



**Universidad
Andrés Bello®**

UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO

Facultad de Odontología

**RECuento DE EOSINÓFILOS EN MUCOSA ORAL, DISPLASIA
EPITELIAL Y CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS,
CON TINCIÓN CORRIENTE Y GIEMSA.**

Tesis de pregrado para optar al título de Cirujano Dentista.

Autores: Francina América Gálvez Carreño, Natalia Javiera Apablaza Niño,

Profesor tutor: Natalia Santibáñez.

Santiago de Chile, 2017.

*Dedicado a todos los pacientes que sufren de cáncer,
cualquiera sea su tipo, un granito de arena
para contribuir al estudio de esta enfermedad.
A mi padre y mi familia, que han sido la estrella que me guía.*

América Gálvez Carreño

*A mi madre, padre
y familia que perseveraron conmigo.*

Natalia Apablaza Niño

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a la Dra. Natalia Santibáñez, por su entrega y dedicación.

Al equipo de Patología encabezado por la Dra. Alejandra Fernández, por el amor a la investigación en las líneas del cáncer.

Al servicio de histopatología de la Universidad Andrés Bello, Viña del Mar.

A Enrique Ropert por su ayuda y tiempo invertido.

A María Niño por su apoyo incondicional

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
MARCO TEÓRICO.....	8
I. Histología oral normal.....	8
II. Cambios morfológicos asociados a la transformación maligna: Displasia epitelial oral	9
III. Carcinoma oral de células escamosas.....	13
IV. Estroma tumoral	15
V. Eosinófilos y su papel en el cáncer	16
VI. Eosinofilia Tisular Asociada a Tumores	18
OBJETIVO.....	20
MATERIAL Y MÉTODO	21
RESULTADOS	26
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIÓN	39
BIBLIOGRAFÍA	40
ANEXOS	45

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Características histológicas y funcionales de la mucosa oral	8
Tabla II. Cambios Citológicos y Arquitectónicos asociados a Displasia Epitelial Oral	10
Tabla III. Criterios de la clasificación de displasia epitelial oral	12
Tabla IV. Clasificación de Broders	14
Tabla V. Función de las Proteínas presentes en gránulos de Eosinófilos	17
Tabla VI. Diagnósticos incluidos en el estudio	26

INDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1 DEO leve	11
Ilustración 2 DEO moderada	11
Ilustración 3 DEO severa	12
Ilustración 4 Densidad celular promedio en MON con HE	30
Ilustración 5 Densidad celular promedio en DEO con HE	30
Ilustración 6 Densidad celular promedio en COCE con HE	30
Ilustración 7 Densidad celular promedio en MON con Giemsa	32
Ilustración 8 Densidad celular promedio en DEO con Giemsa	32
Ilustración 9 Densidad celular promedio en COCE con Giemsa	32

INDICE DE GRAFICOS

Grafico 1. Distribución por sexo de la muestra	27
Grafico 2. Distribución del sexo según diagnóstico	27
Grafico 3. Distribución de la muestra por localización	28
Grafico 4. Distribución de la localización según diagnóstico	28

INDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Análisis de eosinófilos con HE según diagnóstico	29
Diagrama 2. Análisis de eosinófilos con Giemsa según diagnóstico	31

RESUMEN

Objetivo: Comparar la densidad celular promedio de eosinófilos en el estroma de muestras de Mucosa oral normal (MON), Displasia epitelial oral (DEO) y Carcinoma oral de células escamosas (COCE) con tinción de Hematoxilina-eosina (HE) y Giemsa.

Material y métodos: Estudio descriptivo, serie de casos. Se analizaron 16 muestras de MON, 13 de DEO y 15 de COCE teñidas con HE y Giemsa. Para determinar la densidad celular promedio de eosinófilos, se identificaron 3 campos continuos adyacentes al área de MON, DEO y COCE con un microscopio óptico (Olympus® CX-31) con aumento mayor (40x), considerando como eosinófilos las células nucleadas con gránulos citoplasmáticos intensamente rojos sin incluir glóbulos rojos superpuestos con células mono y polimorfonucleares. Se sacó un promedio entre ellos. Las variables fueron analizadas mediante el test Kruskal-Wallis, test post hoc de Conover-Iman y se realizó un análisis estadístico a través del programa STATA 12®.

Resultados: Existe una asociación estadísticamente significativa entre el diagnóstico (MON, DEO y COCE) y la densidad celular promedio de eosinófilos ($p < 0.001$) en ambas tinciones. Adicionalmente existe una correlación moderada entre ambas técnicas histoquímicas con un coeficiente rho de 0,612 ($p < 0,001$).

Conclusión: Los eosinófilos están presentes en las muestras de MON, DEO y COCE de forma creciente a medida que el diagnóstico va aumentando su grado de malignidad. Por otra parte, al comparar la técnica de tinción HE y Giemsa, se observó que, con la segunda, el número de eosinófilos duplicó el promedio celular observado con la tinción corriente de HE. Por lo tanto, la técnica de tinción Giemsa es más efectiva para la observación de eosinófilos.

INTRODUCCIÓN

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es uno de los cánceres más prevalentes del mundo, ocupando el 6to lugar a nivel mundial, 9 de cada 10 neoplasias orales, corresponde a COCE y su incidencia ha aumentado un 50% en los últimos años, mostrando una tendencia significativa por el sexo masculino en América y replicándose en Chile; su patogénesis es multifactorial; y su tasa de supervivencia es de un 50% a los 5 años.

El comportamiento de un tumor se ve influenciado por el estroma que lo rodea, con el cual presenta interacciones complejas. Un grupo celular importante presente en el estroma tumoral pertenece al sistema inmune innato, los eosinófilos. Los eosinófilos son granulocitos derivados de la médula ósea, que han adquirido importancia en la carcinogénesis. Los gránulos presentes en el citoplasma de eosinófilos son teñidos con la técnica histoquímica corriente de hematoxilina-eosina (HE), sin embargo, Giemsa permitirá observar mejor sus propiedades citoplasmáticas. Por tal motivo, nos preguntamos si el recuento de eosinófilos en muestras de Mucosa Oral Normal (MON), Displasia Epitelial Oral (DEO) y COCE con la técnica de HE y con la tinción de Giemsa son iguales.

MARCO TEÓRICO

I. Histología oral normal

La mucosa oral normal (MON) es una importante barrera protectora en la cavidad bucal. Está constituida por un epitelio de revestimiento plano pluriestratificado, que cumple la función de proteger los tejidos subyacentes; y un tejido conjuntivo subepitelial compuesto por células como fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, linfocitos, eosinófilos, entre otras; además de una matriz extracelular, en donde se alojan fibras colágenas, elásticas y algunas reticulares. Dentro de las funciones del tejido conjuntivo se incluyen la irrigación e inervación de la mucosa oral, sostén mecánico y barrera bioquímica. ^(1,2)

La mucosa oral de acuerdo con sus características histológicas y funcionales se puede dividir en 3 tipos, como se observa en la tabla I. ⁽³⁾

Tabla I. Características histológicas y funcionales de la mucosa oral. ⁽³⁾

	Localización	Epitelio	Corion	Función
Mucosa Masticatoria	Encía marginal	Paraqueratinizado	Semilaxo o denso con papilas	Soporta fuerzas masticatorias
	Paladar duro	Queratinizado	Denso (rafe medio) o laxo con papilas	
Mucosa de Revestimiento	Mucosa de piso de boca	No queratinizado	Laxo y elástico	No resiste fuerzas masticatorias
	Mucosa de labios y			

	mejillas			
	Cara ventral de la lengua		Laxo	
	Paladar blando			
Mucosa especializada y de revestimiento	Dorso de la lengua	Paraqueratinizado	Corion y submucosa fusionados adheridos firmemente al musculo	Gustativa (dorsal) y defensiva (raíz)
	Papilas			
	Raíz (amígdala lingual)	No queratinizado		

II. Cambios morfológicos asociados a la transformación maligna: Displasia epitelial oral

La displasia epitelial oral (DEO) se refiere al conjunto de alteraciones celulares y tisulares confinadas al epitelio. ^(4,5) Clínicamente se puede observar como una leucoplasia o eritroplasia, ambos, desórdenes potencialmente malignos (DPM), los que podrían transformarse en cáncer. ⁽⁶⁾

La etiología de los DPM no es del todo conocida, sin embargo, factores de riesgo como el consumo de tabaco y alcohol juegan un rol importante en su desarrollo. ⁽⁷⁾ Los criterios utilizados para el diagnóstico de DEO son enumerados en la tabla II. ⁽⁵⁾

Tabla II. Cambios Citológicos y Arquitectónicos asociados a Displasia Epitelial Oral.
(OMS 2017) ⁽⁵⁾

Cambios citológicos	Cambios arquitectónicos
Variación anormal en el tamaño nuclear (anisocariosis)	Estratificación epitelial irregular
Variación anormal en la forma nuclear (pleomorfismo nuclear)	Pérdida de polaridad de células basales
Variación anormal en el tamaño celular (anisocitosis)	Perdida de la cohesión epitelial
Variación anormal en forma de la célula (pleomorfismo celular)	Crestas epiteliales en forma de gota invertida
Aumento relación núcleo-citoplasma	Mayor número de figuras mitóticas
Hiperchromatismo	Figuras mitóticas anormales superficiales
Figuras mitóticas atípicas	Queratinización precoz en las células individuales (disqueratosis)
Aumento número y tamaño de nucléolos	Perlas de queratina dentro de los rete pegs

Según la clasificación más reciente de tumores de cabeza y cuello realizada por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017),⁽⁵⁾ la DEO puede clasificarse como leve, moderada, severa y carcinoma in situ (CIS), de acuerdo con los estratos epiteliales afectados.⁽⁵⁾ (tabla III e ilustraciones 1, 2, 3)

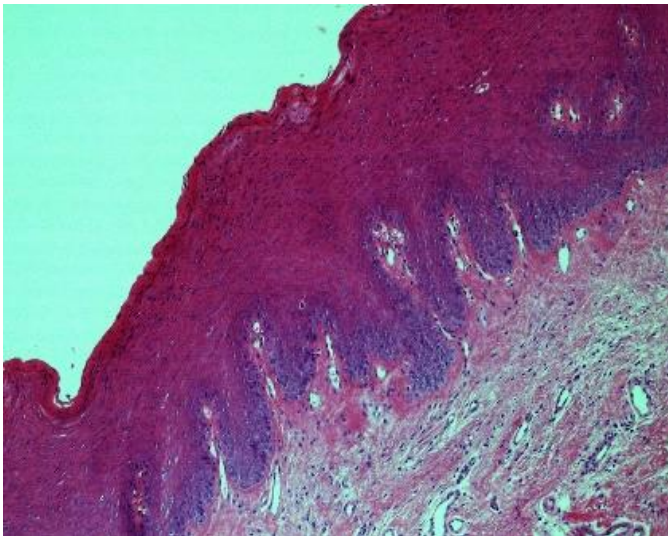


Ilustración 1 DEO leve. Hematoxilina- Eosina. Aumento 10x. Se observa hiperplasia epitelial basal con células de citoplasma basófilo, hiperqueratosis. (Laboratorio histopatología Universidad Andrés Bello).

