

Riesgo de transformación maligna de las lesiones verrucopapilares orales

INVESTIGACIÓN

Risk of malignant transformation of oral verrucopapillary lesions

Risco de transformação maligna de lesões verrucopapilares orais

Resumen

Objetivos: evaluar el riesgo potencial maligno mediante la tinción de azul de toluidina y gradificación displásica de las lesiones verrucopapilares de la cavidad oral (LVPO).

Materiales y métodos: Se identificaron pacientes con LVPO localizados en la cavidad oral, se les aplicó azul de toluidina y posteriormente se evaluó los cambios displásicos para finalmente gradificarlos histopatológicamente en ausente, bajo o alto riesgo de transformación maligna. Pacientes que se negaron a la tinción con AT, no aceptaron la biopsia escisional o el tejido no poseía coilocitos, daño citopático asociado a la presencia del virus papiloma humano fueron eliminados del estudio.

Resultados: se incluyeron 34 pacientes con LVPO, 4 con tinción positiva al AT (3 fueron considerados intensos y 1 leve).

Conclusiones: las LVPO pueden emitir una tinción positiva al azul de toluidina así como presentar una variedad heterogenea de cambios displásicos arquitecturales y citológicos evaluados histopatológicamente, que en la totalidad de las muestras, de acuerdo al sistema binario, son clasificadas como riesgo leve de transformación maligna.

-  Jorge García Barragán ¹
-  Rogelio González González ²
-  Ronell Bologna Molina ³
-  Victor Toral Rizo ⁴
-  Germán Villanueva Sánchez ⁵
-  Sandra López Verdín ⁶

CORRESPONDENCIA

Sandra López Verdín:

sandra.lverdin@academicos.udg.mx

RECIVIDO: 12/07/2024
ACEPTADO: 11/09/2024



Palabras clave: Virus Papiloma Humano, Azul de Toluidina, Displasia

- 1** Maestría en Patología y Medicina Bucal. Departamento de Clínicas Odontológicas Integrales. Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, México.
- 2** Departamento de Investigación, Escuela de Odontología, Universidad de Juárez del Estado de Durango. Durango, México.
- 3** Área de Patología Molecular, Diagnóstico en Patología y Medicina Oral, Facultad de Odontología. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Departamento de Investigación, Escuela de Odontología, Universidad de Juárez del Estado de Durango. Durango, México.

- 4** Clínica Orocenter, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca de Lerdo, México.
- 5** Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria, Área de Patología Oral y Maxilofacial. Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León, Universidad Nacional Autónoma de México. León, Guanajuato, México.
- 6** Instituto de Investigación en Odontología. Departamento de Clínicas Odontológicas Integrales. Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, México.

Abstract

Objectives: to evaluate the risk of malignant potential through toluidine blue staining and dysplastic grading of verrucous papillary lesions of the oral cavity (VPLO).

Materials and methods: patients with VPLO located in the oral cavity were identified to whom toluidine blue was applied and dysplastic changes were subsequently evaluated and graded histopathologically as absent, low or high risk of malignant transformation. Patients who refused toluidine blue staining, did not accept excisional biopsy or had insufficient tissue, or the tissue lack of presence of koilocytes, damage associated with the presence of human papilloma virus were eliminated from the study.

Results: Thirty-four patients with VPLO were included, of which 4 were found to have positive toluidine blue staining. Of these, 3 cases were considered intense and 1 was mild.

Conclusions: LVPO may emit a positive stain to toluidine blue as well as present a heterogeneous variety of architectural and cytological dysplastic changes evaluated histopathologically, which in all samples, according to the binary system, are classified as low risk of malignant transformation.

Key words: Human Papillomavirus, Toluidine blue, dysplasia

Introducción y Antecedentes

Los virus del papiloma humano (VPH) tienen un tropismo por el epitelio escamoso⁽¹⁾. Las partículas virales infectan las células basales del epitelio, que quedan expuestas a través de microabrasiones o heridas epiteliales. Los receptores del VPH y el modo de entrada viral en la célula aún son desconocidos mayoritariamente. Sin embargo se ha señalado que la participación de los glucosaminoglucanos, proteoglucanos y glipicanos podrían actuar como receptores de unión en la superficie de la célula^(2,3).

Las manifestaciones de las infecciones por VPH pueden ser múltiples, las cuales pueden variar de una infección asintomática, una lesión papilomatosa o verrucosa benigna, lesiones potencialmente malignas, neoplasia intraepitelial e inclusive carcinomas invasivos⁽³⁾.

La variedad de estas lesiones y su comportamiento se deben a la diversidad genotípica encontrada en la configuración molecular del VPH, (los cuales hasta la

Resumo

Objetivos: Avaliar o risco de potencial maligno através da coloração com azul de toluidina e da classificação displásica das lesões verrucopapilares da cavidade oral (LVPO).

Materiais e métodos: Foram identificados pacientes com LVPO POVE localizados na cavidade oral nos quais foi aplicado azul de toluidina e posteriormente avaliadas as alterações displásicas para finalmente serem classificadas histopatologicamente como ausentes, baixo ou alto risco de transformação maligna. Os pacientes que recusaram a coloração com azul de toluidina AT, não aceitaram a biópsia excisional ou o tinha tecido insuficiente, presença de coilócitos ou dano citopático associado ao papilomavírus humano foram eliminados do estudo.

