

Valoración de los métodos de tinción con azul de toluidina y lugol en el diagnóstico precoz del cáncer bucal

Alaejos Algarra C*, Berini Aytés L**, Gay Escoda C***

RESUMEN

La mayoría de carcinomas escamosos bucales son diagnosticados en estadios avanzados a pesar de la accesibilidad de la cavidad bucal a la exploración clínica. Es muy importante, por tanto, realizar un diagnóstico precoz de las lesiones premalignas y malignas de la cavidad bucal, y establecer programas de prevención y control de los grupos de riesgo. Una de las líneas de investigación en este sentido se basa en la utilización de tinciones in vivo de la mucosa bucal como pruebas de cribaje en poblaciones susceptibles, entre ellas el azul de toluidina y el lugol. El azul de toluidina es una tinción acidofílica con una apetencia selectiva para los ácidos nucleicos; su utilidad se basa en que las células displásicas y anaplásicas contienen cuantitativamente mayor cantidad de ácidos nucleicos y, por tanto, captan más fácilmente la tinción. El lugol es una tinción con afinidad por el glucógeno de las células epiteliales normales y no es retenido por las células tumorales. El objetivo de este artículo es establecer, basándonos en la literatura publicada al respecto, la importancia de ambos métodos de tinción en el despistaje de las lesiones premalignas y malignas de la cavidad bucal.

Palabras Clave: Azul de toluidina; yoduro de lugol; cáncer bucal.

SUMMARY

Most patients with oral squamous cell carcinomas are diagnosed with advanced disease although oral cavity is easily accessible to clinical examination. Therefore early diagnosis of malignant and premalignant lesions of the oral cavity is of paramount importance, so is the screening of high risk groups. In vivo vital staining with toluidine blue and lugol's iodine might improve the diagnostic yield. Toluidine blue is an acidophilic dye that is retained by areas of increased DNA and RNA cellular activity, and the in vivo test is based on the fact that dysplastic and anaplastic cells contain quantitatively more nucleic acids than normal tissue. Lugol's iodine solution is retained in normal squamous epithelial cells by reaction of the iodine with glycogen. The purpose of this study is to review the literature published and determine the importance of both stains to assist in the assessment of patients at risk of developing malignant disease.

Key Words: Toluidine blue; lugol's iodine; oral neoplasms.

Aceptado para publicación: Julio 1995.

* Odontóloga. Licenciada en Medicina y Cirugía. Alumna del Master de Cirugía e Implantología Bucal. Facultad de Odontología. Universidad de Barcelona.

** Profesor Titular de Patología Quirúrgica Bucal y Maxilofacial. Profesor del Master de Cirugía e Implantología Bucal. Facultad de Odontología. Universidad de Barcelona.

*** Catedrático de Patología Quirúrgica Bucal y Maxilofacial. Director del Master de Cirugía e Implantología Bucal. Facultad de Odontología. Universidad de Barcelona.

Alaejos Algarra C, Berini Aytés L, Gay Escoda C. Valoración de los métodos de tinción con azul de toluidina y lugol en el diagnóstico precoz del cáncer bucal. *Av Odontoestomatol* 1996; 12: 511-517.

INTRODUCCIÓN

La utilización de las tinciones con azul de toluidina y lugol se describen para el diagnóstico precoz del cáncer bucal como métodos citológicos, y, por tanto, quedan englobadas en la sistemática de su prevención.

Lo ideal en cuanto a la prevención del cáncer bucal, como en todas las enfermedades, comprendería las actividades a nivel de prevención primaria, pero dado los recursos tan limitados con que desafortunadamente contamos en la actualidad en la protección específica del cáncer bucal, será a nivel de la prevención secundaria, diagnóstico y tratamiento precoces, donde debemos poner y mantener nuestra atención. (1-3)

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión de la literatura publicada sobre los métodos de tinción con azul de toluidina y lugol como estrategias de prevención del cáncer bucal, de cada una de ellas por separado, y de la combinación de ambas tinciones, con el fin de mejorar la sensibilidad y especificidad obtenida hasta ahora utilizándolas por separado.

