

## Características clínicas e histopatológicas y expresión de p53 en lesiones palatinas producidas por tabaquismo de forma invertida

Maythé Gamboa<sup>1</sup>, Mariana Villarroel-Dorrego<sup>\*2</sup>

<sup>1</sup>MSc. Medicina Bucal. Facultad de Odontología, Universidad Central de Venezuela.

<sup>2</sup>Patólogo Buco Maxilo Facial.

maythe\_gamboa@yahoo.com, mariana.villarroel@ucv.ve

### Resumen

**Objetivo:** Caracterizar clínicamente e histopatológicamente las lesiones palatinas producidas por tabaquismo invertido y determinar la expresión de la proteína p53 en dichas lesiones. **Materiales y métodos:** Usando un diseño clínico observacional, 18 fumadores invertidos (FI) fueron incluidos en el estudio. Como controles (GC) 17 individuos no fumadores fueron pareados por género. Posterior al consentimiento informado, fue completada historia clínica y tomadas biopsias de las lesiones y mucosa sana. Fueron realizadas coloraciones de H&E e inmunohistoquímica para evaluar p53 (DAKO clon DO-7). Las variables fueron comparadas aplicando el test *t*-Student y U de Mann-Whitney. Se estableció un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$  y valores  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos. **Resultados:** Todos los pacientes FI mostraron estomatitis nicotínica. Histopatológicamente 16 muestras (76.2%) de FI presentaron displasia epitelial leve. La media de núcleos p53+ fue similar en FI y en GC ( $5.51 \pm 0.94$ ,  $5.58 \pm 1.28$  respectivamente;  $p = 0.117$ ). Sin embargo, tanto la intensidad de la expresión, como la ubicación suprabasal fue mayor en los FI ( $p = 0,001$  y  $p = 0,0001$  respectivamente). **Conclusiones:** FI fue fuertemente asociado a estomatitis nicotínica. No se observó displasia epitelial severa o carcinoma, sin embargo la expresión intensa y suprabasal de p53 sugiere una alteración genética importante y éste podría ser un excelente marcador de progresión maligna en estas lesiones.

**Palabras clave:** tabaquismo forma invertida, estomatitis nicotínica, palatitis nicotínica, p53, desórdenes potencialmente malignos.

\* Autor de correspondencia: Instituto de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología. Los Chaguaramos. Caracas 1040, Venezuela.

## Clinical and Histopathological Features and p53 Expression in Palate Lesions Produced by Reverse Smoking

### Abstract

**Objective:** The aim of this study was to establish the clinical and histological features of palate lesions produced by reverse smoking and to determine p53 protein expression in those lesions. **Methods:** Using a clinical observational study, 18 reverse smokers (RS) were evaluated. As a control group (CG), 17 non-smokers were paired by gender. After obtaining informed consent, clinical history was completed and biopsies of the lesions of the reverse smokers were taken as were samples from healthy mucosa of the controls, during third molar extraction. Samples were processed using H&E staining and immunohistochemistry to evaluate p53 (monoclonal antibody DAKO clone DO-7). Variables were compared using the *t*-Student test and U by Mann-Whitney. The significance level was set at  $\alpha=0.05$  and *p* values  $<0.05$  were considered statistically significant. **Results:** All patients in the RS group showed palatal lesions (nicotine stomatitis). Mild epithelial dysplasia was observed in 16 cases (76.2%) of the RS. The mean of positive p53 nuclei was similar in both groups ( $5.51 \pm 0.94$  and  $5.58 \pm 1.28$ , respectively;  $p=0.117$ ). However, the intensity of expression as well as suprabasal location was higher in the RS ( $p=0,001$  and  $p=0,0001$ , respectively). **Conclusions:** RS were highly associated with nicotine stomatitis. Severe epithelial dysplasia or carcinoma were not found; however, the intense suprabasal expression of p53 suggests an important gene disturbance which could be considered an excellent biomarker for malignant progression in these lesions.

**Key words:** reverse smoking, nicotine stomatitis, p53, palatal lesions, potentially malignant disorders.

### Introducción

El tabaco es una planta que está compuesta por nicotina, un alcaloide líquido natural, absorbido en segundos por el cuerpo y responsable de la adicción al tabaco<sup>1</sup>. El humo del tabaco procesado contiene carcinógenos conocidos entre los que se encuentran los hidrocarburos aromáticos, nitrosaminas y aminas heterocíclicas<sup>2</sup>.