Resultados: Foram incluídos 34 pacientes com LVPO, dos quais 4 foram interpretados como tendo coloração positiva para azul de toluidina AT positiva, sendo 3 considerados intensos e 1 leve.

Conclusões: A LVPO pode emitir coloração positiva para azul de toluidina, bem como apresentar uma variedade heterogênea de alterações arquitetônicas e citológicas displásicas avaliadas histopatologicamente, que em todas as amostras, segundo o sistema binário, são classificadas como leve risco de transformação maligna.

Palavras Chave: Papilomavírus Humano, Azul de Toluidina, Displasia

realización de este trabajo se conocen aproximadamente 200 tipos y suelen diferenciarse entre VPH de alto riesgo (AR) y bajo riesgo (BR) con base en la interacción con oncogenes relacionados a la carcinogénesis^(3,4).

Las lesiones por VPH no son consideradas dentro de los desórdenes potencialmente malignos⁽⁵⁾, porque generalmente son provocadas por VPH-BR. Sin embargo, se considera que cualquier agente que ocasiona el aumento de la proliferación celular aumenta el riesgo de transformación neoplásica⁽⁶⁾. Además tres datos obtenidos recientemente obligan a evaluar la posibilidad de transformación neoplásica de las lesiones verrucopapilares de la cavidad oral (LVPO); **1)** se ha reportado un aumento en la co-infección por VPH-AR con VPH-BR en citologías cervicales con presencia de neoplasia intraepitelial en cualquiera de sus grados⁽⁷⁾. **2)** la displasia epitelial oral asociada al virus del papiloma humano (VPH-DEO) se incorporó recientemente la 5ta Clasificación de la OMS de los tumores de cabeza y cuello, como un tumor de distinto tipo de displasia oral caracterizada por una arquitectura típica con cambios arquitecturales y

citológicos causados por VPH-AR^(8,9) y **3)** los factores de riesgo asociados al carcinoma oral de células escamosas en adultos jóvenes incluye la infección por el virus del papiloma humano^(10,11).

Dentro de los métodos adyuvantes utilizados como auxiliar en la selección de lesiones con riesgo de malignización, el de mayor acceso a nivel mundial y con mejores porcentajes de sensibilidad y especificidad reportados es el azul de toluidina (AT)^(12,13). Esta tinción supravital se ha utilizado para resaltar lesiones orales potencialmente malignas y poder identificar lesiones tempranas, que podrían pasar desapercibidas en el examen clínico^(14,15). El AT (también conocido como cloruro de tonio) es un colorante metacromático acidófilo que tiñe selectivamente los componentes ácidos del tejido, por lo que tiene afinidad por los ácidos nucleicos y, por lo tanto, se une al material nuclear de los tejidos con un alto contenido de ADN y ARN⁽¹⁵⁾.

Richart propuso por primera vez el uso del AT como tinción vital para revelar displasia y carcinoma in situ del cuello uterino. Neibel y Chomet y Shedd y colaboradores fueron los primeros en informar sobre la aplicación vital de AT para la detección de lesiones premalignas y malignas de la cavidad bucal. Ellos confirmaron la propiedad de AT para verificar lesiones clínicamente sospechosas como neoplásicas, así como para delimitar márgenes de lesiones premalignas y crecimiento maligno, y detectar tumores satélites o inadvertidos⁽¹⁶⁾.

El marcador ampliamente aceptado para evaluar el riesgo de que un trastorno potencialmente maligna oral (TPMO) eventualmente sufra transformación maligna, es la presencia y el grado de displasia histopatológica en la lesión. La displasia se define como cambios arquitectónicos y citológicos epiteliales específicos, secundarios a la pérdida de maduración normal y estratificación⁽¹⁷⁾.

Se han propuesto diversos enfoques para la graduación de la displasia epitelial oral (DEO), pero se reconoce que el sistema binario, que clasifica en baja o alto grado de displasia, es el que presenta menor ambigüedad^(17,18).

Hasta ahora no existen estudios que haya evaluado ambos métodos en LVPO por lo que se desconoce si estos cuentan con algún riesgo de transformación maligna. Por lo que el objetivo del presente trabajo es evaluar la positividad con el azul de toluidina y los cambios histológicos de displasia en LVPO.

Materiales y Métodos

En la clínica de patología y medicina bucal de la Universidad de Guadalajara se capturaron pacientes con lesiones detectadas clínicamente por especialistas en el área como LVPO con la aplicación de los siguientes criterios de inclusión: lesiones de primera vez no asociadas a algún

síndrome o condición hereditaria con la aceptación de consentimiento informado o asentimiento en pacientes menores de edad. Dentro de los criterios de eliminación se consideraron a los pacientes que no accedieron a la aplicación del azul de toluidina o no continuaron el proceso para la evaluación histopatológica, así como muestras que no contaron con el daño citopático (coilocitos) asociado a la presencia de VPH. El proyecto de investigación fue aprobado por el comité de ética e investigación de la Universidad de Guadalajara CI-04219.

PRUEBA DE DETECCIÓN OPORTUNA DE TPMO.

