

Valoración de la citología exfoliativa como factor de predicción en lesiones de la mucosa oral

Valuation of exfoliative cytology as prediction factor in oral mucosa lesions

Mabel Brunotto ⁽¹⁾, Ana María Zárate ⁽¹⁾, Adriana Cismondi ⁽²⁾, María del Carmen Fernández ⁽³⁾, Rita Inés Noher de Halac ^(1,2)

(1) Área de Biología Oral, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba. Argentina

(2) Investigador Independiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina

(3) Departamento de Biología Celular. Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada. España

Correspondencia / Address:

Mabel N. Brunotto

Facultad de Odontología

Haya de la Torre s/n

5000 - Córdoba, Argentina

E-mail: mbruno@odo.unc.edu.ar

Recibido / Received: 27-06-2004 Aceptado / Accepted: 1-04-2005

Indexed in:

-Index Medicus / MEDLINE / PubMed

-EMBASE, Excerpta Medica

-Índice Médico Español

-IBECs

Brunotto M, Zárate AM, Cismondi A, Fernández MC, Noher de Halac RI. Valuation of exfoliative cytology as prediction factor in oral mucosa lesions. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2005;10: Suppl 2:E92-102.

© Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - ISSN 1698-4447

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue inmunomarcarse las oncoproteínas CK14, p53, p21 y Bcl-2 a fin de evaluar la magnitud de su expresión en lesiones estomatológicas premalignas y malignas en el epitelio oral, y comparar esta expresión con alteraciones en las citologías exfoliativas de los mismos pacientes.

Se estudiaron biopsias y citologías de trece sujetos con líquenes plano oral con y sin infección con Virus Papiloma Humano (HPV), leucoplasias, y carcinomas espinocelulares diagnosticados clínicamente y confirmados por estudios anatomopatológicos.

Las lesiones producidas por líquen oral plano presentaron células binucleadas y con coloración naranja; en las lesiones leucoplásicas sólo se observó tinción naranja mientras que en carcinomas espinosos y en infecciones por Virus Papiloma Humano además se observaron coilocitos, células inflamatorias, aumento del volumen nuclear y microorganismos patogénicos. Las proteínas CK14, p53, p21 y Bcl-2 se encontraron modificadas en leucoplasias, líquenes planos orales y cáncer.

Las alteraciones citológicas y la inmunomarcación positiva o sobreexpresión de la citoqueratina CK14 en los estratos epiteliales superficiales deberían ser suficientes indicadores de transformaciones malignas como para realizar exámenes posteriores.

Palabras clave: Mucosa oral, citología exfoliativa, inmunocitología, p53, Bcl-2, p21, Ck14, lesiones premalignas.

INTRODUCCION

El cáncer oral involucra una serie de pasos, cada uno caracterizado por una acumulación secuencial de defectos genéticos seguidos de una proliferación por clonación. Los procesos neoplásicos que se inician en un epitelio normal, lo modifican

SUMMARY

The aim of this study was immunolabeling oncoproteins Ck14, p53, p21 and Bcl-2 in order to evaluate their expression in pre-malignant and malignant stomatological lesions in oral epithelial, and to compare this expression with exfoliative cytology alterations in the same patients.

It was studied biopsies and cytologies of 13 subjects with oral lichen planus, with or without Human Papilloma Virus (HPV), leukoplakia and squamous cell carcinoma clinically diagnosed and confirmed by anatomopathological studies.

The oral lichen planus lesion presented binuclei orange cells; and in leukoplakia lesions only orange stained was observed; meanwhile koilocytes, inflammatory cells, enlarge nuclear volume and pathogenic microorganisms were observed in the HPV infections and squamous cells carcinoma (SCC).

The Ck14, p53, p21 and Bcl-2 proteins were found modified in the leukoplakia, oral lichen planus and cancer. Cytological alterations and positive immunolabeling or over-expression of Ck14 cytokeratine in the upper epithelial stratus should be indicator of malignant transformations as doing subsequence exams.

Key words: Oral mucosa, exfoliative cytology, immunocytology; p53, Bcl-2, p21, Ck14, premalignant lesions.

INTRODUCTION

Oral cancer involves a several steps, each characterized by the sequential accumulation of additional genetic defects followed to clonal proliferation. The neoplastic process begins with normal epithelium progressing through hyperplasia to dysplasia to carcinoma *in situ* and finally in an invasive carcinoma (1).

Oral soft tissues express several systemic pathologies with skin compromise, such as oral lichen planus, leukoplakias, candidia-

a un epitelio hiperplásico, displásico, carcinoma *in situ* y finalmente en un carcinoma invasivo (1).

Los tejidos blandos de la boca manifiestan una variedad de patologías sistémicas con compromiso cutáneo, entre ellas se encuentran lesiones como líquenes orales planos, leucoplasias, candidiasis, queratosis, papilomas, úlceras traumáticas, infecciones por HPV, entre otros (2). Las leucoplasias y líquenes, con y sin infección con HPV, constituyen lesiones frecuentes de la mucosa bucal con características premalignas o precancerosas (3-5). Las leucoplasias pueden transformarse en carcinomas en un 1-10% y los líquenes en un 5%, dependiendo del sitio de ataque y del grado de displasia epitelial observado (6).

La transformación maligna en la cavidad oral depende en cierto modo del sitio anatómico que se ve afectado (labios, lengua, piso de la boca, paladar, gingiva, mucosa bucal y orofaringe), de los numerosos factores endógenos y exógenos que afectan el crecimiento de las células malignas en cada uno de estos sitios y de la relación con el suministro de nutrientes (7).

Varias investigaciones prueban que la expresión de proteínas como p53, Bcl-2, p21, p21^{waf}, Bax, citoqueratinas, que están involucradas en procesos como proliferación celular (8), diferenciación celular (9) y apoptosis (10) presentan modificaciones en relación a la carcinogénesis en el epitelio de la mucosa oral. La oncoproteína Bcl-2 está relacionada con la inhibición de la apoptosis (11). La proteína CK14 es reconocida como un marcador específico de la diferenciación celular en las capas del estrato basal de un epitelio normal estratificado (12). La proteína p53 inhibe la progresión del ciclo celular, regulando el crecimiento celular y promoviendo la apoptosis de células con ADN dañado (13). La familia de proteínas p21, codificada por los genes *ras*, está ligada a la transducción de señales. La expresión de estas oncoproteínas fue estudiada *in situ* en varios tejidos orales por medio de inmunocitoquímica (14-20).

