

CAMBIOS MOLECULARES EN LOS MÁRGENES DE RESECCIÓN EN EL CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CAVIDAD ORAL

JUAN F LIUZZI, MARÍA CORRENTI, CARMEN LÓPEZ, HELEN RIVERA, SAÚL SISO, MARIBEL DACUNHA

SERVICIO ONCOLÓGICO HOSPITALARIO IVSS. LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR, INSTITUTO DE ONCOLOGÍA Y HEMATOLOGÍA MPPS. LABORATORIO DE PATOLOGÍA BUCAL, FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA. CARACAS, VENEZUELA

TRABAJO GANADOR PREMIO "DR. ALEJANDRO CALVO LAIRET". 2012.

RESUMEN

OBJETIVO: Evaluación molecular de márgenes de resección en pacientes con carcinoma de células escamosas de cavidad oral sometidos a cirugía. **MÉTODO:** 16 pacientes con carcinoma escamoso de cavidad oral, en cualquiera de sus localizaciones, sin tratamientos previos, intervenidos quirúrgicamente en el 2011. La pieza operatoria fue procesada por anatomía patológica a través del método tradicional, realizándose cortes adicionales que incluían: tumor y 0,5 cm de margen no tumoral. Se realizó hematoxilina-eosina y complementó con inmunomarcaje para p53, PCNA, Ki-67, factor de crecimiento epidérmico y receptor de crecimiento endotelial vascular. **RESULTADOS:** De los 16 pacientes en estudio la mayoría eran del género masculino, la edad promedio fue cercana a los 60 años, la mayoría eran pacientes consumidores de tabaco y alcohol. La lengua fue la localización más frecuente y los tumores se encontraban en un estadio avanzado (estadio III y IV). Estudio molecular: todos los marcadores evaluados se encontraban positivos en los márgenes de resección en el 93,75 % de los pacientes. Los marcadores de proliferación celular como el PCNA y Ki-67 así como el p-53 se encontraban positivos entre 1,5 cm a 2 cm del tumor con un marcaje intenso. Por el contrario, el factor de crecimiento epidérmico el receptor de crecimiento endotelial vascular se encontraban positivos hasta 1,5 cm pero con menor intensidad. **CONCLUSIONES:** En el cáncer oral podemos observar con frecuencia cambios moleculares en el tejido aparentemente sano que rodea el tumor hasta por lo menos 15 mm.

PALABRAS CLAVE: Cáncer, oral, campos de cancerización, p53, PCNA, Ki-67, factor de crecimiento epidérmico, receptor de crecimiento endotelial vascular.

SUMMARY

OBJECTIVE: The molecular evaluation of resection margins in patients with squamous cell carcinoma of oral cavity who underwent surgery. **Field of cancerization concept.** **METHODS:** We included 16 patients with oral cavity squamous cell carcinoma in any of their locations, without pre treatment, surgically treated in our hospital in the 2011 year. The surgical specimen was processed by the pathology department of our institution, through the traditional method, additional sectioned including the tumor and at least 0.5 cm margin non tumorigenic. Study was performed hematoxylin eosin and was supplemented with immunostaining for p53, PCNA, Ki-67, epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor. **RESULTS:** The most important features of the 16 patients studied were: The majorities were male, the average age was around 60 years old; most of them were tobacco and alcohol consumers. The tongue was the most frequent location and most of the tumors were in an advanced stage (stage III y IV). In molecular evaluation all the markers were positive in the resection margins in 93.75 % of all patients. The cell proliferation markers such as PCNA and Ki-67 and the p-53 were positive 1.5 cm to 2 cm tumor with intense staining. Conversely, epidermal receptor grow factors and vascular endothelial grow factor receptor were positive up to 1.5 cm but with less intensity. **CONCLUSIONS:** In oral cancer can often observe molecular changes in the apparently healthy tissue surrounding the tumor to at least 15 mm.

KEY WORDS: Cancer, oral, field of cancerization p53, PCNA, Ki-67, epidermal growth factor receptor, vascular endothelial growth factor receptor.

Recibido: 29/04/2012 Revisado: 14/09/2012
Aceptado para publicación: 05/10/2012

Correspondencia Dr. Juan F Liuzzi: Avenida Libertador,
edif. Av. Libertador N° 75, piso 3, consultorio 3-D,
La Campiña, Caracas, Venezuela. Tel: 04166153436.
E-mail: jfliuzzi@gmail.com.