Posteriormente al llenado de datos sociodemográficos se realizó la prueba de tinción intravital con azul de toluidina de acuerdo a protocolos previamente establecidos⁽¹⁵⁾. Inicialmente se le pide al paciente que realice enjuagues con agua potable durante 20 s para retirar el espesor de la saliva; luego se limpia la lesión con un hisopo de algodón impregnado con Bluedetect limpia (ácido Acético 1%) por 20s, posteriormente se aplica Bluedetect tiñe (Azul de Toluidina 1%) por 20s. Para limpiar nuevamente se aplicó bluedetect limpia igualmente por 20s y finalmente se le solicitó al paciente se enjuagará con agua potable dos veces. La interpretación fue basada en la intensidad del color azul la cual pudo ser de leve a un azul intenso para considerarlo positivo, mientras que la ausencia total del color se interpretó como negativo.

GRADIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA

Las lesiones fueron retiradas mediante biopsia escisional. Luego del procedimiento quirúrgico, el tejido obtenido se sumergió en formol al 10% para su posterior estudio histopatológico. Se identificaron las lesiones con cambios citológicos asociados a la infección por VPH con presencia de coilocitos. La gradificación se realizó de acuerdo con el sistema binario establecido por la Organización Mundial de la Salud en el 2005⁽¹⁹⁾ en el cual se toman en cuenta nueve posibles alteraciones arquitectónicas como son: 1) estratificación irregular, 2) pérdida de polaridad de las células basales, 3) procesos gotosos, 4) queratinización prematura generalizada, 5) altas mitosis en todo el epitelio, 6) perlas de queratina, 7) anidamiento de células basales, 8) arquitectura papilar o verrucosa, 9) pérdida de la cohesión de los queratinocitos. A la vez considera nueve alteraciones citológicas tales como: 1) variación anormal en el tamaño del núcleo, 2) variación anormal en la forma nuclear, 3) variación anormal en el tamaño de la célula, 4) variación anormal en la forma de la célula, 5) incremento en la relación núcleo-citoplasma, 6) figuras mitóticas atípicas, 7) incremento del tamaño, 8) número

de nucleolos, 9) hiper cromasia.

La gradificación de los cambios displásicos se basó en la sumatoria de los cambios displásicos, que de acuerdo con la propuesta por la OMS en 2017⁽²⁰⁾, displasia de alto grado se consideró cuando existieron >5 cambios citológicos y > 4 cambios arquitectónicos, y displasia de bajo grado cuando se presentaron <5 cambios citológicos y <4 cambios arquitectónicos.

Resultados

De los 34 casos incluidos en el estudio, 23 (67,6%) correspondieron al sexo masculino y 11 (32,3%) al sexo femeni-

no con un promedio de edad de 32,4 años. La localización más frecuente fue paladar duro o blando con 12 (35,3%) casos ubicados en esta zona. La siguiente zona anatómica oral afectada con mayor frecuencia fue la encía con 9 (26,5%) casos mientras que las ubicaciones con menores frecuencias fueron la lengua en la que se identificaron 7 casos (20,6%) y la orofaringe con 6 (17,6%) casos.

Cuatro casos al realizar la tinción intravital mostraron la retención del reactivo dando un espectro azul sobre el tejido de la lesión. Tres fueron interpretadas en un espectro azul intenso a la absorción del AT (Figura 1 A, B y C) y 1 caso se determinó como leve (Figura 2D).