En India el tabaco es fumado de forma muy peculiar ya que el consumo de cigarrillo se hace de manera invertida (con el extremo encendido dentro de la boca). El fumar de manera invertida es más frecuente en mujeres,

con una frecuencia de 1 ó 2 cigarrillos por día ya que esta forma de fumar aumenta el tiempo de combustión del cigarrillo o tabaco<sup>3</sup>. En Latinoamérica, el fumar de manera invertida se ha observado en países como Colombia y Venezuela, donde los fumadores que lo hacen, son en su mayoría mujeres de las zonas rurales que fuman tanto cigarrillos prefabricados como preparados artesanalmente<sup>4,5</sup>.

Se ha asociado fumar de manera invertida con melanosis del fumador, desórdenes potencialmente malignos y carcinoma de células escamosas<sup>3-5</sup>. La estomatitis nicotínica, paladar de fumador, o palatitis nicotínica, es la lesión más fuertemente relacionada a fumar

de manera invertida, también descrito, pero en menor frecuencia, en fumadores de pipa o de gran consumo de cigarrillos<sup>6</sup>. La estomatitis nicotínica se reconoce hoy como un desorden con un alto potencial de riesgo de transformación maligna<sup>7</sup>.

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar clínica e histopatológicamente las lesiones palatinas producidas por tabaquismo invertido y determinar la expresión de la proteína p53 en dichas lesiones.

## Metodología y pacientes

*Población:* Fue diseñado un estudio de investigación clínica observacional en Río Chico, Estado Miranda. El grupo de casos fue conformado por 18 fumadores de manera invertida (FI). Los criterios de inclusión contemplaron individuos mayores de 18 años, con tabaquismo de forma invertida de más de 10 años de evolución. Fueron excluidos individuos que consumían concomitantemente tabaco de forma masticada o alcohol. Como grupo control, 17 individuos sanos, no fumadores, provenientes de la misma población que ameritaban la extracción de 3<sup>ros</sup> molares retenidos, fueron considerados para la investigación (GC). Por razones éticas los pacientes no pudieron ser apareados por edad, ya que los pacientes que ameritaban extracciones de 3<sup>ros</sup> molares no presentaban la misma edad que los del grupo de casos. El apareamiento del grupo control fue realizado por género ( $p=0.337$ ).

*Metodología:* Posterior a la firma del consentimiento informado, fue completada una historia clínica y se procedió a la toma de biopsia de las lesiones palatinas de FI y mucosa sana durante la exodoncia indicada en el GC. Para la obtención de la muestra se procedió a la toma de una biopsia incisional previa anestesia local perilesional, se colocó en formol

10%, se procesó en parafina y se procedió a la coloración de los cortes con hematoxilina y eosina.

Para el estudio inmunohistoquímico se realizó la técnica indirecta avidina-estreptavidina-peroxidasa, en donde los tejidos previamente embebidos en bloques de parafina fueron cortados a 4 $\mu$ m de espesor con micrótomo. Para desenmascarar el antígeno se sumergieron las muestras en buffer citrato de sodio 0.1 M y se calentó al micro-ondas por espacio de 20 minutos. Los tejidos fueron incubados con el anticuerpo primario monoclonal anti-p53 humano marca DAKO clon DO-7 a una dilución de 1:50 por un lapso de 1 hora en una cámara húmeda, lavados e incubados con el anticuerpo secundario biotinilado. El revelado de la reacción se realizó utilizando diamino-benzidina (DAB) y las coloraciones fueron contrastadas con Hematoxilina de Meyer. La expresión de p53 fue evaluada y semicuantificada bajo microscopio de luz. Los núcleos fueron semicuantificados por campo a 10X/0.25, 10 campos fueron seleccionados sistemáticamente en el epitelio de la muestra, sin repetir ningún campo, y el número total de núcleos promediado en cada caso. La intensidad y localización de los núcleos positivos fue también recolectada.

*Variables evaluadas:* Género y edad de los casos. Queratinización del epitelio, espesor del epitelio y displasia epitelial (leve, moderada y severa). Número de núcleos p53+, localización de la expresión de p53 e intensidad de la expresión (bajo, moderado, intenso).