INTRODUCCIÓN

La incidencia de cáncer de cabeza y cuello para el año 2006 en EE.UU fue de aproximadamente 40 490 nuevos casos (siendo el 3 % de todos los tumores malignos del adulto), con una mortalidad de 11 170 pacientes ⁽¹⁾. En Venezuela la mortalidad por cáncer de cabeza y cuello registrada para el año 2005 fue de 634 casos ⁽²⁾.

El cáncer de cabeza y cuello, independientemente de su localización, se asocia generalmente con un pronóstico ominoso ⁽³⁾.

Se considera a este tipo de cáncer como una enfermedad de etiología multifactorial, describiéndose varios factores de riesgo que pueden aumentar su incidencia. De los factores universalmente conocidos que aumentan el riesgo de cáncer de cabeza y cuello se encuentran el consumo de tabaco y de alcohol. Igualmente existen un gran número de investigaciones que apoyan la evidencia de que los virus contribuyen en el desarrollo del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, entre ellos el virus de Epstein Barr, el cual se ha asociado con el carcinoma nasofaríngeo, y el virus del papiloma humano, relacionado con el carcinoma de orofaringe ⁽⁴⁾.

Las células de la mucosa expuesta durante un tiempo prolongado a estos carcinógenos, comienzan a presentar cambios moleculares que posteriormente conllevan a cambios celulares, lo que se denomina proceso de carcinogénesis.

En vista que la exposición a los carcinógenos no solo ocurre en una sola área del tracto aero-digestivo superior, si no en toda la mucosa que lo conforma, pueden ocurrir en forma simultánea en varios sitios del tracto (esófago y pulmón inclusive), estos cambios de carcinogénesis. Esto explicaría la aparición de neoplasias en localizaciones lejanas al sitio original del tumor

(segundos primarios) o la reaparición del tumor en la cicatriz de una cirugía, a pesar de haberse obtenido en ella márgenes histológicos amplios y claros (recaída o recurrencia). La tasa de recaídas y de segundos primarios en cabeza y cuello puede variar entre un 10 % a un 40 % ⁽³⁾. Este fenómeno es lo que se ha descrito con el concepto de “campo de cancerización”.

El término de “campo de cancerización” fue postulado por primera vez por Slaughter y col., en su artículo publicado en 1953, que aunque no definieron un concepto como tal, dieron las primeras pistas de este fenómeno ⁽⁵⁾. Esta hipótesis sugería que después de exponer completamente el epitelio del tracto aero-digestivo superior a los carcinógenos se producen cambios citológicos y moleculares extensos lo que conduce a la aparición de múltiples neoplasias ⁽⁶⁾. Algunos trabajos han realizado análisis moleculares del epitelio considerado histológicamente normal adyacente a carcinomas y han evidenciado la existencia de alteraciones genéticas tempranas o inestabilidad cromosómica. Las células genéticamente alteradas forman “poblaciones clonales” las cuales tienen una elevada tasa proliferativa, sin embargo, se acepta que es necesario el acúmulo de diferentes alteraciones genéticas para lograr que una célula molecularmente alterada progrese a una célula maligna. Esto explicaría que a pesar de que una célula posea diversos cambios moleculares, citológicamente sea de apariencia normal o quizás tenga solo cambios displásicos ⁽⁷⁻⁹⁾.

Basado en recientes estudios genéticos, se propone un modelo de progresión para el desarrollo del cáncer oral. En la fase inicial, una célula pluripotencial o célula madre (*stem cell*) adquiere una alteración genética; posteriormente se forma un terreno, una unidad clonal, que consiste en la célula madre con sus células hijas, que comparten la alteración del ADN. El siguiente paso crítico es la conversión de un terreno en campo expansivo, como resultado de

alteraciones genéticas adicionales. Por último, la selección clonal provoca el desarrollo del carcinoma dentro de este campo contiguo de células pre-neoplásicas ⁽⁷⁾.

La rutina inmunohistoquímica y el estudio molecular de lesiones premalignas y malignas permiten conocer la expresión de algunas alteraciones genéticas, que pueden ayudar al diagnóstico y tratamiento de esta patología, teniendo especial relevancia el estudio del oncogén p53, factores de proliferación celular (Ki-67 y el antígeno nuclear de proliferación celular o PCNA) y factores de crecimiento epidérmico o vascular endotelial ⁽¹⁰⁾.