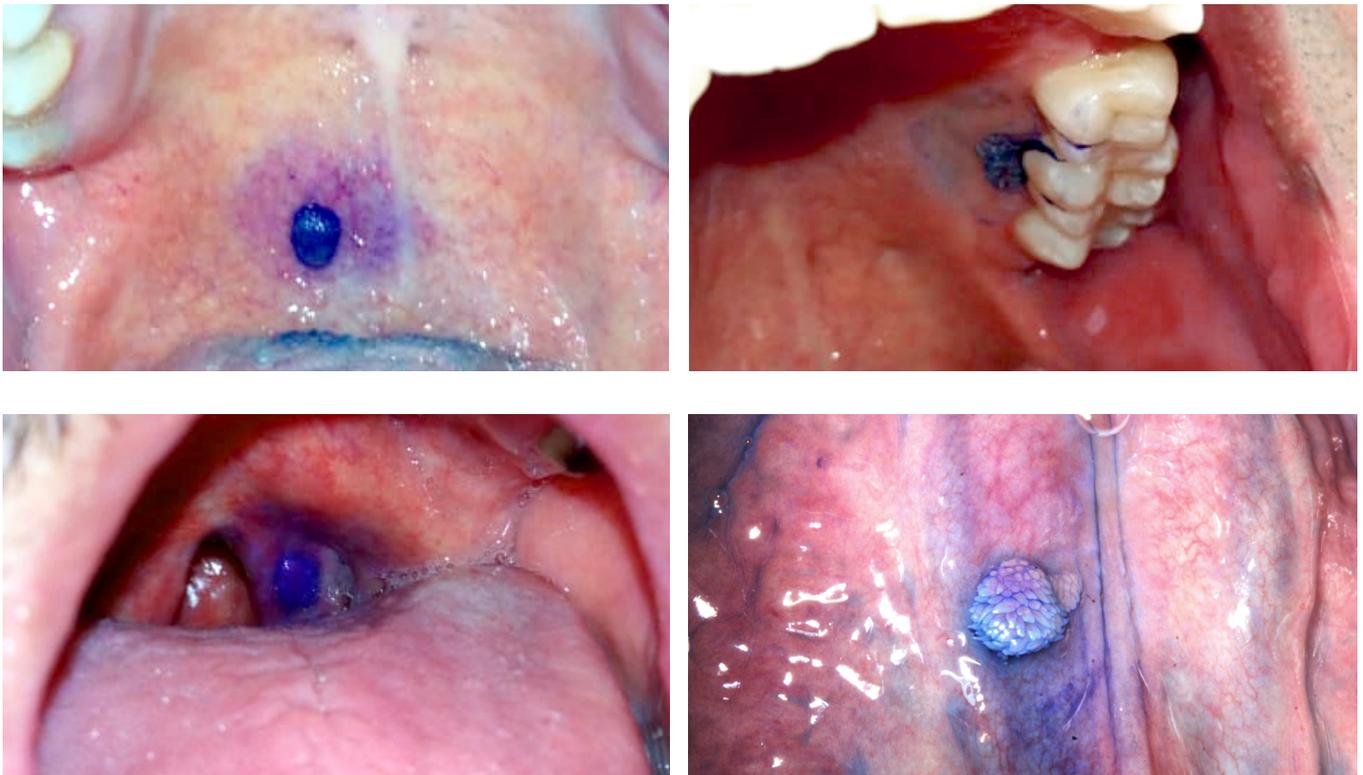


Figura 1. Positividad al AT de LVPO.

- A. LVPO en paladar blando que muestra coloración azul intensa (+) a la tinción por AT
- B. LVPO en paladar duro en el margen gingival que muestra mayor intensidad del azul (+) en las hendiduras de la placa verrucosa
- C. LVPO en orofaringe con espectro intenso del azul en la totalidad de la lesión
- D. LVPO de intensidad leve (+) en vientre de lengua.

Referente a los cambios displásicos arquitectónicos, se observó apariencia verrucosa o papilar en todos los casos (Figura 2A). El siguiente cambio displásico que se detectó fue la pérdida de la polaridad del núcleo (Figura 2B), presente en 4 casos (11,8%).

Se reconocieron cambios displásicos citológicos, de los cuales el hiper cromatismo nuclear (Figura 2C) tuvo

mayor presencia en 16 (47,0%) de los casos, seguido por la alteración en la relación núcleo-citoplasma (Figura 2D) en 14 (41,2%) muestras. En menor proporción fue posible apreciar aumento en el tamaño y número de nucleolos (Imagen 2E), en 4 lesiones de los casos analizados (11,8%) y variación en el tamaño de la célula en 1 caso (Figura 3E) (2,9%).

