

Índice de Proliferación Celular con el marcador Ki67

En Cáncer Oral

Presentado por

Dahian Lized Silva Polania

Henry Damián Dussan Rivera

Brenda Camacho Restrepo

Asesor temático: Dr. Manuel García Flórez. PhD.

Asesor metodológico: Dra. Claudia Lorena García Rojas MSc.

Universidad Antonio Nariño

Facultad de Odontología

Pregrado en Odontología

Neiva-Huila

2020

Índice de Proliferación Celular con el marcador Ki67

En Cáncer Oral

Presentado Por

Dahian Lized Silva Polania

Henry Damian Dussan Rivera

Brenda Camacho Restrepo

Proyecto De Grado Para Optar Al Título De Odontólogo

Asesor temático: Dr. Manuel García Flórez. PhD.

Asesor metodológico: Dra. Claudia Lorena García Rojas MSc

Universidad Antonio Nariño

Facultad de odontología

Pregrado en odontología

Neiva-Huila

2020

**NOTA DE ACEPTACIÓN**

---

---

---

---

Presidente del Jurado

---

Jurado

---

Jurado

Neiva, Octubre de 2020

### **Dedicatoria**

Al creador de todas las cosas, el que me ha dado fortaleza para continuar cuando a punto de caer he estado; por ello, con toda la humildad que de mi corazón puede emanar, dedico primeramente mi trabajo a Dios. Por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorarlo cada día más.

A nuestros padres quienes con su apoyo incondicional, cariño y dedicación hicieron posible, la consecución de nuestro proyecto vida.

A nuestros hermanos y hermanas, que siempre han estado apoyándonos con sus mensajes de amor y apoyo.

A nuestros abuelos y familiares que de una u otra manera se vincularon con este trabajo.

A nuestros profesores, gracias por su tiempo, por su apoyo así como por la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi formación profesional.

## **Agradecimientos**

Queremos agradecer como primera medida a nuestro asesor temático el Dr. Manuel García Flórez y a la Dra. Claudia Lorena García Rojas, nuestra asesora metodológica, por su valioso acompañamiento en el desarrollo de este proyecto, por su alta competencia y conocimiento en nuestra materia de investigación, por su dedicación y comprensión y por creer en este proceso.

A la Universidad Antonio Nariño y a todos los profesores que componen esta gran y cálida familia educativa.

**Tabla De Contenido**

	<b>Pág.</b>
Resumen	9
Introducción	11
1	17
1.1	19
2	20
3	21
3.1	21
3.2	21
4	22
4.1	22
4.1.1	22
4.1.2	23
4.1.3	23
4.2	24
4.3	25
4.4	26
4.4.1	27
4.5	31

5. 32

5.1. 32

5.2. 32

5.3. 32

5.4. 32

5.5. 33

5.6. 33

5.7. 34

5.8. 34

5.9. 37

5.10. 37

6. 39

6.1. 39

6.2. 41

6.3. 44

7. 47

8. 48

9. 52

Bibliografía

**Lista de Figuras**

	<b>Pág.</b>
Figura 1. <i>Carcinoma de células escamosas</i>	20
Figura 2, <i>Carcinoma verrucoso</i>	21
<i>Figura 3. Ciclo celular</i>	23
Figura 4. Resumen de la reacción de Inmunohistoquímica para el marcador Ki67	32
Figura 5. Proceso de Inmunohistoquímica	33
<i>Figura 6. Imagen mediante técnica fluorescencia.</i>	35



**Lista de Tablas**

	Pág.
Tabla 1. Análisis conteo nucleos Cancer escamocelular	37
Tabla 2. Diagnostico patológico, edad, género y lugar anatómico de las muestras seleccionadas por conveniencia para identificar características histológicas del carcinoma escamo celular.	43

## Resumen

**Introducción:** Los marcadores biológicos, “son alteraciones celulares, bioquímicas o moleculares que se pueden medir y evaluar objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. **Objetivo:** Determinar los índices de proliferación celular en los estadios bien, moderadamente y pobremente diferenciado de cáncer escamocelular de la cavidad oral.

**Materiales y Métodos:** Corresponde a una investigación de tipo experimental, por el método de Inmunofluorescencia, mediante captura de imágenes con la AxioCam I Cm1 acoplada al Microscopio Axio imager Z2 con enfoque en z motorizado y obtenidas con el objetivo EC Plan-Neofluar 40x/0.75 M27. Se empleó el juego de filtros Set 49, que detecta la excitación de 358 nm y la emisión a 463 nm. Con el programa ZEN Digital Imaging se capturaron las imágenes con 300 dpi de resolución y en formato TIFF. **Resultados:** Los mayores diferenciales en núcleos por parámetro analizado corresponden a bien diferenciado (63% en N), pobremente diferenciado infiltrante (18,8% en S), moderadamente diferenciado (71,9% en SR), pobremente diferenciado infiltrante (7,3% en SI), bien diferenciado (10% en LR), moderadamente diferenciado ulcerado e infiltrante (2,2% en li) y bien Diferenciado ulcerado e infiltrante (19% en I). **Conclusiones:** se determinaron 3 tipos de grado histológico en la muestra; el cáncer escamocelular bien diferenciado, moderadamente diferenciado y pobremente diferenciado; identificando una mayor cantidad de núcleos en el carcinoma escamocelular pobremente diferenciado.

Palabras clave: Lesión Bucal, Bucodental, Carcinoma Escamocelular, Ki67, Ciclo Celular

## Abstract

**Introduction:** Biomarkers, "are cellular, biochemical or molecular alterations that can be objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes or pharmacological responses to a therapeutic intervention. **Objective:** To determine the rates of cell proliferation in the well, moderately and poorly differentiated stages of squamous cell cancer of the oral cavity. **Materials and Methods:** It corresponds to an experimental research, by the Immunofluorescence method, by means of image capture with the AxioCam ICm1 coupled to the Axio imager Z2 Microscope with motorized z focus and obtained with the EC Plan-Neofluar 40x/0.75 M27 objective. The Set 49 filter set was used, which detects the excitation at 358 nm and the emission at 463 nm. With the ZEN Digital Imaging program, the images were captured with 300 dpi resolution and in TIFF format. **Results:** The highest differentials in nuclei per parameter analyzed correspond to well-differentiated (63% in N), poorly differentiated infiltrating (18.8% in S), moderately differentiated (71.9% in SR), poorly differentiated infiltrating (7.3% in SI), well differentiated (10% in LR), moderately differentiated ulcerated and infiltrating (2.2% in LI) and well differentiated ulcerated and infiltrating (19% in I). **Conclusions:** 3 types of histological grade were determined in the sample; well-differentiated, moderately-differentiated and poorly-differentiated squamous cell carcinoma; identifying a greater number of nuclei in poorly-differentiated squamous cell carcinoma.

**Keywords:** Mouth Injury, Buccal, Squamous Cell Carcinoma, Ki67, Cell Cycle

## **Introducción**

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. Esta misma organización, calcula la incidencia mundial del cáncer de labio y de cavidad bucal desde 4 casos por 100.000 habitantes, hasta 20 casos por 100.000 habitantes en algunas regiones (OMS, 2019)

El cáncer oral puede ser el resultado de una lesión primaria u originarse desde otra lesión tumoral distante o adyacente que conduzca a neoplasias malignas en las estructuras y tejidos de la cavidad bucal (metástasis). Todos los tipos de cáncer en la cavidad oral y la orofaringe se conocen como cáncer oral o cáncer de boca; entre ellos se encuentra el cáncer epitelial (especialmente células escamosas), cáncer de glándulas salivales, cáncer de tejidos blandos, cáncer hematolinfoide y carcinoma odontogeno; el carcinoma de células escamosas (SCC) constituye > 90% de todos los cánceres orales.

El proceso carcinogénico es complejo: intervienen genes y proteínas reguladoras del proceso neoplásico, desde división y proliferación celular, hasta destrucción tisular e invasión metastásica.

Algunos de estos genes y proteínas (marcadores biológicos) involucrados en estas fases, pueden ser útiles como marcadores de la patología y pueden orientar el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del Cáncer.

Los marcadores biológicos, “son alteraciones celulares, bioquímicas o moleculares que se pueden medir y evaluar objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica; el siguiente proyecto tiene como objetivo determinar los índices de proliferación celular para establecer correlaciones con los

estadios de cáncer escamocelular de cavidad oral bien diferenciado, moderadamente diferenciado y pobremente diferenciado.

### **Antecedentes**

El cáncer de cavidad oral es la neoplasia más frecuente de *Head and Neck Cancer* (HNC) y representa más de la mitad de los casos de HNC en el país; de acuerdo a esto el cáncer de boca ocupa el sexto lugar como causa de mortalidad relacionada con el cáncer; según los investigadores el potencial de la terapia dirigida contra el cáncer abre una gran ventana para buscar nuevos marcadores o indicadores de malignidad en las células madre del cáncer de boca, especialmente en cánceres raros; el objetivo de esta investigación era establecer los marcadores de las células madre del cáncer en los cánceres orales (carcinoma oral de células escamosas, los cánceres de glándulas salivales) y establecer el indicador de progresión y/o pronóstico del tratamiento de cáncer oral; se determinó como marcadores más relevantes a los marcadores de tipo embrionario (de origen de las células primitivas; entre estos encontramos: El factor de transcripción OCT4, el cual tiene un papel importante en la embriogénesis; los factores de transcripción de la familia POU, que han sido relacionados en desarrollo neuronal; los factores de transcripción de la familia NANOG, están con otros factores reguladores como el OCT4, SOX2 y KLF4. Estos factores poseen un amplio espectro en diagnóstico, prevención y tratamiento farmacológico (Tahmasebia, Alikhani, Yazdanian, & Yazdanian, 2020).

Previamente se ha determinado la expresión de diversos biomarcadores moleculares en la lesión de liquen plano oral, con el fin de entender su comportamiento biológico; el método aplicado incluyó un estudio de inmunohistoquímica para una muestra de 40 casos de liquen plano oral contra BAX, BCL-2, CD-138, Histona 3, Ki-67, MCM3 y p53; se encontró una mayor expresión de BAX en contraposición con BCL-2, sugiriendo un comportamiento proapoptótico, respaldado a su vez por la ausencia de expresión de p53; con respecto a la expresión de los marcadores de

proliferación celular fue en todo el tejido lesional observado, sugiriendo así alteraciones de la proliferación; el marcador CD-138 se expresó de manera intensa y uniforme, determinando una baja alteración de las uniones intercelulares para estos casos; los autores concluyeron que la alteración en la expresión de las proteínas estudiadas sugiere un trastorno en los mecanismos proliferativos y apoptóticos, los cuales se asocian con una conducta patológica de la mucosa oral (Davila, Suarez, Pereira P, & Tomasi, 2019).