La elaboración de este trabajo se ha llevado a cabo mediante la búsqueda bibliográfica de todo lo publicado sobre el tema en libros de cirugía bucal, medicina bucal, diagnóstico y prevención del cáncer bucal y en revistas de medicina y odontología.

Estas últimas han sido seleccionadas mediante: el programa informático de base de datos Medline, el Index Medicus y el Index to Dental Literature. Todas estas fuentes han sido consultadas en el período comprendido entre los años 1989 a 1994, a pesar de que en casos puntuales hemos buscado algún artículo más antiguo si nos era necesaria la información que contenía.

Las publicaciones seleccionadas fueron artículos de revisión, por su enorme valor informativo, y artículos científicos que incluían estudios sobre el cáncer bucal y los métodos de tinción con azul de toluidina y lugol.

Se excluyeron determinados artículos, después de haber tenido acceso a ellos, por considerar que la población o el tiempo de seguimiento no eran los adecuados, o las conclusiones no estaban relacionadas con el tema de revisión.

PRUEBA DEL AZUL DE TOLUIDINA

El azul de toluidina es un colorante acidofílico y metacromático que pertenece al grupo de las tiacidas. Su característica principal es que tiñe selectivamente componentes ácidos de los tejidos, tales como sulfatos, carboxilatos y radicales fosfato, principalmente los incorporados en el DNA y RNA de las células (4,5). Por ello, el azul de toluidina se utiliza para hacer tinciones nucleares "in vivo"; la prueba se basa en que las células displásicas y anaplásicas contienen cuantitativamente mayor cantidad de ácidos nucleicos y, por tanto, retienen la tinción.

La composición de la solución es la siguiente: azul de toluidina (1 gramo), ácido acético (10 cc.), alcohol al 100% (4'19 cc.), agua destilada (86 cc.). La técnica de aplicación consiste en aplicar en primer lugar ácido acético al 1% durante 30 segundos, a continuación se aplica azul de toluidina al 1 ó 2% (según realicemos una aplicación tópica, o bien por medio de enjuagues) durante 1 minuto, y, finalmente se vuelve a aplicar ácido acético al 1% durante 30 segundos. Una tinción es considerada positiva si adquiere una coloración azul oscuro, tanto si se tiñe la totalidad de la lesión como si sólo lo hace una parte de la misma (Figura N°1).

Para establecer una valoración correcta de cualquier prueba diagnóstica deben tenerse en cuenta varios parámetros: sensibilidad, especificidad, y prevalencia de la enfermedad (6-10). La sensibilidad de una prueba se define como la probabilidad de que un sujeto enfermo genere un resultado positivo para la prueba:

$$\text{Sensibilidad (S)} = (\text{Verdaderos positivos (VP)}) / (\text{VP} + \text{Falsos negativos (FN)})$$

La especificidad de una prueba se define como la probabilidad de que un sujeto no enfermo genere un resultado negativo para la prueba:

$$\text{Especificidad (E)} = (\text{Verdaderos negativos (VN)}) / (\text{VN} + \text{Falsos Positivos (FP)})$$

Verdaderos positivos (VP) son aquellos sujetos con la enfermedad que dan un resultado positivo para la prueba.

Falsos positivos (FP) son aquellos sujetos no enfermos que dan positivo para la prueba.

Falsos negativos (FN) son aquellos sujetos enfermos que dan negativo para la prueba.

Verdaderos negativos (VN) son aquellos sujetos no enfermos que dan negativo para la prueba.

La prevalencia de una enfermedad se define como la proporción de personas con una determinada condición en una población definida y en un momento de tiempo definido:

Prevalencia (P) = Personas con la enfermedad / Población total estudiada

Los parámetros básicos que hemos definido nos permiten establecer dos parámetros más, que son el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo, que nos ayudan a calcular la probabilidad que tiene una prueba de generar falsos resultados.