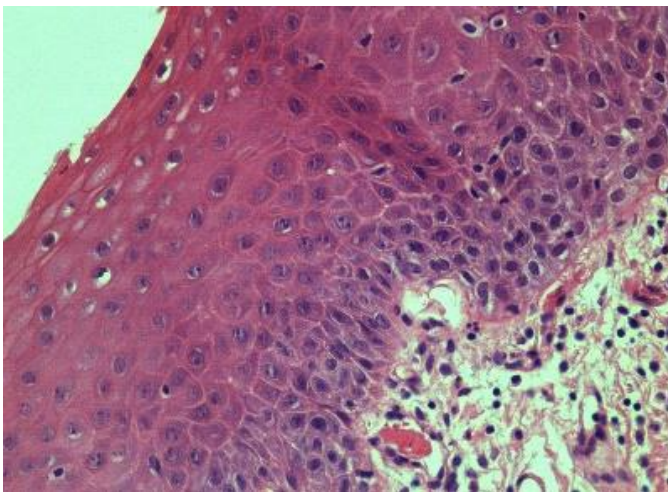


Ilustración 2 DEO moderada. Hematoxilina-Eosina. Aumento 40x. Se observa hiperplasia epitelial, papilas en forma de gotas, núcleos hiper Cromáticos, involucra 2/3 inferiores. (Laboratorio histopatología Universidad Andrés Bello).

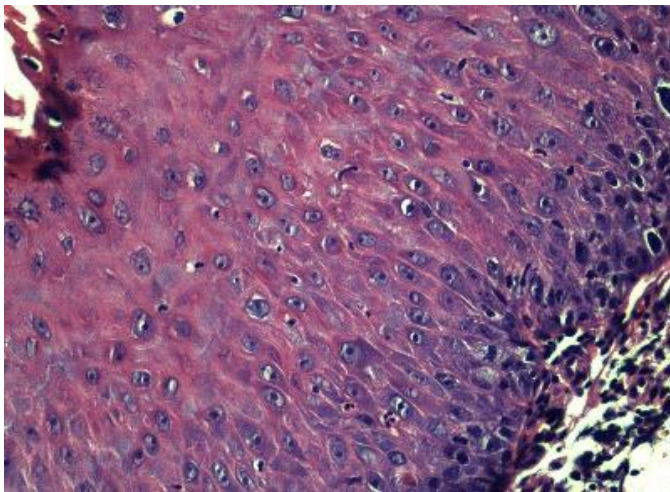


Ilustración 3 DEO severa. Hematoxilina- Eosina. Aumento 40x. Epitelio afectado en más de 2/3 de su grosor, pleomorfismo celular, hiper cromatismo nuclear, pérdida de estratificación normal. (Laboratorio histopatología Universidad Andrés Bello).

Tabla III. Criterios de la clasificación de displasia epitelial oral. ⁽⁵⁾

DISPLASIA LEVE	<ul style="list-style-type: none"> • Perturbación arquitectónica limitada al tercio inferior del epitelio acompañado de atipias citológicas mínimas.
DISPLASIA MODERADA	<ul style="list-style-type: none"> • Disturbios arquitectónicos que se extienden al tercio medio del epitelio.
DISPLASIA SEVERA	<ul style="list-style-type: none"> • Más de dos tercios del epitelio mostrando disturbios arquitectónicos y citológicos.
CARCINOMA IN SITU	<ul style="list-style-type: none"> • Ha ocurrido la transformación maligna pero la invasión no está presente. Anomalías arquitectónicas en el espesor total o casi total, capas celulares viables acompañadas de atipia citológica pronunciada. Figuras mitóticas atípicas y superficies anómalas, mitosis se ven comúnmente

A pesar de ser la clasificación más actualizada en cuanto a la graduación histopatológica, suele considerarse subjetiva, pudiendo haber diferencias inter e intraobservador. ⁽⁵⁾ Es debido a esto, que autores como Kujan et al. propone el Sistema Binario con el fin de estandarizar los criterios y hacerlos reproducibles dividiendo las displasias epiteliales en: ^(8, 9,10)

- Lesiones de alto riesgo (Con susceptibilidad de transformación maligna): Presencia de al menos cuatro cambios arquitectónicos y cinco cambios citológicos e acuerdo a los criterios propuestos por la OMS 2017.
- Lesiones de bajo riesgo (No tienen la potencial susceptibilidad para la transformación maligna): Presencia de menos de cuatro cambios arquitectónicos o menos de cinco cambios citológicos (criterios OMS 2017).

El sistema de clasificación binaria al complementarse con la clasificación de la OMS 2017 podría ser una ayuda diagnóstica en los casos de displasia moderada. ^(8, 9,10)

III. Carcinoma oral de células escamosas

El cáncer oral corresponde al sexto cáncer más común en todo el mundo, con una incidencia anual de aproximadamente 274.000 casos. ⁽⁷⁾ Su patogénesis es multifactorial, es decir, comprende alteraciones genéticas y ambientales. ⁽¹¹⁾ Suele asociarse a diversos factores de riesgo, tales como el tabaco, alcohol y recientemente al virus del papiloma humano (VPH), entre otros. ^(6,7,12)

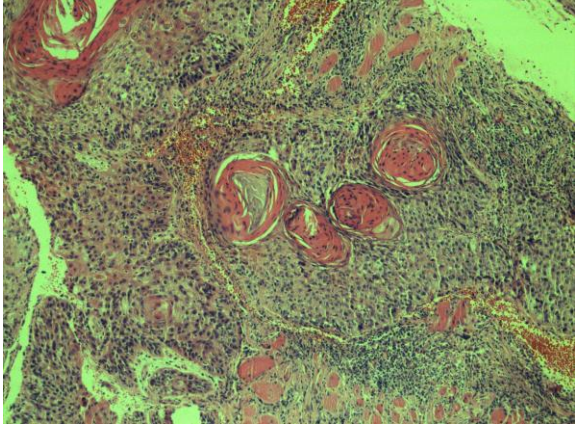
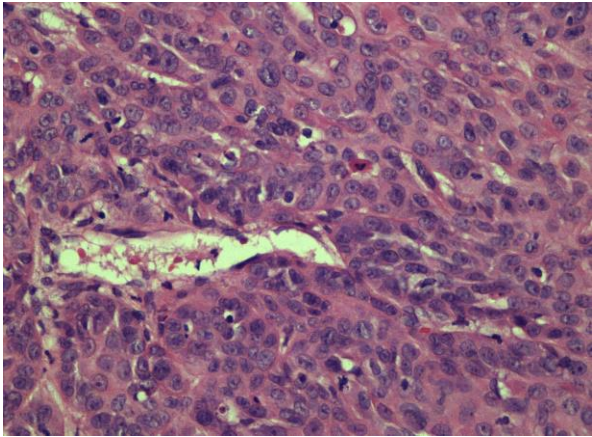
La carcinogénesis puede evolucionar a partir de una lesión celular inicial hasta la formación de una neoplasia maligna. Esta puede surgir a partir de la transformación maligna de MON ⁽¹³⁾ o a partir de una DEO. ⁽¹⁴⁾

El Carcinoma oral de células escamosas (COCE) se define como una neoplasia epitelial invasiva, con grados variables de diferenciación escamosa, con o sin queratinización. ⁽⁵⁾ Corresponde a 9 de cada 10 neoplasias orales ⁽¹⁵⁾ y tiende a afectar en mayor medida al sexo masculino. Su incidencia aumenta con la edad y generalmente se desarrolla en pacientes mayores de 40 años.

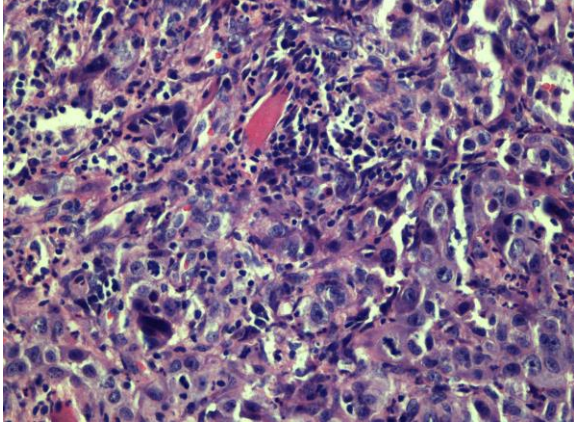
El COCE puede afectar distintos sitios de la cavidad oral, siendo los más frecuentes, el borde lateral de la lengua y el piso de boca. ⁽⁶⁾ Suele pesquisarse en etapas tardías por lo que su tasa de supervivencia es de 50% a los 5 años. ⁽⁷⁾

Actualmente se utilizan dos sistemas para clasificar histológicamente las lesiones tumorales: La primera corresponde a la clasificación histológica internacional de tumores propuesta por Broders ⁽⁵⁾ (tabla IV) y el patrón del frente de infiltración tumoral (TIF). ⁽¹⁶⁾

Tabla IV. Clasificación de Broders. ⁽⁵⁾

GRADO HISTOPATOLÓGICO	CARACTERÍSTICAS
<p>COCE BIEN DIFERENCIADO</p>  <p>HE aumento 10x</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Células tumorales dispuestas en islotes (varían en forma y tamaño) con puentes intercelulares. • escamosas bien diferenciadas de aspecto poliédrico (núcleos pleomorfos, Células cromatina heterogénea). • Abundantes perlas de queratina (eosinófilas, núcleos picnóticos, cariólisis).
<p>COCE MODERADAMENTE DIFERENCIADO</p>  <p>HE aumento 40x</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Células tumorales dispuestas en islotes con puentes intercelulares, separadas en un estroma fibroso, con infiltrado inflamatorio de intensidad variable. • Células escamosas atípicas pleomórficas (ovaladas, rectangulares, redondas). • Núcleos pleomórficos y anisocariosis. • Múltiples mitosis atípicas

COCE MAL DIFERENCIADO



HE aumento 40x

- Células tumorales dispuestas en islotes y/o cordones epiteliales, con pérdida de los puentes intercelulares.
- Pérdida del fenotipo escamoso.
- Múltiples mitosis atípicas.