En Cáncer de Lengua se ha determinado la inmuno expresión de marcadores de proliferación celular: Ki-67 y Mcm-2), estos se han correlacionado con la edad de los pacientes y los indicadores pronósticos; se determinó que en pacientes jóvenes se presentaron los estadios III / IV ( $n = 13/65$  %), mientras que la mayoría de los pacientes mayores eran estadios I / II ( $n = 11 / 61,1$  %) ( $p > 0,05$ ). La media de Ki-67 en pacientes jóvenes y mayores fue 42,4% y 44,15%, respectivamente ( $p > 0,05$ ); la media de Mcm-2n fue mayor en pacientes mayores (63,6 %) que en pacientes jóvenes (55,75 %) ( $p < 0,05$ ). Se determinó que los pacientes jóvenes presentaron lesiones más agresivas que los pacientes mayores, sin embargo la expresión de Mcm-2 fue significativamente mayor en pacientes mayores que en pacientes jóvenes; desde el punto de vista del marcador se determinó que entre el Mcm-2 y Ki-67 (Pereira DS, Amorim B, & Weege N, 2016)

En 2016, Mondragón y Colaboradores (Mondragón, Rodríguez F, & Salazar H, 2016), correlacionaron la descripción histológica de casos de COCE con la expresión de Ki-67 y ciclina D1; para lograr dicho objetivo se analizó una muestra comprendida por 12 pacientes con lesiones sugestivas de cáncer oral, los cuales fueron incluidos en el estudio de pacientes con diagnóstico de COCE, a nivel metodológico se tomaron biopsias únicas, procesamiento histotécnico para cortes en parafina, coloración con H&E y coloración inmunohistoquímica con ciclina D1 y Ki-67, de acuerdo a esto tres pacientes cumplieron con los criterios de inclusión, llamados C1, C2 y C3; la

clasificación empleada fue la tipo de COCE según el *American Joint Committee on Cáncer*; los resultados indicaron que a nivel histológico, el caso C1 fue clasificado como COCE tipo II, los casos C2 y C3 tipo I; en la inmunohistoquímica encontramos en C1 Ki-67 positivo y ciclina D1 negativo, para C2, Ki 67 negativo y ciclina D1 positivo y para C3 Ki-67 positivo y ciclina D1 negativo; los autores concluyeron que los marcadores como Ki-67 y ciclina D1 en diagnósticos de COCE preestablecidos, pueden influenciar los resultados histológicos, contribuyendo a un diagnóstico más acertado así como los tratamientos a realizar en el paciente.

A nivel regional no se encontraron investigaciones o artículos en referencia al tema de estudio, lo cual evidencia la importancia de esta propuesta de investigación.



## 1 Planteamiento del Problema

El cáncer oral es una patología que afecta a una parte de la población. Las lesiones pueden presentarse en forma de pigmentaciones blancas o rojas, lesiones con úlceras, hemorragias. Pueden ocasionar pérdida ósea y dental, problemas de deglución, otitis y en algunos casos desencadenar la muerte.

En 2012, se registraron 300.373 casos de cáncer oral en el mundo, y de acuerdo con la *American Society of Clinical Oncology*, en Estados Unidos, cada año se diagnostican 53,000 casos nuevos de cáncer oral. Siendo los hombres más propensos que las mujeres en una relación de 2:1. Además, es el octavo cáncer más frecuente en hombres, con una edad promedio de 62 años en el momento del diagnóstico, pero se cree que el 25 % de los casos ocurre en personas menores de 55 años (nidcr, 2019). Por tal razón, se considera que esta patología tiene un crecimiento continuo, afectando de forma negativa la calidad de vida de las pacientes.

Ya las cifras de América Latina y el Caribe se registran 20.633 con una incidencia de 300 casos por 100.000 habitantes (2.1%) con una mortalidad de 145 por 100.000 habitantes (1.8%) (Bernal D & Hernández S, 2018).

De los 101.893 casos de cáncer en Colombia, en 2018, 845 corresponden a cáncer oral, posicionándolo como un tipo de cáncer relevante en el país. Durante este mismo periodo fallecieron 46.057 personas, de las cuales 354 fueron por cáncer de cavidad oral (IARC, 2019)

**Tabla 1.** Tabla de incidencia, mortalidad y prevalencia por tipo de cáncer a 2018

Cáncer	new cases				Deaths				5-Year prevalence (all ages)	
	Number	Rank	(%)	Cum. Risk	Number	Rank	(%)	Cum. Risk	Number	Prop.
Breast	13380	1	31,3	4,77	3702	3	8,6	1,31	39330	156,47
Prostate	12712	2	37,7	6,1	3166	5	9,1	0,89	27043	111,16
Stomach	7419	3	35,5	1,43	5505	1	21,1	1,01	9541	19,29
Lung	5856	4	7,5	1,21	5236	2	17,7	1,05	5341	10,8
Colón	5661	5	6,5	1,1	3389	4	44,4	0,5	12932	26,14
Thyroid	5114	6	5,5	0,94	471	20	13,3	0,09	17028	34,42
Non-Hodgkin Lymphoma	4170	7	4,3	0,8	1676	10	63,6	0,31	10644	21,52
Cervix Uteri	3853	8	3,3	1,32	1775	9	94,4	0,62	10518	41,84
Leukaemia	3126	9	1,2	0,53	2192	7	82,2	0,37	8464	17,11
Rectum	2922	10	9,2	0,59	1016	14	22,2	0,19	7169	14,49
Ovary	2414	11	4,2	0,88	1252	11	74,4	0,47	6126	24,37
Páncreas	2311	12	3,2	0,45	2142	8	74,4	0,42	1390	2,81
Liver	2279	13	2,1	0,43	2216	6	81,1	0,42	1552	3,14
Melanoma of skin	1907	14	1,1	0,36	518	19	22,2	0,09	5328	10,77
Brain, nervous system	1884	15	8,1	0,34	1176	12	61,1	0,21	4759	9,62
Kidney	1793	16	8,1	0,37	673	17	51,1	0,14	4220	8,53
Bladder	1660	17	6,1	0,32	596	18	32,2	0,17	4392	8,88
Gallbladder	1657	18	6,1	0,33	1104	13	40,0	0,21	1742	3,52
Corpus uteri	1583	19	6,1	0,64	357	22	81,1	0,14	4283	19,19
Multiple myeloma	1323	20	3,1	0,29	806	15	80,0	0,05	2911	5,89
Testis	1284	21	3,0	0,36	173	25	41,0	0,13	4480	18,41
Oesophagus	922	22	9,0	0,18	710	16	50,0	0,08	803	1,62
Larynx	848	23	8,0	0,18	418	21	90,0	0,07	2347	4,74
Lip, Oral Cavity	845	24	8,0	0,17	354	23	80,0	0,04	2260	4,57
Hodgkin Lymphoma	743	25	7,0	0,12	216	24	50,0	0,04	2425	4,5

Fuente: IARC (2018)

Otro aspecto que aumenta la problemática de esta enfermedad, es su diagnóstico tardío, por lo tanto es necesario conocer los procesos celulares que se desarrollan en torno a esta patología con el fin de poder identificar variaciones en la proliferación celular dentro de los diferentes estadios de diferenciación de la patología.

### **1.1 Formulación del Problema**

De acuerdo al anterior contexto se genera la siguiente pregunta de investigación

¿Está el índice de proliferación celular relacionado con el estadio de diferenciación del Cáncer Escamocelular de Cavidad Oral?

## 2 Justificación

El carcinoma de células escamosas de la cavidad oral es el cáncer más relevante para los cirujanos dentistas; es uno de los 10 cánceres más comunes en el planeta, con una detección clínica tardía, pobre pronóstico, con alternativas terapéuticas de alto costo y desfigurantes.

Esto indica que los procesos de investigación para conocer la evolución celular del cáncer oral y evitar de forma preventiva los aspectos relacionados anteriormente, deben conducir a un conocimiento específico en la búsqueda de evidencia científica que permita establecer con claridad los marcadores a nivel celular que pueden ayudar en el proceso de diagnóstico preventivo y de tratamiento farmacológico al paciente.

Por otra parte, el desarrollo del estudio presenta un nivel de importancia e innovación elevado para la región y para la Universidad Antonio Nariño, sede Neiva; ya que es escasa la literatura relacionada con marcadores de proliferación de cáncer oral a nivel regional, por lo tanto el documento resultante de la investigación servirá como herramienta de consulta y guía para la comunidad de las áreas de la salud en la UAN y otros claustros universitarios con formación a fin al área de la salud.