Los cambios morfo-fisiológicos pueden ser detectados por medio de metodologías de monitoreo como citología exfoliativa y/o por inmunomarcación *in situ* con anticuerpos contra proteínas como las mencionadas anteriormente. Por otra parte, la utilidad de los extendidos citológicos de mucosa oral, que pueden ser obtenidos en forma no invasiva, para la caracterización del riesgo oncogénico en la cavidad oral, aún no se ha establecido fehacientemente, tal como se ha realizado en el caso del cáncer de útero en pacientes ginecológicos mediante la tinción de Papanicolau (PAP) (21).

Esta metodología es utilizada en programas preventivos de salud pública a fin de evaluar riesgo de cáncer genital en la población. En mucosa oral, la citología exfoliativa (CE) revela alteraciones morfo-fisiológicas (22) en las células epiteliales, tales como cambios en el tamaño nuclear y aspecto sucio del preparado, los cuales ayudan a un diagnóstico presuntivo (23). Sin embargo, esta metodología no invasiva y de bajo costo no es utilizada actualmente como monitoreo de lesiones en mucosa oral en los programas de salud pública en nuestro país.

El objetivo de este estudio fue inmunomarcarse las oncoproteínas CK14, p53, p21 y Bcl-2 a fin de evaluar la magnitud de su expresión en lesiones estomatológicas premalignas y malignas en el epitelio oral de pacientes, y comparar esta expresión con alteraciones en las citologías exfoliativas de los mismos

sis, keratosis, papilomas, traumatic ulcer, and HPV infections, among others (2). Leukoplakia and oral lichen planus, with and without HPV infections, are frequent lesions of buccal mucosa with premalignant and precancerous features (3-5). Leukoplakias can transform into carcinomas in 1-10% and lichens in 5%, depending on attack site or epithelial dysplasia grade observed (6).

The malignant transformation in oral cavity some way depends on affected anatomic site (lips, tongue, mouth floor, palate, gingiva, buccal mucosa and oropharynx), endogenous and exogenous factors that affect malignant cell grow up into each sites and the relationship with nutrients supply (7).

Various studies proved that the expression of proteins, like p53, Bcl-2, p21, p21^{waf}, Bax, cytoqueratins, etc., that affect processes such as cell proliferation (8), cell differentiation (9) and apoptosis (10) show changes in relation to carcinogenesis in the epithelial layers of the oral mucosa. The oncoprotein Bcl-2 was related to the inhibition of apoptosis (11). CK14 protein is recognised as a specific marker for cell differentiation in the basal stratum of normal stratified epithelia (12). The protein p53 inhibited the progression of the cell cycle, regulating cell growth and promoting apoptosis in cells with damage DNA (13). The family of p21 proteins encoded by *ras* genes is linked to the transduction of signals. The expression of these oncogenic proteins was studied *in situ* in various oral tissues by immunocytochemistry (14-20).

The morpho-physiological changes could be detected through screening methodology as exfoliative cytology and/or *in situ* immunolabeling with antibodies against proteins like mentioned before. In the other hand, useful of oral mucosa cytology smears, that can be obtained for non invasive way, for characterization of oncogenic risk in oral cavity, has not been reliably established like it has been performed in the case of uterus cancer in gynaecologic patients by PAP stained (21).

This methodology is used in preventive programs of public health in order to evaluate genital cancer risk on population. In oral mucosa, the exfoliative cytology (EC) reveals morpho-physiological alterations (22) in squamous cells like dirtiness of the smear and changes in the size of the nucleus, all of which may be used to aid as presumptive diagnostic (23). Nevertheless, this cheap, non invasive methodology is not used actually as a means of screening for lesions in the oral mucosa in public health programs in our country.

The aim of this study was immunolabeling oncoproteins Ck14, p53, p21 and Bcl-2 in order to evaluate their expression in premalignant and malignant stomatological lesions in oral epithelial, and to compare this expression with exfoliative cytology alterations in the same patients.

MATERIAL AND METHOD

Subjects: Forty-six subjects were studied, both sexes ranked 23 to 75 years. Controls of cytologies (n=23) and biopsy (n=10) were subjects diagnosed of healthy clinically oral mucosa. Patients were persons (n=13) with same ranked ages and sex as controls, from external office of the Faculty of Odontology, Cordoba National University. The study was performed according to legal norms of ethics laid down by the School of Dentistry, National

pacientes.

MATERIALES Y METODOS

-Sujetos: Fueron estudiados cuarenta y seis sujetos de ambos sexos con rango de edad de 23 a 75 años. Los controles de citología (n=23) y de biopsia (n=10) fueron sujetos con diagnóstico de mucosa oral clínicamente sana. Los pacientes fueron personas (n=13) del mismo rango de edad y de sexos que los controles, que concurren al consultorio externo de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba. El estudio se llevó a cabo según las normas legales vigentes de ética de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Se incluyó a todos los sujetos que presentaban lesiones en mucosa oral con características clínicas consistentes con carcinomas, leucoplasias o líquenes orales planos, con y sin infección con HPV y que fueron confirmados por diagnóstico histopatológico a microscopía óptica por los profesionales estomatólogos y anatomatólogos. La infección con Papiloma Virus Humano (HPV) fue corroborada por observación de las partículas virales a microscopía electrónica.

Los pacientes (n=13) fueron divididos en dos subgrupos de acuerdo al diagnóstico anatomopatológico confirmado: a) pacientes con lesiones premalignas (leucoplasias o líquenes orales planos con y sin infección con HPV) (n=10) y b) pacientes con lesiones malignas (carcinoma *in situ*) (n=3).

-Citología Exfoliativa: Se recolectaron células de la mucosa oral directamente de las lesiones y de la zona opuesta clínicamente sana, en el mismo paciente, por cepillado (cytobrush-Galucci) y fueron procesadas con tinción de Papanicolaou (PAP) (23). En los sujetos controles, las citologías fueron obtenidas por cepillado de mucosa oral no queratinizada perteneciente al carrillo, lengua y / o paladar. Después de la tinción con PAP (23) las citologías fueron observadas en un microscopio Olympus BX50 y analizadas con un software para análisis de imágenes, Image Pro Plus System.

