

**PROTEÍNA TRANSLOCADORA MITOCONDRIAL 18kDa EN SALIVA COMO UN
BIOMARCADOR ASOCIADO A CÁNCER BUCAL**

GUILLERMO TAMAYO CABEZA

MEISSER MADERA VIDAL

JENNIFER OROZCO PAEZ

DARIO MENDEZ CUADRO

FARITH GONZALEZ MARTINEZ

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

CARTAGENA DE INDIAS

2016

**PROTEÍNA TRANSLOCADORA MITOCONDRIAL 18kDa EN SALIVA COMO UN
BIOMARCADOR ASOCIADO A CÁNCER BUCAL**

GUILLERMO TAMAYO CABEZA

Estudiante de décimo semestre de Odontología, Universidad de Cartagena.

MEISSER MADERA VIDAL

Odontólogo, Magíster en Bioquímica, Magister en Epidemiología Clínica, Estudiante del Doctorado en Metodología de Investigación Biomédica y Salud, Universidad Autónoma de Barcelona.

JENNIFER OROZCO PAEZ

Odontóloga, Magíster en Bioquímica, Joven Investigador, Universidad de Cartagena.

DARIO MENDEZ CUADRO

Químico Farmacéutico, Magíster en Ciencias, Doctor en Bioquímica y Biología Molecular, España

FARITH GONZALEZ MARTINEZ

Odontólogo, Magíster en Salud Pública, Especialista en Investigación Social, candidato del Doctorado en Toxicología Ambiental, Universidad de Cartagena.

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

CARTAGENA 2016

NOTA DE ACEPTACIÓN

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

Cartagena, noviembre de 2016

CONTENIDO

RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	11
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	16
2. JUSTIFICACIÓN	17
3. OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GENERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4. MARCO TEÓRICO	19
4.1 CÁNCER BUCAL	19
4.1.1 Epidemiología del cáncer bucal	21
4.1.2 Métodos para el diagnóstico del cáncer bucal	22
4.2 PROTEINA TRANSLOCADORA MITOCONDRIAL (TSPO) 18kDa	24
4.2.1 Presencia de la proteína translocadora mitocondrial (TSPO) de 18kDa en muestras salivares	27
4.2.2 Relación de la proteína translocadora mitocondrial (TSPO) de 18kDa con el cáncer	27

5. METODOLOGÍA	28
5.1 TIPO DE ESTUDIO	28
5.2 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	28
5.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	28
5.4 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SALIVA	29
5.5 ANALISIS PROTEOMICO	29
5.6 ANALISIS ESTADÍSTICO.....	31
5.7 CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	32
6. RESULTADOS.....	34
7. DISCUSIÓN	40
8. CONCLUSIÓN	44
9. RECOMENDACIONES	45
BIBLIOGRAFÍA	46
ANEXOS	51

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características sociodemográficas de los sujetos de estudio.....	34
Tabla 2. Relación entre el diagnóstico histopatológico de las lesiones y los valores de cuantificación de la proteína TSPO 18kDa en saliva.....	36
Tabla 3. Valores de expresión de la (TSPO) 18 kDa en muestras de saliva del grupo de sujetos con cáncer bucal o lesiones potencialmente malignas.....	38
Tabla 4. Valores de expresión de la (TSPO) 18 kDa en muestras de saliva del grupo de sujetos sin la patología.	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%.....	37
Figura 2. Dot blot para ensayo utilizando muestras de dos pacientes para comparación de la señal obtenida dependiendo de la cantidad de proteína sembrada en la membrana.....	37
Figura 3. Análisis utilizando densitometría óptica del dot blot en el grupo de sujetos con cáncer bucal o lesiones potencialmente malignas y el grupo de individuos sin la patología.....	38
Figura 4. Cuantificación de la expresión de la proteína TSPO en sujetos con y sin cáncer bucal.....	39

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

ANEXO 2. FORMATO DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

RESUMEN

Problema. El cáncer bucal es una enfermedad que posee una gran tasa de mortalidad y una baja proporción de supervivencia debido a que su diagnóstico se realiza en estadios avanzados. Actualmente existen pocos estudios que evalúen el rol de biomarcadores salivares que puedan ser capaces de permitir un diagnóstico precoz de esta patología.

Objetivo. Cuantificar en saliva la expresión de la proteína translocadora mitocondrial 18kDa (TSPO) en individuos con cáncer bucal o lesiones potencialmente malignas y en individuos sin cáncer en Cartagena, Colombia.

Métodos. Estudio descriptivo comparativo en 12 sujetos adultos seleccionados durante la consulta odontológica en la ciudad de Cartagena a través de dos grupos; con y sin hallazgos clínicos de cáncer oral o lesiones potencialmente malignas. Se obtuvo por encuestas los aspectos sociodemográficos. Además, se obtuvo el estudio histopatológico mediante biopsia incisional y citología exfoliativa. Para determinar la presencia de la TSPO 18kDa en saliva, se realizó protocolo de extracción y precipitación de la proteína, cuantificación por método de Bradford e inmunoensayo utilizando técnica dot blot. Los datos se analizaron mediante pruebas no paramétricas usando la U. Mann Whitney y el test de Kruskal Wallis.

Resultados. Al realizar la cuantificación de la proteína TSPO en saliva se obtuvo que el valor promedio de expresión en el grupo de participantes con cáncer o lesiones potencialmente malignas fue de 185,4 con relación al volumen de la señal obtenida, mientras que el grupo de participantes sin cáncer obtuvo un promedio de 65,1 ($p=0,008$).

Conclusión. Existe una tendencia al aumento de los valores de expresión de la proteína TSPO en saliva de los participantes con cáncer bucal o lesiones potencialmente malignas, teniendo en cuenta que éstas últimas fueron las más prevalentes.

PALABRAS CLAVE: neoplasia de la boca, saliva, diagnóstico, (Fuente: DeCS-Bireme)

INTRODUCCIÓN

El cáncer bucal es una enfermedad que posee una gran tasa de mortalidad y una baja proporción de supervivencia, debido a que su diagnóstico generalmente se realiza sobre estadios avanzados cuando la patología se ha diseminado a otros órganos y tejidos, lo cual hace necesario encontrar alternativas que permitan comprender el proceso de la carcinogénesis bucal y a su vez establecer un diagnóstico precoz. En esta búsqueda se ha propuesto la utilización de diversos biomarcadores celulares y tisulares, los cuales, desde una perspectiva molecular pueden proporcionar información adicional a la obtenida en los estudios histopatológicos o mediante la evaluación clínica. Hoy en día, avances científicos y tecnológicos en bioquímica, están permitiendo descubrir nuevos biomarcadores en saliva que pueden ser utilizados para detectar algunas patologías como el cáncer.

Entre estos biomarcadores se encuentra la proteína translocadora mitocondrial (TSPO) 18kDa, la cual se encuentra asociada con el poro de transición de permeabilidad mitocondrial y está relacionada con procesos como el transporte de colesterol, viabilidad celular, apoptosis y carcinogénesis, por lo tanto, la TSPO 18kDa podría ser considerada como un biomarcador a estudiar en sujetos con cáncer bucal.

Es por ello que se realiza este estudio con el fin de evaluar el rol de la proteína TSPO 18kDa en saliva de sujetos con lesiones potencialmente malignas y cáncer bucal en la ciudad de Cartagena, Colombia, para establecer precedentes que contribuyan a la búsqueda de un biomarcador eficaz para el diagnóstico de esta

enfermedad, teniendo en cuenta que la utilización de muestras de saliva representa una alternativa no invasiva comparada a las muestras de sangre y biopsias. Cabe resaltar que, aunque existe un creciente esfuerzo dedicado a la investigación del cáncer bucal, la cual se centra en la identificación de indicadores biológicos para el diagnóstico y la agresividad biológica, son pocos los que han examinado biomarcadores tumorales en saliva.

Como metodología fueron recolectadas muestras de saliva y cuantificadas por el método de Bradford y para la cuantificación de la proteína TSPO fue usada la técnica de Dot-Blot.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer bucal hace parte de un grupo de cánceres de cabeza y cuello, el cual puede surgir como una lesión primaria en cualquier parte de la cavidad bucal u orofaríngea o por metástasis producto de un sitio distante de origen. En el cáncer bucal pueden estar involucrados sitios como la lengua, el piso de boca, la mucosa oral, encías y labios.¹ En ésta patología, las células proliferan sin medida por medio de mitosis repetidas y anómalas, extendiéndose más allá de los límites normales e invadiendo partes adyacentes del cuerpo. Estas células derivan de una única célula que en algún momento anterior experimentó una mutación y alteró su programa normal de proliferación.²

El cáncer bucal, aunque es poco frecuente en países desarrollados, es considerado un problema serio y de gran crecimiento en muchas partes del mundo. Junto al cáncer orofaríngeo, el cáncer bucal ocupa el sexto lugar en frecuencia a nivel mundial y el tercero en áreas de alta incidencia. La incidencia anual estimada es de 275.000, dos tercios de estos casos siendo de países en vía

¹ MASTHAN, KMK, et al. Advanced diagnostic aids in oral cancer. En: Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2012. vol. 13, no. 8, p. 3573-76

² ANTÓN, Mateo-Sidrón y SOMACARRERA PÉREZ, ML. Cáncer oral: genética, prevención, diagnóstico y tratamiento. revisión de la literatura. En: Avances en Odontoestomatología. 2015. vol. 31, no. 4, p. 247-59

de desarrollo. Algunos países con alta incidencia son Sri Lanka, India, Pakistán y Taiwán, y en sur américa se encuentran Brasil, Uruguay, Puerto Rico y Cuba.³

