



El valor de la Fosfohistona H3 como marcador de proliferación celular en el carcinoma oral de células escamosas

Un estudio comparativo con el Ki-67 y el índice de actividad mitótica

Dra. Natalia Fernanda Tancredi Cueto

Maestría en Ciencias Odontológicas

Opción Biología Oral

Escuela de Graduados – Facultad de Odontología

Universidad de la República

Montevideo – Uruguay

2022



El valor de la Fosfohistona H3 como marcador de proliferación celular en el carcinoma oral de células escamosas

Un estudio comparativo con el Ki-67 y el índice de actividad mitótica

Tesis de Maestría presentada al Programa de Maestrías Académicas en Ciencias Odontológicas, opción Biología Oral, Facultad de Odontología de la Universidad de la República, como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Magíster en Ciencias Odontológicas – Opción Biología Oral

Directora de tesis:

Prof. PhD. Dra. Verónica Beovide

Codirector:

Prof. PhD. Dr. Ronell Bologna

Director académico:

Prof. PhD. Dr. Ronell Bologna

Montevideo – Uruguay

2022

Tancredi, Natalia.

El valor de la Fosfohistona H3 como marcador de proliferación celular en el carcinoma oral de células escamosas. Un estudio comparativo con el Ki-67 y el índice de actividad mitótica/ Natalia Tancredi.

Tesis de Maestría. Maestría en Ciencias Odontológicas, opción Biología Oral. Facultad de Odontología, Universidad de la República, 2022

Montevideo: Facultad de Odontología, 2022

1. Carcinoma de Células Escamosas. Proliferación celular. Antígeno Ki-67. Fosfohistona H3 I. Tancredi, Natalia

WU140TANv

Dedicado a Hugo y Máximo, quienes me apoyaron, impulsaron, acompañaron y supieron entender mis ausencias. Este trabajo fue posible gracias al esfuerzo de nuestra familia.

Agradecimientos

Muy especialmente a mi tutora, Profesora Verónica Beovide, por incentivarne a realizar la maestría y acompañarme en todo su proceso, orientándome y apoyándome con sus conocimientos.

Al Profesor Ronell Bologna, por permitirme utilizar los recursos del Laboratorio de Patología Molecular, fundamentales para la ejecución de este trabajo de investigación.

A la Dra. Gabriela Vigil, por su profesionalismo, entusiasmo y tiempo dedicado para la realización de todas las técnicas de inmunohistoquímica y la documentación digital de las láminas histológicas, pilares fundamentales de este trabajo.

A la Dra. Natalia González, por su apoyo, aportes, ayuda, tiempo y dedicación ofrecida en todo momento.

A las Técnicas en Anatomía Patológica María Laura Gómez y Rosina Silva, por su profesionalismo y trabajo, que contribuyeron a la concreción del proyecto de investigación.

Al Licenciado en Estadística Fernando Massa por su ayuda con el análisis estadístico.

A mis compañeros de maestría con quienes tuve el gusto de compartir múltiples instancias de aprendizaje, experiencias y lindos momentos.

A la Facultad de Odontología de la UdelaR por permitirme realizar este proceso tan importante para mi formación académica y otorgarme todas las herramientas necesarias para su concreción.

Muchas gracias

Resumen

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la inmunoexpresión de la Fosfohistona H3 (PHH3) en el carcinoma oral de células escamosas, a través de la correlación con la inmunoexpresión de Ki-67, el índice de actividad mitótica (IAM), la graduación histológica de la OMS, parámetros clínico-morfológicos y la tasa de sobrevida.

La muestra de estudio estuvo constituida por 62 casos de carcinoma oral de células escamosas diagnosticados en el Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la UdelaR. En cada uno de ellos se realizó técnica de inmunohistoquímica para los anticuerpos Ki-67 y PHH3 (serina 10). Se utilizó el software *Image J* para el índice de actividad mitótica y la cuantificación de los biomarcadores, definiendo el porcentaje de positividad y de figuras mitóticas cada 1000 células tumorales. Con el fin de comparar la expresión de PHH3, Ki-67 y el IAM con los parámetros clínico-morfológicos se utilizó *t* de *Student* y ANOVA, mientras que para indagar sobre el grado de relación lineal entre ellos se empleó el coeficiente de correlación lineal de Pearson. El análisis de sobrevida se realizó a través de curvas de sobrevida de Kaplan y Meier y para la comparación de las mismas se utilizó el modelo de Cox.

Los resultados mostraron una correlación significativa entre la expresión de la PHH3 (p 0,016) y el IAM (p 0,031) con el tiempo de sobrevida. Sin embargo, no se encontró una relación similar con el Ki-67 (p 0,295). Si bien pudimos constatar una asociación estadística entre el grado histológico y la inmunoexpresión de Ki-67 (p 0,004), la PHH3 no mostró una relación similar (p 0,564).

Destacamos que no encontramos estudio previo que haya analizado en carcinoma oral de células escamosas la relación entre PHH3 y tiempo de sobrevida. En base a los resultados obtenidos, consideramos importante continuar investigando este tópico, con un protocolo de inmunohistoquímica estandarizado y en una gran cohorte de casos. También sería interesante correlacionar su expresión con el estadio TNM y parámetros histológicos adicionales como la graduación del frente de invasión tumoral (FIT), la gemación tumoral y la profundidad de invasión (DOI).

Palabras claves: carcinoma oral de células escamosas, Fosfohistona H3, Ki-67, proliferación celular.

Abstract

The main objective of this study was to evaluate the immunoexpression of Phosphohistone H3 (PHH3) in oral squamous cell carcinoma, through the correlation with the immunoexpression of Ki-67, the mitotic activity index (MAI), histological grading WHO, clinical-morphological parameters and survival rate.

The study sample consisted of 62 cases of oral squamous cell carcinoma diagnosed in the Pathological Anatomy Laboratory of the UdelaR School of Dentistry. In each of them, an immunohistochemical technique was performed for Ki-67 and PHH3 (serine 10) antibodies. *Image J* software was used for the mitotic activity index and biomarker quantification, defining the percentage of positivity and mitotic figures per 1000 tumor cells. To compare the expression of PHH3, Ki-67 and MAI with the clinical-morphological parameters, Student's t-test and ANOVA were used. Pearson's linear correlation coefficient was used to investigate the degree of linear relationship between them. Survival analysis was performed through Kaplan and Meier survival curves and the Cox model was used for their comparison.

The results showed a significant correlation between the expression of PHH3 (p 0.016) and MAI (p 0.031) with survival time. However, a similar relationship was not found with Ki-67 (p 0.295). Although we were able to confirm a statistical association between histological grade and Ki-67 immunoexpression (p 0.004), PHH3 did not show a similar relationship (p 0.564).

We emphasize that we did not find a previous study that has analyzed the relationship between PHH3 and survival time in oral squamous cell carcinoma. Based on the results obtained, we consider it important to continue investigating this topic, with a standardized immunohistochemical protocol and in a large cohort of cases. It would also be interesting to correlate its expression with TNM stage and additional histological parameters such as grading tumor invasion front (TIF), tumor budding, and tumor depth of invasion (DOI).

Keywords: oral squamous cell carcinoma, Phosphohistone H3, Ki-67, cell proliferation.

Lista de abreviaturas y siglas

ADN Ácido Desoxirribonucleico

CCI Coeficiente de correlación interclase

CGA Campo de gran aumento

COCE Carcinoma oral de células escamosas

DE Desvío estándar

DOI Profundidad de invasión

FIT Frente de invasión tumoral

FM Figura mitótica

H-E Hematoxilina-Eosina

IAM Índice de actividad mitótica

IHQ Inmunohistoquímica

M Media estadística

OMS Organización Mundial de la Salud

p p-valor

PHH3 Fosfohistona H3

PI Patrón de invasión

r Coeficiente de correlación

RNC Registro Nacional de Cáncer

TNM T: tamaño o extensión del tumor primario, N: compromiso de ganglios a nivel regional, M: presencia o ausencia de metástasis a distancia. Sistema de estadificación del cáncer del Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer (AJCC) y la Unión Internacional para el Control del Cáncer (UICC)

UdelaR Universidad de la República

Lista de tablas y figuras

Tablas

TABLA 1. Operacionalización de las variables independientes. [PÁGINA 48]

TABLA 2. Operacionalización de las variables dependientes. [PÁGINA 49]

TABLA 3. Grado de expresión de Ki-67 en COCE según índice de etiquetado Ki-67.
[PÁGINA 55]

TABLA 4. Asociación entre las características clínico-patológicas del COCE y las variables dependientes: IAM, inmunexpresión de Ki-67 y PHH3. [PÁGINA 61]

TABLA 5. FM positivas para PHH3 en 1000 células tumorales en comparación con las FM reconocidas en base a sus características morfológicas en láminas teñidas con H-E.
[PÁGINA 64]

TABLA 6. Análisis de la asociación entre las variables dependientes (KI-67, PHH3 e IAM) y sobrevida de los pacientes de forma bivariada y multivariada. [PÁGINA 66]

Figuras

FIGURA 1. Sellos distintivos del cáncer. A la izquierda, las características distintivas y habilitadoras del cáncer descritas por Hanahan y Weinberg (2011). A la derecha, esquema que incorpora los sellos distintivos emergentes y características habilitadoras adicionales propuestas por Douglas Hanahan (2022). Adaptado de Hanahan, D. (2022). Hallmarks of cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. [PÁGINA 22]

FIGURA 2. Ciclo celular de una célula eucariota normal. Durante la interfase la célula crece continuamente, durante la fase M se divide. La replicación del ADN se produce durante la fase S. Adaptado de Lomanto, L., Ortiz, O., Bretón, C., Gomez, Á., & Mesa, V. (2003). El ciclo celular. *Medunab*, 6 (16), 21–29. [PÁGINA 24]

FIGURA 3. En esta imagen se muestran los biomarcadores considerados de valor pronóstico en el COCE de lengua que han sido objeto de estudio en tres o más publicaciones. Adaptado de Almangush, A., Heikkinen, I., Mäkitie, A. A., Coletta, R. D., Läärä, E., Leivo, I., & Salo, T. (2017). Prognostic biomarkers for oral tongue squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 117(6), 856–866. [PÁGINA 31]

FIGURA 4. Localización y gradiente de concentración de Ki-67 durante el ciclo celular. (A) Las células en división continua presentan niveles máximos de Ki-67 durante la transición de fase G_2 / M , disminuyendo luego de forma gradual a medida que la célula progresa a través del ciclo celular, observándose los niveles más bajos en la transición de fase G_1 / S . La localización de Ki-67 también cambia a lo largo del ciclo celular, las imágenes muestran la marcación de Ki-67 en células HeLa en diferentes etapas del ciclo celular (Ki-67 en rojo, núcleos en azul). (B y C) Los niveles de expresión de Ki-67 durante el ciclo celular guardan relación con el tiempo que las células han permanecido en G_0 . En consecuencia, al reingresar al ciclo celular una célula que pasó un corto periodo de tiempo en reposo (B) tendrá mayor concentración de Ki-67 que una célula que haya permanecido un tiempo mayor en G_0 (C). Abreviatura: t, el tiempo que una célula se encuentra en reposo (G_0). Adaptado de Sales Gil, R., & Vagnarelli, P. (2018). Ki-67: More Hidden behind a ‘Classic Proliferation Marker’. *Trends in Biochemical Sciences*, 43 (10), 747-748. [PÁGINA 34]

FIGURA 5. Figuras mitóticas normales y atípicas en muestras tisulares teñidas con H-E. (A-D) Figuras mitóticas normales: A. Prometáfase. B. Metáfase. C. Anáfase. D. Telófase. (E-H) Figuras mitóticas atípicas: E. Mitosis multipolar. F. Mitosis asimétrica en anáfase. G. Puente en anáfase. H. Mitosis con cromosomas o fragmentos cromosómicos rezagados. Adaptado de Donovan, T. A., Moore, F. M., Bertram, C. A., Luong, R., Bolfa, P., Klopfleisch, R., ... Meuten, D. J. (2021). Mitotic Figures—Normal, Atypical, and Imposters: A Guide to Identification. *Veterinary Pathology*, 58 (2), 243–257. [PÁGINA 39]

FIGURA 6. A. Estructura atómica del nucleosoma en forma de disco, constituida en su centro por un octómero de histonas, alrededor del cual el ADN da 1,7 vueltas. Cada hebra del ADN se encuentra representada por un tono de azul diferente. B. (1) Tetrámero de histonas H3 (verde) y H4 (amarillo) constituido por la asociación de dos dímeros H3-H4. B. (2) Dímero de histonas H2A (rojo) y H2B (rosado). B. (3) Histona enlazadora H1. Adaptado de: Khorasanizadeh, S. (2004). The Nucleosome: From Genomic Organization to Genomic Regulation. Review. *Cell Press*, 116 (23), 259–272. [PÁGINA 41]

FIGURA 7. Morfología de los distintos grados de diferenciación histológica del COCE. A. COCE bien diferenciado (H-E. Magnificación 10x). B. COCE moderadamente diferenciado (H-E. Magnificación 10x). C. COCE pobremente diferenciado (H-E. Magnificación 10x). [PÁGINA 49]

FIGURA 8. El software *Motic VM 3.0 – Motic Digital Slide Assistant* permite evaluar las láminas histológicas en formato digital de una forma muy similar al uso del microscopio óptico. En esta imagen, se muestra la lámina digital de un COCE moderadamente diferenciado de reborde alveolar teñido con H-E y visualizado con el software *Motic DS Assistant*, magnificación 1.5x. [PÁGINA 50]

FIGURA 9. Figuras mitóticas normales observadas en láminas digitales de COCE, teñidas con H-E, a una magnificación de 40x. A. Prometáfase. B. Metáfase. C. Anáfase. D. Telófase. [PÁGINA 51]

FIGURA 10. Figuras mitóticas atípicas en COCE observadas en láminas digitales, teñidas con H-E, a una magnificación de 40x. A. Mitosis tripolar. B. Puente que une los cromosomas paralelos en anáfase. C. Mitosis en anillo (flecha). D. Mitosis asimétrica. [PÁGINA 52]

FIGURA 11. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en un COCE bien diferenciado. A. Vista panorámica, se destaca la inmunomarcación elevada de Ki-67 en el estrato basal del

epitelio de revestimiento, la cual es esperable, cumpliendo el rol de control interno (magnificación 2.3x). B. Islotes de células tumorales, en ellos se puede observar la inmunoexpresión de Ki-67 en las células periféricas adyacentes al estroma tumoral (magnificación 10x). C. Células que inmunoeexpresan Ki-67 con marcación nuclear marrón (magnificación 20x). [PÁGINA 55]

FIGURA 12. Figuras mitóticas PHH3 positivas en COCE, que cumplen con los criterios para su identificación: tinción nuclear marrón, ausencia de membrana nuclear y condensación de la cromatina. A-D Figuras mitóticas normales: A. Profase. B. Metafase. C. Anafase. D. Telofase. E-H Figuras mitóticas atípicas: E. Puente anafásico. F. Mitosis tripolar. G. Mitosis en anillo. H. Mitosis asimétrica. Magnificación 40x (A-H). [PÁGINA 56]

FIGURA 13. Imagen microscópica inmunohistoquímica de PHH3 en COCE. Las mitosis señaladas con flecha roja, corresponden a las imágenes consideradas como positivas en este estudio. Los núcleos con gránulos teñidos de marrón y membrana nuclear intacta englobados en círculos, no fueron contabilizados porque no corresponden a células en mitosis. Magnificación 40x. [PÁGINA 57]

FIGURA 14. Relación entre el grado histológico del COCE y la inmunoexpresión de Ki-67. En estas imágenes se puede observar cómo aumenta la inmunomarcación de Ki-67 a medida que disminuye el grado de diferenciación histológica del COCE. A. COCE bien diferenciado (Grado 1). B. COCE moderadamente diferenciado (Grado 2). C. COCE pobremente diferenciado (Grado 3). Magnificación 10x (A-C). [PÁGINA 62]

FIGURA 15. Diagrama de dispersión que muestra la existencia de una correlación significativa, pero baja, entre PHH3 y Ki-67 (r 0,259 / p 0,041). [PÁGINA 62]

FIGURA 16. Comparación de la misma área tumoral en láminas teñidas con H-E e IHQ para Ki-67 y PHH3. A. Lámina de H-E donde se pueden identificar dos FM. B. Lámina de IHQ para Ki-67, donde se observan varias células positivas con tinción nuclear de intensidad variables. C. Lámina de IHQ para PHH3, en la que se visualizan un menor número de células positivas en comparación con las láminas de IHQ para Ki-67, identificándose cuatro FM que inmunoeexpresan el anticuerpo PHH3. Magnificación 20x (A-C). [página 63]

FIGURA 17. Diagrama de dispersión. A. Representación gráfica que muestra ausencia de correlación significativa entre Ki-67 y el IAM (r 0,167 / p 0,194). B. Como se muestra en este diagrama, si se encontró una correlación significativa entre PHH3 y el IAM (r 0,450 / p < 0,001). [PÁGINA 64]

FIGURA 18. Curva de Kaplan-Meier de sobrevida global. [PÁGINA 65]

FIGURA 19. La Curva de Kaplan-Meier grafica la asociación entre sobrevida y la expresión de PHH3. La expresión alta de PHH3 se asoció significativamente con un período de sobrevida más corto. [PÁGINA 67]

FIGURA 20. La Curva de Kaplan-Meier grafica la asociación entre sobrevida y el IAM. El aumento en el IAM se correlacionó significativamente con un período de sobrevida más corto. [PÁGINA 67]

Tabla de contenido

Capítulo 1 Introducción	13
1.1. Justificación y planteamiento del problema de investigación.....	13
1.2. Objetivos	16
Objetivo general.....	16
Objetivos específicos	16
1.3. Metodología	16
1.3.1. Análisis estadístico	17
1.4. Principales resultados obtenidos	18
Capítulo 2 Estado de la cuestión: consideraciones teóricas y antecedentes	20
2.1. La pérdida del control de la proliferación celular: un evento clave en el desarrollo de las neoplasias malignas.....	20
2.1.1. Ciclo celular.....	22
2.2. Carcinoma oral de células escamosas	24
2.2.1. Etiología, epidemiología y características clínico-patológicas del carcinoma oral de células escamosas.....	24
2.2.2. Graduación histopatológica del carcinoma oral de células escamosas.	27
2.2.3. Frente de invasión tumoral	29
2.3. Métodos de evaluación del grado de proliferación celular	29
2.3.1. Ki-67.....	31
2.3.2. Índice de actividad mitótica.....	36
Mitosis: figuras mitóticas normales y atípicas	36
2.3.3. Fosfohistona H3.....	39
Capítulo 3 Metodología	45
3.1. Consideraciones éticas	45
3.2. Diseño del estudio.....	45

3.3. Obtención de la muestra	46
3.3.1. Criterios de inclusión.....	46
3.3.2. Criterios de exclusión	47
3.4. Operacionalización de las variables.....	47
3.5. Revisión histológica y calibración	47
3.6. Índice de actividad mitótica.....	50
3.7. Procesamiento Inmunohistoquímico.....	52
3.8. Evaluación Inmunohistoquímica	54
3.8.1. Ki-67.....	54
3.8.2. PHH3	55
3.9. Análisis estadístico	57
3.9.1. Determinación del tamaño muestral	58
3.9.2. Calibración	58
3.10. Financiación.....	59
3.11. Declaración de conflicto de intereses	59
Capítulo 4 Resultados	60
4.1. Análisis descriptivo de las variables clínico-patológicas del carcinoma oral de células escamosas	60
4.2. Asociación entre las características clínico-patológicas y los biomarcadores Ki-67 y PHH3.....	60
4.3. Patrones de expresión de Ki-67 y PHH3	62
4.4. Análisis de sobrevida	65
Capítulo 5 Discusión.....	68
5.1. Limitaciones del estudio	74
Capítulo 6 Consideraciones finales	75
Referencias bibliográficas	77

Anexos	92
Anexo 1 Aprobación del Comité de Ética	93
Apéndices	94
Apéndice 1 Planilla electrónica	95

Capítulo 1 | Introducción

1.1. Justificación y planteamiento del problema de investigación

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es un tumor sólido maligno que se origina a partir del epitelio estratificado escamoso de la mucosa oral (Am et al., 2018; Leão et al., 2017; Speight & Farthing, 2018). Se caracteriza por presentar diferentes grados de diferenciación histológica y un elevado potencial invasivo y metastásico (Am et al., 2018; Leão et al., 2017; Speight & Farthing, 2018).

El COCE representa el cáncer más comúnmente diagnosticado en la región de cabeza y cuello, el sexto tumor maligno más frecuente a nivel mundial y el 95 % de todas las neoplasias malignas que se producen en la cavidad oral (Acero-mondragón & Rodríguez-farías, 2016; Almangush et al., 2020; Blatt et al., 2017; Chang et al., 2019; Farooq & Bugshan, 2020; Ghanizada, Jakobsen, Grønhøj, & von Buchwald, 2019; Lopes et al., 2017; Miranda Galvis et al., 2018; Padma, Sundaresan, Kalaivani, & Thilagavathi, 2019). Anualmente, en el mundo, son diagnosticados más de 300.000 nuevos casos de COCE y fallecen aproximadamente 128.000 personas por causa del mismo (Brockton et al., 2017; Chen, Hsiao, Chang, & Chang, 2021; Contreras-Ramírez, Donoso, Venegas, & Rivera, 2015; Majumdar, Patil, Sarode, Sarode, & Rao, 2017).

El COCE es una neoplasia agresiva con un comportamiento biológico impredecible y un pronóstico desfavorable (Gadbail et al., 2021; Lopes et al., 2017). La agresividad de esta neoplasia maligna se evidencia en que a pesar de las estrategias terapéuticas disponibles en la actualidad, que incluyen su extirpación quirúrgica, ya sea en forma exclusiva o en combinación con radioterapia, quimioterapia y/o inmunoterapia, la tasa de supervivencia y de recurrencia a los 5 años es deficiente, sobreviviendo solo el 50 % de los pacientes diagnosticados y tratados; situación que no ha mejorado en las últimas cinco décadas (Chaudhari, Shukla, Tamhane, Acharya, & Bhake, 2018; Ivina, Semkin, Khabadze, & Babichenko, 2019; Majumdar et al., 2017; Oliveira et al., 2015; Wunschel et al., 2021; Q. S. Xu et al., 2018; Z. Yang et al., 2019). De hecho, se constata a nivel mundial, un elevado número de fallecidos, aún en aquellos casos diagnosticados y tratados quirúrgicamente en un estadio temprano de la enfermedad (Rezazadeh, Ebrahimi, Andisheh-tadbir, Ashraf, & Khademi, 2017).

Con la finalidad de mejorar la baja tasa de supervivencia de los pacientes con COCE, una línea importante de investigación se encuentra abocada a la identificación de biomarcadores moleculares de valor pronóstico (Alicandri-ciuffelli, 2016; Almangush et al., 2017; Bartolomeo et al., 2016; Blatt et al., 2017; Jing et al., 2019; Z. Yang et al., 2019).

La proliferación celular es un proceso biológico esencial, clave en el crecimiento y conservación de la homeostasis tisular (Gadbail et al., 2021; Van Diest, Brugal, & Baak, 1998). Asimismo, la pérdida del control de este proceso, fue reconocido por Hanahan y Weinberg (2000, 2011) como un sello distintivo del cáncer (*Hallmark of Cancer*), debido a su rol fundamental en el desarrollo de las neoplasias malignas (Chitra, Boaz, N, Lewis, & K.s., 2019; Feitelson et al., 2016; Hanahan & Weinberg, 2011; Ladstein, Bachmann, Straume, & Akslen, 2012; Takkem et al., 2018).

De hecho, en varios tipos de cáncer humano, la evaluación de la proliferación celular se considera un parámetro histológico muy importante, tanto en la definición del comportamiento biológico tumoral, particularmente del potencial de recidiva local y metastásico, como en la determinación del pronóstico individualizado a cada paciente (Chitra et al., 2019). En este sentido, con la finalidad de poder cuantificar este parámetro en cada tumor en particular, se han desarrollado diferentes métodos y marcadores de proliferación, entre ellos, los más utilizados son el índice de actividad mitótica (IAM) y la inmunoexpresión de Ki-67, pero a ambos se les objeta el presentar una importante variabilidad intra e interobservador (Chitra et al., 2019; Khieu et al., 2019; J.-Y. Kim et al., 2017; Lea et al., 2021).

Sin embargo, en el COCE, la evaluación de la proliferación tumoral no forma parte del sistema de estadificación actual (Almangush et al., 2020). No obstante, constituye una línea de investigación, como tantas otras, justificada en parte por la pobre tasa de supervivencia que presentan los pacientes diagnosticados, aún en estadios tempranos de la enfermedad y por la necesidad de poder identificar aquellos casos que tienen un mayor riesgo de recurrencia (Gadbail et al., 2021; D. W. Kim et al., 2019; Takkem et al., 2018). Realidad que no ha mejorado en los últimos años, a pesar de los avances en las técnicas de diagnóstico y modalidades de tratamiento, que pone en cuestionamiento el sistema de estadificación vigente como responsable de tratamientos insuficientes o innecesarios, al no poder reflejar adecuadamente el comportamiento biológico de cada COCE en particular (Gadbail et al., 2021; D. W. Kim et al., 2019).

Si bien, hasta ahora no se ha podido determinar un panel de marcadores moleculares con valor pronóstico en el COCE; aquellos utilizados para evaluar la capacidad proliferativa tumoral son considerados por algunos autores como buenos candidatos, complementarios a la evaluación pronóstica basada en parámetros convencionales (Bhuyan, Sarangi, Das, Das, & Nayak, 2018; Takkem et al., 2018). En base a esta línea de investigación fue desarrollado este trabajo, con el objetivo principal de conocer el comportamiento del biomarcador PHH3 en el COCE, utilizando como parámetros de comparación el Ki-67 y el IAM.

El interés por el estudio del anticuerpo Fosfohistona H3 (PHH3), reconocido como un biomarcador de proliferación celular y específico de células en mitosis, surge luego de analizar la bibliografía, donde observamos que el mismo, en comparación con otros biomarcadores de proliferación celular, ha sido poco estudiado (Hao et al., 2018; Ramani, Taylor, Miller, Sowa-Avugrah, & May, 2015). Sin embargo, en los últimos años ha aumentado el número de investigaciones que lo tienen como objeto de estudio en diferentes tumores malignos, recalándose en algunas de ellas, ciertas ventajas de PHH3 como marcador de proliferación celular con respecto al Ki-67 (Khieu et al., 2019; J.-Y. Kim et al., 2017; Ohashi et al., 2018). Así, una de las principales características que lo destacan, es el presentar una inmunomarcación clara y bien contrastada, limitada a las células que se encuentran en la fase M del ciclo celular, mientras que las células en interfase no lo expresan o lo hacen mínimamente (Khieu et al., 2019; J.-Y. Kim et al., 2017; Ohashi et al., 2018). Además, estudios recientes han demostrado que la inmunocuantificación de este biomarcador tiene valor pronóstico en diferentes tumores malignos sólidos (Bedekovics et al., 2018; Chow et al., 2017; Hao et al., 2018; J.-Y. Kim et al., 2017; Laflamme et al., 2020; Olar, 2015; Siriweera & Zardawi, 2016). No obstante, el comportamiento de PHH3 en el COCE ha sido escasamente estudiado y particularmente su relación con la tasa de sobrevida, uno de los objetivos específicos de este trabajo, no ha sido hasta ahora objeto de investigación.

En cambio, en el COCE, a diferencia del anticuerpo PHH3, uno de los biomarcadores de proliferación celular que sí ha sido ampliamente estudiado es el Ki-67 (Ahmad et al., 2020; Bhuyan et al., 2018; Chaudhari et al., 2018; Cortegoso et al., 2017; Gadbaill et al., 2021; Jing et al., 2019; Padma et al., 2019; Takkem et al., 2018). Sin embargo, los estudios sobre el valor de la expresión de este biomarcador en la determinación de la

sobrevida de los pacientes con COCE han mostrado resultados contradictorios (Lopes et al., 2017; Xie et al., 2016).

