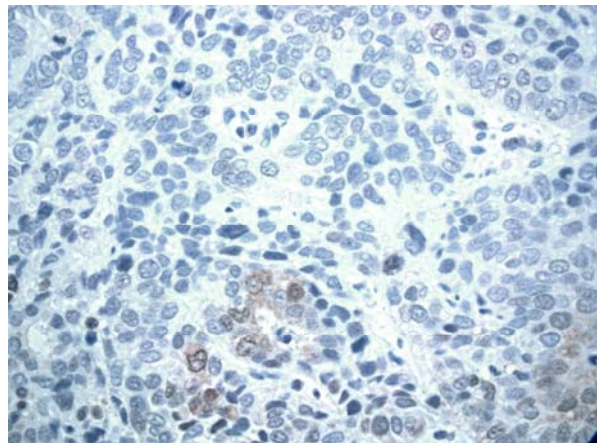


Figura 26. Algunas células tumorales expresan intensamente caspasa-3.

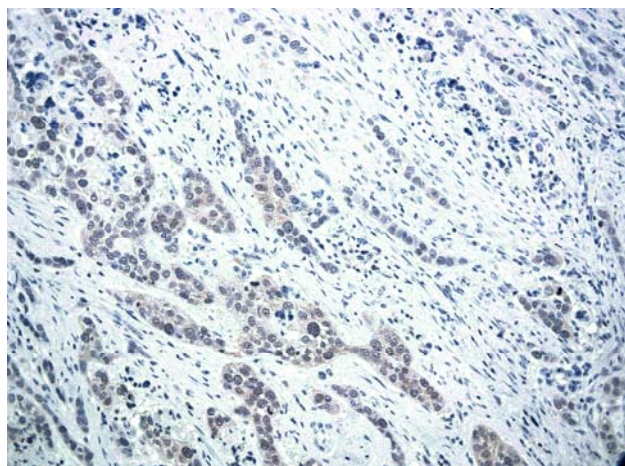
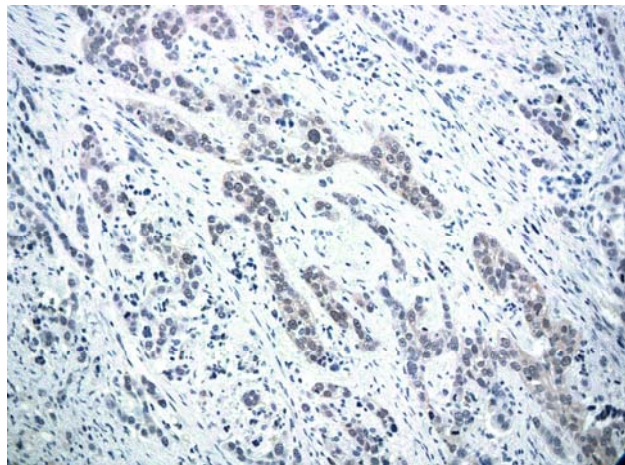
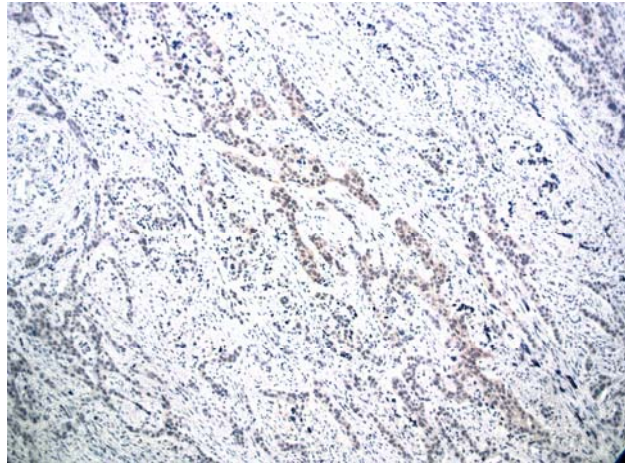


Figura 27, 28, 29. Cordones infiltrantes de células tumorales expresando caspasa-3.

5.3.3 Expresión de la proteína Bcl-2

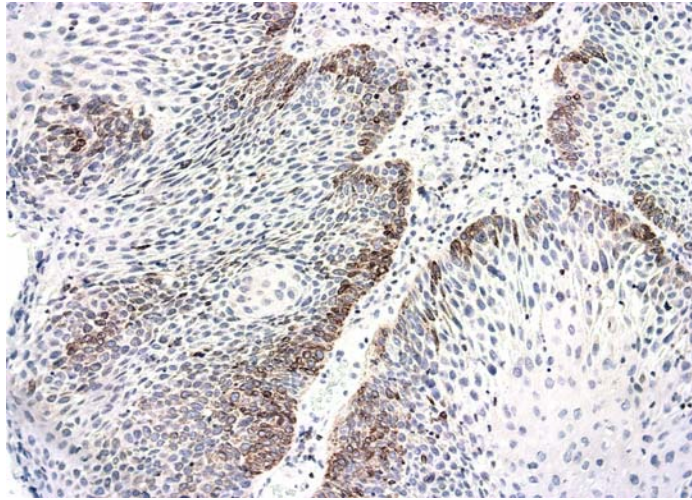


Figura 30. Expresión de Bcl-2 en nidos tumorales bien diferenciados especialmente localizados en la zona periférica del nido.

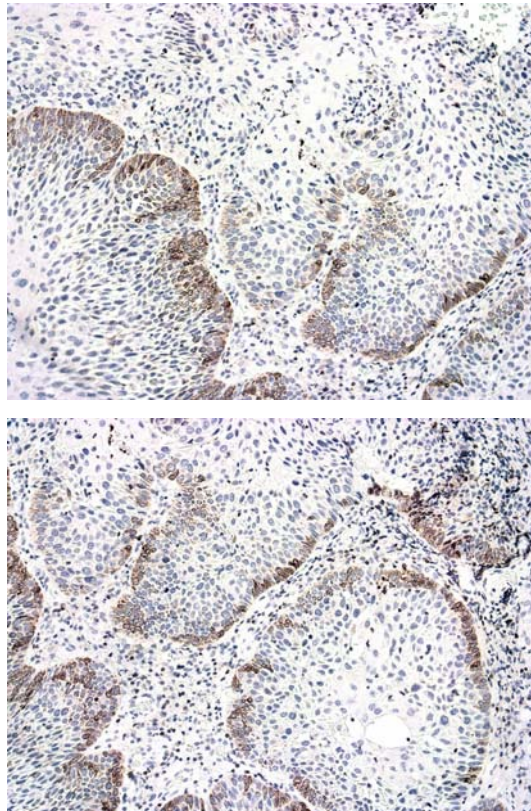


Figura 31, 32. Expresión de Bcl-2 en nidos tumorales bien diferenciados especialmente localizados en la zona periférica del nido. Algunas zonas del tumor son negativas.

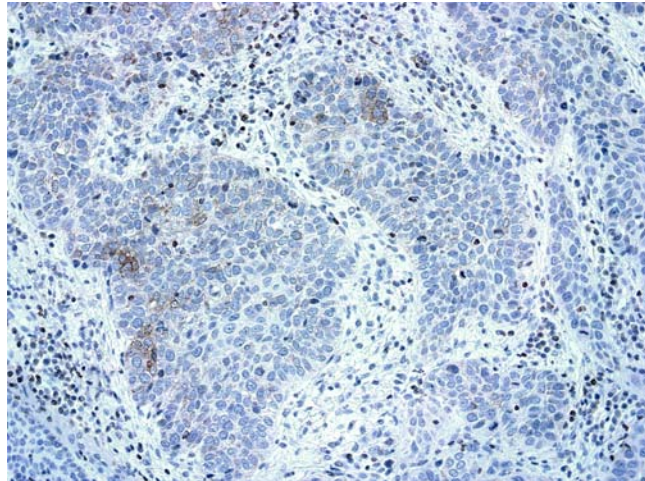


Figura 33. Expresión leve de Bcl-2 en tejido tumoral.

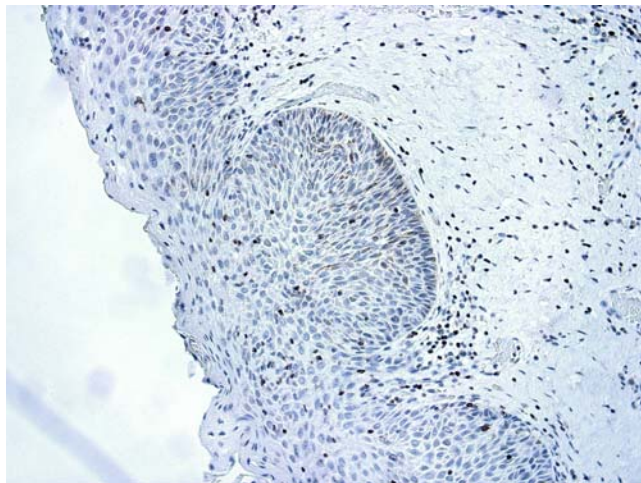


Figura 34. Expresión leve de Bcl-2 en ENTA adyacente a un carcinoma: También aparecen algunas áreas de negatividad.