-Biopsias: Todas las muestras fueron fijadas con una mezcla de glutaraldehído 1% y paraformaldehído 4% en sym-collidine buffer 0.1 M pH 7.2 por 4 h a temperatura ambiente. A posterior fueron incluidas en Unicryl (BioCell, U.K.) y polimerizadas con UV 360 nm a 4°C por 4-6 días. Se cortaron secciones semifinas (1µm) con un ultramicrotomo Reichert E y teñidas con azul de metileno para MO. Los cortes ultrafinos (0.7-0.8 µm) fueron colocados en grillas de níquel, 300 meshes, cubiertas con Formvar y contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo.

-Inmunocitoquímica: Los cortes ultrafinos fueron incubados toda la noche con IgM de ratón anti CK14 e IgG de ratón anti p53, p21 y Bc1-2 (Sigma-Aldrich, USA) con una dilución 1:100 PBS, en cámara húmeda a 4°C. El anticuerpo secundario IgM o IgG anti-ratón conjugado con partículas de oro coloidal de 5 ó 10 nm, con una dilución 1:50 en PBS (Sigma-Aldrich, USA) fue incubado por 2-3 hs a temperatura ambiente (23). Para MO se realizó un incremento con plata de acuerdo al protocolo de BioCell, U.K. Luego, los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina o con safranina 10%. Para MET los cortes ultrafinos fueron tratados del mismo modo sin incremento de plata. Los cortes fueron contrastados con acetato de uranilo 5%. La inmunomarcación

University Cordoba Argentina.

The study included all subjects that presented lesions in oral mucosa with clinical features consistent with squamous cell carcinoma; leukoplakia or oral lichen planus, with and without HPV confirmed light microscopy histopathological diagnostic by stomatologist and anatomopathologist. Human Papilloma Virus infection (HPV) was corroborated by the observations of viral particles at electron microscopy.

The patients (n=13) were divided into two subgroups according confirmed anatomopathological diagnostic: a) patients with premalignant lesions (leukoplakias or oral lichen planus with and without HPV infection) (n=10) and b) patients with malignant lesions (carcinoma *in situ*) (n=3).

-Exfoliative Cytology: Cells were collected with a cytobrush (Galucci) directly from lesions and from healthy tissue on the opposite side of the same patient's mouth and processed with Papanicolaou stained (PAP) (23). In the control subjects, the smears were obtained brushing non keratinized oral mucosa belongs to cheek, the tongue and/or palate. After staining with PAP (23) the smears were examined under an Olympus BX50 microscope and analyzed with software Image Pro plus System.

-Biopsies: All samples were fixed in a mixture of glutaraldehyde 1% and paraformaldehyde 4% in sym-collidine buffer 0.1 M pH 7.2 for 4 h at RT. Then included in Unicryl (BioCell, U.K.) polymerized at 360 nm UV light at 4°C for 4-6 days. Semithin sections (1 µm) were cut with a ReichertE ultramicrotome and stained with methylene blue for light microscopy. The ultrathin sections (0.7-0.8 µm) were collected on 300 meshes Formvar coated nickel grids and contrasted with lead citrate and uranyl acetate.

-Immunocytochemistry: Semithin sections were incubated overnight with mouse IgM CK14 and mouse IgG p53, p21 and Bc12 (Sigma-Aldrich, USA) in to 1:100 PBS, in a humid chamber at 4°C. The secondary mouse antibody, diluted 1:50 in PBS was IgM or IgG conjugated with 5 or 10 nm particles of colloidal gold (Sigma-Aldrich, USA) incubated for 2-3 h at RT (23). Silver enhancement was carried out according to the supplier's instructions (BioCell, U.K.) by light microscopy. Then, sections were stained with hematoxylin-eosin or in safranin 10%. For TEM the ultrathin sections were treated as the same way without silver enhancement. The sections were contrasted with 5% uranyl acetate. Immunolabeling was evaluated by quantity of gold-silver/mm² particles in sections at light microscopy like negative (0 particles/mm²) or positive (>20 particles/mm²).

-Statistical Analysis: immunolabeling was statistically evaluated with non parametric Mann-Whitney U test for independent samples at confidence level estimated by bootstrap of 0.05% (samples sizes minus 10) with software SPSS 10.1 version by Windows, 1999.

RESULTS

In the cytology controls, PAP stained, were observed epithelial cells of oral mucosa, basophilic and acidophilic, with picnotic nuclei and nucleus to cytoplasm ratio 1:10 with "clean" background.

Studied lesions were localized in different anatomical regions of

fue evaluada según la cantidad de partículas de oro-plata/ mm² en los cortes de microscopía óptica como negativa (0 partículas/ mm²) o positiva (>20 partículas/ mm²)

-Análisis Estadísticos: La inmunomarcación fue evaluada estadísticamente con el test no paramétrico Mann-Whitney U para muestras independientes con un nivel de confianza estimado por bootstrap de 0.05% (para muestras de tamaño menores a 10) con software SPSS 10.1 versión para Windows, 1999.

RESULTADOS

En los controles citológicos, teñidos con PAP, se observaron células epiteliales de mucosa oral, basófilas y acidófilas, con núcleo picnótico y relación núcleo-citoplasma 1:10 y con fondo "limpio".

Las lesiones estudiadas se localizaron en diferentes regiones anatómicas de la cavidad oral (lengua, carrillo interno, paladar duro y blando). Los líquenes orales planos mostraron, como característica particular, células naranjas al igual que las leucoplasias donde todas las células presentaron esta coloración (Fig. 1A). En los pacientes con carcinomas espinocelulares las CE teñidas con PAP mostraron aspecto "sucio", aumento del tamaño nuclear en relación al citoplasma 10:1. A MET las biopsias de estos pacientes presentaron vacuolización citoplasmática y desorganización tisular. A MO en las lesiones premalignas se observó displasia epitelial y membrana basal modificada.

Las biopsias de controles sanos observadas a MO mostraron las características histológicas normales del epitelio estratificado no queratinizado. La inmunomarcación en las muestras controles de p53, p21, Bcl-2 fue negativa mientras que la marcación con Ck14 fue positiva en el estrato basal epitelial.

La inmunomarcación con Ck14 resultó positiva en los estratos superficiales de la mucosa oral de las lesiones preneoplásicas y neoplásicas, y fue estadísticamente significativa con respecto a los controles ($p < 0.05$) (Figura 1B). Las proteínas p53 y Bcl-2 marcaron positivamente el 45% y 53%, respectivamente. Contrariamente, la proteína p21 no fue detectada en el 90% de las muestras (Tabla 1).