La tasa de supervivencia del carcinoma oral de células escamosas es de 5 años,⁴ y su pronóstico disminuye con el estadio de la patología, además de la presencia de factores como la edad y los estilos de vida del individuo. El mal pronóstico se le atribuye cuando se presenta en estadios muy avanzados.⁵ En Colombia, en el 2008 se presentaron 528 muertes por cáncer bucal, lo que representa una tasa de 1,2 casos por cien mil habitantes.⁶

Para poder disminuir estas altas tasas de morbilidad y mortalidad, se han empleado diferentes ayudas diagnósticas, por medio de las cuales se espera detectar la patología en estadios más tempranos, ya que a pesar de que el cáncer bucal puede estar precedido por lesiones que podrían ser detectables a nivel de la mucosa, la utilidad de la examinación visual para estas lesiones potencialmente malignas no es altamente efectiva.⁷

Entre los diferentes métodos para el diagnóstico se encuentran aquellos que utilizan tinciones con colorantes, iluminación con luz fluorescente y biopsia. Los primeros evidencian las diferencias en los niveles de actividad metabólica

³ WARNAKULASURIYA, Saman. Living with oral cancer: epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. En: Oral oncology. 2010. Vol. 46, no. 6, p. 407-10

⁴ DISSANAYAKA, W. L., et al. Clinical and histopathologic parameters in survival of oral squamous cell carcinoma. En: Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. Apr, 2012. Vol. 113, no. 4, p. 518-25

⁵ WARNAKULASURIYA. Op. cit.

⁶ LÓPEZ, Juan Carlos Uribe. Mortalidad en Colombia por Cáncer oral en el 2008. En: Revista CES Salud Pública. 2011. Vol. 2, no. 2, p. 187

⁷ GUNERI, P. y EPSTEIN, J. B. Late stage diagnosis of oral cancer: components and possible solutions. En: Oral Oncol. Dec, 2014. Vol. 50, no. 12, p. 1131-6

existentes entre las células normales y tumorales, lo que se traduce en mayor afinidad por algunos colorantes. En el caso de la luz fluorescente, como ésta es absorbida de forma distinta por el tejido epitelial sano o el anormal, se trata de someter la zona sospechosa a la iluminación directa para poder establecer con ello el nivel de reflexión y a su vez determinar el tejido sano del afectado.⁸

Así mismo se han estudiado diferentes métodos como los biomarcadores en saliva, en los cuales se considera que la saliva al ser un fluido biológico, posee algunas ventajas como una sencilla recolección de la muestra, una cantidad suficiente para el análisis o menores costos en comparación con muestras de sangre u orina.⁹

Entre estos biomarcadores se encuentra la proteína translocadora mitocondrial (TSPO) 18kDa, anteriormente conocida como el receptor periférico de benzodiazepinas y fue identificada primeramente en 1977 como un sitio de unión externo al diazepam a nivel del tejido cerebral. Ésta proteína ha sido detectada en varias densidades en la mayoría de los tejidos estudiados, la cual se localiza a nivel de la membrana mitocondrial externa y se asocia al poro de transición de permeabilidad mitocondrial.

⁸ BARBANY, JR. Cáncer oral: Métodos de diagnóstico (screening) rápido en la consulta odontológica. En: Avances en Odontoestomatología. 2008. Vol. 24, no. 1, p. 123-28

⁹ KATAKURA, Akira. A screening test for oral cancer using saliva samples: Proteomic analysis of biomarkers in whole saliva. En: Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology. 2015. Vol. 27, no. 1, p. 1-5

Aunque algunos estudios han investigado la presencia de niveles aumentados de la TSPO 18kDa en diversos tipos de cánceres humanos,¹⁰ son pocos los estudios a nivel internacional que describen la posible relación existente entre la expresión de la TSPO 18kDa en pacientes con cáncer bucal.¹¹ En Colombia no se encuentran estudios que estudien esta problemática, por lo cual se hace necesario cuantificar los valores de la proteína translocadora mitocondrial 18kDa (TSPO) en individuos con cáncer bucal o lesiones potencialmente malignas para establecer precedentes que conlleven a la obtención de un método de diagnóstico precoz a la enfermedad.

1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuál es la expresión en saliva de la proteína translocadora mitocondrial (TSPO) 18kDa en individuos con cáncer bucal o lesiones potencialmente malignas y en individuos sin cáncer de la ciudad de Cartagena?

¹⁰ NAGLER, R, et al. Cigarette smoke-induced reduction in binding of the salivary translocator protein is not mediated by free radicals. En: Biochimie. 2016. Vol. 121, p. 1-4

¹¹ NAGLER, Rafael. Oral cancer, cigarette smoke and mitochondrial 18kDa translocator protein (TSPO)—In vitro, in vivo, salivary analysis. En: Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. 2010.Vol. 1802, no. 5, p. 454-61

2. JUSTIFICACIÓN

A pesar de los avances significativos en la prevención, tratamiento y de la implementación de diferentes métodos para el diagnóstico del cáncer bucal en la actualidad, aún se mantiene una tasa de supervivencia de 5 años y sigue constituyéndose como un problema serio de salud pública, sobre todo en países en vía de desarrollo.¹² Esto se debe en gran parte a la falta de estudios bioquímicos y moleculares sobre marcadores para la detección temprana y la aplicación de los mismos en la práctica clínica, ya que además del examen visual y el diagnóstico histopatológico, se puede estudiar el uso de diferentes métodos alternativos como los biomarcadores salivares, los cuales podrían ser considerados como técnicas no invasivas para la detección del cáncer bucal¹³.

Entre estos biomarcadores salivares se ha estudiado la proteína translocadora mitocondrial (TSPO) 18kDa, la cual se ha encontrado en diferentes estados patológicos en tejidos humanos¹⁴ y puede estar relacionada con el proceso de carcinogénesis oral. Es por ello que en el presente estudio se evalúan los valores de la TSPO 18Kda en pacientes con cáncer bucal o lesiones potencialmente malignas con el propósito de establecer precedentes sobre la investigación en el uso de esta proteína como un biomarcador asociado a cáncer bucal.

¹² BROCKLEHURST, P., et al. Screening programmes for the early detection and prevention of oral cancer. En: Cochrane Database Syst Rev. Nov 19, 2013, no. 11, p. CD004150

¹³ CHENG, Y. S., et al. A review of research on salivary biomarkers for oral cancer detection. En: Clin Transl Med. Feb 24, 2014. Vol. 3, no. 1, p. 3

¹⁴ BATARSEH, Amani y PAPADOPOULOS, Vassilios. Regulation of translocator protein 18kDa (TSPO) expression in health and disease states. En: Molecular and cellular endocrinology. 2010. Vol. 327, no. 1, p. 1-12

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Cuantificar la expresión en saliva de la proteína translocadora mitocondrial 18kDa (TSPO) en individuos con cáncer bucal o lesiones potencialmente malignas y en individuos sin cáncer en Cartagena, Colombia.
-

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir la distribución de las características sociodemográficas en los sujetos de estudio.
- Estandarizar el método para la cuantificación de los niveles de expresión de la proteína TSPO 18kDa en saliva.
- Identificar los niveles de expresión de la proteína TSPO en saliva de los participantes.
- Comparar los niveles de expresión de la proteína TSPO en saliva de acuerdo a cada uno de los diagnósticos histopatológicos obtenidos por biopsia de la lesión.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 CÁNCER BUCAL

El cáncer bucal es el tipo de cáncer más frecuente en cabeza y cuello.¹⁵ La célula que da origen a este tipo de carcinoma es el queratinocito de la mucosa oral. Este es causado, así como muchos cánceres, por la mutación del ADN, fenómeno que a menudo ocurre de manera espontánea, pero puede aumentarse el riesgo, debido a la exposición de algunos tipos de mutágenos, los cuales pueden ser químicos, físicos o microbiológicos. Los diferentes cambios en el ADN pueden favorecer el progreso de un queratinocito normal a uno pre-maligno o potencialmente maligno, el cual se caracteriza por su habilidad para proliferar más de lo normal. Las células se vuelven autónomas y los resultados del cáncer se caracterizan por la invasión a través de la membrana basal epitelial y finalmente la metástasis hacia los nodos linfáticos, hueso, cerebro, hígado y otros sitios.¹⁶

A pesar de los avances significativos en términos de prevención y tratamiento de la enfermedad, aún se mantiene la baja tasa de supervivencia de 5 años luego del

¹⁵ RETTIG, Eleni M y D'SOUZA, Gypsyamber. Epidemiology of head and neck cancer. En: Surgical oncology clinics of North America. 2015. Vol. 24, no. 3, p. 379-96

¹⁶ SCULLY, Crispian y BAGAN, Jose. Oral squamous cell carcinoma overview. En: Oral oncology. 2009. Vol. 45, no. 4, p. 301-08

diagnóstico, debido a las lesiones no controladas o recurrentes y a la falta de marcadores adecuados para una detección temprana.¹⁷

En los individuos con cáncer bucal, el dolor es el síntoma más frecuente, presentándose en un 30% a un 40%. Aunque el dolor es el mayor síntoma, este usualmente aparece sólo cuando las lesiones han alcanzado un tamaño notable, y es el momento en el que el paciente requiere asistencia médica. Es por ello que los carcinomas en etapas tempranas pueden pasar desapercibidos, ya que son asintomáticos.¹⁸