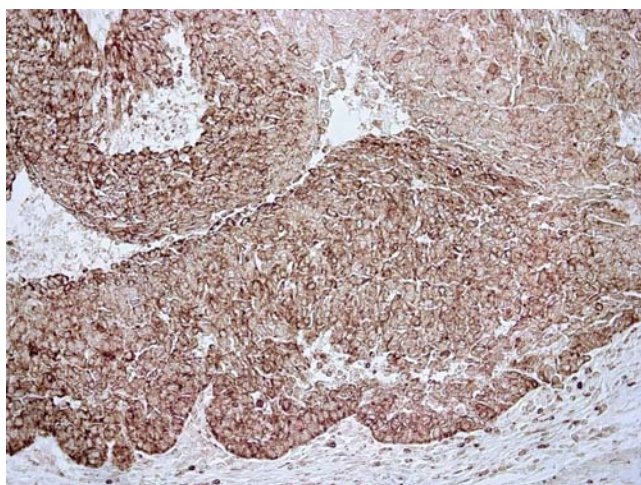
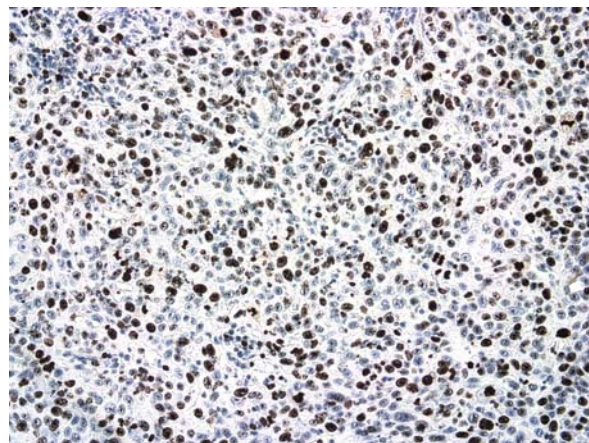
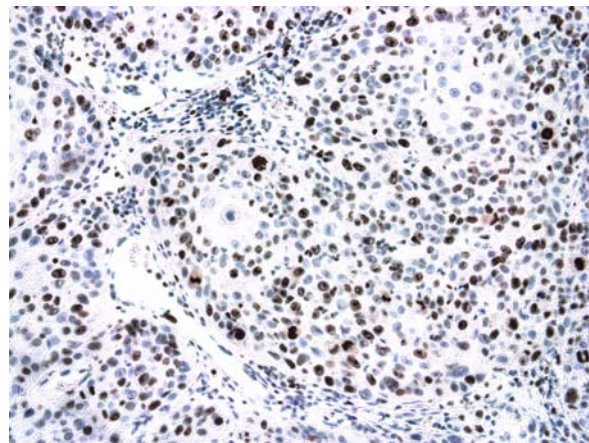
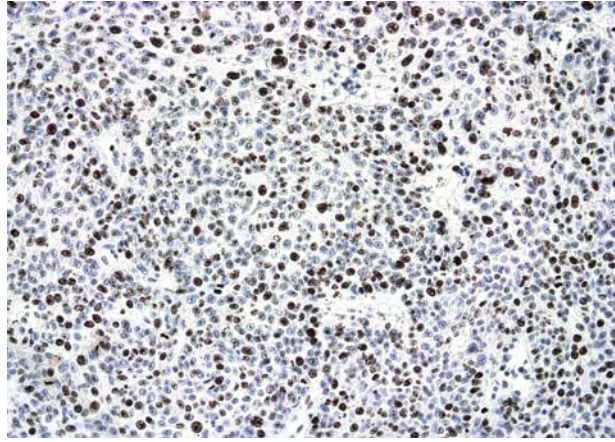


Figura 35. Intensa expresión de Bcl-2 en tejido tumoral.

5.3.4 Expresión de la proteína Ki-67



Figuras 36, 37, 38. Marcada expresión de Ki-67 en tejido tumoral.

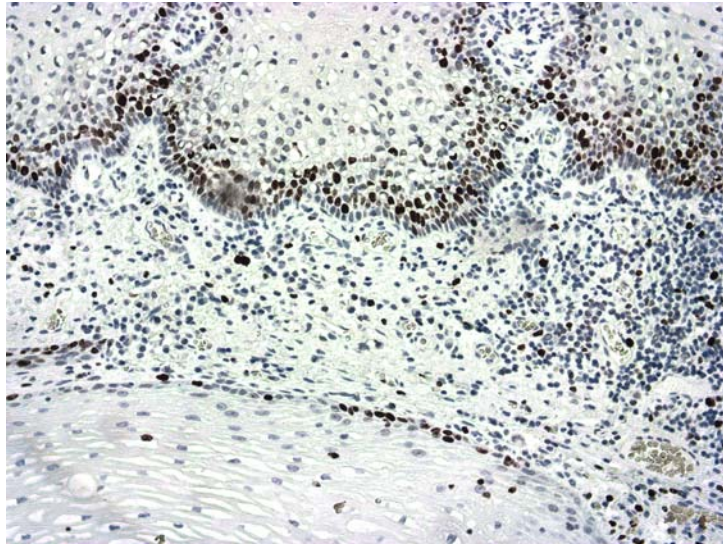


Figura 39. Expresión basal y parabasal de Ki-67 en ENTA a un carcinoma junto a la expresión periférica de ki-67 en un nido tumoral bien diferenciado.

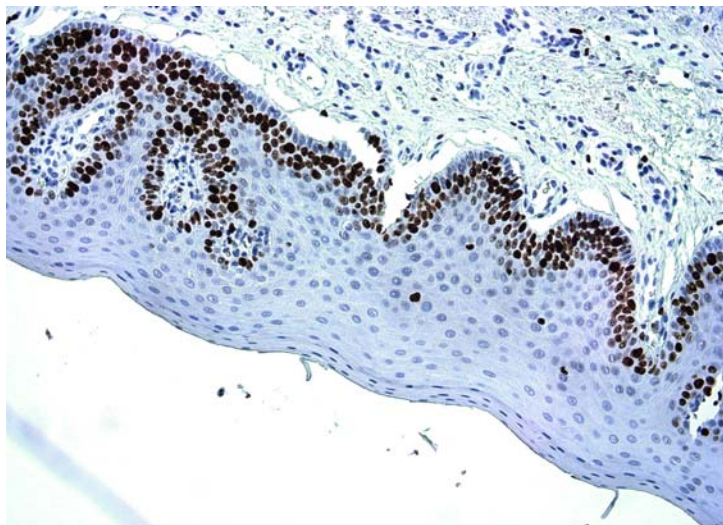


Figura 40. Expresión basal y parabasal de Ki-67 en ENTA a un carcinoma.

6.-DISCUSIÓN

Nuestros datos ponen de manifiesto que la expresión de proteína p53 apareció con más frecuencia en el epitelio no tumoral adyacente al tumor (ENTA) de tumores p53 positivo que en el ENTA de tumores p53 negativos. Ello tiene varias consecuencias importantes. Si consideramos que la expresión inmunohistoquímica (IMH) de p53 puede considerarse como un mecanismo que marca trastornos importantes en el sistema de control mediado por esta proteína, la sobreexpresión de p53 podría indicar un mecanismo precoz de escape de la célula en vías de transformación maligna al control ejercido por p53. Así una importante producción de proteína p53 incapaz de detener el ciclo celular para la reparación del ADN o inducir apoptosis, podría estar produciéndose en una célula genéticamente alterada. En este sentido se ha demostrado que los oncogenes de clase MDM, específicamente el oncogén MDM2 y MDM4, inhiben al gen TP53 en ausencia de mutación de TP53⁽¹⁵⁸⁾, lo que puede justificar la falta de función de este gen en ausencia de trastornos genéticos o de la proteína p53.

Sin embargo, la mutación de p53 es uno de los trastornos genéticos más frecuentes en la tumorigénesis, encontrándose el gen permanentemente mutado en carcinoma oral de células escamosas⁽¹⁵⁹⁾. Así la observación en nuestro estudio de una mayor expresión de p53 en los ENTA de carcinomas también + para p53, induce a pensar que nos encontramos ante un evento precoz en la carcinogénesis de cavidad oral ⁽¹⁶⁰⁾.

Algunos estudios han demostrado que la detección de p53 por IMH, sola o en combinación con otros marcadores parece estar asociada con mayor riesgo de progresión maligna⁽¹⁶¹⁻¹⁶⁶⁾. Un metanálisis concluyó que el 47% de las lesiones premalignas expresaban p53⁽¹⁶⁷⁾ pero las

conclusiones sobre el papel de p53 no están claras debido a la incapacidad de distinguir por IMH las isoformas funcionales.

Las ventajas de la IMH se basan en la demostración directa de la relación especial de las células que tienen una expresión alterada de la proteína p53, lo cual es especialmente importante en el estudio de expansión clonal de poblaciones celulares alteradas durante la tumorigénesis multipaso.

Por otra parte, algunos autores⁽¹⁶⁸⁾ han demostrado un incremento del número de células p53+ en epitelios displásicos en comparación con epitelios no displásicos y controles así como una tendencia a incrementar el índice de marcaje a medida que se incrementa el grado de displasia. Este trabajo refuerza la idea de que la alteración de la expresión p53 parece estar involucrada en el estado preinvasivo de la carcinogénesis oral, lo que está en concordancia con la observación de nuestro estudio.

En nuestra opinión, la sobreexpresión de p53 en un ENTA que acompaña a un carcinoma p53+ indica que el sistema ha sido incapaz de controlar la progresión de precancer a un estadio invasivo normal.