El valor predictivo positivo (VPP) de una prueba es la probabilidad de que una persona con una prueba positiva tenga la enfermedad.

El valor predictivo negativo (VPN) de una prueba es la probabilidad de que una persona con una prueba negativa no tenga la enfermedad.

$$VPN = (VN / (VN + FN))$$

$$VPP = (VP / (VP + FP))$$

Otro parámetro que no se debe olvidar en las pruebas diagnósticas es la exactitud. La determinación de la exactitud de una prueba depende de su relación con las formas de saber si la enfermedad o una determinada alteración está presente verdaderamente o no. Generalmente las únicas pruebas exactas son aquellas que nos dan un diagnóstico definitivo, tales como los estudios histológicos. Sin embargo, ante la imposibilidad de obtener un diagnóstico definitivo que a la vez sea precoz, estas pruebas, más exactas, son sustituidas por exámenes más simples, al menos inicialmente, pero que tengan una sensibilidad y especificidad aceptables; esta es la base de la utilización de las pruebas de cribaje en el diagnóstico precoz de múltiples enfermedades, entre ellas el cáncer.

Aplicando estos parámetros a la prueba del azul de toluidina vemos que los falsos negativos hacen referen-

Tabla 1. Sensibilidad y especificidad de la prueba del azul de toluidina según diferentes autores

| | Sensibilidad | Especificidad |
|-----------------|--------------|---------------|
| Neibel (11) | 100% | 100% |
| Shedd (12) | 93 - 100% | 87 - 100% |
| Lundgren (13) | 97% | 52% |
| Mashberg (14) | 90 - 98% | 91 - 94% |
| Silverman (15) | 98% | 70% |
| Barrellier (16) | 95% | 86% |

cia a lesiones malignas que permanecen sin teñir; los observamos en zonas muy necróticas y en lesiones muy queratinizadas y además, los tumores de localización submucosa tampoco se tiñen. Los falsos positivos hacen referencia a lesiones benignas que retienen la tinción; los observamos en zonas infectadas y con inflamación, zonas con tejido de granulación y en tejidos postirradiados (Figura N°2).

En cuanto a los resultados obtenidos en los diferentes estudios revisados son muy dispares (Tabla N°1).

Neibel y Chomet (11) fueron los primeros en aplicar el test de azul de toluidina en la cavidad bucal y refieren una especificidad y una sensibilidad del 100%. No observaron falsos positivos ni falsos negativos.

Shedd y colaboradores (12) refieren una sensibilidad entre el 93 y el 100% y una especificidad entre el 87 y el 100%.

Lundgren (13) observó una sensibilidad del 91% y una especificidad del 52% en el diagnóstico de lesiones malignas a nivel de glotis.

Mashberg (14) estableció una sensibilidad entre el 90 y el 98%, con un 6'7% de falsos negativos, y una especificidad del 91 al 94%, con un 8'5% de falsos positivos. Comparando estos resultados con los obtenidos utilizando para el diagnóstico únicamente criterios clínicos observó que los falsos negativos aumentaban (sólo con criterios clínicos 4'8%), mientras que los falsos positivos disminuían (sólo con criterios clínicos 28'5%), lo cual indica una tendencia al sobrediagnóstico por parte del clínico.

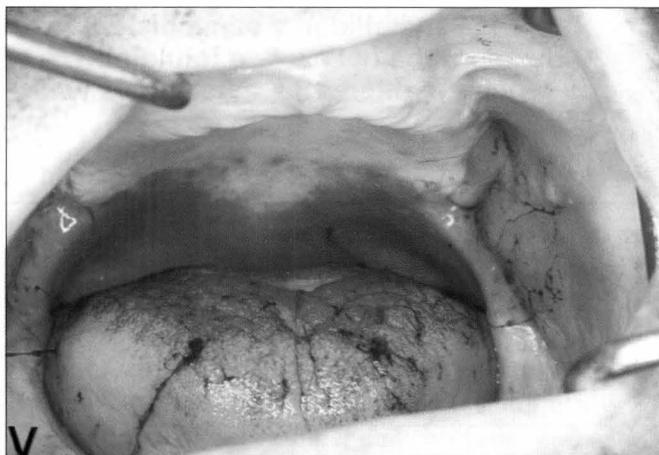


Figura 1. Utilización de la tinción con azul de toluidina en enjuagues. Aspecto de la boca de un paciente con factores de riesgo. El resultado de la prueba es negativo.