El trabajo que se presenta a continuación es realizado con el propósito de determinar si en una población seleccionada de pacientes con cáncer oral, intervenidos quirúrgicamente, con especímenes patológicos que muestran márgenes de resección negativos a la evaluación microscópica según la coloración de hematoxilina eosina (H&E), presentan en ese margen de resección, aparentemente sano, cambios moleculares determinados a través de la inmunohistoquímica. El hecho de que podamos evidenciar cambios moleculares similares a nivel del tumor y de los márgenes de resección confirmaría la teoría de los “campos de cancerización” y de las “poblaciones clonales” de las células malignas. Esto supondría una mayor posibilidad de desarrollar recurrencias tempranas y segundos primarios en los casos con marcados cambios moleculares en los márgenes de resección, que en aquellos que no poseen estas alteraciones.

MÉTODO

Este es un trabajo de corte prospectivo y de tipo descriptivo. Se incluyeron un total de 16 pacientes quienes ingresaron al servicio de cabeza y cuello en el año 2011, con clínica de tumor en el área de la cavidad oral en cualquiera

de sus localizaciones. A todos los casos se les realizó biopsia de la lesión confirmatoria del diagnóstico de carcinoma de células escamosas, se completaron los estudios de extensión, se clasificaron según el TNM clínico ⁽¹¹⁾ y fueron intervenidos quirúrgicamente. Los pacientes que se excluyeron del estudio fueron aquellos que al momento del ingreso ya habían recibido algún tipo de terapia para su patología, bien sea cirugía, quimioterapia o radioterapia. También se excluyeron los pacientes que presentaban tumores no resecables, con metástasis a distancia, con alto riesgo quirúrgico, o alguna otra condición que contraindicara su intervención quirúrgica.

Los pacientes fueron intervenidos quirúrgicamente realizándose cirugía en la cavidad oral y disecciones cervicales según fuere el caso particular. Todos los casos al operarse fueron sometidos a biopsia extemporánea de los bordes de resección para garantizar márgenes negativos de tumor. El espécimen quirúrgico en el departamento de anatomía patológica fue sometido al procesamiento habitual, describiéndose la pieza macro y determinando el tamaño tumoral, invasión a estructuras óseas o a la piel, tamaño y número de ganglios disecados y el espacio entre el tumor y el borde de resección (margen quirúrgico). Se tomaron muestras del tumor, de los bordes de resección, del hueso cercano al tumor (si este estaba incluido y después de haber sido sometido a descalcificación), y de los ganglios disecados para su colocación en formaldehído al 10 % y posterior inclusión en parafina. Se realizaron cortes adicionales del tumor en continuidad con el margen de resección, incluyendo de 0,5 cm hasta 2 cm de margen en relación al crecimiento radial del tumor. Posteriormente, se analizaron al microscopio después de su coloración de H&E, para determinar las características del tumor (grado de diferenciación, invasión angiolinfática, invasión perineural), cambios displásicos en los márgenes o presencia de tumor microscópico en los bordes, invasión ósea, número de ganglios metastásicos y de estar presentes, si presentaban

invasión extra capsular. Con estos datos el paciente fue reclasificado con el estadio TNM pos quirúrgico y se le indicó recibir o no radioterapia y/o quimioterapia posoperatoria según fuere el caso.

Luego a las muestras que incluían tumor y margen de resección, se les realizó inmunohistoquímica. Se usaron anticuerpos primarios monoclonales específicos para detectar la oncoproteína p53, marcadores de proliferación celular Ki-67 y PCNA y los factores de crecimiento epidérmico (EGFR) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) como marcador de transducción de señales.

Para el estudio inmunohistoquímico, los cortes fueron desparafinados y re-hidratados siguiendo los procedimientos histológicos habituales, se realiza exposición del antígeno con *buffer* citrato, luego se bloqueó la peroxidasa endógena utilizando peróxido de hidrógeno al 3 % (H_2O_2 al 3 %) en metanol (estuche DAB. Invitrogen®). Las secciones se incubaron con los anticuerpos primarios monoclonales dirigidos contra p53, PCNA, Ki-67, EGFR y VEGF. La dilución a emplear será 1:100 para cada anticuerpo primario. Se realizaron incubaciones con un anticuerpo secundario unido a un HRP (Invitrogen®) y reveló con el estuche comercial DAB (Invitrogen®). Las secciones fueron finalmente coloreadas con hematoxilina de Meyer y diferenciadas con agua corriente.