Este tipo de carcinoma puede aparecer en cualquier lugar de la cavidad oral, aunque hay algunas áreas en las cuales se puede encontrar con mayor frecuencia. La lengua y el piso de la boca, son las áreas más comunes donde se puede localizar y ocurre en un 50% de los casos. Otros lugares de aparición son el área retromolar, encía, paladar blando, y con menos frecuencia, el paladar duro. El carcinoma oral de células escamosas, se presenta en su mayoría de cuatro maneras, que incluyen clínicamente a una mancha roja, una mancha blanca o una lesión endofítica ulcerativa, y menos común, puede aparecer como una masa exofítica con márgenes alterados, ulceración en el centro de la lesión y tejido friable.¹⁹

¹⁷ TAGHAVI, Nasim y YAZDI, Ismail. Prognostic factors of survival rate in oral squamous cell carcinoma: Clinical, histologic, genetic and molecular concepts. En: Arch Iran Med. 2015. Vol. 18, no. 5, p. 314-19

¹⁸ WAAL, I, et al. Early diagnosis in primary oral cancer: is it possible? En: Medicina Oral Patologia Oral y Cirurgia Bucal. 2011. Vol. 16, no. 3, p. e300-e05

¹⁹ BAGAN, J., et al. Oral cancer: clinical features. En: Oral Oncol. Jun, 2010. Vol. 46, no. 6, p. 414-7

4.1.1 Epidemiología del cáncer bucal. A nivel mundial, se esperan anualmente 405.000 casos nuevos de cáncer bucal y los países con las más altas tasas son Sri Lanka, India, Pakistán, Bangladesh, Hungría y Francia. En la Unión Europea se estiman 66.650 nuevos casos cada año. La Sociedad Americana de Cáncer estima que habrá 45.780 casos nuevos de cáncer oral y faríngeo en los Estados Unidos en 2015, causando 8650 muertes.²⁰

El cáncer bucal es un problema serio y de gran crecimiento en muchas partes del mundo, este tipo de cáncer junto al faríngeo, son el sexto cáncer más frecuente en el mundo y se encuentran en el tercer lugar en áreas de alta incidencia.²¹

En Sur América y el Caribe, el cáncer bucal y faríngeo ocupan el quinto lugar en hombres y el sexto en las mujeres. La región comprendida por Argentina, el sur de Brasil y Uruguay presenta los niveles de incidencia más altos, aunque el más alto se observa en Brasil. En el Caribe, Puerto Rico tiene la más alta incidencia de cáncer oral, mientras que Cuba tiene una incidencia intermedia de cánceres de la cavidad oral.²²

En la mayoría de los países alrededor del mundo, el cáncer bucal es más común en hombres que en mujeres. Esta diferencia, la cual ha sido reportada, es atribuida a una mayor exposición de factores de riesgo como el alcohol y el tabaco en los hombres y una mayor exposición a la luz solar, relacionada con el tipo de

²⁰ MONTERO, Pablo H y PATEL, Snehal G. Cancer of the oral cavity. En: Surgical oncology clinics of North America. Jul, 2015. Vol. 24, no. 3, p. 491-508

²¹ WARNAKULASURIYA. Op. cit.

²² WARNAKULASURIYA, Saman. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. En: Oral oncology. 2009. Vol. 45, no. 4, p. 309-16

labores que ejercen. Además de los factores antes mencionados, el riesgo de desarrollar el cáncer bucal también aumenta con la edad y la mayoría de los casos ocurren en personas mayores de 50 años.²³

Los principales factores de riesgo son fumar y el consumo de alcohol, sin embargo, el desarrollo de la carcinogénesis oral muestra una etiología multifactorial, donde se involucran factores endógenos (genéticos) y exógenos (ambientales y del comportamiento). Entre estos factores se destacan diferentes variables sociodemográficas y económicas, incluyendo a la falta de higiene oral, la exposición laboral y la presencia de prótesis dentales mal adaptadas. Así mismo existen casos en los que la etiología es desconocida o también se destaca el papel importante de Virus del Papiloma Humano en la asociación con el carcinoma oral de células escamosas.²⁴

4.1.2 Métodos para el diagnóstico del cáncer bucal. La detección temprana del cáncer bucal es un objetivo prioritario en salud pública, en el cual, los profesionales de la salud oral deberían jugar un papel de liderazgo, con el fin de conseguir un mejor pronóstico de la enfermedad. Con respecto a la detección temprana, existen pruebas para evaluar la presencia de la enfermedad en individuos asintomáticos, quienes aparentemente no sufren de ella; así como pruebas para la detección de casos, en la que se realiza la aplicación de un

²³ WARNAKULASURIYA, Living with oral cancer: epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. Op. cit.

²⁴ VARGAS-FERREIRA, Fabiana, et al. Etiologic factors associated with oral squamous cell carcinoma in non-smokers and non-alcoholic drinkers: a brief approach. En: Brazilian dental journal. 2012. Vol. 23, no. 5, p. 586-90

procedimiento específico en pacientes con una lesión identificada. La exploración oral convencional (examen visual y palpación) es considerada la prueba patrón de referencia para el diagnóstico presuntivo de una lesión potencialmente maligna o un cáncer bucal, mientras que el estudio relevante para la detección definitiva de casos es la biopsia y el diagnóstico histopatológico.²⁵

También existen diferentes técnicas complementarias que pueden contribuir al diagnóstico del cáncer oral como la tinción con azul de toluidina, la citología por cepillado, los sistemas de imágenes ópticas, el uso de la sangre o la saliva, entre otros.²⁶

4.1.2.1 Análisis de muestras de saliva. El análisis de la saliva es considerado una alternativa no invasiva a la prueba de suero, siendo una modalidad eficaz para el diagnóstico y la predicción del pronóstico de diversas enfermedades incluyendo al cáncer bucal, así como para controlar el estado después de la terapia del paciente. El desarrollo de herramientas de diagnóstico salivares para estos pacientes es de suma importancia, especialmente para las poblaciones de alto riesgo.²⁷

La recolección de muestras de saliva no es un procedimiento invasivo, además de ser más aceptado por los pacientes, a diferencia de la toma de muestra

²⁵ LESTÓN, Juan Seoane y DIOS, Pedro Diz. Diagnostic clinical aids in oral cancer. En: Oral oncology. 2010. Vol. 46, no. 6, p. 418-22

²⁶ GÜNERI, Pelin y EPSTEIN, Joel B. Late stage diagnosis of oral cancer: components and possible solutions. Ibíd. p. Cited Pages|.Dec, 2014. Vol. 50, no. 12, p. 1131-36

²⁷ KATAKURA, Akira, et al. A screening test for oral cancer using saliva samples: Proteomic analysis of biomarkers in whole saliva. En: Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology. 2015. Vol. 27, no. 1, p. 1-5

sanguínea. También es sabido que la saliva baña toda la cavidad oral y, por lo tanto, es más probable que represente toda la superficie expuesta, lo cual no ocurre utilizando la examinación a través de una biopsia invasiva del tejido local, pero ésta a su vez se enfrenta a otras dificultades como la sensibilidad en relación a la contaminación por bacterias y células del sistema inmune.

Es por ello que la saliva como fluido biológico ha sido de interés como herramienta de diagnóstico en la última década. Esta contiene un amplio espectro de péptidos y proteínas, ácidos nucleicos, electrolitos y hormonas que se originan de múltiples fuentes tanto locales como sistémicas.²⁸ Además se han encontrado múltiples biomarcadores salivares, los cuales han mostrado presentar correlación con la patogénesis del carcinoma oral de células escamosas.²⁹

4.2 PROTEINA TRANSLOCADORA MITOCONDRIAL (TSPO) 18kDa

Entre los biomarcadores que se han estudiado se encuentra la Proteína Translocadora (TSPO) de 18kDa, anteriormente conocida como receptor periférico de benzodiazepinas (PBR), la cual fue identificada en 1977 como un sitio de unión al diazepam a nivel cerebral. Lo que permitió ser descrita como el receptor de tipo periférico de benzodiazepinas, para distinguirla del receptor central de benzodiazepinas (CBR), el cual se localiza principalmente en las membranas de

²⁸ CHIANEH, Yousef Rezaei y PRABHU, Krishnananda. Biochemical markers in saliva of patients with oral squamous cell carcinoma. En: Asian Pacific Journal of Tropical Disease. 2014. Vol. 4, p. S33-S40

²⁹ CHENG, et al. Op. cit.

las neuronas en el sistema nervioso central, mientras que la localización de la TSPO se encuentra a nivel de las membranas mitocondriales de distintos tipos celulares. La TSPO ha sido detectada en varias densidades en la mayoría de tejidos estudiados. Esta proteína se localiza principalmente en la membrana mitocondrial externa y se encuentra muy asociada con el poro de transición de permeabilidad mitocondrial.³⁰

La TSPO fue caracterizada por su habilidad para unir fármacos de pequeñas moléculas, colesterol, y porinas con diversas afinidades. En mamíferos, la significancia biológica de la TSPO ha sido estudiada por décadas y se ha encontrado relacionada con múltiples funciones celulares, incluyendo el transporte de colesterol, la síntesis de hormonas esteroideas, la respiración mitocondrial, la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, la apoptosis y la proliferación celular.^{31,32} Aunque algunas funciones celulares de la TSPO se han conservado, como el transporte de colesterol, su significancia biológica parece estar adaptada para funciones específicas críticas en algunos tejidos.³³