En este contexto, es que surge nuestro principal objetivo de investigación, cuyo eje central es la evaluación del biomarcador PHH3 en el COCE, escasamente estudiado en esta patología. Para ello, utilizamos como parámetros de comparación, la inmunexpresión de Ki-67 y el IAM, dos clásicos en la determinación de la capacidad proliferativa de las neoplasias malignas.

1.2. Objetivos

Objetivo general

- Determinar y evaluar la inmunexpresión de la PHH3 en el COCE, a través de la correlación con la inmunexpresión de Ki-67, el IAM, la graduación histológica de la OMS, parámetros clínico-morfológicos y la tasa de sobrevida.

Objetivos específicos

- Identificar y localizar la expresión de los biomarcadores Ki-67 y PHH3 en el COCE.
- Correlacionar entre sí la inmunexpresión positiva de los biomarcadores Ki-67 y PHH3 en el COCE.
- Correlacionar la inmunexpresión positiva de los biomarcadores con los parámetros clínico-morfológicos del COCE.
- Correlacionar el IAM con la inmunexpresión de Ki-67 y PHH3.
- Correlacionar la inmunexpresión positiva de los biomarcadores con la sobrevida de los pacientes.

1.3. Metodología

Se realizó un estudio descriptivo, retrospectivo y transversal, tanto para la identificación y localización de los biomarcadores objeto de estudio, como para la correlación de estos con el IAM y los parámetros clínicos-morfológicos del COCE. En cambio, para el análisis de la tasa de sobrevida en relación a la inmunexpresión de Ki-67 y PHH3, el diseño del estudio fue longitudinal y analítico.

La muestra estuvo constituida por 62 COCE diagnosticados en el Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la UdelaR, en el período comprendido entre enero de 2007 y diciembre de 2015. El tipo de muestreo fue no probabilístico por conveniencia.

En este trabajo las variables independientes consideradas fueron: a) graduación histológica del COCE según la clasificación propuesta por la OMS (2017); b) paciente vivo o muerto, en este último caso se consideró el tiempo de sobrevida desde el momento del diagnóstico histológico; c) edad; d) género y e) localización topográfica agrupada. Mientras que el IAM, el índice de expresión de Ki-67 y el índice de expresión de PHH3 fueron las variables dependientes.

Se realizó el procesamiento inmunohistoquímico (IHQ) para los anticuerpos Ki-67 y PHH3 (serina 10). Las láminas histológicas, tanto de hematoxilina-eosina (H-E) para la determinación del IAM, como de IHQ para los biomarcadores Ki-67 y PHH3, fueron digitalizadas previo a su análisis. Para la cuantificación de las variables dependientes se utilizó el software *Image J*.

1.3.1. Análisis estadístico

El análisis estadístico consistió en la comparación de la expresión de los marcadores considerados mediante estadísticas descriptivas (medias y desvío estándar), para las variables continuas y distribución de frecuencias para las variables categóricas. Para comparar la expresión de los marcadores según sexo, edad, localización y grado histológico, cuando se trataron de dos grupos, se utilizó la comparación de medias basada en la Prueba *t* de Student para muestras independientes. Asimismo, en los casos donde se compararon tres o más grupos, se empleó el modelo de Análisis de Varianza (ANOVA) (Anscombe, 1948).

Adicionalmente se confeccionaron diagramas de dispersión para indagar sobre el grado de correlación lineal entre las tres variables dependientes, calculando en cada caso el coeficiente de correlación lineal de Pearson. El análisis de sobrevida se llevó a cabo mediante la confección de curvas de sobrevida, construidas siguiendo la metodología de Kaplan y Meier (1958), mientras que las comparaciones de las mismas se realizaron mediante el modelo de Cox (1972).

Todas las pruebas se llevaron a cabo con un nivel de significación del 5 %. El análisis se realizó mediante el paquete estadístico R (R Core Team, 2019), en particular el análisis

de sobrevida, se llevó a cabo a través de los procedimientos incluidos en la librería survival (Emura, Matsui, & Rondeau, 2000).

1.4. Principales resultados obtenidos

En este trabajo pudimos identificar una relación estadísticamente significativa entre el grado histológico del COCE y la inmunoexpresión de Ki-67 (p 0,004). Así, en los COCE bien diferenciados se observó una menor expresión de Ki-67 (media 28,97), elevándose en los COCE moderadamente diferenciados (media 41,27) y alcanzando la mayor expresión en los COCE pobremente diferenciados (media 43,37). Sin embargo, con el biomarcador PHH3 no se halló una relación similar (p 0,564). Tampoco se pudo demostrar una correlación estadísticamente significativa entre los biomarcadores estudiados y las variables independientes, sexo, edad y localización.

Al correlacionar las variables Ki-67 y PHH3, registramos una relación significativa (p 0,041) entre ellos. En general, el grado de expresión del anticuerpo PHH3 fue marcadamente menor que el de Ki-67, con una media de 1,34 (DE 0,62) y 38,14 (DE 14,44) respectivamente. Adicionalmente, el anticuerpo PHH3 se caracterizó porque además de presentar un rango estrecho de inmunomarcación, la intensidad de la tinción fue fuerte y se correlacionó positivamente con la morfología de los núcleos según las diferentes etapas de la mitosis. En cambio, el anticuerpo Ki-67 demostró un rango de expresión amplio, con patrones e intensidad de tinción variable y en algunos casos, además, se observó inmunoexpresión positiva por parte de células estromales.

Al analizar la relación entre los biomarcadores y el IAM, no se encontró suficiente evidencia que indique una correlación significativa con el Ki-67 (p 0,194). En cambio, en función del coeficiente de correlación calculado (r 0,450), con un p -valor $< 0,001$, sí se observó una asociación estadísticamente significativa entre el IAM y la PHH3. Además, como se describe en la bibliografía, con respecto a la determinación del IAM en láminas de H-E; el anticuerpo PHH3 nos permitió identificar más fácilmente las figuras mitóticas (FM) positivas y los campos con mayor densidad mitótica, pudiendo por lo tanto constatar su rol como marcador específico de mitosis.

En cuanto al análisis de sobrevida, se observó el evento de fallecimiento en 48 pacientes, el tiempo mediano de sobrevida global estimado fue de 1,51 años (0,92; 2,69) y la tasa de sobrevida a los cinco años, sin considerar el estadio de la enfermedad, fue del 27 % (0,18; 0,41).

Asimismo, del estudio de la posible asociación entre cada marcador (Ki-67, PHH3 e IAM) y la sobrevida de los pacientes, de forma bivariada y multivariada, observamos una asociación significativa entre el tiempo de sobrevida y la expresión de PHH3 (p 0,016). También registramos una relación significativa y similar con el IAM (p 0,031), constatándose que, a mayores valores de este, así como de la inmunexpresión de PHH3, menor es el tiempo de sobrevida. En cambio, para el KI-67, no se encontró asociación estadísticamente significativa (p 0,295) con la sobrevida.

Este trabajo está organizado en seis capítulos. Primeramente, capítulo 1, la presente *Introducción*. En el capítulo 2, *Estado de la cuestión: consideraciones teóricas y antecedentes*, se fundamenta la importancia de la pérdida del control de la proliferación celular como un sello distintivo de la transformación neoplásica y en ese contexto, como marcadores de la capacidad proliferativa tumoral, son presentadas las variables dependientes de este estudio: PHH3, Ki-67 e IAM. También se define al COCE y se describen sus rasgos principales en cuanto a etiología, epidemiología, características clínico-patológicas y graduación histológica. En el capítulo 3, *Metodología*, se detalla el diseño metodológico empleado para la ejecución de este trabajo de investigación. En el capítulo 4, *Resultados*, son presentadas las principales observaciones y asociaciones con valor estadístico obtenidas. En el capítulo 5, *Discusión*, son analizados los resultados de nuestro trabajo, en base a los obtenidos por investigaciones previamente publicadas y fundamentos teóricos planteados. También se formulan las principales limitaciones de la investigación. Finalmente, en el capítulo 6, *Consideraciones finales*, se destacan los principales conceptos y resultados; en particular, el estudio del biomarcador PHH3 en el COCE y su correlación con la sobrevida, tópico original de este trabajo.

Capítulo 2 | Estado de la cuestión: consideraciones teóricas y antecedentes

Este capítulo describe el marco conceptual que fundamenta el estudio de los biomarcadores Ki-67 y PHH3 en el COCE. En primer lugar, se realizan algunas consideraciones sobre la pérdida de control de la proliferación celular como un evento clave en el desarrollo de las neoplasias malignas (§ 2.1). Además, con el fin de conceptualizar a los biomarcadores estudiados y al IAM como indicadores del grado de proliferación celular, se repasan los conceptos principales del ciclo celular (2.1.1). En segundo lugar, se exponen las características fundamentales del COCE (§ 2.2); en un primer apartado se describen las principales consideraciones en cuanto a su etiología, epidemiología y características clínico-patológicas (2.2.1) y en un segundo apartado, se detallan los criterios definidos por la OMS (2017) para su graduación histopatológica (2.2.2). En tercer lugar, se realizan algunas consideraciones generales sobre los métodos de evaluación de la proliferación celular (§ 2.3), en particular se desarrollan las características que definen, fundamentan y limitan la utilización del Ki-67 (2.3.1), del IAM (2.3.2) y de la PHH3 (2.3.3) en las neoplasias malignas, específicamente en el COCE.

2.1. La pérdida del control de la proliferación celular: un evento clave en el desarrollo de las neoplasias malignas

El cáncer es una enfermedad que ha estado presente en el transcurso de la historia de humanidad (Molina Romero, Laserna Mendieta, Varo Sánchez, Alonso-Cerezo, & Orera Clemente, 2018). Con el devenir de los años, debido a la mejora en la esperanza de vida del ser humano, su prevalencia ha aumentado progresivamente, transformándose en un problema de salud pública a nivel mundial y un desafío importante para la medicina moderna (Hao et al., 2018; Molina Romero et al., 2018).

Los diferentes tipos de cáncer humano son el resultado de la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas, responsables del comportamiento biológico maligno, debido a que modifican vías de señalización específicas, implicadas en el desarrollo y en el establecimiento de las características fenotípicas tumorales (Butler, Mackay, Denniston, & Daley, 2016; Hanahan & Weinberg, 2011; Rivera & Venegas, 2014; Sasahira & Kirita, 2018). Este proceso de múltiples pasos, fue resumido por Hanahan y Weinberg (2000, 2011) en los denominados “Sellos distintivos del cáncer” (*Hallmarks of cancer*), clasificación que intenta englobar el conjunto de características y eventos comunes a los diferentes tipos de cáncer, que determinan su comportamiento, crecimiento y capacidad

metastásica (Butler et al., 2016; Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2000, 2011; Rivera & Venegas, 2014; Sasahira & Kirita, 2018).

La misma ha sido modificada por sus autores con el devenir del conocimiento científico (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2000, 2011). Actualmente incluye diez características, de las cuales se tipifican como distintivas en el desarrollo del cáncer: a) la autosuficiencia en el mantenimiento de la señalización proliferativa, b) la capacidad para evadir los mecanismos supresores del crecimiento tumoral, c) el poder para resistir la muerte celular, d) el presentar inmortalidad replicativa, e) la capacidad para inducir de forma sostenida la angiogénesis, f) la capacidad de invasión y metástasis, g) la capacidad de reprogramación del metabolismo energético celular y h) la facultad por parte de las células tumorales de poder evadir de forma activa la respuesta inmune del huésped (Butler et al., 2016; Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2000, 2011; Rivera & Venegas, 2014; Sasahira & Kirita, 2018).

Como estas características distintivas por si solas no abarcan todos los mecanismos moleculares y celulares precisos que permiten el desarrollo tumoral y progresión maligna, se incluyen en la clasificación otras dos, denominadas habilitadoras: i) la inestabilidad genómica y j) el contexto inflamatorio desencadenado por el sistema inmune del huésped en respuesta al tumor (Butler et al., 2016; Hanahan & Weinberg, 2000, 2011; Sasahira & Kirita, 2018). No obstante, recientemente Hanahan (2022), en una nueva revisión, plantea cuatro características adicionales emergentes que podrían ser incluidas a este modelo: k) desbloqueo de la plasticidad fenotípica, l) reprogramación epigenética no mutacional, ll) microbiomas polimórficos y m) células senescentes. Las cuales, al igual que las anteriores, son características presentes en la carcinogénesis de los diferentes tipos de tumores malignos del cuerpo humano (Hanahan, 2022). En la figura 1 son esquematizados los sellos distintivos del cáncer anteriormente enumerados.

La proliferación celular es un proceso biológico fundamental, altamente regulado, clave en el crecimiento y desarrollo, así como en el mantenimiento de la homeostasis tisular (Gadbail et al., 2021; Van Diest et al., 1998; Watanabe et al., 2010). Como ha sido anteriormente establecido, la pérdida del control de este proceso, es reconocido como un característica distintiva del cáncer, esencial en el desarrollo y en la progresión de las neoplasias malignas (Bhuyan et al., 2018; Chitra et al., 2019; Dantas et al., 2021; Feitelson et al., 2016; Hanahan & Weinberg, 2011; Ladstein et al., 2012; Marangon Junior et al., 2018; Takkem et al., 2018).

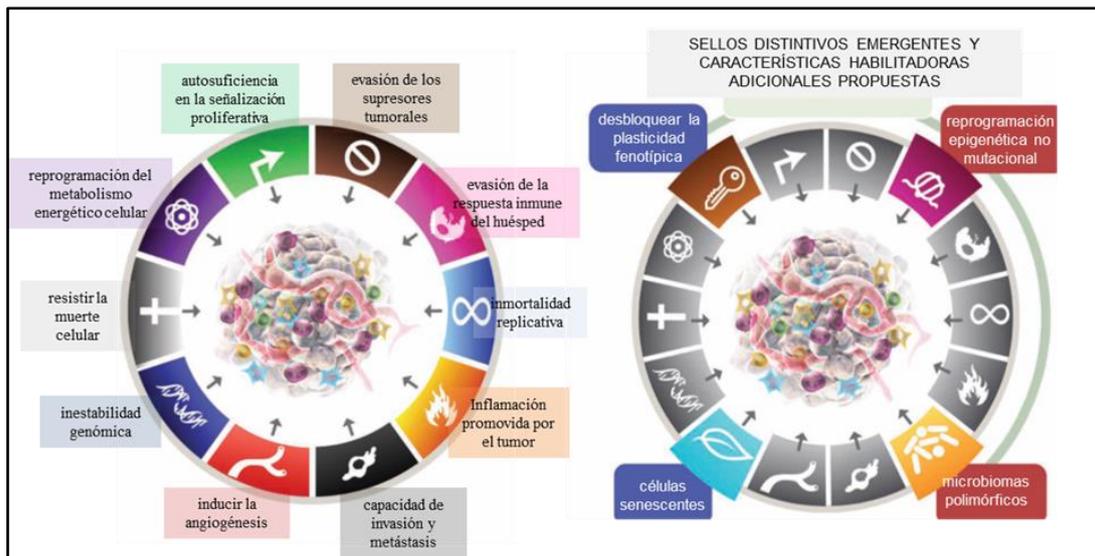


FIGURA 1. Sellos distintivos del cáncer. A la izquierda, las características distintivas y habilitadoras del cáncer descritas por Hanahan y Weinberg (2011). A la derecha, esquema que incorpora los sellos distintivos emergentes y características habilitadoras adicionales propuestas por Douglas Hanahan (2022). Adaptado de Hanahan, D. (2022). Hallmarks of cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46.

De hecho, en oncología, para el estudio, diagnóstico y tratamiento de diferentes neoplasias malignas, se utiliza el grado de proliferación celular como un parámetro importante, que refleja el comportamiento biológico, condiciona el pronóstico y define el plan de tratamiento individualizado a cada paciente en particular (J.-Y. Kim et al., 2017; Siriweera & Zardawi, 2016; Sudarshini et al., 2018; Watanabe et al., 2010; Xie et al., 2016). Para su valoración, se han identificado diferentes antígenos moleculares, que al ser expresado por las células en proliferación activa — aquellas que se encuentran transcurriendo por las fases G₁, S, G₂ y M del ciclo celular — pueden ser utilizados como potenciales biomarcadores predictores de la proliferación sostenida (Blatt et al., 2017).

A continuación, se describen los conceptos fundamentales del ciclo celular, esenciales para poder conceptualizar a los biomarcadores Ki-67, PHH3 y al IAM como indicadores del grado de proliferación celular.

2.1.1. Ciclo celular

Las células neoplásicas malignas presentan alteraciones en los mecanismos de control y regulación del ciclo celular, responsables de la proliferación celular descontrolada y la replicación excesiva del ADN (Feitelson et al., 2016; Williams & Stoeber, 2012). Por consiguiente, la pérdida del control del ciclo celular por parte de las células tumorales

ocasiona mayor inestabilidad genómica y promueve nuevas mutaciones (Feitelson et al., 2016; Williams & Stoeber, 2012).

El ciclo celular es definido como la serie de eventos moleculares secuenciales que tienen lugar en una célula y que conducen a su división en dos células hijas (Bavle, 2014; Eastman & Guo, 2020). Con el fin de preservar la integridad genética, al tiempo que aumenta el número de células, la progresión del ciclo celular es altamente regulada (Eastman & Guo, 2020; Feitelson et al., 2016).

Como se puede observar en la figura 2, el ciclo celular se encuentra constituido por cuatro fases secuenciales, G_1 , S, G_2 y M, siendo las más importantes, la fase S donde se produce la replicación del ADN y la fase M donde la célula se divide en dos células hijas (Bavle, 2014; Eastman & Guo, 2020; Williams & Stoeber, 2012). Durante la fase G_1 , que precede a la fase S, la célula aumenta de tamaño y se caracteriza por ser el único período del ciclo celular, donde la misma es sensible a señales de crecimiento externas, tanto positivas como negativas (Bavle, 2014; Eastman & Guo, 2020; Feitelson et al., 2016; Williams & Stoeber, 2012). Mientras que en la fase G_2 , instancia posterior a la fase S, la célula se prepara para entrar en el proceso de mitosis (Bavle, 2014; Eastman & Guo, 2020; Feitelson et al., 2016; Williams & Stoeber, 2012).

Las fases G_1 , S y G_2 constituyen el período de síntesis del ciclo celular, también llamado interfase, durante el cual el ADN se replica y el resto de los componentes celulares se producen en cantidades suficientes, para poder satisfacer las necesidades de las dos células hijas resultantes (Mcintosh, 2016). Todos los elementos sintetizados durante la interfase, son reorganizados durante la fase M, de forma tal, que después de la citocinesis, cada una de las células hijas se encuentren completamente dotadas de los elementos necesarios para crecer y dividirse nuevamente (Bavle, 2014; Eastman & Guo, 2020; Mcintosh, 2016)

Después de la fase M, cada célula hija puede pasar a la fase G_1 (reiniciando un nuevo ciclo celular) o abandonar el ciclo en forma reversible o irreversible. Así, G_0 representa un estado de quiescencia, en el que las células se han retirado reversiblemente del ciclo de división celular, en respuesta a una alta densidad celular o a la privación de mitógenos (Bavle, 2014; Eastman & Guo, 2020; Williams & Stoeber, 2012). Alternativamente, las células pueden retirarse irreversiblemente del ciclo celular, al adquirir un estado de diferenciación terminal o senescente (Williams & Stoeber, 2012). La progresión a través

del ciclo celular es impulsada por la familia de quinasas dependientes de ciclina y sus reguladores, las ciclinas (Feitelson et al., 2016; Williams & Stoeber, 2012).

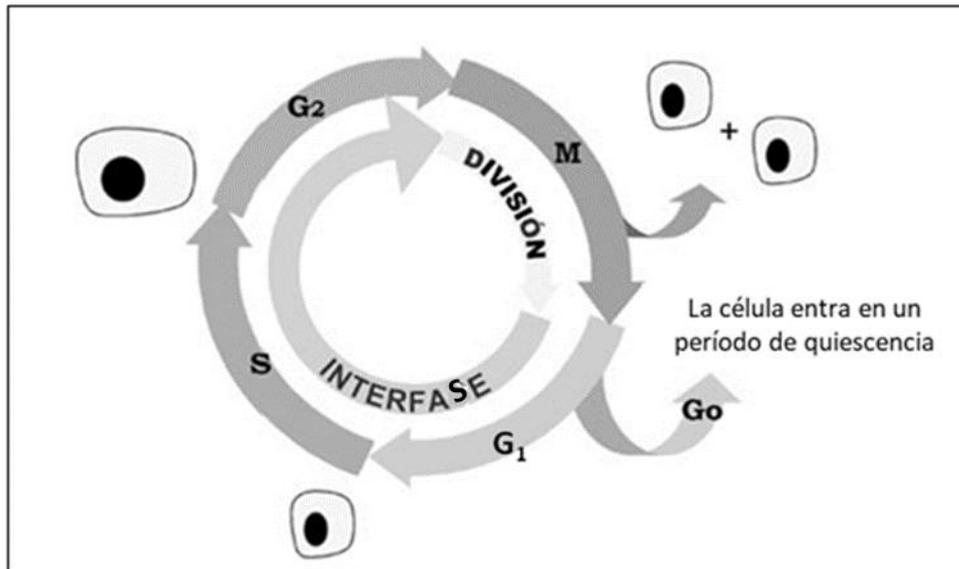


FIGURA 2. Ciclo celular de una célula eucariota normal. Durante la interfase la célula crece continuamente, durante la fase M se divide. La replicación del ADN se produce durante la fase S. Adaptado de Lomanto, L., Ortiz, O., Bretón, C., Gomez, Á., & Mesa, V. (2003). El ciclo celular. *Medunab*, 6 (16), 21–29.

2.2. Carcinoma oral de células escamosas

El COCE es un tumor sólido maligno que se origina a partir del epitelio estratificado escamoso de la mucosa oral (Am et al., 2018; Leão et al., 2017; Speight & Farthing, 2018). Se caracteriza por presentar diferentes grados de diferenciación histológica y un elevado potencial invasivo y metastásico (Am et al., 2018; Leão et al., 2017; Speight & Farthing, 2018).

2.2.1. Etiología, epidemiología y características clínico-patológicas del carcinoma oral de células escamosas

El COCE representa el cáncer más comúnmente diagnosticado en la región de cabeza y cuello, el sexto tumor maligno más frecuente a nivel mundial y el 95% de todas las neoplasias malignas que se producen en la cavidad oral (Acero-mondragón & Rodríguez-farías, 2016; Almangush et al., 2020; Blatt et al., 2017; Chang et al., 2019; Farooq & Bugshan, 2020; Ghanizada et al., 2019; Lopes et al., 2017; Miranda Galvis et al., 2018; Padma et al., 2019). Anualmente, en el mundo, son diagnosticados más de 300.000 nuevos casos de COCE y fallecen aproximadamente 128.000 personas por causa del mismo

(Brockton et al., 2017; Chen et al., 2021; Contreras-Ramírez et al., 2015; Majumdar et al., 2017).

El COCE es una neoplasia agresiva con un comportamiento biológico impredecible y un pronóstico desfavorable (Gadbail et al., 2021; Lopes et al., 2017). La agresividad de esta neoplasia maligna se evidencia en que a pesar de las estrategias terapéuticas disponibles en la actualidad, que incluyen su extirpación quirúrgica, ya sea en forma exclusiva o en combinación con radioterapia, quimioterapia y/o inmunoterapia, la tasa de supervivencia y de recurrencia a los 5 años es deficiente, sobreviviendo solo el 50 % de los pacientes diagnosticados y tratados; situación que no ha mejorado en las últimas cinco décadas (Chaudhari et al., 2018; Ivina et al., 2019; Majumdar et al., 2017; Oliveira et al., 2015; Wunschel et al., 2021; Q. S. Xu et al., 2018; Z. Yang et al., 2019). De hecho, se constata a nivel mundial, un elevado número de fallecidos, aún en aquellos casos diagnosticados y tratados quirúrgicamente en un estadio temprano de la enfermedad (Rezazadeh et al., 2017).

La etiología del COCE es multifactorial, siendo considerados como los principales factores de riesgo en la carcinogénesis oral, el tabaco y el alcohol (Chaudhari et al., 2018; Chen et al., 2021; dos Santos Costa et al., 2018; Gatoó & Dar, 2018). Aproximadamente el 75 al 90 % de los COCE se encuentran asociados al uso de tabaco (Gatoó & Dar, 2018). De hecho, los pacientes que consumen tabaco, tienen 20 a 40 veces más riesgo de desarrollar una neoplasia maligna de cabeza y cuello, que aquellos pacientes que no asocian este hábito (Gatoó & Dar, 2018). Otros factores de riesgos que han sido vinculados a la etiología del COCE son: el virus del papiloma humano (subtipos 16 y 18), las dietas pobres en frutas y verduras, la higiene bucal deficiente y la masticación de la nuez de betel (Ahmad et al., 2020; Am et al., 2018; Gatoó & Dar, 2018; Holmes & Wenig, 2019; Leite et al., 2018; Rivera & Venegas, 2014). Asimismo, para el COCE de labio, el principal factor de riesgo es la exposición a la luz ultravioleta (Am et al., 2018; Leite et al., 2018).

El COCE es más prevalente en el sexo masculino — probablemente, debido a una mayor exposición a factores de riesgo —. Además, su incidencia aumenta con la edad, presentándose con mayor frecuencia después de la quinta década de la vida (Ahmad et al., 2020; dos Santos Costa et al., 2018; Kang, Kiess, & Chung, 2015; Leite et al., 2018; Rivera & Venegas, 2014). Sin embargo, aproximadamente el 0,4 al 3,6 % de los COCE ocurren en pacientes jóvenes (menores de 40 años) (dos Santos Costa et al., 2018;

Miranda Galvis et al., 2018). De hecho, es destacar que se observa a nivel mundial, una tendencia al alza de la incidencia de esta enfermedad en este grupo etario (dos Santos Costa et al., 2018; Miranda Galvis et al., 2018; Pereira, Barroso, Nonaka, Pinto, & de Souza, 2016; Thomson, 2018). En la población joven la evidencia sugiere que los factores de riesgos tradicionales tienen menos peso, siendo más importante la predisposición genética y la influencia de factores nutricionales y biológicos, como la infección por el virus del papiloma humano, especialmente del subtipo 16 (Holmes & Wenig, 2019; Leite et al., 2018; Miranda Galvis et al., 2018; Oliveira et al., 2015).

Si bien, el COCE se puede desarrollar en cualquier sitio de la cavidad bucal, se topografía con mayor frecuencia en bordes laterales de lengua y piso de boca (Kintawati & Pramesti, 2019; Leite et al., 2018; Rodrigues et al., 2020). Con menor regularidad se presenta en encía, reborde alveolar, trígono retromolar y mucosa yugal (Z. Yang et al., 2019).

El pronóstico del COCE se relaciona a parámetros clínicos e histopatológicos, como el tamaño tumoral, la presencia de ganglios linfáticos metastásicos, el grado de diferenciación tumoral, la invasión de estructuras adyacentes, la localización y el tratamiento realizado (Almangush et al., 2020; Chang et al., 2019; González & Beovide, 2020; Majumdar et al., 2017). El sistema de estadificación TNM del inglés TNM Staging System, donde T significa tamaño o extensión del tumor primario, N compromiso de ganglios linfáticos regionales y M presencia de metástasis a distancia, es un método universal de estadificación de la enfermedad del paciente con cáncer y constituye un factor pronóstico importante para la toma de decisiones terapéuticas (González & Beovide, 2020; Oliveira et al., 2015; Steigen et al., 2020; Sundermann, Uhlmann, Hoffmann, Freier, & Thiele, 2018; Wunschel et al., 2021).

Morfológicamente el COCE se observa como una proliferación neoplásica epitelial maligna, conformada por nidos, cordones e islotes que invaden el conjuntivo y que recuerdan en mayor o menor grado al epitelio escamoso de la mucosa de origen (El-Naggar, Takata, Slootweg, Chan, & Grandis, 2017; González & Beovide, 2020; Speight & Farthing, 2018). Actualmente la graduación histopatológica del COCE se realiza en base a la clasificación histológica de la OMS y al frente de invasión tumoral (El-Naggar et al., 2017; González & Beovide, 2020).