Las láminas fueron deshidratadas con concentraciones graduales de etanol hasta llegar al 100 % y por último a xileno, una vez transcurrido este tiempo, las secciones

coloreadas se cubrieron con medio de montaje *Inmunomunt* (Invitrogen®) y se le colocó un cubre objetos de 20 x 50 dejándose secar para su posterior observación a microscopio y registro. Se utilizaron controles internos y externos con la técnica de avidina-biotina-peroxidasa con el marcaje mediante diamino-bencidina como cromógeno.

Para los marcadores de proliferación celular y p53 se utilizaron los índices de proliferación celular, los cuales se obtienen cuando se observa tinción nuclear en los diferentes estratos del epitelio (capa basal, parabasal, medio y tercio superior), contando en un mínimo de 4 a 10 campos de 40 x cuando existía el mismo en el corte. Se contaron el total de núcleos marcados en cada caso, y se determinó el porcentaje del mismo en las diferentes distancias evaluadas. Las categorías de los porcentajes se establecieron como sigue (según los parámetros de Takeda y col.⁽¹²⁾ y González M y col.⁽¹³⁾). Se utilizaron asimismo, controles positivos externos e internos (tumor adyacente al borde) y las categorías fueron asignadas en cruces: 0 % de células positivas (negativo), 1 % - 25 % células positivas (+), 26 % - 50 % (++), 51 % - 75 % (+++) y más 75 % (++++).

Para la evaluación de los anticuerpos monoclonales EGFR y VEGF, se consideraron como positivos cuando presentaban marcaje de membrana, y se establecieron como parámetros los usados por Franchi y col.⁽¹⁴⁾ y Henríquez y col.⁽¹⁵⁾. En dicha escala se analiza semi-cuantitativamente las células en cuatro grados o *scores*: *score* 0: sin tinción en las células, 1: ≤

Cuadro 1. Anticuerpos primarios y concentración a emplear

Anticuerpo	Casa Comercial		Dilución
P53	INVITROGEN®	Mouse/anti-human	1:100
PCNA	“	Mouse/anti-PCNA	1:100
Ki-67	“	Mouse/anti-human	1:100
Bcl-2	“	Mouse/anti-human	1:100
EGFR	“		1:100

25 % células teñidas, 2: entre $\geq 25 \% \leq 50 \%$ de las células teñidas, 3: $\geq 50 \%$ y $\leq 75 \%$ de las células teñidas, y 4: $\geq 75 \%$ de las células teñidas.

RESULTADOS

De los 16 pacientes evaluados, la mayoría de ellos pertenecían al género masculino (11 pacientes 68,75 %), la edad media fue de 59,76 años con edades comprendidas entre 43 y 68 años. El 80 % de los pacientes fue considerado como fumador (antiguo o actual), con igual porcentaje de pacientes que consumían alcohol en cualquier cantidad. La localización más frecuente fue la lengua (12 pacientes 75 %), seguido por piso de boca y reborde alveolar inferior. A todos los pacientes se les realizó algún tipo de disección cervical uni o bilateral según fuere el caso. El tamaño tumoral fue variable, desde 0,9 cm hasta 8,5 cm. El margen de resección macroscópicamente más cercano a la lesión (el más pequeño evaluando la pieza en 3 dimensiones) comprendía entre 5 mm hasta 20 mm, los demás márgenes superaban estas cifras. La invasión ósea se presentó en 31,25 % y la invasión a piel en un 25 %. Los ganglios disecados en general comprendían un rango de 13 hasta un máximo de 107, con un promedio de 28,76 ganglios disecados; las metástasis se vieron en un total de 24 ganglios que pertenecían a 6 pacientes. Con respecto al estadio TNM pos-quirúrgico quedaron clasificados como estadio I un total de 3 pacientes (18,75 %), igual cantidad para los estadios II y III, mientras que el estadio IVA fue el más frecuente con 7 pacientes (43,75 %).

Con respecto a algunas características propias del tumor, los grados de diferenciación más frecuentes fueron el bien diferenciado y el moderadamente diferenciado con 7 casos cada uno (41,17 % c/u), el pobremente diferenciado se presentó en 2 casos. La presencia de invasión angiolinfática se observó en el 43,75 % y la invasión perineural en el 37,5 %.