En pacientes que presentaron lesiones asociadas a HPV se observaron, tanto en citologías como en biopsias, coilocitos patognómicos de esta patología. Estos también fueron observados en citologías de áreas clínicamente sanas de pacientes afectados. Por otra parte, la MET de estos pacientes reveló un área perinuclear sin organelas (Fig. 1C) y sobre expresión de CK14.

DISCUSION

La citología exfoliativa de la mucosa oral mostró alteraciones morfológicas relevantes que coinciden con patrones de carcinogénesis mencionados en la literatura. La forma y el cambio en el tamaño del núcleo, como así también el aspecto sucio del preparado fueron indicadores de cambios relacionados con la carcinogénesis (2). Conjuntamente con estas características, en la tinción con PAP se observó además una coloración naranja, característica conspicua de hiperqueratinización (18).

En nuestro país, la citología exfoliativa de la mucosa oral, no se utiliza sistemáticamente como método de prevención o seguimiento de condiciones patológicas orales. Sin embargo

oral cavity (tongue, inside cheek, hard and soft palate). The oral lichen planus showed, as particularly characteristic, orange cells as same as leukoplakia where all cells presented this colouring (Figure 1A). In patients with squamous cell carcinoma EC stained with PAP showed "dirty" background, nuclear size increase in relation with cytoplasm 10:1. Biopsies of these patients presented cytoplasmatic vacuolization and tissue disorganization at TEM. In premalignant lesions was observed epithelial dysplasia and modified basal membrane at LM.

Healthy controls biopsies showed normal histological features of not keratinized stratified epithelial when they observed at LM. The p53, p21, Bcl-2 immunolabeling of control samples were negative meanwhile Ck14 marked was positive in basal epithelial strata.

Ck14 immunolabeling was positive in upper stratus of oral mucosa of preneoplastic and neoplastic lesions and was statistically significant respect to controls ($p < 0.05$) (Figure 1B). The p53 and Bcl-2 proteins marked positively 45% and 53%, respectively. In opposition, p21 protein was not detected in 90% of samples (Table 1).

It was observed, in mucosa and biopsy samples, pathognomonic koilocytes of this pathology in patients that presented lesions associated with HPV. And, they were observed also in smears of healthy clinical areas of affected patients. In other hand, TEM of these patients revealed a perinuclear zone without organelles (Figure 1C) and CK14 overexpression.

DISCUSSION

The EC of the oral mucosa showed relevant morphological alterations coinciding with patterns of carcinogenesis mentioned in the literature. Shape and nuclear size change and dirty background were pointed out as indicating changes linked to carcinogenesis (2). Altogether with these characteristics, in PAP stained was also observed an orange colour, typically feature of hiperkeratinization (18).

In our country, EC analysis was no used systematically as a method of prevention or to follow up oral pathological conditions. However, studies carried out by authors such as Silverman *et al.* (24) on a population in India identified accurately oral cancers in EC about 90% of all cases despite a suspicious meanwhile biopsies in the same patients were initially negatives and then confirm cancer diagnostic (24). Other studies not agree with these researches, up date still its worth as diagnostic is a controversial matter.

Oncogenic proteins like Ck14, p53, Bcl-2 and p21 were involved in controlling cell cycle, apoptosis and cell differentiation. They are active in carcinogenesis although an alteration to any of these proteins is not an indispensable condition for a carcinogenic process. We observed in precancerous and cancerous lesions (25) positive immunolabelling of Ck14 in upper epithelium stratus although other oncongenic proteins studied were not always positive marked in all lesions. The Bcl-2, p53 and p21 proteins involved at different steps of cell cycle control, DNA damage repair and apoptotic process (26), whereas Ck14 is involved in epithelial cell differentiation of oral mucosa (27, 28). Premalignant lesions studies could be not directly active in initial steps

Tabla 1. Citologías e inmunomarcación de mucosa oral de pacientes adultos con lesiones diagnosticadas estomatológica y anatomopatológicamente.

A: Lesiones Premalignas

N	Sexo	Rango de Edad (años)	Sitio de lesión	Diagnóstico	Características Citología exfoliativa	(%) de lesiones con Inmunomarcación positiva
4	F-M	43 a 77	Lengua	Líquen Oral plano	Tinción naranja, Algunas cél. binucleadas	P53 (0), Bcl-2 (25), p21 (25), CK14 (100) (*)
2	M	35 -43	Lengua y Paladar	Leucoplasia	Células escamosas, Tinción naranja	P53 (100), Bcl-2 (100), p21 (50), CK14 (100) (*)
4	F-M	39-76	Yugal y Lengua	HPV y Líquen Oral plano	Microorganismos Cristales Coilocitos, Tinción naranja Células escamosas, Escasas células inflamatorias. Abundantes polimorfos nucleares	P53 (25), Bcl-2 (25), p21 (0), CK14 (25) (*)

B: Lesiones Malignas

3	F-M	51-68	Lengua y Paladar	Carcinoma <i>in situ</i>	Tinción naranja, Fondo sucio, aumento Volumen nuclear	P53 (33), Bcl-2 (33), p21(0), CK14 (100) (*)
---	-----	-------	------------------	--------------------------	---	--

C: Controles

10	F-M	23-77	Lengua, Yugal y Paladar	Normal	Células azules y rojas. Fondo limpio Núcleos picnóticos	P53 (0), Bcl-2 (0), p21(0), CK14 (100 en estrato basal) (*)
----	-----	-------	-------------------------	--------	--	---

(*) Diferencias estadísticamente significativas con p<0.05

Table 1. Cytologies and immunolabeling of oral mucosa of adults patients with stomatological and anatomopathological diagnostic lesions.