La función mejor caracterizada de la TSPO es la regulación del transporte del colesterol a través de las membranas mitocondriales, el cual es el paso limitante

³⁰ NAGLER, Rafael, et al. Oral cancer, cigarette smoke and mitochondrial 18kDa translocator protein (TSPO)—In vitro, in vivo, salivary analysis. En: Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. 2010. Vol. 1802, no. 5, p. 454-61

³¹ FALCHI, A. M., et al. Intracellular cholesterol changes induced by translocator protein (18 kDa) TSPO/PBR ligands. En: Neuropharmacology. Aug, 2007. Vol. 53, no. 2, p. 318-29

³² LI, Fei, et al. Evolving understanding of translocator protein 18kDa (TSPO). En: Pharmacological research. 2015. vol. 99, p. 404-09

³³ BATARSEH y PAPADOPOULOS. Op. cit.

de la velocidad de la esteroidogénesis. Una vez en la mitocondria, el colesterol es convertido a pregnenolona vía una escisión oxidativa de su cadena lateral por el citocromo P450_{scc}. Ligandos de la TSPO como el colesterol son capaces de iniciar la esteroidogénesis por medio de la unión a la proteína. La presencia de la TSPO en el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPM) también involucra a la proteína en la regulación de la apoptosis y la muerte celular, con ligandos capaces de abrir el PTPM, resultando en la inducción de la apoptosis.^{34,35}

Los ligandos de la TSPO también inhiben la proliferación celular en líneas celulares de cáncer, causando una acumulación de células en la fase G1/G0 del ciclo celular, inhibiendo finalmente la progresión de células a la fase S y G2/M, que es donde ocurre la proliferación celular. Los efectos de la proliferación celular pueden ser debido a una pequeña proporción de la proteína que se expresa en el núcleo de la célula. Sin embargo, los efectos de los ligandos de la TSPO en la apoptosis y la proliferación varían dependiendo de la concentración del ligando, con las acciones antiproliferativas y proapoptóticas en concentraciones micromolares, así como los efectos pro-proliferativos a través de la estimulación de la mitosis y los efectos antiapoptóticos en concentraciones nanomolares.³⁶

³⁴ SCARF, Alana M y KASSIOU, Michael. The translocator protein. En: Journal of Nuclear Medicine. 2011. Vol. 52, no. 5, p. 677-80

³⁵ SÁNCHEZ, Ruth y ARBOLEDA, Gonzalo. Mitocondria y muerte celular. En: NOVA. 2008. Vol. 6, no. 10

³⁶ SCARF y KASSIOU. Op. cit.

4.2.1 Presencia de la proteína translocadora mitocondrial (TSPO) de 18kDa en muestras salivares. Se ha encontrado que la saliva humana contiene la proteína TSPO con características similares de afinidad a la de las células de otros tejidos humanos. Las células de la mucosa epitelial, las cuales exfolian en la saliva, son la fuente más probable para encontrar TSPO en las muestras salivares. La TSPO en saliva puede ser un objetivo de fácil acceso para la investigación médica no invasiva de pruebas que relacionen patologías de la mucosa oral, incluyendo potencialmente al cáncer bucal.³⁷

4.2.2 Relación de la proteína translocadora mitocondrial (TSPO) de 18kDa con el cáncer. Como un mediador de la proliferación celular, varios estudios han reportado un aumento de la capacidad de unión al ligando TSPO y/o unos niveles elevados de la proteína TSPO en líneas celulares de cáncer y biopsias de tumores (incluyendo carcinomas a nivel cerebral, colorrectal, hígado, cavidad oral y próstata), Curiosamente ambas características de localización nuclear de la TSPO y el transporte de colesterol se ha visto aumentado en la metástasis de cáncer de mama y próstata, indicando un patrón de expresión alterado de la TSPO como resultado de cambios regulatorios con células cancerígenas.³⁸

³⁷ NAGLER, R, et al. Cigarette smoke decreases salivary 18 kDa translocator protein binding affinity-in association with oxidative stress. En: Current medicinal chemistry. 2010. Vol. 17, no. 23, p. 2539-46

³⁸ AUSTIN, C. J., et al. The translocator protein (TSPO): a novel target for cancer chemotherapy. En: Int J Biochem Cell Biol. Jul, 2013. Vol. 45, no. 7, p. 1212-6

5. METODOLOGÍA

5.1 TIPO DE ESTUDIO

Se realizó un estudio de tipo descriptivo comparativo.

5.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

Los participantes fueron convocados en los principales centros de referencia de personas con cáncer bucal o lesiones potencialmente malignas de la ciudad de Cartagena. El tamaño de la muestra fueron 6 individuos con diagnóstico de cáncer o lesiones potencialmente malignas en cavidad bucal y 6 individuos sin ninguna alteración bucal, seleccionados a partir de la población de trabajadores pertenecientes a las dependencias administrativas de la Facultad de Odontología de dónde se obtuvieron los sujetos con cáncer. Los participantes fueron seleccionados mediante evaluación de las características clínicas visuales típicas en cavidad bucal y mediante el reporte de biopsia realizado en los diferentes centros de atención.

5.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN

En el grupo de sujetos con la alteración bucal, los criterios para ser seleccionados fueron: diagnóstico de cáncer bucal en cualquier estadio o de lesiones potencialmente malignas. En el grupo de individuos sin ninguna alteración bucal se tuvo en cuenta el sexo y el rango de edades emparejadas con los sujetos del

grupo con cáncer y que aceptaran participar a través de la donación de muestras de saliva.

5.4 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SALIVA

Las muestras de saliva fueron recolectadas en tubos de polipropileno de 15 mL previamente fríos, para obtener una cantidad de 5ml. A todos los participantes se les realizó el cepillado de dientes y posteriormente se les indicó la no ingesta de bebidas ni comidas antes de la colección salival. Todas las muestras se obtuvieron siguiendo el protocolo de expectoración, luego de la obtención de la saliva fue adicionado inhibidor de proteasas Invitrogen y luego las muestras fueron almacenadas a 4 °C en el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cartagena.³⁹

5.5 ANALISIS PROTEOMICO

Se añadió agua MilliQ a las muestras de saliva con una relación (1:1 v/v) y fueron agitadas con Vortex por 30 segundos. Luego se centrifugó (3500 RPM, 25 min, 4 °C) y recolectó el sobrenadante realizando dos alícuotas de 1ml, a las cuales se les añadió 500ml de solución TCA (20%)-Acetona (90%), y fueron agitadas con Vortex por 30 segundos. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas (8000 RPM, 35 min, 4 °C), y se descartó el sobrenadante, para añadir 200ul de acetona fría al

³⁹ HENSON, Bradley Stephen y WONG, David T. Collection, storage, and processing of saliva samples for downstream molecular applications. En: Oral Biology: Molecular Techniques and Applications. 2010. Vol. 666, p. 21-30

90%, nuevamente se agitaron con Vortex por 30 segundos y fueron incubadas a -20°C por 20 minutos. Luego se centrifugó (8000 RPM, 5 min, 4 °C), y fue descartado el sobrenadante, agregando 200ul de acetona fría al 80%, se agitó con Vortex por 30 segundos y fueron incubadas a 20°C por 10 minutos. El sobrenadante fue descartado completamente y los residuos de acetona fueron eliminados, luego se agregó 10ul de 1M NaOH y se incubaron por 2 minutos, para luego añadir 80 uL de Buffer de rehidratación (Urea 7 M, Tiourea 2, 4% CHAPS) y posteriormente fueron incubadas en hielo por una hora agitando con Vortex de 30 segundos periódicamente cada 10 minutos. El sobrenadante fue recolectado para realización de determinación por el método de Bradford utilizando una microplaca de 96 pozos,^{40,41} y fue realizada una curva de calibrado con un R² de 0,9934.

Consecutivamente, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% con 20µg de proteína en cada carril y tinción con solución coloidal de Commassie overnight, con el propósito de evaluar el perfil de bandeo de proteínas de saliva. Se utilizó una cámara Mini-PROTEAN® Tetra Cell de BioRad®, y un sistema discontinuo de geles, en donde durante la corrida del gel de apilamiento se aplicaron 90V, luego durante el apilamiento de las proteínas entre el staking y el resolving se aumentó el voltaje a 120V, y se corrió finalmente bajo este voltaje estándar. Esta electroforesis en gel tuvo una duración de una hora y treinta minutos aproximadamente. Se utilizó un marcador de peso molecular Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo Fisher® de 10 bandas. La imagen

⁴⁰ JESSIE, K, et al. Protein precipitation method for salivary proteins and rehydration buffer for two-dimensional electrophoresis. *En: Biotechnology*. 2008. Vol. 7, p. 686-93

⁴¹ GENHRKE. Total protein extraction for IEF and 2-D SDS-PAGE. . 2006

se obtuvo utilizando el ChemiDoc MP system® de Bio-Rad, en donde no se utilizó luz UV.⁴²

La determinación de la TSPO 18kDa fue realizada mediante dot blot, en este inmunoensayo la muestra se sembró directamente sobre una membrana de PVDF previamente activada en metanol y en agua MilliQ. Luego se dejó secar y se activó utilizando PBS-Leche al 10%. Seguido a ello, fueron incubados los anticuerpos Anti-TSPO (EMD Millipore Corporation) policlonal como anticuerpo primario a una concentración 1:2000 y Anti-Rabbit Ig HRP policlonal (EMD Millipore Corporation) a 1:10000. Fueron sembradas 20µg de proteína de cada muestra por triplicado. El revelado se realizó por quimioluminiscencia utilizando sustratos para HRP INVITROGEN mediante el ChemiDoc MP system® de Bio-Rad durante 20 minutos, el cual capturó una imagen cada 1,5 minutos, acumulándose la señal hasta llegar a la imagen final.⁴³