Las implicaciones de la alteración del funcionamiento de p53 en el proceso multipaso de eventos oncogénicos moleculares que acontecen en la carcinogénesis oral se evidencian también en nuestro estudio por la estrecha asociación estadística observada entre la expresión de p53 y Ki-67 en el ENTA a carcinomas orales. Las alteraciones moleculares que acontecen en un epitelio no tumoral que se encuentra en el camino de la transformación implican en líneas generales una pérdida del control del ciclo celular por inactivación de

genes supresores tumorales como p53 o por activación de oncogenes promotores de la proliferación celular como el oncogén ciclina D1⁽¹⁶⁹⁾. Por cualquiera de estas vías, las células que están en el camino de la transformación maligna incrementan su tasa de proliferación celular generando clones de células no invasivas aunque más proliferativas que las células que no sufren alteraciones genéticas. Estas ganancias proliferativas en clones celulares genéticamente alterado los hace más susceptibles de adquirir eventos oncogénicos, mutaciones tardías, que doten a las células finalmente de capacidad invasiva. Nuestro hallazgo de una asociación entre la expresión IMH de p53 y Ki-67 en el ENTA a un carcinoma indica que el fenómeno de pérdida de control de p53 está ligado a un incremento de la tasa de proliferación. Sin embargo, no podemos establecer si la ganancia proliferativa es secundaria a la alteración de p53, o por el contrario, es la ganancia proliferativa primaria la que hace a las células más susceptibles a alteraciones oncogénicas sumatorias entre las que se encuentran las mutaciones de p53. En el modelo multipaso para carcinogénesis oral propuesto por Lippman et al⁽¹⁶⁹⁾ las detecciones en los loci 3p y 9p que inactivan los genes supresores p16 y p14, y la amplificación de 11q que produce una sobreexpresión del oncogén ciclina D1, se ubican como eventos muy precoz que condicionan un incremento de la tasa de proliferación con inestabilidad genómica. Por el contrario las alteraciones de 17p con mutación del gen p53 son eventos oncogénicos que ocurren en el estadio final de progresión desde la displasia al carcinoma invasivo. En este sentido por tanto, podría pensarse que el incremento proliferativo precozmente adquirido por las alteraciones en 3p, 9p y 11q, facilitaría la adquisición de nuevos eventos, como mutaciones de p53, que serían de gran trascendencia para la adquisición de capacidad invasiva. Esta idea también está soportada en nuestro estudio por las asociaciones estadísticas observadas entre la expresión de caspasa-3 y Ki-67. Nosotros

observamos que la mayoría de los ENTA a carcinomas orales de células escamosas caspasa 3 negativos, eran KI-67 + (6 casos; 54.5%) ($p=0.020$). Así la ausencia de desarrollo de fenómenos apoptóticos en células con alteraciones en la expresión de genes supresores tumorales, posibilita que estas alteraciones se traduzcan en un incremento de su tasa de proliferación celular.

Esta alteración tardía de p53 en fases muy cercanas a la invasión se ha postulado también por otros investigadores. En este sentido McGregor et al⁽¹⁷⁰⁾ comunicaron que entre las características fenotípicas y moleculares más importantes que acontecen muy próximas a la invasión se encuentran la sobreexpresión de EGFR (receptor de factor de crecimiento epidérmico) y la adquisición de propiedades invasivas. El incremento de la expresión de EGFR se ha documentado en displasias severas pero no en displasias leves adyacentes a carcinomas invasivos de cabeza y cuello⁽¹⁷¹⁾. De forma interesante la sobreexpresión de EGFR, que parece ser importante en estadios previos cercanos a la invasión, puede ser corregida *in vitro* mediante la restauración de una proteína p53 de tipo salvaje normofuncionante en una línea celular de carcinoma de cabeza y cuello⁽¹⁷²⁾. Sin embargo la sobre expresión del producto del oncogén ciclina D1 no se altera en fases cercanas a la invasión. Estos datos hacen pensar que los efectos del estímulo de la proliferación y adquisición de capacidad invasiva mediados por EGFR probablemente se vean favorecidos por la presencia de una proteína p53 no funcionante, bien por mutación del gen o por inactivación de la proteína, constituyendo esto un evento oncogénico tardío en fases cercanas a la invasión. Si se tiene en consideración esta reflexión y como consecuencia de lo propuesto por Lippman et al⁽¹⁶⁹⁾, en nuestra opinión la sobreexpresión de p53 en un epitelio precanceroso indicaría un estadio cercano a la adquisición de capacidad invasiva.

Los resultados de nuestro estudio también demuestran relaciones interesantes entre la expresión de p53 y las proteínas que intervienen en la regulación de la apoptosis, caspasa-3 y Bcl-2. Destaca la escasa frecuencia con la que se observó apoptosis medida por caspasa-3 en células de ENTA a carcinomas orales, lo que indica que el fenómeno de la muerte por apoptosis aparece bloqueado o inhibido en epitelios que se encuentran en el camino franco de la transformación maligna. Las células neoplásicas han demostrado que exhiben una supervivencia incrementada y resistencia a la apoptosis^(173,174) y en este sentido, nuestros resultados indican que esta resistencia a la apoptosis es un mecanismo oncogénico adquirido precozmente en el cáncer oral. Nosotros hemos observado que la mayoría de los ENTA p53- eran también negativos para caspasa3, y que todos los ENTA p53+ eran caspasa3-. En nuestra opinión estos resultados indican que la sobreexpresión IMH de p53 en el ENTA a carcinoma oral de células escamosas revela la existencia de una proteína p53 mutada o la existencia de mecanismos de escape a las acciones inductoras de apoptosis ligadas a p53.

Nuestros resultados en relación a la expresión de Bcl-2 en el ENTA asociado a carcinoma oral de células escamosas indican una escasa frecuencia de activación de esta proteína antiapoptótica en oncogénesis oral; además, en los pocos casos en los que apareció una sobreexpresión de Bcl-2 en ENTA (3 casos), la mayoría (2 casos) expresan caspasa-3, lo que parece indicar que las acciones antiapoptóticas mediadas por Bcl-2 no son importantes o están bloqueadas en la carcinogénesis oral. Los trabajos en la literatura sobre la expresión de Bcl-2 durante la progresión del carcinoma oral de células escamosas son controvertidos. Algunos grupos han demostrado un incremento de la expresión de Bcl-2 en lesiones displásicas y en carcinoma oral de

células escamosas⁽¹⁷⁵⁻¹⁷⁹⁾, mientras otros han encontrado expresión esporádica⁽¹⁸⁰⁾ o falta de expresión⁽¹⁸¹⁾.

Al igual que ha sido comentado previamente para la expresión de p53, nuestros resultados ponen de manifiesto la existencia de una asociación estadística significativa entre la expresión de Caspasa-3 en el ENTA y la expresión tumoral, lo que también se observó con la expresión de Bcl-2 en ENTA y en el tejido tumoral. Estas asociaciones indican, desde nuestro punto de vista, que las alteraciones oncogénicas adquiridas durante el proceso multipaso de la transformación maligna se mantienen en los clones celulares que posteriormente van a adquirir capacidad invasiva. Por el contrario no observamos una relación significativa entre la expresión de Ki-67 en el epitelio precanceroso y el carcinoma invasivo, lo que en nuestra opinión refleja que la proliferación de las células tumorales es un fenómeno dependiente de múltiples proteínas inductoras de crecimiento celular, entre las que se establecen múltiples interacciones que trascienden a las mediadas por las proteínas estudiadas en nuestro análisis.

Ninguno de los marcadores empleados en nuestro estudio, tomando en consideración su expresión en el ENTA, se ha asociado estadísticamente a los parámetros clínico-patológicos tumorales (grado de diferenciación y estadio) o a la supervivencia de los pacientes. En nuestra opinión este hecho refleja la importancia de estas alteraciones en el proceso de adquisición por parte del epitelio precanceroso de un fenotipo invasivo, aunque presumiblemente con alteraciones que condicionan las características clinicopatológicas o el pronóstico tumoral trascienden y se dejan influenciar por fenómenos más amplios y probablemente complejos que los que aparecen en la etiología precancerosa.

El análisis de los marcadores empleados en este estudio en el tejido tumoral ha arrojado resultados interesantes. En relación a la expresión de p53 en el tejido tumoral nosotros hemos observado una asociación significativa muy marcada entre la mayor expresión de p53 con mayores estadios tumorales, con la diferenciación tumoral (carcinomas bien diferenciados o basaloides) y con la supervivencia de los pacientes. En este último caso la expresión marcada de p53 en el tumor fue significativamente mayor en pacientes que habían fallecido durante la evolución.

Los trabajos que analizan la influencia de p53 en el pronóstico tumoral arrojan resultados contradictorios. Shin y cols⁽¹⁸²⁾ señalan que la presencia de mutaciones de p53 está asociada con la aparición de recurrencia precoz y con el desarrollo de segundos tumores primarios. Otros trabajos han puesto de manifiesto la asociación entre mutaciones de p53 y la respuesta desfavorable a la radioterapia o la quimioterapia^(183,184). No obstante también se ha puesto de manifiesto que la heterogeneidad de las mutaciones complica la obtención de resultados predictivos de pronóstico tumoral⁽¹⁸⁵⁾. Por el contrario otros autores han puesto de manifiesto que las investigaciones de p53 por métodos inmunohistoquímicos probablemente no son marcadores predictivos útiles de pronóstico, como por ejemplo la detección de metástasis ocultas en el cuello. Estos autores tampoco encontraron asociación con el tipo de tumor, la diferenciación, el tamaño o el estadio. En el trasfondo de la discordancia de resultados se pueden encontrar probablemente razones relacionadas con la distinta sensibilidad de los diferentes anticuerpos monoclonales empleados o incluso con los diferentes puntos de corte utilizados para considerar un caso como positivo para p53.