*Análisis estadístico:* Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante el uso del programa estadístico para las ciencias sociales (SPSS versión 17.0). Las variables numéricas fueron comparadas aplicando el test paramétrico *t*-Student y las variables categóricas usando el tests no paramétrico U de Mann-Whitney. Se estableció un nivel de

significancia  $\alpha = 0.05$  y todos los valores  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## Resultados

De los 18 FI, 16 pacientes eran del género femenino (88.9%). El GC presentó una distribución de 13 personas del género femenino (76.4%). En cuanto a la edad los FI mostraron un rango entre 35-86 años, con una media  $\pm$  desviación estándar de  $62.6 \pm 3.2$  años. El grupo control exhibió un rango entre 14 y 51 años con una media de  $23.9 \pm 2.47$  años.

Todos los FI tenían estomatitis nicotínica, 16 fumadores (88.9%) presentaron estomatitis nicotínica como lesión única (Fig. 1 y 2) y dos fumadores presentaron, además de estomatitis nicotínica, melanosis del fumador y leucoplasia en lengua, labios y carrillos (Fig. 3).

Entre los hallazgos histopatológicos en todas las muestras de FI se observó un epitelio acantósico, cubierto por una gruesa capa de ortoqueratina en 13 casos y por paraqueratina en 5 casos. El 76.2% de los casos (16 muestras)

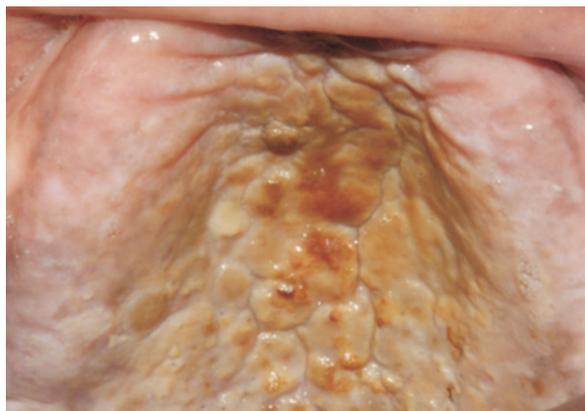


Figura 1. Estomatitis Nicotínica en grupo de FI.



Figura 2. Estomatitis Nicotínica y Melanosis del fumador en grupo de FI.



Figura 3. Leucoplasia en labio (A), Leucoplasia y Melanosis del Fumador en Carrillo (B), Leucoplasia y Melanosis del fumador en lengua (C) en grupo de FI.

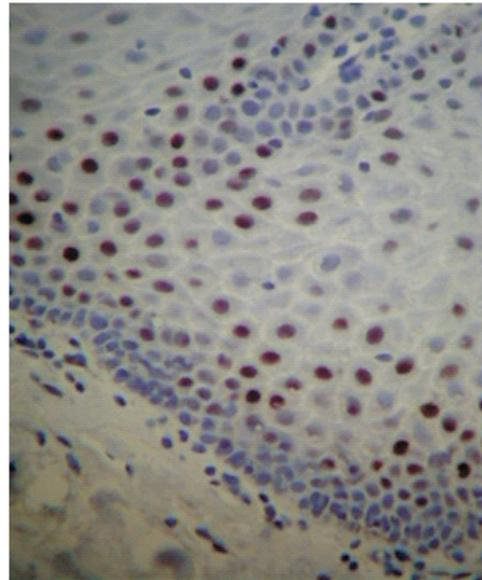
presentaron displasia epitelial leve. Displasia epitelial moderada, severa o carcinoma de células escamosas no fueron observados en ninguno de los casos. En ninguna muestra del GC se observó displasia epitelial (100%). La presencia de displasia epitelial fue estadísticamente mayor en los FI ( $p < 0.0001$ ).

En relación a la expresión de p53, la media de núcleos p53+ fue similar en FI y GC ( $5.51 \pm 0.94$  y  $5.06 \pm 1.26$  núcleos; media  $\pm$  desviación estándar respectivamente) ( $p = 0,117$ ). Sin embargo, tanto la intensidad de la expresión de p53 como la ubicación suprabasal de la proteína se observaron incrementadas en FI ( $p < 0,0001$  y  $p < 0,0001$  respectivamente) (Tabla 1) (Fig. 4).