El TIF corresponde al área de la lesión con mayor profundidad de invasión y progresión hacia el entorno de los tejidos, es considerada el área más representativa del tumor y es identificado por cuatro características:

- 1) El grado de queratinización
- 2) Polimorfismo nuclear
- 3) Infiltración linfocítica
- 4) Patrón de Invasión

IV. Estroma tumoral

El estroma tumoral (ET), corresponde a un tejido de sostén, típicamente un tejido conectivo, que sostiene a las células funcionales, éstas últimas corresponden al parénquima. ⁽¹⁷⁾

En un COCE, el ET está compuesto por células que pueden adoptar actividad antitumoral o protumoral, además de matriz extracelular. Estas células incluyen: fibroblastos, células endoteliales, células mesenquimales, células inmunes e inflamatorias. ⁽¹⁸⁾

Las células cancerosas pueden modificar el comportamiento del ET para permitir la progresión del tumor, produciendo factores de crecimiento y proteasas, induciendo angiogénesis e inflamación y alterando la homeostasis de los tejidos normales. ⁽¹⁷⁾

El ET puede interactuar con las células neoplásicas por medio de contactos celulares directos o vía mediadores químicos, como citoquinas, mitógenos, factores proangiogénicos y metaloproteinasas de la matriz (MMP); afectando la supervivencia de las mismas, modificando la respuesta a fármacos, facilitando la invasión y metástasis. Por lo que se le adjudica un papel directo en el tumor, actuando como mutágeno o bien enlentecer y revertir la progresión tumoral. ^(17,19)

V. Eosinófilos y su papel en el cáncer

Los eosinófilos son leucocitos derivados de la médula ósea con gránulos citoplasmáticos. Corresponden al 1-5 por ciento del total de células blancas de la sangre. ^(20,21) Son células multifuncionales y desempeñan un papel importante en la salud y la enfermedad. ⁽²¹⁾ Modulan la respuesta inmune innata y adaptativa. ^(20,22) Están implicados en enfermedades parasitarias y helmínticas, infecciones bacterianas/virales, lesión tisular y enfermedades alérgicas. ^(20,21,22)

Los eosinófilos almacenan, sintetizan y liberan una gran cantidad de citoquinas, quimiocinas, factores de crecimiento, enzimas y mediadores lipídicos, que podrían afectar directa o indirectamente al ET modulando las propiedades de las células de este microambiente. ⁽¹⁹⁾ Los gránulos citotóxicos que éstos poseen contienen 4 proteínas: proteína catiónica eosinofílica (ECP), proteína básica mayor (MBP), neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) y la peroxidasa eosinofílica (EPO). Cada una de las cuales posee diferentes funciones en la biología del cáncer. ⁽²³⁾ La tabla V muestra las acciones de cada una de ellas. ⁽²³⁾

Tabla V. Función de las Proteínas presentes en gránulos de Eosinófilos. ⁽²³⁾

ECP	Tiene efecto citotóxico sobre bacterias, parásitos, virus, epitelio respiratorio y células cancerosas. Es citotóxica para líneas celulares de linfoma de Hodgkin, de carcinoma colorrectal e inhibe la proliferación celular in vitro de COCE a través de lisis osmótica.
MPB	Desempeña un papel en la defensa del anfitrión, daño tisular e inhibe la actividad de la heparanasa, ejerce un rol protector en enfermedades inflamatorias y la progresión del cáncer. Es citotóxica contra los helmintos. Y se ha demostrado que es citotóxico en el cáncer humano.
EDN	También producida por las células mononucleares y los neutrófilos. Tiene actividad citotóxica y sirve como quimioatrayente para células dendríticas, monocitos, mastocitos, neutrófilos y células T. Ha demostrado una fuerte actividad citotóxica contra las líneas celulares de carcinoma colorrectal.
EPO	Está implicada en la muerte de parásitos y bacterias, lesiones en el tejido inflamatorio y contribuye a la patogénesis del asma. Está presente en el cáncer de mamas en el estroma del tejido conectivo peri e intra tumoral, sin embargo, no se observa en el tejido mamario benigno.

Los eosinófilos responden a una amplia gama de mediadores solubles como, por ejemplo, citoquinas, mediadores lipídicos, complemento, y también, expresan una amplia gama de receptores de superficie. Además, interactúan con numerosas células (inmunes y no inmunes) presentes en el ET, como células cebadas, macrófagos, células dendríticas, células T, células B, fibroblastos y células endoteliales. ⁽¹⁹⁾

Por lo anteriormente descrito, pareciera ser que los eosinófilos poseen actividad tumoricida por la acción directa de sus proteínas citotóxicas y de manera indirecta por medio de citoquinas, para permeabilizar y provocar la muerte de las células neoplásicas. ⁽²¹⁾ Aunque probablemente la función de los eosinófilos podría depender de la composición celular local del ET y la presencia o ausencia de factores que puedan co-estimularlos, ya que en células inmunes tales como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas se ha demostrado esa función. ⁽¹⁹⁾

VI. Eosinofilia Tisular Asociada a Tumores

Los eosinófilos son considerados células efectoras en fase terminal, ya que, al activarse, degranulan y liberan sustancias altamente citotóxicas, ⁽²⁴⁾ dañando y matando a células tumorales. ⁽²⁰⁾ A menudo son reclutados al ET, generando una infiltración peri o intratumoral, sin asociarse con necrosis ni ulceración del tejido, este concepto se conoce con el nombre de Eosinofilia Tisular Asociada a Tumores (TATE), ^(22,25) concepto descrito por primera vez por Prezewoski en 1896.

Se ha descrito una gran TATE asociada a diversos cánceres, incluyendo COCE, ⁽²¹⁾ carcinoma de cuello uterino y otros carcinomas, ⁽²⁶⁾ como de laringe, faringe, del tracto gastrointestinal, y genitales externos. ^(21, 26, 27, 28)

En la región de cabeza y cuello, la TATE ha dado lugar a una gran controversia y se discute su valor pronóstico en situaciones clínicas. Algunos estudios como los señalados en la investigación de Davis BP (2014), ⁽²⁹⁾ han demostrado que una mayor TATE se ha asociado con buen pronóstico en diversos tipos de tumores sólidos, como tumores de colon, de esófago, carcinoma nasofaríngeo, cáncer de pene, carcinoma de laringe, adenocarcinoma pulmonar, carcinoma de vejiga, cáncer de próstata y COCE. ^(29, 30) Sin embargo, el papel de TATE aun es controversial, pues también ha sido descrita en estudios analíticos multivariantes como un indicador de mal pronóstico en COCE, ya que a medida que aumentaba la expresión del antígeno leucocitario humano DR (HLA-DR) aumentaba la infiltración eosinofílica, aunque esta discrepancia puede estar relacionada con las diferencias en los métodos y diseño de estudios. ⁽²⁹⁾

Kargahi et al. (2015) ⁽³¹⁾ contabilizó la presencia de eosinófilos en muestras de MON, DEO y COCE, comparando la efectividad de distintas tinciones como hematoxilina-eosina, Rojo Congo y técnicas inmunohistoquímicas con marcador de receptor de hormona 1 (EMR1). ⁽³¹⁾ Como resultado obtuvo un alto número de eosinófilos en COCE en todas las técnicas empleadas. ⁽³¹⁾ Por otro lado, Megha Jain et al. (2014) ⁽²⁰⁾ comparó la cantidad de eosinófilos en muestras de DEO y COCE con tinción de Rojo Congo, observando un aumento en el recuento de estas células en COCE. Esto nos hace suponer que la evaluación cuantitativa de eosinófilos sería útil dentro de los parámetros histológicos evaluados en neoplasias de cabeza y cuello. ⁽³²⁾

OBJETIVO

Objetivo principal

El objetivo de este estudio es comparar la densidad celular promedio de eosinófilos en el estroma de muestras de MON, DEO y COCE con tinción de HE y Giemsa.

Objetivos específicos

- Describir la muestra de estudio según edad, sexo y diagnóstico de la lesión en mucosa oral.
- Determinar la densidad celular promedio de eosinófilos con técnica histoquímica de HE según diagnóstico de tejido obtenido de la mucosa oral.
- Determinar la densidad celular promedio de eosinófilos con técnica histoquímica de Giemsa según diagnóstico de tejido obtenido de la mucosa oral.
- Correlacionar los valores de densidad celular promedio de eosinófilos con HE y Giemsa.

MATERIAL Y MÉTODO

A) Diseño del estudio

Serie de casos

B) Población y muestra

La muestra de estudio consistió en un N muestral de 52 tacos embebidos en parafina, de los cuales solo 44 fueron contabilizados dentro de nuestro estudio con ambas tinciones, al cumplir con los criterios propuestos para este trabajo. Los 44 tacos fueron procesados en el servicio de histopatología de la Universidad Andrés Bello, Viña del Mar, entre los años 2004 y 2012 (anexo 1). De ellos, 16 muestras correspondieron al diagnóstico de Mucosa Oral Normal, 13 a Displasia Epitelial Oral y 15 a Carcinoma Oral de Células Escamosas. Las muestras de MON fueron obtenidas de la mucosa que recubría a terceros molares completamente incluidos, extraídas en el pabellón de la misma universidad en el momento de la cirugía.

Un patólogo oral experto evaluó previamente todas las muestras con tinción de hematoxilina eosina para corroborar los diagnósticos, considerando para la tipificación histológica de MON los criterios propuestos por el libro Histología y Embriología bucodental (Gómez de Ferrari, 2010). Para DEO y COCE se consideraron los criterios diagnósticos propuestos por la OMS (WHO, 2017).