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo General**

Determinar los índices de proliferación celular en los estadios bien, moderadamente y pobremente diferenciado de cáncer escamocelular de la cavidad oral

#### **3.2 Objetivos Específicos**

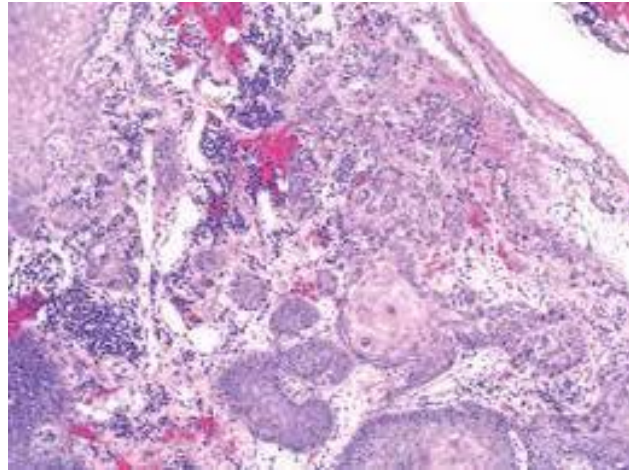
1. Correlacionar índices de proliferación celular con el estadio de diferenciación del cáncer de cavidad oral
2. Establecer cuál es el tipo de cáncer más prevalente dentro de la muestra analizada
3. Identificar las características sociodemográficas de los pacientes con cáncer oral que acudieron al hospital universitario Hernando Moncaleano en el periodo comprendido entre 2014 y 2016

## 4 Marco Teórico

### 4.1 Clasificación del cáncer oral.

#### 4.1.1 El carcinoma de células escamosas

**Figura 1.** *Carcinoma de células escamosas*



**Nota.** Carcinoma oral de células escamosas (Shutterstock)

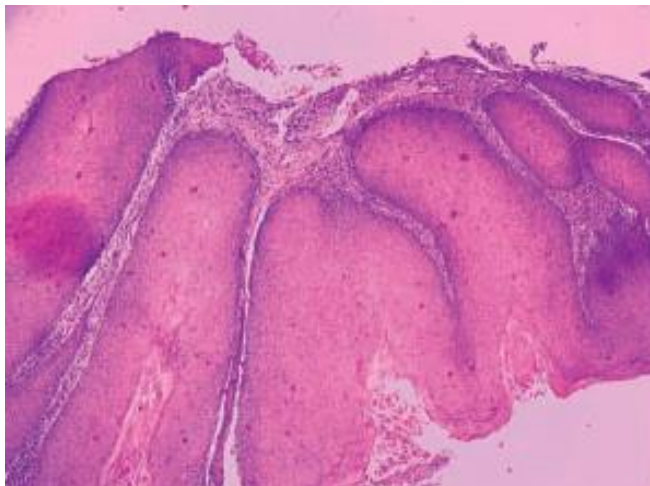
**Fuente:** Tomado de Oreamuno (2017)

Es la entidad maligna de mayor frecuencia en la región orofacial (alrededor del 90%), y aunque su incidencia es menor a la de otros tipos de cáncer, su importancia radica en su mortalidad y las secuelas físicas y psicológicas que origina. Puede presentarse como carcinoma *in situ* (no invasivo) o poseer características invasivas. Histológicamente los carcinomas invasivos son bien diferenciados, moderadamente diferenciados, poco diferenciados o indiferenciados (Sidrón A & Pérez M.L, 2015).

### 4.1.2 Carcinoma verrucoso

#### *Figura 2. Carcinoma*

Figura 2, *Carcinoma verrucoso*



Fuente: laboratorio xx

Este tipo de cáncer representa entre el 2 – 12% de los carcinomas orales. Es un tumor epitelial exofítico, bien diferenciado, de evolución lenta, con gran crecimiento papilar y solo invasivo en fases tardías. Otros tumores malignos derivados del epitelio son los carcinomas de células fusiformes y melanomas; con respecto a los del tejido conectivo se tienen los fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, liposarcoma, angiosarcoma, neurosarcoma, rabdomyosarcoma y leiomyosarcoma (Sidrón A & Pérez M.L, 2015).

### 4.1.3 Metástasis en las partes blandas de la cavidad oral

Las metástasis son poco frecuentes en la mucosa oral, ya que del total de las neoplasias del organismo sólo el 1% aproximadamente metastatizan en la cavidad oral. Los tumores primarios suelen estar localizados en pulmón, riñón e hígado (García G & Bascones M, 2009)

## 4.2 Epitelio de la Cavidad Oral

Las estructuras anatómicas que rodean la cavidad oral se encuentran cubiertas principalmente por una membrana que está formada por epitelio plano estratificado, que puede ser queratinizado o no queratinizado, dependiendo de la zona anatómica, este desempeña dos funciones importantes: de barrera, para evitar paso de factores patógenos externos y de cubierta para el tejido (Lobos N, 2019)

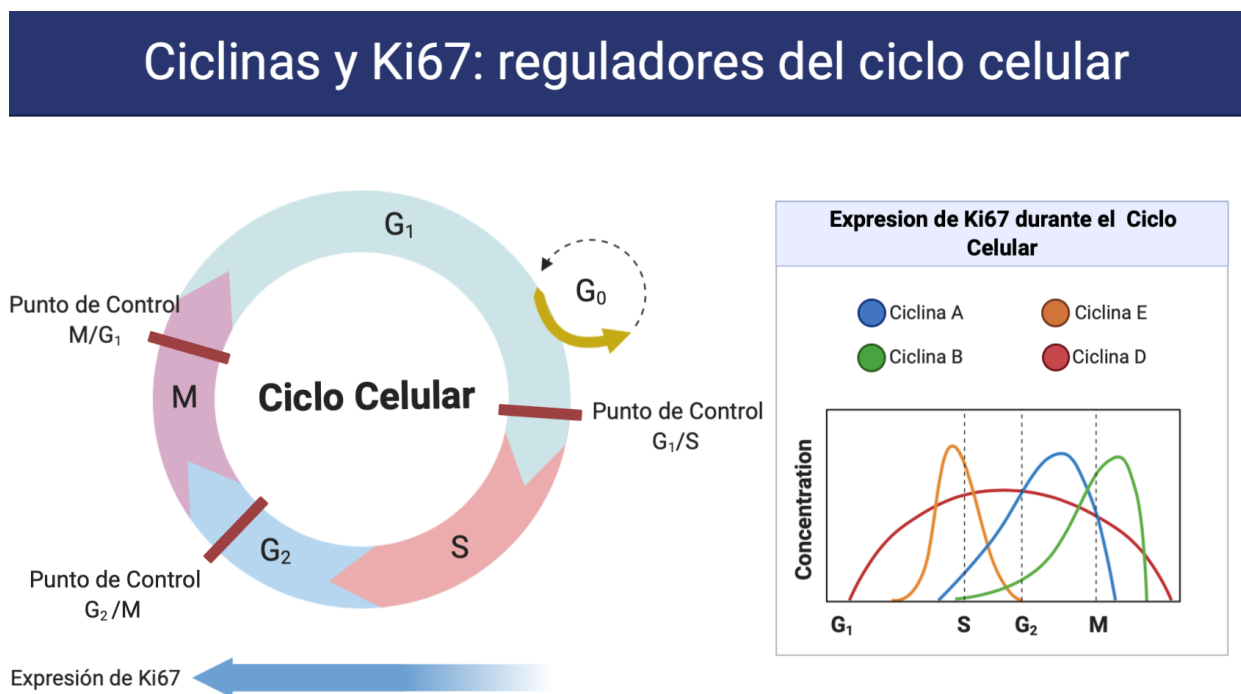
Al presentarse alguna alteración en el tejido, es resultado de un trastorno a nivel celular, específicamente en su proliferación que al ser descontrolada y sin función acaba por destruir, hurtar nutrientes y ocupar espacio en la región, todo esto es generado por factores etiológicos como el consumo de tabaco, efectos de la radiación actínica, infecciones, deficiencias nutricionales, enfermedades orales preexistentes y cofactores.

Es importante aclarar que la malignidad y diagnóstico se determina a través de una exploración histopatológica que también mide el potencial metastásico y está íntimamente relacionado con la magnitud de diferenciación que presentan las células tumorales y también la similitud entre la arquitectura del tejido y epitelio, de tal forma que se clasifican en tres grupos; bien diferenciado ya que los tumores producen grandes cantidades de queratina y presentan algunos rasgos de maduración; moderadamente diferenciado en el cual el tumor produce poca cantidad de queratina y el epitelio es aún reconocible; y, finalmente el pobremente diferenciado, tumores carentes de queratina, que han perdido su patrón estructural, sin cohesión de las células y con anomalías extensas de estas (MINSALUD, 2007) .



### 4.3 Ciclo celular

Figura 3. Ciclo celular



Fuente: Creado con BioRender.com por los autores Septiembre de 2020

El ciclo celular posee varias etapas por las que transcurre la vida de la célula. Una célula "nace" a partir de la división de su predecesora, pasa por una secuencia donde crece, duplica su tamaño y, finalmente, se divide en dos células hijas que iniciarán de nuevo el ciclo. Esto es lo que ocurre a las células que proliferan (Megías, Molist, & Pombal, 2017).

El ciclo celular de los distintos tipos celulares dentro de un tejido o de un organismo debe estar fuertemente controlado y coordinado. En la edad adulta disminuyen las tasas de proliferación celular, ajustándose a las necesidades de reparación, mantenimiento o supervivencia del organismo (Megías, Molist, & Pombal, 2017).

#### 4.4 Fases del ciclo celular

En condiciones normales, el proceso de división celular es precedido de una serie de acontecimientos denominados mitosis y el periodo de tiempo entre una mitosis y la siguiente se denomina interfase. Periodo durante el cual la célula se prepara para la posterior división durante la mitosis. (Figura 3). Podemos destacar los siguientes eventos durante el proceso de división celular:

- 1) La fase M que comprende la división nuclear o mitosis y la citoplásmica o citocinesis.
- 2) La fase G1 sigue a la citocinesis y se corresponde con el intervalo entre el final de la fase M y el inicio de la síntesis de DNA.
- 3) A continuación está la fase S en la que la célula duplica su contenido de DNA.
- 4) El ciclo termina con la fase G2 que abarca desde el final de S al principio de una nueva mitosis.

La duración de las distintas fases del ciclo varía considerablemente entre tipos celulares. Si una célula en el ser humano completara su ciclo en 24 horas; de ellas, 11 corresponden a la fase G1, 8 a S, 4 a G2 y aproximadamente 1 a M (National Human Genome Research Institute, 2019).

Por otro lado hay células con baja tasa de división celular, como es el caso del tejido nervioso. que pueden salir de la fase G1 para entrar en otra etapa del ciclo llamada G0 en que, aunque se mantienen metabólicamente activas, no se dividirán a menos que sean apropiadamente estimuladas por señales extracelulares; 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 duplicará el contenido de DNA, las células hijas resultantes serían en cada división más pequeñas.

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 (National Human Genome Research Institute, 2019)

#### **4.4.1 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 citoplasma o citocinesis; La mitosis es una secuencia continua de acontecimientos que clásicamente se divide en cinco etapas; la profase en la cual los cromosomas replicados se condensan y el huso mitótico comienza a formarse fuera de la membrana nuclear.

- 1) La prometafase se caracteriza por la desaparición de dicha membrana.
- 2) La metafase a lo largo de la cual los cromosomas se colocan en el ecuador del huso mitótico formando la placa mitótica.
- 3) 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.
- 4) 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 (megias, 2016)

- **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” (Rodríguez G, 2010).