## Discusión

El tabaquismo de forma invertida es una forma poco frecuente de consumo de tabaco que ha sido observada en la población de la India y Latinoamérica<sup>3, 4,8</sup> en la cual el fumador lo hace colocando el cigarrillo con el extremo encendido dentro de la boca generando calor intenso sobre los tejidos por prolongados períodos de tiempo<sup>3</sup>.

La presente investigación reporta la existencia de este tipo de consumo en la población venezolana. El hecho de que las personas que fuman de manera invertida son mayoritariamente de género femenino y de afinidad étni-



**Figura 4.** Microfotografía 100X de mucosa palatina. Se observa expresión de la proteína p53 en capas suprabasales.

ca negra es observado en esta investigación, y coincide con estudios anteriores en la India, Colombia y nuestro país<sup>9,4,5</sup>.

En la población estudiada de esta investigación la lesión más fuertemente asociada a tabaquismo de forma invertida fue la estomatitis nicotínica lo cual coincide con otros autores<sup>3,10</sup>. Con menor frecuencia se observó la presencia de leucoplasia también reportada anteriormente<sup>4,5</sup>. Se considera que la estomatitis nicotínica y todas las lesiones asociadas al tabaquismo de forma invertida no deberían ser consideradas lesiones reversibles inocuas,

**Tabla 1.** Positividad de P53 según su intensidad y expresión en las distintas capas del epitelio en fumadores de manera invertida (FI) y grupo control (GC).

	Intensidad de la Expresión de p53						Expresión de p53 en las distintas capas del epitelio							
	Leve		Moderada		Intensa		p	Basal		Basal/Suprabasal		Basal/Suprabasal / Espinosa		p
	Nº	%	Nº	%	Nº	%		Nº	%	Nº	%	Nº	%	
FI	3	14.3	10	47.6	8	38.1	$p < 0,0001$	9	42.9	10	47.6	2	9.5	$p < 0,0001$
GC	7	63.6	1	9.1	3	27.3		11	100	0	0	0	0	

tal como se expuso en el pasado<sup>11</sup>, sino ser considerados desórdenes potencialmente malignos que muestran un alto grado de potencial de transformación neoplásica a pesar de su aspecto histopatológico poco agresivo. De hecho, en un estudio realizado sobre la mortalidad en el sur de India en relación al uso de tabaco fumado de manera invertida en una población de 80.612 personas, la muerte de 913 personas estuvo asociada a este tipo específico de consumo de tabaco en el transcurso del estudio<sup>3</sup>.

Los cambios observados en las muestras de tejido a nivel histopatológico como la presencia de hiperqueratosis, acantosis e infiltrado inflamatorio de tipo crónico en el corion a nivel de glándulas salivales accesorias coinciden con los descritos anteriormente por otros autores<sup>10,11</sup>. La transformación maligna en las lesiones encontradas en el presente estudio no fue observado, sin embargo, pudo evidenciarse la presencia de displasia epitelial en casi todas las muestras de lesiones de FI lo cual ha sido descrito anteriormente<sup>11,12</sup>.

Se sugiere que la presencia de displasia epitelial, aunque sea leve, es un indicador de cambio molecular comprobado mediante la detección de la proteína p53, la cual fue observada en un número importante de muestras y ha sido descrito por otros autores en lesiones

presentes en boca de fumadores<sup>13,14</sup>, en mucosa clínicamente sana de fumadores<sup>15</sup>, mas no en fumadores de manera invertida. La detección de p53 se distribuyó especialmente en el área suprabasal del epitelio lo cual es de relevancia pronóstica y sugiere que el hecho de que capas no germinativas expresen la proteína p53 demuestra la alteración estructural y de maduración del tejido epitelial que lo llevará finalmente a la formación del carcinoma bucal<sup>13</sup>.

Todas las muestras de mucosa bucal de pacientes no fumadores expresaron p53 en la capa basal. La expresión de p53 no necesariamente implica la mutación del gen que codifica la proteína, sino la activación genética para la supresión de los procesos tumorales. La proteína es posible observarla depositada en el núcleo de queratinocitos en la capa basal de mucosa oral sana tras la activación de los procesos de vigilancia y supresión tumoral, sin implicar posible transformación oncogénica<sup>16,17</sup>.