C) Criterios de Inclusión

- Casos de MON diagnosticados histológicamente que contaron con la información relativa a la edad, género del paciente, además de la localización de la lesión, anteriores a octubre del año 2012.
- Casos de DEO y COCE diagnosticados histológicamente y que contaron con la información relativa a la edad y género del paciente, además de la

localización de la lesión, anteriores a octubre del año 2012.

- Tacos de parafina con tejido suficiente de donde se obtuvieron 3 laminillas histológicas con cortes de 3 micrones cada uno.
- Presencia de tejido íntegro en la muestra para elegir al menos 3 campos continuos con aumento mayor (40x), adyacente al área de la mucosa oral normal, con displasia epitelial y COCE.

D) Criterios de exclusión

- Muestras de MON, DEO y COCE en mal estado o con artefactos de la técnica histológica y tinción.
- Muestras con ausencia de tejido conjuntivo en la zona adyacente a DEO y COCE.

E) Variables

Variable	Definición operacional	Tipo de variable	Descripción
Edad	Años del paciente en que se extrajo la muestra	Cuantitativa, discreta	Obtenida del registro de ficha de la Universidad Andrés Bello.
Género	Femenino, masculino	Cualitativa, dicotómica	Obtenida del registro de ficha de la Universidad Andrés Bello.
Diagnóstico	Mucosa normal, displasia epitelial oral, carcinoma oral de células escamosas	Cualitativa, tricotómica	Realizado por un patólogo oral experto, basado en el libro Ten Cate (2008) y la OMS (2005).

Localización	Bajo riesgo, alto riesgo	Cualitativa, dicotómica, nominal	Clasificación basada en Ribeiro et al. alto riesgo: Mucosa del borde lateral y vientre de la lengua y piso de boca. Bajo riesgo: mucosa labial, yugal, palatina, alveolar, dorso lingual y encía.
Densidad celular promedio teñido con Hematoxilina Eosina	Número de eosinófilos por campo de aumento mayor (40x)	Cuantitativa, discreto	Basado en Jain et al., 2014
Densidad celular promedio teñido con Giemsa	Número de eosinófilos por campo de aumento mayor (40x)	Cuantitativa, discreto	Basado en Jain et al., 2014

F) Técnica con HE

De 44 muestras previamente incluidas en parafina, se obtuvieron cortes de 3 micrones que fueron montados en portaobjetos xilanizados, desparafinados y rehidratados por inmersión en diluciones de etanol en series graduadas de forma decreciente. Los cortes fueron lavados en agua corriente por 2 minutos y luego de esto, sumergidos en hematoxilina de Harris durante 1:30 minutos. Se eliminó el exceso de hematoxilina con breves lavados de agua y alcohol. Se tiñó durante 7 minutos en eosina al 1%. Posteriormente se realizaron baños en alcoholes de concentraciones crecientes para finalmente lavar la muestra en 3 baños sucesivos de xilol de 2 minutos cada uno y permitir la fijación.

G) Técnica con Giemsa

De 44 muestras previamente incluidas en parafina, se obtuvieron cortes de 3 micrones que fueron montados en portaobjetos xilanizados, desparafinados. Sellevó a agua destilada. Se tiñeron las muestras con una Solución diluida de Giemsa (consistente en 1 volumen de Solución concentrada de Giemsa con 4 volúmenes de agua destilada). Posteriormente se lavó con agua corriente para eliminar el exceso de colorante. Se sumergió en agua acetificada (agua destilada 100ml + ácido acético 0,2 ml), hasta apreciar color rosado en los cortes. Se enjuagó en alcohol al 95%, luego se deshidrató en alcohol absoluto, 5 inmersiones, se aclaró y finalmente se montó con Flo-texx.

H) Determinación densidad celular promedio

Las muestras teñidas seleccionadas fueron observadas en su totalidad en un microscopio óptico (Olympus® CX-31) con aumento mayor (40x). Se consideraron como eosinófilos las células nucleadas con gránulos citoplasmáticos intensamente rojos sin incluir glóbulos rojos superpuestos con células mono y polimorfonucleares. Se realizó el conteo clásico de eosinófilos en las secciones de estroma de las muestras de MON, DEO y COCE observando 3 campos consecutivos y sacando un promedio entre ellos. ⁽²¹⁾

I) Calibración

La calibración y entrenamiento del examinador estuvo a cargo de un experimentado patólogo oral y abarcó tanto un área teórica (revisión bibliográfica) como práctica. Esta última consistía en observar y analizar microfotografías de MON, DEO y COCE teñidos con Hematoxilina Eosina y Giemsa de publicaciones referentes al tema.

El grado de acuerdo o concordancia entre el examinador y un “gold standard” (acuerdo interobservador) se determinó en dos ocasiones utilizando el estadístico kappa. En cada oportunidad se mostraron múltiples microfotografías y el

examinador debía detectar la presencia o ausencia de eosinófilos con cada tinción. En la primera sesión, de las 30 microfotografías mostradas se obtuvieron 22 aciertos, por lo que el acuerdo entre el observador y el gold standard fue moderado (coeficiente kappa 0,45). En la segunda sesión, se obtuvieron 28 aciertos de un total de 30 microfotografías, por lo que el acuerdo interobservador fue considerado bueno (coeficiente kappa 0,75).

J) Análisis estadístico

En relación con el análisis estadístico, la variable edad se representó mediante mediana y rango intercuartílico. Las variables cualitativas (género, diagnóstico y localización) se representaron mediante frecuencia absoluta y relativa.

La comparación del promedio de número de eosinófilos según diagnóstico se realizó mediante el test Kruskal Wallis, con test post hoc de Conover-Iman. Se utilizó un nivel de significancia de un 0,05 y se realizó el análisis estadístico con el programa STATA 12® (StataCorpLP, Texas, USA).

RESULTADOS

I. Descripción de la muestra:

La muestra de estudio consistió en un total de 44 tacos embebidos en parafina. La información relativa al diagnóstico, número de casos, edad promedio, rango etario y desviación estándar de la totalidad de la muestra y según diagnóstico se muestra en la tabla VI.

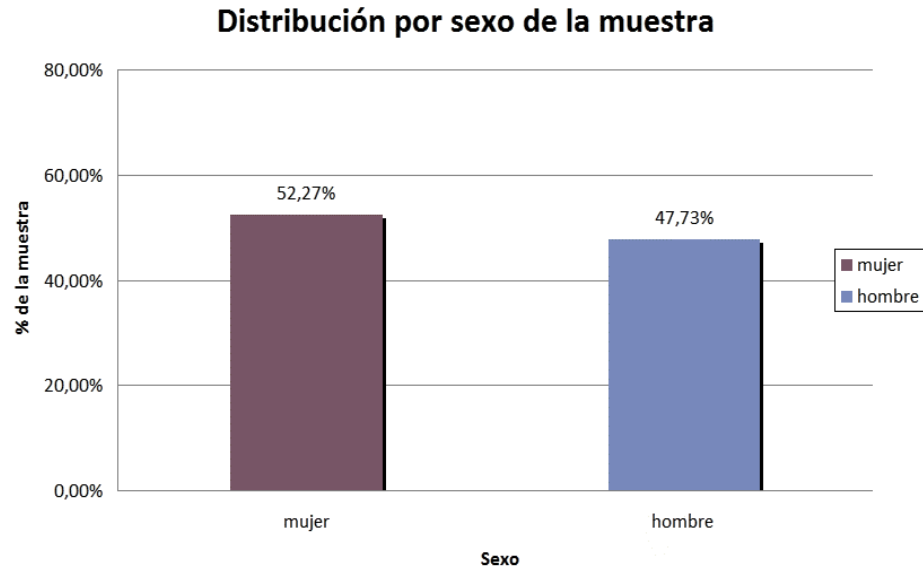
Tabla VI. Diagnósticos incluidos en el estudio.

	Número de casos	Edad promedio (años)	Rango etario	Desviación estándar (D.E.)
MON	16	38,07	8-68	21,22
DEO (n:13)		55,61	37-86	12,64
Leve	10			
Moderada	3			
Severa	0			
COCE (n:15)		74,4	61-84	7,51
Bien diferenciado	9			
Mod. diferenciado	6			
Mal diferenciado	0			
Totalidad de la muestra	44	56.47	8-86	21.03

Para comparar el promedio de las edades de los tres grupos se utilizó el test de Kruskal Wallis, $p=0,001$, es decir al menos un grupo presentó diferente mediana de edad. Los 3 grupos presentaron edades que difieren entre sí ($p<0,03$) test de comparación múltiple (post hoc) de Conover-Iman (anexo 1).

En el gráfico 1 se observa la distribución por sexo en relación con la totalidad de la muestra.

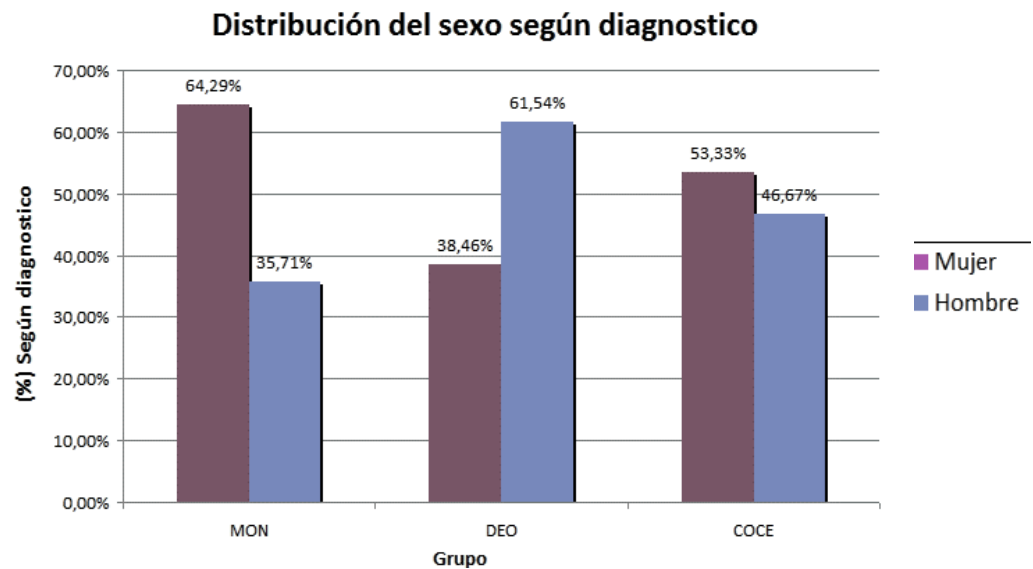
Gráfico 1.