5.6 ANALISIS ESTADÍSTICO

Se diseñó una base de datos en Microsoft office Excel 2013. Luego se transportó al programa STATA® (Stata Corp. LP, College Station, TX, USA). Inicialmente fue evaluada la normalidad de la distribución de datos a partir del test de Shapiro wilk, obteniendo una distribución no paramétrica. Para el análisis descriptivo fueron usadas las medidas de tendencia central como proporciones, mediana y moda;

⁴² LAMY, Elsa, et al. Protein Electrophoresis in Saliva Study. 2012

⁴³ Protein Blotting Applications Guide. Bedford, Massachusetts, USA: Millipore Corporation, 1997.

además de las medidas de dispersión como: rango y coeficiente de variación. Para establecer la validez del protocolo de obtención de la proteína en muestras de mucosa bucal fue aplicado un test de sensibilidad y especificidad comparando los resultados a partir de lo obtenido en los resultados de un Western Blot. Para evaluar la asociación entre los cambios histopatológicos y la expresión de la proteína TSPO en saliva se aplicó el test de Kruskal Wallis, usando un valor para la significancia $p < 0.05$. Así mismo, para comparar los valores de cuantificación de la proteína en los dos grupos de estudio fue usada la U. Mann Whitney.

5.7 CONSIDERACIONES ÉTICAS

La presente investigación se clasifica de acuerdo a la resolución número 008430 del 4 de octubre de 1993, capítulo 1, artículo 11 – inciso c, como una investigación sin riesgo a realizarse en pacientes adultos, a los cuales se les solicitó el consentimiento informado por escrito para la obtención de muestras de saliva con fines de realizar la evaluación proteica de la TSPO. Al participante se le explicó el objetivo del presente trabajo, teniendo en cuenta que los investigadores asumieron el compromiso de no socializar la información obtenida en forma individual, tratando ante todo de no vulnerar la intimidad de los participantes. En este sentido se diseñó un consentimiento informado por escrito, basados en la normatividad legal vigente; normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en seres humanos, resolución 8430 de 1993 antiguo Ministerio de Salud,

República de Colombia y declaración de Helsinki, modificación de Edimburgo año 2000 (ver formato anexo 1).

6. RESULTADOS

La muestra estuvo constituida por 6 sujetos pertenecientes a centros de referencias de pacientes con cáncer bucal y 6 individuos pertenecientes a las dependencias administrativas de la Facultad de Odontología de la Universidad de Cartagena dónde se obtuvieron los sujetos con cáncer. La edad promedio fue de 60.08 años, siendo la edad mínima 41 años y la máxima 85 años. La mayoría de los participantes pertenecían al sexo femenino. Además, la ocupación más frecuente del grupo de sujetos con la patología fue ama de casa (*Ver Tabla 1*).

Tabla 1. Características sociodemográficas de los sujetos de estudio.

Variable	Grupo enfermo		Grupo no enfermo	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
Sexo				
Femenino	5	83,3	4	66,6
Masculino	1	16,6	2	33,3
Estado Civil				
Soltero	1	16,6	1	16,6
Casado	1	16,6	3	50,0
Viudo	3	50,0	0	0
Unión Libre	1	16,6	2	33,3
Ocupación				
Ama de casa	5	83,3	0	0
Salud	0	0	6	100
Comunicaciones	0	0	0	0
Otro	1	16,6	0	0
Tabaquismo				
Consume cigarrillo				
Si	4	66,6	0	0
No	2	33,3	6	100
Frecuencia por día				
1 a 2	0		0	0
3 a 5	0		0	0

Más de 5	4	66,6	0	0
No aplica	2	33,3	6	100
Forma				
Candela invertida	0	0	0	0
Normal	4	66,6	0	0
No aplica	2	33,3	6	100
Alcoholismo				
Consumo de alcohol regularmente				
Si	1	16,6	1	16,6
No	5	83,3	5	83,3
Frecuencia por semana				
Menos de 1	1	16,6	1	16,67
1 a 2	0	0	0	0
3 a 5	1	16,6	0	0
Más de 5	0	0	0	0
No aplica	4	66,6	5	83,3
Tipo de alcohol				
Cerveza	1	16,6	1	16,6
Aguardiente	1	16,6	0	0
Ron	0	0	0	0
Whisky	0	0	0	0
Otro	0	0	0	0
No aplica	4	66,6	5	100

Se observó que el estado civil más frecuente entre los participantes fue viudo para el grupo de individuos enfermos, mientras que para los pacientes sin ninguna afección fue casado. Además, respecto a los hábitos como el tabaquismo, el 66,6% de los sujetos enfermos consume cigarrillo con una frecuencia mayor a 5 por día y de una forma normal, no invertida; mientras que los sujetos del grupo sin ninguna afección afirmaron no presentar el hábito de fumar (*ver tabla 1*).

Así mismo, se evaluó el hábito de consumo de alcohol observándose en su mayoría que tanto los participantes enfermos y los sujetos sin ninguna afección no

consumen alcohol y los que lo hacen presentan una frecuencia semanal baja (ver *tabla 1*).

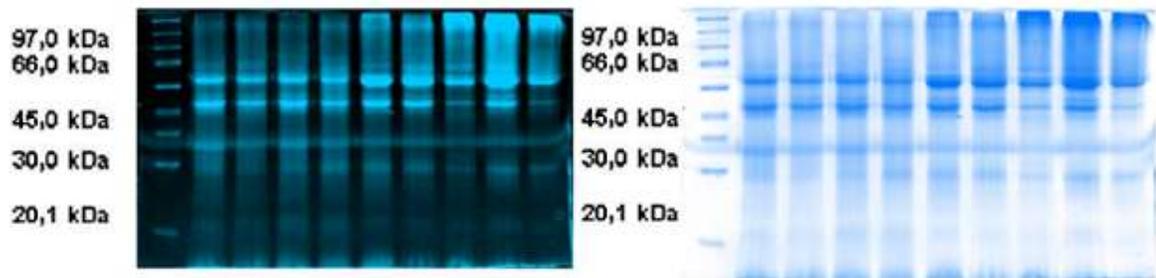
Respecto al resultado del estudio histopatológico que se realizó utilizando los reportes de biopsia incisional, se observó que no hubo diagnósticos de carcinoma in situ o de carcinoma entre los participantes, mientras que hallazgos como displasia epitelial e hiperplasia fueron encontradas con mayor proporción en los sujetos de estudio. Así mismo, se presentaron valores ligeramente mayores en la expresión de proteína TSPO en los diagnósticos de acantosis, sin embargo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0.16$) (ver *tabla 2*).

Tabla 2. Relación entre el diagnóstico histopatológico de las lesiones y los valores de cuantificación de la proteína TSPO 18kDa en saliva.

Variable	Volumen de la señal obtenida TSPO 18kda	p valor
Hallazgos histológicos	Mediana TSPO	
Hiperplasia (n=2)	95,4	
Displasia epitelial (n=3)	140,2	0,16
Acantosis con hiperqueratosis (n=1)	141,3	

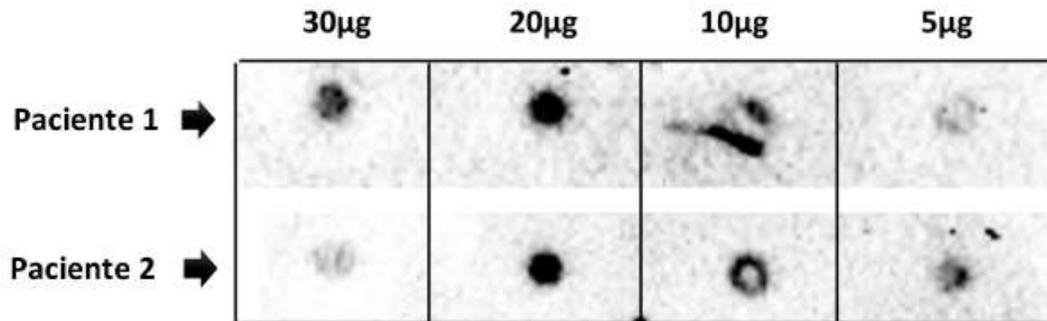
En cuanto a la estandarización del método de cuantificación de la proteína, luego de realizada la cuantificación a través del método Bradford se obtuvo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% un correcto perfil de bandeo, con presencia de la proteína a nivel del peso molecular correspondiente a 18kDa (Ver *figura 1*).

Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%.



Al realizar un primer ensayo para determinar la cantidad de proteína a sembrar para el dot blot, se observó que al utilizar 20µg de proteína se obtuvo una mejor señal, y para ello fueron analizadas las muestras de dos de los participantes sin la patología. (Ver figura 2).

Figura 2. Dot blot para ensayo utilizando muestras de dos pacientes para comparación de la señal obtenida dependiendo de la cantidad de proteína sembrada en la membrana.



Al realizar el análisis de la expresión de la proteína translocadora mitocondrial mediante el dot blot en ambos grupos de participantes (ver figura 3), se observaron valores en promedio más altos en el grupo de sujetos con cáncer bucal o lesiones potencialmente malignas en comparación con los valores en el grupo de individuos sin la patología ($p=0.008$) (Ver tablas 3 y 4, figura 4).