Pareciera entonces que la localización de p53 en las capas superiores a la capa basal epitelial, independientemente de la intensidad y la cantidad de células positivas es la característica más importante a considerar como factor predictivo de transformación maligna en lesiones palatinas asociadas a fumar de forma invertida.

## Referencias

1. Kuper H, Adami H, Boffetta P. Tobacco use, cancer causation and public health impact. *J Intern Med* 2002; 251(6):455-66.
2. Subapriya R, Thangavelu A, Mathavan B, Ramachandran CR, Nagini S. Assessment of risk factors for oral squamous cell carcinoma in Chidambaram, Southern India: a case-control study. *Eur J Cancer Prev* 2007; 16(3):251-6.
3. Gupta PC, Mehta FS, Pindborg JJ. Mortality among reverse chutta smokers in South India. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1984; 289(6449):865-6.
4. Alvarez Gómez GJ, Alvarez Martínez E, Jiménez Gómez R, Mosquera Silva Y, Gaviria Núñez AM, Garcés Agudelo A *et al.* Reverse smokers's and changes in oral mucosa. Department of Sucre, Colombia. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008; 13(1):E1-8.

5. Leira A, Lárez A. Riesgo probable de cancer bucal y lesiones precancerosas en mujeres mayores de 30 años residents de las comunidades de "Cumboto" y "La Trilla" en Ocumare de la Costa. Edo. Aragua. Acta Odontol Venez 2006; 44(3): 371-375.
6. Warnakulasuriya S, Sutherland G, Scully C. Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence. Oral Oncol 2005; 41(3):244-60.
7. Bouquot J, Speight PM, Farthing P. Epithelial dysplasia of the oral mucosa- Diagnostic problems and prognostic features. Curr Diagnostic Pathol 2006; 12:11-21.
8. Cowan CG, Gregg TA, Napier SS, McKenna SM, Kee F. Potentially malignant oral lesions in Northern Ireland: a 20-year population-based perspective of malignant transformation. Oral Dis 2001;7(1):18-24.
9. Pindborg JJ, Daftary DK, Mehta FS. A follow-up study of sixty-one oral dysplastic precancerous lesions in Indian villagers. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1977; 43(3):383-90.
10. Reddy CR, Ramulu C, Raju MV, Reddy PG. Relation of reverse smoking and other habits to the development of stomatitis nicotina. Indian J Cancer 1972; 9(3):223-30.
11. Reddy CR, Rajakumari K, Ramulu C. Regression of stomatitis nicotina in persons with a long-standing habit of reverse smoking. Morphologic evidence of the role of ducts. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1974; 38(4):570-83.
12. Holmstrup P, Vedtofte P, Reibel J, Stoltze K. Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. Oral Oncol 2006; 42(5):461-74.
13. Murti PR, Warnakulasuriya KA, Johnson NW, Bhonsle RB, Gupta PC, Daftary DK *et al.* p53 expression in oral precancer as a marker for malignant potential. J Oral Pathol Med 1998; 27(5):191-6.
14. Scheidt JH, Yurgel LS, Romanini J, Cherubini K, de Figueiredo MA, Salum FG. Oral Squamous Cell Carcinoma from Users and Nonusers of Tobacco and Alcohol: Clinicopathologic Features and Immunoreactivity of VEGF, Caspase-3, and P53. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2013; 21(2):148-53.
15. Ayan N, Ayan I, Alatli C, Guler SD, Dalkilic C, Cinar F *et al.* P53 overexpression in normal oral mucosa of heavy smokers. J Exp Clin Cancer Res 2000; 19(4):525-9.
16. Cruz IB, Snijders PJ, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Snow GB, Walboomers JM *et al.* p53 expression above the basal cell layer in oral mucosa is an early event of malignant transformation and has predictive value for developing oral squamous cell carcinoma. J Pathol. 1998; 184(4):360-8.
17. Swaminathan U, Joshua E, Rao UK, Ranganathan K. Expression of p53 and Cyclin D1 in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa: An Immunohistochemical study. J Oral Maxillofac Pathol. 2012; 16(2):172-7.