II. Asociación entre el sexo y diagnóstico: (Test exacto de Fisher).

El gráfico 2 muestra la distribución del sexo según diagnóstico, en donde no existe asociación entre ambas variables, obteniéndose un valor $p=0,434$.

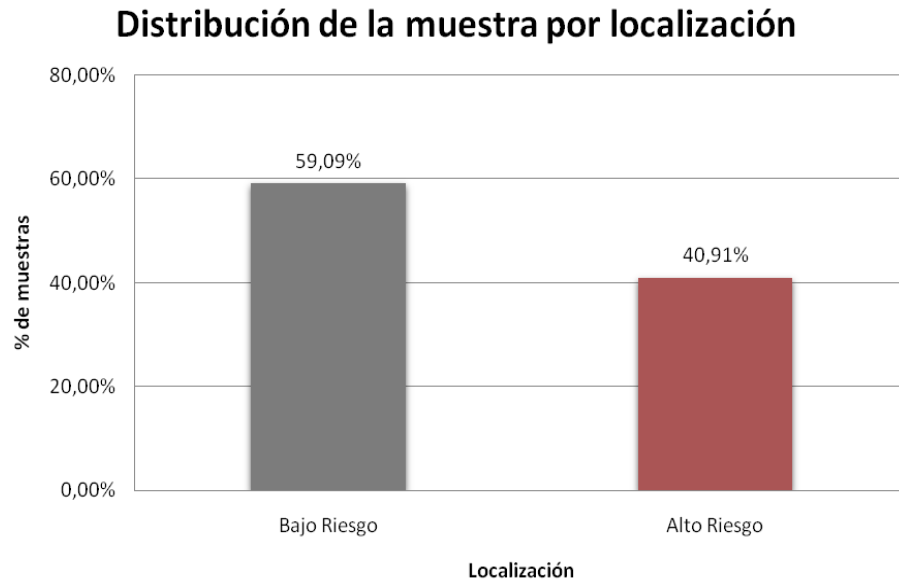
Gráfico 2.



III. Localización

El gráfico 3 muestra la localización de la muestra total.

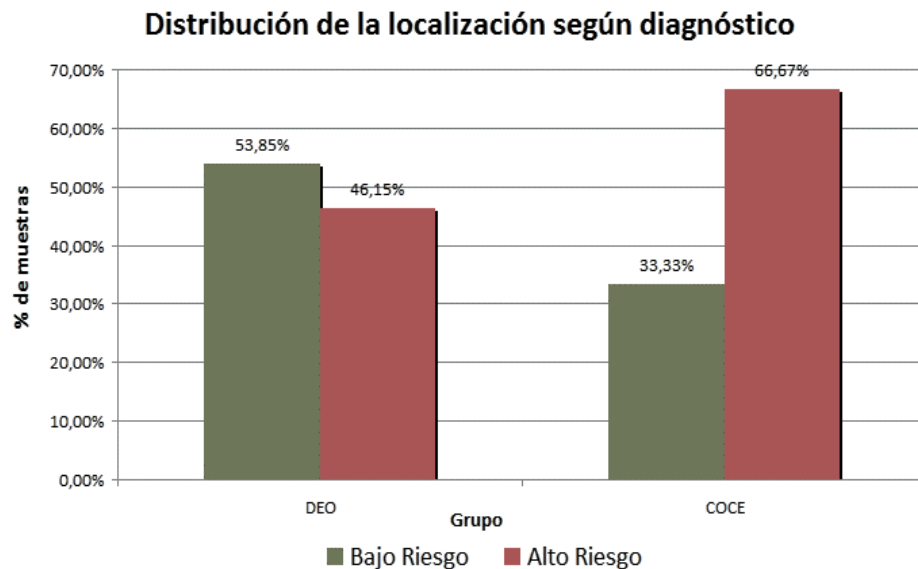
Gráfico 3.



IV. Asociación entre localización y diagnóstico: (Test exacto de Fisher)

La asociación entre la localización y el diagnóstico de DEO y COCE se muestra en el gráfico 4, en donde no existió asociación estadísticamente significativa entre ambas variables, obteniéndose un valor p de 0,445.

Gráfico 4.



V. Hematoxilina eosina

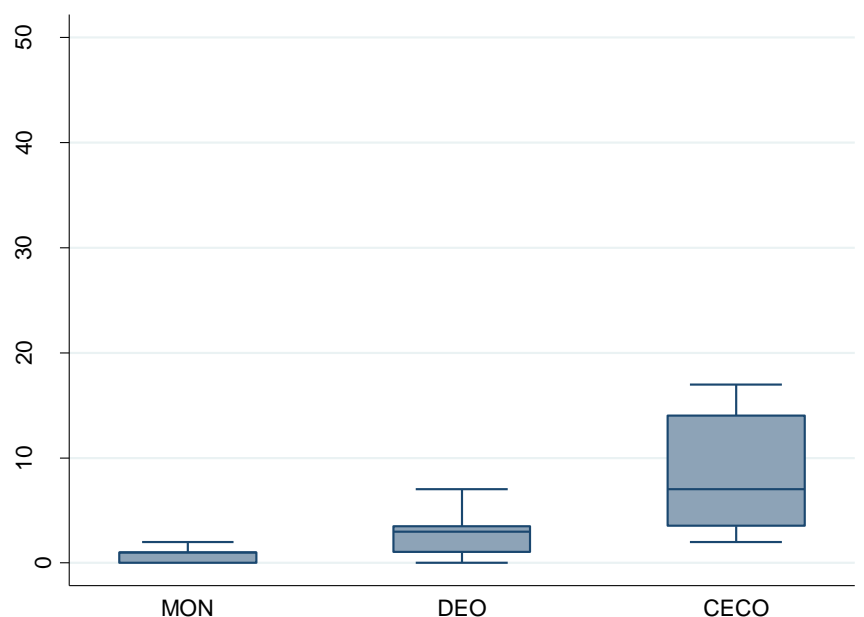
1. Distribución de la densidad celular promedio de eosinófilos con HE en la totalidad de la muestra.

Respecto a la distribución de la densidad celular promedio de eosinófilos con HE en la totalidad de la muestra, se observaron 5,53 células en promedio por campo (40x), con una desviación estándar de 9,00.

2. Asociación entre la densidad celular promedio de Eosinófilos con HE y el diagnóstico: (Test de Kruskal Wallis)

El Diagrama 1 muestra el análisis de eosinófilos con HE según diagnóstico. Para comparar la mediana de los eosinófilos de los tres grupos se utilizó el Test de Kruskal Wallis, obteniéndose un $p < 0,001$, es decir al menos un grupo presenta diferente mediana. Para saber cuál de ellas eran, se aplicó test de comparación múltiple (post hoc) de Conover-Iman indicando que los 3 grupos presentaron densidades celulares promedio que difieren entre si $p < 0,001$, por lo que existe una asociación estadísticamente significativa entre la densidad celular promedio de eosinófilos y el diagnóstico.

Diagrama 1. Análisis de eosinófilos con HE según diagnóstico.



Las ilustraciones 4, 5 y 6 muestran la densidad celular promedio en muestras de MON, DEO y COCE con técnica de tinción hematoxilina-eosina.