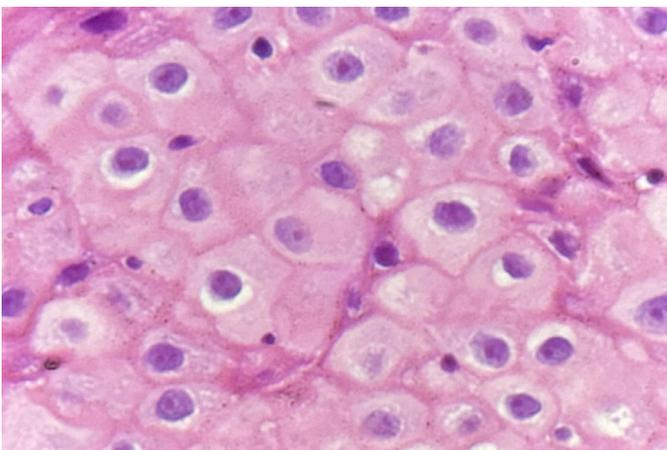
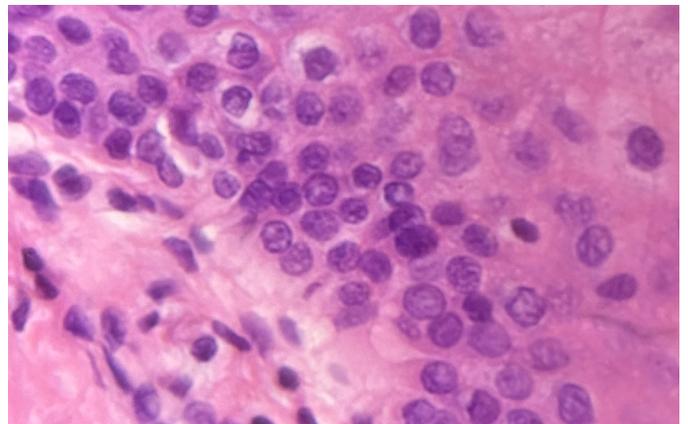
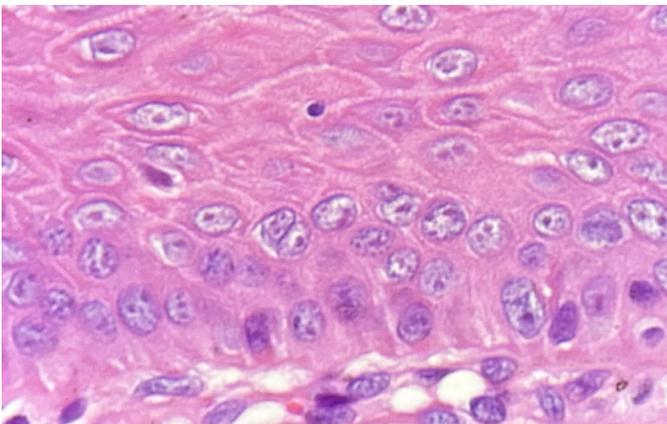
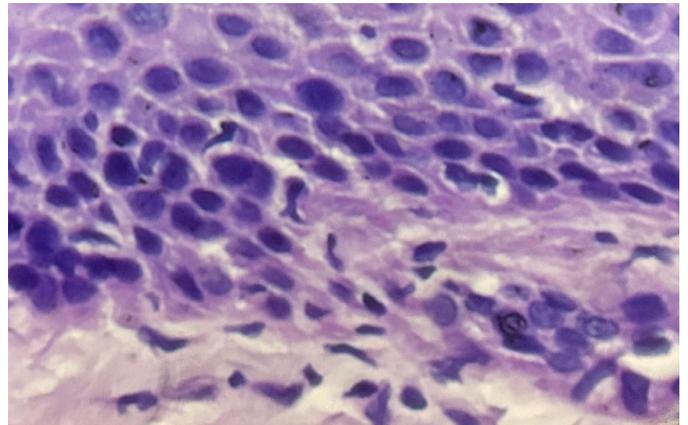
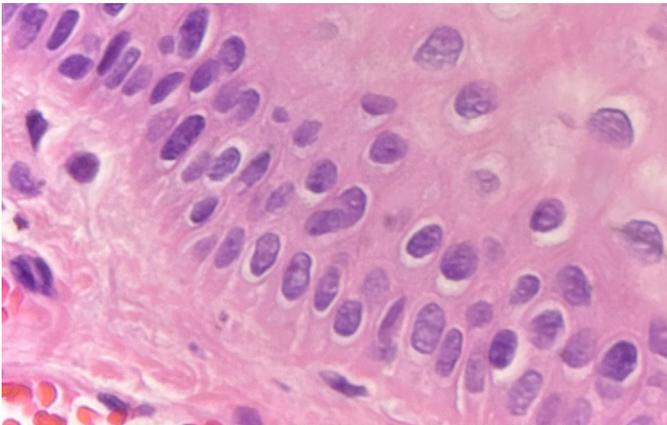
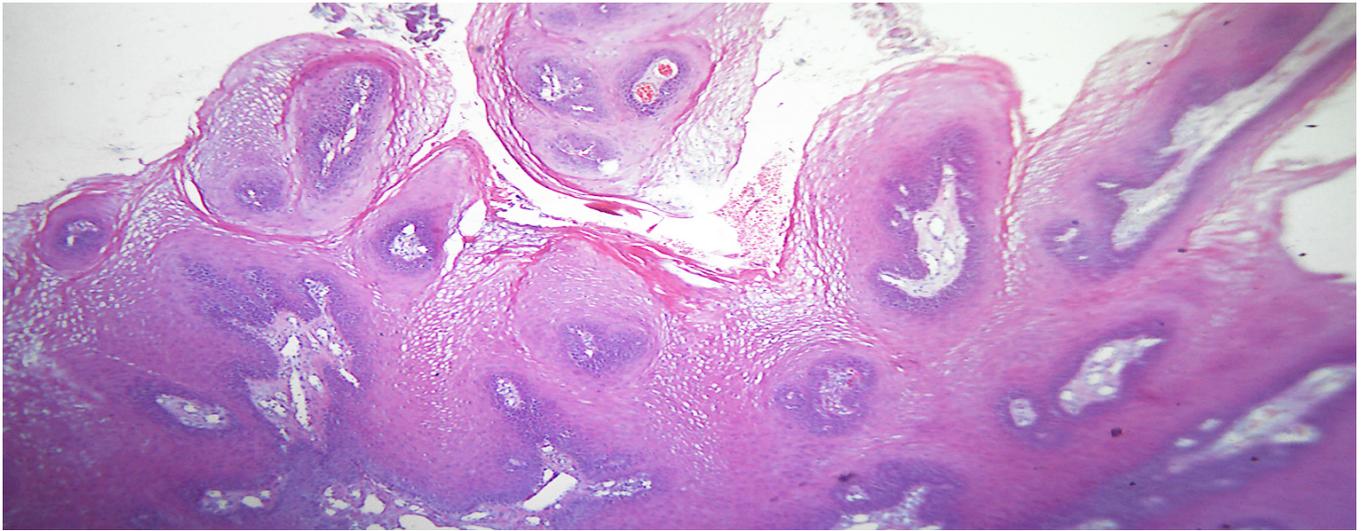


Figura 2. Cambios displásicos en LVPO.

Arquitecturales:

- A.** apariencia verrucosa o papilar
- B.** pérdida de la polaridad del núcleo de las células basales.

Citológicos:

- C.** hiperchromatismo nuclear
- D.** alteración en la relación núcleo-citoplasma
- E.** aumento en el tamaño y número de nucleolos
- F.** variación en el tamaño de la célula.

Las magnificaciones se encuentran a 4, 10 y 40 x.