En la fase S del ciclo el centrosoma se duplica, y al comenzar la profase los dos centrosomas hijos se separan y migran 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 reduciéndose y engrosando a medida que progresa la profase debido a la espiralización creciente de la molécula de DNA (Rodríguez G, 2010).

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 cromátidas 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 (Rodríguez G, 2010).

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) (Rodríguez G, 2010).

- **Prometafase**

En 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 p34cdc2. 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 cromátida 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) (Rodríguez G, 2010).

- **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.

- **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 (Rodríguez G & Frias V, 2014).

- **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 (Rodríguez G & Frias V, 2014).

- **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 (Rodríguez G & Frias V, 2014).

#### **4.5 Marcador Ki-67**

El 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; de igual forma, el Ki-67 puede emplearse, como marcador celular, 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.

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.

## **5. Metodología**

### **5.1. Enfoque de la investigación**

Esta investigación es de tipo experimental, en la cual se tienen diferentes grupos donde se comparan parámetros cuantificables. Por medio de la ejecución del proyecto se pretende dar solución a los interrogantes sobre la correlación entre los índices de proliferación celular con la agresividad del tumor.

### **5.2. Área y línea de investigación de la universidad**

Área de investigación: Ciencias de la Salud.

Línea: Ciencias Odontológicas.

### **5.3. Población y muestra**

Los casos se seleccionaron entre 2014 y 2016. El número de pacientes fue de 24 hombres y 9 mujeres para un total de 33 pacientes, el periodo de finalización de observación clínica fue hasta diciembre de 2016, totalizando 36 meses.

### **5.4. Materiales y Métodos**

Aunque para cada caso de tumor, se tiene el registro de tamaño, invasión, estatus de los nódulos. En esta fase el trabajo se centra en relacionar la morfología nuclear con estadios de diferenciación del tumor; Bien Diferenciado, Moderadamente Diferenciado y Pobremente Diferenciado, destacando la infiltración del tumor y la queratinización.

Para su valoración histológica, todas las biopsias fueron fijadas en formol tamponado, e incluidos en Paraplast de forma rutinaria, con ayuda del micrótopo fueron obtenidos cortes de 5m, los cuales fueron contrastados con la tinción Hematoxilina-Eosina (H&E).



Para el Análisis Nuclear Morfométrico se utilizó el programa FIJI, de libre distribución, en el cual se instaló el aplicativo NII, propuesto por (Filippi C, Oliveira, Jurkovski, & Callegari J, 2012).

Este permite la obtención de la información morfométrica de los núcleos, al cuantificar área nuclear y cuatro parámetros de irregularidad, que generan el Índice Nuclear de irregularidad (NII); porcentaje de núcleos normales (N); irregulares (I); pequeños regulares (SR); pequeños (S) pequeños e irregulares (SI); largos y regulares (LI), y largos e irregulares (LR).

### **5.5. Criterios de inclusión**

Se seleccionaron los pacientes que fueron atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano con cáncer en cavidad oral como faringe, laringe, lengua, epiglotis en el año 2014-2016, se excluyeron los pacientes con cáncer de labio ya que está relacionado con la exposición solar y otros factores.

### **5.6. Procesamiento del Material**

Una vez realizada la cirugía se procedió a la fijación en solución de formol tamponado al 4% durante 24h, posteriormente se realizó la deshidratación del tejido en concentraciones de alcohol ascendente hasta llegar al 100%, enseguida se sometió a diafanización en baños de xilol, para concluir en baños de parafina. Finalmente se realizó la inclusión. Una vez formados los bloques de parafina se cortaron a un espesor de 5 un y fueron repescados en láminas portaobjetos, de forma rutinaria se realizó el proceso de desparafinación, finalmente una vez los cortes fueron rehidratados se usó la tinción rutinaria de Hematoxilina y Eosina para observar la morfología general del tejido.

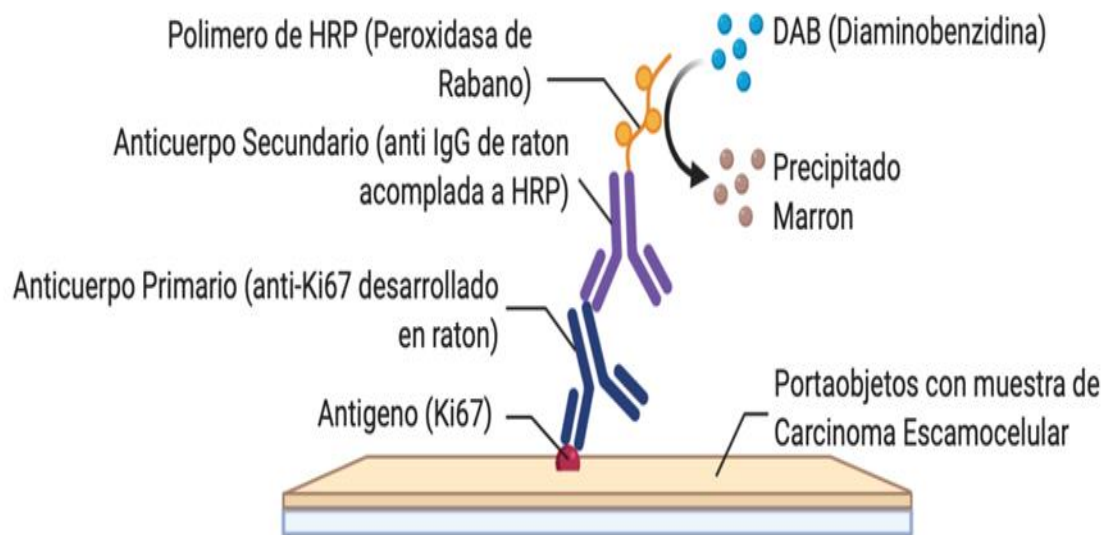
### 5.7. Captura y Análisis de Imágenes

La toma de las imágenes se realizó en el Laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana. Para tal fin se usó el Microscopio Imager Z2, marca Carl Zeiss, Alemania, con cámara AxioCam I Cm1, del mismo fabricante. Usando el software ZEN Imaging Software.

### 5.8. Inmunohistoquímica

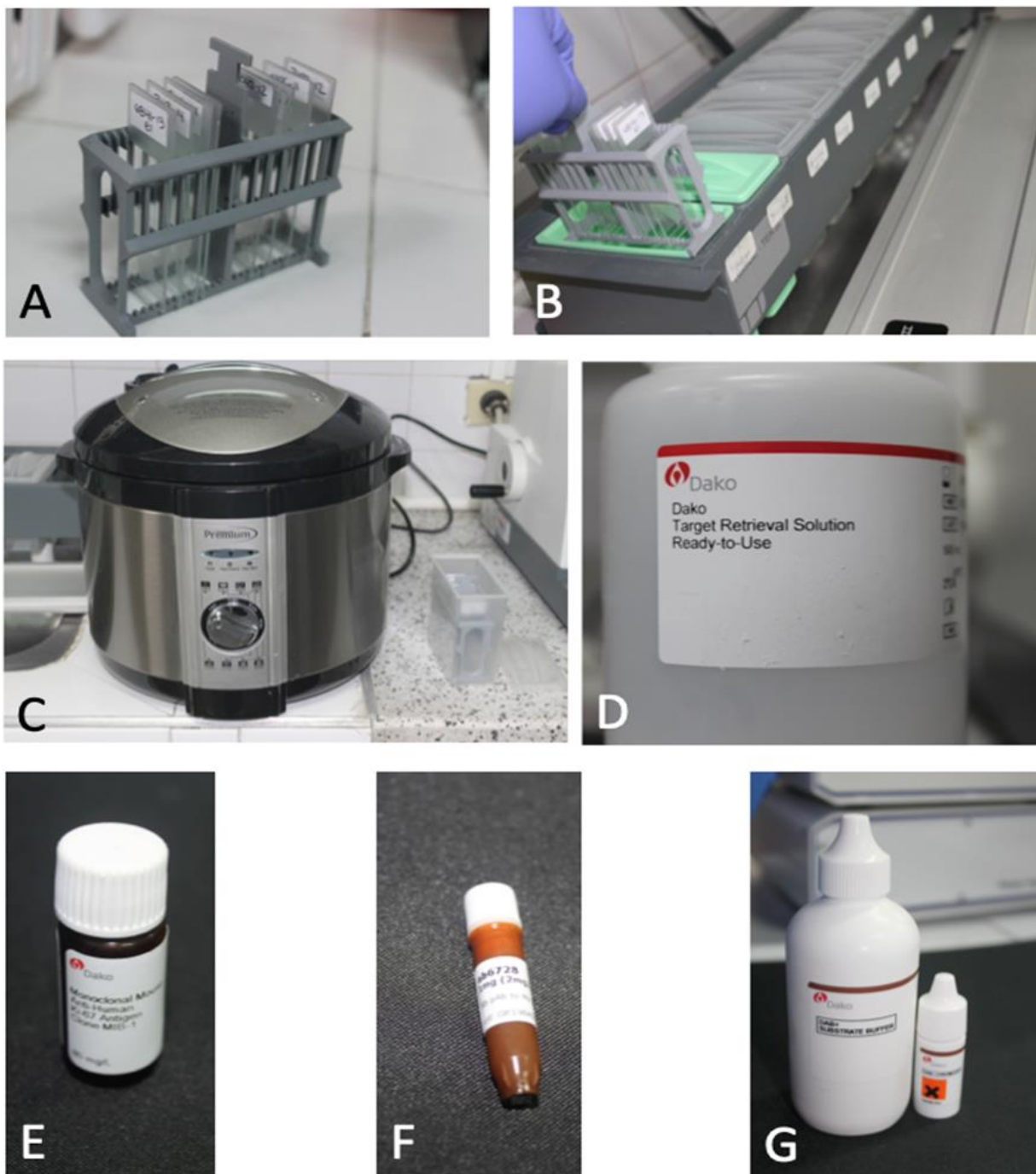
Los cortes de 5  $\mu\text{m}$  fueron desparafinados de forma rutinaria y posteriormente rehidratados. Se realizó la recuperación antigénica en tampón 10 mM citrato buffer, pH 6.0 durante 15 minutos en olla de presión eléctrica. Las láminas se incubaron en  $\text{H}_2\text{O}_2$  1% por 15 minutos, para bloquear la peroxidasa endógena. En seguida se usó BSA 3% por una hora para bloquear la unión inespecífica. Las secciones se incubaron *overnight* a 4°C con el anticuerpo primario monoclonal anti-Ki67 desarrollado ratón (Clone-MIB5; Dako Cytomation Inc., Carpinteria, CA, USA), en una dilución 1:100 en BSA 1%. Los controles negativos se incubaron solamente con BSA 1% sin el anticuerpo primario. Se usó el anticuerpo secundario policlonal *antimouse* desarrollado en conejo, acoplado a la enzima HRP (peroxidasa de rabano). La reacción fue revelada con el complejo Revelador Dako EnVision. Para esto se combinó 1 ml de tampón sustrato con 1 gota (20mL) de cromógeno líquido DAB (Diaminobenzidina) (DakoCytomation Inc., Carpinteria, CA, USA). (Figura 4 y 5)