Figura 3. Análisis utilizando densitometría óptica del dot blot en el grupo de sujetos con cáncer bucal o lesiones potencialmente malignas y el grupo de individuos sin la patología.

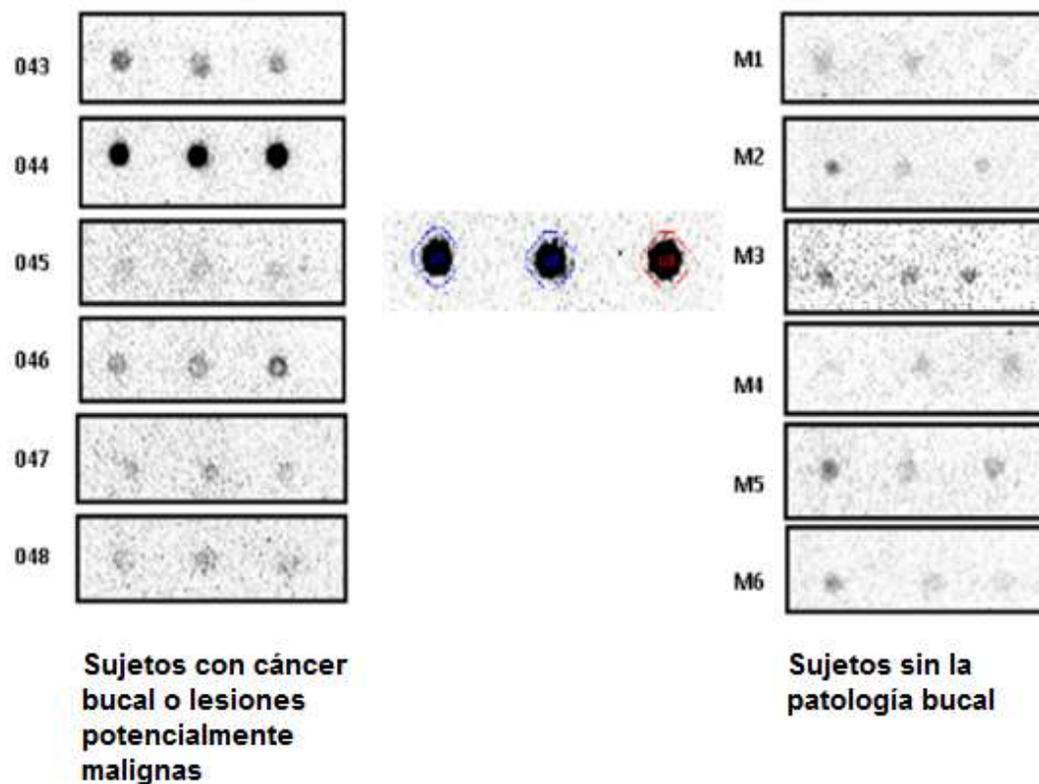


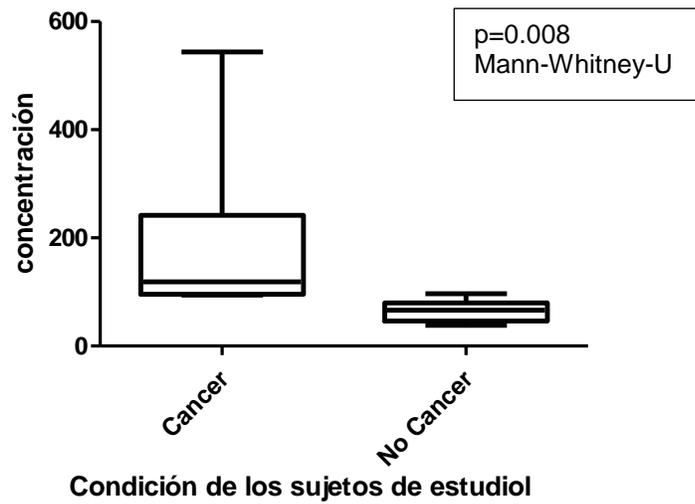
Tabla 3. Valores de expresión de la (TSPO) 18 kDa en muestras de saliva del grupo de sujetos con cáncer bucal o lesiones potencialmente malignas.

Código	Réplica 1	Réplica 2	Promedio	DS	CV
043	128,2	152,0	140,2	17038,4	12,1
044	506,4	580,9	543,7	52685,1	9,7
045	93,2	94,8	94,0	1145,5	1,2
046	139,0	143,6	141,3	3312,1	2,3
047	94,9	98,1	96,5	2299,5	2,4
048	97,1	96,4	96,8	500,6	0,5
Total			185,4	176,8	95,4

Tabla 4. Valores de expresión de la (TSPO) 18 kDa en muestras de saliva del grupo de sujetos sin la patología.

Código	Réplica 1	Réplica 2	Promedio	DS	CV
M1	60,4	60,1	60,2	175,4	0,3
M2	117,6	76,0	96,8	29443,9	30,4
M3	76,2	68,3	72,2	5563,5	7,7
M4	84,4	64,1	74,3	14371,2	19,3
M5	48,4	49,1	48,8	469,5	1,0
M6	39,6	36,8	38,2	1951,6	5,1
Total			65,1	20,7	31,9

Figura 4. Cuantificación de la expresión de la proteína TSPO en sujetos con o sin Càncer bucal



7. DISCUSIÓN

Este estudio representa la primera investigación realizada respecto a la cuantificación de los niveles de la proteína translocadora mitocondrial (TSPO) de 18kDa en individuos con cáncer bucal o lesiones potencialmente malignas en Colombia.

Se observó una tendencia al aumento de los niveles de expresión de la TSPO en el grupo de individuos con la patología, lo cual ha sido previamente descrito por autores como Nagler, et al (2010).⁴⁴ Estos niveles aumentados están acordes a los estudios reportados previamente, donde una sobre-expresión de ésta proteína ha sido relacionada en la tumorigenicidad de algunos cánceres como cerebro, mama, colon y próstata.^{45,46, 47,48}

Estos valores de expresión aumentados de la proteína TSPO pueden estar relacionados con el mecanismo de la carcinogénesis oral. Varios estudios han presentado diferentes hipótesis y una de ellas afirma que la TSPO interviene posiblemente en los mecanismos o procesos involucrados con la muerte celular programada, sobre todo en la cascada de activación de la apoptosis por vía

⁴⁴ NAGLER, et al. Op. cit.

⁴⁵ MAASER, Kerstin, et al. Up-regulation of the peripheral benzodiazepine receptor during human colorectal carcinogenesis and tumor spread. En: Clinical cancer research. Mar 1, 2005. Vol. 11, no. 5, p. 1751-56

⁴⁶ HAN, Zeqiu, et al. Expression of peripheral benzodiazepine receptor (PBR) in human tumors: relationship to breast, colorectal, and prostate tumor progression. En: Journal of Receptors and Signal Transduction. 2003. Vol. 23, no. 2-3, p. 225-38

⁴⁷ GALIEGUE, S., et al. Immunohistochemical assessment of the peripheral benzodiazepine receptor in breast cancer and its relationship with survival. En: Clin Cancer Res. Mar 15, 2004. Vol. 10, no. 6, p. 2058-64

⁴⁸ VEENMAN, Leo, et al. Peripheral-type benzodiazepine receptor density and in vitro tumorigenicity of glioma cell lines. En: Biochemical pharmacology. 2004. Vol. 68, no. 4, p. 689-98

mitocondrial, mediante la oxidación de las cardiolipinas y especies reactivas de oxígeno (ROS), lo cual podría explicar la proliferación sin control de las células afectadas.^{49,50}

Es interesante destacar la diferencia entre los valores de expresión de la proteína TSPO entre el grupo de participantes, lo cual se atribuye a una posible variabilidad biológica donde interactúan múltiples factores que pueden generar estos cambios. Petti (2009) afirma que esto se puede atribuir a la presencia de factores de riesgo como los estilos de vida, de los cuales existe evidencia en su asociación como el consumo de tabaco o alcohol.⁵¹

Para la cuantificación de las proteínas totales en saliva, se realizó método de Bradford que, a pesar de ser relativamente nuevo, es el ensayo para la evaluación de proteínas más usado y aceptado universalmente, el cual utiliza un reactivo de Coomassie para unir las proteínas en una solución ácida (a través de uniones electrostáticas y de van der Waals), resultando en un cambio en la absorción del colorante de 465 a 595nm.⁵² En este estudio se utilizó este método debido a sus ventajas al ser altamente sensible y ser capaz de medir de 1-20 µg de proteína. Sin embargo, cabe resaltar que se tuvieron previamente en cuenta los materiales que pudieran interferir en el análisis, sobre todo los detergentes.