Debido a la hiperplasia provocada por el VPH, todas las lesiones contaron con al menos 1 cambio displásico arquitectural hasta 6 cambios displásicos ya sea citológico y/o arquitecturales, que de acuerdo a la imagen 4 fueron

las lesiones positivas a AT las que contaron con mayor número de cambios citológicos a diferencias de las negativas las cuales se concentraron en 1 a 3 cambios displásicos.

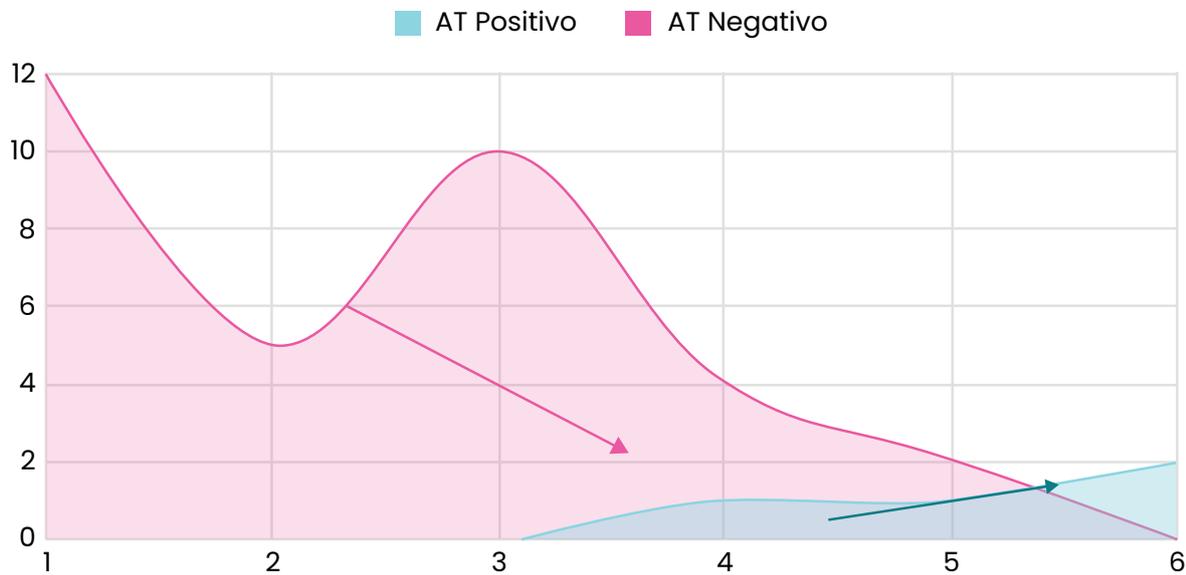


Figura 3. Sumatoria de cambios celulares y arquitecturales agrupados de acuerdo al resultado de la tinción intravital.

El grupo de lesiones negativas a la tinción mostraron una frecuencia descendente conforme se aumentaba la cantidad de cambios arquitecturales o celulares (flecha morada), contrario a las lesiones positivas, donde la frecuencia asciende a mayor número de cambios (flecha naranja).

Dados los datos recabados, se clasifican los casos en displasia epitelial de bajo grado.

Discusión

El desarrollo del carcinoma oral de células escamosas ocurre en un proceso multietapas a partir de la hiperplasia epitelial inicial que puede progresar hacia un carcinoma invasivo ⁽²¹⁾.

Hasta ahora no existían estudios que hayan utilizado métodos previamente establecidos para la identificación de lesiones con cambios displásicos en el tamizaje clínico e histopatológico.

El AT se basa en que las células displásicas y neoplásicas pueden contener cuantitativamente más ácido nucléico que los tejidos normales. Además, el epitelio maligno puede contener canales intracelulares más anchos que el epitelio normal, lo que puede facilitar la utilización del AT ⁽²²⁾. Las otras propuestas sobre la adopción del AT en los carcinomas y tejidos displásicos incluye la alta den-

sidad del material nuclear, la pérdida de cohesión celular y aumento de la mitosis ⁽²³⁾.

Este es el primer estudio que expone imágenes de LVPO positivas al AT. La positividad por el AT en las LVPO se puede adjudicar a la sumatoria de características displásicas que pueden estar presentes en el tejido infectado, pues como se observó en los resultados las LVPO positivas pueden presentar (hasta 6 cambios displásicos). Algunos casos presentaron en conjunto hiper cromatismo nuclear, aumento en la relación núcleo-citoplasma, aumento en el tamaño y número de nucleolos, variación en el tamaño de la célula, apariencia verrucosa o papilar y pérdida de la polaridad del núcleo. Además, las lesiones que tiñeron son las que presentaron el aumento en el tamaño y número de nucleolos, lo cual representa la alta actividad mitótica.

Pero esto no es posible demostrarlo en la totalidad con la evaluación histopatológica, y aunque el sistema binario es una herramienta útil para el riesgo de transformación maligna, no está esclarecido cuáles elementos arquitectónicos o citológicos son los que se asocian directamente a un proceso de carcinogénesis. En la actualidad para valorar la actividad mitótica así como la infección por VPH es necesario sumar métodos moleculares con la presencia del inmunomarcador ki67 para conocer el índice mitótico ⁽²⁴⁾ y en el caso de la infección se requiere el reconocimiento de ADN viral perteneciente al VPH ⁽²⁵⁾.