**Figura 4.** Resumen de la reacción de Inmunohistoquímica para el marcador Ki67



Fuente: Creado con BioRender.com por los autores Septiembre de 2020

**Figura 5.** Proceso de Inmunohistoquímica



Proceso de Inmunohistoquímica. Resumen del material usado: laminas (A) desparafinización (B) maquina de presión eléctrica (C); solución de recuperación antigénica (D); Anticuerpo primario Anti- Ki67 (E); Anticuerpo secundario acoplado a HRP (F) y Revelador con Diaminobenzinida (G)

Fuente: Laboratorio

### **5.9. Cuantificación de celular Ki67 positivas**

Los índices de proliferación fueron obtenidos contabilizando los núcleos de las células Ki67-positivas y Ki67-negativas (Teñidas con Metil Green) a una magnificación de 400X. Un total de 3 láminas por grupo fueron seleccionadas y sometidas a reacciones inmunohistoquímicas. Aproximadamente un total de 2000 células fueron contadas por cada grupo de investigación.

Para el Análisis Nuclear Morfométrico se empleó el programa FIJI, de libre distribución, en el cual se instaló el aplicativo NII, propuesto por (Filippi-Chiela y colaboradores, 2011). Este permite la obtención de la información morfo métrica de los núcleos, al cuantificar área nuclear y cuatro parámetros de irregularidad, que generan el Índice Nuclear de irregularidad (NII); porcentaje de núcleos normales (N); irregulares (I); pequeños regulares (SR); pequeños (S) pequeños e irregulares (SI); largos y regulares (LI), y largos e irregulares (LR).

### **5.10. Inmunofluorescencia**

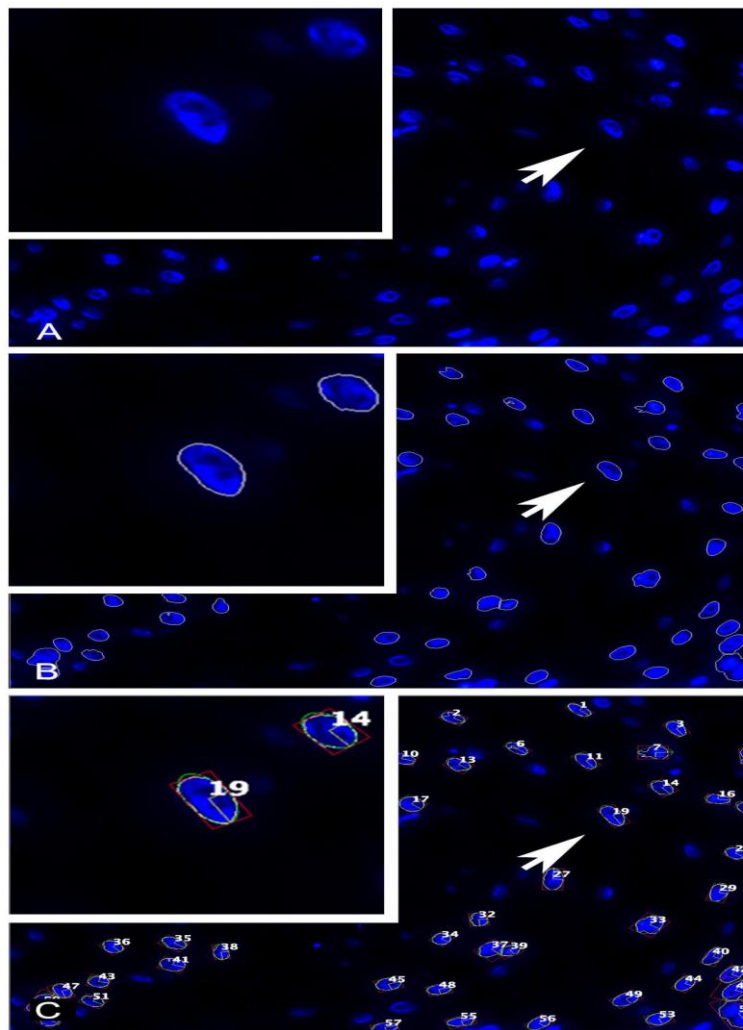
La tinción DAPI, con afinidad por ácidos nucleicos, fue usada para la identificación de los núcleos celulares. Para esto, las láminas fueron desparafinizadas y lavadas con dos repeticiones de xilol refrigerado de 1 min, enseguida se realizaron, 3 cambios de etanol al 95% , y 3 cambios de solución salina tampón tris (TBS).

Se aplicó entonces el DAPI (mounting medium Abcam ab104139) (1 µg/mL) por 5 min, , seguido de dos cambios de TBS, posteriormente cubierto con cubreobjetos y llevados al microscopio dotado con lámpara de fluorescencia. Las imágenes fueron capturadas con la AxioCam ICm1 acoplada al Microscopio Axio imager Z2 con enfoque en z motorizado y

Obtenidas con el objetivo EC Plan-Neofluar 40x/0.75 M27. Se empleó el juego de filtros Set 49, que detecta la excitación de 358 nm y la emisión a 463 nm. Con el programa ZEN Digital

Imaging se capturaron las imágenes con 300 dpi de resolución y en formato TIFF como se indica en la figura 6.

*Figura 6. Imagen mediante técnica fluorescencia.*



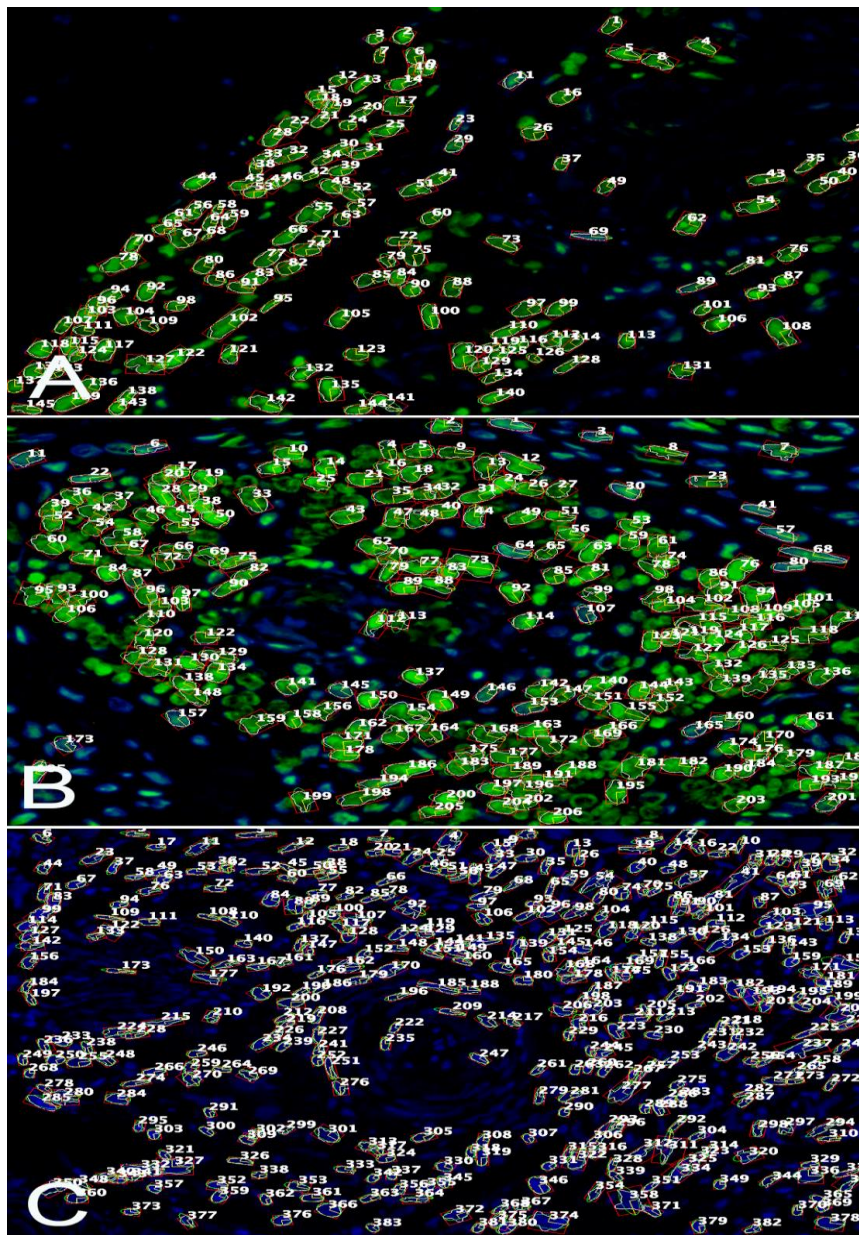
Fuente: AxioCam I Cm1 acoplada al Microscopio Axio imager Z2



## 6. Resultados

### 6.1. Correlacionar índices de proliferación celular con el estadio de diferenciación del cáncer de cavidad oral (Marcación con Técnica de Inmunofluorescencia y Análisis con el programa FIJI)

**Figura 7.** Marcación para el anticuerpo ki67 en Carcinoma Escamocelular Moderadamente diferenciado queratinizante ulcerado e infiltrante.