En esta misma línea también han sido interesantes los resultados de nuestro estudio en relación a la expresión de caspasa 3 en el tejido tumoral. El 41.2% de los carcinomas de nuestra serie (21 casos) expresaron caspasa-3 en >25% de las células tumorales. Nosotros hemos observado una asociación estadística significativa entre expresión caspasa-3 y el estadio tumoral ($p=0.019$) de tal forma que en líneas generales los tumores de mayor estadio presentaron menores porcentajes de expresión de caspasa-3, observando una asociación similar con el grado de diferenciación tumoral, de tal forma que los tumores moderadamente o pobremente diferenciados fueron significativamente caspasa-3 negativos. Hange et al⁽¹⁸⁶⁾ encontraron que la proporción de células caspasa-3 positivas en el tejido tumoral fue significativamente mayor a la observación en el epitelio oral normal, lo que confirma los hallazgos de Macluskcy et al⁽¹⁸⁷⁾ quienes comunican que el índice apoptótico se incrementa durante la carcinogénesis oral. Algunos autores han puesto de manifiesto que el marcaje citoplasmático de caspasa-3 puede ser un marcador valioso relacionado con el pronóstico⁽¹⁸⁶⁾. Una hipotética explicación para estas asociaciones radicaría en que las células tumorales previsiblemente desarrollan mecanismos de supervivencia y resistencia a la apoptosis, y según nuestros resultados estos mecanismos se desarrollan más comúnmente en carcinomas peor diferenciados y de mayores estadios⁽¹⁷³⁾. En esta misma línea se encuentra la observación de nuestro trabajo, que pone de manifiesto una estrecha asociación entre la mortalidad y la ausencia de expresión de caspasa-3.

Un resultado interesante de nuestro trabajo se relaciona con las asociaciones encontradas entre la expresión de Ki-67 en el tejido tumoral y algunos parámetros pronósticos. Así, los carcinomas orales con mayores expresiones de Ki-67 presentan peor diferenciación, estadios

más avanzados y mayores tasas de recidiva, aunque no fueron diferentes en cuanto al porcentaje de mortalidad. Nosotros hemos empleado el anticuerpo monoclonal Mib-1 como medio para avaluar la proliferación celular en el tumor. Este anticuerpo reconoce partes recombinantes del antígeno Ki-67. El gen para este antígeno se localiza en el brazo largo del cromosoma 10 (10q25). El antígeno Ki-67 comienza a expresarse en la fase S, incrementando progresivamente su expresión a través de la fase S y G2, alcanzando una meseta en la fase de mitosis. Después de la división las células retornan a la fase G1 con un stock de Ki-67, cuyo nivel decrece progresivamente durante esta fase⁽¹⁸⁸⁾. Un gran número de publicaciones, que recogen un total de 1613 casos, han demostrado el valor pronóstico de la proliferación celular en el carcinoma oral de células escamosas⁽¹⁸⁹⁾. En general una alta actividad proliferativa se asocia con un peor pronóstico. Casi el 30% de los casos que fueron investigados usando análisis AgNOR, aunque este método de evaluación de la proliferación celular no es extensamente aplicado. No obstante, también en un gran número de trabajos que recogen un total de 1271 casos de carcinoma oral de células escamosas, la actividad proliferativa en el tumor no tuvo ningún valor pronóstico⁽¹⁸⁹⁾. Curiosamente nosotros no encontramos ningún trabajo en el que hubiera una falta de significado pronóstico del análisis AgNOR. El análisis AgNOR mide de forma fácil el tiempo que emplea la célula en completar su ciclo celular⁽¹⁹⁰⁾ y así, la cantidad de expresión de AgNOR está estrictamente relacionada con la rapidez e la proliferación celular: una mayor cantidad de AgNOR traduce un acortamiento del tiempo de proliferación celular^(191,192). Los hallazgos comunicados previamente y la falta de asociación observada en nuestro estudio entre mortalidad y expresión de Ki-67 podrían indicar que la rapidez de la proliferación celular es probablemente el parámetro cinético que se correlaciona mejor con el pronóstico del carcinoma oral de células escamosas. La

actividad proliferativa de un tumor depende además de la velocidad del ciclo, de la fracción de células que se encuentran en ciclo celular (fracción de crecimiento o G). Resulta evidente que ni la fracción de crecimiento ni la velocidad del ciclo celular, por sí mismas definen la actividad proliferativa real de un tumor⁽¹⁹³⁾; la fracción de crecimiento de un tumor puede ser fácilmente evaluada a través de la medición de Ki-67, ya que este antígeno se expresa en todas las células que están en el ciclo celular^(194,195); por el contrario la cuantificación de la expresión de AgNOR refleja la rapidez de la proliferación celular. Así, la actividad proliferativa real de un tumor puede expresarse simplemente por la ecuación $PA = \text{tasa de expresión de Ki-67} \times \text{cantidad de expresión de AgNOR}$, aunque hasta nuestro conocimiento, esta ecuación nunca ha sido aplicada para evaluar el pronóstico de los carcinomas de cabeza y cuello. Por todo lo dicho, nosotros creemos que la falta de asociación encontrada en nuestro trabajo entre la expresión de Ki-67 y el pronóstico, realmente obedece a que la actividad proliferativa del tumor no es exclusivamente dependiente de la fracción de células en crecimiento.

7.-CONCLUSIONES

1. La expresión de proteína p53 apareció con más frecuencia en el epitelio no tumoral adyacente al tumor de tumores p53 positivo que en el epitelio no tumoral adyacente al tumor de tumores p53 negativos, lo que indica que el sistema ha sido incapaz de controlar la progresión de precancer a un estadio invasivo normal.
2. Se ha evidenciado una asociación estadísticamente significativa entre la expresión inmunohistoquímica de p53 y Ki-67 en el epitelio no tumoral adyacente a un carcinoma, indicando que el fenómeno de pérdida de control de p53 está ligado a un incremento de la tasa de proliferación.
3. Se ha evidenciado igualmente una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de caspasa-3 y ki-67 en el epitelio no tumoral adyacente al tumor, siendo la mayoría de ENTAs con una expresión de caspasa-3 negativas, ki.67 positivos.
4. Hemos evidenciado como todos los ENTAs con expresión positiva de p53 coinciden con una expresión de caspasa-3 negativa, lo que puede revelar la existencia de una proteína p53 mutada o la existencia de mecanismos de escape a las acciones inductoras de apoptosis ligadas a p53.
5. Ninguno de los marcadores empleados en nuestro estudio, tomando en consideración su expresión en el ENTA, se ha asociado estadísticamente a los parámetros clínico-patológicos tumorales (grado de diferenciación y estadio) o a la supervivencia de los pacientes.

6. Hemos observado una asociación significativa muy marcada entre la mayor expresión de p53 con mayores estadios tumorales, con la diferenciación tumoral y con la supervivencia de los pacientes.
7. Hemos observado una asociación estadística significativa entre la expresión caspasa-3 y el estadio tumoral (los tumores de mayor estadio presentaron menores porcentajes de expresión de caspasa-3) y entre la expresión caspasa-3 y el grado de diferenciación tumoral (los tumores moderadamente o pobremente diferenciados fueron significativamente caspasa-3 negativos).
8. Los carcinomas orales con mayores expresiones de Ki-67 presentan peor diferenciación, estadios más avanzados y mayores tasas de recidiva, aunque no fueron diferentes en cuanto al porcentaje de mortalidad.
9. Hemos observado una falta de asociación entre la mortalidad y la expresión de Ki-67, lo que podría indicar que la rapidez de la proliferación celular es probablemente el parámetro cinético que se correlaciona mejor con el pronóstico del carcinoma oral de células escamosas.

8.-BIBLIOGRAFÍA

1. Bagán JV, Ramón C, Lloria E, Cardena F, Milián M.A. Carcinoma de células escamosas: visión global de sus aspectos epidemiológicos, etiopatogénicos, clínicos y terapéuticos. *Arch Odontoestm* 1996; 12: 13-25.
2. Mayorga f, Rollán A, Infante P, González Pd, García-Perla A, García A. Cáncer orofacial: estudio descriptivo y supervivencia. *Rev Esp Cirug Oral y Macillo* 1999; 21: 190-7.
3. Boyle P. European School of Oncology Advisory Report to the European Commission for the Europe against Cancer Programme: Oral Carcinogenesis in Europe. *Oral onco Eur J Cancer* 1995; 313: 75-85.
4. Moreno López L.A, Esparza Gómez G. Oral cáncer versus oropharyngeal cáncer versus head and neck cancer. *Oral Oncol* 1998; 34: 576-7.
5. Chandu A, Adams G, Smith A.S.H. Factor affecting survival on patients with oral cancer: an Australian perspective. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005; 34. 514-20.
6. Martínez-Conde R, Aguirre JM., Burgos J.J., Rivera J.M. Factores clínicos-patológicos en el carcinoma de células escamosas inicial de lengua y suelo de la boca, en Vizcaya. *Med. Oral* 2001; 6-2:87-93.
7. James T. Castle, Cardinali M, MB, Kratochvil James F, Abbondanzo L. Susan, Kessler P. Harvey, Auclair L. Paul, Yeudall Andrew W. P53 and cyclin D1 Staining patterns of malignant and premalignant noral lesions in age-dependent populations. *Oral Surg Med Oral Othol Oral Radiol Endod* 1999; 88-3: 326-32.
8. Paterson I.C, Evenson J.W, Prime S.S. Molecular Changes in Oral Cancer May Reflect Aetiology and Ethnic Origin. *Oral Oncol, Eur J Cancer* 1996; 32-B: 150-3.
9. Neville B, Day TA. Oral Cancer and precancerous lesions. *Cancer J Clin* 2002; 52: 195-215.
10. Das BR, Nagpal. Understanding the biology of oral cancer. *Med Sci Monit* 2002; 8RA258-67.
11. Speight PM, Elliot AE, Jullien JA, Downer MC, Zakrzewska JM. The Use of Artificial Intelligence to Identify People at Risk of Oral Cancer and Precancer. *Br Dent J* 1995; 179: 382-7.