A: Premalignant lesions

<i>N</i>	<i>Sex</i>	<i>Age rank (ages)</i>	<i>Lesion site</i>	<i>Diagnostic</i>	<i>Features Exfoliative Cytology</i>	<i>(%) of lesions with positive immunolabeling</i>
4	F-M	43 - 77	Tongue	Oral lichen planus	Orange stained Some binucleated cells	P53 (0), Bcl-2 (25), p21 (25), CK14 (100) (*)
2	M	35 -43	Tongue and Palate	Leukoplakia	Squamous cells, Orange stained	P53 (100), Bcl-2 (100), p21 (50), CK14 (100) (*)
4	F-M	39-76	Yugal and Tongue	HPV and Oral Lichen planus	Microorganisms Crystals koilocytosis, Orange stained Squamous cells, Scarce inflammatory cells. A lot of neutrophils	P53 (25), Bcl-2 (25), p21 (0), CK14 (25) (*)

B: Malignant Lesions

3	F-M	51-68	Tongue and Palate	Carcinoma in situ	Orange stained, Dirty background, Enlarge nuclear volume	P53 (33), Bcl-2 (33), p21(0), CK14 (100) (*)
---	-----	-------	-------------------	-------------------	--	--

C: Controls

10	F-M	23-77	Tongue, Yugal and Palate	Normal	Blue and red cells. Clean background Picnotic nucleus	P53 (0), Bcl-2 (0), p21(0), CK14 (100 in basal stratus) (*)
----	-----	-------	--------------------------	--------	---	---

(*) Significant statistical differences $p < 0.05$

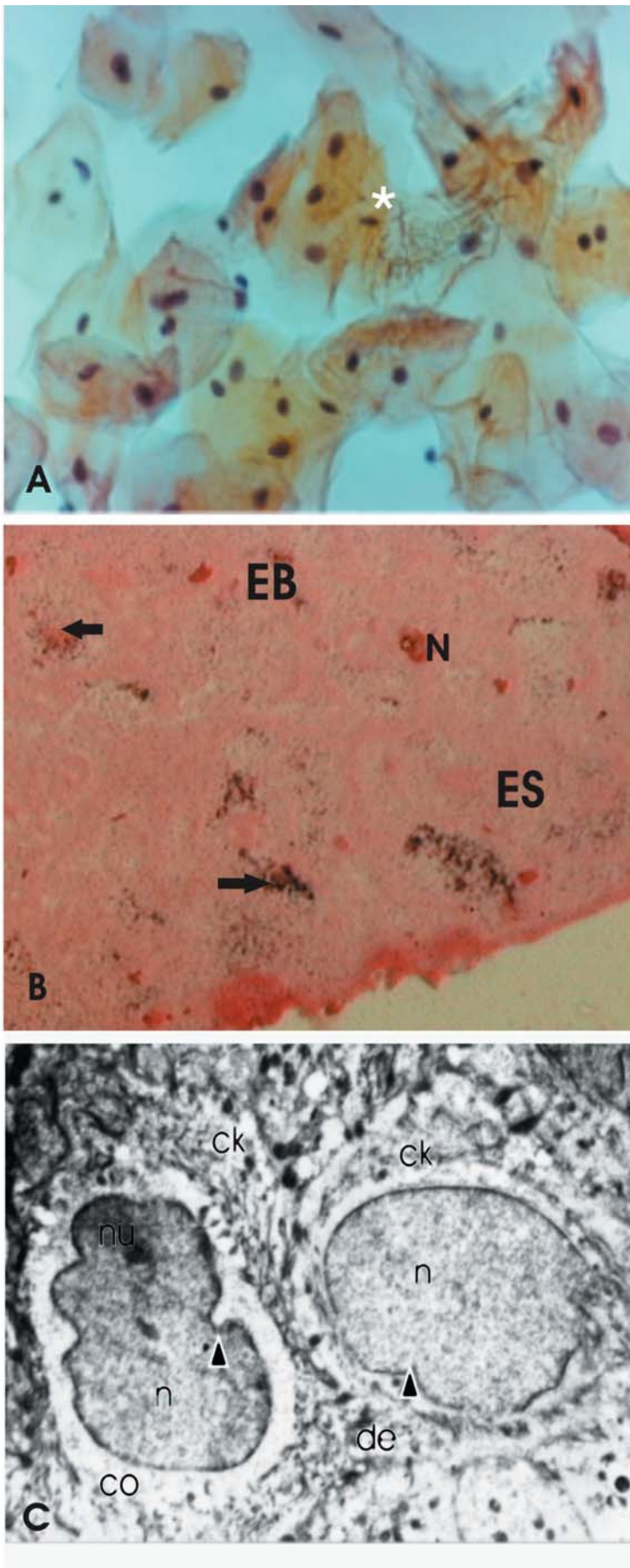


Fig. 1. A) Leucoplasia: citología exfoliativa, (*) zona con queratinización. Tinción PAP, 320X
 B) Líquen oral plano: Microscopía Óptica, inmunomarcación oro-plata positiva de citoqueratina K14 (flecha), ES: estrato superficial; EB estrato basal; N: núcleo. Safranina 10%, 200X.
 C) Líquen oral plano infectado con HPV: Microscopía electrónica de transmisión 11.000X.

co: coilocito; ck: citoesqueleto; n: núcleo; nu: nucleolo; de: desmosomas; ▲: membrana nuclear de forma irregular.

A) Leukoplakia: exfoliative cytology (*) Keratinized area. PAP stained, 320X

B) Oral Lichen Planus: Light Microscopy, immunomarked positive gold-silver of cytokeratine K14 (arrow), ES: upper stratus; EB basal stratus; N: nuclei. Safranin 10%, 200X.

C) Oral Lichen Planus infected with HPV: Transmission Electron Microscopy 11.000X. co: koilocyto; ck: cytoskeleton; n: nuclei; nu: nucleolus; de: desmosomes; ▲: irregular membrane nuclear.