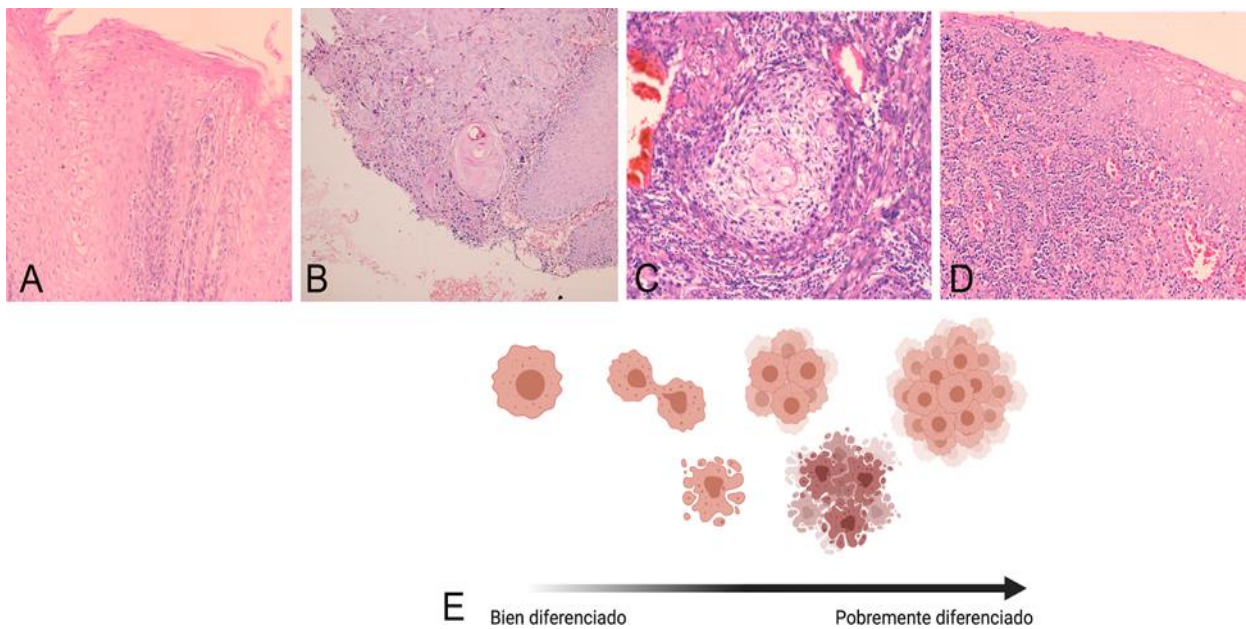


Fuente: AxioCam I Cm1 acoplada al Microscopio Axio imager Z2

La marcación con Inmunofluorescencia evidenció los núcleos en los grupos experimentales cáncer escamocelular bien diferenciado, moderadamente diferenciado y pobremente diferenciado (Figura 7), notándose, una mayor cantidad de núcleos en el carcinoma escamocelular pobremente diferenciado (Figura 7C). Al tabular estos datos se observa un aumento en los núcleos en división celular a medida que el Cancer avanza hacia el estadio pobremente diferenciado. De forma similar también son detectados núcleos apoptóticos en mayor porcentaje. (Tabla 1)

Los parámetros de irregularidad son: El Índice Nuclear de irregularidad (NII); porcentaje de núcleos normales (N); irregulares (I); pequeños regulares (SR); pequeños (S) pequeños e irregulares (SI); largos y regulares (LI), y largos e irregulares (LR).

**Figura 8. Proceso división celular para parametrización**



Fuente: Propio



Tabla 1. Análisis conteo nucleos Cancer escamocelular

Carcinoma Escamocelular	N	S	SR	SI	LR	LI	I	TOTAL
Bien Diferenciado	63% (272)	2% (8)	12% (52)	1% (4)	10% (43)	2% (10)	10% (43)	431
Bien Diferenciado Ulcerado e Infiltrante	56% (266)	5% (22)	20% (96)	1% (6)	1% (5)	1% (7)	19% (88)	473
Bien Diferenciado Queratinizante e Infiltrante	13.7% (67)	13.9% (68)	65.5% (321)	4.3% (21)	1% (5)	-	1.6% (8)	490
Bien Diferenciado Queratinizante e Infiltrante de Células Grandes	17.7% (55)	15.8% (49)	53.1% (165)	3.5% (11)	1.0% (3)	-	9% (28)	311
Bien Diferenciado. Queratinizante e Infiltrante de Crecimiento Endofítico, Ulcerado	38.6% (117)	5.3% (16)	47.2% (143)	0.3% (1)	2.6% (8)	-	5.9% (18)	303
Moderadamente Diferenciado	11.2% (40)	10.4% (37)	71.9% (256)	2% (7)	-	-	4.5% (16)	356
Moderadamente Diferenciado Ulcerado e Infiltrado	29.7% (148)	9.8% (49)	48.8% (243)	1.8% (9)	1.2% (6)	2.2% (11)	6.4% (32)	498
Pobrememente Diferenciado Infiltrante	9.9% (38)	18.8% (72)	58.5% (224)	7.3% (28)	-	-	5.5% (21)	383
Promedio	125.4	40.1	187.5	10.9	8.8	3.5	31.8	
DS	96.5	23.6	89.6	9.1	14.1	5.0	25.1	
n	1003	321	1500	87	70	28	254	

Fuente: Elaboración propia

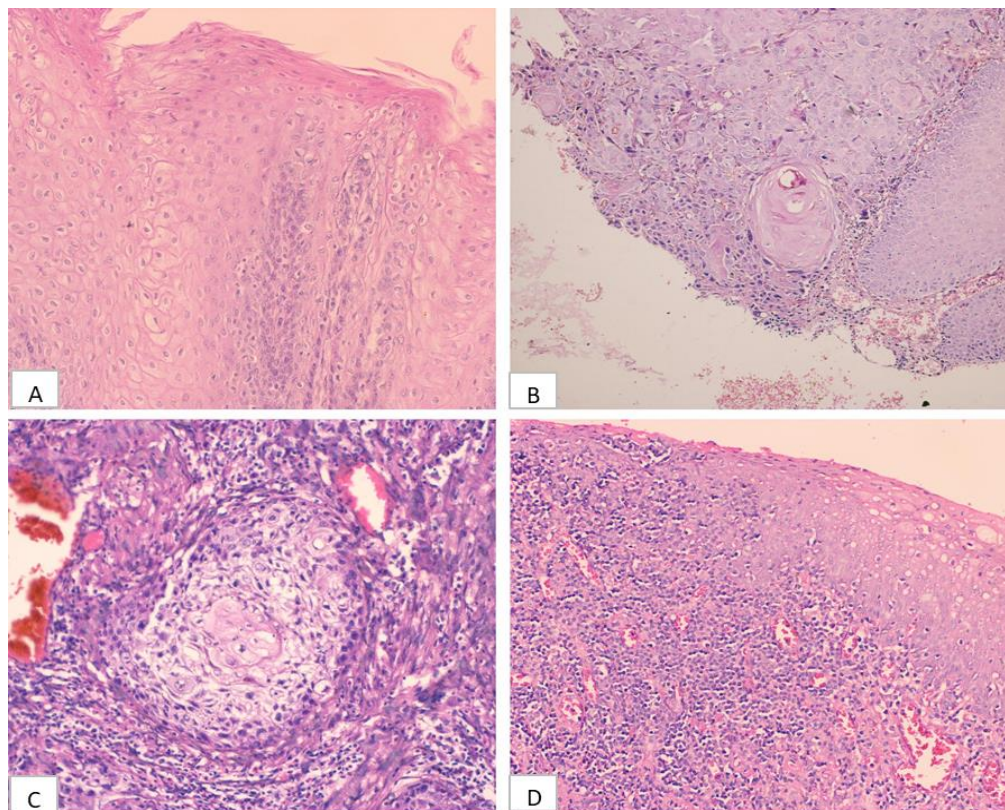
Con respecto a los parámetros analizados al comparar las desviaciones estándar con su promedio, los datos de mayor dispersión son los parámetros LR Y LI.

## 6.2. Análisis histológico

A diferencia del tejido regular estratificado plano queratinizado característico de la cavidad oral (Figura 7A), en las muestras analizadas se encontraron una serie de alteraciones correspondientes con la progresión de la enfermedad. El tumor bien diferenciado mostro características similares a la arquitectura del tejido normal, también se observaron perlas de queratina (Figura 7B). En el caso

del moderadamente diferenciado (Figura 7C) se observaron algunas regiones con queratina pero aquí ya es evidente el cambio de los núcleos de las células, alteraciones morfológicas en el tejido y pérdida de uniformidad del mismo, proceso que es aún más evidente en el tumor pobremente diferenciado (Figura 7D) como se indica en la figura 7.

**Figura 9. Tipos alteraciones carcinoma**

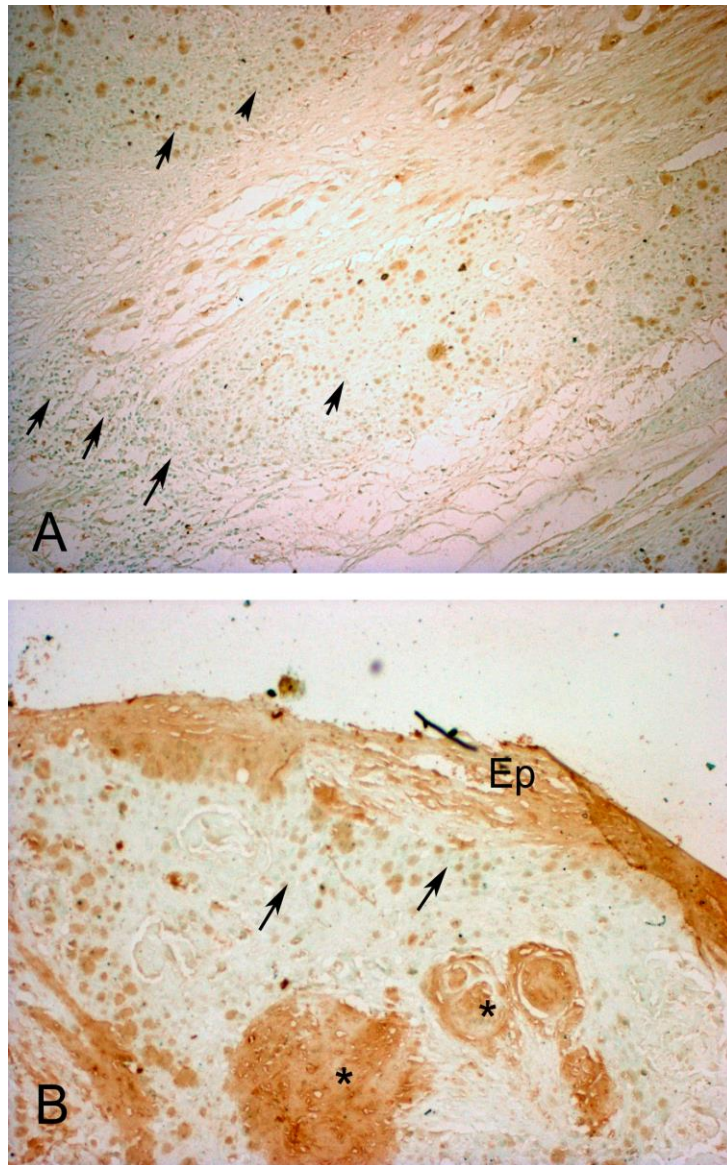


Nota, Fotografías en microscopía óptica de 20x de aumento, de cortes histológicos de la cavidad oral. A) Tejido normal de la cavidad oral, lengua B) carcinoma escamocelular bien diferenciado (CEBD) C) Carcinoma escamocelular moderadamente diferenciado (CEMD) y D) Carcinoma Escamocelular Pobremente Diferenciado