12. Varveri RL, Gali A, Castro de Avezedo MA, Bordoni NE. Aprendizaje, retención y estrategia docente. *Rev Asoc Odont Argen 1985; 73: 89-92.*
13. Kuttan N.A.A, Rosin M.P, Ambika K, Priddy R.W, Bhakthan N.M:G, Zhang L. High prevalence of Expression of p 53 Oncoprotein in Oral Carcinomas from India Associated with Betel and Tobacco Chewing. *Oral Oncol, Eur J Cancer 1995; 31-B: 169-173.*
14. Jane C, Nerurkar A.V, Shirsat N.V, Deshpande R.B, Amrarpurkar A.D, Karjodkar F.R. Increased surviving expression in high-grade oral squamous cell carcinoma: a study in Indian tobacco chewers. *J oral Pathol Med 2006; 35: 595-601.*
15. Ralhan R, Agarwal S, Nath N, Mathaur M, Wasyluk B, Srivastava S. Correlation between *p53* gene mutations and circulating antibodies en betel- and tobacco-consuming North Indian population. *Oral oncol 2001; 31: 243-50.*
16. Baral R N, Patnaik S, Das B R. Co-overexpression of p 53 and c-myc proteins linked with advanced stages of betel-and tobacco-related oral squamous cell carcinomas from eastern India. *Eur J Oral Sci 1998; 106: 907-13.*
17. De Stefani E, Oreggia F, Rivero S, Fierro L. Hand-rolled cigarette smoking and risk of cáncer of the mouth, pharynx and larynx. *Cancer 1992; 70-3: 679-82.*
18. Rohatgi N, Kaur J, Srivastava A, Ralhan R. Smokeless tobacco (khaini) extracts modulate gene expression in epithelial cell culture from an oral hyperplasia. *Oral Oncol 2005; 41: 806-820.*
19. Hwa-Jeong Lee, Han- Young Guo, Sun-Kyung Lee, Byung-Hun Jeon, Chang-Duk Jun, Suk-Keun Lee, Myung-Hee Park, Eun-Cheol Kim. Effects of nicotine on proliferation, cell cycle, and differentiation immortalized and malignant oral keratinocytes. *J Oral Pathol Med 2005; 34: 436-43.*
20. Warnakularuriya K.A.A.S, Ralhan r. Clinical, pathological, cellular and molecular lesions caused by oral smokeless tobacco – a review. *J Oral Pathol Med 2007; 36: 63-77.*
21. Schwartz J, Baker V, Larios E, Desai D, Amin S. Inhibition of experimental tobacco carcinogen induced head and neck carcinogénesis. *Oral Oncology 2004; 40: 611-23.*

22. Moreno-López LA, Esparza-Gómez GC, González Navarro A, Cerero-Lapiedra R, González-Hernández MJ, Domínguez-Rojas V. Risk of oral cancer associates with tobacco smog, alcohol consumption and oral hygiene: A case-control study in Madrid, Spain. *Oral Oncol* 2000; 36: 170-4.
23. La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. Epidemiology and Prevention of Oral Cancer. *Oral Oncol* 1997; 33: 302-12.
24. Camacho Alonso F y cols. Estudio clinic-patológico de 40 leucoplasias orales. *Rev Euro Odontost* 2004; 16: 181-92.
25. Figuero-Ruiz E, Carretero-Peláez MA, Cerero-Lapiedra R, Esparza-Gómez G, Moreno-López LA. Efectos del alcohol etílico en la cavidad oral: relación con el cáncer oral. *Med Oral* 2004; 9: 14-23.
26. Carretero Peláez M.A, Esparza Gómez G.C, Figuero Ruiz E, Cereco Lapiedra R. Colutorios con alcohol y su relación con el cáncer oral. Análisis crítico de la literatura. *Med Oral* 2004; 9: 116-23
27. Reibel J. Prognosis of Oral Pre-malignant Lesions: Significance of Clinical, Histopathological, and Molecular Biological Characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14: 47-62.
28. Summersgill K F, Smith M E, Kirchner L H, Haugen H T, Turek P L. p 53 polymorphism, human papillomavirus infection in the oral cavity, and oral cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000; 90: 334-9.
29. Yeudall W.A, Paterson I.C, Patel V, Prime S.S. Presence of Human Papillomavirus Sequences in Tumour-derived Human Oral Keratinocytes Expressing Mutant p 53. *Oral Oncol Eur J Cancer* 1995; 31B: 136-43.
30. González-Moles M.A, Galindo P, Gutierrez J, Rodríguez-Archilla A, Ruiz-Avila I, Sánchez-Fernández E. Expression of the p53 protein in oral squamous cell carcinomas associates with Epstein-Barr virus. *Microb* 200; 102: 147-54.
31. Byung-Moo M, Jeong-Hwa B, Ki-Hyuk S, Chandrasekhar Gujuluva Chandrasekhar N, Cherrick M, Park NP. Inactivation of the p53 Gene by Either Mutation or HPV Infection is Extremely Frequent in Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. *Oral Oncol Eur J Cancer* 1994; 30B: 338-45.

32. Moreno L.A, Cerero R, Arriola P Esparza G, Brezmes A. Incidencia del cáncer orofaríngeo en la comunidad autónoma de Madrid. *Arch Odontostom* 1996; 12: 43-9.
33. Levi F, Pasche C, Lucchini F, Bossetti C, La Vecchia C. Processed meat and the risk of selected digestive tract and laryngeal neoplasms in Switzerland. *Ann Oncol* 2004; 15: 346-9.
34. De Stefani E, Deneo-Pellegrini H, Mendilaharsu M, Ronco A. Diet and risk of cáncer of upper aerodigestive tract-I. *Foods. Oral Oncol* 1999; 35: 17-21.
35. Toporkov Tn, Ferreira Antunes JL, Tavares MR. Fat food habitual intake and risk of oral cancer. *Oral Oncol* 2004; 40: 925-31.
36. De Stefani E, Ronco A, Mendilaharsu M, Deneo-Pellegrini H. Diet and risk of cáncer of upper aerodigestive tract-II. *Nutrients. Oral Oncol* 1999; 35: 22-6.
37. Lodi G, Rimondini L, Zuppiroli A, Sardella A, Carrasi A. Attitude Towards Smoking and Oral Cancer Prevention among Northern Italian Dentists. *Oral Oncol* 1997; 33: 100-4.
38. Lockhart PB, Norris CM, Pulliam C. Dental Factors in the Genesis of Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. *Oral Oncol* 1998; 34: 133-9.
39. González-Moles M.A. Precáncer y Cáncer Oral. *Ediciones Avances*. 2001. Pags 13-26.
40. Bascones A, Seoane JM, Aguado a, Suárez Quintanilla JM. Cáncer y Precáncer Oral: Bases clínico-quirúrgicas y moleculares. *Ediciones Avances*. 2003. Pags 15-18.
41. Bascones A, Seoane JM, Aguado a, Suárez Quintanilla JM. Cáncer y Precáncer Oral: Bases clínico-quirúrgicas y moleculares. *Ediciones Avances*. 2003. Pags 43-60.
42. Silverman S, Gorsky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation: a follow-up study. *Cancer* 1984; 53: 563-8.
43. Alvi A, Myers EN, Johnson JT. Cancer of the oral cavity. In: Myers EN, Suen JY, editors. *Cáncer of the head and neck*. 3rd edition. Philadelphia: Mosby; 1996. P321-60.

44. Kannan S, Balaram P, Pillai Mr. Ultrastructural variations and assessment of malignant transformation risk in oral leucolakia. *Pathol Res Pract* 1993; 189: 1169-80.
45. Kramer IRH, El-Lablan D, Lee KV. The clinical features and risk of malignant transformation in sublingual keratosis. *Br Dent J* 1978; 144: 171-80.
46. Sebastián JVB, Masanet AM, Soriano YJ. Lesiones blancas de la mucosa oral. En: Martínez AB. *Tratado de Odontología. Ediciones Avances. 3ªed. (2000): 3025-35.*
47. Ögmundsdóttir H.M, Hilmarsdóttir H, Ástvaldsdóttir Á, Jóhannson JH, Holbrook WP. Oral lichen planus has a high rate of TP53 mutations. A study of oral mucosa in Iceland. *Eur J Oral Sci* 2002; 110: 192-8.
48. Girod C S, Pfeiffer P, Ries J, Pape D H. Proliferative activity and loss of function of tumour genes as "biomarkers" in diagnosis and prognosis of benign and preneoplastic oral lesions and oral squamous cell carcinoma. *British J of Oral And Maxillo Surg* 1998; 36: 252-60.
49. González-Moles M.A, Bascones-Ilundain C, Gil Montoya J.A, Ruiz-Ávila I, Delgado-Rodríguez M, Bascones-Martínez A. Cell cycle regulating mechanisms in oral lichen planus: Molecular bases in epithelium predisposed to malignant transformation. *Arch of Oral Bio* 2006; 51: 1093-103.
50. Bascones-Ilundain C, González-Moles M.A, Esparza-Gómez G, Gil-Montoya J.A, Bascones-Martínez A. Importance of apoptotic Mechanisms in Inflammatory Infiltrate or Oral Lichen Planus Lesions. *Antican Resea* 2006; 26: 357-62.
51. Lanfranchi Tizeira H.E, Cristina Aguas S, Mariela Sano S. Transformación maligna del Liquen Plano Bucal atípico: Análisi de 32 casos. *Med Oral* 2003; 8: 2-9.
52. Bascones C, González-Moles M.A, Esparza G, Bravo M. Acevedo A, Gil-Montoya J.A, Bascones A. Apoptosis and cell cycle arrest in oral lichen planus Hypothesis on their possible influence on its malignant transformation. *Archv Oral Oncol* 2005; 50: 873-81.