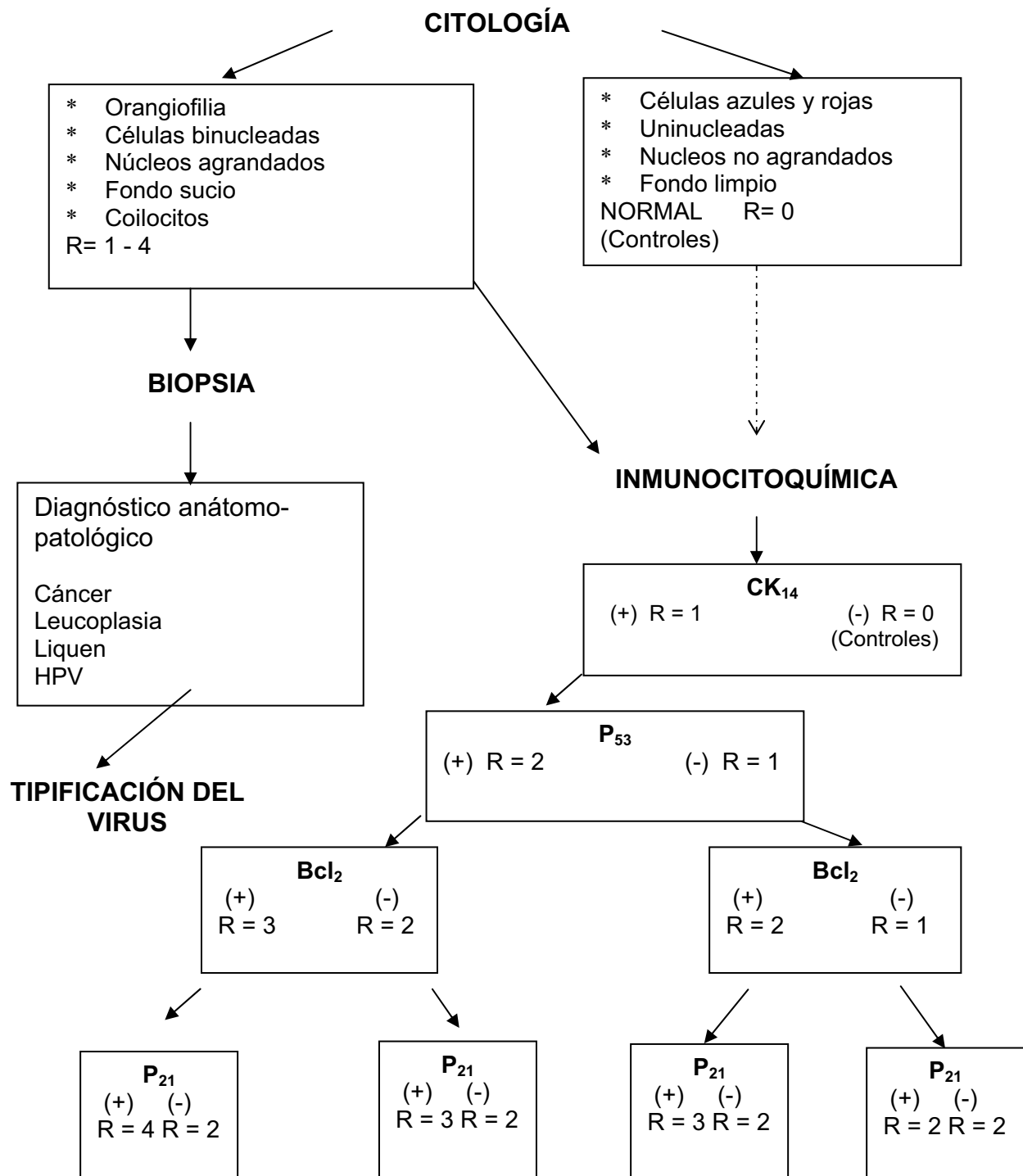


Fig. 2. Algoritmo de riesgo carcinogénico; R, riesgo, escala de 1 a 4 según el número de biomarcadores positivos y características de las citologías exfoliativas.

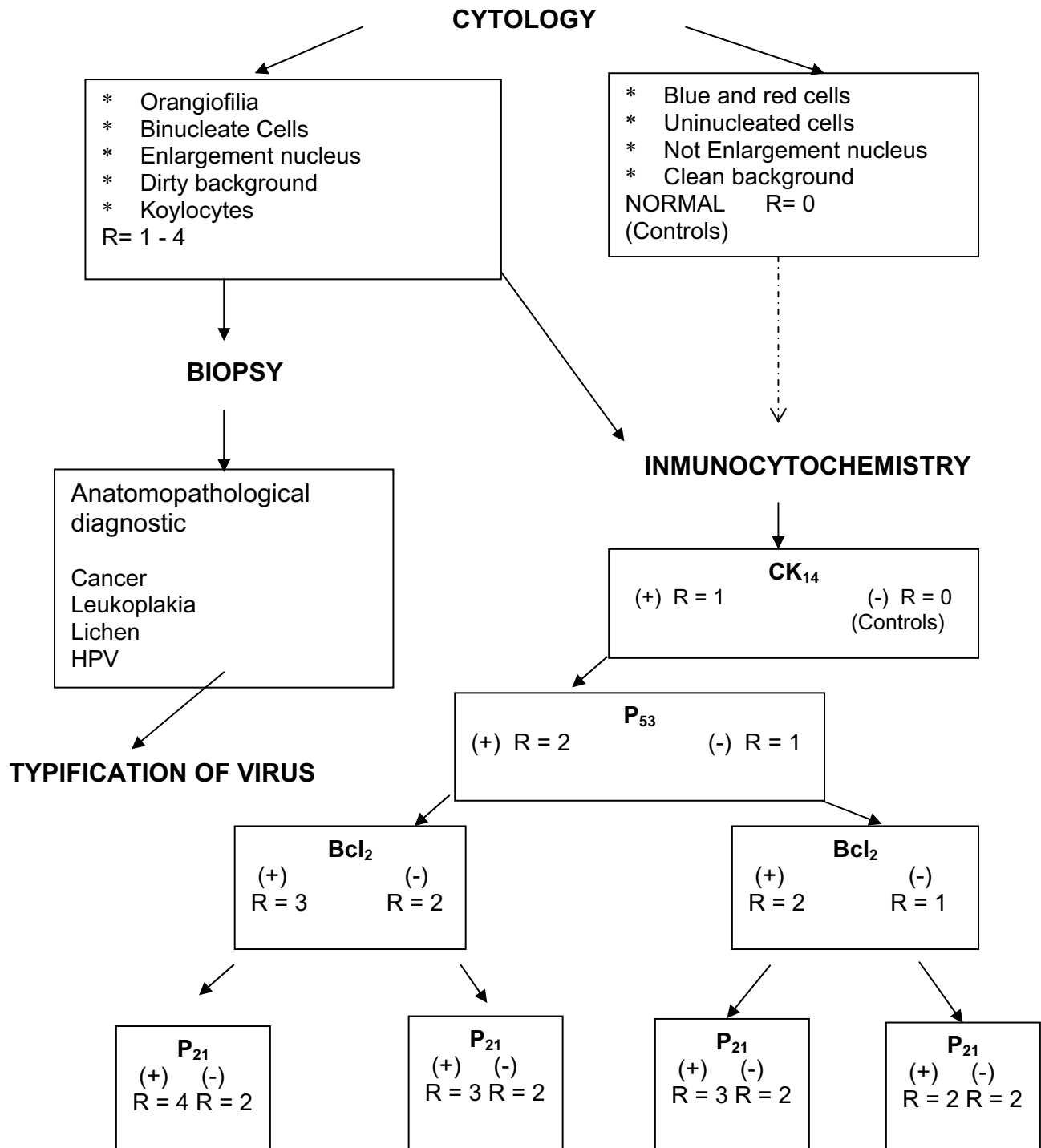


Fig. 2. Carcinogenic risk algorithm; R, riesgo, rank of 1 to 4 according number of positive biomarkers and exfoliative cytology features.

estudios llevados a cabo por autores como Silverman *et al* (24) en poblaciones de la India, identificaron precisamente cánceres orales en las CE en el 90% de los casos fue evidenciada cuando éstas resultaron sospechosas, mientras que las biopsias en los mismos pacientes resultaron negativas en un comienzo y luego confirmaron diagnóstico de cáncer (24). Otros estudios no concuerdan con estas investigaciones, siendo aún hoy controversial el valor diagnóstico de la misma.

