



Revisión

Eficacia del azul de toluidina para la detección temprana de cáncer oral. Una revisión narrativa*Efficacy of toluidine blue for oral cancer early detection. A narrative review***Katia Sánchez-Sánchez¹ y Rosa Diana Hernández-Palacios²**¹ Estudiante de la Carrera de Cirujano Dentista, FES Zaragoza, UNAM.² Profesor de tiempo completo de la Carrera de Cirujano Dentista, FES Zaragoza, UNAM**RESUMEN**

Introducción. El cáncer es un problema de salud que tiene alta morbilidad y mortalidad, se estima que cada año se producen 275,000 casos de cáncer oral. Lamentablemente, el diagnóstico se realiza en etapas avanzadas, por lo que es necesario efectuar el examen bucal y aplicar en lesiones sospechosas técnicas complementarias como la tinción con azul de toluidina para establecer el diagnóstico y tratamiento. **Objetivo.** Presentar una revisión narrativa sobre la eficacia del azul de toluidina para la detección temprana de cáncer oral. **Desarrollo.** A través de la base de datos PubMed, se identificaron 9 estudios donde fueron incluidos 770 participantes a quienes se les aplicó la tinción con azul de toluidina y donde se especificó su sensibilidad y especificidad para identificar cáncer oral o lesiones potencialmente malignas. La información analizada mostró que en dos estudios la sensibilidad del azul de toluidina fue de 86-100%, en seis estudios 57-75% y en uno 42%, la especificidad en dos estudios fue de 88-90%, en cuatro de 68-77% y en tres de 30-50%, lo cual muestra que el azul de toluidina presenta variabilidad respecto a su sensibilidad y especificidad. **Conclusiones.** El azul de toluidina mostró una sensibilidad de moderada a alta para la detección de displasia en lesiones potencialmente malignas y cáncer oral, puede ser utilizada por el personal de salud cuando existan lesiones sospechosas de malignidad.

Palabras clave: Diagnóstico, detección temprana, neoplasia maligna, tinción

ABSTRACT

Introduction. Cancer is a health problem that has high morbidity and mortality, it is estimated that 275,000 cases of oral cancer occur each year. Unfortunately, diagnosis is made in advanced stages, so it is necessary to perform the oral examination and apply in complementary technical suspicious lesions such as blue staining of toluidine to establish the diagnosis and treatment. **Aim.** Presenting a narrative review on the effectiveness of toluidine blue for oral cancer early detection. **Narrative.** Through the PubMed database, 9 studies were identified, which included 770 participants, who were given blue toluidine staining and whose sensitivity and specificity were determined to identify oral cancer or potentially malignant lesions. Results. The analyzed information showed that in two studies the sensitivity of toluidine blue was 86-100%, in six studies 57-75% and in one 42%, the specificity in two studies was 88-90%, in four of 68-77% and three of 30-50%, which shows that blue toluidine has variability regarding its sensitivity and specificity. **Conclusions.** Blue toluidine showed moderate to high sensitivity for the detection of dysplasia in potentially malignant lesions and oral cancer. It can be used by health personnel when there are suspicious malignancy lesions.

Keywords: Diagnosis, early detection, malignancy, staining

Correspondencia: Rosa Diana Hernández-Palacios
E.mail: palaciosd671@gmail.com

Artículo recibido: 21 de febrero de 2020
Artículo aceptado: 23 de mayo de 2020

INTRODUCCIÓN

El cáncer oral constituye del 3-6% de todas las neoplasias malignas. El carcinoma oral de células escamosas (COCE) representa el 90% de todos los tipos de cáncer que se presentan en boca; dado que en etapas tempranas es asintomático regularmente su diagnóstico se realiza de manera tardía.¹⁻² Se han reconocido algunos factores que retrasan el diagnóstico de COCE entre los que se encuentran que los profesionales de la salud no realizan un examen completo de la mucosa oral, y cuando identifican alguna lesión no le dan el manejo adecuado. Asimismo, aproximadamente 30% de los pacientes, por lo general esperan entre 3 a 10 meses antes de consultar al estomatólogo después de haber identificado alguna lesión que no cicatriza.³⁻⁵

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define al COCE como una neoplasia epitelial invasiva con diferentes grados de diferenciación escamosa y propensa a metastatizar hacia los ganglios linfáticos en estadio temprano, puede originarse a partir de mucosa sana; sin embargo más del 50% están precedidos de lesiones cancerizables, las que se denominan desde el año 2017 por la OMS como Desórdenes Potencialmente Malignos Orales (DPMO) donde se incluyen 12 entidades patológicas: leucoplasia, eritroplasia, eritroleucoplasia, fibrosis oral submucosa, disqueratosis congénita, queratosis del masticador de tabaco, lesiones palatinas asociadas con fumar al revés, candidiasis crónica, liquen plano, lupus eritematoso discoide, glositis sifilítica y queilitis actínica.⁶⁻⁸