En la evaluación del inmunomarcaje, se evidenció que con el p53 se observó tinción (2+) en 9 casos a una distancia 0,5 cm y 0,8 cm con respecto a la neoplasia, y 6 con inmunotinción de (1+) con distancia 1,2 cm a 1,5 cm. Se observó un caso sin inmunotinción.

Con el anticuerpo monoclonal VEGF, se observaron los siguientes resultados: se observó tinción 1 mm a 5 mm (0,5 cm) de distancia del tumor en 11 casos, y 5 casos mostraron positividad entre 1 cm a 1,5 cm del tumor, el cual fue la distancia máxima evaluada de la totalidad de los casos.

Con el anticuerpo monoclonal, EGFR, se observó marcaje a 0,5 cm de distancia del tumor, en 11 casos y en cuatro casos se observó positividad entre 0,6 cm y 1,2 cm (distancia máxima observada con el marcador). Se observó un caso en el cual no se observó inmunotinción.

Con los anticuerpos monoclonales de proliferación celular se obtuvieron los siguientes resultados: con el PCNA (antígeno de proliferación celular), se observó un índice de (2+) de las células positivas en nueve casos, tres casos con positividad de (3+) de las células positivas, y tres casos de (1+). Se observó un caso sin inmunotinción. El marcaje logró observarse hasta 15 mm del borde tumoral.

Con el Ki-67 se observó inmunotinción de (2+) en ocho casos, cuatro casos con (3+), tres casos con inmunotinción de (1+).

Se observó un caso sin inmunotinción. El marcaje logró observarse hasta 20 mm del borde tumoral.

DISCUSIÓN

Está aceptado que el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello se origina de un progenitor pre maligno común, seguido del crecimiento de "poblaciones clonales" asociado a alteraciones genéticas acumuladas que conllevan a una lesión invasiva. Estas alteraciones

genéticas resultan de la inactivación de genes supresores o de la activación de proto-oncogenes por delecciones, mutaciones, mutilación de promotores y amplificación de genes ⁽¹⁶⁻¹⁸⁾.

Las alteraciones genéticas más comunes que ocurren en forma más temprana son las siguientes:

1. La pérdida de heterozigosidad (*LOH* por sus siglas en inglés “*loss of heterozygosity*”) de la región del cromosoma 9p21, representa la alteración genética más común vista en las displasias y en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello con un 70 % al 80 % de los casos, inclusive es una mutación que puede observarse en el 30 % de las lesiones hiperplásicas. Este gen codifica al p16 y al p14, los cuales son responsables de la regulación del ciclo celular en G1 y la degradación del p53 mediada por el MDM2.
2. La pérdida de la región 3p21, es otra alteración genética “temprana” en las displasias y tumores invasivos. Esto puede ocurrir en un 16 % en lesiones pre-invasivas.
3. La pérdida en el cromosoma 17p13, el cual conlleva a la mutación del p53, esto puede evidenciarse en el 50 % de los casos y es considerado una alteración genética común pero tardía. En muchos tumores de cabeza y cuello la mutación del p53 ocurre en la transición de una lesión pre-invasiva a una invasiva, como lo demostró Boyle y col., cuando evidenció que la incidencia de mutaciones del p53 en lesiones no invasivas era del 19 % (7/37 pacientes) y se incrementaba a 43 % (28/65 pacientes) en tumores invasivos ⁽¹⁸⁾.
4. Amplificación del 11q13 y la sobreexpresión de la ciclina D1, son vistas entre el 30 % y 60 % de los casos de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y se asocia a un incremento de las metástasis ganglionares y a una pobre supervivencia ⁽¹⁶⁾.

Se ha determinado que la población de células clonales que se encuentran presentes en una hiperplasia, posee hasta un 30 % de alteraciones genéticas ocultas, las cuales son típicas de los carcinomas invasivos, lo que sugiere que una proporción substancial de estas lesiones progresarán a lesiones invasivas, sin embargo, lo usual, es que no todas las lesiones benignas progresen a cáncer ⁽¹⁷⁾.

El p53 es un gen de supresión tumoral ubicado en el cromosoma 17p13 que se encarga de corregir el ADN dañado durante el ciclo celular, y de no poder ser reparado, induce a la célula a la apoptosis o muerte celular programada, garantizando así que la célula dañada muera y no se reproduzca. En las células cancerosas, p53 a menudo aparece mutado o en su forma salvaje pero inactivada, favoreciendo que las células con ADN dañado o alterado sigan viviendo en vez de ser destruidas ⁽¹⁹⁾.