Las proteínas oncogénicas Ck14, p53, Bcl-2 y p21 están involucradas en el control de procesos tales como el ciclo celular, la apoptosis y la diferenciación celular. Están activas en la carcinogénesis aunque la alteración de cualquiera de estas proteínas por sí sola, no es una condición indispensable para que dicho proceso ocurra. En lesiones precancerosas y cancerosas (25) nosotros observamos inmunomarcación positiva para CK14 en el estrato epitelial superficial, aunque las demás proteínas oncogénicas estudiadas no siempre inmunomarcaron positivamente todas las lesiones. Las proteínas Bcl-2, p53 y p21 intervienen en diferentes etapas del control del ciclo celular, en la reparación de daños en el ADN y en los procesos apoptóticos (26), mientras que CK14 está involucrada en la diferenciación de las células epiteliales de la mucosa oral (27, 28). Las lesiones premalignas estudiadas podrían no estar activas directamente en los estadios iniciales de la carcinogénesis en la mucosa oral.

Marcadores tumorales como los estudiados, no son utilizados para diagnóstico de cáncer, aunque contribuirían a monitorear poblaciones sin síntomas de esta enfermedad o realizar el seguimiento de pacientes con historia previa de cáncer. Sin embargo, un resultado positivo para una o más de estas proteínas representa una sospecha de carcinogénesis y fundamenta la recomendación de exámenes de seguimiento.

Nuestras investigaciones sugieren que características tales como, núcleos agrandados, coloración naranja y aspecto sucio podrían estar relacionados con las modificaciones en la expresión de las oncoproteínas CK14, p53, p21 y Bcl-2, en las biopsias de los mismos pacientes. Los cambios morfológicos e inmunocitoquímicos observados en las CE y biopsias indicarían riesgo de transformación celular maligna (29-32), permitiendo generar un algoritmo de riesgo (Figura 2)

En pacientes con diagnóstico clínico de HPV se observaron coilocitos en las CE. Estos son característicos de lesiones de la mucosa vaginal en pacientes con esta infección (26) y permitiendo la confirmación de la presencia de HPV por MET (26), previamente a la identificación molecular. El área citoplasmática que rodea a los coilocitos mostró inmunomarcación positiva con citoqueratina CK14. Este hecho concuerda con el aumento de filamentos intermedios observado por Okagaki *et al.* (29) en carcinomas genitales.

La CE-PAP en mucosa oral debería ser considerada como un método de diagnóstico presuntivo especialmente en sujetos expuestos a factores de riesgo. Si las CE resultaran anormales se hace necesario realizar un estudio de inmunomarcación de las proteínas CK14, p53, y Bcl-2. No todas las inmunomarcaciones utilizadas resultaron positivas en pacientes con lesiones con el mismo diagnóstico histopatológico. Sin embargo la inmunomarcación positiva o la sobreexpresión de la citoqueratina CK14 en los estratos epiteliales superficiales deberían ser suficientes

of oral mucosa carcinogenesis.

Tumoral markers like ones studies are not used for cancer diagnostic, although they contribute to do population screening without symptoms of this disease or to perform follow up of patients with previous history of cancer. However, a positive output for one or more of these proteins represents a carcinogenesis suspicious and fundament follow up exams.

Our researches suggest that features such as enlargement nucleus, orange colouring and dirty background could be relation with modifications in the expression of Ck14, p53, p21 and Bcl-2 oncoproteins in biopsies the same patients. Morphological and immunocytochemistry changes observed in CE and biopsies would indicate risk of malignant cell transformation (29-32), and allow generate a risk algorithm (Figure 2).

In EC was observed koilocytes in patients with HPV clinical diagnostic. These are typically in lesions of vaginal mucosa of patients with the same infection (26) and they allow confirmation of HPV at TEM (26), previously molecular identification. Cytoplasmatic area around koilocytes showed Ck14 positive immunolabeling. This fact agrees with increase of intermediate filaments observed by Okagaki *et al* (29) in genital carcinomas.

The EC-PAP in oral mucosa could be considering like a presumption diagnostic method, especially in subject exposed a risk factors. It is necessary to do immunolabeling study for Ck14, p53, p21, and Bcl-2 proteins if the EC are no normal. Not all immunomarked were positive in patients with lesions with the same histopathological diagnostic. But for, the positive immunomarked or overexpression of Ck14 cytoqueratine in upper epithelial stratus should be enough indicator of malignity as to realize subsequent exams (27, 31).

indicadores de malignidad como para realizar exámenes posteriores. (27, 31).