53. Bascones-Ilundain C, González-Moles M.A, Carrillo de Albornoz A, Bascones-Martínez A. Liquen plano oral (I). Aspectos clínicos, etiopatogénicos y epidemiológicos. *Av Odontoestomatol 2006; 22-1: 11-9.*
54. Bascones-Ilundain C, González-Moles M.A, Campo-Trapero J, Bascones-Martínez A. Liquen plano oral (II). Mecanismos apoptóticos y posible malignización. *Av. Odontoestomatol 2006; 22-1: 21-31.*
55. Mithani SK, Mydlarz WK, Grumbine FL, Smith IM, Califano JA. Molecular genetics of premalignant oral lesions. *Oral Dis 2007; 13: 126-33.*
56. Acha A, Ruesga T. M, Rodríguez J. M, Martínez de Pancorbo M: A, Aguirre J: M. Aplicaciones de la citología oral por raspado (esfoliativa) en el cáncer y precáncer oral. *Med Oral Pathol Cir Bucal 2005; 10: 95-102.*
57. Wrangle M J, Khuri R F. Chemoprevention of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Curr Opi in Oncol 2007; 19: 180-7.*
58. Murillo Cortes J, Etayo Pérez A, Sebastián López C, Martino Gorbea R, Fodríguez-Cortel J.M. Carcinoma intraóseo primario originado en un quiste mandibular. *Med Oral 2002; 7:370-4.*
59. González Lagunas J, Rodalo C, Raspall G, Bermejo B, Huguet P, Giralt J. Tumores malignos de glándulas salivales menores. Estudio retrospectivo sobre 59 casos. *Med Oral 2001; 6: 142-7.*
60. Seoane J, González-Reforma N, Aguado A, Romero M.A, Varela-Centelles P.I. Assesment of Dental Student's Accury for Oral Cancer Screening. *J Dent Educ 1997; 61: 437-9.*
61. Seoane JR, Varela-Centelles PI, González-Reformas M, Aguado A, Esparza G. Assesments of dental student's ability to recognise precancerous lesions and conditions. *Eur J Educ 1997; 1: 172-5.*
62. Julien JA, Zakrzewska JM, Cowner MC, Speight PM. Attendance and Compliance at an Oral Cancer Screening Programme in a General Medical Practise. *Oral Onco Eur J Cancer 1995; 313: 202-5.*

63. Downer MC, Evans AW, Hallett HCM, Jullien JA, Speight PM, Zakrzewska JM. Evaluation of Screening for Oral Cancer and Precancer in a Company Headquarters. *Community Dent Oral Epidemiol* 1995; 23: 84-8.
64. Sciubba J.J. Oral Cancer. The importance of early diagnosis and treatment. *Am J Clin Dermatol* 2001; 2: 239-51.
65. Moore c, Flunn MB, Greenberg RA. Evaluation of Siza in Prognosis of Oral Cancer. *Cancer* 1986; 58: 158-62.
66. Hays GL. Co-carcinogenesis and Field Cancerization: Oral Lesions offer First Sings. *JADA* 1995; 126: 47-51.
67. O'Sullivan E. Improving early Diagnosis of Oral Cancer. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62: 115-8.
68. Holmes J.D, Dierks E.J, Homer L.D, Potter B.E. Is Detection of Oral and Oropharyngeal Squamous Cancer by a Dental Health Care Provider Associated with a Lower Stage at Diagnosis? *J Oral Maxillofac Surg* 2003; 61: 285-91.
69. Kaur J, Chakravarti N, Mathur M, Srivatava A, Ralhan R. alterations in expression of tetinois receptor Beta and p53 in oral submucosus fibrosis. *Oral Dis* 2004; 10: 201-6.
70. Muntoni A, Fleming J, Gordon E K, Hunter K, McGregor F, Parkinson K E, Harrison R P. Senescing oral dysplasias are not immortalized by ectopic expression of nTERT alone without other molecular changes, such as loss of INK4A and/or retinoic acid receptor-Beta: but p53 mutations are not necessarily required. *Oncog* 2003; 22: 7804-8.
71. Pitiphat A, Diehl S.R, Laskaris G, Cartsos V, Douglass CW, Zavra AI. Factors Associated with Delay in the Diagnosis of Oral Cancer. *J Dent Res* 2002; 81: 192-7.
72. Downer C M, Moles R D, Palmer S, Speight M P. A systematic review of measures or effectiveness in screening for oral cancer and precancer. *Oral Oncol* 2006; 42: 551-60.
73. Chen J, Eisenberg E, Krutchkoff D.J, Katz R.V. Changing Trends in Oral Cancer in the United States, 1935 to 1985, a Connecticut Study. *J Oral Maxillofac Surg* 1991; 49: 1152-8.

74. Warnakulasuriya KAAS, Johnson NW. Sensitivity and specificity of Ora Scan toluidine blue mouthrinse in the detection of oral cancer and precancer. *J Oral Pathol Med* 1996; 25: 97-103.
75. Ravi D, Ramadas K, Mathew B.S, Panikkar K.R, Nair M.K, Pillai M.R. Apoptosis angiogenesis and proliferation: trifunctional measure of tumour response to radiotherapy for oral cancer. *Oral Oncol* 2001; 37: 164-71.
76. Hamakawa H, Bao T, Takarada H. Histological effects and predictive biomarkers of TPP induction chemotherapy for oral carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1998; 27: 87-94.
77. Massano J, Regateiro S F, Januário G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: Review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 102: 67-76.
78. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 6: 759-67.
79. Hanahan d, Weinberg A R. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
80. Hahn WC, COUNTER CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 1999; 400: 464-8.
81. Downward J, Yarden Y, Mayes E, et al. Close similarity of epidermal growth factor gene and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 1984; 307: 521-7.
82. Grandis JR, Tweardy D. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 3579-84.
83. Mao L, El-Naggar AK, Fan YH, et al. Telomerase activity in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent tissues. *Cancer Res* 1996; 56: 5600-4.
84. Papadimitrakopoulou V, Izzo J, Lippman SM, et al. Frequent inactivation of p16 ink 4 a in oral premalignant lesions. *Oncogene* 1997; 14: 1799-803.

85. Shpitzer T, Chanjimaoff M, Gal R, Stern Y, Feinmesser R, Segal K. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in early oral tongue cancer. *Arch Otolaryng Head Neck Surg* 1996; 122: 856-8.
86. Zatterstrom K, Brum E, Willen R, Kjellen E, Wennerberg J. Tumor angiogenesis and prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck surg* 1995; 17: 312-8.
87. Dray TG, Hardin NJ, Sofferman RA. Angiogénesis as a prognostic marker in early head and neck cancer. *Ann Otol Rhinol Laryng* 1995; 104: 724-9.
88. Gleich LL, Biddinger PW, Pavelic ZP, Gluckman JL. Tumor angiogenesis in T1 oral cavity squamous cell carcinoma: role in predicting tumor aggressiveness. *Head Neck* 1996; 18: 343-6.
89. Liotta L. Tumor invasion and metastasis: role of the extracellular matrix. *Cancer Res* 1986; 46: 1-7.
90. Chen AY, Myers Jn. Cancer of the Oral Cavity. *Concurrent Problems in Surgery* 2000; 37: 635-731.
91. Arbes Sj Jr, Olshan AF, Caplan DJ, Achoenbach VJ, Slade GD, Symons MJ. Factors contributing to the poorer survival of black Americans diagnosed with oral cancer (United States). *Cancer Causes Control* 1999; 10: 36-43.
92. Caplan DJ, Herzt-Picciotto I. Racial differences in survival of oral and pharyngeal cancer patients in North Carolina. *J Public Health Dent* 1998; 58: 36-43.
93. Barash A, Morse DE, Krutchkoff DJ, Eisenberg E. Smoking, gender, and age as risk factors for site-specific intraoral squamous cell carcinoma: a case-series analysis. *Cancer* 1994; 73: 509-13.
94. Rubright WC, Hoffman HT, Lych CG, et al. Risk factors of advanced-stage oral cavity cancer. *Arch Otolaryng Head Neck Surg* 1996; 122: 621-6.
95. Tood R, Hinds P: W, Munger K, Rustgi A: K, Opitz O.G, Suliman Y, Wong D.T. Cell cycle dysregulation in oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13-1: 51-61.

96. García García V, González-Morales M.A., Bascones Martínez A. Bases moleculares del cáncer oral. Revisión bibliográfica. *Av. Odontoestomatol* 2005; 21-6: 287-95.
97. Hartwell LH, Culotti J, Pringle JL, Reid BJ. Genetic control of cell division cycle in yeast. *Sci* 1974; 183: 46-51.
98. Bongers V, Snow G.B, Van der Waal I, Braakhuis B.J.M. Value of p 53 Expression in Oral Cancer and Adjacent Normal Mucosa in Relation to the Occurrence of Multiple Primary Carcinomas. *Oral Oncol, Eur J Cancer* 1995; 31-B: 392-5.
99. Paterson I.C, Evenson J.W, Prime S.S. Molecular Changes in Oral Cancer May Reflect Aetiology and Ethnic Origin. *Oral Oncol, Eur J Cancer* 1996; 32-B: 150-3.
100. Kaur J, Chakravarti N, Mathur M, Srivatava A, Ralhan R. alterations in expression of tetinois receptor Beta and p53 in oral submucosus fibrosis. *Oral Dis* 2004; 10: 201-6.
101. Warnakulisutiya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weakness and scope for improvement. *J Oral Pathol Med* 2008; 37: 127-33.
102. Napier S, Speight PM. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *J Oral Pathol Med* 2008; 37: 1-10.
103. Braakhuis B, Leemans C, Brakenhoff RH. A genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications. *J Oral Pathol Med* 2004; 33: 17-22.
104. Tabor MP, Brakenhoff RH, van Houten VMM, et al. Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: biological and clinical implications. *Clin Cancer res* 2001; 7: 1523-1532.
105. Perez-Losada J, Balmain A. Stem-cell hierarchy in skin cancer. *Nature Rev Cancer* 2003; 3: 434-43.
106. Sansal I, Sellers WR. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2954-63.
107. Hahn WC, Weinberg RA. Mechanism of disease: rules for for marking human tumor cell, *N Engl J Med* 2002; 347: 1593-603.