## 6.2 Marcación Inmunohistoquímica para Ki67

Las reacciones de Inmunohistoquímica mostraron la marcación positiva en algunos de los núcleos del tejido, se observaron núcleos en proliferación en el epitelio y estroma (flechas, Figura 8A). En el carcinoma escamocelular moderadamente diferenciado también se encontraron algunas perlas de queratina (asterico, Figura 8B).

**Figura 10.. Marcación inmunohistoquímica**



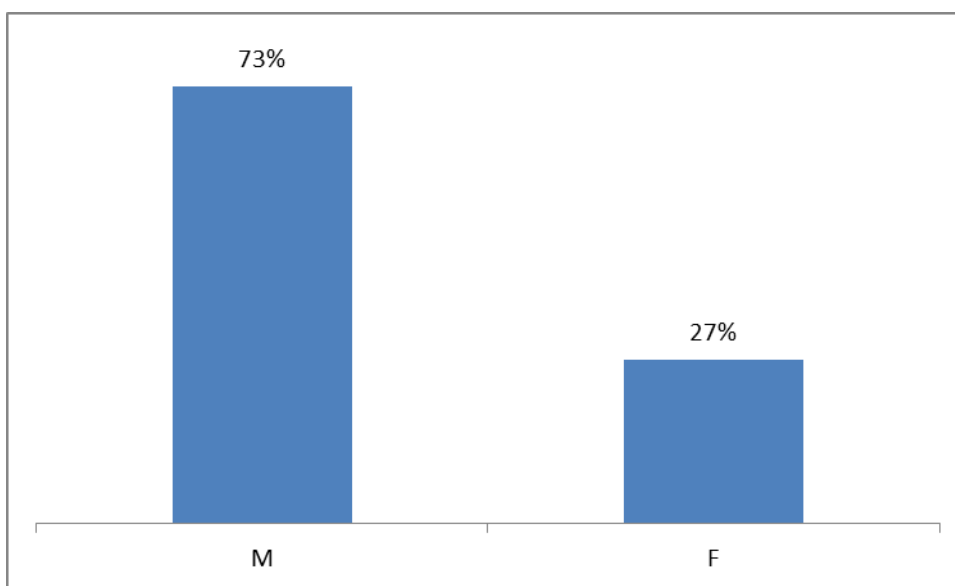
Fuente: Laboratorio

### 6.3. Características sociodemográficas

De las muestras seleccionados se encontró que el promedio de edad de los pacientes diagnosticados con cáncer escamo celular fue de 63 años de edad; el rango etario de la muestra varía entre 38 y 93 años.

Con respecto a la distribución del sexo de la muestra la Figura 11 muestra la siguiente tendencia:

*Figura 11 Sexo de la muestra*



Fuente: Propia

El 73 % de la muestra corresponde al sexo masculino y el 27 % al sexo femenino, de lo cual se establece una marcada participación de muestras masculinas.

Con respecto al rango de edad de la muestra, esta se encuentra entre los 38 y 93 años, con un promedio de edad de 63 años.

Tabla 2. *Diagnostico patológico, edad, género y lugar anatómico de las muestras seleccionadas por conveniencia para identificar características histológicas del carcinoma escamo celular.*

Caso	Diagnósticos histopatológico	Edad	Gen	Lugar Anatómico
1	Carcinoma escamo celular moderadamente diferenciado de la región glótica izquierda con extensión supraglótica e infraglótica	80	M	Laringe
2	Carcinoma escamo celular pobremente diferenciado infiltrante	64	M	Base de lengua, ganglios y epiglotis
3	Carcinoma escamo celular bien diferenciado	47	M	Lengua
4	Carcinoma escamo celular moderadamente diferenciado.	75	M	Laringe
5	Carcinoma escamo celular bien diferenciado, ulcerado, infiltrante, que compromete la supra glotis, glotis y su glotis.	74	M	Laringe
6	Carcinoma escamo celular moderadamente diferenciado infiltrante.	63	M	Laringe
7	Carcinoma escamo celular sarcomatoide.	33	F	Lengua
8	Carcinoma escamo celular infiltrante de células grandes, queratinizante, moderadamente diferenciado	56	M	Lengua y paladar blando
9	Carcinoma escamo celular moderadamente diferenciado ulcerado infiltrado.	54	F	Lengua
10	Carcinoma escamo celular bien diferenciado queratinizante.	79	M	Lengua
11	Carcinoma escamo celular bien diferenciado	66	M	Lengua
12	Carcinoma escamo celular de células grandes no queratinizante	66	M	Cavidad oral y ganglio mandibular
13	Carcinoma escamocelular infiltrante de células grandes, queratinizante, bien diferenciado.	72	F	Laringe
14	Carcinoma escamocelular bien diferenciado	55	M	Laringe
15	Carcinoma escamocelular moderadamente diferenciado, infiltrante.	54	M	Amígdala izquierda
16	Carcinoma escamocelular moderadamente diferenciado, infiltrante.	52	M	Laringe
17	Carcinoma escamocelular bien diferenciado queratinizante ulcerado e infiltrante.	49	M	Lengua: bode lateral izquierdo
18	Carcinoma escamocelular infiltrante de crecimiento endofítico, ulcerado de células escamosas grandes, queratinizante, bien diferenciado	43	M	Lengua
19	Carcinoma escamocelular moderadamente diferenciado, ulcerado, infiltrante.	87	F	Lengua
20	Carcinoma escamocelular moderadamente diferenciado.	41	M	Lengua
21	Carcinoma escamocelular de la lengua, ulcerado, que infiltra	63	M	Lengua
22	Carcinoma escamocelular bien diferenciado, ulcerado, infiltrante.	58	M	Lengua
23	Carcinoma escamocelular pobremente diferenciado no queratinizante.	60	M	Amígdala derecha
24	Carcinoma escamocelular bien diferenciado queratinizante infiltrante.	92	M	Amígdala izquierda

25	Carcinoma escamocelular moderadamente diferenciado	62	M	Hipofaringe
26	Carcinoma escamocelular moderadamente diferenciado	47	F	Amígdala
27	Comisura anterior y Glotis: Carcinoma escamocelular queratinizante moderadamente diferenciado	66	M	Comisura anterior y glotis: Laringe
28	Carcinoma escamocelular pobremente diferenciado abscesado.	76	M	Lengua
29	Carcinoma escamocelular bien diferenciado queratinizante ulcerado infiltrante.	48	F	Hemilengua derecha
30	Carcinoma escamocelular moderadamente diferenciado queratinizante ulcerado infiltrante.	56	F	Hemilengua
31	Carcinoma escamocelular bien diferenciado.	72	M	Cuerda vocal derecha y laringe
32	Carcinoma escamocelular bien diferenciado queratinizante e infiltrante.	67	M	Hemilengua Izquierda
33	Carcinoma escamocelular bien diferenciado queratinizante infiltrante.	65	F	Hemilengua izquierda

**Fuente: Autor 2020**

## 7. Discusión

Estudios previos mostraron resultados similares al aumento de apoptosis en el Cáncer de peor pronóstico (Jain, Maheshwari, Alam, Mehdi, & Sharma, 2009); al igual que el estudio realizado en la presente investigación se estableció un aumento en apoptosis (SR), lo que indica una validación de los estudios anteriores.

El análisis de la expresión de Ki-67 se usa para determinar el índice de proliferación de las células en tejido normal y en muestras de tumor, estudios previos han demostrado que los altos índices de Ki-67 estaban correlacionados con la gravedad de la enfermedad y con un peor pronóstico (Iamaroon, Khemaleelakul, Pongsiriwet, & Pintong, 2003), este planteamiento valida el hecho de que en la investigación realizada, se identificó mediante el marcador estadios elevados de núcleos Apoptóticos y normales.



## 8. Análisis y Conclusiones

La marcación con Inmunofluorescencia evidenció los núcleos en los grupos experimentales de grado histológico de cáncer escamocelular bien diferenciado, moderadamente diferenciado y pobremente diferenciado; de acuerdo a esto se identificó una mayor cantidad de núcleos en el carcinoma escamocelular pobremente diferenciado.

En el carcinoma escamocelular bien diferenciado el 63% de los núcleos fueron normales (N), mientras que en el diferenciado ulcerado e infiltrante solo el 56% fueron normales, para el caso de bien diferenciado queratinizante e infiltrante el 13,7% fueron normales, con respecto al bien diferenciado queratinizante e infiltrante de células grandes el 17,7% de las células fueron normales, al igual que bien diferenciado queratinizante e infiltrante de crecimiento endofítico, ulcerado el 38,6 %; en lo que respecta al grado histológico moderadamente diferenciado y moderadamente diferenciado ulcerado e infiltrante el porcentaje de núcleos normales fue de 11,2% y 29,7% respectivamente; en el grado histológico pobremente diferenciado infiltrante el porcentaje de núcleos normales fue del 9.9%; el mayor diferencial de núcleos normales se presentó en el carcinoma bien diferenciado.