Figura 2b. Tinción con azul de toluidina (falso positivo).

Silverman (15) estableció una sensibilidad del 98% y una especificidad del 70% y concluye que es un buen soporte diagnóstico a la exploración clínica.

Barrellier y cols. (16) lo propusieron como método ambulatorio para el despistaje de lesiones premalignas y malignas de la cavidad bucal. Describieron una sensibilidad del 95% y una especificidad del 86%.

De todos los datos obtenidos en los diferentes estudios consultados podemos decir que la prueba de tinción con azul de toluidina se puede utilizar como ayuda en el



Figura 2a. Lesión tuberculosa de la mucosa yugal.

diagnóstico de lesiones premalignas y malignas de la cavidad bucal. Su uso como técnica de despistaje o de búsqueda de casos de cáncer bucal viene limitado por varios factores: los falsos positivos, los falsos negativos y la prevalencia. A este respecto Rosenberg y colaboradores (17) realizaron una valoración estadística utilizando la técnica del meta-análisis, a partir de los trabajos ya comentados, y concluyeron que el número de falsos negativos que genera esta prueba es reducido, lo cual hace que la sensibilidad sea alta y su valor predictivo negativo elevado; esto nos da seguridad, ya que supone que el riesgo de que alguien que tenga cáncer burle la prueba es bajo. Sin embargo, el número de falsos positivos es elevado, lo cual hace que su especificidad sea baja y su valor predictivo positivo también; esto supone que se diagnostican como posiblemente malignas muchas lesiones que no lo son, con lo cual el número de biopsias posteriores a la tinción es elevado.

TINCIÓN CON YODURO DE LUGOL

El yoduro de lugol es una tinción utilizada por su afinidad por el glucógeno de las células epiteliales, esto da como resultado una tinción de color verde-marrón. La técnica se basa, por tanto, en que las células que contengan más glucógeno retendrán la tinción, y aquellas con menor contenido en glucógeno no la retendrán. Las células epiteliales normales contienen gran cantidad de



Figura 3a. Lesión blanca en el reborde lingual.



Figura 3b. Aplicación tópica de la tinción con yoduro de lugol. Captación del colorante: prueba negativa.

glucógeno, sin embargo las células carcinomatosas contienen muy poco glucógeno, no solamente en las líneas celulares más superficiales sino en la profundidad y, por tanto, la reacción con el yoduro de lugol no se producirá o será muy tenue, lo cual nos dará una zona no teñida tras la aplicación de la solución (Figura nº3). La composición de la solución es la siguiente: yoduro de lugol (2 gramos), yoduro de potasio (4 gramos), agua destilada (100 cc.). La técnica de aplicación consiste en aplicar primeramente ácido acético al 1% durante 20 segundos, a continuación se aplica la solución de lugol al 2% durante 20 segundos y, finalmente, se vuelve a aplicar ácido acético al 1% durante 20 segundos.

Para llevar a cabo la valoración correcta de la prueba deberemos tener en cuenta los parámetros ya comentados: sensibilidad, especificidad y prevalencia. El cálculo y significado de estos parámetros y de los que se derivan de ellos ya ha sido comentado.

Los estudios consultados sobre este tipo de tinción hacen referencia en su mayor parte a su aplicación como método de despistaje del cáncer esofágico (18-24). Únicamente Epstein y cols. (25) lo proponen como técnica de despistaje del cáncer bucal y describen una sensibilidad del 87% y una especificidad del 84%.