2.2.2. Graduación histopatológica del carcinoma oral de células escamosas

La Clasificación de tumores de cabeza y cuello de la OMS en su cuarta edición (2017), mantiene para el COCE la clasificación histopatológica que utiliza como criterio de tipificación el grado de semejanza observado entre el parénquima tumoral y el epitelio escamoso oral de origen (Almangush et al., 2020; El-Naggar et al., 2017; Speight & Farthing, 2018; B. Xu et al., 2021). En función de la cual, la OMS reconoce tres variantes histopatológicas en el COCE: bien diferenciado, moderadamente diferenciado y pobremente diferenciado (Almangush et al., 2020; El-Naggar et al., 2017; Speight & Farthing, 2018; B. Xu et al., 2021). Broders en 1920 definió los parámetros que guían esta clasificación, considerando como tales: grado de queratinización, atipia cito-nuclear y patrón infiltrativo (Almangush et al., 2020; El-Naggar et al., 2017; Speight & Farthing, 2018).

Si bien, la OMS continúa utilizando esta clasificación histopatológica basada en criterios clásicos, reconoce que la misma por sí sola no ofrece una buena correlación pronóstica (Almangush et al., 2020). Con la finalidad de mejorar su precisión predictiva, se han evaluado parámetros histológicos adicionales como el grosor del tumor, el patrón de crecimiento, la graduación del frente invasivo tumoral, la gemación del tumor (grupos invasores de cuatro o menos células tumorales en el frente invasivo) y la profundidad de invasión (DOI) (Almangush et al., 2020; Wunschel et al., 2021). Este último, ha sido incluido en el sistema TNM actual (octava edición) para tumores malignos de la cavidad oral (Almangush et al., 2020; Chang et al., 2019; Mupparapu & Shanti, 2018; Rodrigues et al., 2020; Steigen et al., 2020; Tirelli et al., 2018; Wunschel et al., 2021).

2.2.2.1. Carcinoma oral de células escamosas bien diferenciado

Se clasifica como un COCE bien diferenciado, aquel conformado por un parénquima tumoral constituido por células escamosas poliédricas con desmosomas evidentes, ostensible estratificación, marcada producción de queratina y mínimo pleomorfismo celular y nuclear (Am et al., 2018; Chaudhari et al., 2018; Speight & Farthing, 2018; B. Xu et al., 2021). Las células tumorales se disponen en islas de diferentes formas y tamaños, siendo característica la presencia de un estrato basal semejante al del epitelio normal delimitando cada una de ellas (Am et al., 2018; Chaudhari et al., 2018; Speight & Farthing, 2018; B. Xu et al., 2021).

Con frecuencia, en el COCE bien diferenciado, se observa en el centro de los nidos tumorales, acúmulos arremolinados de queratina, denominados perlas de queratina o cebolletas córneas (Am et al., 2018; Chaudhari et al., 2018; Speight & Farthing, 2018; B. Xu et al., 2021). Cada una de ellas, se encuentra constituida por células escamosas de citoplasma eosinófilo y núcleo picnótico o en proceso de cariólisis (Am et al., 2018; Chaudhari et al., 2018; B. Xu et al., 2021). Otra característica que define al COCE bien diferenciado, es la presencia de un patrón de invasión cohesivo, constituido por grandes proyecciones ramificadas de epitelio neoplásico que penetran en el tejido conectivo subyacente (Speight & Farthing, 2018).

2.2.2.2. Carcinoma oral de células escamosas moderadamente diferenciado

Los COCE moderadamente diferenciados muestran un mayor grado de atipia celular, con menor grado de queratinización; las cebolletas córneas son infrecuentes, no así la queratinización individual (Am et al., 2018; Chaudhari et al., 2018; Speight & Farthing, 2018; B. Xu et al., 2021). Asimismo, suelen presentar un frente invasivo menos cohesivo, constituido por cordones de células tumorales que infiltran de forma difusa los tejidos subyacentes (Am et al., 2018; Chaudhari et al., 2018; Speight & Farthing, 2018; B. Xu et al., 2021).

La atipia citológica, con pleomorfismo nuclear y celular, núcleos hipercromáticos y nucleolos prominentes, siempre está presente en el COCE moderadamente diferenciado, pudiendo incluso llegar a ser muy importante (Am et al., 2018; Chaudhari et al., 2018; Speight & Farthing, 2018; B. Xu et al., 2021). Además, con frecuencia, se observan mitosis atípicas (Am et al., 2018; Chaudhari et al., 2018; B. Xu et al., 2021).

2.2.2.3. Carcinoma oral de células escamosas pobremente diferenciado

El COCE pobremente diferenciado presenta escasa semejanza con el epitelio escamoso normal, pero aún es posible reconocer la naturaleza epitelial de las células que constituye el parénquima tumoral (Speight & Farthing, 2018). Suele mostrar una atipia celular considerable, con marcado pleomorfismo celular y nuclear (Chaudhari et al., 2018; Speight & Farthing, 2018).

En el COCE pobremente diferenciado se observa un patrón de invasión no cohesivo, conformado por finos cordones, pequeñas islas y células individuales que infiltran ampliamente el tejido conectivo (Speight & Farthing, 2018). Adicionalmente, las figuras

mitóticas son prominentes y muchas de ellas atípicas (Chaudhari et al., 2018; Speight & Farthing, 2018)

Dentro del espectro constituido por el grado de diferenciación, en el peor extremo, se ubica el COCE indiferenciado o anaplásico (Speight & Farthing, 2018). Esta denominación se utiliza para tipificar aquellos tumores constituidos por un parénquima tumoral cuya naturaleza epitelial no es posible identificar en láminas histológicas teñidas con H-E, siendo necesario la realización de técnicas de IHQ para tipificar la lesión (Speight & Farthing, 2018).

2.2.3. Frente de invasión tumoral

El frente de invasión tumoral (FIT) corresponde al área más profunda del tumor, donde se observa la invasión de los tejidos circundantes (Rivera & Venegas, 2014). Las células del FIT tienen características moleculares diferentes en comparación con las que constituyen las áreas superficiales, siendo considerado como el área más representativa del tumor (Rivera & Venegas, 2014). Morfológicamente, el FIT refleja diversas interacciones moleculares que son cruciales para la progresión del cáncer: aumento de la angiogénesis, alteración de las moléculas de adhesión, sobreproducción de enzimas que degradan la matriz extracelular y aumento de la expresión de proteínas relacionadas con la proliferación celular (M Bryne, 1998; Magne Bryne, Koppang, Lilleng, & Kjørheim, 1992; Cortegoso et al., 2017).

El FIT se tipifica en función de cuatro características histológicas: grado de queratinización, pleomorfismo nuclear, infiltración linfocítica y patrón de invasión (PI) (M Bryne, 1998). De estos, el PI se considera un buen factor pronóstico (Chitra et al., 2019; Rivera & Venegas, 2014).

2.3. Métodos de evaluación del grado de proliferación celular

Frente al diagnóstico de una neoplasia maligna, es fundamental poder establecer su pronóstico, definido en tiempo de sobrevida y sobrevida libre de recidiva; así como el mejor plan terapéutico para cada caso en particular (Hao et al., 2018). Actualmente, el pronóstico y el plan de tratamiento del paciente diagnosticado con COCE se establecen en función de parámetros clínicos e histopatológicos (Almangush et al., 2020; Chang et al., 2019; Majumdar et al., 2017).

Con la finalidad de mejorar la baja tasa de supervivencia de los pacientes con COCE, una línea importante de investigación, se encuentra abocada a la identificación de biomarcadores moleculares de valor pronóstico (Alicandri-ciuffelli, 2016; Almangush et al., 2017; Bartolomeo et al., 2016; Blatt et al., 2017; Jing et al., 2019; Z. Yang et al., 2019). Los mismos, deben tener la capacidad para predecir el comportamiento del tumor y contribuir al manejo clínico efectivo de la enfermedad (Alicandri-ciuffelli, 2016; Almangush et al., 2017; Bartolomeo et al., 2016; Blatt et al., 2017; Jing et al., 2019; Z. Yang et al., 2019).

De acuerdo con la definición de la OMS, un biomarcador es una sustancia, estructura o proceso, que debe reunir dos características fundamentales: el ser medible y el poder de predecir en mayor o menor grado el curso o la incidencia de una enfermedad (Molina Romero et al., 2018). En las últimas tres décadas se han desarrollado más de 100 biomarcadores IHQ de valor pronóstico para el COCE, siendo los más estudiados: p53, Ki-67, p16, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y ciclina D₁ (Almangush et al., 2017). En la figura 3 son presentados los biomarcadores más estudiados en el COCE de lengua.

La evidencia científica actual define al grado de proliferación celular como un indicador de la agresividad biológica tumoral, fundamento que sustenta la utilización de biomarcadores inmunohistoquímicos de proliferación para la determinación del pronóstico individual y la definición del protocolo terapéutico más adecuado a cada paciente en particular (Bhuyan et al., 2018; Chitra et al., 2019; Gadbaill et al., 2021; Lopes et al., 2017; Xie et al., 2016). Los marcadores de proliferación utilizados para la determinación del pronóstico tumoral son clasificados en tres categorías principales en función de los distintos eventos asociados al fenómeno proliferativo: 1) marcadores de fracción de crecimiento; 2) marcadores específicos de fase del ciclo celular y 3) marcadores de tiempo del ciclo celular, que miden la velocidad a que tienen lugar la proliferación (Gonzalez-Moles, Ruiz-Avila, Gil-Montoya, Esteban, & Bravo, 2010). Como los mismos evalúan diferentes aspectos del mismo fenómeno, se considera que no tienen todos el mismo significado biológico (Gonzalez-Moles et al., 2010).

En este sentido, en los tumores malignos, el grado de proliferación celular es habitualmente establecido a través de la inmunomarcación de Ki-67 y del IAM, sin embargo, ambos métodos presentan limitaciones de reproducibilidad, lo que representa un problema en su utilización (Khieu et al., 2019; J.-Y. Kim et al., 2017; Lea et al., 2021)

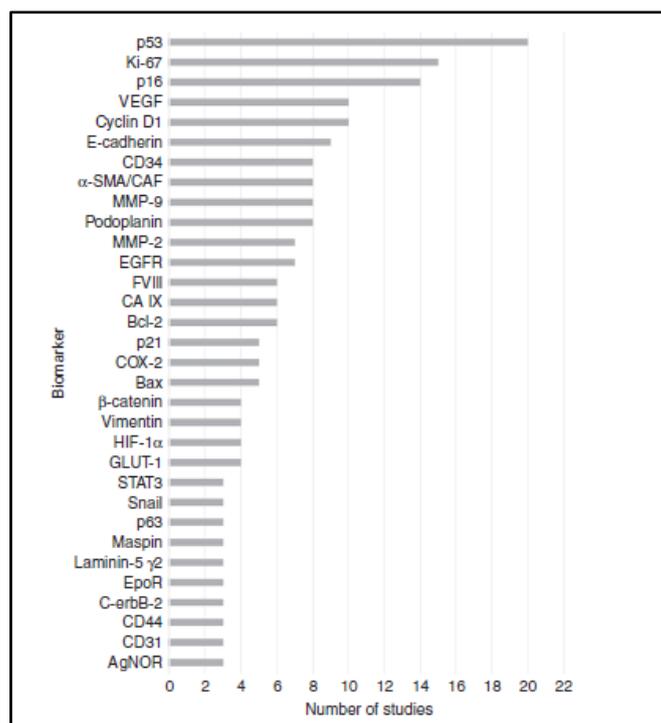


FIGURA 3. En esta imagen se muestran los biomarcadores considerados de valor pronóstico en el COCE de lengua que han sido objeto de estudio en tres o más publicaciones. Adaptado de Almagush, A., Heikkinen, I., Mäkitie, A. A., Coletta, R. D., Läärä, E., Leivo, I., & Salo, T. (2017). Prognostic biomarkers for oral tongue squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 117(6), 856–866.

2.3.1. Ki-67

El antígeno Ki-67, codificado por el gen *MKI67* (10q26.2), es una proteína nuclear no histonal que se presenta unida al ADN (Cuylen et al., 2016; Dias et al., 2021; Gadbaill et al., 2021; Jing et al., 2019; Li, Jiang, Chen, & Zheng, 2015; Sales Gil & Vagnarelli, 2018; Takkem et al., 2018). Asimismo, se encuentra conformado por 3256 aminoácidos, que en función de su disposición, se reconocen dos isoformas, de 345 y 395 kDa (Cuylen et al., 2016; Dias et al., 2021; Gadbaill et al., 2021; Jing et al., 2019; Li et al., 2015; Sales Gil & Vagnarelli, 2018; Takkem et al., 2018). Además, este antígeno, se destaca por el hecho de encontrarse presente en todas las fases activas del ciclo celular (G_1 , S, G_2 y M), estando ausente solamente en las células en reposo (G_0) (Bhuyan et al., 2018; Kintawati & Pramesti, 2019; Li et al., 2015; Watanabe et al., 2010).

La proteína Ki-67 es sintetizada de forma continua desde el inicio de la fase S hasta las primeras etapas de la fase M, disminuyendo su concentración fuertemente en las instancias finales de la misma — durante la anafase y telofase — (Dias et al., 2021; Li et al., 2015).

De hecho, se le adjudica a esta proteína funciones importantes para la integridad celular, tanto en la interfase como en la mitosis (Cuylen et al., 2016; Dias et al., 2021; Sales Gil & Vagnarelli, 2018; Sun & Kaufman, 2018). En este sentido, juega un rol clave en la conformación de la capa pericromosómica (estructura que previene la agregación de los cromosomas condensados) en las primeras instancias de la fase M, mientras que en la interfase es responsable del mantenimiento de la integridad de la heterocromatina (Cuylen et al., 2016; Dias et al., 2021; Sales Gil & Vagnarelli, 2018; Sun & Kaufman, 2018).

El anticuerpo monoclonal Ki-67 fue descrito inicialmente por Gerdes *et al.* (1983) en el núcleo de células de linfomas de Hodgkin; su empleo a través de técnicas de IHQ, permite identificar a la proteína Ki-67 en muestras tisulares (Gadbail et al., 2021; Gerdes, Schwab, Lemke, & Stein, 1983; Sun & Kaufman, 2018; Takkem et al., 2018). Las células en proliferación activa, es decir las que se encuentran transcurriendo por el ciclo celular, inmunoexpresan este anticuerpo, variando en intensidad y localización, en función de la fase del ciclo celular y del historial de cada célula individual (Li et al., 2015; Sales Gil & Vagnarelli, 2018; Sun & Kaufman, 2018; Xie et al., 2016):

- a) Intensidad de la inmunoexpresión del anticuerpo Ki-67: se ha observado niveles de inmunoexpresión bajos durante las fase G_1 y S, aumentando en forma progresiva y alcanzando su pico máximo al comienzo de la fase M; para disminuir fuertemente en las instancias finales de la división celular (Dias et al., 2021; Jing et al., 2019; Li et al., 2015; Miller et al., 2018; Sales Gil & Vagnarelli, 2018). Asimismo, es de destacar que los niveles iniciales de Ki-67 en G_1 se encuentra condicionado por el tiempo de permanencia en G_0 , así, cuanto mayor es el tiempo que una célula permanece quiescente, menor es el nivel de inmunoexpresión de Ki-67 al ingresar nuevamente en ciclo (Dias et al., 2021; Jing et al., 2019; Li et al., 2015; Miller et al., 2018; Sales Gil & Vagnarelli, 2018). En la figura 4 se puede observar cómo varía la concentración de la proteína Ki-67 en función del tiempo de permanencia de la célula en G_0 .
- b) Inmunolocalización del anticuerpo Ki-67: durante la interfase del ciclo celular, la proteína Ki-67 se localiza en los compartimientos fibrilares densos de la corteza nucleolar, en cambio, durante la fase M, se identifica en la periferia de los cromosomas (Dias et al., 2021; Sun & Kaufman, 2018; Takkem et al., 2018). En

la figura 4 se puede observar cómo varía la localización de la proteína Ki-67 en las diferentes fases del ciclo celular.

La cuantificación de la inmunoexpresión de Ki-67 se realiza a través del *índice de etiquetado*, definido como porcentaje de células positivas en una población celular de número conocido (Dias et al., 2021; Gadbail et al., 2021; Lopes et al., 2017). Los valores elevados de este índice, en cada tumor en particular, son asociados a un mayor riesgo de recaída y a una menor tasa de supervivencia (Dias et al., 2021; Li et al., 2015; Molina Romero et al., 2018; Nazar, Naz, Mahmood, & Hashmi, 2020; Sales Gil & Vagnarelli, 2018).

Desde su identificación, el anticuerpo Ki-67 es reconocido por la mayor parte de la comunidad científica como el biomarcador prototipo de proliferación celular, debido a que permite reconocer la fracción total de células en proliferación, es decir, la proporción de células tumorales que se encuentran en ciclo celular (Cortegoso et al., 2017; Dias et al., 2021; Gadbail et al., 2021; González-González et al., 2016; Gonzalez-Moles et al., 2010; Jing et al., 2019; Marangon Junior et al., 2018; Nazar et al., 2020; Sales Gil & Vagnarelli, 2018; Takkem et al., 2018). De hecho, es utilizado de forma rutinaria en el estudio de la agresividad tumoral, en la determinación del potencial maligno de las lesiones epiteliales, como parámetro de clasificación tumoral y como indicador pronóstico (Cortegoso et al., 2017; Dias et al., 2021; Gadbail et al., 2021; González-González et al., 2016; Jing et al., 2019; Nazar et al., 2020; Sales Gil & Vagnarelli, 2018; Takkem et al., 2018).

Adicionalmente, múltiples estudios han demostrado que el anticuerpo Ki-67 es un biomarcador confiable de agresividad tumoral, predictor de supervivencia y parámetro de clasificación en cáncer de pulmón, mama, sistema nervioso central y próstata (Lopes et al., 2017; Takkem et al., 2018). Sin embargo, a pesar de que el anticuerpo Ki-67 es el biomarcador inmunohistoquímico de proliferación celular más usado; varios autores destacan limitaciones en su utilización, en cuanto a fiabilidad y reproducibilidad, particularmente en tumores con gran heterogeneidad genética (J.-Y. Kim et al., 2017).

En este sentido, los detractores del anticuerpo Ki-67 como biomarcador de proliferación celular, le objetan una importante variabilidad interobservador (Elmaci, Altinoz, Sari, & Bolukbasi, 2018; Khieu et al., 2019; van Steenhoven et al., 2020). Además, observan que el índice de etiquetado Ki-67 tiende a sobreestimar el grado de proliferación tumoral, debido a que es expresado por células que se encuentran en varias fases del ciclo celular,

muchas de ellas con destino incierto — no todas las células que expresan Ki-67 en G₁ progresan a la fase M del ciclo celular — (Khieu et al., 2019; J.-Y. Kim et al., 2017; Puripat & Loharamtaweethong, 2019). Asimismo, destacan que el Ki-67 también es inmunoexpresado por las células inmunitarias que infiltran el parénquima tumoral (Khieu et al., 2019; J.-Y. Kim et al., 2017; Puripat & Loharamtaweethong, 2019).

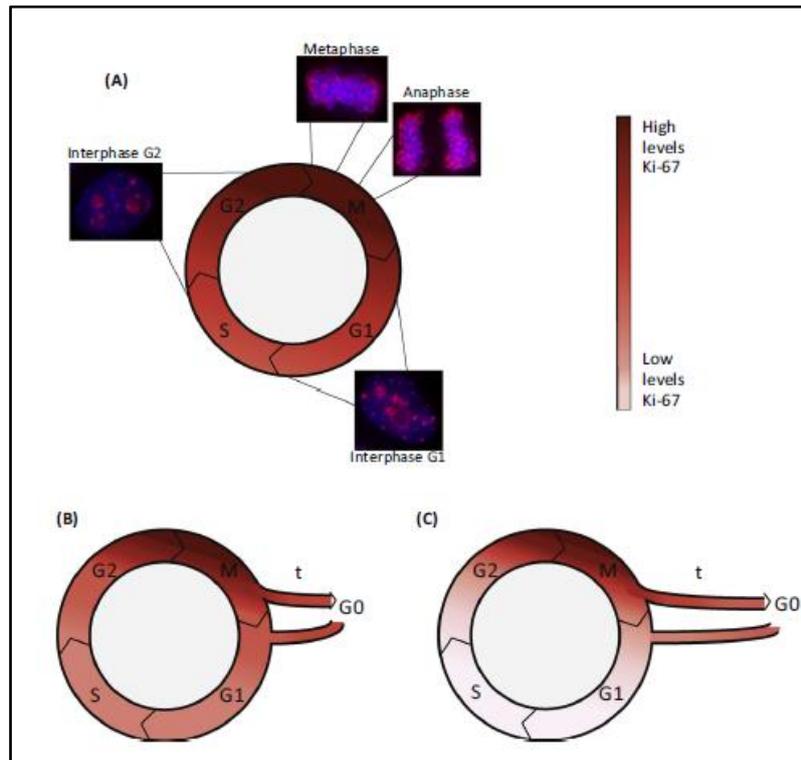


FIGURA 4. Localización y gradiente de concentración de Ki-67 durante el ciclo celular. (A) Las células en división continua presentan niveles máximos de Ki-67 durante la transición de fase G₂/M, disminuyendo luego de forma gradual a medida que la célula progresa a través del ciclo celular, observándose los niveles más bajos en la transición de fase G₁/S. La localización de Ki-67 también cambia a lo largo del ciclo celular, las imágenes muestran la marcación de Ki-67 en células HeLa en diferentes etapas del ciclo celular (Ki-67 en rojo, núcleos en azul). (B y C) Los niveles de expresión de Ki-67 durante el ciclo celular guardan relación con el tiempo que las células han permanecido en G₀. En consecuencia, al reingresar al ciclo celular una célula que pasó un corto periodo de tiempo en reposo (B) tendrá mayor concentración de Ki-67 que una célula que haya permanecido un tiempo mayor en G₀ (C). Abreviatura: t, el tiempo que una célula se encuentra en reposo (G₀). Adaptado de Sales Gil, R., & Vagnarelli, P. (2018). Ki-67: More Hidden behind a ‘Classic Proliferation Marker’. *Trends in Biochemical Sciences*, 43 (10), 747–748.

En cuanto al comportamiento de este biomarcador en patología buco-maxilofacial, se han publicado varios trabajos que evalúan su inmunoexpresión en mucosa oral, displasia

epitelial oral y COCE; en ellos, con frecuencia, se destaca una posible correlación entre el grado de alteración epitelial y la topografía e intensidad de la inmunomarcación, (Ahmad et al., 2020; Jing et al., 2019; Padma et al., 2019; Takkem et al., 2018). Así, en el epitelio de la mucosa oral normal los niveles de Ki-67 son bajos y se topografía básicamente en los queratinocitos basales, mientras que, en el COCE, la inmunoexpresión es mayor (Ahmad et al., 2020; Bhuyan et al., 2018; Chaudhari et al., 2018; Dash, Mahapatra, & Mishra, 2020; Gadbaile et al., 2021; Gonzalez-Moles et al., 2010; Jing et al., 2019; Padma et al., 2019; Takkem et al., 2018). Además, diferentes trabajos describen una relación significativa entre el grado de diferenciación histológica de este tumor y la cuantificación de Ki-67, observándose los niveles más altos en los tumores con menor grado de diferenciación histológica (Ahmad et al., 2020; Chaudhari et al., 2018; Dash et al., 2020; Gadbaile et al., 2021; Gonzalez-Moles et al., 2010; Jing et al., 2019; Padma et al., 2019; Takkem et al., 2018).

En el COCE, los estudios sobre el valor de la expresión de Ki-67, particularmente de la relación entre la expresión de este biomarcador y la sobrevida, han mostrado resultados contradictorios (Lopes et al., 2017; Xie et al., 2016). En este sentido, por un lado, varios autores describen haber observado en el COCE, una asociación estadísticamente significativa entre los niveles altos de expresión de Ki-67 y los períodos menores de sobrevida general, sobrevida libre de recurrencia y sobrevida libre de metástasis (Jing et al., 2019; Lopes et al., 2017). Inclusive, autores como Gadbaile *et al.* (2021) precisan que esta asociación es significativamente mayor que la observada con los parámetros clínico-patológicos de uso habitual, como ser el grado histopatológico y el estadio TNM. Por otro lado, autores como González-Moles *et al.* (2010), descartan el valor pronóstico del Ki-67 en el COCE, debido a que en el tumor —como ocurre en los tejidos normales— coexisten diferentes poblaciones celulares resultantes de la división asimétrica de células madres. Razón por la cual, este biomarcador identificaría solamente una fracción de las células neoplásicas —las que se encuentran en ciclo— responsables del crecimiento maligno persistente y no aquellas que han adquirido una diferenciación terminal, de las que surgen células con capacidad de invasión y metástasis (Gonzalez-Moles et al., 2010). Estas últimas serían las que condicionarían más fuertemente el pronóstico y la sobrevida (Gonzalez-Moles et al., 2010).

2.3.2. Índice de actividad mitótica

El *índice de actividad mitótica* (IAM) representa el método más antiguo para la determinación de la capacidad proliferativa de las neoplasias malignas (Elmaci et al., 2018; van Steenhoven et al., 2020). Se obtiene a través de la identificación y recuento de figuras mitóticas (FM) normales y atípicas en láminas histológicas teñidas con H-E y observadas con microscopía óptica o en formato digital (Elmaci et al., 2018; van Steenhoven et al., 2020). Es importante establecer las diferencias entre el IAM y el *recuento de actividad mitótica* (conocido también como *conteo proliferante*), en este sentido, el primero se establece a través del recuento de FM en una población celular de número conocido, mientras que el segundo se refiere al número de FM presentes en una superficie de diez campos de gran aumento (un CGA corresponde a 1,6 mm²) (Elmaci et al., 2018; van Steenhoven et al., 2020).

El IAM refleja el número incrementado de FM que es habitual observar en las neoplasias malignas, siendo reconocido por el Colegio de Patólogos Americanos y la Unión Internacional para el Control del Cáncer como el mejor marcador de proliferación celular (Kim et al., 2017). Sin embargo, el IAM presenta limitaciones de precisión y reproducibilidad intra e interobservador, debido a lo difícil que puede resultar incluso para patólogos entrenados, la identificación de áreas mitóticamente activas y la diferenciación de células en mitosis de aquellas que muestran núcleos con morfología similar (denominadas en algunas publicaciones como *mitotic-like figures*), como ser las células apoptóticas (Chow et al., 2017; Donovan et al., 2021; Jin, Huang, Nasim, Yang, & Lee, 2019; Khieu et al., 2019; J.-Y. Kim et al., 2017; Lea et al., 2021; Olar, 2015).

Mitosis: figuras mitóticas normales y atípicas

La mitosis, también denominada cariocinesis, ocurre durante la fase M del ciclo celular, donde la cromatina previamente replicada se condensa y adhiere a las fibras del huso mitótico (Bavle, 2014; Donovan et al., 2021; Ohashi et al., 2018; Tandon, Singh, Brave, & Sreedhar, 2016). Posteriormente, en esta fase, se produce el desplazamiento de las dos copias cromosómicas hacia lados opuestos, para finalizar con la obtención de dos nuevos núcleos de células hijas genéticamente iguales (Bavle, 2014; Donovan et al., 2021; Ohashi et al., 2018; Tandon et al., 2016).

Mientras que el término mitosis se utiliza para referirse a la fase del ciclo celular donde ocurre el proceso de cariocinesis, la denominación de FM es empleada para referirse a las

estructuras morfológicas que adopta la cromatina durante esta fase y que son identificables con microscopía óptica (Donovan et al., 2021). Las FM se definen como agregados nucleares constituidos por bastones cortos o picos de cromosomas — Van Diest *et al.* (1998) fueron los primeros en describirlas como extensiones “peludas” —, carentes de membrana nuclear, la cual se pierde al inicio de la mitosis, específicamente durante la profase (Chitra et al., 2019; Donovan et al., 2021; Tandon et al., 2016; Van Diest et al., 1998).