⁴⁹ VEENMAN, Leo, et al. VDAC activation by the 18 kDa translocator protein (TSPO), implications for apoptosis. En: Journal of bioenergetics and biomembranes. 2008. Vol. 40, no. 3, p. 199-205

⁵⁰ VEENMAN, Leo, et al. Channel-like functions of the 18-kDa translocator protein (TSPO): regulation of apoptosis and steroidogenesis as part of the host-defense response. En: Current pharmaceutical design. 2007. Vol. 13, no. 23, p. 2385-405

⁵¹ PETTI, Stefano. Lifestyle risk factors for oral cancer. En: Oral oncology. Apr-May, 2009. Vol. 45, no. 4, p. 340-50

⁵² HEGYI, György, et al. Introduction to Practical Biochemistry. En: ELTE Faculty of Natural Sciences, Institute of Biology. 2013

En el presente estudio se utilizó la técnica dot blot, la cual permite detectar la reacción específica entre un antígenos y un anticuerpo y está basado en el mismo principio del western Blot; sin embargo, el dot blot requiere una menor cantidad del antígeno a estudiar y presenta gran sensibilidad.⁵³ Es por ello que se implementó para la presente evaluación de la expresión de la proteína TSPO. Otros autores como Bahar et al (2007) han utilizado el análisis a través de western blot para la evaluación de proteínas salivares en pacientes con carcinoma oral de células escamosas, mostrando diferencias en los niveles de expresión comparado con grupos controles.⁵⁴ Se requiere así mismo, la realización de un inmunoensayo western blot para el presente estudio, con el propósito corroborar que mediante los ensayos se esté evaluando con mayor especificidad la proteína TSPO 18kDa y a su vez se utilicen anticuerpos primarios y secundarios de tipo monoclonales que favorezcan la afinidad durante incubación con la muestra y brinde mayor confiabilidad.

Para la estandarización del método, durante el primer ensayo se aplicaron las concentraciones de los anticuerpos primario (Anti-TSPO EMD Millipore Corporation) y secundario (Anti-Rabbit IgG HRP EDM Millipore) siguiendo los protocolos reportados anteriormente.^{55,56,57} Aunque se observó que al utilizar una

⁵³ RARAS, Tri Yudani Mardining, et al. Salivary slg-A response against the recombinant Ag38 antigen of Mycobacterium tuberculosis Indonesian strain. En: International journal of clinical and experimental medicine. 2014. Vol. 7, no. 1, p. 129

⁵⁴ BAHAR, G., et al. Salivary analysis in oral cancer patients: DNA and protein oxidation, reactive nitrogen species, and antioxidant profile. En: Cancer. Jan 1, 2007. Vol. 109, no. 1, p. 54-9

⁵⁵ KUGLER, Wilfried, et al. Ligands of the mitochondrial 18 kDa translocator protein attenuate apoptosis of human glioblastoma cells exposed to erucylphosphohomocholine. En: Analytical Cellular Pathology. 2008. Vol. 30, no. 5, p. 435-50

concentración del anticuerpo primario de 1:2000 y el secundario 1:10000 se presentó mayor afinidad para la proteína como antígeno en las muestras de estudio. Sin embargo, cabe resaltar la limitación en el uso de anticuerpos de tipo policlonales, los cuales comparados con los monoclonales presentan una menor especificidad a los antígenos a estudiar.⁵⁸

Entre las limitaciones del presente estudio se encuentran el tamaño de muestra, por lo que se espera continuar con esta investigación aumentando el número de sujetos para poder con ello establecer modelos explicativos a partir de variables sociodemográficas y de factores de riesgo (consumo de tabaco y alcohol).

Los resultados de la cuantificación de la proteína TSPO en individuos con cáncer bucal o lesiones potencialmente malignas, representan una investigación base o precedente para el estudio de ésta proteína como un marcador bucal utilizando muestras de saliva en individuos que presentan la afección. Además de la posibilidad de desarrollar en un futuro, una posible evaluación de este marcador en personas que presentan factores de riesgos definidos, los cuales han sido mencionados anteriormente.

⁵⁶ SHOUKRUN, Rami, et al. The 18-kDa translocator protein, formerly known as the peripheral-type benzodiazepine receptor, confers proapoptotic and antineoplastic effects in a human colorectal cancer cell line. En: Pharmacogenetics and genomics. 2008. Vol. 18, no. 11, p. 977-88

⁵⁷ ZENO, Sivan, et al. CoCl₂ induces apoptosis via the 18 kDa translocator protein in U118MG human glioblastoma cells. En: Biochemistry. 2009. Vol. 48, no. 21, p. 4652-61

⁵⁸ RITTER, Mary A. Polyclonal and monoclonal antibodies. En: Diagnostic and Therapeutic Antibodies. 2000, p. 23-34

8. CONCLUSIÓN

Existe una tendencia al aumento de los valores de expresión de la proteína translocadora mitocondrial (TSPO) de 18kDa en saliva de los participantes con lesiones potencialmente malignas, comparados con los valores de individuos sin la patología bucal.

9. RECOMENDACIONES

Se necesitan más estudios capaces de relacionar el pronóstico y el diagnóstico del cáncer bucal y las funciones de la proteína translocadora mitocondrial (TSPO) de 18kDa involucradas en el proceso de la carcinogénesis bucal.

BIBLIOGRAFÍA

Protein Blotting Applications Guide. Bedford, Massachusetts, USA: Millipore Corporation, 1997.

ANTÓN, Mateo-Sidrón y SOMACARRERA PÉREZ, ML. Cáncer oral: genética, prevención, diagnóstico y tratamiento. revisión de la literatura. En: Avances en Odontoestomatología. 2015. vol. 31, no. 4, p. 247-59

AUSTIN, C. J., et al. The translocator protein (TSPO): a novel target for cancer chemotherapy. En: Int J Biochem Cell Biol. Jul, 2013. vol. 45, no. 7, p. 1212-6

BAGAN, J., et al. Oral cancer: clinical features. En: Oral Oncol. Jun, 2010. vol. 46, no. 6, p. 414-7

BAHAR, G., et al. Salivary analysis in oral cancer patients: DNA and protein oxidation, reactive nitrogen species, and antioxidant profile. En: Cancer. Jan 1, 2007. vol. 109, no. 1, p. 54-9

BARBANY, JR. Cáncer oral: Métodos de diagnóstico (screening) rápido en la consulta odontológica. En: Avances en Odontoestomatología. 2008. vol. 24, no. 1, p. 123-28

BATARSEH, Amani y PAPADOPOULOS, Vassilios. Regulation of translocator protein 18kDa (TSPO) expression in health and disease states. En: Molecular and cellular endocrinology. 2010. vol. 327, no. 1, p. 1-12

BROCKLEHURST, P., et al. Screening programmes for the early detection and prevention of oral cancer. En: Cochrane Database Syst Rev. Nov 19, 2013, no. 11, p. CD004150

CHENG, Y. S., et al. A review of research on salivary biomarkers for oral cancer detection. En: Clin Transl Med. Feb 24, 2014. vol. 3, no. 1, p. 3

CHIANEH, Yousef Rezaei y PRABHU, Krishnananda. Biochemical markers in saliva of patients with oral squamous cell carcinoma. En: Asian Pacific Journal of Tropical Disease. 2014. vol. 4, p. S33-S40

DISSANAYAKA, W. L., et al. Clinical and histopathologic parameters in survival of oral squamous cell carcinoma. En: Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. Apr, 2012. vol. 113, no. 4, p. 518-25

FALCHI, A. M., et al. Intracellular cholesterol changes induced by translocator protein (18 kDa) TSPO/PBR ligands. En: Neuropharmacology. Aug, 2007. vol. 53, no. 2, p. 318-29

GALIEGUE, S., et al. Immunohistochemical assessment of the peripheral benzodiazepine receptor in breast cancer and its relationship with survival. En: Clin Cancer Res. Mar 15, 2004. vol. 10, no. 6, p. 2058-64

GENHRKE. Total protein extraction for IEF and 2-D SDS-PAGE. . 2006

GUNERI, P. y EPSTEIN, J. B. Late stage diagnosis of oral cancer: components and possible solutions. En: Oral Oncol. Dec, 2014. vol. 50, no. 12, p. 1131-6

GÜNERI, Pelin y EPSTEIN, Joel B. Late stage diagnosis of oral cancer: components and possible solutions. En: Oral oncology. Dec, 2014. vol. 50, no. 12, p. 1131-36

HAN, Zeqiu, et al. Expression of peripheral benzodiazepine receptor (PBR) in human tumors: relationship to breast, colorectal, and prostate tumor progression. En: Journal of Receptors and Signal Transduction. 2003. vol. 23, no. 2-3, p. 225-38

HEGYI, György, et al. Introduction to Practical Biochemistry. En: ELTE Faculty of Natural Sciences, Institute of Biology. 2013

HENSON, Bradley Stephen y WONG, David T. Collection, storage, and processing of saliva samples for downstream molecular applications. En: Oral Biology: Molecular Techniques and Applications. 2010. vol. 666, p. 21-30

JESSIE, K, et al. Protein precipitation method for salivary proteins and rehydration buffer for two-dimensional electrophoresis. En: Biotechnology. 2008. vol. 7, p. 686-93

KATAKURA, Akira. A screening test for oral cancer using saliva samples: Proteomic analysis of biomarkers in whole saliva. En: Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology. 2015. vol. 27, no. 1, p. 1-5

KATAKURA, Akira, et al. A screening test for oral cancer using saliva samples: Proteomic analysis of biomarkers in whole saliva. En: Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology. 2015. vol. 27, no. 1, p. 1-5

KUGLER, Wilfried, et al. Ligands of the mitochondrial 18 kDa translocator protein attenuate apoptosis of human glioblastoma cells exposed to erucylphosphohomocholine. En: Analytical Cellular Pathology. 2008. vol. 30, no. 5, p. 435-50

LAMY, Elsa, et al. Protein Electrophoresis in Saliva Study. 2012

LESTÓN, Juan Seoane y DIOS, Pedro Diz. Diagnostic clinical aids in oral cancer. En: Oral oncology. 2010. vol. 46, no. 6, p. 418-22