La proliferación celular es uno de los mecanismos de oncogénesis más importantes y es uno de los factores pronósticos más relevantes. Todas las células normales requieren de una estimulación basada en señales de crecimiento, diferenciación y proliferación, muchos de los cuales son llevados a cabo por factores de crecimiento. El EGFR juega un importante papel en el rol de la diferenciación, morfogénesis y proliferación, en el cáncer de cabeza y cuello su expresión ha sido documentada en 80 % ^(20,21).

La angiogénesis es un paso crucial en el éxito del crecimiento invasivo y metástasis tumoral, sin el cual el tumor no es capaz de crecer más de 1 mm³ a 2 mm³ en diámetro, el VEGF ha sido el candidato que lidera el proceso de angiogénesis tumoral ⁽²¹⁾.

El crecimiento tisular depende de la proliferación celular y la tasa de muerte celular. El PCNA es un polipéptido intranuclear de 36 kd cuya expresión está asociada con la síntesis de ADN y la proliferación celular; muchos estudios han demostrado una asociación de sobre-expresión de este marcador con un peor

pronóstico ⁽²¹⁾.

En nuestro trabajo, con respecto al p53, observamos que coincide con los marcadores de proliferación nuclear como Ki-67 y PCNA, apreciando que esta proteína se encontraba mutada hasta un máximo de 1,5 cm con respecto a la neoplasia, resultados que coinciden con lo descrito en la literatura. Prácticamente todos los pacientes del estudio presentan sobre-expresión de estos 3 marcadores en el epitelio aparentemente sano que rodea a los tumores.

Con los resultados obtenidos en este estudio podemos inferir que la distancia mínima de epitelio no neoplásico histológicamente en la cual se puede observar positividad con los biomarcadores en estudio fue de 5 mm (0,5 cm). Los que más expresaron positividad fueron los de proliferación celular (PCNA seguido de Ki-67). Esta positividad se observó principalmente en la capas basales y parabasales, excepcionalmente en tres casos llegó a los dos tercios del epitelio, sin evidenciar ninguno en todo el epitelio. Estos resultados coinciden con los descritos en la literatura y demuestra que el epitelio adyacente a la neoplasia expresa alteraciones genéticas que no pueden ser observadas o expresadas morfológicamente con los estudios convencionales de H&E.

De manera contraria, observamos positividad en pocos casos con los marcadores de EGFR y VEGF. En estos la distancia máxima que expresó positividad fue hasta 1,5 cm del tumor pero solo en 4 y 5 casos respectivamente. Con respecto a esto, tenemos que considerar que una limitación posible que pudo impedir mayor expresión de los anticuerpos es la sobre-exposición del material a

formaldehído al 10 % por más de 48 h, como es referenciado, estos marcadores expresan epítopes que pueden perder expresión con este artefacto técnico, motivo por el cual creemos que nuestros resultados a pesar de no coincidir con los de la literatura, pueden explicarse por esta razón.

Podemos entonces evidenciar que alrededor de los tumores, en un epitelio microscópicamente sano a la H&E, existen cambios invisibles al ojo humano, a nivel molecular, que incluyen alteraciones genéticas que pueden dirigir a estas células aparentemente sanas a desarrollarse y a convertirse en el tiempo en una célula neoplásica. Esto pareciera demostrar que al momento de la cirugía, la mucosa en la que hacemos el corte, a menos de 2 cm de la lesión, puede tener cambios moleculares, lo que puede explicar la aparición de recurrencias tempranas en cirugías amplias y la presencia de segundos tumores.

Pudiéramos concluir, según los resultados que se obtuvieron en este trabajo, el margen de resección que debemos dar para que sea adecuado desde el punto de vista de cambios moleculares, debería ser de por lo menos 2 cm. Sin embargo, este es un trabajo preliminar y deben añadirse una mayor cantidad de pacientes para así lograr un número quizás más representativo. Igualmente debe darse seguimiento a los mismos y determinar si existe correlación de los hallazgos inmunohistoquímicos y la posibilidad de recurrencia y supervivencia de los pacientes. Estudios futuros permitirán profundizar en el conocimiento de la relación entre estas lesiones y tal vez identificar la clave de las alteraciones moleculares, como objetivo o diana de la terapia génica.