Una característica distintiva de las neoplasias malignas, es la presencia de FM atípicas; o sea, aquellas con morfología que dista en mayor o menor medida de la observada en las FM consideradas normales (Ohashi et al., 2018). Debido a que en el IAM se contabilizan ambas, es fundamental conocer las características que las tipifican y diferencian entre sí, y a estas, de las denominadas *mitotic-like figures* (Donovan et al., 2021). Para ello, es importante considerar que la morfología de las FM tanto normales como atípicas varía en función de las diferentes fases secuenciales de la mitosis, reconociendo como tales y en orden de presentación: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase (Donovan et al., 2021). Las mismas, con excepción de la profase, por presentar una morfología nuclear característica, son reconocibles en las muestras tisulares procesadas de forma rutinaria y observadas con microscopía óptica (Donovan et al., 2021; Sudarshini et al., 2018; Tandon et al., 2016). La figura 5 corresponde a una imagen obtenida y modificada de un artículo realizado por Donovan *et al.* (2021), en la que se puede observar FM normales (A-D) y FM atípicas (E-H).

Fases de la mitosis normal. Características morfológicas

- a) Profase: es la primera etapa de la mitosis, donde los cromosomas se compactan y se constituye el huso mitótico, al cual se adhieren los primeros para ser guiados durante las fases posteriores (Bavle, 2014; Donovan et al., 2021). Debido a que los cromosomas no se encuentran densamente agregados en forma de bastones y a que la membrana nuclear se pierde recién en instancias avanzadas de esta fase, habitualmente en muestras tisulares observadas con microscopía óptica no son identificadas FM en profase (Donovan et al., 2021).
- b) Prometafase: en esta etapa, las FM se observan como bastones y picos oscuros agrupados que sobresalen a la observación microscópica (Donovan et al., 2021). Durante la prometafase tardía, los cromosomas se organizan brevemente en un

solo anillo en forma de corona, conocido como roseta cromosómica (Donovan et al., 2021). En la figura 5 (A) se muestra una FM en prometafase, observada con microscopía óptica.

- c) Metafase: las FM en esta fase se caracterizan por estar constituidas por cromosomas alineados a lo largo de la placa ecuatorial, siendo visualizadas como una placa lineal, banda o anillo de bastones cromosómicos, que se proyectan hacia la superficie (Bavle, 2014; Donovan et al., 2021). En la figura 5 (B) se pueden observar las características morfológicas de la metafase previamente descritas.
- d) Anafase: cómo se puede ver en la figura 5 (C), las FM en esta fase son fácilmente reconocibles en preparaciones histológicas, por su morfológica característica (Bavle, 2014; Donovan et al., 2021). En esta etapa, podemos observar que las FM se encuentran constituidas por los cromosomas hermanos separados de la línea media, equidistantes de los extremos opuestos de la célula (Bavle, 2014; Donovan et al., 2021).
- e) Telofase: es la fase terminal de la mitosis, donde se forma el surco de escisión, se reconstruyen las envolturas nucleares y aparecen los nucleolos (Bavle, 2014; Donovan et al., 2021). Una vez completada la misma, ocurre la citocinesis, entendida como la separación física en dos células hijas de los componentes citoplasmáticos (Donovan et al., 2021). La morfología característica de las FM en telofase se presenta en la figura 5 (D).

Como se ha mencionado anteriormente, las neoplasias malignas se caracterizan por presentar FM atípicas (Matsuda et al., 2016; Ohashi et al., 2018). Las variaciones con respecto a la morfología catalogada como normal en las FM, se debe a que, con frecuencia, las neoplasias malignas presentan inestabilidad cromosómica, disfunción de telómeros y aneuploidía, que ocasionan alteraciones en el proceso de división celular y por lo tanto variaciones en la morfología mitótica (Ohashi et al., 2018). Se consideran como FM atípicas: a) las mitosis multipolares, b) mitosis anulares, c) mitosis bipolares asimétricas, d) mitosis con puente en anafase y e) mitosis con cromosomas o fragmentos cromosómicos rezagados (Donovan et al., 2021; Matsuda et al., 2016; Ohashi et al., 2018). En la figura 5 (E-H) se presentan diferentes tipos de FM atípicas.

Debido a la dificultad que puede representar a veces la identificación de las FM y con la finalidad de mejorar la reproducibilidad del IAM, se han desarrollado biomarcadores específicos para antígenos presentes exclusivamente durante la mitosis; uno de ellos es el

anticuerpo para la proteína PHH3 (Chow et al., 2017; Donovan et al., 2021; J.-Y. Kim et al., 2017).

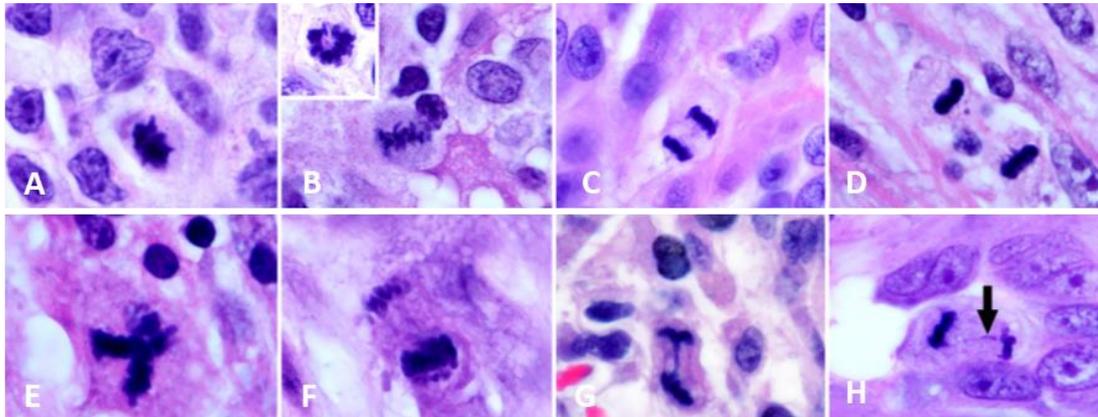


FIGURA 5. Figuras mitóticas normales y atípicas en muestras tisulares teñidas con H-E. (A-D) Figuras mitóticas normales: A. Prometafase. B. Metafase. C. Anafase. D. Telofase. (E-H) Figuras mitóticas atípicas: E. Mitosis multipolar. F. Mitosis asimétrica en anafase. G. Puente en anafase. H. Mitosis con cromosomas o fragmentos cromosómicos rezagados. Adaptado de Donovan, T. A., Moore, F. M., Bertram, C. A., Luong, R., Bolfa, P., Klopffleisch, R., ... Meuten, D. J. (2021). Mitotic Figures—Normal, Atypical, and Imposters: A Guide to Identification. *Veterinary Pathology*, 58 (2), 243–257.

2.3.3. Fosfohistona H3

Las histonas son proteínas simples y de pequeño tamaño, que enrollan de forma ordenada, progresiva y eficiente la doble hélice de ADN (González Romero, Ausió, Méndez, & Eirín López, 2011; Khorasanizadeh, 2004). Por consiguiente, estas proteínas permiten que el ADN pueda ser contenido en el interior del núcleo de las células eucariotas, a la vez que proporcionan la base estructural para la conformación de la fibra de cromatina (González Romero et al., 2011; Khorasanizadeh, 2004).

Se denomina nucleosoma a la subunidad elemental y repetitiva de la fibra de cromatina, constituida por las histonas en asociación con el ADN (Cutter & Hayes, 2015; de Freitas Filho et al., 2018; Escargueil, Soares, Salvador, Larsen, & Henriques, 2008; Khorasanizadeh, 2004; Kono & Ishida, 2020; Koyama & Kurumizaka, 2018). En cada uno de ellos, las histonas se disponen en el centro, a modo de núcleo, en torno al cual, se enrolla la molécula de ADN (Cutter & Hayes, 2015; Kono & Ishida, 2020).

En este sentido, en cada nucleosoma se identifican ocho moléculas de histonas, pertenecientes a cinco tipos distintos: H1, H2A, H2B, H3 y H4 (Cutter & Hayes, 2015;

Escargueil et al., 2008; González Romero et al., 2011; Khorasanizadeh, 2004; Koyama & Kurumizaka, 2018; H. Yang, Jin, Dan, & Chen, 2020). Las mismas se organizan espacialmente en un núcleo tetramérico estable, constituido por las denominadas histonas centrales (H2A, H2B, H3 y H4), flanqueado por la histona enlazadora H1 (Cutter & Hayes, 2015; Escargueil et al., 2008; González Romero et al., 2011; Khorasanizadeh, 2004; Koyama & Kurumizaka, 2018; H. Yang et al., 2020). En la figura 6 se muestra a través de una representación gráfica la estructura atómica del nucleosoma.

Asimismo, al igual que ocurre con la histona H2, en las células eucariotas superiores se han reconocido varios subtipos de histonas H3; tipificadas en función de su estructura y del momento del ciclo celular en que son sintetizadas como H3.1, H3.2, H3.3 y CENP-A (proteína H3 centrómero específica) (Elmaci et al., 2018; Kallappagoudar, Yadav, Lowe, & Partridge, 2015). De esta manera, mientras las histonas H3.1 y H3.2 son producidas e incorporadas a la cromatina replicada durante la fase S del ciclo celular, la histona H3.3 se encuentra presente en las distintas fases del ciclo celular y es almacenada en la célula de manera independiente a la síntesis del ADN (Elmaci et al., 2018). De acuerdo a su estructura, la histona H3.2 se distingue de H3.1 por presentar un aminoácido extra (Ser96), mientras que H3.3 se diferencia por presentar cuatro aminoácidos adicionales (Ser31, Ala87, Ile89 y Gly90) con respecto a H3.1 y H3.2 (Kallappagoudar et al., 2015).

Las histonas tienen la potencialidad de experimentar cambios químicos, responsables del aumento o disminución en la fuerza de atracción entre los componentes del nucleosoma, lo que se traduce en modificaciones en el grado de empaquetamiento de la cromatina y en la accesibilidad por parte de los factores de transcripción al ADN (Escargueil et al., 2008; González Romero et al., 2011). Estas variaciones en la intensidad de unión entre las histonas y el ADN son las que permiten la concreción de los procesos de expresión, reparación y replicación génica (Escargueil et al., 2008; González Romero et al., 2011). De hecho, es a través de la acetilación, metilación o fosforilación de las histonas, que los diferentes sucesos modificadores intrínsecos y/o extrínsecos producen cambios en la expresión génica (de Freitas Filho et al., 2018; Elmaci et al., 2018). En este sentido, se considera que la activación transcripcional se encuentra asociada a la fosforilación de la histona H3 (Elmaci et al., 2018).

Pero por otro lado, la fosforilación de la histona H3 a nivel de serina 10 y 28, también se encuentra asociada a otro proceso fundamental y estructuralmente opuesto, como es la compactación de la cromatina durante la división celular (Elmaci et al., 2018). Así, es a

partir de este suceso, que la célula es habilitada para ingresar en la fase M del ciclo celular (Hendzel et al., 1997; Lai et al., 2019; Olar, 2015). Además, este evento molecular parece ser clave para la correcta alineación de los cromosomas en la placa metafásica y en el proceso de transición de la metafase a la anafase (Elmaci et al., 2018; Hendzel et al., 1997; J.-Y. Kim et al., 2017; Lai et al., 2019; Olar, 2015).

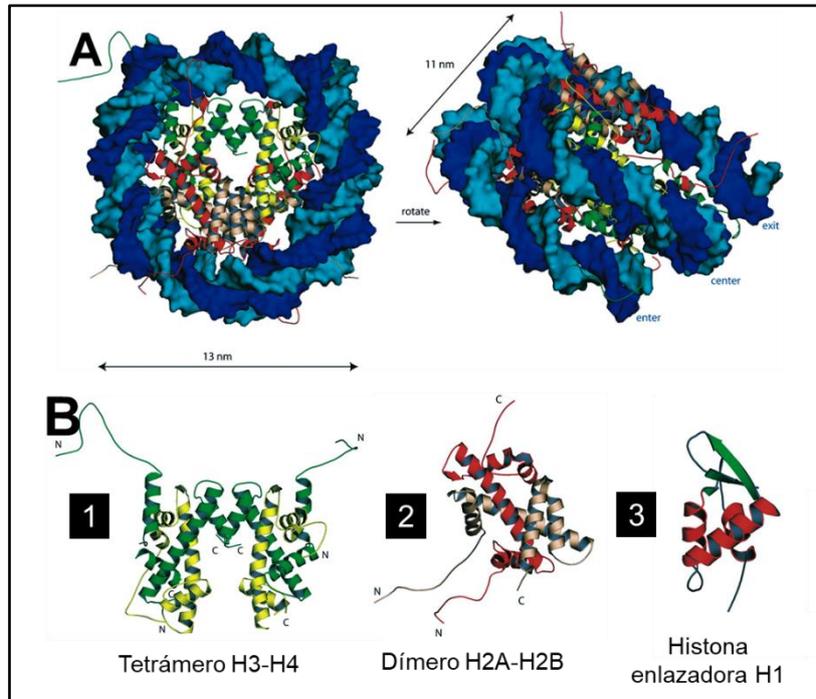


FIGURA 6. A. Estructura atómica del nucleosoma en forma de disco, constituida en su centro por un octómero de histonas, alrededor del cual el ADN da 1,7 vueltas. Cada hebra del ADN se encuentra representada por un tono de azul diferente. B. (1) Tetrámero de histonas H3 (verde) y H4 (amarillo) constituido por la asociación de dos dímeros H3-H4. B. (2) Dímero de histonas H2A (rojo) y H2B (rosado). B. (3) Histona enlazadora H1. Adaptado de: Khorasanizadeh, S. (2004). The Nucleosome: From Genomic Organization to Genomic Regulation. Review. *Cell Press*, 116 (23), 259–272.

La fosforilación de la histona H3 se inicia de manera no aleatoria en la heterocromatina pericentrómica en la fase G₂ tardía y a medida que avanza la mitosis, se extiende a todo el cromosoma, completándose en la profase avanzada y manteniéndose durante la metafase (Hendzel et al., 1997; Lai et al., 2019; Olar, 2015). En la anafase tardía comienza el proceso de desfosforilación de la histona H3, que finaliza en la telofase temprana, previo a la descondensación de la cromatina (Elmaci et al., 2018; Hendzel et al., 1997; J.-Y. Kim et al., 2017; Lai et al., 2019; Olar, 2015).

En función de que los niveles mayores de fosforilación de la histona H3 en serina 10 y 28 son alcanzados durante la condensación de la cromatina en la fase M del ciclo celular, y con el objetivo de identificar a las células en mitosis, Hendzel *et al.* (1997) desarrollaron un anticuerpo que reconoce como antígeno a la histona H3 fosforilada (PHH3) (Bedekovics *et al.*, 2018; Ohashi *et al.*, 2018; Puripat & Loharamtaweethong, 2019). En este sentido, como la histona H3 siempre se encuentra fosforilada durante la mayor parte de la fase M del ciclo celular y es positiva para el anticuerpo PHH3, mientras que en la interfase las células no expresan este anticuerpo (o lo hacen mínimamente); se reconoce al anticuerpo PHH3 como un biomarcador IHQ específico de mitosis (Khieu *et al.*, 2019; J.-Y. Kim *et al.*, 2017; Ohashi *et al.*, 2018).

Varios autores consideran que la inmunomarcación tanto de la histona H3 fosforilada en serina 10 (PHH3-S10) como de la histona H3 fosforilada en serina 28 (PHH3-S28), representa un método rápido, sencillo y sensible para la evaluación de la actividad mitótica (Puripat & Loharamtaweethong, 2019). De hecho, múltiples trabajos publicados, reconocen la utilidad de estos anticuerpos para la obtención de un IAM más preciso y con menor variabilidad interobservador (Hao *et al.*, 2018; Jin *et al.*, 2019; Laflamme *et al.*, 2020).

Asimismo, las ventajas que son reconocidas y que validan la utilización del anticuerpo PHH3 por técnicas de IHQ para el reconocimiento de las FM y el cálculo del IAM, son las siguientes: a) permite obtener una tinción clara y bien contrastada de las FM; b) ofrece una característica única de reconfirmación de la FM, a través de la asociación de la positividad de la tinción con la morfología que adopta la cromatina condensada; c) no se inmunoexpresa en las denominadas *mitotic-like figures* (cuerpos apoptóticos, imágenes artefactuales, células necróticas, restos cariorréxicos y células morfológicamente distorsionadas); d) se marcan FM que no se pueden identificar en secciones teñidas con H-E y e) permite reconocer más fácilmente las áreas de mayor actividad mitótica, es decir, los denominados puntos calientes tumorales (Bedekovics *et al.*, 2018; Chow *et al.*, 2017; Elmaci *et al.*, 2018; Jin *et al.*, 2019; Khieu *et al.*, 2019; J.-Y. Kim *et al.*, 2017; Laflamme *et al.*, 2020; Ohashi *et al.*, 2018; Olar, 2015; Puripat & Loharamtaweethong, 2019; van Steenhoven *et al.*, 2020; Winther, Arnli, Salvesen, & Torp, 2016).

Dado que el biomarcador PHH3 se inmunoexpresa intensamente en la fase G₂ tardía y en la fase M del ciclo celular, es reconocido por varios autores, como un biomarcador específico de proliferación celular (Hao *et al.*, 2018; Ramani *et al.*, 2015). Asimismo,

estudios recientes han demostrado el valor pronóstico que tiene este biomarcador en una gran variedad de tumores malignos sólidos (Bedekovics et al., 2018; Chow et al., 2017; Hao et al., 2018; Hendzel et al., 1997; J.-Y. Kim et al., 2017; Laflamme et al., 2020; Olar, 2015; Siriweera & Zardawi, 2016). Particularmente, diferentes autores, han reconocido en cáncer de mama, ginecológico, cutáneo y urogenital, la existencia de una correlación significativa entre la expresión de PHH3 con la estadificación clínica y la supervivencia global (Bedekovics et al., 2018; Hao et al., 2018; Jin et al., 2019; J.-Y. Kim et al., 2017). Además, en base a la información recogida en la bibliografía, en los últimos años, se ha desarrollado una línea de investigación que tiene como objetivo comparar el valor como marcador de proliferación celular del anticuerpo PHH3 con respecto al Ki-67 en diferentes neoplasias (Khieu et al., 2019; Lea et al., 2021; van Steenhoven et al., 2020; Winther et al., 2016). De hecho, se ha analizado si el biomarcador PHH3 puede superar las limitaciones observadas con el Ki-67, como ser la importante variabilidad interobservador y la tendencia a sobrestimar la capacidad proliferativa tumoral (Khieu et al., 2019; J.-Y. Kim et al., 2017; Winther et al., 2016). Así, se puede encontrar en varios estudios, luego de analizar diferentes variables, parámetros que orientan a un comportamiento más específico como indicador de proliferación celular del marcador PHH3 con respecto al Ki-67 y al IAM (Elmaci et al., 2018; J.-Y. Kim et al., 2017; Lea et al., 2021; Ramani et al., 2015; van Steenhoven et al., 2020).

El buen desempeño del anticuerpo PHH3 como marcador de proliferación celular, según lo argumentado en la bibliografía —a diferencia del biomarcador Ki-67— se debería a que su inmunexpresión se encuentra limitada a las células que se hallan en el tramo final de G₂ y en la fase M del ciclo celular (Elmaci et al., 2018; J.-Y. Kim et al., 2017; Lea et al., 2021; Ramani et al., 2015; van Steenhoven et al., 2020). Además, se destacan otros argumentos a favor de su buen comportamiento como marcador de proliferación celular, en comparación con los marcadores clásicos, como por ejemplo, su mayor sensibilidad en la identificación de mitosis y su menor variabilidad interobservador (Khieu et al., 2019; J.-Y. Kim et al., 2017; van Steenhoven et al., 2020).

Finalmente, en el COCE, el biomarcador PHH3 ha sido poco estudiado; así lo demuestra la bibliografía, donde solamente hemos encontrado dos artículos que refieren al análisis de este marcador en el tumor maligno más frecuente de la cavidad oral. En uno de ellos, Sudarshini *et al.* (2018) evaluaron el rol del anticuerpo PHH3 como marcador específico

de FM; para ello compararon el número de mitosis PHH3 positivas por técnicas de IHQ con aquellas localizadas en laminas teñidas con H-E y cristal violeta al 1 %. Este trabajo, que se limitó a comparar el *conteo proliferante* obtenido con las diferentes técnicas histológicas en lesiones con displasia epitelial y en COCE, concluye que el anticuerpo PHH3 es un biomarcador específico de FM (Sudarshini et al., 2018).

El otro artículo encontrado que estudia a la PHH3 en COCE, es el de Ivina *et al.* (2019), en este trabajo los autores analizaron la expresión de PHH3, Ki-67 y citoqueratina 15, en hiperplasias epiteliales, lesiones con displasia epitelial y COCE. En el mismo no se hallaron resultados significativos con respecto a la PHH3 en los diferentes procesos patológicos epiteliales estudiados (Ivina et al., 2019). Por lo tanto, consideramos, que el estudio de la posible asociación entre la inmunoexpresión del biomarcador PHH3 y la tasa de supervivencia de los pacientes con COCE —uno de los objetivos específicos de nuestro trabajo— se constituye como un tópico original, al no encontrar artículos que refieran específicamente al mismo.

Capítulo 3 | Metodología

Este capítulo describe el conjunto de métodos y materiales utilizados para la ejecución del proyecto de investigación, así como para el análisis de los resultados. Inicialmente se presentan las consideraciones éticas que rigieron su realización (§ 3.1), el diseño del estudio (§ 3.2) y los criterios considerados para la obtención de la muestra (§ 3.3). Posteriormente, mediante tablas se definen las variables dependientes e independientes con su respectiva operacionalización (§ 3.4). Además, se explica el proceso de revisión histológica de los casos seleccionados y los principios utilizados para la calibración intra e interobservador (§ 3.5). A continuación, se desarrolla la metodología empleada para la obtención del IAM (§ 3.6), para el procesamiento IHQ (§ 3.7) y para la evaluación IHQ (§ 3.8). Finalmente se detallan los métodos utilizados para el análisis estadístico (§ 3.9), la financiación (§ 3.10) y la declaración de conflicto de intereses (§ 3.11).

La ejecución de este trabajo de investigación fue realizada en el Laboratorio de Anatomía Patológica en coordinación con el Laboratorio de Patología Molecular de la Facultad de Odontología de la UdelaR.

3.1. Consideraciones éticas

El proyecto se encuentra registrado en la Unidad de Investigación de la Facultad de Odontología y fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la UdelaR (Expediente 091900-000351-19. Resolución No. 3 del 2 de julio de 2020) (Anexo 1).

Con la finalidad de garantizar la seguridad y confidencialidad de los datos personales, en ninguna instancia, durante la ejecución del proyecto fueron utilizados los nombres y apellidos de los pacientes seleccionados. En su lugar, le fue asignado a cada uno de ellos un código para su identificación (titulado en la planilla electrónica como número de caso) (Apéndice 1). Además, se limitó a la persona responsable del proyecto el acceso a toda información que pudiera identificar a los pacientes seleccionados.

3.2. Diseño del estudio

Se realizó un estudio descriptivo, retrospectivo y transversal, tanto para la identificación y localización de los biomarcadores objeto de estudio, como para la correlación de estos con el IAM y los parámetros clínicos-morfológicos del COCE. En cambio, para el análisis

de la tasa de sobrevida en relación a la inmunoexpresión de Ki-67 y PHH3, el diseño del estudio fue longitudinal y analítico.

3.3. Obtención de la muestra

La población de estudio estuvo constituida por 137 casos de COCE, diagnosticados en el Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la UdelaR, en el período comprendido entre enero de 2007 y diciembre de 2015. A partir de esta, se obtuvo la muestra de estudio, conformada inicialmente por 70 COCE que fueron seleccionados en base al cumplimiento de los criterios de inclusión y exclusión propuestos. Luego del procesamiento IHQ fueron excluidos ocho casos por falta de antigenicidad, quedando conformada finalmente la muestra de estudio por 62 COCE. El tipo de muestreo fue no probabilístico por conveniencia.

Se revisaron las fichas clínico-patológicas de cada uno de los casos seleccionados, ingresando en la planilla electrónica diseñada para la ejecución del proyecto, las variables correspondientes a género, edad, localización del tumor, fecha del diagnóstico anatomopatológico y diagnóstico histopatológico (en el Apéndice 1 se presenta la planilla electrónica utilizada). En este estudio, la fecha del diagnóstico anatomopatológico fue considerada como la fecha de inicio de la enfermedad.

La sobrevida del paciente se definió como el tiempo transcurrido entre el diagnóstico histopatológico inicial y la muerte por cáncer. La fecha de defunción, para los casos que fallecieron por cáncer, fue aportada por el Registro Nacional de Cáncer (RNC) al 10 de setiembre de 2021.

3.3.1. Criterios de inclusión

Los COCE primarios, localizados en lengua (cara dorsal y/o ventral), piso de boca, mucosa yugal, paladar duro y blando, encía, área retromolar y mucosa labial, para ser incluidos en nuestra muestra de estudio debían contar con datos clínico-morfológicos completos, incluyendo edad, género, localización, grado histopatológico de la lesión, fecha de diagnóstico y número de cédula de identidad.

El número de cédula identidad fue definido como criterio de inclusión y su ausencia como criterio de exclusión, debido a que es a partir de éste, que el RNC puede determinar si un paciente se encuentra vivo o ha fallecido por la enfermedad, y en este último caso, con la fecha de defunción, calcular la tasa de sobrevida.

3.3.2. Criterios de exclusión

En este trabajo fueron excluidos los casos que presentaban extensas áreas de necrosis y/o deficiente preservación estructural histológica. Tampoco fueron incluidos aquellas muestras tisulares cuyos bloques de parafina contuvieran material tisular insuficiente. Además, no fueron considerados aquellos COCE con ficha clínico-patológica incompleta, sin registro de alguno de los siguientes datos: edad, género, localización y/o cédula de identidad.

Durante la selección de la muestra, se constató en algunos casos, que para un mismo paciente, había más de una biopsia, obtenida en diferentes momentos temporales, correspondientes a la recidiva de una misma lesión de COCE. Puntualmente, en estos pacientes, se resolvió incluir la fecha de diagnóstico de la primera biopsia, para la sobrevida y el bloque de parafina de la última, para el diagnóstico histopatológico y análisis IHQ.

3.4. Operacionalización de las variables

En la tabla 1 son definidas cada una de las variables independientes analizadas con su respectiva operacionalización.

En la tabla 2 son definidas cada una de las variables dependientes analizadas con su respectiva operacionalización.

3.5. Revisión histológica y calibración

Una vez definida la muestra de estudio, se procedió a verificar o rectificar la graduación histológica de cada uno de los casos según la clasificación propuestas por la OMS (2017) para el COCE (El-Naggar et al., 2017). Así, a través del estudio histológico de las láminas teñidas con H-E y en función de los criterios originalmente definidos por Broders (1920), cada uno de los tumores fue tipificado como bien diferenciado, moderadamente diferenciado y pobremente diferenciado (Almangush et al., 2020; El-Naggar et al., 2017; Speight & Farthing, 2018; B. Xu et al., 2021). En la figura 7 se puede observar la morfología correspondiente a los diferentes grados de diferenciación histológica del COCE.

TABLA 1

Operacionalización de las variables independientes

Variable independiente	Operacionalización
	Grado 1 (bien diferenciado) ^a
Carcinoma oral de células escamosas	
Grado histológico	Grado 2 (moderadamente diferenciado) ^a
	Grado 3 (pobrementemente diferenciado) ^a
Paciente vivo o muerto / sobrevida	En los pacientes vivos, se consideró el lapso de tiempo transcurrido desde el inicio de la enfermedad hasta la finalización del estudio ^b
	En los pacientes muertos, se consideró el lapso de tiempo transcurrido entre la fecha de diagnóstico y la de muerte por cáncer
Edad	Años cumplidos al momento del diagnóstico
Género	Se registró como variable dicotómica: femenino (0) y masculino (1)
Localización agrupada	lengua (dorso, bordes laterales, ventral y extensiones a piso de boca)
	mucosa bucal (encía, reborde alveolar y extensiones, trígono retromolar y mejilla)
	piso de boca
	paladar (duro, blando y extensiones a pilares)

Nota: ^a Categorías de clasificación para el COCE según OMS (2017). ^b La fecha de finalización del estudio fue el 10 de setiembre de 2021.