BIBLIOGRAFIA/REFERENCES

1. Nagpala JK, Dasa BR. Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its directive management. Review. *Oral Oncology* 2003;39:213-21.
2. Lanfranchi HE, Klein-Szato AJP. Patología de la Mucosa Oral. En: Cabrini R, eds. Anatomía Patológica Bucal. Buenos Aires: Mundi Editores; 1988. p. 301-50.
3. Rodstrom PO, Jontell M, Mattsson U, Holmberg E. Cancer and oral lichen planus in a Swedish population. *Oral Oncol* 2004;40:131-8.
4. Nagao T, Ikeda N, Fukano H, Miyazake H, Yano M, Warnakulasuriya S. Outcome following a population screening programme for oral cancer and precancer in Japan. *Oral Oncology* 2000;36:340-6.
5. Ceccotti EJ, eds. Clínica Estomatológica. SIDA. Cáncer y otras afecciones Buenos Aires: Panamericana Editores; 1993. p. 1-500.
6. Sawaf MH, Ouhayoun JP, Forest N. Cytokeratin profiles in oral epithelia: review and a new classification. *J Biol Buccales* 1991;19:187-98.
7. Cantoa MT, Devesa SS. Oral cavity and pharynx cancer incidence rates in the United States, 1975-1998. *Oral Oncology* 2002;38:610-7.
8. Todd R, Hinds PW, Munger K, Rustgi AK, Opitz OG, Suliman Y, et al. Cell cycle deregulations in oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13:51-61.
9. Fuchs E. Genetic Skin Disorders of Keratin. En: Scriver C R, Beaudet AL, Sly MS, Valle D. eds. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. New York: McGraw Hill Inc. Health Professions Division Editores; 1995. p. 4421-37.
10. Kurupkat C, Venkatesan TK, Caldarelli DD, Panje WR, Hutchinson J, Preisler HD, et al. Abnormalities of molecular regulators of proliferation and apoptosis in carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Auris Nasus Larynx* 2002;29:165-74.
11. Kanauchi H, Wada N, Clark OH, Duh QY. Apoptosis regulating genes, bcl-2 and bax, and human telomerase reverse transcriptase messenger RNA expression in adrenal tumors: possible diagnostic and prognostic importance. *Surgery* 2002;132:1021-6.
12. Depondt J, Shabana H, Sawaf H, Gehanno P, Forest N. Cytokeratin alterations as diagnostic and prognostic markers of oral and pharyngeal carcinomas. *Eur J Oral Sci* 1999;107:442-54.
13. Gottlieb TM, Oren M. p53 in growth control and neoplasia. Review. *Biochem Biophys Acta* 1996;1287:77-102.
14. Bos JL. ras Oncogenes in Human Cancer: a review. *Cancer Research* 1989; 49:4682-9.
15. Schwartz JL, Gu X, Kittles RA, Baptiste A, Shklar G. Experimental oral carcinoma of the tongue and buccal mucosa: possible biologic markers linked to cancers at two anatomic sites. *Oral Oncol* 2000;36:474-83.
16. Liao PH, Chang YC, Huang MF, Tai KW, Chou MY. Mutation of p53 codeine 63 in saliva as a molecular marker for oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2000; 36:272-6.
17. Sulkowska M, Famulski W, Chyczewski L, Sulkowski S. Evaluation of p53 and bcl-2 oncoprotein expression in precancerous lesion of the oral cavity. *Neoplasm* 2001;48:94-8.
18. Reddy CRR, Kameswari VR, Prahad D, Ramulu C, Reddy P. Correlative study of exfoliative cytology and histopathology of oral carcinoma. *J Oral Maxillofac Sug* 1975;33:435-8.
19. Yanamoto S, Kawasaki G, Yoshitomi I, Mizuno A. p53, mdm2, and p21 expression in oral squamous cell carcinomas: relationship with clinicopathologic factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94: 593-600.
20. Odgen GR, Cowpe JG, Wight AJ. Oral exfoliative cytology: review of methods of assessment. *J Oral Pathol Med* 1997;26:201-5.
21. Cotran R, Kumar V, Collins T, eds. Patología estructural y funcional. España: Mc Graw Hill Interamericana Editores; 2000. p. 1-1600.
22. Mollaoglu N, Cowpe JG, Walker R. Quantitative cytomorphologic analyses of Papanicolaou-stained smears from oral lichen planus. *Anal Quant Cytol Histol* 2001;23:118-22.
23. Bancroft JD, Stevens A, Turner DR, eds. Theory and Practice of Histological Techniques. New York: Churchill Livingstone Editores; 1990. p. 1-41.
24. Silverman S J, Bilimoria KF, Bhargava K, Mani NJ, Shah R. Cytological, histological and clinical correlation of precancerous oral lesions in 57,518 industrial workers of Gujarat, India. *Acta Cytologica* 1977;21:196-8.
25. Saiz-Rodriguez A. Molecular basis of oral cancer. *Med Oral* 2001;6: 342-9.
26. Miller CS, White DK. Human papiloma virus expression in oral mucosa, premalignant conditions and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996; 82:57-68.
27. Cooper MP, Braakhuis BJM, de Vries N, van Dongen GAM, Nauta JJP, Sonw GB. A panel of Biomarkers of Carcinogenesis of the Upper Aerodigestive Tract as Potential Intermediate Endpoints in Chemoprevention Trials. *Cancer* 1993;71:825-30.
28. Scully C, Burkhardt A. Tissue markers of potentially malignant human oral epithelial lesions. *J Oral Pathol Med* 1993;22:246-56.
29. Okagaki T, Clark BA, Brooker DC, Williams PP. Koilocytosis in dysplastic and reactive cervical squamous epithelium. An ultrastructural study. *Acta Cytol* 1978;22:95-8.
30. Nagler RM, Kerner H, Laufer D, Ben-Eliezer S, Minkov I, Ben-Itzhak O. Squamous cell carcinoma of the tongue: the prevalence and prognostic roles of p53, Bcl-2, c-erbB-2 and apoptotic rate as related to clinical and pathological characteristics in a retrospective study. *Cancer Letter* 2002;186:137-50.
31. Saudubray JM, Charpentier C. Clinical Phenotypes: Diagnosis/Algorithms. En: Scriver CR, Beaudet A, Sly WS, Valle, D. eds. The Metabolic and Molecular Base of Inherited Disease 1. New York: Mc Graw Hill Inc. Health Professions Division Editores; 1995. p. 347-400.
32. Kuo MY, Chang HH, Hahn LJ, Wang JT, Chiang CP. Elevated ras p21 expression in oral premalignant lesions and squamous cell carcinoma in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 1995;24:255-60.

Agradecimientos: Queremos expresar nuestro agradecimiento a los profesores y pacientes de la Facultad de Odontología. Agradecemos a la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Córdoba (Subsidio N° 05/J044) y al proyecto FOMEC que financiaron nuestra investigación. Además deseamos agradecer a la Dra. María Isabel Rodríguez-García, de la Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, España fM.I. Rodríguez García, a la Profesora Dra. Raquel Dodelson de Kremer por facilitarnos su laboratorio y a la Odontóloga Marina Rocamundi por su colaboración en la recolección de muestras.

Acknowledgements: We express our gratitude to the teachers and patients at the School of Dentistry. We acknowledge the Secretary of Science and Technology of the Universidad Nacional de Córdoba (Grant N° 05/J044) and the FOMEC program for the grants to our work. We are thankful to Dr. María Isabel Rodríguez-García, of the Station Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, Spain, Granada Spain and Professor Dr. Raquel Dodelson de Kremer for the use of their laboratory facilities and to Marina Rocamundi for her helps on buccal pathology;