En el carcinoma escamocelular bien diferenciado el 2% de los núcleos fueron pequeños (S), mientras que en el diferenciado ulcerado e infiltrante este valor fue del 5%, para el caso de bien diferenciado queratinizante e infiltrante de células el 13,9 % de los núcleos fueron pequeños, de igual forma el 15,8% de los núcleos pequeños se presentaron en el bien diferenciado queratinizante e infiltrante de células grandes; con respecto al bien diferenciado queratinizante e infiltrante de crecimiento endofítico ulcerado este valor fue de 5,3 %; en lo que respecta al grado histológico moderadamente diferenciado y moderadamente diferenciado ulcerado e infiltrante el porcentaje de núcleos normales fue de 10,4% y 9,8% respectivamente; en el grado histológico



pobrementemente diferenciado infiltrante el porcentaje de nucleos normales fue del 18.8%; el mayor diferencial de nucleos pequeños se presentó en el carcinoma pobrementemente diferenciado infiltrante.

En el carcinoma escamocelular bien diferenciado el 12% de los nucleos fueron pequeños regulares (SR), mientras que en el diferenciado ulcerado e infiltrante este valor fue del 20%, para el caso de bien diferenciado queratinizante e infiltrante de células el 65,5% de los nucleos fueron pequeños regulares, de igual forma el 53,1% de los nucleos pequeños regulares se presentaron en el bien diferenciado queratinizante e infiltrante de células grandes; con respecto al bien diferenciado queratinizante e infiltrante de crecimiento endofitico ulcerado este valor fue de 47,2 %; en lo que respecta al grado histológico moderadamente diferenciado y moderadamente diferenciado ulcerado e infiltrante el porcentaje de nucleos pequeños regulares fue de 71,9% y 48,8% respectivamente; en el grado histológico pobrementemente diferenciado infiltrante el porcentaje de nucleos pequeños regulares fue del 58,5%; el mayor diferencial de nucleos pequeños regulares se presentó en el carcinoma moderadamente diferenciado.

En el carcinoma escamocelular bien diferenciado el 1% de los nucleos fueron pequeños e irregulares (SI), mientras que en el diferenciado ulcerado e infiltrante este valor fue del 1%, para el caso de bien diferenciado queratinizante e infiltrante de células el 4,3%% de los nucleos fueron pequeños e irregulares, de igual forma el 3,5% de los nucleos pequeños e irregulares se presentaron en el bien diferenciado queratinizante e infiltrante de células grandes; con respecto al bien diferenciado queratinizante e infiltrante de crecimiento endofitico ulcerado este valor fue de 0,3 %; en lo que respecta al grado histológico moderadamente diferenciado y moderadamente diferenciado ulcerado e infiltrante el porcentaje de nucleos pequeños e irregulares fue del 2% y 1,8% respectivamente; en el grado histológico pobrementemente diferenciado infiltrante el porcentaje

de nucleos pequeños e irregulares fue del 7,3%; el mayor diferencial de nucleos pequeños e irregulares se presentó en el carcinoma pobremente diferenciado infiltrante.

En el carcinoma escamocelular bien diferenciado el 10% de los nucleos fueron largos e irregulares (LR), mientras que en el diferenciado ulcerado e infiltrante este valor fue del 1%, para el caso de bien diferenciado queratinizante e infiltrante de células el 1%% de los nucleos fueron largos e irregulares, de igual forma el 1% de los nucleos largos e irregulares se presentaron en el bien diferenciado queratinizante e infiltrante de células grandes; con respecto al bien diferenciado queratinizante e infiltrante de crecimiento endofitico ulcerado este valor fue de 2,6 %; en lo que respecta al grado histológico moderadamente diferenciado no se presentaron nucleos largos e irregulares, mientras que en el moderadamente diferenciado ulcerado e infiltrante el porcentaje de nucleos largos e irregulares fue del 1,2%; en el grado histológico pobremente diferenciado infiltrante no se presentaron nucleos largos e irregulares ; el mayor diferencial de nucleos largos e irregulares se presentó en el carcinoma bien diferenciado .

En el carcinoma escamocelular bien diferenciado el 10% de los nucleos fueron largos y regulares (LI), mientras que en el diferenciado ulcerado e infiltrante, el bien diferenciado queratinizante e infiltrante de células ,grandes, el bien diferenciado, queratinizante e infiltrante de crecimiento endofitico ulcerado, así como en el grado histológico moderadamente diferenciado no se presentaron nucleos largos y regulares, mientras que en el moderadamente diferenciado ulcerado e infiltrante el porcentaje de nucleos largos y regulares fue del 2,2%; en el grado histológico pobremente diferenciado infiltrante no se presentaron nucleos largos y regulares ; el mayor diferencial de nucleos largos y regulares se presentó en el carcinoma moderadamente diferenciado ulcerado e infiltrado.

Los parámetros de irregularidad son: El Índice Nuclear de irregularidad (NII); porcentaje de núcleos normales (N); irregulares (I); pequeños regulares (SR); pequeños (S) pequeños e irregulares (SI); largos y regulares (LI), y largos e irregulares (LR).

Con respecto al tipo de cáncer , las mayores prevalencias en la muestra corresponde a carcinoma escamo celular bien diferenciado (44%), seguido de carcinoma escamo celular moderadamente diferenciado (38%), carcinoma escamo celular pobremente diferenciado (9%), y carcinoma escamocelular de células grandes de lengua y sarcomatoide (3%)

A nivel sociodemográfico se identificó una mayor participación del sexo masculino frente al femenino; por otro lado el rango etario general de dicha población se ubicó entre los 38 y 93 años de edad., con una media de 63 años.

## **9. Recomendaciones**

Se debe contar un número suficiente de células y se debe tener en cuenta la heterogeneidad del tumor, con el fin de tener un mayor espectro en el análisis.

Se debe tener cuidado para distinguir los linfocitos de los cuerpos apoptóticos y no incluir neutrófilos u otros leucocitos en el recuento.

Ampliar los estudios a poblaciones muestrales de mayor tamaño, con el fin de tener un amplio análisis experimental.

## Bibliografía

- Bernal D, L. A., & Hernández S, P. V. (2018). *Detección temprana del cáncer oral en Colombia e implicaciones para el sistema de salud*. Bogotá: Unacional.
- Davila, L., Suarez, T., Pereira P, V., & Tomasi, R. (2019). *IMMUNOEXPRESSION OF BIOMARKERS BAX, BCL-2, CD-138, H3, Ki-67, MCM3 AND p53 IN ORAL LICHEN PLANUS*. Montevideo (Uruguay): Scielo.org.
- Filippi C, E. C., Oliveira, M. M., Jurkovski, B., & Callegari J, S. M. (2012). *Nuclear Morphometric Analysis (NMA): Screening of Nuclear Morphometric Analysis (NMA): Screening of*. Porto Alegre (Brasil): Plos one.
- García G, V., & Bascones M, A. (2009). *Update in oral cancer*. Madrid (España): Scielo.org.
- Iamaroon, A., Khemaleelakul, U., Pongsiriwet, S., & Pintong, J. (2003). *Co-expression of p53 and Ki67 and lack of EBV expression in oral squamous cell carcinoma*. Chiang Mai (Tailandia): Journal Of oral Pathology & Medicine.
- IARC. (12 de mayo de 2019). *iarc*. Recuperado el 12 de Septiembre de 2020, de iarc: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/170-colombia-fact-sheets.pdf>
- Jain, A., Maheshwari, V., Alam, K., Mehdi, G., & Sharma, S. (2009). *Apoptosis in premalignant and malignant squamous cell lesions of the oral cavity: A light microscopic study*. Aligarh (India): Indian Journal Pathology & Microbiology.
- Lobos N, J. F. (2019). *Patología de la mucosa oral*. Santiago de Chile: Scielo.org. Obtenido de [Infermera virtual](#).

megias. (12 de Junio de 2016). *megias*. Recuperado el 21 de Septiembre de 2020, de megias:

<https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/8-m.php>

Megías, M., Molist, P., & Pombal, M. A. (2017). *Atlas de Histología Animal y Vegetal*. Celta de vigo (españa): U de vigo.

MINSALUD. (2007). Guías de práctica Clínica en enfermedades neoplásicas. En MINSALUD, *Guías de práctica Clínica en enfermedades neoplásicas* (págs. 111-115). Bogotá: Minsalud.

Mondragón, E., Rodríguez F, R., & Salazar H, M. (2016). *Histological correlation of Ki-67 and D1 cycline markers expression in squamous cell carcinoma in the oral cavity*. Mexico D.F.: Scielo-org.

National Human Genome Research Institute. (12 de Septiembre de 2019). *National Human Genome Research Institute*. Recuperado el 23 de Septiembre de 2020, de National Human Genome Research Institute: <https://www.genome.gov/es/node/18636>

nidcr. (12 de junio de 2019). *nidcr*. Recuperado el 12 de enero de 2020, de nidcr: <https://www.nidcr.nih.gov/espanol/temas-de-salud/el-cancer-oral/informacion-adicional>

OMS. (18 de Junio de 2019). *OMS*. Recuperado el 3 de Septiembre de 2020, de OMS: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/oral-health#:~:text=El%20c%C3%A1ncer%20bucal%20abarca%20los,casos%20por%20100%20000%20personas>.

Pereira DS, J., Amorim B, K. M., & Weege N, C. F. (2016). *Immunoexpression of Cell Proliferation Markers in Oral Squamous Cell Carcinoma*. Rio Bravo (Brasil): Scielo.org.

Rodriguez G, A., & Frias V, s. (2014). *La mitosis y su Regulación*. Mexico D.f.: Medigraphic.

- Rodríguez G, J. C. (2010). *Estudio de los reguladores del ciclo celular asociados al desarrollo del cancer oral en una muestra de la provincia de Álava*. Madrid (españa): Ucomputlense.
- Sidrón A, M., & Pérez M.L, .. S. (2015). *Oral cancer: Genetics, prevention, diagnosis and treatment. Literature review*. Madrid (españa): Scielo.org.
- Tahmasebia, E., Alikhani, M., Yazdanian, A., & Yazdanian, M. (2020). *The current markers of cancer stem cell in oral cancers*. teheran (Iran): Science Direct.