REFERENCIAS

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, et al. Cancer statistics, 2006. CA Cancer J Clin. 2006;56(2):106-130.
2. Anuario de mortalidad 2005. Dirección general de

epidemiología. Dirección de información social y estadísticas. Ministerio del Poder Popular Para la Salud. Agosto 2006. Disponible en: URL: <http://www.mpps.gob.ve>.

3. Califano J, Leong P, Koch W, Eisenberger C, Sidransky D, Westra W. Second esophageal tumors in patients with head and neck squamous cell carcinoma: An assessment of clonal relationships. *Clin Cancer Res.* 1999;5:1862-1867.
4. Sisk EA, Soltys SG, Zhu S, Fisher SG, Carey TE, Bradford CR. Human papillomavirus and p53 mutational status as prognostic factors in head and neck carcinoma. *Head Neck.* 2002;24(9):841-849.
5. Braakhuis B, Tabor M, Leemans R, van der Waal I, Sow G, Brakenhoff R. Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: Molecular techniques provide new insights and definitions. *Head Neck.* 2002;24(2):198-206.
6. Day G, Blot W, Shore R, McLaughlin J, Austin D, Greenberg R, et al. Second cancers following oral and pharyngeal cancers: Role of tobacco and alcohol. *J Nat Cancer Inst.* 1994;86(2):132-137.
7. Gallegos-Villanueva M, Chimenos-Küstner E, López-López J, Roselló-Llabrés X. Cancerización de campo: Revisión del concepto. *Av Odontoestomatol.* 2007;23(1):35-44.
8. Gallegos-Hernández J. El cáncer de cabeza y cuello. Factores de riesgo y prevención. *Cir Ciruj.* 2006;74:287-293.
9. Höckel M, Dornhöfer N. The hydra phenomenon of cancer: Why tumors recur locally after microscopically complete resection. *Cancer Res.* 2005;65:2997-3002.
10. Santos-Garcia A, Abad-Hernandez MM, Fonseca-Sanchez E, Cruz-Hernandez JJ, Bullon-Sopelana A. Proteic expression of p53 and cellular proliferation in oral leukoplakias. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2005;10:1-8.
11. Edge SB, Byrd DR, Compton CC. Lip and oral cavity. En: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, editores. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7ª edición. Nueva York, NY: Springer; 2010.p.29-35.
12. Takeda T, Sugihara K, Hirayama Y, Hirano M, Tanuma JI, Semba I. Immunohistological evaluation of Ki-67, p63, CK19 and p53 expression in oral epithelial dysplasia. *J Oral Pathol Med.* 2006;35(6):369-375.
13. Gonzalez-Moles MA, Bravo M, Ruiz-Avila I, Acebal F, Gil-Montoya JA, Brenner S, et al. Ki-67 expression in non-tumor epithelium adjacent to oral cancer as risk marker for multiple oral tumors. *Oral Dis.* 2010;16:68-75.
14. Franchi A, Santucci M, Masini E, Sardi I, Paglierani M, Gallo O. Expression of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in carcinoma of the head and neck: Correlation with p53 status, inducible nitric oxide synthase activity, and angiogenesis. *Cancer.* 2002;95(9):1902-1910.
15. Henriques AC, de Matos FR, Galvão HC, Freitas Rde A. Immunohistochemical expression of MMP-9 and VEGF in squamous cell carcinoma of the tongue. *J Oral Sci.* 2012;54(1):105-11.
16. Perez-Ordoñez B, Beauchemin M, Jordan RCK. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol.* 2006;59:445-453.
17. Califano J, Van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: Implications for field cancerization. *Cancer Res.* 1996;56:2488-2492.
18. Boyle JO, Hakim J, Koch W, van der Riet P, Hruban RH, Roa RA, et al. The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res.* 1994;53:4477-4480.
19. Bradford CR. Predictive factors in head and neck cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1999;13(4):777-786.
20. Pich A, Chiusa L, Navone R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. *Ann Oncol.* 2004;15(9):1319-1329.
21. Sarkis SA, Abdullah BH, Abdul Majeed BA, Talabani NG. Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in oral squamous cell carcinoma: In relation to proliferation, apoptosis, angiogenesis and lymph angiogenesis. *Head Neck Oncol.* 2010;2:13.