Posteriormente, todas las láminas histológicas objeto de estudio, tanto las teñidas con H-E como las obtenidas por técnica de IHQ, fueron pasadas a formato digital con el sistema de adquisición y procesamiento de imágenes *Motic VM 3.0 Digital Slide Scanning System*. A su vez, para su análisis, se utilizó el software *Motic VM 3.0 – Motic Digital Slide*

Assistant (versión 1.0.7.46, Copyright Motic China Group Co., Ltd.2017). Tanto para el cálculo del IAM como para la cuantificación de las células positivas para Ki-67 y PHH3, se realizó captura de imagen de las áreas consideradas más representativas a 40x de magnificación. La figura 8 corresponde a una captura de pantalla, donde se muestra parte de los recursos que ofrece el software *Motic VM 3.0 –Motic Digital Slide Assistant* para el análisis histológico de láminas digitales.

TABLA 2

Operacionalización de las variables dependientes

Variables dependientes	Operacionalización
Índice de actividad mitótica (IAM)	$(\text{número de mitosis} \div 1000 \text{ células}) \times 100^a$
Índice de expresión de Ki-67	$(\text{número de células Ki-67 positivas} \div 1000 \text{ células}) \times 100^a$
Índice de expresión de PHH3	$(\text{número de mitosis PHH3 positivas} \div 1000 \text{ células}) \times 100^a$

Nota: ^a En todos los casos, se realizó la cuantificación en 1000 células tumorales.

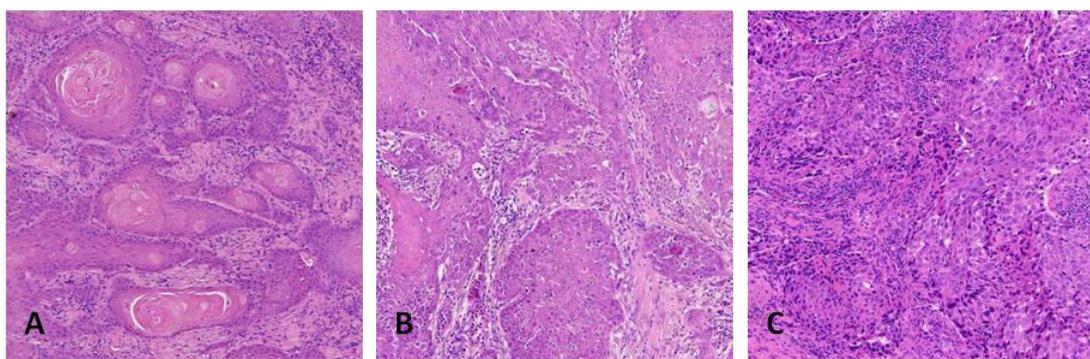


FIGURA 7. Morfología de los distintos grados de diferenciación histológica del COCE. A. COCE bien diferenciado (H-E. Magnificación 10x). B. COCE moderadamente diferenciado (H-E. Magnificación 10x). C. COCE pobremente diferenciado (H-E. Magnificación 10x).

La calibración interobservador en el reconocimiento de las FM y de las células positivas por IHQ para los anticuerpos Ki-67 y PHH3, se realizó entre la responsable del trabajo y la Dra. Natalia González (asistente de la Cátedra de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la UdelaR). Para ello, fueron seleccionadas 30 imágenes a 40x de aumentos, de las cuales, diez correspondían a láminas teñidas con H-E, diez a láminas de IHQ para Ki-67 y las restantes, a láminas de IHQ para PHH3 (J.-Y. Kim et al., 2017).

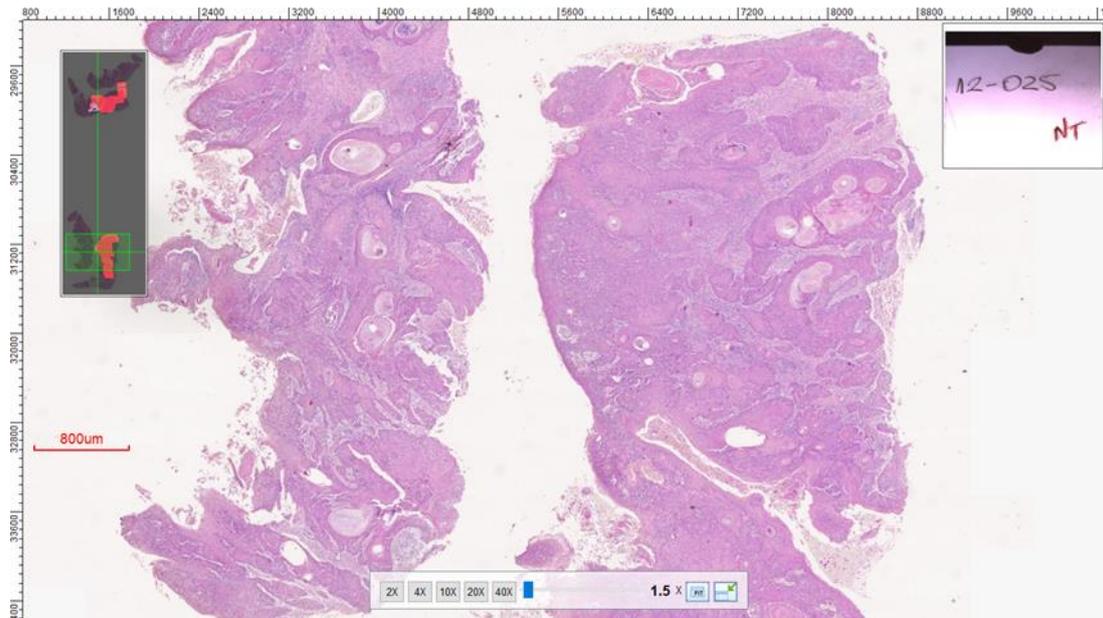


FIGURA 8. El software *Motic VM 3.0 – Motic Digital Slide Assistant* permite evaluar las láminas histológicas en formato digital de una forma muy similar al uso del microscopio óptico. En esta imagen, se muestra la lámina digital de un COCE moderadamente diferenciado de reborde alveolar teñido con H-E y visualizado con el software *Motic DS Assistant*, magnificación 1.5x.

Con el fin de establecer el grado de concordancia interobservador, previo al conteo, las examinadoras analizaron y acordaron los criterios morfológicos necesarios tanto para la identificación de las FM, como para el reconocimiento de las células positivas a los biomarcadores estudiados en las láminas de IHQ. Las observadoras realizaron sus cuantificaciones de manera independiente, sin conocimiento de las cifras establecidas por la otra. Asimismo, para establecer el grado de concordancia intraobservador, pasados 30 días, se volvió a realizar el análisis y la cuantificación de las mismas imágenes. Se utilizó el coeficiente de correlación interclase (CCI) para el cálculo del grado de concordancia interobservador [CCI: (Ki-67 = 0,85) (PHH3 = 0,86)] e intraobservador [CCI: (Ki-67 = 0,98) (PHH3 = 0,86)] (Cortés-Reyes, Rubio-Romero, & Gaitán-Duarte, 2010).

3.6. Índice de actividad mitótica

Para el cálculo del IAM se utilizaron las láminas digitales teñidas con H-E. En cada caso, con el software *Motic VM 3.0 – Motic Digital Slide Assistant* (versión 1.0.7.46, Copyright Motic China Group Co., Ltd.2017) a 10x de magnificación, se seleccionaron las áreas con mayor densidad de células tumorales, evitando zonas con alteraciones tisulares, con importantes exudados inflamatorios o con pliegues tisulares (Ohashi et al., 2018; Tandon et al., 2016). Posteriormente, a 20x de magnificación se eligieron los campos con mayor

densidad mitótica y a 40x de magnificación, se realizó la individualización de las FM (normales y atípicas) y la captura de imagen para su posterior análisis con el software *Image J* (1.52v, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) (Ohashi et al., 2018; Tandon et al., 2016).

La identificación de las FM se realizó de acuerdo con las características morfológicas descritas por Van Diest *et al.* (1998), reconociendo como tales: a) coágulos oscuros de cromosomas con frecuentes extensiones superficiales, visibles al mover el micrométrico y de configuración variable en función de las distintas fases mitóticas (prometáfase, metafase, anafase o telofase); b) ausencia de envoltura nuclear y c) citoplasma basófilo (Chitra et al., 2019; Tandon et al., 2016; Van Diest et al., 1998). En la figura 9 se pueden observar las diferentes morfologías compatibles con FM normales, que puede adoptar el núcleo celular a medida que la célula transcurre por las distintas fases de la mitosis. Estas imágenes fueron obtenidas durante el análisis histológico de nuestra muestra de estudio.

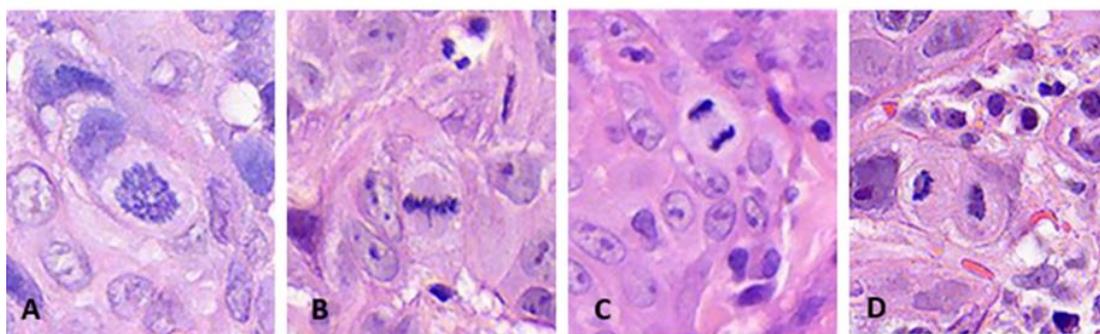


FIGURA 9. Figuras mitóticas normales observadas en láminas digitales de COCE, teñidas con H-E, a una magnificación de 40x. A. Prometáfase. B. Metafase. C. Anafase. D. Telifase.

Como se ha mencionado previamente, para el cálculo del IAM fueron contabilizadas tanto FM normales como atípicas. En este estudio, se identificaron como mitosis atípicas todas aquellas reconocidas como FM, pero con morfologías que diferían en mayor o menor medida a las consideradas normales. De esta manera, fueron incluidas como FM atípicas, las mitosis multipolares, anulares (en anillo), asimétricas y con puente en anafase (Matsuda et al., 2016; Ohashi et al., 2018). Asimismo, fueron excluidas del conteo, aquellas morfologías nucleares cuestionables, como los núcleos picnóticos o apoptóticos (Elmaci et al., 2018; Matsuda et al., 2016; Ohashi et al., 2018). En la figura 10 se muestran diferentes FM atípicas registradas durante el análisis histológico de las láminas digitales teñidas con H-E de los COCE objeto de estudio.

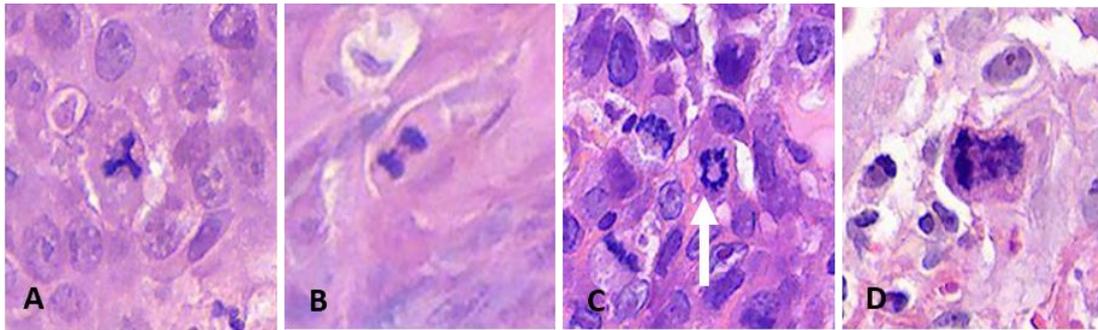


FIGURA 10. Figuras mitóticas atípicas en COCE observadas en láminas digitales, teñidas con H-E, a una magnificación de 40x. A. Mitosis tripolar. B. Puente que une los cromosomas paralelos en anafase. C. Mitosis en anillo (flecha). D. Mitosis asimétrica.

Para establecer el IAM en cada uno de los casos, con la herramienta de conteo manual del software *Image J* (1.52v, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA), se contaron las FM normales y atípicas presentes en 1000 células tumorales. El valor obtenido fue registrado como porcentaje de mitosis cada 1000 células tumorales, a través de la fórmula: $IAM = [(número\ de\ mitosis \div 1000\ células) \times 100]$ (Kadoo et al., 2018).

3.7. Procesamiento Inmunohistoquímico

El procesamiento IHQ fue realizado en el Laboratorio de Patología Molecular de la Facultad de Odontología de la UdelaR, por la Dra. Gabriela Vigil (asistente del Laboratorio de Patología Molecular de la Facultad de Odontología de la UdelaR) y la responsable del trabajo. Para ello se siguió el protocolo detallado en investigaciones previamente publicadas por el grupo de trabajo del laboratorio donde se ejecutó el procesamiento inmunohistoquímico (Bologna-Molina et al., 2019; Carreón-Burciaga et al., 2018; Sánchez-Romero et al., 2021).

Para la técnica de IHQ, se obtuvieron dos cortes de 4 μ m espesor de cada uno de los 70 bloques de tejido fijado en formol e incluido en parafina, que posteriormente se montaron en láminas tratadas con poly-L-lisina. A continuación, las secciones fueron desparafinadas en estufa a 45° C por 30 minutos y luego se colocaron en xilol por cinco minutos. Ulteriormente se hidrataron en un tren de concentraciones decrecientes de alcoholes (absoluto, 95, 80, 70 y 50 %) y agua destilada (Bologna-Molina et al., 2019; Carreón-Burciaga et al., 2018; Sánchez-Romero et al., 2021).

Para el desenmascaramiento de los epítopes antigénicos, se realizó la recuperación con solución de citrato de sodio de 10 mM (pH 6.2) (Borg Decloaker, RTU, Biocare Medical)

en una olla a presión en microondas a potencia máxima (750 W) por cinco minutos, luego se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se enjuagaron con agua destilada. Las peroxidasas endógenas se bloquearon con peróxido de hidrógeno al 0,9 % durante cinco minutos y a continuación se lavaron con agua destilada (Bologna-Molina et al., 2019; Carreón-Burciaga et al., 2018; Sánchez-Romero et al., 2021).

Como la técnica de IHQ fue realizada por capilaridad, luego de la recuperación antigénica y del bloqueo de las peroxidasas endógenas, las laminillas fueron montadas en placas cubiertas y colocadas en bastidores para la incubación con los anticuerpos. Para ello, previamente, durante cinco minutos, estuvieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS, Biocare Medical) a pH 7,4. Ulteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios monoclonales Ki-67 (mouse monoclonal Anti-Human Ki-67 Antigen, Clon MIB-1, dilución 1:100, Dako, Glostrup, Denmark, N° de catálogo M7240) y PHH3 (Serina 10) [rabbit monoclonal Anti-Human Histone H3 (p Ser10), Antibody (SA31-01), dilución 1:100, NBP2-67305, Novus Biologicals and Bio-Techne brand] durante 45 minutos. Posteriormente se lavaron con PBS, para luego ser incubadas con un anticuerpo secundario anti-ratón / anti-conejo biotinilado durante 30 minutos. Después, previo lavado intermedio con PBS, también durante 30 minutos, se incubaron con un complejo de estreptavidina-peroxidasa (LSA-B + Labeled streptavidin-biotin, Dako Corporation, Carpintería CA, USA) (Bologna-Molina et al., 2019; Carreón-Burciaga et al., 2018; Sánchez-Romero et al., 2021).

A continuación, para la visualización de los productos de la reacción antígeno-anticuerpo, se utilizó el sustrato 3,3'-diaminobencidina - H₂O₂ (Dako Corporation, Carpintería, CA, USA), luego se enjuagaron con agua destilada y posteriormente, se realizó la contra coloración con hematoxilina de Harris (Biopack, cod. 0832.08, Argentina) durante 90 segundos. Los excesos de hematoxilina fueron eliminados con agua corriente y seguidamente las laminillas fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de alcoholes (50, 70, 80, 95 y 100 %), se secaron a temperatura ambiente y finalmente sobre ellas se montaron los cubre objetos con resina líquida (Tissue-Tek®, Sakura, ref. 1408, Netherlands). Una vez completado el proceso, las láminas histológicas se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas y posteriormente fueron observadas con microscopio óptico (Bologna-Molina et al., 2019; Carreón-Burciaga et al., 2018; Sánchez-Romero et al., 2021).

Como control positivo del procesamiento IHQ, tanto para el anticuerpo Ki-67 como PHH3, se utilizaron muestras de carcinoma de mama. Asimismo, como control negativo, se realizó el procesamiento IHQ previamente descrito omitiendo la etapa de incubación con los anticuerpos primarios (Bologna-Molina et al., 2019; Carreón-Burciaga et al., 2018; Sánchez-Romero et al., 2021).

3.8. Evaluación Inmunohistoquímica

3.8.1. Ki-67

En este trabajo, se consideraron como células positivas para el anticuerpo Ki-67, aquellas células epiteliales neoplásicas que presentaban núcleo de color marrón, independientemente de la intensidad y del patrón de tinción (Cortegoso et al., 2017; Gadbaill et al., 2021; Jing et al., 2019). Las células con núcleo de color azul, debido a la contra tinción con la hematoxilina de Harris fueron consideradas negativas (Cortegoso et al., 2017; Gadbaill et al., 2021; Jing et al., 2019). En la figura 11 se muestran tres imágenes en aumentos progresivamente mayores, correspondientes a un caso de COCE bien diferenciado, donde se puede observar el patrón de inmunomarcación y las células con tinción nuclear positiva para el anticuerpo Ki-67.

Para la cuantificación de la inmunomarcación del anticuerpo Ki-67, se utilizaron las láminas de IHQ en formato digital. En cada caso, con el software *Motic VM 3.0 – Motic Digital Slide Assistant* (versión 1.0.7.46, Copyright Motic China Group Co., Ltd.2017) a una magnificación de 10x, se localizaron las áreas con mayor densidad de células epiteliales neoplásicas Ki-67 positivas, aumentando posteriormente y en forma progresiva hasta 40x. A este aumento, se realizó la captura de imagen, para su posterior cuantificación con la herramienta de conteo manual del software *Image J* (1.52v, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). En promedio se necesitaron siete imágenes de cada caso, para poder contabilizar 1000 células tumorales.

El grado de positividad para Ki-67 de cada COCE analizado, fue registrado como porcentaje de núcleos positivos en 1000 células tumorales. En la bibliografía, a este valor se le denomina índice de etiquetado para Ki-67 y es calculado con la fórmula: [(número de células Ki-67 positivas ÷ número total de células neoplásicas contabilizadas) x 100] (Ahmad et al., 2020; Chaudhari et al., 2018; Gadbaill et al., 2021; Surov et al., 2019).

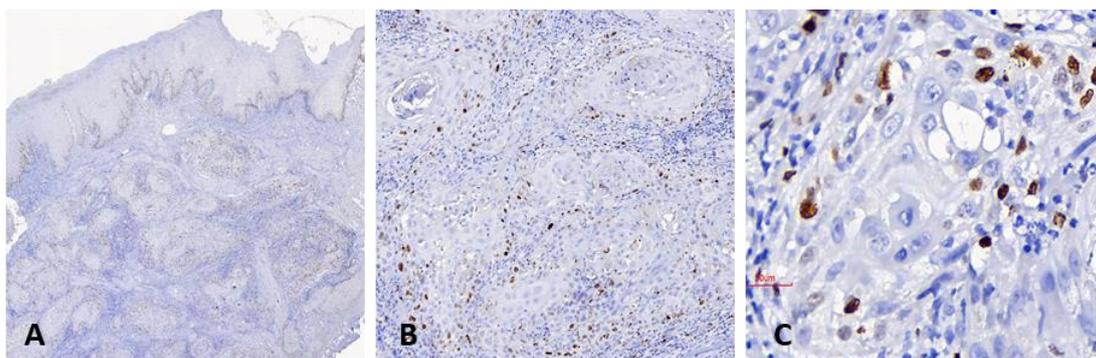


FIGURA 11. Expresión inmunohistoquímica de Ki-67 en un COCE bien diferenciado. A. Vista panorámica, se destaca la inmunomarcación elevada de Ki-67 en el estrato basal del epitelio de revestimiento, la cual es esperable y cumple el rol de control interno (magnificación 2.3x). B. Islotes de células tumorales, en ellos se puede observar la inmunoexpresión de Ki-67 en las células periféricas adyacentes al estroma tumoral (magnificación 10x). C. Células que inmunoexpresan Ki-67 con marcación nuclear marrón (magnificación 20x).

Asimismo, en función del grado de proliferación establecido por el índice de etiquetado para Ki-67, cada caso fue puntuado de 1 a 3, siguiendo la escala descrita por Chaudhari *et al.* (2018) y que se muestra en la tabla 3.

TABLA 3

Grado de expresión de Ki-67 en COCE según índice de etiquetado Ki-67

Expresión Ki-67	Grado de proliferación	Índice de etiquetado Ki-67
1	Alto	> 50 %
2	Moderado	30 - 50 %
3	Bajo	< 30 %

Reproducido de Chaudhari, M., Shukla, S., Tamhane, A., Acharya, S., & Bhake, A. (2018). Histopathological Grading of Oral Squamous Cell Carcinoma and Its Correlation with Ki-67 - a Proliferative Marker. *Journal of Evidence Based Medicine and Healthcare*, 5(22), 1690–1695. <https://doi.org/10.18410/jebmh/2018/355>

3.8.2. PHH3

Para el análisis de la inmunoexpresión del anticuerpo PHH3, se consideraron como células positivas, aquellas cuyos núcleos reunían las siguientes características: a) tinción marrón intensa y densa, b) ausencia de membrana nuclear intacta y c) cromatina condensada con morfología de FM normal o atípica (Bede Kovics *et al.*, 2018; Chow *et al.*, 2017; Ginter, Shin, Liu, Chen, & D'Alfonso, 2016; J.-Y. Kim *et al.*, 2017; Ladstein *et al.*, 2012; Olar, 2015; Puripat & Loharamtaweethong, 2019; Ramani *et al.*, 2015; van Steenhoven *et al.*,

2020). En la figura 12 se muestran FM-PHH3 positivas (FM-PHH3 +), normales y atípicas, halladas durante el análisis histológico de las muestras de nuestro estudio.

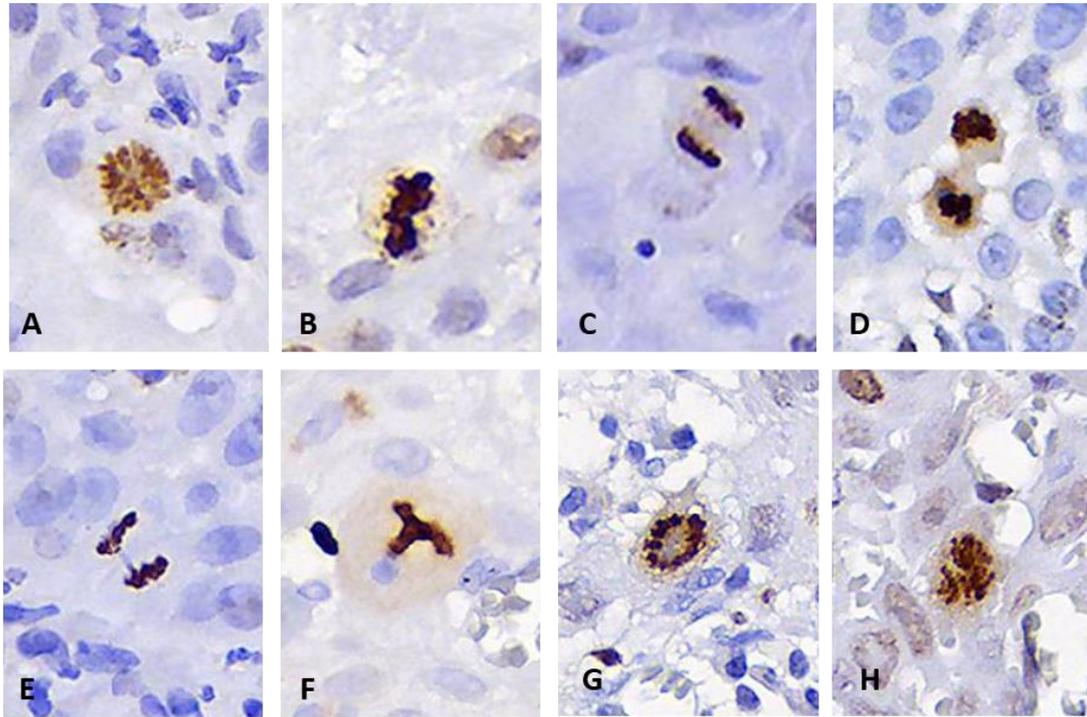


FIGURA 12. Figuras mitóticas PHH3 positivas en COCE, que cumplen con los criterios para su identificación: tinción nuclear marrón, ausencia de membrana nuclear y condensación de la cromatina. A-D Figuras mitóticas normales: A. Prometafase. B. Metafase. C. Anafase. D. Telofase. E-H Figuras mitóticas atípicas: E. Puente anafásico. F. Mitosis tripolar. G. Mitosis en anillo. H. Mitosis asimétrica. Magnificación 40x (A-H).

Los núcleos teñidos de marrón con membrana nuclear lisa, intacta y sin condensación cromosómica llamativa, fueron considerados inespecíficos y no se tuvieron en cuenta para la inmunocuantificación (Bede Kovics et al., 2018; Chow et al., 2017; Ginter et al., 2016; Ladstein et al., 2012; Puripat & Loharamtaweethong, 2019; van Steenhoven et al., 2020). En la figura 13 se señalan dentro de un círculo los núcleos teñidos de marrón, que al no cumplir con los requisitos anteriormente mencionados y detallados en la bibliografía, no se incluyeron en el conteo de células PHH3 positivas. En la misma imagen se señala con una flecha roja, las células que sí fueron incluidas como positivas para PHH3.

Para la cuantificación de las FM-PHH3 +, en cada caso, con el software *Motic VM 3.0 – Motic Digital Slide Assistant* (versión 1.0.7.46, Copyright Motic China Group Co., Ltd.2017) a una magnificación de 20x, se localizaron las áreas con mayor densidad de FM-PHH3 +, aumentando posteriormente a 40x, para individualizar cada una de ellas. A

este aumento se realizó captura de imagen, para posteriormente con la herramienta de conteo manual del programa *Image J* (1.52v, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) determinar el número de FM-PHH3 + presentes en 1000 células tumorales.