108. Owens DM, Watt FM. Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours. *Nature Rev Cancer* 2003; 3: 444-51.
109. van Houten VMM, Tabor MP, van den Brekel MWM et al. Mutated p53 as a molecular marker for the diagnosis of head and neck cancer, *J Pathol* 2002; 198: 476-86.
110. Gasco M, Crook T. The p53 network in head and neck cancer. *Oral Oncol* 2003; 39: 222-31.
111. Bagan JV, Murillo J, Poveda R et al. Proliferative verrucous leukoplasia: unusual localisations of oral squamous cell carcinomas, and field cancerization as shown by the appearance of multiple OSCCs. *Oral Oncol* 2004; 40: 440-3.
112. Tsantoulis P.K, Kastrinakis N.G, Tourvas A.D, Laskaris G, Gorgoulis V.G. Advances in the biology of oral cancer. *Oral Oncol* 2007; 43: 523-34.
113. Van Oijem MGCT, Tilanus MGJ, Medema RH, Slootweg PJ. Expression of p21 (Waf1/Cip1) in head and neck cancer in relation to proliferation, differentiation, p53 status and cyclin D1 expression. *J Oral Med* 1998; 27: 367-75.
114. Soni S, Kaur J, Kumar A, Chakravarti N, Mathur M, Bahadur S, Kumar Shukla N, V.S. Deo S, Ralhan R. Alterations of Rb Pathway Components Are Frequent Events in Patients with Oral Epithelial Dysplasia and Predict Clinical Outcome in Patients with Squamous Cell Carcinoma. *Oncology* 2005; 68: 314-25.
115. Z.W. Ji, N. Oku, M. Umeda, T. Komori. Establishment of an oral squamous cell carcinoma cell line (NOS-1) exhibiting amplification of the *erb B-1* oncogene and point mutation of *p 53* tumor suppressor gene: its biological Characteristics and animal model of local invasion by orthotopic transplantation of the cell line. *Oral Oncol* 2001; 37: 286-392.
116. Bongers V, Snow G.B, Van der Waal I, Braakhuis B.J.M. Value of p 53 Expression in Oral Cancer and Adjacent Normal Mucosa in Relation to the Occurrence of Multiple Primary Carcinomas. *Oral Oncol, Eur J Cancer* 1995; 31-B: 392-5.
117. Tandle AT, Sanghavi V, Saranath D. Determination of p53 genotypes in oral cancer patients from India. *British J of Cancer* 2001; 84: 739-42.

118. Ho C.C, Yang X.W, Lee T.L, Liao P.H, Tsai C.H, Chou M.Y. Activation of p53 signaling acetylsalicylic acid-induced apoptosis in OC2 human oral cancer cells. *Eur J of Clinical Inv* 2003; 33:875-82.
119. Whyte D.A, Broton C.E, Shillitoe E.J. The unexplained survival of cells in oral cancer: what is the role of p53?. *J oral Pathol Med* 2002; 31: 125-33.
120. Murti PR, Warnakulasuriya KAAS, Jhonson NW, Gupta RB, Daftary DK, Mehta FS. P 53 expression in oral precancer as a marker for malignant potencial. *J of Oral Pathol & Med* 1998; 27: 191-6.
121. Warnakulasuriya KAAS, Tavassoli M, Johnson NW. Relationship of p53 overexpression to other cell cycle regulatory proteins in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1998; 27: 376-81.
122. López-Martínez M, Anzola M, Cuevas N, Aguirre J.M., Martínez de Pancorb M. Aplicaciones clínicas del diagnóstico de las alteraciones de p53 en el carcinoma excamoso de cabeza y cuello (p53 3n 3l CRCC). *Med. Oral* 2002; 7:108-20.
123. Fathy Abbas N, Labib El-Sharkawy S, Ahmed Abbas E, Abdel Monem El-Shaer M, Egypt C. Inmunohistochemical study of p53 and angiogenesis in benign and preneoplastic oral lesions and oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Path Radiol Endod* 2007 ; 103: 385- 90.
124. González-Moles M.A, Galindo P, Gutierrez-Fernández J, Sánchez-Fernández E, R7dríguez-Archilla A, Ruiz-Ávila I, Bravo M. P53 Protein Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma. Survival Analysis. *Anticancer Rese* 2001; 21: 2889-94.
125. González-Moles M.A, Galindo P, Gutiérrez I, Rodríguez-Archilla A, Ruiz-Ávila I, Sánchez-Fernández E. Significate of p53 expression in non-tumoral epithelium adjacent to oral squamous cell carcinomas. *The J or Laryngol and Otol* 2002; 116: 355-58.
126. Warnakulasuriya K, Jonhson NW. Expression of p53 mutant nuclear phosphoprotein in oral carcinoma and potentially malignant oral lesions. *J Oral Pathol Med* 1992; 21: 404-8.
127. Lako Loro L, Johannessen A.C, Vintermyr O.K. Decreased expression of bcl-2 in moderate and severe oral epithelia dysplasias. *Oral Oncol* 2002; 38: 691-98.

128. Broders AC. Squamous cell apithelioma of the lip. *JAMA* 1920; 74: 656-64.
129. Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system od malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res* 1987; 95: 299-49.
130. Pizarro VML. Factores pronósticos del carcinoma epidermoide de cavidad oral. Análisis multivariante. *Rev. Esp. Círg. Oral y Maxillo* 1999; 21: 59-70.
131. Mateo MM, Fernández RG, Garrido AM, Torres MP, Trujillo SM, Sanvicente VV, Pérez JF, García JLR, Flores DP. Factores pronósticos del carcinoma de cavidad oral. 1994; 16: 1-9.
132. Martínez R, Aguirre JM, Burgos JJ, Rivera JM. Factores clínico-patológicos en el carcinoma de células escamosas inicial de lengua y suelo de la boca, en Vizcaya. *Med Oral* 2001; 6: 87-94.
133. Winzerburg SM, Neihans GA, George E, Daly K, Adams GL. Basalioid squamous carcinoma: a clinical comparison of two histologic types with poorly differentiated squamous cell carcinoma. *Otolaryng Head Neck Surg* 1998; 119: 471-5.
134. Martínez-Gimeno C, Rodríguez EM, Vila CN, Varela SL. Squamous cell carcinoma of the oral cavity: a clinicopathologic scoring system for evaluating risk of cervical lymph node metastasis. *Laryngoscope* 1995; 105: 728-33.
135. Close LG, Burns DK, Reisch J, Schaefer SD. Mircovascular invasion in cancer of the oral cavity and oropharyns. *Arch Otolaryngol Head N_eck Surg* 1987; 113: 1191-5.
136. Pande P, Soni S, Kaur J, Agarwal S, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R. Prognóstic factors in betel and tobacco related oral cancer. *Oral Oncol* 2002; 38: 491-99.
137. Osaki T, Kimura T, Tatemoto Y, Yamamoto T, Yomeda K. Risk factors of Metastasis in Oral Squamous Cell Carcinomas. *Oncology* 2000; 58: 137-43.
138. González-Moles M.A, Galindo P, Gutierrez J, Rodríguez-Archilla A, Ruiz-Avila I, Sánchez-Fernández E. Expression or the p53 protein in oral squamous cell carcinomas associates with Epstein-Barr virus. *Microb* 2000; 102: 147-54.

139. Saito T, Nakajima T, Mogi K. Immunohistochemical analysis of cell cycle-associated proteins p 16, p Rb, p53, p 27 and Ki-67 in oral cáncer and precancer with special reference to verrucous carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1999; 28: 226-32.
140. Scully C, Bagan V J. Recent advances in Oral Oncology. *Oral Oncol* 2007; 43: 107-115.
141. Tanuja T. y cols. Expresión of Bcl-2 and Bax In Chewing Tobacco-Induced Oral Cancers and Oral Lesions from India. *Pathology Oncology Research* 2002; 8 (2):109-14.
142. Loro L. y cols. Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance. *J Oral Pathol Med* 2003;32:125-38.
143. Mc Alinden RL. y cols. Bcl-2 expression in sequential biopsies of potentially malignant oral mucosal lesions assessed by immunocytochemistry. *Oral Diseases* 2000;6:318-26.
144. Dechao L. y cols. Reactive oxygen species (ROS) control the expression of Bcl-2 family proteins by regulating their phosphorylation and ubiquitination. *Cancer Sci* 2004;95:644-50.
145. Loro L. y cols. Decreased expression of bcl-2 in moderate and severe oral epithelia dysplasias. *Oral Oncology* 2002; 38:691-8.
146. Schoelch M. L. y cols. Apoptosis-associated proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 1999;35:77-85.
147. Gibson S. y cols. Induction of Apoptosis in Oral Cancer Cells by an Anti-bcl-2 Ribozyme Delivered by an Adenovirus Vector. *Clinical Cancer Research, Vol.6, 213-222, January 2000.*
148. Tong D. y cols. 5-Fluorouracil-induced apoptosis in cultured oral cancer cells. *Oral Oncology* 2000;36: 236-41.
149. Kudo Y. y cols. p27Kip1 Accumulation by Inhibition of Proteasome Function Induces Apoptosis in Oral Squamous Cell Carcinoma Cells. *Clinical Cancer Research Vol. 6, 916-923, March 2000.*