Los falsos positivos que aparecen con esta prueba son debidos a zonas inflamatorias y ulceradas. Los falsos negativos aparecen en zonas con queratosis superficial.



Figura 4. Material para realizar las tinciones con azul de toluidina y yoduro de lugol.

UTILIZACIÓN CONJUNTA DE AMBAS TINCIONES EN EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DEL CÁNCER BUCAL

Debido a las características de ambas tinciones, azul de toluidina y lugol, para diferenciar células neoplásicas de células normales de la mucosa bucal una opción interesante sería la combinación extemporánea de ambas. Realizamos primero la tinción con yoduro de lugol y tras limpiar la lesión sospechosa aplicamos azul de toluidina. La finalidad de este procedimiento se basa en que así podría conseguirse un aumento de la especificidad y reducir el número de falsos positivos (Figura N°4).

A este respecto, Epstein y cols. (25) llevaron a cabo un estudio en el que compararon la utilización de azul de

Tabla 2. Resultados obtenidos por Epstein y cols (25)

| | S | E | VPP | VPN |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|
| Azul de Toluidina | 0,925 | 0,632 | 0,841 | 0,800 |
| Lugol | 0,875 | 0,842 | 0,941 | 0,762 |
| Ambas tinciones | 0,850 | 0,895 | 0,944 | 0,739 |

toluidina y lugol por separado con la utilización de ambas tinciones conjuntamente. La especificidad (E), la sensibilidad (S) y los valores predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) fueron los siguientes (Tabla N°2).

Observamos, por tanto, que el uso de ambas tinciones supone un incremento en la especificidad. Estos resultados sugieren que el uso del azul de toluidina es útil por su elevada sensibilidad, pero tiene una especificidad baja debido a los falsos positivos que genera. Por el contrario, el lugol tiene una mayor especificidad y una menor sensibilidad. Por tanto, el uso de ambas tinciones parece que mejora los resultados y que debilita los defectos de cada una de ellas considerada por separado.

No obstante, existe una clara controversia sobre el uso de las pruebas de tinción en el diagnóstico precoz del cáncer bucal. Los resultados obtenidos en los diferentes estudios consultados son muy dispares al respecto. A pesar de ello, la mayoría coinciden en que el azul de toluidina es una técnica útil ya que permite una mejor delimitación de los márgenes a biopsiar ante lesiones clínicamente sospechosas, y, por otro lado, permite identificar lesiones que han pasado desapercibidas a la exploración clínica.

Debe tenerse en cuenta que en ningún caso se considera estas pruebas como sustitutos de la biopsia en el diagnóstico definitivo del cáncer bucal, su utilidad estaría, sin embargo, encuadrada en el marco de la prevención del cáncer bucal. Ambas pruebas de tinción cumplen los criterios exigidos a una prueba de cribaje: aceptabilidad (son sencillas, económicas, rápidas de realizar y no son molestas para el paciente), y validez (su sensibilidad y especificidad son aceptables e incluso superiores a otras pruebas de cribaje de cáncer, tal como la prueba de Papanicolau utilizada en el diagnóstico precoz de cáncer de cérvix uterino, que tiene una sensibilidad del 52 al 64%).

En cuanto al yoduro de lugol, basándonos en la bibliografía, observamos que presenta una especificidad superior al azul de toluidina.

Como resultado de todo lo expuesto creemos pertinente el uso combinado de ambas tinciones como método de cribaje de cáncer bucal, aunque debe seguirse investigando al respecto.