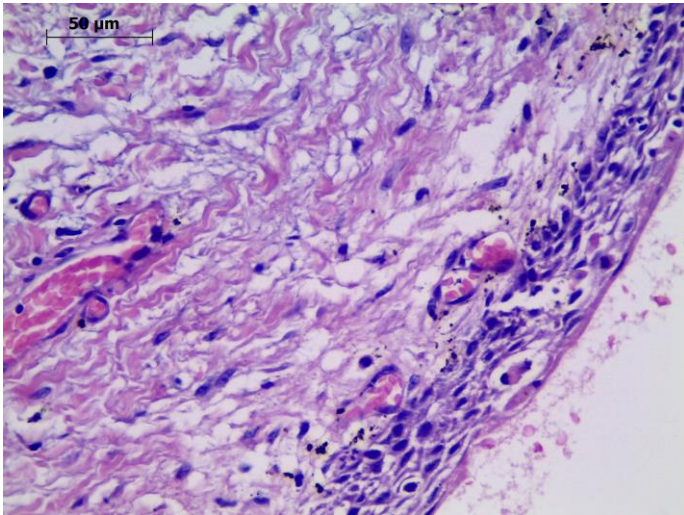


Ilustración 4. Muestra de MON con Hematoxilina Eosina. 40x

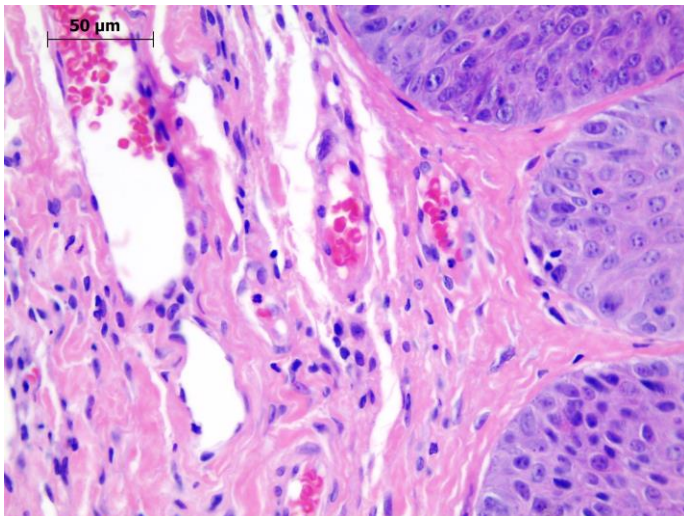


Ilustración 5. Muestra de DEO con Hematoxilina Eosina. 40x

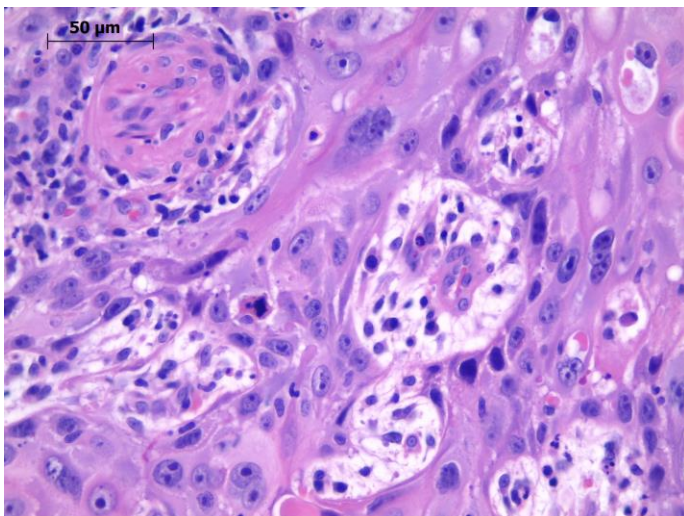


Ilustración 6. Muestra de COCE con Hematoxilina Eosina. 40x

VI. GIEMSA

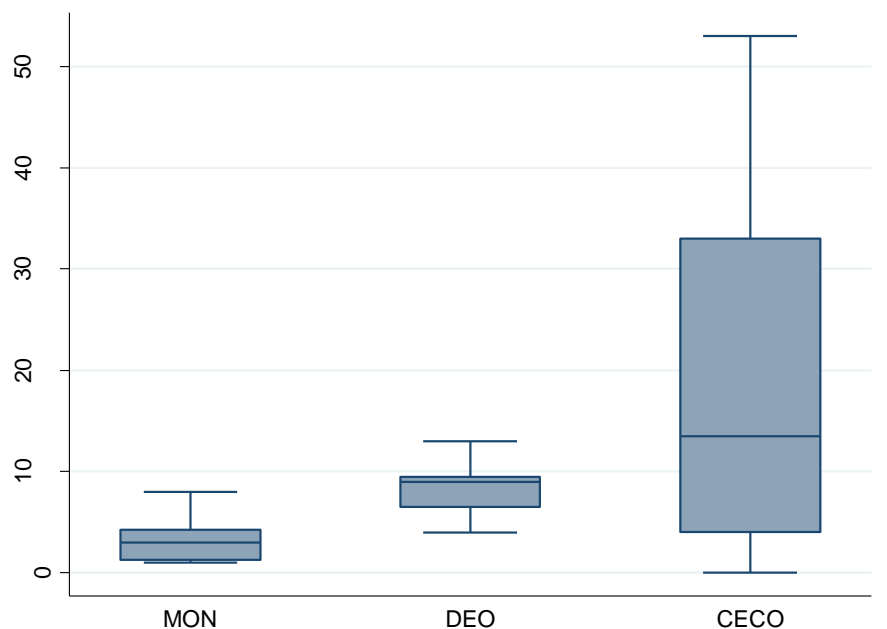
1. Distribución de la densidad celular promedio de eosinófilos con Giemsa en la totalidad de la muestra.

Respecto a la distribución de la densidad celular promedio de eosinófilos con Giemsa en la totalidad de la muestra, se observaron 10,45 células en promedio por campo (40x), con una desviación estándar de 12,31.

2. Asociación entre la densidad celular promedio de Eosinófilos con Giemsa y el diagnóstico: (Test de Kruskal Wallis)

En el Diagrama 2 se observa el análisis de eosinófilos con Giemsa según diagnóstico. Para comparar la mediana de los eosinófilos de los tres grupos se utilizó el Test de Kruskal Wallis, $p < 0,001$, es decir al menos un grupo presenta diferente mediana. Para saber cuál de ellas eran, se aplicó test de comparación múltiple (post hoc) de Conover-Iman, indicando que el grupo MON difirió de DEO ($p < 0,001$) y de COCE ($p < 0,001$). Y el grupo DEO no difirió de COCE ($p = 0,213$).

Diagrama 2. Análisis de Eosinófilos con Giemsa según diagnóstico.



Las ilustraciones 7, 8 y 9 muestran la densidad celular promedio en muestras de MON, DEO y COCE con técnica de tinción Giemsa.

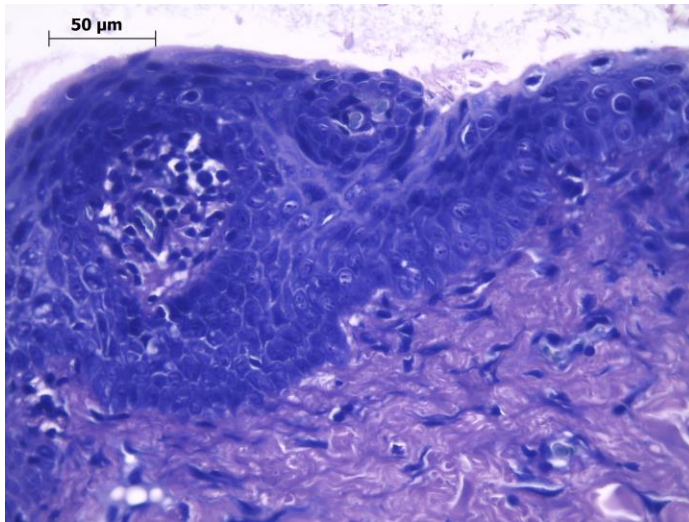


Ilustración 7. Muestra de MON
Con Giemsa. 40x

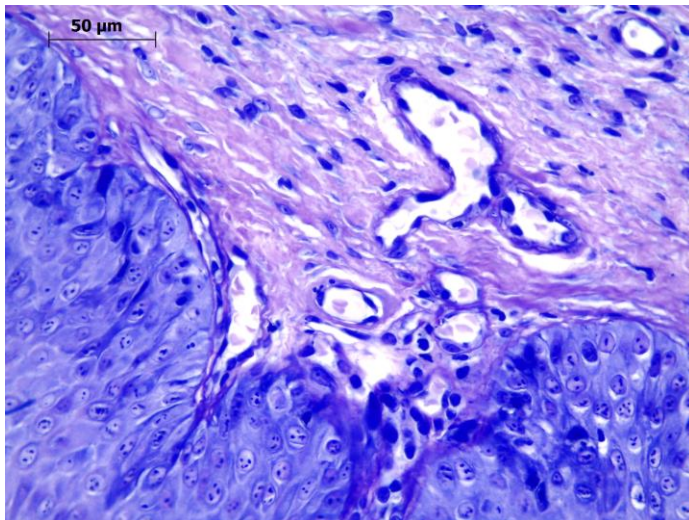


Ilustración 8. Muestra de DEO
Con Giemsa. 40x

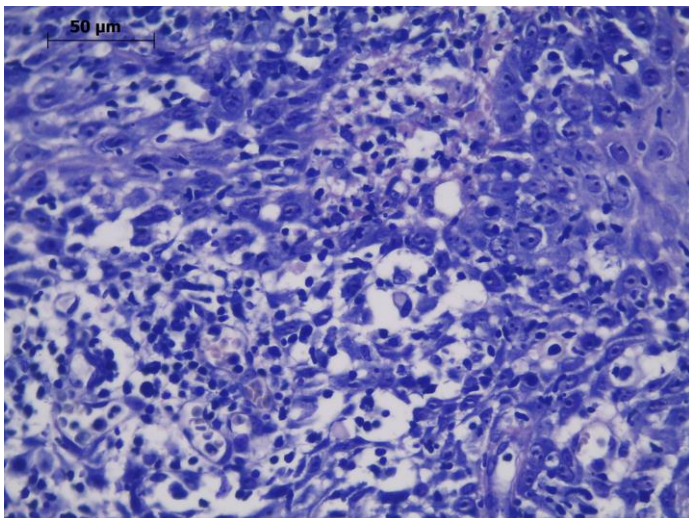


Ilustración 9. Muestra de COCE
Con Giemsa. 40x

VII. Correlación entre los valores de densidad celular promedio de eosinófilos con HE y Giemsa. (coeficiente de correlación de Spearman)

La correlación entre la evaluación de los eosinófilos entre ambas técnicas histoquímicas fue moderada con un coeficiente rho de 0,612 ($p < 0,001$).

DISCUSIÓN

Con el propósito de comparar la densidad celular promedio de eosinófilos en el estroma de muestras de Mucosa Oral Normal (MON), Displasia Epitelial Oral (DEO) y Carcinoma oral de células escamosas (COCE), realizamos 2 técnicas histoquímicas, la convencional técnica corriente con Hematoxilina- Eosina y Giemsa.

Descripción de la muestra

Nuestros resultados evidencian que no existe asociación entre el sexo y el diagnóstico de MON, DEO y COCE, obteniéndose un valor $p=0,434$. Tal como lo señalan autores como Warnakulasuriya⁽³³⁾ y Dost.⁽³⁴⁾ No obstante, nuestros resultados demuestran que el sexo más afectado en el grupo DEO fue el masculino y no el femenino como lo señala Martínez et al. 2016,⁽³⁵⁾ quien argumenta una mayor frecuencia de DEO en muestras obtenidas de mucosa oral y faríngea en mujeres, ya que éstas consultarían con mayor anticipación que hombres. Pensamos que el hecho de que encontramos más casos de DEO en hombres se deba a que actualmente las campañas informativas han sido efectivas y los hombres consultan con mayor frecuencia.

En cuanto a COCE también diferimos de lo propuesto actualmente en la literatura, en donde se indica que el sexo masculino se ve más afectado, ya que los hombres están más expuestos que las mujeres a factores carcinogénicos. De acuerdo con nuestros resultados, el sexo femenino ha aumentado el consumo de alcohol, tabaco y estilos de vida poco saludables.^(36,37)

Con respecto a la variable edad, en las muestras de MON la edad promedio fue de 38,07 años, lo que se puede explicar ya que el sitio de donde se extrajeron las muestras (mucosa que recubría molares incluidos, durante el momento de la

exodoncia), pertenece mayoritariamente a un rango etario menor. En DEO la edad promedio fue 55,61 años y en COCE fue 74,4 años, ambas en adultos mayores de 40-45 años, edades similares a las señaladas por RA Khammissa et al. (2015) ⁽³⁸⁾ y Udeabor et al. (2012).⁽³⁹⁾ Con estos resultados podemos confirmar que la edad de presentación de lesiones potencialmente malignas que al examen histológico presenten distintos grados de DEO es menor que la edad promedio de diagnóstico de COCE, lo que sugiere que a medida que pasa el tiempo, existe mayor probabilidad de que una DEO pueda sufrir transformación maligna.