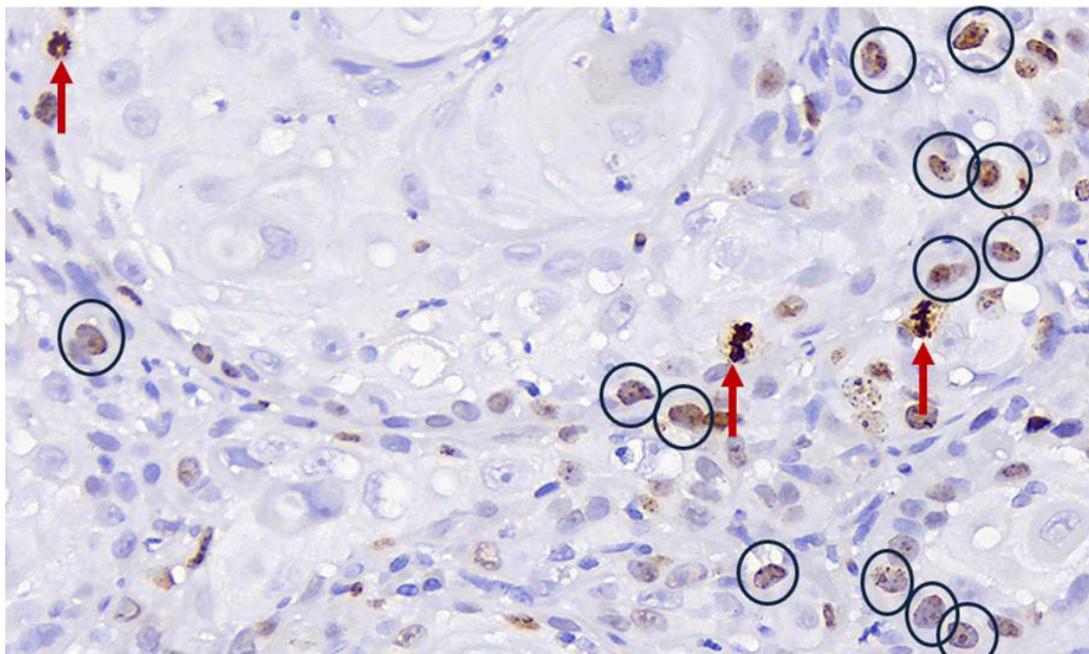


FIGURA 13. Imagen microscópica inmunohistoquímica de PHH3 en COCE. Las mitosis señaladas con flecha roja, corresponden a las imágenes consideradas como positivas en este estudio. Los núcleos con gránulos teñidos de marrón y membrana nuclear intacta englobados en círculos, no fueron contabilizados porque no corresponden a células en mitosis. Magnificación 20x.

El IAM calculado en función de las mitosis PHH3 + (IAM-PHH3 +), fue definido como porcentaje de mitosis PHH3 positivas observadas cada 1000 células tumorales, a través de la aplicación de la siguiente fórmula: $[(\text{número de mitosis PHH3 positivas} \div 1000 \text{ células}) \times 100]$.

3.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico consistió en la comparación de la expresión de los marcadores considerados, mediante estadísticas descriptivas (medias y desvío estándar) para las variables continuas y distribución de frecuencias para las variables categóricas. Para comparar la expresión de los marcadores según sexo, edad, localización y grado histológico se utilizó la comparación de medias basada en la Prueba *t* de Student para muestras independientes, cuando se trataron de dos grupos, y el modelo de Análisis de Varianza (ANOVA), en los casos donde se compararon tres o más grupos (Anscombe, 1948).

Adicionalmente se confeccionaron diagramas de dispersión para indagar sobre el grado de correlación lineal entre los tres marcadores, calculando en cada caso el coeficiente de correlación lineal de Pearson. El análisis de sobrevida se llevó a cabo mediante la confección de curvas de sobrevida construidas siguiendo la metodología de Kaplan y Meier (1958), mientras que la comparación de las mismas se realizó con el modelo de Cox (1972).

Todas las pruebas se llevaron a cabo con un nivel de significación del 5 %. Para el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico R (R Core Team, 2019) y en particular, para el análisis de sobrevida fueron utilizados los procedimientos incluidos en la librería survival (Emura et al., 2000).

3.9.1. Determinación del tamaño muestral

Para determinar el tamaño muestral se consideró estimar el riesgo relativo resultante de comparar la sobrevida de los pacientes con baja y elevada expresión de Ki-67. El valor de referencia que se utilizó fue extraído de Jing *et al.* (2019), siendo el mismo de 1893, el cual indica que la sobrevida de los pacientes con alta inmunoexpresión (superior al 43 %) presentan un riesgo de 89,3 % mayor que los de menor inmunoexpresión (inferior al 43 %).

Para calcular el tamaño muestral, se utilizó la siguiente fórmula presentada por David Schoenfeld (1983):
$$n = \frac{(z_{1-\alpha} + z_{\beta})^2}{P_A P_B \log(HR)^2}$$

En función de la cual, el tamaño muestral resultante fue de 61 casos. Este cálculo se realizó considerando un nivel de significación de 5 %, una potencia de 80 % y que se contaría con igual número de casos con baja y alta inmunoexpresión.

3.9.2. Calibración

Para la evaluación del grado de concordancia intra e interobservador, se utilizó el CCI. Se eligió este indicador debido a que los marcadores fueron registrados en una escala cuantitativa (Cortés-Reyes et al., 2010). Para la interpretación de los coeficientes resultantes fueron empleados los criterios definidos por Cicchetti (1994). Esta autora considera que el grado de acuerdo es pobre cuando los valores del CCI oscilan entre 0 y 0,4; moderado cuando los valores se localizan entre 0,4 y 0,59 y bueno cuando se ubican entre 0,6 y 0,74. Asimismo, cuando el coeficiente resultante se posiciona entre 0,75 y 1, el grado de acuerdo es calificado de excelente (Cicchetti, 1994).

3.10. Financiación

Para la ejecución de este trabajo, se utilizaron las instalaciones y los recursos humanos de los servicios de Anatomía Patológica y Patología Molecular de la Facultad de Odontología de la UdelaR. Además, este trabajo contó con el apoyo económico de 90000 pesos uruguayos obtenidos en el concurso de proyectos de investigación realizado en el marco de los 90 años de la Facultad de Odontología de la UdelaR, donde fue galardonado con el primer lugar. El dinero obtenido fue utilizado para la compra de los biomarcadores inmunohistoquímicos Ki-67 y PHH3.

3.11. Declaración de conflicto de intereses

Los responsables y participantes de este trabajo de investigación declaran no tener conflicto de intereses durante su desarrollo y ejecución.

Capítulo 4 | Resultados

Este capítulo presenta las observaciones y resultados obtenidos del proceso de investigación. En primer lugar, se realiza un análisis descriptivo de las variables clínico-patológicas del COCE (§ 4.1). En segundo lugar, se detallan la asociación estadísticamente significativa encontrada entre la inmunexpresión del Ki-67 y el grado histológico del COCE (§ 4.2). En tercer lugar, se describen los patrones de expresión de los anticuerpos estudiados; la correlación entre ellos y con el IAM (§ 4.3). Finalmente, en cuarto lugar, se presenta el análisis de sobrevida, donde además de establecer el tiempo de sobrevida global y la tasa de sobrevida a los cinco años de la muestra de estudio, se exponen los resultados obtenidos del estudio bivariado y multivariado de la posible asociación entre las variables dependientes y la sobrevida de los pacientes (§ 4.4)

4.1. Análisis descriptivo de las variables clínico-patológicas del carcinoma oral de células escamosas

La muestra de estudio quedó constituida por 62 casos de COCE diagnosticados en el Servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la UdelaR. La reducción en el n de la muestra se debe a que luego del procesamiento IHQ, debido a la falta de antigenicidad, fueron excluidos ocho casos.

De los 62 casos estudiados, el 64,6 % ($n = 39$) correspondieron a hombres y el 59,7 % de todos los casos eran mayores de 65 años al momento del diagnóstico. En cuanto a la localización, la mucosa bucal (encía, reborde alveolar y extensiones a trigono retromolar y mejilla) representó el 43,5 % ($n = 27$), seguido en orden decreciente por lengua (25,8 %, $n = 16$), paladar (21,0 %, $n = 13$) y piso de boca (9,7 %, $n = 6$).

En cuanto a la graduación histológica, el 61,3 % ($n = 38$) correspondieron a COCE moderadamente diferenciados (Grado 2), el 27,4 % ($n = 17$) a COCE bien diferenciados (Grado 1) y solo el 1,3 % ($n = 7$) fueron tipificados como COCE pobremente diferenciados (Grado 3). En la tabla 4 se presentan los datos anteriormente detallados.

4.2. Asociación entre las características clínico-patológicas y los biomarcadores Ki-67 y PHH3

En función de los valores obtenidos, como se puede ver en la tabla 4, se encontró una relación estadísticamente significativa entre el grado histológico del COCE y la inmunexpresión de Ki-67 ($p 0,004$). Así, como se ejemplifica en la figura 14, en los

COCE bien diferenciados se observó una menor expresión de Ki-67 (media 28,97), elevándose en los COCE moderadamente diferenciados (media 41,27) y alcanzando la mayor expresión en los COCE pobremente diferenciados (media 43,37). Sin embargo, con el biomarcador PHH3 no se constató una relación similar (p 0,564). Tampoco se pudo demostrar una correlación estadísticamente significativa entre los biomarcadores estudiados y las variables independientes, sexo, edad y localización.

También es de destacar, que el 70 % de los COCE de la muestra, presentaron un grado de proliferación bajo o moderado (índice de etiquetado Ki-67 menor o igual a 50).

TABLA 4

Asociación entre las características clínico-patológicas del COCE y las variables dependientes: IAM, inmunoexpresión de Ki-67 y PHH3

	<i>n</i>	Ki-67			PHH3			IAM		
Global	62	M 38,14 (DE 14,44)			M 1,34 (DE 0,62)			M 0,97 (DE 0,55)		
<i>Sexo</i>		M	DE	<i>p</i>	M	DE	<i>p</i>	M	DE	<i>p</i>
Femenino	23 (35,4 %)	39,31	16,75	0,651	1,31	0,59	0,777	1,04	0,43	0,392
Masculino	39 (64,6 %)	37,45	13,08		1,36	0,65		0,93	0,61	
<i>Edad</i>										
Menor a 65	25 (40,3 %)	39,31	15,33	0,441	1,33	0,67	0,853	0,98	0,56	0,891
Mayor a 65	37 (59,7 %)	36,40	13,14		1,36	0,56		0,96	0,55	
<i>Localización agrupada</i>										
Lengua	16 (25,8 %)	35,34	14,75	0,785	1,22	0,59	0,508	0,81	0,35	0,559
Mucosa oral	27 (43,5 %)	39,10	15,56		1,47	0,71		1,01	0,54	
Paladar	13 (21,0 %)	40,35	11,87		1,21	0,47		1,09	0,69	
Piso de boca	6 (9,7 %)	36,48	15,78		1,35	0,55		1,93	0,73	
<i>Grado histológico</i>										
1	17 (27,4 %)	28,97	13,72		1,19	0,63		1,00	0,54	
2	38 (61,3 %)	41,27	12,74	0,004*	1,43	0,62	0,564	0,91	0,52	0,654
3	7 (1,3%)	43,37	16,87		1,21	0,61		1,21	0,70	

Nota: M (media), DE (desvío estándar). En negrita se muestran los valores significativos. * $p \leq 0,05$

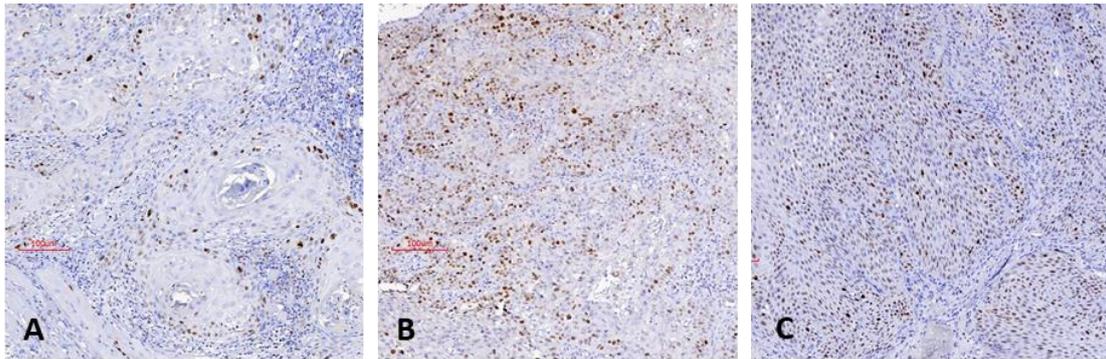


FIGURA 14. Relación entre el grado histológico del COCE y la inmunoexpresión de Ki-67. En estas imágenes se puede observar cómo aumenta la inmunomarcación de Ki-67 a medida que disminuye el grado de diferenciación histológica del COCE. A. COCE bien diferenciado (Grado 1). B. COCE moderadamente diferenciado (Grado 2). C. COCE pobremente diferenciado (Grado 3). Magnificación 10x (A-C).

4.3. Patrones de expresión de Ki-67 y PHH3

Al correlacionar las variables Ki-67 y PHH3, se encontró una relación significativa (p 0,041), leve y significativamente distinta de cero, como se muestra en el diagrama de dispersión de la figura 15.

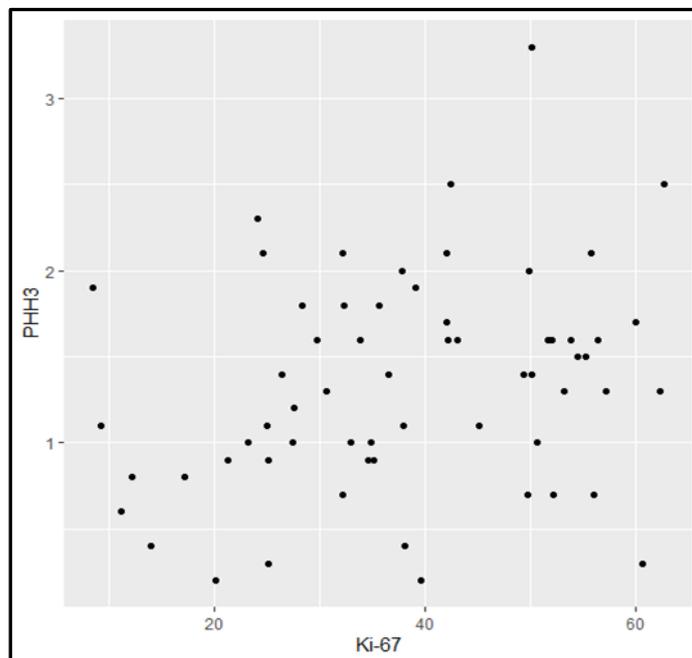


FIGURA 15. Diagrama de dispersión que muestra la existencia de una correlación significativa, pero baja, entre PHH3 y Ki-67 (r 0,259 / p 0,041)

En general, el grado de expresión del anticuerpo PHH3 fue marcadamente menor que el de Ki-67, con una media de 1,34 (DE 0,62) y de 38,14 (DE 14,44) respectivamente.

Adicionalmente, el anticuerpo PHH3 se caracterizó porque además de presentar un rango estrecho de inmunomarcación (rango = 3, 1; límite inferior = 0,2 y límite superior = 3,3), la intensidad de la tinción fue fuerte y se correlacionó positivamente con la morfología de los núcleos según las diferentes etapas de la mitosis. En cambio, el anticuerpo Ki-67 demostró un rango de expresión amplio (rango = 54,2; límite inferior = 8,5 y límite superior = 62,7) con patrones e intensidad de tinción variable y en algunos casos, además, se observó inmunoexpresión positiva por parte de células estromales. En la figura 16 se puede apreciar las diferencias anteriormente descritas en relación a los patrones de inmunoexpresión de los anticuerpos estudiados.

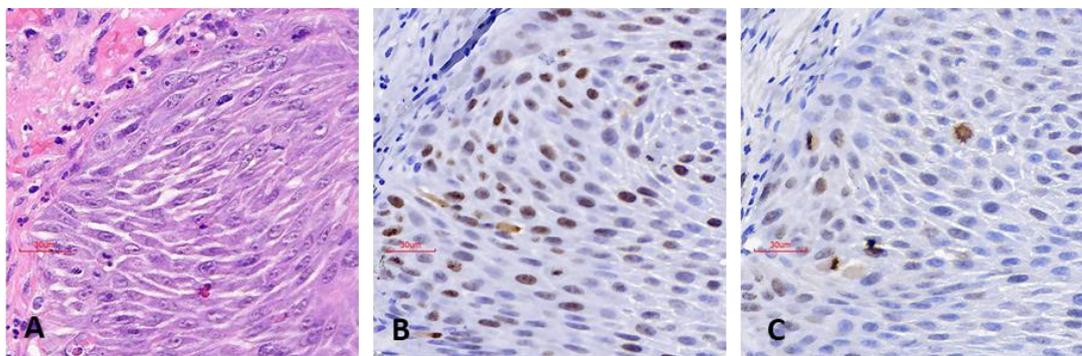


FIGURA 16. Comparación de la misma área tumoral en láminas teñidas con H-E e IHQ para Ki-67 y PHH3. A. Lámina de H-E donde se pueden identificar dos FM. B. Lámina de IHQ para Ki-67, donde se observan varias células positivas con tinción nuclear de intensidad variables. C. Lámina de IHQ para PHH3, en la que se visualizan un menor número de células positivas en comparación con las láminas de IHQ para Ki-67, identificándose cuatro FM que inmunoexpresan el anticuerpo PHH3. Magnificación 20x (A-C).

Al analizar la relación entre los biomarcadores y el IAM, no se encontró suficiente evidencia que indique una correlación significativa con el Ki-67 (p 0,194). En cambio, en función del coeficiente de correlación calculado (r 0,450) con un p -valor $< 0,001$, sí se observó una asociación estadísticamente significativa entre el IAM y la PHH3. El diagrama de dispersión de la figura 17 demuestra gráficamente la correlación existente entre IAM y la PHH3 y su ausencia entre IAM y el Ki-67.

Asimismo, el anticuerpo PHH3 nos permitió identificar más fácilmente las FM positivas y los campos con mayor densidad mitótica, pudiendo por lo tanto constatar su rol como marcador específico de mitosis. De hecho, como se muestra en la tabla 5, en 44 casos, el número de mitosis identificadas por IHQ para PHH3 fue mayor al obtenido en base al reconocimiento de sus características morfológicas en láminas teñidas con H-E. Sin

embargo, en 12 muestras tisulares se identificó un mayor número de FM en las láminas de H-E que en las de IHQ y en los seis restantes se tipificaron el mismo número de FM independientemente de la técnica empleada.

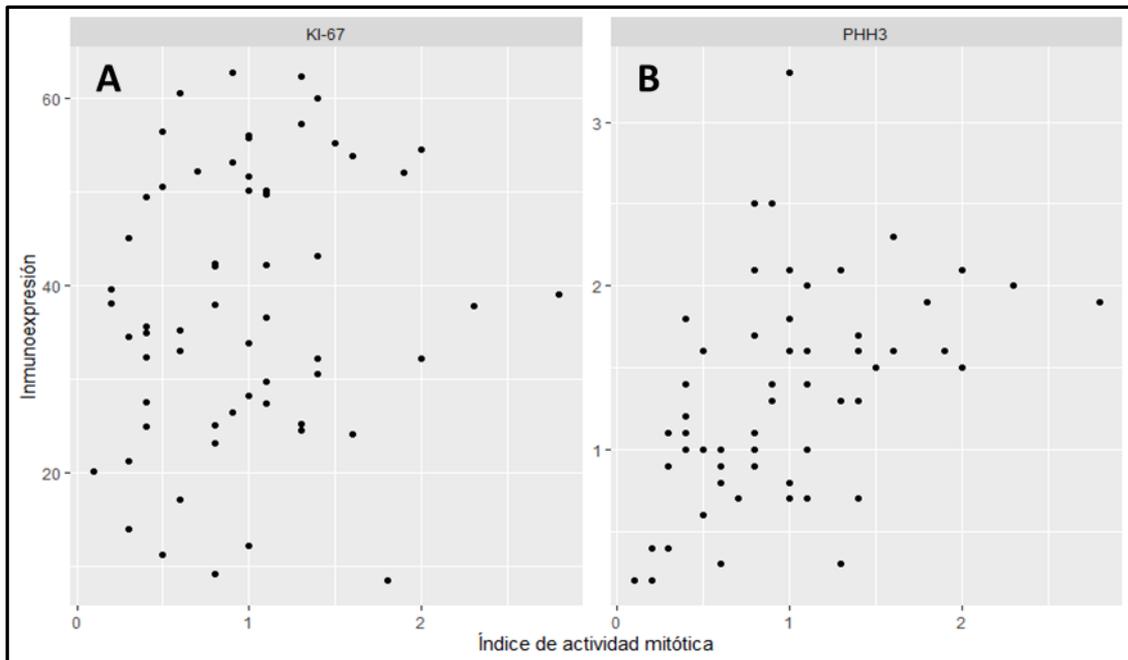


FIGURA 17. Diagrama de dispersión. A. Representación gráfica que muestra ausencia de correlación significativa entre Ki-67 y el IAM (r 0,167 / p 0,194). B. Como se muestra en este diagrama, si se encontró una correlación significativa entre PHH3 y el IAM (r 0,450 / p < 0,001).

TABLA 5

FM positivas para PHH3 en 1000 células tumorales en comparación con las FM reconocidas en base a sus características morfológicas en láminas teñidas con H-E

Parámetro	Número de casos	Porcentaje
Mayor número de FM positivas a PHH3 que las identificadas en H-E	44	70,9 %
Coincidencia en el número de FM identificadas con PHH3 y H-E	6	9,7 %
Menor número de FM positivas PHH3 que las identificadas en H-E	12	19,4 %
Total	62	100

4.4. Análisis de sobrevida

Al realizar el análisis de sobrevida de los pacientes con COCE, se observó el evento de fallecimiento en 48 pacientes, mientras que 14 pacientes llegaron al final del período de seguimiento, a los que se les asignó un indicador de censura. Se construyó la curva de sobrevida —que se presenta en la figura 18—, mediante el procedimiento de Kaplan-Meier, a partir de la cual se estimó que el tiempo mediano de sobrevida global fue de 1,51 años (0,92; 2,69) y la tasa de sobrevida a los cinco años, sin considerar el estadio de la enfermedad fue del 27 % (0,18; 0,41).

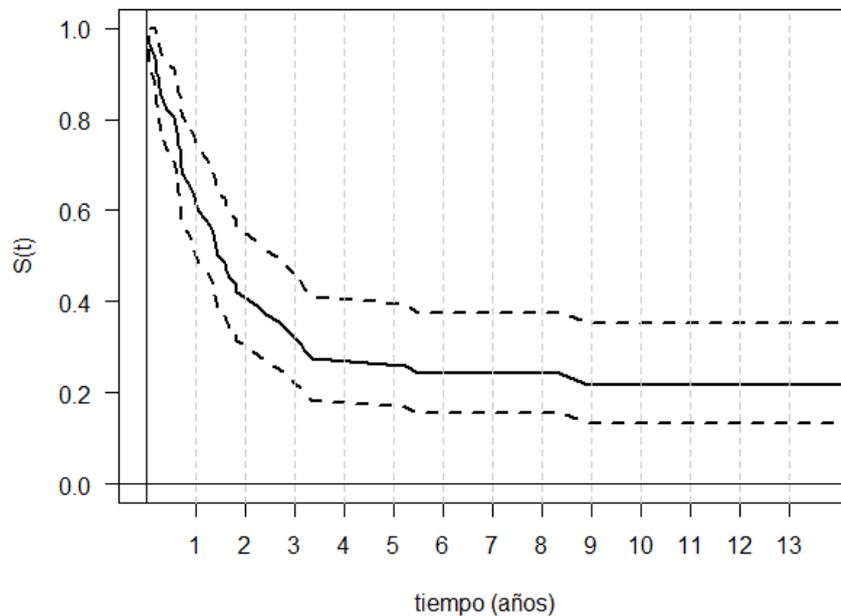


FIGURA 18. Curva de Kaplan-Meier de sobrevida global.

Asimismo, se efectuó el estudio de la posible asociación entre cada marcador (Ki-67, PHH3 e IAM) y la sobrevida de los pacientes, tanto de forma bivariada (asociación de cada marcador con la sobrevida) como multivariada (asociación de cada marcador y las demás variables independientes con la sobrevida). En ambos casos, la metodología estadística empleada fue el modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox (1972). La representación de los datos obtenidos se realizó a través de curvas de sobrevida de Kaplan-Meier (1958). En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos y en las figuras 19 y 20 las gráficas correspondientes.

De este análisis, en sus dos formas (bivariada y multivariada), se pudo observar cierta asociación significativa entre el tiempo de sobrevida y la expresión de PHH3 (p 0,016). También se observa una relación significativa y similar con el IAM (p 0,031),

constatándose que, a mayores valores de este, así como de la inmunoexpresión de PPH3, menor es el tiempo de sobrevida. En cambio, para el KI-67, no se encontró una asociación estadísticamente significativa (p 0,295).

TABLA 6

Análisis de la asociación entre KI-67, PPH3 e IAM y sobrevida de los pacientes de forma bivariada y multivariada

n	bivariado		multivariado	
	HR	p	HR	p
KI-67	1,010 (0,991; 1,030)	0,295	1,001 (0,983; 1,128)	0,605
PPH3	1,061 (1,011; 1,113)	0,016*	1,052 (1,002; 1,105)	0,042*
IAM	1,056 (1,005; 1,110)	0,031*	1,054 (1,001; 1,109)	0,045*

Nota: HR (*hazard ratio*). Los valores que aparecen entre paréntesis adjuntos al HR, corresponden al intervalo de confianza del 95 %. En negrita se muestran los valores significativos. * $p \leq 0,05$

A continuación, se detalla la interpretación de los valores de *hazard ratios* (HR) mostrados en la tabla 5:

- a) Estudio bivariado: los HR PPH3 [1,061 (1,011; 1,113)] y HR IAM [1,056 (1,005; 1,110)], indican que por cada décima que aumenta la inmunoexpresión de PPH3 y el IAM, el riesgo de fallecer se eleva un 6,1 % y 5,6 %, respectivamente.
- b) Estudio multivariado: en este caso los HR PPH3 [1,052 (1,002; 1,105)] y HR IAM [1,054 (1,001; 1,109)] indican que por cada décima que aumenten los marcadores, dejando las demás variables constantes, el riesgo de fallecer aumenta un 5,2 % y 5,4 %, respectivamente.

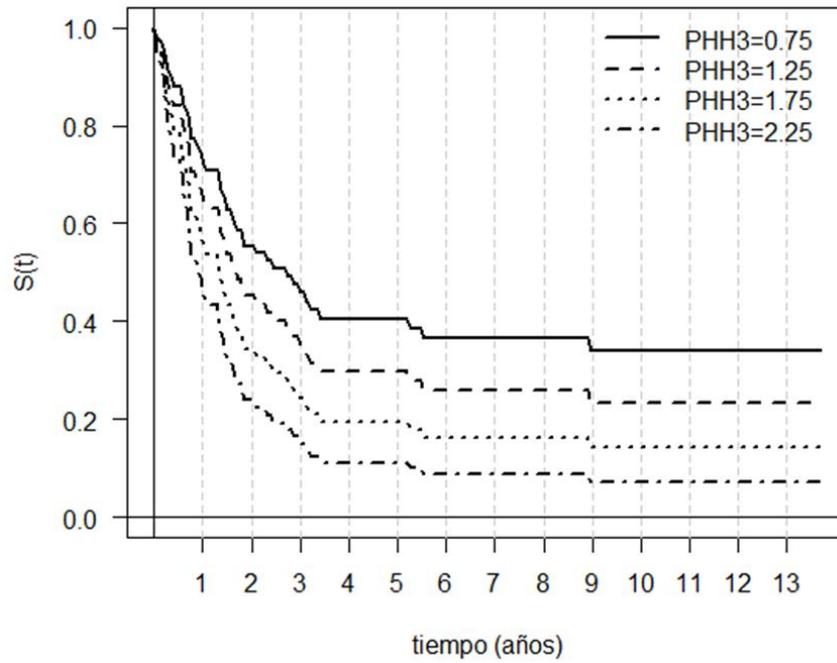


FIGURA 19. La Curva de Kaplan-Meier grafica la asociación entre sobrevida y la expresión de PHH3. La expresión alta de PHH3 se asoció significativamente con un período de sobrevida más corto.