Aunque la gradificación estableció que todas las lesiones se encontraban en bajo riesgo, se enfatiza que este resultado no implica la inexistencia de riesgo, ya que se ha demostrado que lesiones positivas a AT muestran alteraciones genéticas asociadas a la pérdida de heterocigosidad en múltiples sitios del material genético, evento frecuentemente implicado en las multietapas de carcinogénesis del cáncer de cabeza y cuello ⁽²⁶⁾.

En nuestra búsqueda sólo se encontró un trabajo en el cual se evaluó la posibilidad del riesgo de malignidad a través de la evaluación por la detección de genotipos de VPH-AR y VPH-BR presentes en los papilomas escamosos de la cavidad oral, así como el marcaje de proliferación celular por ki67. Tales investigadores al contrastar con tejidos tumorales con cáncer oral y de orofaringe, obtuvieron en sus resultados que los VPH-AR sólo se presentaban en los tejidos malignos y que el marcaje de ki67 no

se podía considerar positivo para las lesiones por VPH ⁽²⁷⁾. A pesar de utilizar una metodología muy sofisticada, en cavidad oral, la tinción por AT es de acceso fácil y puede ser realizado por cualquier especialista en el área de la salud. De igual manera la evaluación de datos displásicos pueden ser descritos en el reporte histopatológico.

No obstante el presente trabajo, no cuenta con el suficiente tamaño de muestra para determinar la sensibilidad o especificidad del AT en predecir la transformación maligna, así como descartar la posibilidad de encontrar LVPO con características displásicas gradificadas en alto riesgo. Pero este estudio prueba que el daño por VPH en los tejidos orales no es autolimitado y homogéneo, que pueden existir lesiones positivas al AT y presentar uno o más cambios displásicos. Es importante considerar que la tinción con azul de toluidina puede revelar alteraciones citológicas que son difíciles de detectar clínicamente. Sin embargo, estas alteraciones no siempre están relacionadas con una transformación maligna. A pesar de esto, no se debe desestimar completamente el uso del azul de toluidina para el monitoreo del cáncer bucal, ya que la técnica presenta una alta sensibilidad. La baja especificidad se atribuye a la elevada tasa de falsos positivos, a menudo causada por una interpretación incorrecta del contexto clínico ⁽²⁸⁾. Sin embargo, estos resultados pueden servir de precedente para futuros estudios, ya que no se desestima totalmente el uso del azul de toluidina para.

Conclusión

Las LVPO pueden emitir una tinción positiva al azul de toluidina así como presentar una variedad heterogénea de cambios displásicos arquitecturales y citológicos evaluados histopatológicamente. Sin embargo se requieren investigaciones con mayor tamaño de muestra para analizar el riesgo de transformación maligna.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Raff AB, Woodham A, Raff LM, Skeate J, Yan I, Da Silva DM, Schelhaas M, Kast M. The evolving field of human papillomavirus receptor research: a review of binding and entry. *J Virol* 2013;87(11):6062–6072.
2. Horvath CA, Boulet GA, Renoux VM, Delvenne PO, Bogers JP. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virology* 2010 Jan 20;7:11. doi: 10.1186/1743-422X-7-11. PMID: 20089191; PMCID: PMC2823669.
3. Syrjänen S. Oral manifestations of human papillomavirus infections. *Eur J Oral Sci* 2018;126(1):49–66.
4. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol*. 2015;25(1):2-23. doi: 10.1002/rmv.1822. PMID: 25752814; PMCID: PMC5024016.
5. Awadallah M, Idle M, Patel K, Kademani D. Management update of potentially premalignant oral epithelial lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2018;125(6):628-636.
6. Federico A, Morgillo F, Tuccillo C, Ciardiello F, Loguercio C. Chronic inflammation, and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int J Cancer*. 2007;121(11):2381-6. <https://doi.org/10.1002/ijc.23192>
7. Meštrović T, Ljubin-Sternak S, Božičević I, Drenjančević D, Barać A, Kozina G, Neuberg M, Vraneš J. Human Papillomavirus (HPV) Prevalence, Temporal Dynamics and Association with Abnormal Cervical Cytology Findings in Women from Croatia: Is there a Compounding Effect of Low-Risk/High-Risk HPV Co-Infection? *Clin Lab*. 2020;66(12). doi: 10.7754/Clin.Lab.2020.200406. PMID: 33337847.
8. Roza, A.L.O.C, Fonsêca, T.C, Mariz, B.A.L.A. et al. Human Papillomavirus-Associated Oral Epithelial Dysplasia: Report of 5 Illustrative Cases from Latin America. *Head and Neck Pathol* 2023;17:921–93. doi: 10.1007/s12105-023-01589-z. Epub 2023 Oct 16. PMID: 37843735; PMCID: PMC10739682.
9. Woo SB, Robinson M, Thavaraj S HPV-associated oral epithelial dysplasia. In: WHO Classification of Tumours Editorial Board. *Head and neck tumours*. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2022 [cited 2023 07 24]. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 9). Available from: <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/52>
10. Majchrzak, E, Szybiak, B, Wegner, A, Pienkowski, P, Pazdrowski, J, Luczewski, L., et al. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a review of the literature. *Radiol Oncol* 2014;48(1):1-10.
11. Llewellyn, C.D., Johnson, N.W., Warnakulasuriya, K.A. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity 392 in young people-a comprehensive literature review. *Oral Oncol*, 2001;37(5):401-418.
12. Mills S. How effective is toluidine blue for screening and diagnosis of oral cancer and premalignant lesions? *Evid Based Dent*. 2022;23(1):34-35.
13. Yang EC, Tan MT, Schwarz RA, Richards-Kortum RR, Gillenwater AM, Vigneswaran N. Noninvasive diagnostic adjuncts for the evaluation of potentially premalignant oral epithelial lesions: current limitations and future directions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2018;125(6):670-681.
14. Lumerman H, Freedman P, Kerpel S. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;79(3):321–329.
15. Sridharan G, Shankar AA. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2012;16(2):251-5.