LI, Fei, et al. Evolving understanding of translocator protein 18kDa (TSPO). En: Pharmacological research. 2015. vol. 99, p. 404-09

LÓPEZ, Juan Carlos Uribe. Mortalidad en Colombia por Cáncer oral en el 2008. En: Revista CES Salud Pública. 2011. vol. 2, no. 2, p. 187

MAASER, Kerstin, et al. Up-regulation of the peripheral benzodiazepine receptor during human colorectal carcinogenesis and tumor spread. En: Clinical cancer research. Mar 1, 2005. vol. 11, no. 5, p. 1751-56

MASTHAN, KMK, et al. Advanced diagnostic aids in oral cancer. En: Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2012. vol. 13, no. 8, p. 3573-76

MONTERO, Pablo H y PATEL, Snehal G. Cancer of the oral cavity. En: Surgical oncology clinics of North America. Jul, 2015. vol. 24, no. 3, p. 491-508

NAGLER, R, et al. Cigarette smoke-induced reduction in binding of the salivary translocator protein is not mediated by free radicals. En: Biochimie. 2016. vol. 121, p. 1-4

NAGLER, R, et al. Cigarette smoke decreases salivary 18 kDa translocator protein binding affinity-in association with oxidative stress. En: Current medicinal chemistry. 2010. vol. 17, no. 23, p. 2539-46

NAGLER, Rafael. Oral cancer, cigarette smoke and mitochondrial 18kDa translocator protein (TSPO)—In vitro, in vivo, salivary analysis. En: Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. 2010. vol. 1802, no. 5, p. 454-61

NAGLER, Rafael, et al. Oral cancer, cigarette smoke and mitochondrial 18kDa translocator protein (TSPO)—In vitro, in vivo, salivary analysis. En: Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. 2010. vol. 1802, no. 5, p. 454-61

PETTI, Stefano. Lifestyle risk factors for oral cancer. En: Oral oncology. Apr-May, 2009. vol. 45, no. 4, p. 340-50

RARAS, Tri Yudani Mardining, et al. Salivary sIg-A response against the recombinant Ag38 antigen of Mycobacterium tuberculosis Indonesian strain. En: International journal of clinical and experimental medicine. 2014. vol. 7, no. 1, p. 129

RETTIG, Eleni M y D'SOUZA, Gypsyamber. Epidemiology of head and neck cancer. En: Surgical oncology clinics of North America. 2015. vol. 24, no. 3, p. 379-96

RITTER, Mary A. Polyclonal and monoclonal antibodies. En: Diagnostic and Therapeutic Antibodies. 2000, p. 23-34

SÁNCHEZ, Ruth y ARBOLEDA, Gonzalo. Mitochondria y muerte celular. En: NOVA. 2008. vol. 6, no. 10

SCARF, Alana M y KASSIOU, Michael. The translocator protein. En: Journal of Nuclear Medicine. 2011. vol. 52, no. 5, p. 677-80

SCULLY, Crispian y BAGAN, Jose. Oral squamous cell carcinoma overview. En: Oral oncology. 2009. vol. 45, no. 4, p. 301-08

SHOUKRUN, Rami, et al. The 18-kDa translocator protein, formerly known as the peripheral-type benzodiazepine receptor, confers proapoptotic and antineoplastic effects in a human colorectal cancer cell line. En: Pharmacogenetics and genomics. 2008. vol. 18, no. 11, p. 977-88

TAGHAVI, Nasim y YAZDI, Ismail. Prognostic factors of survival rate in oral squamous cell carcinoma: Clinical, histologic, genetic and molecular concepts. En: Arch Iran Med. 2015. vol. 18, no. 5, p. 314-19

VARGAS-FERREIRA, Fabiana, et al. Etiologic factors associated with oral squamous cell carcinoma in non-smokers and non-alcoholic drinkers: a brief approach. En: Brazilian dental journal. 2012. vol. 23, no. 5, p. 586-90

VEENMAN, Leo, et al. Peripheral-type benzodiazepine receptor density and in vitro tumorigenicity of glioma cell lines. En: Biochemical pharmacology. 2004. vol. 68, no. 4, p. 689-98

VEENMAN, Leo, et al. Channel-like functions of the 18-kDa translocator protein (TSPO): regulation of apoptosis and steroidogenesis as part of the host-defense response. En: Current pharmaceutical design. 2007. vol. 13, no. 23, p. 2385-405

VEENMAN, Leo, et al. VDAC activation by the 18 kDa translocator protein (TSPO), implications for apoptosis. En: Journal of bioenergetics and biomembranes. 2008. vol. 40, no. 3, p. 199-205

WAAL, I, et al. Early diagnosis in primary oral cancer: is it possible? En: Medicina Oral Patologia Oral y Cirurgia Bucal. 2011. vol. 16, no. 3, p. e300-e05

WARNAKULASURIYA, Saman. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. En: Oral oncology. 2009. vol. 45, no. 4, p. 309-16

WARNAKULASURIYA, Saman. Living with oral cancer: epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. En: Oral oncology. 2010. vol. 46, no. 6, p. 407-10

ZENO, Sivan, et al. CoCl₂ induces apoptosis via the 18 kDa translocator protein in U118MG human glioblastoma cells. En: Biochemistry. 2009. vol. 48, no. 21, p. 4652-61

ANEXOS

Anexo 1. Formato de consentimiento informado

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

CONSENTIMIENTO INFORMADO DE DONACIÓN DE MUESTRAS ÓRGANOS O TEJIDOS

TÍTULO DEL PROYECTO: Análisis salival de la Proteína Translocadora Mitocondrial 18 kDa en pacientes con cáncer oral.

INVESTIGADORES: Farith González Martínez, Meisser Madera Anaya, Guillermo Tamayo Cabeza.

FECHA: _____

Según la resolución del Ministerio de Salud de Colombia No. 008430 de 1993 y Pautas Éticas Internacionales para la Investigación y Experimentación Biomédica en Seres Humanos de 2000.

El objetivo del estudio es: Evaluar la asociación entre la presencia y la expresión de la Proteína Translocadora Mitocondrial 18 kDa (TSPO) en saliva de pacientes con cáncer oral.

El grupo investigador lo invita a donar su saliva para ser utilizada dentro de este proyecto de investigación. Las muestras de saliva serán conservadas adecuadamente y serán utilizadas únicamente en esta investigación. Una vez finalice el proyecto las muestras serán destruidas. Este procedimiento será realizado por personas expertas dentro de las instalaciones de la Universidad de Cartagena y no genera ningún riesgo para su salud.

Las dudas pueden ser resueltas mediante comunicación con: Farith González Martínez. Tel. 301-3680355, correo: fgonzalezm1@unicartagena.edu.co

Yo _____ identificado con cédula número _____ declaro que autorizo la donación de mi saliva para este proyecto de investigación. Se me ha informado que estos procedimientos no presentan ningún proceso invasivo que requiera riesgo para la salud y me han confirmado los investigadores que los resultados del presente estudio van a ser presentados compilados, sin vulnerar mi intimidad y el derecho de preservar mi identidad y la condición que presento.

DATOS DEL PARTICIPANTE

Nombre _____ C.C No. _____

Teléfono: _____ Firma _____

DATOS DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL

Nombre Farith González Martínez C.C No. 79533296

Teléfono: 3013680355 Firma _____

DATOS DE LOS TESTIGOS

Nombre _____ C.C No. _____

Teléfono: _____ Firma _____

Parentesco con el paciente: _____

Nombre _____ C.C No. _____

Teléfono: _____ Firma _____

Parentesco con el paciente: _____

Anexo 2. Formato de recolección de información

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

FORMATO DE RECOLECCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LOS DATOS

TÍTULO DEL PROYECTO: Análisis salival de la Proteína Translocadora Mitocondrial 18 kDa en pacientes con cáncer oral.

Fecha: _____ Nombre: _____

Características Socio demográficas y hábitos

1. Edad: _____ 2. Sexo: (F) (M) 3. Estado civil: () Soltero () Casado () Viudo () Unión libre () Separado (). 4. Ocupación: Ama de casa () Desempleado () Estudiante () Comerciante () Prestador de Servicios () Agropecuario () Industrial () Transporte () Financiero () Construcción () salud () Comunicaciones () Otro () Cual? _____

Tabaquismo

5. Consume cigarrillo: Si () No ()

6. Frecuencia por día: 1 a 2 () 3 a 5 () más de 5 () No aplica ()

7. Forma: Candela invertida () Normal () No aplica ()

Alcoholismo

8. Tiene el hábito de consumir alcohol regularmente: Si () No ()

9. Frecuencia por semana: < 1 () 1 a 2 () 3 a 5 () más de 5 () No aplica ()

10. Tipo de Alcohol: Cerveza () Aguardiente () Ron () Whisky () Otro () No aplica ()

Cual: _____

Examen clínico visual

11. Tipo de lesión visual: Ulcerativa () Blanca () Roja ()

12. Ubicación: Lengua () Paladar () Labios () Mucosa yugal () Encías () Piso de boca () Otra () Cual: _____

13. Impresión clínica: _____

Biomarcadores en saliva

14. Positivo para: TSPO: Si () No (), cantidad: _____

Reporte de Biopsia

15. () Positivo () Negativo

16. Hallazgos histológicos: Hiperplasia epitelial () Displasia epitelial () Carcinoma *in situ* () Carcinoma escamoso celular () Otro () Cual: _____