La acumulación de mutaciones en el tiempo aumenta el riesgo para generar una lesión displásica la que finalmente se transformará en cáncer. Algunos autores ^(35,40) señalan que una lesión displásica antecedería en 10-15 años la aparición de un COCE. Liviu Feller et al. 2013, ⁽⁴¹⁾ señala que en aquellos campos del epitelio oral en que los queratinocitos están comprometidos con la vía del cáncer, la progresión de éste puede variar de 6 meses a 8 años, sin embargo, los factores que determinan la velocidad de la transformación maligna aún son desconocidos.

Respecto a la variable localización, nuestros resultados no reflejan una asociación estadísticamente significativa entre zonas de alto y bajo riesgo en DEO y COCE. Al considerar de forma aislada las muestras de COCE en que un 66,67% se encontraron en un sitio de alto riesgo, es decir, piso de boca, cara ventral y lateral de lengua, existe similitud con lo propuesto en la literatura. ^(38,39,42) Por otro lado, un 53,85% de las muestras de DEO se encontraron en un sitio de bajo riesgo, implicando el resto de la mucosa oral. Estos resultados, podrían deberse a que, tal como lo proponen diversos autores, un COCE puede ubicarse en cualquier zona de la mucosa oral, sin embargo, el pronóstico que tendría éste en un sitio de alto riesgo, sería peor a uno ubicado en un sitio de bajo riesgo. ^(5, 33, 34, 35, 43, 44)

Lo anteriormente dicho, guarda relación con el concepto de “cancerización de campo”, en la génesis y progresión del cáncer oral ya que ésta explicaría varios aspectos del comportamiento patobiológico de COCE, ⁽⁴⁵⁾ la que señala que la inducción de carcinógenos sobre un área de la mucosa oral, más la presencia de

aberraciones genéticas y genómicas, sin alteraciones histológicas, aumentaría el riesgo de desarrollar cáncer. ^(45,46) Esto toma relevancia, ya que un paciente al presentar una LPM en un sitio de la cavidad oral, presenta un riesgo aumentado de padecer cáncer en cualquier sitio de ésta. Esta teoría explicaría en primer lugar, por qué muchos cánceres surgen o están estrechamente contiguos a una LPM; y en segundo lugar, puede explicar por qué el epitelio de apariencia aparentemente normal que rodea a un COCE alberga células con alteraciones genéticas y/o displásicas. ⁽⁴¹⁾

Por lo que reiteramos, de acuerdo con nuestros resultados y a lo publicado en la literatura que todos los sitios de la cavidad oral están en igualdad de condiciones para generar una DEO y/o COCE. ⁽⁴¹⁾

Análisis de HE

El análisis cuantitativo de la densidad promedio de eosinófilos con la tinción de Hematoxilina Eosina reflejó un promedio de 5,53 células por campo (40x) en la totalidad de la muestra. La densidad celular promedio difiere entre los diferentes diagnósticos ($p < 0,001$). Lo que quiere decir que la mediana en los 3 diagnósticos es distinta, indicando que el valor de MON fue menor al de DEO y al de COCE, y el valor de DEO fue menor al de COCE, reflejando que a medida que aumenta el grado de malignidad de la lesión existe una mayor presencia de eosinófilos en el estroma. Hallazgos similares observó Kargahi et al. (2015) ⁽³¹⁾ quien contabilizó la presencia de eosinófilos en muestras de MON, DEO y COCE, comparando la efectividad de distintas tinciones. ⁽³¹⁾ Como resultado obtuvo un alto número de eosinófilos en COCE en todas las técnicas empleadas.

Said et al. (2005), ⁽²⁸⁾ evaluó la presencia de infiltrado eosinofílico en 87 muestras de carcinoma de laringe invasor y no invasor, obteniendo como resultado un mayor número de eosinófilos en lesiones invasivas, preferentemente a nivel del frente de invasión del tumor, lo que sugiere que una alta eosinofilia estaría relacionada con

tumores invasivos además de afectar en el pronóstico de los pacientes. Hallazgos similares propone. ⁽⁴⁷⁾

Análisis de Giemsa

El análisis cuantitativo de la densidad celular promedio de eosinófilos con la tinción de Giemsa reflejó en promedio 10,45 células por campo (40x) en la totalidad de la muestra. Al comparar las medianas de los grupos de MON, DEO y COCE, se observa que éstas difieren entre sí ($p < 0,001$). En el grupo de MON se observó una menor cantidad de eosinófilos en comparación con los grupos DEO y COCE, sin embargo, el grupo DEO y COCE no presentó diferencias ($p = 0,213$). Por ende, los eosinófilos están presentes en el infiltrado inflamatorio propio de estas lesiones tal como lo sugieren Jain, ⁽²¹⁾ Shweta Yellapurkar, ⁽²²⁾ Lorena SC, ⁽²⁶⁾ Goldsmith MM, ⁽³⁰⁾ sin embargo, se desconocen las interacciones que tendrían con los epitelios displásicos y carcinomas. Sugerimos que el estroma enviaría señales que promoverían la movilización y llegada de eosinófilos, los que aumentarían en número en este tipo de lesiones; es probable también, que el microambiente tumoral moldee el fenotipo y los programas genéticos de los eosinófilos y promueva sus funciones antitumoral o protumoral. ⁽¹⁹⁾ Por lo tanto, diferentes microambientes tumorales podrían polarizar eosinófilos en distintas poblaciones con efectos opuestos en los tumores. ⁽¹⁹⁾

Al realizar una búsqueda exhaustiva de la literatura, solo fue posible hallar 2 estudios que avalan la eficacia de esta técnica en el conteo de eosinófilos en el estroma tumoral, de los autores Dessy et al. 1986 ⁽⁴⁸⁾ y Deron P et al. 1996. ⁽⁴⁹⁾ Sin embargo, no fue posible encontrar estudios actuales que utilicen la misma tinción con fines similares, por lo que se sugiere replicar el método utilizado en el presente estudio.

Análisis de la densidad celular promedio de Eosinófilos con HE y Giemsa

El análisis cuantitativo de la densidad celular promedio de eosinófilos con la tinción de Giemsa reflejó en promedio 10,45 células por campo (40x) en la totalidad de la muestra, lo que duplica al promedio celular observado con la tinción corriente de HE. Esto nos permite concluir que la tinción de Giemsa es más efectiva para visualizar Eosinófilos, tal como lo describe Juan José Barcia 2007 ⁽⁵⁰⁾ donde explica la alta calidad de la tinción en estructuras como membranas celulares y cromatina, y la metacromasia de gránulos e inclusiones citoplasmáticas, como los presentes en eosinófilos. ⁽⁵¹⁾

Esta diferencia de números se puede explicar por el hecho de que en el presente estudio fue utilizada una tinción específica para el conteo de eosinófilos. Los eosinófilos pueden ser fácilmente identificables en secciones de tejido teñidas con hematoxilina eosina, ⁽²¹⁾ sin embargo, en ocasiones estos granulocitos presentan una morfología inusual dificultando su identificación, para lo que se requieren técnicas de tinción especiales como Giemsa. ^(48, 49)

Por otra parte, podemos señalar que, en cada estudio revisado, el conteo de la TATE adquiere valores arbitrarios determinados por cada autor, lo que hace difícil la comparación de nuestros resultados con dichas investigaciones. ^(21, 28, 47) Sin embargo, es evidente el aumento de la densidad celular promedio de eosinófilos en muestras de cáncer con ambas tinciones.

A pesar de que los eosinófilos se encuentran comúnmente en el cáncer humano, su papel aún es ambiguo. ^(21,32) No hay suficientes estudios que indiquen la participación y contribución en la patogenia del cáncer oral, queda pendiente investigar sobre sus interacciones celulares y moleculares para contribuir a un mejor diagnóstico y a establecer nuevas estrategias de tratamiento a nivel mundial. ⁽¹⁹⁾

CONCLUSIÓN

Los eosinófilos están presentes en las muestras de MON, DEO y COCE de forma creciente a medida que el diagnóstico va aumentando su grado de malignidad. Por otra parte, al comparar la técnica de tinción HE y Giemsa, se observó que, con la segunda, el número de eosinófilos duplicó el promedio celular observado con la tinción corriente de HE. Por lo tanto, la técnica de tinción Giemsa es más efectiva para la observación de eosinófilos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Montenegro MA, Antonio A, Mónica G, M Rosario H, Cristián M. Histología y Embriología del Sistema Estomatognático. Volumen 1. 1ra edición. Chile: Quintessence Int; 1997.
2. Ross MH, Wojciech P. Histología texto y atlas color con Biología celular y Molecular. Volumen 1. 6ta edición. EEUU: Panamericana; 2013.
3. Gómez de Ferraris M, Campos A. Histología, Embriología e Ingeniería tisular bucodental. 3ª edición. México: Panamericana; 2010.
4. Dost F, Lê Cao K, Ford PJ, Ades C, Farah CS. Malignant transformation of oral epithelial dysplasia: a real-world evaluation of histopathologic grading. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2014; 117(3): 343-352.
5. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Pathology and genetics of head and neck tumours, World Health Organization Classification of Tumours, IARC Press, Lyon, 2017.
6. Rivera C, Venegas B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (review). *Oncol Lett.* 2014;8(1):7-11.
7. Siebers TJ, Bergshoeff VE, Otte-Höller I, Kremer B, Speel EJ, van der Laak JA, Merks MA, et al. Chromosome instability predicts the progression of premalignant oral lesions. *Oral Oncol.* 2013; 49(12): 1121-1128.
8. Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med.* 2008; (37): 127-133.
9. Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol.* 2006; 42(10):987-93.
10. Rastogi V, Puri N, Mishra S, Arora S, Kaur G, Yadav L. An Insight to oral epithelial dysplasia *International Journal of Head and Neck Surgery.* *Int J Head Neck Surg.* 2013;4(2):74-82