CORRESPONDENCIA

Dr. Cosme Gay Escoda. C/Ganduxer 140, 4º. 08022 Barcelona.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rioboo R. Higiene y prevención en odontología. Individual y comunitaria. Madrid: Ediciones Avances, 1994.
2. LLibre Blanc. Bases per a la integració de la prevenció a la pràctica assistencial. Generalitat de Catalunya. Departament de Sanitat i Seguretat Social. Barcelona: Ediciones Doyma, 1993.
3. Guia per a la prevenció i el control de les malalties buco-dentals. Generalitat de Catalunya. Departament de Sanitat i Seguretat Social. Barcelona: CYAN, 1994.
4. Silverman S. Early diagnosis of oral cancer. Cancer 1988; 62: 1796-9.
5. Kaugars GE, Mehalescu WL. Toluidine blue: its significance and application in dentistry. Gen Dent 1989; 37: 404-7.
6. Fletcher RH, Fletcher SW, Wagner EH. Epidemiología clínica. Barcelona: Ediciones Consulta, 1989.
7. Martin A, Luna J. Bioestadística para las ciencias de la salud. 3 ed. Madrid: Ediciones Norma, 1991.
8. Armitage P, Berry G. Estadística para la investigación biomédica. Barcelona: Ediciones Doyma, 1992.

9. Jeniceck M, Cléroux R. Epidemiología. Principios. Técnicas. Aplicaciones. Barcelona: Salvat, 1987.
10. Buck C, Llopis A, Nájera E, Terris M. El desafío de la epidemiología. Problemas y lecturas seleccionadas. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1988.
11. Neibel H, Chomet B. In vivo staining test for delineation of oral intraepithelial neoplastic change: preliminary report. J Am Dent Assoc 1964; 64: 801.
12. Shedd DP, Hukill PB, Bahn S. In vivo staining properties of oral cancer. Am J Surg 1965; 110: 631-6.
13. Lundgren J, Olofsson J, Hellquist H. Toluidine blue. An aid in the microlaryngoscopic diagnosis of glottic lesions?. Arch Otolaryngol 1979; 105: 169-74.
14. Mashberg A. Reevaluation of toluidine blue application as a diagnostic adjunct in the detection of asymptomatic oral squamous carcinoma: a continuing prospective study of oral cancer III. Cancer 1980; 196: 758-63.
15. Silverman S, Migliorati C, Barbosa J. Toluidine blue staining in the detection of oral precancerous and malignant lesions. Oral Surg 1984; 57: 379-82.
16. Barrellier P, Babin E, Louis MY, Meunier-Guttin A. Utilisation du bleu de toluidine dans le diagnostic des lésions néoplasiques de la cavité buccale. Rev Stomatol Chir Maxillofac 1993;94:51-4.
17. Rosenberg D, Cretin S. Use of meta-analysis to evaluate toluidine chloride in oral cancer screening. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1989; 67: 621-7.
18. Brodmerkel GJ. Schiller's test: an aid in esophagoscopy diagnosis. Gastroenterology 1971; 60: 813.
19. Sugimachi K, Ohno S, Matsuda H, Mori M, Kuwano H. Lugol-combined endoscopic detection of minute malignant lesions of the thoracic esophagus. Ann Surg 1988; 210: 179-83.
20. Sugimachi K, Ohno S, Matsuda H, Mori M, Kuwano H. Clinicopathologic study of early stage esophageal carcinoma. Br J Surg 1989; 76: 759-63.
21. Misumi A, Harada K, Murakami A, Arima K, Kondo H, Akagi M, et al. Early diagnosis of esophageal cancer. Analysis of 11 cases of esophageal mucosal cancer. Ann Surg 1989; 210: 732-9.
22. Shiozaki H, Tahara H, Kabayashi K, Yano H, Tamura S, et al. Endoscopic screening of early esophageal cancer with the lugol dye method in patients with head and neck cancer. Cancer 1990; 66: 2068-71.
23. Mori M, Adachi Y, Matshima T, Matsuda H, Kuwano H, Sugimachi K. Lugol staining pattern and histology of esophageal lesions. Am J Gastroenterol 1993; 88: 701-5.
24. Weinstein W. Vital staining of esophageal and gastric mucosa: not vital but may be helpful. Gastrointest Endosc 1992; 38: 723-5.
25. Epstein JB, Scully C, Spinelli J. Toluidine blue and lugol's iodine application in the assessment of oral malignant disease and lesions at risk of malignancy. J Oral Pathol Med 1992; 21: 160-3.