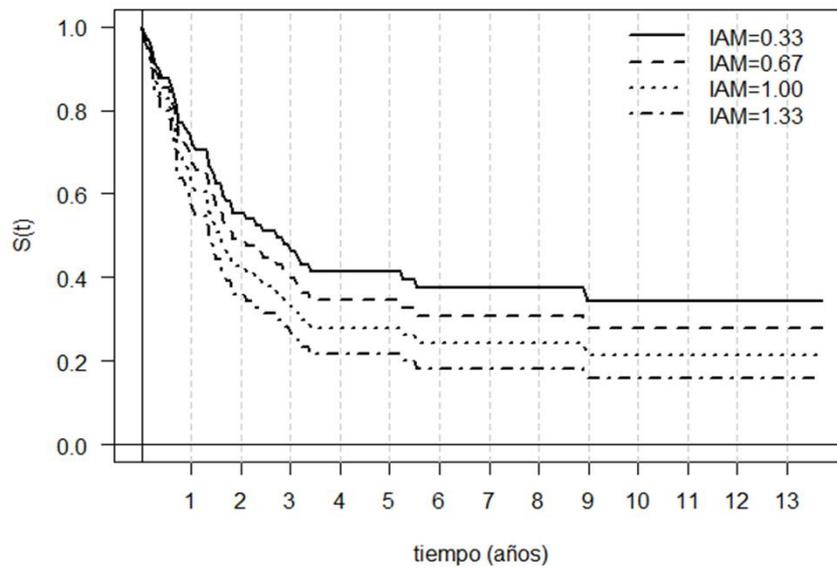


FIGURA 20. La Curva de Kaplan-Meier grafica la asociación entre sobrevida y el IAM. El aumento en el IAM se correlacionó significativamente con un período de sobrevida más corto.

Capítulo 5 | Discusión

En este capítulo se realiza el análisis de los resultados obtenidos y su correlación con los descriptos por otros autores en trabajos de investigación previos. En primer lugar, destacamos la proliferación celular como un evento ampliamente estudiado en las neoplasias malignas, particularmente en el COCE y en ese contexto ubicamos el biomarcador PHH3 como objeto de estudio original. También detallamos los criterios que determinaron la elección de las otras variables dependientes: Ki-67 y el IAM. En segundo lugar, analizamos los principales resultados obtenidos con respecto al Ki-67, su correlación con la graduación histopatológica del COCE y la ausencia de la misma con la sobrevida. En tercer lugar, describimos las diferencias encontradas en el estudio en relación a la inmunexpresión de los biomarcadores, la asociación estadística significativa entre ambos y la falta de correlación entre la PHH3 y la tipificación histológica de las muestras. En cuarto lugar, analizamos los resultados obtenidos con respecto al IAM y los marcadores de IHQ: la relación estadística significativa con la PHH3 y la ausencia de la misma con el Ki-67. En quinto lugar, detallamos el principal resultado — a nuestro criterio — de este trabajo de investigación: la relación estadísticamente significativa entre la inmunexpresión de PHH3 y la sobrevida de los pacientes con COCE, debido a que no encontramos en la bibliografía estudios que lo hayan analizado previamente. Finalmente enumeramos las limitaciones de este trabajo.

La proliferación celular es un proceso biológico esencial, clave en el crecimiento y conservación de la homeostasis tisular (Gadbail et al., 2021; Van Diest et al., 1998). Asimismo, la pérdida del control de este proceso, fue reconocido por Hanahan y Weinberg (2000, 2011) como un *Hallmark of Cancer*, debido a su rol fundamental en el desarrollo de las neoplasias malignas (Chitra et al., 2019; Feitelson et al., 2016; Hanahan & Weinberg, 2011; Ladstein et al., 2012; Takkem et al., 2018).

De hecho, la evaluación de la proliferación celular en el cáncer se considera un parámetro histológico muy importante tanto en la definición del comportamiento biológico tumoral, particularmente del potencial de recidiva local y metastásico, así como en la determinación del pronóstico individualizado a cada paciente (Chitra et al., 2019). En este sentido, con la finalidad de poder cuantificar este parámetro en cada tumor en particular, se han desarrollado diferentes métodos y marcadores de proliferación, entre los cuales, los más utilizados son la evaluación del número de mitosis (IAM) y la inmunexpresión

de Ki-67, pero a ambos métodos se les objeta el presentar una importante variabilidad intra e interobservador (Chitra et al., 2019; Khieu et al., 2019; J.-Y. Kim et al., 2017; Lea et al., 2021).

Sin embargo, en el COCE, la evaluación de la proliferación tumoral no forma parte del sistema de estadificación actual (Almangush et al., 2020). No obstante, constituye una línea de investigación, como tantas otras, justificada en parte por la pobre tasa de sobrevida que presentan los pacientes diagnosticados, aún en estadios tempranos de la enfermedad y por la necesidad de poder identificar aquellos casos que tienen un mayor riesgo de recurrencia (Gadbail et al., 2021; D. W. Kim et al., 2019; Takkem et al., 2018). Realidad que no ha mejorado en los últimos años, a pesar de los avances en las técnicas de diagnóstico y modalidades de tratamiento, que pone en cuestionamiento el sistema de estadificación vigente como responsable de tratamientos insuficientes o innecesarios, al no poder reflejar adecuadamente el comportamiento biológico de cada COCE en particular (Gadbail et al., 2021; D. W. Kim et al., 2019). De hecho, en este trabajo, el tiempo mediano de sobrevida global fue solo de 1,51 años (0,92; 2,69) y la tasa de sobrevida a los cinco años sin considerar el estadio de la enfermedad fue del 27 % (0,18; 0,41).

Si bien, hasta ahora no se ha podido determinar un panel de marcadores moleculares con valor pronóstico en el COCE; aquellos utilizados para evaluar la capacidad proliferativa tumoral—cómo se ha mencionado anteriormente—son considerados por algunos autores como buenos candidatos, complementarios a la evaluación pronóstica basada en parámetros convencionales (Bhuyan et al., 2018; Takkem et al., 2018). En base a esta línea de investigación fue desarrollado este trabajo, con el objetivo principal de conocer el comportamiento del biomarcador PHH3 en el COCE, utilizando como parámetros de comparación el Ki-67 y el IAM.

El interés por el estudio del anticuerpo PHH3, reconocido como un biomarcador de proliferación celular y específico de células en mitosis, surge luego de analizar la bibliografía, donde observamos que el mismo, en comparación con otros biomarcadores de proliferación celular ha sido poco estudiado (Hao et al., 2018; Ramani et al., 2015). Sin embargo, en los últimos años ha aumentado el número de investigaciones que lo tienen como objeto de estudio en diferentes tumores malignos, recalándose en varias de ellas ciertas ventajas de PHH3 como marcador de proliferación celular con respecto al Ki-67 (Khieu et al., 2019; J.-Y. Kim et al., 2017; Ohashi et al., 2018). Así, una de las

principales características que lo destacan, es el presentar una inmunomarcación clara y bien contrastada, limitada a las células que se encuentran en la fase M del ciclo celular, mientras que las células en interfase no lo expresan o lo hacen mínimamente (Khieu et al., 2019; J.-Y. Kim et al., 2017; Ohashi et al., 2018). Además, estudios recientes han demostrado que la inmunocuantificación de este biomarcador tiene valor pronóstico en diferentes tumores malignos sólidos (Bedekovics et al., 2018; Chow et al., 2017; Hao et al., 2018; Hendzel et al., 1997; J.-Y. Kim et al., 2017; Laflamme et al., 2020; Olar, 2015; Siriweera & Zardawi, 2016). No obstante, el comportamiento de PHH3 en el COCE ha sido escasamente estudiado y particularmente su relación con la tasa de sobrevida, no ha sido hasta ahora objeto de investigación.

En cambio, en el COCE, a diferencia del anticuerpo PHH3, uno de los biomarcadores de proliferación celular que sí ha sido ampliamente estudiado es el Ki-67 (Ahmad et al., 2020; Bhuyan et al., 2018; Chaudhari et al., 2018; Cortegoso et al., 2017; Gadbail et al., 2021; Jing et al., 2019; Padma et al., 2019; Takkem et al., 2018). Sin embargo, los estudios sobre el valor de la expresión de este biomarcador en la determinación de la sobrevida de los pacientes con COCE han mostrado resultados contradictorios (Lopes et al., 2017; Xie et al., 2016). De hecho, en nuestro trabajo, no encontramos una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de Ki-67 y la sobrevida de los pacientes (p 0,295). En la misma línea, son los resultados obtenidos por Cortegoso *et al.* (2017), Brockton *et al.* (2017) y González-Moles *et al.* (2010).

Así, González-Moles *et al.* (2010), luego de estudiar 79 COCE, correspondientes a 69 pacientes, concluyeron que el Ki-67 no puede ser considerado un biomarcador de valor pronóstico en el COCE. Estos autores argumentan que la falta de asociación entre este biomarcador y el comportamiento biológico del tumor se debería a que el Ki-67 solamente es expresado por una pequeña fracción de las células tumorales —las que se encuentran en ciclo— responsables del crecimiento tumoral y no por aquellas otras subpoblaciones tumorales que han adquirido una diferenciación terminal (Gonzalez-Moles et al., 2010). Estas últimas, que no inmunoexpresan Ki-67, sí condicionarían el pronóstico, debido a que si bien no están en proliferación activa, han desarrollado diferentes características fenotípicas, como la capacidad de invasión y metástasis, que hacen al comportamiento biológico maligno del tumor (Gonzalez-Moles et al., 2010).

Adicionalmente, en consonancia con las observaciones de González-Moles *et al.* (2010), en nuestro estudio observamos que en el 70 % de los COCE analizados (44 muestras), el índice de etiquetado para Ki-67 fue menor al 50 %. Por lo tanto, en un número importante de casos, más de la mitad de las células contabilizadas no inmunoexpresaron Ki-67, o sea, no se encontraban en proliferación activa.

Sin embargo, es importante destacar, que investigaciones recientemente publicadas, como la de Gadbail *et al.* (2021) y Jing *et al.* (2019), reconocen la inmunocuatificación del Ki-67 como un factor pronóstico confiable en el COCE. Estos autores hallaron una relación significativa entre el grado de inmunomarcación de Ki-67 y la sobrevida, luego de estudiar la expresión de Ki-67 en grandes cohortes, de 217 y 298 casos de COCE respectivamente.

Continuando con los resultados obtenidos en nuestro trabajo con respecto al Ki-67, nosotros observamos una relación significativa entre el grado de diferenciación histológica del COCE y la inmunoexpresión de Ki-67 (p 0,004). Así, registramos que a medida que disminuye el grado de diferenciación histológica, mayor número de células expresan Ki-67. Este resultado concuerda con los presentados en trabajos previos, como el de Gadbail *et al.* (2021), Ahmad *et al.* (2020), Nazar *et al.* (2020), Dash *et al.* (2020), Jing *et al.* (2019), Padma *et al.* (2019), Chaudhari *et al.* (2018), Takkem *et al.* (2018) y Gonzalez-Moles *et al.* (2010). Por lo tanto, esta relación significativa, apoya al Ki-67 como un biomarcador potencialmente útil para la clasificación histopatológica del COCE, concepto que fue previamente descrito por Gadbail *et al.* (2021).

Asimismo, al estudiar la correlación entre las variables Ki-67 y PPH3, observamos una relación significativa entre ellas (p 0,041); esperable por ser ambos biomarcadores de proliferación celular expresados por la fracción de células que se encuentran transcurriendo por el ciclo celular en forma activa. Esta correlación fue descripta también en carcinoma orofaríngeo por Siriweera y Zardawi (2016), cáncer de mama por Kim *et al.* (2017) y linfoma folicular por Bedekovics *et al.* (2018). Sin embargo, a diferencia de la correlación estadísticamente significativa que encontramos entre la inmunoexpresión del Ki-67 y el grado de diferenciación histológica, no pudimos establecer una relación similar con el biomarcador PPH3 (p 0,564).

Al igual que las observaciones descriptas en trabajos previos, como el de Ohashi *et al.* (2018) en cáncer de mama, en nuestro trabajo constatamos que el anticuerpo PPH3 se

expresó de forma significativa en menos células que el Ki-67, lo que demuestra una mejor selectividad por una fase específica del ciclo celular, al identificar básicamente las células que se encuentran a finales de la fase G₂ y M, a diferencia del Ki-67 que es expresado por las células en ciclo, tanto en interfase como en mitosis (Dias et al., 2021; Khieu et al., 2019; J.-Y. Kim et al., 2017; Puripat & Loharamtaweethong, 2019; van Steenhoven et al., 2020).

Además, evaluamos y comparamos los patrones de inmunomarcación de los biomarcadores estudiados. En este sentido, en las láminas de Ki-67 pudimos constatar, como se describe en la bibliografía, una de las limitantes en su uso como biomarcador, como es el presentar una inmunomarcación nuclear con una amplia gama de intensidades, factor que contribuye a una baja reproducibilidad (Elmaci et al., 2018; J.-Y. Kim et al., 2017; Lea et al., 2021; Ramani et al., 2015; van Steenhoven et al., 2020). En cambio, PHH3 mostró pequeñas variaciones en la intensidad de expresión y como solo deben ser reconocidas como positivas aquellas células con núcleo teñido fuertemente de marrón, sin membrana nuclear, con cromatina condensada y morfología de FM normal o atípica, en términos generales resultó más fácil su identificación y cuantificación (Bedekovics et al., 2018; Chow et al., 2017; Ginter et al., 2016; J.-Y. Kim et al., 2017; Ladstein et al., 2012; Olar, 2015; Puripat & Loharamtaweethong, 2019; Ramani et al., 2015; van Steenhoven et al., 2020).

Sin embargo, es importante destacar, que como también ha sido descrito en otros trabajos que estudiaron la inmunomarcación de este anticuerpo, en algunas muestras la inmunocuantificación de las células PHH3 positivas no fue sencilla, debido a la presencia de células con núcleos teñidos de marrón pero con conservación de la membrana nuclear, las que fueron tipificadas como inespecíficas siguiendo los parámetros descritos en la bibliografía (los criterios utilizados para diferenciar a las mismas de las células PHH3 positivas, son presentados en el capítulo de Metodología, apartado 3.8.2) (Bedekovics et al., 2018; Chow et al., 2017; Ginter et al., 2016; Ladstein et al., 2012; Puripat & Loharamtaweethong, 2019; van Steenhoven et al., 2020). De acuerdo con Bedekovics *et al.* (2018), estas células no deben ser consideradas en el recuento, porque corresponderían a células en fase G₂, donde se inicia la fosforilación de la histona H3 y no a células en fase M, las que si presentan una fosforilación completa de la histona H3. En algunos casos, como se puede observar en la figura 13, el número de células inespecíficas superaron ampliamente a las células cuantificadas como positivas para PHH3.

En este trabajo para poder evaluar el comportamiento del anticuerpo PHH3 como biomarcador de proliferación celular en el COCE, además del Ki-67, el otro parámetro de comparación que utilizamos fue el IAM. La inclusión del mismo, se debe en primer lugar, a que es considerado el método más antiguo para la determinación de la capacidad proliferativa de las neoplasias malignas (Elmaci et al., 2018; van Steenhoven et al., 2020).

En segundo lugar, la incorporación de esta variable dependiente se justifica por el hecho de que uno de los argumentos a favor de la PHH3, es que permite superar las limitaciones de precisión y reproducibilidad del IAM, al facilitar el reconocimiento de las áreas mitóticamente activas y la diferenciación de células en mitosis de las *mitotic-like figures* (Chow et al., 2017; Donovan et al., 2021; Jin et al., 2019; Khieu et al., 2019; J.-Y. Kim et al., 2017; Lea et al., 2021; Olar, 2015). De hecho, para poder comparar las tres variables dependientes, utilizamos para la cuantificación de los biomarcadores el mismo criterio que se emplea para el cálculo del IAM. Así, en todos los casos, tanto el recuento de FM en láminas de H-E, como de células positivas para Ki-67 y de FM positivas para PHH3, se realizó en base a 1000 células tumorales (Kadoo et al., 2018).

Si bien, hay varios trabajos que describen una relación significativa entre el IAM y la cuantificación de Ki-67, como el de Khieu *et al.* (2019) en el linfoma folicular, el de Kim *et al.* (2017) en cáncer de mama invasor y el de Kadoo *et al.* (2018) en COCE, nosotros en este trabajo no la pudimos encontrar ($p 0,194$). Particularmente, en el COCE, los trabajos que refieren una correlación significativa entre estas dos variables, estudiaron su comportamiento en el frente de invasión tumoral, parámetro que no fue considerado en este estudio (Buch, Haldar, Kheur, Chandanwale, & Kumar, 2019; Kadoo et al., 2018).

Sin embargo, si observamos una asociación estadísticamente significativa entre el IAM y la PHH3 ($p < 0,001$), descrita previamente por Puripat *et al.* (2018) en meningiomas, por Bedekovics *et al.* (2018) en linfoma folicular y por Ginter *et al.* (2016) en tumores fibroepiteliales de mama. La misma era esperable debido a que el anticuerpo PHH3 es un biomarcador IHQ específico de FM y porque se utilizó el mismo criterio de cuantificación, tanto en las láminas de H-E para el cálculo del IAM, como en las de IHQ (Khieu et al., 2019; J.-Y. Kim et al., 2017; Ohashi et al., 2018).

También pudimos constatar la especificidad de PHH3 como biomarcador de FM y las limitaciones que presenta el cálculo del IAM en las láminas de H-E, debido a que en el 70,9 % de los casos estudiados, el IAM obtenido en la lámina de IHQ para el anticuerpo

PHH3 fue superior al calculado en la correspondiente lámina de H-E. Esta observación fue descrita en estudios previos como el de Sudarshini *et al.* (2018) en displasia epitelial oral y COCE. La razón del menor número de FM identificadas en las láminas de H-E, se debe probablemente a las dificultades inherentes a la identificación de las zonas de mayor densidad mitótica en los cortes procesados de forma rutinaria (Chow *et al.*, 2017; Donovan *et al.*, 2021; Jin *et al.*, 2019; Khieu *et al.*, 2019; J.-Y. Kim *et al.*, 2017; Lea *et al.*, 2021; Olar, 2015). Otra limitación que puede explicarlo también, es la dificultad para reconocer las FM en sus distintas fases; particularmente la profase no suele ser identificada en los cortes teñidos con H-E y observados con microscopía óptica (Donovan *et al.*, 2021; Sudarshini *et al.*, 2018; Tandon *et al.*, 2016). En cambio, en las muestras de IHQ para PHH3 puede ser reconocida, al inmunoexpresar este anticuerpo (van Steenhoven *et al.*, 2020).

Finalmente, a diferencia del Ki-67, en este trabajo pudimos demostrar una relación significativa entre la expresión de PHH3 y el tiempo de supervivencia de los pacientes con COCE (p 0,016). Si bien, la misma fue previamente establecida en cáncer de mama invasor y urogenital, no encontramos en la bibliografía trabajo que haya estudiado previamente esta relación en el COCE (Hao *et al.*, 2018; J.-Y. Kim *et al.*, 2017).

5.1. Limitaciones del estudio

Consideramos como limitaciones de nuestro trabajo:

En primer lugar, el tamaño de la muestra, constituida solamente por 62 casos.

En segundo lugar, como nuestra muestra de estudio estuvo mayormente constituida por biopsia incisionales, debido a su tamaño y profundidad, no consideramos como parámetro particular de evaluación el frente de invasión tumoral. Sector que mejor refleja el comportamiento biológico del tumor y que es considerado particularmente en varios estudios que evalúan Ki-67.

Otra limitación importante es que no contamos con la información del estadio TNM de los casos analizados, parámetro clínico de valor pronóstico y terapéutico. Hubiese sido muy interesante poder correlacionar nuestras variables con el mismo.

Finalmente, si bien se realizó la calibración intra e interobservador hasta alcanzar un índice de concordancia muy bueno, el reconocimiento y cuantificación de las diferentes variables fue realizado solamente por la responsable del estudio.

Capítulo 6 | Consideraciones finales

El COCE, el cáncer más común de la región de cabeza y cuello, es una neoplasia agresiva con un comportamiento biológico impredecible y un pronóstico desfavorable. Se han desarrollado diferentes líneas de investigación que buscan conocer los distintos factores responsables del comportamiento biológico de este tumor maligno, pero debido a la heterogeneidad del mismo y a la multicausalidad de la carcinogénesis oral, aun no se han obtenidos resultados acabados.

La pérdida del control del ciclo celular y de la proliferación celular, han sido objeto de intensa investigación en el COCE, debido a que son considerados fundamentales en las primeras etapas de la transformación neoplásica y posibles indicadores de la agresividad biológica tumoral. Particularmente, en la búsqueda de parámetros que puedan definir la capacidad proliferativa de cada COCE en particular, que contribuyan a la determinación del pronóstico individual y al mejor plan terapéutico, se han estudiado diferentes biomarcadores de proliferación celular por técnicas de IHQ.

El anticuerpo Ki-67, es un biomarcador de proliferación celular que se inmunoexpresa en las células en ciclo (proliferación activa), ha sido ampliamente estudiado y se considera un indicador confiable de la agresividad tumoral, predictor de supervivencia y parámetro de clasificación en varios tipos de cáncer humano. En este trabajo confirmamos lo descrito en la bibliografía previamente, los COCE con menor grado de diferenciación histológica son los que presentan mayores niveles de expresión de este marcador. Sin embargo, con respecto a la sobrevida, no pudimos establecer una relación significativa entre ambos.

La PHH3, es un biomarcador de proliferación celular específico de las células en mitosis, con respecto al Ki-67, ha sido poco investigado en la bibliografía. En este trabajo, nos planteamos como objetivo evaluar la inmunomarcación de este anticuerpo, comparándola con el Ki-67 y el IAM. A diferencia del Ki-67, pudimos observar que la inmunoexpresión de PHH3 presenta una relación estadísticamente significativa con el tiempo de sobrevida de los pacientes. Destacamos que no encontramos estudio previo que haya analizado en COCE esta relación.

En base a los resultados obtenidos, consideramos importante continuar investigando el biomarcador de proliferación PHH3 en el COCE, con un protocolo de IHQ uniformemente estandarizado y en una gran cohorte de casos. También sería interesante correlacionar su expresión con el estadio TNM y parámetros histológicos adicionales como la graduación del FIT, la gemación del tumor y el DOI.

Referencias bibliográficas

- Acero-mondragón, E., & Rodríguez-farías, R. (2016). Correlación histológica de expresión de marcadores Ki-67 y ciclina D1 presentes en carcinomas de células escamosas en cavidad oral Histological correlation of Ki-67 and D1 cycline markers expression. *Revista Odontológica Mexicana*, 20(4), 233–237. <https://doi.org/10.1016/j.rodmem.2016.11.002>
- Ahmad, B., Asif, M., Ali, A., Jamal, S., Khan, M. Z., & Khadim, M. T. (2020). Expression of Ki-67 and beta-catenin in pseudoepitheliomatous hyperplasia and squamous cell carcinoma in oral mucosal biopsies: An immunohistochemical study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 21(1), 157–161. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.1.157>
- Alicandri-ciufelli, F. M. G. M. (2016). The prognostic value of cyclin D1 expression in head and neck squamous cell carcinoma. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 273(4), 801–809. <https://doi.org/10.1007/s00405-014-3426-3>
- Almangush, A., Heikkinen, I., Mäkitie, A. A., Coletta, R. D., Läärä, E., Leivo, I., & Salo, T. (2017). Prognostic biomarkers for oral tongue squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 117(6), 856–866. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.244>
- Almangush, A., Mäkitie, A. A., Triantafyllou, A., de Bree, R., Strojan, P., Rinaldo, A., ... Leivo, I. (2020). Staging and grading of oral squamous cell carcinoma: An update. *Oral Oncology*, 107(January). <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2020.104799>
- Am, B., It, D., Coleş, E., Țîrcă, T., Stan, M., Şu, G., & Ag, N. (2018). Histopathological aspects in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Open Access Journal of Dental Sciences ISSN: 2573-8771*, 3(3), 000173.
- Anscombe, F. J. (1948). The validity of Comparative experiments. *Journal of the Royal Statistical Society*, 111(3), 181–211.
- Bartolomeo, D., Gabusi, A., Tarsitano, A., Badiali, G., Marchetti, C., Morandi, L., ... Montebugnoli, L. (2016). Ki67 Overexpression in mucosa distant from oral carcinoma : A poor prognostic factor in patients with long-term follow-up. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 44(9), 1430–1435.

<https://doi.org/10.1016/j.jcms.2016.06.011>

Bavle, R. M. (2014). Enigmatic Morpho Insight: Mitosis at a Glance. *J Oral Maxillofac Pathol*, 18, 2–5.

Bedekovics, J., Irsai, G., Hegyi, K., Beke, L., Krenács, L., Gergely, L., & Méhes, G. (2018). Mitotic Index Determined by Phosphohistone H3 Immunohistochemistry for Precise Grading in Follicular Lymphoma. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*, 26(8), 579–585.
<https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000481>

Bhuyan, L., Sarangi, S., Das, B. K., Das, S. N., & Nayak, S. (2018). Proliferative index in invasive tumor front of oral squamous cell carcinoma: A potential prognostic indicator. *Journal of Contemporary Dental Practice*, 19(2), 170–176.
<https://doi.org/10.5005/JP-JOURNALS-10024-2232>

Blatt, S., Krüger, M., Ziebart, T., Sagheb, K., Schiegnitz, E., Goetze, E., ... Max, A. (2017). Biomarkers in diagnosis and therapy of oral squamous cell carcinoma : A review of the literature. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 45(5), 722–730.
<https://doi.org/10.1016/j.jcms.2017.01.033>

Bologna-Molina, R., Ogawa, I., Mosqueda-Taylor, A., Takata, T., Sánchez-Romero, C., Villarroel-Dorrego, M., ... Mikami, T. (2019). Detection of MAPK/ERK pathway proteins and KRAS mutations in adenomatoid odontogenic tumors. *Oral Diseases*, 25(2), 481–487. <https://doi.org/10.1111/odi.12989>

Brockton, N. T., Lohavanichbutr, P., Enwere, E. K., Upton, M. P., Kornaga, E. N., Nakoneshny, S. C., ... Dort, J. C. (2017). *Impact of tumoral carbonic anhydrase IX and Ki - 67 expression on survival in oral squamous cell carcinoma patients*. 5434–5442. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6829>

Bryne, M. (1998). Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? *Oral Diseases*, 4, 70–77.

Bryne, Magne, Koppang, H. S., Lilleng, R., & Kjørheim, Å. (1992). Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *The Journal of Pathology*, 166(4), 375–381.
<https://doi.org/10.1002/path.1711660409>

Buch, A., Haldar, N., Kheur, S., Chandanwale, S., & Kumar, H. (2019). Correlación entre

el índice de etiquetado ki-67 y el índice mitótico en el carcinoma oral de células escamosas. *Clinical Cancer Investigation Journal*, 8, 90–95.

Butler, J., Mackay, F., Denniston, C., & Daley, M. (2016). Halting the hallmarks: a cellular automaton model of early cancer growth inhibition. *Natural Computing*, 15(1), 15–30. <https://doi.org/10.1007/s11047-015-9508-3>

Carreón-Burciaga, R. G., González-González, R., Molina-Frechero, N., López-Verdín, S., Pereira-Prado, V., & Bologna-Molina, R. (2018). Differences in e-cadherin and syndecan-1 expression in different types of ameloblastomas. *Analytical Cellular Pathology*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9392632>

Chang, W. C., Chang, C. F., Li, Y. H., Yang, C. Y., Su, R. Y., Lin, C. K., & Chen, Y. W. (2019). A histopathological evaluation and potential prognostic implications of oral squamous cell carcinoma with adverse features. *Oral Oncology*, 95(June), 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.06.012>

Chaudhari, M., Shukla, S., Tamhane, A., Acharya, S., & Bhake, A. (2018). Histopathological Grading of Oral Squamous Cell Carcinoma and Its Correlation With Ki-67 - a Proliferative Marker. *Journal of Evidence Based Medicine and Healthcare*, 5(22), 1690–1695. <https://doi.org/10.18410/jebmh/2018/355>

Chen, S. H., Hsiao, S. Y., Chang, K. Y., & Chang, J. Y. (2021). New insights into oral squamous cell carcinoma: From clinical aspects to molecular tumorigenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms22052252>

Chitra, N. S., Boaz, K., N, S., Lewis, A. J., & K.s., S. (2019). Pattern-corrected mitotic activity index (pmai): a novel prognosticator of oral squamous cell carcinoma. *Turkish Journal of Pathology*, 1–8. <https://doi.org/10.5146/tjpath.2019.01465>

Chow, K. L., Tse, K. Y., Cheung, C. L., Wong, K. W., Cheung, A. N. Y., Wong, R. W. C., ... Ip, P. P. C. (2017). The mitosis-specific marker phosphohistone-H3 (PHH3) is an independent prognosticator in uterine smooth muscle tumours: an outcome-based study. *Histopathology*, 70(5), 746–755. <https://doi.org/10.1111/his.13124>

Cicchetti, D. V. (1994). Interreliability standards in psychological evaluations. *Psychological Assessment*, 6(4), 284–290.