150. Chrysomali E. y cols. Immunohistochemical evaluation of cell proliferation antigen Ki-67 and apoptosis-related proteins Bcl-2 and caspase-3 in oral granular cell tumor. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 96:566-72.
151. González-Moles M.A, Ruiz-Avila I, Rodríguez-Archilla A, Martínez-Lara I. Suprabasal expression of Ki-67 antigen as a marker for the presence and severity of oral epithelial dysplasia. *Head and Neck* 200; 22: 658-661.
152. Briones, F.; Calderon, M; Muñoz, J; Venegas, F y Araya, N. El anticuerpo monoclonal Ki-67 como elemento de valor pronóstico y diagnóstico en neoplasias mamarias caninas. *Rev. Chil. Anat* 2002; 20(2): 165-168.
153. Llamaron A. y cols. Co-expression of p53 and Ki67 and lack of EBV expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Path Med*, 2004. 33:30-6.
154. García – Pola Vallejo M.J. y cols. 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.
155. Everitt, B. S. The Analysis of Contingency Tables. *Chapman & Hall. Second Edition. 1992.*
156. Ferrán Aranaz, M. SPSS para Windows. Programación y Análisis Estadístico. *Mc Graw Hill. 1996.*
157. Sánchez, M., Frutos, G. y Cuesta, P. L. Estadística y matemáticas aplicadas. *Editorial Síntesis. 1996.*
158. Valentin-Vega YA, Barboza JA, Chau GP, El-Naggar AK, Lozano G. High levels of the p53 inhibitor MDM4 in head and neck squamous carcinomas. *Hum Pathol. 2007; 38(10): 1553-62.*
159. Nylander K, Dabelsteen E, Hall PA. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Pathol Med. 2000; 29(9): 413-25.*
160. Mithani SK, Mydlarz WK, Grumbine FL, Smith IM, Califano JA. Molecular genetics of premalignant oral lesions. *Oral Dis. 2007; 13(2): 126-33.*

161. Nishioka H, Hiasa Y, Hayashi I, Kitahori Y, Konishi N, Sugimura M (1993). Immunohistochemical detection of p53 oncoprotein in human oral squamous cell carcinomas and leukoplakias: comparison with proliferating cell nuclear antigen staining and correlation with clinicopathological findings. *Oncology*. 1993; 50: 426–429.
162. Kaur J, Srivastava A, Ralhan R. Overexpression of p53 protein in betel- and tobacco-related human oral dysplasia and squamous-cell carcinoma in India. *Int J Cancre*. 1994; 58: 340–345.
163. Girod SC, Cesarz D, Fischer U, Krueger GR (1995). Detection of p53 and MDM2 protein expression in head and neck carcinogenesis. *Anticancer Res* 15: 1453–1457
164. Huang JS, Chiang CP, Kok SH, Kuo YS, Kuo MY. Loss of heterozygosity of APC and MCC genes in oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *J Oral Pathol Med*. 1997; 26: 322–326
165. Ries JC, Schreiner D, Steininger H, Girod SC. p53 mutation and detection of p53 protein expression in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 1998; 18: 2031–2036.
166. Kovesi G, Szende B (2003). Changes in apoptosis and mitotic index, p53 and Ki67 expression in various types of oral leukoplakia. *Oncology*. 2003; 65: 331–336.
167. Warnakulasuriya KA, Tavassoli M, Johnson NW. Relationship of p53 overexpression to other cell cycle regulatory proteins in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 1998; 27(8): 376-81.
168. Kushner J, Bradley G, Jordan RC. Patterns of p53 and Ki-67 protein expression in epithelial dysplasia from the floor of the mouth. *J Pathol*. 1997; 183(4): 418-23.
169. Lippman SM, Sudbø J, Hong WK. Oral cancer prevention and the evolution of molecular-targeted drug development. *J Clin Oncol*. 2005; 23(2): 346-56.
170. McGregor F, Muntoni A, Fleming J, Brown J, Felix DH, MacDonald DG, Parkinson EK, Harrison PR. Molecular changes associated with oral dysplasia progression and acquisition of immortality: potential for its reversal by 5-azacytidine. *Cancer Res*. 2002; 62(16): 4757-66.

171. Grandis J. R., Tweardy D. J., Melham M. F. Asynchronous modulation of transforming growth factor α and epidermal growth factor protein expression in progression of premalignant lesions to head and neck squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 1998; 4: 13-20.
172. Grandis J. R., Zeng Q., Drenning S. D., Tweardy D. J. Normalisation of EGFR mRNA levels following restoration of wild-type p53 in a head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Int. J. Oncol.* 1998; 13: 375-378.
173. Oren M. The involvement of oncogenes and tumor suppressor genes in the control of apoptosis. *Cancer Metastasis Rev.* 1992; 11(2): 141-8.
174. Manning FC, Patierno SR. Apoptosis: inhibitor or instigator of carcinogenesis? *Cancer Invest.* 1996; 14(5): 455-65.
175. Jordan RCK, Catzavelos GC, Barrett AW, Speight PM. Differential expression of bcl-2 and bax in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Oral Oncol, Eur J Cancer.* 1996; 32B: 394-400.
176. Ravi D, Ramadas K, Mathew BS, Nalinakumari KR, Nair MK, Pillai MR. De novo programmed cell death in oral cancer. *Histopathol.* 1999; 34: 241-9.
177. Singh BB, Chandler FW Jr, Whitaker SB, Forbes-Nelson AE. Immunohistochemical evaluation of bcl-2 oncoprotein in oral dysplasia and carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endod.* 1998; 85: 692-8.
178. Yao L, Iwai M, Furuta I. Correlations of bcl-2 and p53 expression with the clinicopathological features in tongue squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 1999; 35: 56-62.
179. Sulkowska M, Famulski W, Chyczewski L, Sulkowski S. Evaluation of p53 and bcl-2 oncoprotein expression in precancerous lesions of the oral cavity. *Neoplasma.* 2001; 48: 94-8.
180. Schoelch ML, Le QT, Silverman S Jr, , et al. Apoptosis-associated proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 1999; 35: 77-85.

181. McAlinden RL, Maxwell P, Napier S, et al. Bcl-2 expression in sequential biopsies of potentially malignant oral mucosal lesions assessed by immunocytochemistry. *Oral Dis.* 2000; 6: 318-26.
182. Shin DM, Lee JS, Lippman SM, Lee JJ, Tu ZN, Choi G, Heyne K, Shin HJ, Ro JY, Goepfert H, Hong WK, Hittelman WN. p53 expressions: predicting recurrence and second primary tumors in head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1996; 88(8): 519-29
183. Temam S, Flahault A, Périé S, Monceaux G, Coulet F, Callard P, Bernaudin JF, St Guily JL, Fouret P. p53 gene status as a predictor of tumor response to induction chemotherapy of patients with locoregionally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Clin Oncol.* 2000; 18(2): 385-94.
184. Warnakulasuriya S, Jia C, Johnson N, Houghton J. p53 and P-glycoprotein expression are significant prognostic markers in advanced head and neck cancer treated with chemo/radiotherapy. *J Pathol.* 2000; 191(1): 33-8.
185. Van Houten VM, Tabor MP, van den Brekel MW, Denkers F, Wishaupt RG, Kummer JA, Snow GB, Brakenhoff RH. Molecular assays for the diagnosis of minimal residual head-and-neck cancer: methods, reliability, pitfalls, and solutions. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(10): 3803-16.
186. Hague A, Eveson JW, MacFarlane M, Huntley S, Janghra N, Thavaraj S. Caspase-3 expression is reduced, in the absence of cleavage, in terminally differentiated normal oral epithelium but is increased in oral squamous cell carcinomas and correlates with tumour stage. *J Pathol.* 2004; 204(2): 175-82.
187. Macluskey M, Chandrachud LM, Pazouki S, Green M, Chisholm DM, Ogden GR, Schor SL, Schor AM. Apoptosis, proliferation, and angiogenesis in oral tissues. Possible relevance to tumour progression. *J Pathol.* 2000; 191(4): 368-75.
188. Liu SC, Klein-Szanto AJ. Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. *Oral Oncol.* 2000; 36(2): 145-51.
189. Pich A, Chiusa L, Navone R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. *Ann Oncol.* 2004; 15(9): 1319-29.

190. Gall JG, Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1969; 63: 378–383
191. Derenzini M, Sirri V, Trere D, Ochs RL. The quantity of nucleolar proteins nucleolin and protein B23 is related to cell doubling time in human cancer cells. *Lab Invest.* 1995; 73: 497–502.
192. Dong H, Bertler C, Schneider E, Ritter MA. Assessment of cell proliferation by AgNOR scores and Ki-67 labeling indices and a comparison with potential doubling times. *Cytometry.* 1997; 28: 280–288
193. Brugal G. Interpretation of proliferation markers. In Hofstädter F, Knüchel R, Rüschoff J (eds): *Cell Proliferation Assessment in Oncology.* *Virchows Arch.* 1995; 427: 323–341.
194. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer.* 1983; 31: 13–20.
195. Catto retti G, Becker MHG, Key G et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB-1 and MIB-3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol.* 1992; 168: 357–363.

9.-ANEXO

Tabla de recogida de datos

Nombre			H.C
Edad	Sexo	Profesión	
Antecedentes Personales:			
Fuma:			
Bebe:			
Boca:			
Motivo de la consulta:			
Exploración:			
Cavidad oral:		Macroscópica	Inspección
		Palpación	Extensión
Cuello:			
Exploraciones especiales.			
Scanner			
Biopsia			
Juicio Diagnóstico:			
Estadaje:			
Tratamiento			