16. Miller RL, Simms BW, Gould AR. Toluidine blue staining for detection of oral premalignant lesions and carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 1988;17:73–8.
17. Yan F, Reddy PD, Nguyen SA, Chi AC, Neville BW, Day TA. Grading systems of oral cavity pre-malignancy: a systematic review and meta-analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2020 Nov;277(11):2967-2976. doi: 10.1007/s00405-020-06036-1. Epub 2020 May 23. PMID: 32447493.
18. Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol* 2006;42(10):987–993
19. Barnes LEJ, Reichart P, Sidransky S (2005) World Health Organization Classification of Tumors, Pathology and Genetics, Head and Neck Tumors. International Agency for Research on Cancer Press, Lyon
20. Reibel JGN, Hille J et al. Oral potentially malignant disorders and oral epithelial dysplasia. In: El-Naggar AKCJ, Grandis JR, et al. (eds) WHO Classification of Head and Neck Tumours, 4th edn. International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp 2017; 112–113.
21. Choi S, Myers JN. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *J Dent Res* 2008;87(1):14–32.
22. Epstein JB, Scully C, Spinelli J. Toluidine blue and Lugol's iodine application in the assessment of oral malignant disease and lesions at risk of malignancy. *J Oral Pathol Med.* 1992;21:160–3.
23. Gandolfo S, Pentenero M, Broccoletti R, Pagano M, Carrozzo M, Scully C. Toluidine blue uptake in potentially malignant lesions in vivo: Clinical and histological assessment. *Oral Oncol.* 2006;42:89–95.
24. Jayaraman S, Pazhani J, PriyaVeeraraghavan V, Raj AT, Somasundaram DB, Patil S. PCNA and Ki67: Prognostic proliferation markers for oral cancer. *Oral Oncol.* 2022 Jul;130:105943. doi: 10.1016/j.oraloncology.2022.105943. Epub 2022 May 30. PMID: 35653815.
25. Dixit R, Bhavsar C, Marfatia YS. Laboratory diagnosis of human papillomavirus virus infection in female genital tract. *Indian J Sex Transm Dis AIDS.* 2011 Jan;32(1):50-2. doi: 10.4103/0253-7184.81257. PMID: 21799579; PMCID: PMC3139291.
26. Gupta A, Singh M, Ibrahim R, Mehrotra R. Utility of toluidine blue staining and brush biopsy in precancerous and cancerous lesions. *Acta Cytol* 2007;51(5):788-94. doi: 10.1159/000325843. PMID: 17910350.
27. Snietura M, Lamch R, Kopec A, Waniczek D, Likus W, Lange D, Markowski J. Oral and oropharyngeal papillomas are not associated with high-risk human papillomavirus infection. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2017;274(9):3477-3483.
28. Piemonte ED, Gilligan MG, Lazos JP, Panico RL. Tinción con azul de toluidina en biopsia dirigida de lesiones displásicas de la mucosa bucal. Informe de casos clínicos. *Rev Asoc Odontol Arg.* 2021;109(1):49-58.

Disponibilidad de datos

Todo el conjunto de datos que apoya los resultados de este estudio fue publicado en el propio artículo.

Declaración de Conflicto de interés

Los autores declaran que no hay conflicto de interés

Fuente de Financiamiento

Esta investigación no recibió ninguna subvención específica de agencias de financiación en los sectores público, comercial o sin fines de lucro

Comité de ética

El proyecto de investigación fue aprobado por el comité de ética e investigación de la Universidad de Guadalajara CI-04219

Declaración de contribución de autoría y colaboración

NOMBRE Y APELLIDO	COLABORACIÓN ACADÉMICA													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Jorge García Barragán				X		X		X	X					
Rogelio González González	X	X		X			X				X		X	
Ronell Bologna Molina					X							X	X	X
Victor Toral Rizo			X			X			X	X				
Germán Villanueva Sánchez	X	X						X						
Sandra López Verdín	X	X		X	X	X	X	X						

- | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1. Administración del proyecto | 8. Metodología |
| 2. Adquisición de fondos | 9. Recursos |
| 3. Análisis formal | 10. Redacción - borrador original |
| 4. Conceptualización | 11. Software |
| 5. Curaduría de datos | 12. Supervisión |
| 6. Escritura - revisión y edición | 13. Validación |
| 7. Investigación | 14. Visualización |

Nota de aceptación:

Este artículo fue aprobado por la editora de la revista PhD. Dra. Vanesa Pereira-Prado