11. Malik UU, Zarina S, Pennington SR. Oral squamous cell carcinoma: Key clinical questions, biomarker discovery, and the role of proteomics. *Arch Oral Biol.* 2016; 63: 53-65.
12. Kumar M, Nanavati R, Modi TG, Dobariya C. Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. *J Cancer Res Ther.* 2016; 12(2): 458-463.
13. Rivera CA, Droguett DA, Kemmerling U, Venegas BA. Chronic restraint stress in oral squamous cell carcinoma. *J Dent Res.* 2011; 90: 799-803.
14. Dionne KR, Warnakulasuriya S, Zain RB, Cheong SC. Potentially malignant disorders of the oral cavity: current practice and future directions in the clinic and laboratory. *Int J cancer.* 2015; 136(3):503-515.
15. Fernández A, Córdova P, Badenier O, Esguep A. Epidemiological characterization of oral cancer. Literature review. *J Oral Res.* 2015; 4(2): 137-145.
16. Pilati S, Bianco BC, Vieira D, Modolo F. Histopathologic features in actinic cheilitis by the comparison of grading dysplasia systems. *Oral Dis.* 2017; 23(2):219-224.
17. Turley SJ, Cremasco V, Astarita JL. Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol.* 2015; 15(11):662-689.
18. Takahashi H, Sakakura K, Kudo T, Toyoda M, Kaira K, Oyama T. Cancer-associated fibroblasts promote an immunosuppressive microenvironment through the induction and accumulation of protumoral macrophages. *Oncotarget.* 2017; 8(5): 8633-8647.
19. Reichman H, Karo-Atar D, Munitz A. Emerging Roles for Eosinophils in the Tumor Microenvironment. *Trends Cancer.* 2016; 2(11): 664-675.
20. Pandit TS. Eosinophils and Cancer – Mini Review. *MOJ Immunol.* 2016; 4(3): 00133.
21. Jain M, Kasetty S, Sudheendra U, Tijare M, Khan S, Desai A. Assessment of Tissue Eosinophilia as a Prognosticator in Oral Epithelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma—An Image Analysis Study. *Patholog Res Int.*

2014; 2014: 1-6.

22. Yellapurkar S, Natarajan S, Boaz K, Baliga M, Shetty P, Manaktala N, Prasad M, et al. Tumour-Associated Tissue Eosinophilia in Oral Squamous Cell Carcinoma- A Boon or a Bane?. *J Clin Diagn Res.* 2016; 10(4): ZC65–ZC68.
23. Sakkal S, Miller S, Apostolopoulos V, Nurgali K. Eosinophils in Cancer: Favourable or Unfavourable? *Curr Med Chem.* 2016; 23(7): 650-666.
24. Berek C. Eosinophils: important players in humoral immunity. *Clinic Exp Immunol.* 2015; 183(1): 57-61.
25. Rakesh N, Devi Y, Majumdar K, Reddy SS, Agarwal K. Tumour associated tissue eosinophilia as a predictor of locoregional recurrence in oral squamous cell carcinoma. *J Clin Exp Dent.* 2015; 7(1): 1-5.
26. Lorena SC, Dorta RG, Landman G, Nonogaki S, Oliveira DT. Morphometric analysis of the tumor associated tissue eosinophilia in the oral squamous cell carcinoma using different staining techniques. *Histol Histopathol.* 2003; 18(3):709-713.
27. Leighton SE, Teo JG, Leung SF, Cheung AY, Lee JC, van Hasselt CA. Prevalence and prognostic significance of tumor-associated tissue eosinophilia in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer.* 1996; 177(3): 436-440.
28. Said M, Wiseman S, Yang J, Alrawi S, Douglas W, Cheney R, Hicks W et al. Tissue eosinophilia: a morphologic marker for assessing stromal invasion in laryngeal squamous neoplasms. *BMC Clin Pathol.* 2005; 5(1):1.
29. Davis BP, Rothenberg ME. Eosinophils and cancer. *Cancer Immunol Res.* 2014; 2(1):1-8.
30. Goldsmith MM, Cresson DH, Askin FB. The prognostic significance of stromal eosinophilia in head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1987;96(4):319-324.
31. Kargahi N , Razavi SM, Deyhimi P, Homayouni S. Comparative evaluation of

eosinophils in normal mucosa, dysplastic mucosa and oral squamous cell carcinoma with hematoxylin-eosin, congo red, and emr1 immunohistochemical staining techniques. *Electron Physician*. 2015; 7(2):1019-1026.

32. Martinelli-Kl y CP, Mendis BR, Lombardi T. Eosinophils and Oral Squamous Cell Carcinoma: A Short Review. *J Oncol*. 2009; 2009: 1-6.
33. Warnakulasuriya S, Kovacevic T, Madden P, Coupland VH, Sperandio M, Odell E, M ller H. Factors predicting malignant transformation in oral potentially malignant disorders among patients accrued over a 10-year period in South East England. *J Oral Pathol Med*. 2011; 40(9):677-83.
34. Dost F, Ford PJ, Farak CS. Heightened risk of second primary carcinoma of the head and neck following cervical neoplasia. *Head Neck*. 2014;36(8):1132-7.
35. Martínez C, Hernández M, Martínez B, Adorno D. Frequency of oral squamous cell carcinoma and oral epithelial dysplasia in oral and oropharyngeal mucosa in Chile. *Rev Med Chil*. 2016;144(2):169-74.
36. MINSAL [Internet]. Chile: Ministerio de Salud [octubre 03, 2015]. Disponible en : <http://www.chilelibredetabaco.cl>
37. MINSAL [Internet] Chile: Ministerio de Salud [03 octubre, 2015]. Disponible en : <http://desal.minsal.cl/wp-content/uploads/2013/10/Informe-de-Carga-del-Tabaquismo-en-Chile.pdf>
38. Khammissa RA, Meer S, Lemmer J, Feller L. Oral squamous cell carcinoma in a South African sample: Race/ethnicity, age, gender, and degree of histopathological differentiation. *J Cancer Res Ther*. 2014;10(4):908-914.
39. Udeabor SE, Rana M, Wegener G, Gellrich NC, Eckardt AM. Squamous cell carcinoma of the oral cavity and the oropharynx in patients less than 40 years of age: a 20-year analysis. *Head Neck Oncol*. 2012;4(1): 28.

40. Van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. 2009;(4-5):317-323
41. Feller LL, Khammissa RR, Kramer BB, Lemmer JJ. Oral squamous cell carcinoma in relation to field precancerisation: pathobiology. *Cancer Cell Int.* 2013;13(1):13-31.
42. Chandra A, Singh A, Sebastian BT, Agnihotri A, Bali R, Verma PK. Oral squamous cell carcinomas in age distinct population: A comparison of p53 immunoexpression, *J Cancer Res Ther.* 2013;9(4):587-591.
43. Starzyńska A, Pawłowska A, Renkielska D, Michajlowski I, Sobjanek M, Blazewicz I. Oral premalignant lesions: epidemiological and clinical analysis in the northern Polish population. *Postep Derm Alergol.* 2014;6:341-350.
44. Jerjes W, Upile T, Petrie A, Riskalla A, Hamdoon Z, Vourvachis M, Karavidas K, et al. Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients. *Head Neck Oncol.* 2010;20:2-9.
45. Giaretti W, Monteghirfo S, Pentenero M, Gandolfo S, Malacarne D, Castagnola P. Chromosomal Instability, DNA Index, Dysplasia, and Subsite in Oral Premalignancy as Intermediate Endpoints of Risk of Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013;22(6):1133-1141.
46. Dakubo GD, Jakupciak JP, Birch-Machin MA, Parr RL. Clinical implications and utility of field cancerization. *Cancer Cell Int.* 2007;15(1): 2-7.
47. Falconieri G, Luna MA, Pizzolitto S, DeMaglio G, Angione V, Rocco M. Eosinophil-rich squamous carcinoma of the oral cavity: a study of 13 cases and delineation of a possible new microscopic entity. *Ann Diagn Pathol.* 2008;12(5):322-327.
48. Dessy E, Proto E, Fadda G, Pilato M. Reazione stromale, eosinofilia tessutale e mastocitosi nel carcinoma della laringe. *Acta Otorhinol Ital.* 1986; 6:357-366

49. Deron P, Goossens A, Halama AR. Tumour-Associated Tissue Eosinophilia in Head and Neck Squamous-Cell Carcinoma. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 1996;58(3):167-170.
50. Barcia JJ. The Giemsa Stain: Its History and Applications. *SURG PATHOL.* 2007;15(3):291-296.
51. Wong TW, Jelinek DF. Purification of functional eosinophils from human bone marrow. *J Immuno Methods.* 2013;387(1-2):120-139.

ANEXOS

Anexo 1. Autorización del Servicio de Histopatología, Viña del Mar



**Facultad de
Odontología**
Universidad Andrés Bello

Santiago, Abril 2017

Solicitud de Acceso a Banco de Muestras Histológicas

Dr. René Martínez F.

Jefe de Servicio de Histopatología U. Andrés Bello

Presente

Junto con saludarle, nos dirigimos a Ud. Para solicitar su colaboración en el proyecto de tesis "Recuento de eosinófilos en mucosa oral, displasia epitelial y carcinoma oral de células escamosas, con tinción corriente y Giemsa" requisito para optar al título de cirujano dentista y que tiene por tutor a la Dra. Natalia Santibáñez G.

Esta investigación comparará el recuento de eosinófilos en el tejido conjuntivo de muestras obtenidas de mucosa oral normal, displasia epitelial oral y carcinoma oral de células escamosas con las tinciones señaladas.

Según lo anteriormente expuesto, solicitamos a usted, nos permita acceder al banco de muestras del servicio de histopatología que tiene a su cargo, además de información sobre la localización, género y edad del paciente. Es necesario precisar que, tal como lo establece la normativa vigente, las muestras no deben corresponder a biopsias diagnosticadas posterior al año 2012 y que en todo momento se resguardará la confidencialidad de la información entregada y la integridad de las muestras.

De aceptar colaborar en este trabajo ruego a usted marcar la opción "autorizo" y firmar sobre su nombre según como aparece al final de esta solicitud.

Sin otro particular, se despiden atentamente

América Gálvez
Natalia Apablaza

Licenciadas en Odontología U. Andrés Bello

Dr. René Martínez