Contreras-Ramírez, M., Donoso, W., Venegas, B., & Rivera, C. (2015). Análisis

- histopatológico de casos de cáncer oral en instituciones de las regiones chilenas del Maule y Bío-Bío entre los años 2001-2011. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, 8(3), 223–227. <https://doi.org/10.1016/j.piro.2015.06.005>
- Cortegoso, A. V. B., Laureano, N. K., Silva, A. D. da, Danilecviz, C. K., Magnusson, A. S., Visioli, F., & RADOS, P. V. (2017). Cell proliferation markers at the invasive tumor front of oral squamous cell carcinoma: comparative analysis in relation to clinicopathological parameters of patients. *Journal of Applied Oral Science*, 25(3), 318–323. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2016-0238>
- Cortés-Reyes, É., Rubio-Romero, J. A., & Gaitán-Duarte, H. (2010). Statistical methods for evaluating diagnostic test agreement and reproducibility. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 61(3), 247–255. <https://doi.org/10.18597/rcog.271>
- Cox, D. R. (1972). Regression Models and Life-Tables. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 34(2), 187–202. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1972.tb00899.x>
- Cutter, A. R., & Hayes, J. J. (2015). A brief review of nucleosome structure. *FEBS Letters*, 589(20), 2914–2922. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.05.016>
- Cuylen, S., Blaukopf, C., Politi, A. Z., Muller-Reichert, T., Neumann, B., Poser, I., ... Gerlich, D. W. (2016). Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature*, 535(7611), 308–312. <https://doi.org/10.1038/nature18610>
- Dantas, R. C. M., Guimarães, V. S. N., de Souza, R. O., Valverde, L. F., Vidal, M. T. A., Nogueira, R. L. R., ... Rocha, C. A. G. (2021). Immunodetection of epithelial-mesenchymal transition and tumor proliferation markers in gli-1-positive oral squamous cell carcinoma. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*, 29(5), 335–344. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000866>
- Dash, K. C., Mahapatra, N., & Mishra, P. (2020). An Immunohistochemical Study Showing Ki-67 as an Analytical Marker in Oral Malignant and Premalignant Lesions. *J Pharm Bioallied Sci*, 12(Suppl 1), S274–S278. https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_83_20
- de Freitas Filho, S. A. J., Servato, J. P. S., de Sá, R. T., Siqueira, C. S., de Faria, P. R., Loyola, A. M., & Cardoso, S. V. (2018). Evaluation of specific modified histones in

- lip carcinogenesis. *Pathology Research and Practice*, 214(6), 876–880. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2018.04.004>
- Dias, E. P., Oliveira, N. S. C., Serra-Campos, A. O., da Silva, A. K. F., da Silva, L. E., & Cunha, K. S. (2021). A novel evaluation method for Ki-67 immunostaining in paraffin-embedded tissues. *Virchows Archiv*. <https://doi.org/10.1007/s00428-020-03010-4>
- Donovan, T. A., Moore, F. M., Bertram, C. A., Luong, R., Bolfa, P., Klopfleisch, R., ... Meuten, D. J. (2021). Mitotic Figures—Normal, Atypical, and Imposters: A Guide to Identification. *Veterinary Pathology*, 58(2), 243–257. <https://doi.org/10.1177/0300985820980049>
- dos Santos Costa, S. F., Brennan, P. A., Gomez, R. S., Fregnani, E. R., Santos-Silva, A. R., Martins, M. D., ... Dos Santos Costa SF, Brennan Pa, Gomez, RS, et al. (2018). Molecular basis of oral squamous cell carcinoma in young patients: is it any different from older patients? *J Oral Pathol Med*, 47(6), 541–546. <https://doi.org/10.1111/jop.12642>
- Eastman, A. E., & Guo, S. (2020). The palette of techniques for cell cycle analysis. *FEBS Letters*, 594(13), 2084–2098. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13842>
- El-Naggar, A. K., Takata, T., Sliotweg, P. J., Chan, J. K. ., & Grandis, J. (2017). *WHO classification of head and neck tumours*. International Agency for Research on Cancer (4th editio).
- Elmaci, I., Altinoz, M. A., Sari, R., & Bolukbasi, F. H. (2018). Phosphorylated Histone H3 (PHH3) as a Novel Cell Proliferation Marker and Prognosticator for Meningeal Tumors: A Short Review. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*, 26(9), 627–631. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000499>
- Emura, T., Matsui, S., & Rondeau, V. (2000). *Survival Analysis with Correlated Endpoints: Joint Frailty-Copula Models*.
- Escargueil, A. E., Soares, D. G., Salvador, M., Larsen, A. K., & Henriques, J. A. P. (2008). What histone code for DNA repair? *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 658(3), 259–270. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.01.004>
- Farooq, I., & Bugshan, A. (2020). Oral squamous cell carcinoma: Metastasis, potentially associated malignant disorders, etiology and recent advancements in diagnosis.

F1000Research, 9, 1–10. <https://doi.org/10.12688/f1000research.22941.1>

- Feitelson, M. A., Arzumanyan, A., Kulathinal, R. J., Blain, S. W., Holcombe, R. F., Mahajna, J., ... Newsheen, S. (2016). Sustained proliferation in cancer: therapeutic targets. *Seminars Cancer Biology*, 35, 25–54. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.02.006>. Sustained
- Gadbail, A. R., Sarode, S. C., Chaudhary, M. S., Gondivkar, S. M., Tekade, S. A., Yuwanati, M., & Patil, S. (2021). Ki67 labelling index predicts clinical outcome and survival in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Applied Oral Science*, 29(M), 1–10. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2020-0751>
- Gatoo, M. A., & Dar, A. M. (2018). Cyclin D1 expression of different histological grades in oral squamous cell carcinoma patients from Northern India. *Archive of Oncology*, 24(1), 6–9. <https://doi.org/10.2298/AOO180312001G>
- Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H., & Stein, H. (1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International Journal of Cancer*, 31, 13–20.
- Ghanizada, M., Jakobsen, K. K., Grønhøj, C., & von Buchwald, C. (2019). The effects of checkpoint inhibition on head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review. *Oral Oncology*, 90(November 2018), 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.01.018>
- Ginter, P. S., Shin, S. J., Liu, Y., Chen, Z., & D'Alfonso, T. M. (2016). Phosphohistone H3 expression correlates with manual mitotic counts and AIDS in identification of “hot spots” in fibroepithelial tumors of the breast. *Human Pathology*, 49, 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.10.012>
- González-González, R., Molina-Frechero, N., Carreón-Burciaga, R. G., López-Verdín, S., Robles-Bonilla, C., Pereira-Prado, V., & Bologna-Molina, R. (2016). Comparison between Manual and Automated Methods for Ki-67 Immunoexpression Quantification in Ameloblastomas. *Analytical Cellular Pathology*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7486989>
- Gonzalez-Moles, M. A., Ruiz-Avila, I., Gil-Montoya, J. A., Esteban, F., & Bravo, M. (2010). Analysis of Ki-67 expression in oral squamous cell carcinoma: Why Ki-67 is not a prognostic indicator. *Oral Oncology*, 46(7), 525–530.

<https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2010.03.020>

González, N., & Beovide, V. (2020). Perfil del Carcinoma Oral de Células Escamosas en el Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de la República, período 1982-2015. *Odontoestomatología*, 22(36). <https://doi.org/10.22592/ode2020n36a5>

González Romero, R., Ausió, J., Méndez, J., & Eirín López, J. M. (2011). El papel clave de las histonas. *Investigación y Ciencia*, 423 (Dicie).

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(January 7), 57–70.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Hao, Q., Dai, C., Deng, Y., Xu, P., Tian, T., Lin, S., ... Dai, Z. (2018). Pooling analysis on prognostic value of PHH3 expression in cancer patients. *Cancer Management and Research*, 10, 2279–2288. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S167569>

Henzel, M. J., Wei, Y., Mancini, M. A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B. R., ... Allis, C. D. (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*, 106(6), 348–360. <https://doi.org/10.1007/s004120050256>

Holmes, B. J., & Wenig, B. M. (2019). Virus-associated carcinomas of the head & neck: Update from the 2017 WHO classification. *Annals of Diagnostic Pathology*, 38(October 2018), 29–42. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2018.10.008>

Ivina, A. A., Semkin, V. A., Khabadze, Z. S., & Babichenko, I. I. (2019). Immunohistochemical study of Ki-67, PHH3, and CK15 protein expression in oral epithelial malignancy. *Arkhiv Patologii*, 81(5), 30–34. <https://doi.org/10.17116/patol20198105130>

Jin, C., Huang, Y., Nasim, M., Yang, Y., & Lee, L. (2019). Gastrointestinal Stromal Tumors Risk Stratification Utilizing Phospho-Histone H3 Evaluated by Manual

- Counting and Computer-Assisted Image Analysis. *International Journal of Surgical Pathology*, 27(7), 706–712. <https://doi.org/10.1177/1066896919851866>
- Jing, Y. U. E., Zhou, Q., Zhu, H., Zhang, Y. E., Song, Y., & Zhang, X. (2019). Ki - 67 is an independent prognostic marker for the recurrence and relapse of oral squamous cell carcinoma. *Oncology Letters*, 974–980. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9647>
- Kadoo, P., Dandekar, R., Kulkarni, M., Mahajan, A., Kumawat, R., & Parate, N. (2018). Correlation of mitosis obtained by using 1% crystal violet stain with Ki67LI in histological grades of oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 8(3), 234–240. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2017.09.010>
- Kang, H., Kiess, A., & Chung, C. H. (2015). Emerging biomarkers in head and neck cancer in the era of genomics. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 12(1), 11–26. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.192>
- Kaplan, E. L., & Meier, P. (1958). Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association*. *Journal of the American Statistical Association*, 53(March 2013), 457–481.
- Khieu, M. L., Broadwater, D. R., Aden, J. K., Coviello, J. M., Lynch, D. T., & Hall, J. M. (2019). The Utility of Phosphohistone H3 (PHH3) in Follicular Lymphoma Grading: A Comparative Study with Ki-67 and H&E Mitotic Count. *American Journal of Clinical Pathology*, 151(6), 542–550. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqz003>
- Khorasanizadeh, S. (2004). The Nucleosome: From Genomic Organization to Genomic Regulation. Review. *Cell Press*, 116(23), 259–272. <https://doi.org/10.1093/jb/mvx081>
- Kim, D. W., Lee, S., Kwon, S., Nam, W., Cha, I. H., & Kim, H. J. (2019). Deep learning-based survival prediction of oral cancer patients. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43372-7>
- Kim, J.-Y., Sook Jeong, H., Chung, T., Kim, M., Hee Lee, J., Hee Jung, W., & Seung Koo, J. (2017). The value of phosphohistone H3 as a proliferation marker for evaluating invasive breast cancers: A comparative study with Ki67. *Oncotarget*, 8(39), 65064–65076. Retrieved from www.impactjournals.com/oncotarget/
- Kintawati, S., & Pramesti, H. T. (2019). Immunoexpression of Ki-67 in determining prognosis of oral cavity squamous cell carcinoma. *Padjadjaran Journal of Dentistry*,

31(2), 147. <https://doi.org/10.24198/pjd.vol31no2.22888>

- Kono, H., & Ishida, H. (2020). ScienceDirect Nucleosome unwrapping and unstacking. *Current Opinion in Structural Biology*, 64, 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.06.020>
- Koyama, M., & Kurumizaka, H. (2018). JB Special Review—Chromatin Structure and Function: Biological Implications in Epigenetics Structural diversity of the nucleosome Received. *Biochem*, 163(2), 85–85.
- Ladstein, R. G., Bachmann, I. M., Straume, O., & Akslen, L. A. (2012). Prognostic importance of the mitotic marker phosphohistone H3 in cutaneous nodular melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(4), 1247–1252. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.464>
- Laflamme, P., Mansoori, B. K., Sazanova, O., Orain, M., Couture, C., Simard, S., ... Joubert, P. (2020). Phospho-histone-H3 immunostaining for pulmonary carcinoids: impact on clinical appraisal, interobserver correlation, and diagnostic processing efficiency. *Human Pathology*, 106, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2020.09.009>
- Lai, C. P. T., Yeong, J. P. S., Tan, A. Sen, Ong, C. H. C., Lee, B., Lim, J. C. T., ... Tan, P. H. (2019). Evaluation of phospho-histone H3 in Asian triple-negative breast cancer using multiplex immunofluorescence. *Breast Cancer Research and Treatment*, 178(2), 295–305. <https://doi.org/10.1007/s10549-019-05396-5>
- Lea, D., Gudlaugsson, E. G., Skaland, I., Lillesand, M., Søreide, K., & Søreide, J. A. (2021). Digital Image Analysis of the Proliferation Markers Ki67 and Phosphohistone H3 in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms: Accuracy of Grading Compared with Routine Manual Hot Spot Evaluation of the Ki67 Index. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*, 00(00), 1–7. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000934>
- Leão, P. L. R., Marangon Junior, H., Melo, V. V. M., Caixeta, Â. B., Souza, P. E. A., de Aguiar, M. C. F., & Horta, M. C. R. (2017). Reproducibility, repeatability, and level of difficulty of two methods for tumor budding evaluation in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 46(10), 949–955. <https://doi.org/10.1111/jop.12578>

- Leite, A. A., Leonel, A. C. L. da S., de Castro, J. F. L., Carvalho, E. J. de A., Vargas, P. A., Kowalski, L. P., & Perez, D. E. da C. (2018). Oral squamous cell carcinoma: A clinicopathological study on 194 cases in northeastern Brazil. A cross-sectional retrospective study. *Sao Paulo Medical Journal*, *136*(2), 165–169. <https://doi.org/10.1590/1516-3180.2017.0293061217>
- Li, L. T., Jiang, G., Chen, Q., & Zheng, J. N. (2015). Predict Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review). *Molecular Medicine Reports*, *11*(3), 1566–1572. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2914>
- Lopes, V. K. M., Jesus, A. S. de, Souza, L. L. de, Miyahara, L. A. N., Guimarães, D. M., Pontes, H. A. R., ... Carvalho, P. L. de. (2017). Ki-67 protein predicts survival in oral squamous carcinoma cells: an immunohistochemical study. *Brazilian Oral Research*, *31*(M), e66. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0066>
- Majumdar, B., Patil, S., Sarode, S. C., Sarode, G. S., & Rao, R. S. (2017). Clinicopathological prognosticators in oral squamous cell carcinoma. *Translational Research in Oral Oncology*, *2*, 2057178X1773891. <https://doi.org/10.1177/2057178x17738912>
- Marangon Junior, H., Leão, P. L. R., Melo, V. V. M., Caixeta, Â. B., Souza, P. E. A., de Aguiar, M. C. F., & Horta, M. C. R. (2018). Cell proliferation is associated with intensity of tumor budding in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, *47*(2), 128–135. <https://doi.org/10.1111/jop.12653>
- Matsuda, Y., Yoshimura, H., Ishiwata, T., Sumiyoshi, H., Matsushita, A., Nakamura, Y., ... Arai, T. (2016). Mitotic index and multipolar mitosis in routine histologic sections as prognostic markers of pancreatic cancers: A clinicopathological study. *Pancreatology*, *16*(1), 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2015.10.005>
- Mcintosh, J. R. (2016). Mitosis. *Cold Spring Harbor Perspectives Biol*, *8*(a023218).
- Miller, I., Min, M., Yang, C., Tian, C., Gookin, S., Carter, D., & Spencer, S. L. (2018). Ki67 is a Graded Rather than a Binary Marker of Proliferation versus Quiescence. *Cell Reports*, *24*(5), 1105-1112.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.110>
- Miranda Galvis, M., Santos-Silva, A. R., Freitas Jardim, J., Paiva Fonseca, F., Lopes, M. A., de Almeida, O. P., ... Kowalski, L. P. (2018). Different patterns of expression of cell cycle control and local invasion-related proteins in oral squamous cell

- carcinoma affecting young patients. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 47(1), 32–39. <https://doi.org/10.1111/jop.12601>
- Molina Romero, M., Laserna Mendieta, E. J., Varo Sánchez, G. M., Alonso-Cerezo, M. C., & Orera Clemente, M. (2018). Personalised oncology: Main biomarkers in the prognosis and treatment of solid tumours. *Revista Del Laboratorio Clinico*, (xx), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.labcli.2018.11.001>
- Mupparapu, M., & Shanti, R. M. (2018). Evaluation and Staging of Oral Cancer. *Dental Clinics of North America*, 62(1), 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2017.08.003>
- Nazar, M., Naz, I., Mahmood, M. K., & Hashmi, S. N. (2020). Immunohistochemical expression of Cyclin D1 and Ki-67 in primary and metastatic oral squamous cell carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 21(1), 37–41. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.1.37>
- Ohashi, R., Namimatsu, S., Sakatani, T., Naito, Z., Takei, H., & Shimizu, A. (2018). Prognostic utility of atypical mitoses in patients with breast cancer: A comparative study with Ki67 and phosphohistone H3. *Journal of Surgical Oncology*, 118(3), 557–567. <https://doi.org/10.1002/jso.25152>
- Olar, A. (2015). Phosphohistone H3: Implications for clinical practice and risk assessment in meningioma. *Neuro-Oncology*, 17(5), 631–633. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov047>
- Oliveira, M. L. aur. C., Wagner, V. P. eterse., Sant’ana Filho, M., Carrard, V. C. oelh., Hugo, F. N. eve., & Martins, M. D. omingue. (2015). A 10-year analysis of the oral squamous cell carcinoma profile in patients from public health centers in Uruguay. *Brazilian Oral Research*, 29(1), 1–8. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2015.vol29.0075>
- Padma, R., Sundaresan, S., Kalavani, A., & Thilagavathi, R. (2019). Assessment of Histopathological Grade and Ki-67 Expression in Tobacco and Non-tobacco Habitual Buccal Mucosa Cancer. *Indian Journal of Otolaryngology and Head and Neck Surgery*, 71, 410–416. <https://doi.org/10.1007/s12070-018-1328-1>
- Pereira, J. dos S., Barroso, K. M. A., Nonaka, C. F. W., Pinto, L. P., & de Souza, L. B. (2016). Immunoexpression of Cell Proliferation Markers in Oral Squamous Cell Carcinoma. *International Journal of Odontostomatology*, 10(3), 513–520.

<https://doi.org/10.4067/s0718-381x2016000300020>

- Puripat, N., & Loharamtaweethong, K. (2019). Phosphohistone H3 (PHH3) as a surrogate of mitotic figure count for grading in meningiomas: a comparison of PHH3 (S10) versus PHH3 (S28) antibodies. *Virchows Archiv*, 474(1), 87–96. <https://doi.org/10.1007/s00428-018-2458-2>
- R Core Team. (2019). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 3. Retrieved from <https://www.r-project.org/>
- Ramani, P., Taylor, S., Miller, E., Sowa-Avugrah, E., & May, M. T. (2015). High Phosphohistone H3 Expression Correlates with Adverse Clinical, Biological, and Pathological Factors in Neuroblastomas. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 63(6), 397–407. <https://doi.org/10.1369/0022155415576966>
- Rezazadeh, F., Ebrahimi, R., Andisheh-tadbir, A., Ashraf, M. J., & Khademi, B. (2017). *Evaluation of the Ki-67 and MCM3 Expression in Cytologic Smear of Oral Squamous Cell Carcinoma*. 18(3), 207–211.
- Rivera, C., & Venegas, B. (2014). Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma. *Oncology Letters*, 8(1), 7–11. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2103>
- Rodrigues, R. M., Bernardo, V. G., da Silva, S. D., Camisasca, D. R., Faria, P. A. de S., Dias, F. L., ... Lourenço, S. de Q. C. (2020). How pathological criteria can impact prognosis of tongue and floor of the mouth squamous cell carcinoma. *Journal of Applied Oral Science*, 28, 1–7. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2019-0198>
- Sales Gil, R., & Vagnarelli, P. (2018). Ki-67: More Hidden behind a ‘Classic Proliferation Marker.’ *Trends in Biochemical Sciences*, 43(10), 747–748. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.08.004>
- Sánchez-Romero, C., Carreón-Burciaga, R., González-González, R., Villarroel-Dorrego, M., Molina-Frechero, N., & Bologna-Molina, R. (2021). Perilipin 1 and adipophilin immunoexpression suggests the presence of lipid droplets in tooth germ, ameloblastoma, and ameloblastic carcinoma. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 50(7), 708–715. <https://doi.org/10.1111/jop.13175>
- Sasahira, T., & Kirita, T. (2018). Hallmarks of cancer-related newly prognostic factors of oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8).

<https://doi.org/10.3390/ijms19082413>

- Siriweera, E. H., & Zardawi, I. (2016). Prognostic value of Ki 67 and Phosphohistone H3 in oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Journal of Diagnostic Pathology*, *11*(2), 39. <https://doi.org/10.4038/jdp.v11i2.7709>
- Speight, P. M., & Farthing, P. M. (2018). The pathology of oral cancer. *British Dental Journal*, *225*(9), 841–847. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2018.926>
- Steigen, S. E., Sjøland, T. M., Nginamau, E. S., Laurvik, H., Costea, D. E., Johannessen, A. C., ... Hadler-Olsen, E. (2020). Grading of oral squamous cell carcinomas – Intra and interrater agreeability: Simpler is better? *Journal of Oral Pathology and Medicine*, *49*(7), 630–635. <https://doi.org/10.1111/jop.12990>
- Sudarshini, N., Banavar, S. R., Nambiar, S. K., Augustine, D., Sowmya, S. V., Haragannavar, V. C., & Rao, R. S. (2018). Immunohistochemical stain-phosphohistone H3: Most specific mitotic marker. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, *12*(2), ZC18–ZC21. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2018/24936.11208>
- Sun, X., & Kaufman, P. D. (2018). Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*, *127*(2), 175–186. <https://doi.org/10.1007/s00412-018-0659-8>
- Sundermann, B. V., Uhlmann, L., Hoffmann, J., Freier, K., & Thiele, O. C. (2018). The localization and risk factors of squamous cell carcinoma in the oral cavity: A retrospective study of 1501 cases. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, *46*(2), 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2017.10.019>
- Surov, A., Meyer, H. J., Höhn, A. K., Winter, K., Sabri, O., & Purz, S. (2019). Associations Between [18F]FDG-PET and Complex Histopathological Parameters Including Tumor Cell Count and Expression of KI 67, EGFR, VEGF, HIF-1 α , and p53 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Molecular Imaging and Biology*, *21*(2), 368–374. <https://doi.org/10.1007/s11307-018-1223-x>
- Takkem, A., Barakat, C., Zakaraia, S., Zaid, K., Najmeh, J., Ayoub, M., & Seirawan, M. Y. (2018). Ki-67 prognostic value in different histological grades of oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *19*(11), 3279–3286. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2018.19.11.3279>
- Tandon, A., Singh, N. N., Brave, V. R., & Sreedhar, G. (2016). Image analysis assisted

- study of mitotic figures in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma using differential stains. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6, S18–S23. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2016.09.003>
- Thomson, P. J. (2018). Perspectives on oral squamous cell carcinoma prevention—proliferation, position, progression and prediction. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 47(9), 803–807. <https://doi.org/10.1111/jop.12733>
- Tirelli, G., Gatto, A., Boscolo Nata, F., Bussani, R., Piccinato, A., Marcuzzo, A. V., & Tofanelli, M. (2018). Prognosis of oral cancer: a comparison of the staging systems given in the 7th and 8th editions of the American Joint Committee on Cancer Staging Manual. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 56(1), 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2017.11.009>
- Van Diest, P. J., Brugal, G., & Baak, J. P. A. (1998). Proliferation markers in tumours: Interpretation and clinical value. *Journal of Clinical Pathology*, 51(10), 716–724. <https://doi.org/10.1136/jcp.51.10.716>
- van Steenhoven, J. E. C., Kuijter, A., Kornegoor, R., van Leeuwen, G., van Gorp, J., van Dalen, T., & van Diest, P. J. (2020). Assessment of tumour proliferation by use of the mitotic activity index, and Ki67 and phosphohistone H3 expression, in early-stage luminal breast cancer. *Histopathology*, 77(4), 579–587. <https://doi.org/10.1111/his.14185>
- Watanabe, S., Watanabe, R., Oton-Leite, A. F., Alencar, R. de C. G., Oliveira, J. C., Leles, C. R., ... Mendonça, E. F. (2010). Analysis of cell proliferation and pattern of invasion in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Science*, 52(3), 417–424. <https://doi.org/10.2334/josnusd.52.417>
- Williams, G. H., & Stoeber, K. (2012). The cell cycle and cancer. *Journal of Pathology*, 226, 352–364.
- Winther, T. L., Arnli, M. B., Salvesen, Ø., & Torp, S. H. (2016). Phosphohistone-H3 proliferation index is superior to mitotic index and MIB-1 expression as a predictor of recurrence in human meningiomas. *American Journal of Clinical Pathology*, 146(4), 510–520. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqw141>
- Wunschel, M., Neumeier, M., Utpatel, K., Reichert, T. E., Ettl, T., & Spanier, G. (2021). Staging more important than grading? Evaluation of malignancy grading, depth of

- invasion, and resection margins in oral squamous cell carcinoma. *Clinical Oral Investigations*, 25(3), 1169–1182. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03421-2>
- Xie, S., Liu, Y., Qiao, X., Hua, R. X., Wang, K., Shan, X. F., & Cai, Z. G. (2016). What is the prognostic significance of Ki-67 positivity in oral squamous cell carcinoma? *Journal of Cancer*, 7(7), 758–767. <https://doi.org/10.7150/jca.14214>
- Xu, B., Salama, A. M., Valero, C., Yuan, A., Khimraj, A., Saliba, M., ... Ghossein, R. (2021). The prognostic role of histologic grade, worst pattern of invasion, and tumor budding in early oral tongue squamous cell carcinoma: a comparative study. *Virchows Archiv*. <https://doi.org/10.1007/s00428-021-03063-z>
- Xu, Q. S., Wang, C., Li, B., Li, J. Z., Mao, M. H., Qin, L. Z., ... Feng, Z. (2018). Prognostic value of pathologic grade for patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Diseases*, 24(3), 335–346. <https://doi.org/10.1111/odi.12727>
- Yang, H., Jin, X., Dan, H., & Chen, Q. (2020). Histone modifications in oral squamous cell carcinoma and oral potentially malignant disorders. *Oral Diseases*, 26(4), 719–732. <https://doi.org/10.1111/odi.13115>
- Yang, Z., Liang, X., Fu, Y., Liu, Y., Zheng, L., Liu, F., ... Xu, X. (2019). Identification of AUNIP as a candidate diagnostic and prognostic biomarker for oral squamous cell carcinoma. *EBioMedicine*. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.08.013>

Anexos

Anexo 1 | Aprobación del Comité de Ética

Constancia de aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de la República, con el número de expediente 091900-000351-19, en su resolución número 3 del 2 de julio de 2020.



Montevideo, 9 de julio de 2020-

Dra. Natalia Tancredi

Cúmpleme comunicarle a usted para su conocimiento y demás efectos, la siguiente resolución adoptada por el **Comité de Ética** en su reunión de fecha 02/07/2020:

RESOLUCIÓN No. 3

TOMAR CONOCIMIENTO de la nota presentada por la Dra. Natalia Tancredi y considerando que se cumple con la mayoría de lo solicitado, APROBAR el Proyecto titulado: *"Valor de la fosfohistona H3 como marcador de proliferación celular en el carcinoma oral de células escamosas. Un estudio comparativo con el Ki - 67"*, Responsable Natalia Tancredi. (Exp. 091900-000351-19).

Claudia Ramos Núñez
Jefe de Sección Comisiones

Apéndices