La historia natural del cáncer aún tiene aspectos que deben estudiarse, sobre todo cuando es precedido por alguna lesión, ya que se ha reconocido que la transformación de eritroplasia a cáncer es de 14-51%, de la leucoplasia verrucosa proliferativa es 60-100% y de la fibrosis submucosa de 7% a 30%, de ahí la importancia de diagnosticar dichas lesiones en etapa temprana.⁹⁻¹¹ La OMS ha propuesto que la prevención y la detección precoz son los objetivos principales para el control del cáncer oral en todo el mundo. Para esto se han utilizado diversas técnicas no invasivas como la tinción con azul de toluidina, quimioluminiscencia y autofluorescencia, que muestran los primeros cambios celulares de displasia en carcinoma in situ, cáncer oral y lesiones potencialmente malignas. No obstante, el estándar de oro es la biopsia bucal.¹²⁻¹⁴

El propósito del presente trabajo es presentar una revisión de diversos ensayos clínicos para identificar la

eficacia del azul de toluidina en el diagnóstico de cáncer oral.

EPIDEMIOLOGÍA DE CÁNCER ORAL

El comportamiento epidemiológico del cáncer oral ha cambiado en los últimos 10 años, existe una amplia variación geográfica en la incidencia y mortalidad; sin embargo, desde la perspectiva del gradiente social se identifica que su frecuencia es mayor en países de bajo nivel socioeconómico, debido a la exposición a diversos factores de riesgo como consumo de tabaco y alcohol; tipo de alimentación; sedentarismo; sobrepeso y obesidad; comportamiento sexual (virus del papiloma humano); nivel de educación; condiciones de trabajo y el acceso a los servicios de salud.¹⁵⁻¹⁶

En India, el cáncer oral representa el 40% de todos los tumores malignos y en Asia el 50%. En Estados Unidos son diagnosticados cada año 45,000 nuevos casos de cáncer de cabeza y cuello. En Cuba, el cáncer de labio, cavidad bucal y faringe constituye una de las 10 primeras localizaciones de incidencia, y representa el 4 % de todas las lesiones malignas diagnosticadas. En España cada año se reportan 4,000 casos y en México, pese al subregistro, se estima que aproximadamente hay 2,000 casos. Respecto a la edad el 90% de los carcinomas se diagnostican en personas mayores de 40 años, pero su mayor prevalencia es en adultos mayores; sin embargo ha aumentado en personas jóvenes, lo cual puede estar asociado con el incremento de la infección por el virus de papiloma humano y del consumo de tabaco y alcohol.^{1,8,17-21}

DIAGNÓSTICO DE CÁNCER ORAL

El diagnóstico precoz del carcinoma oral se realiza cuando las lesiones son potencialmente malignas o si el cáncer es menor de 2 cm de diámetro, en este momento es cuando el estomatólogo puede detectarlo durante una exploración oral ya que el acceso visual es directo. Es importante revisar todas las estructuras bucales principalmente los bordes laterales de la lengua y piso de boca porque son los sitios de mayor frecuencia de cáncer oral.^{1,18,21}

Los pacientes con cáncer oral por lo común son diagnosticados en etapa avanzada que requiere tratamientos más agresivos y mutilantes. En este sentido, en un estudio realizado en Argentina en 274 pacientes, se



identificó que 65% de carcinomas orales fueron diagnosticados en etapas avanzadas (III y IV), la manifestación clínica es como una úlcera indurada con bordes elevados que tiene más de 3 semanas de evolución, sin mostrar evidencia de cicatrización, o puede manifestarse como un aumento de volumen sin causa aparente; otro síntoma referido por los pacientes es dolor, motivo por el cual acude a consulta estomatológica y con menor frecuencia hipoestesia facial y disfagia.^{12,22,23}

TÉCNICAS PARA DIAGNÓSTICO TEMPRANO DE CÁNCER ORAL

La técnica vital con azul de toluidina se utilizó desde 1960 por Sherwin. La toluidina es un colorante nuclear metacromático que tiñe selectivamente los componentes ácidos de los tejidos, el DNA y RNA de color azul rey, lo cual muestra que las lesiones son positivas ya que en casos de displasia celular existen cuantitativamente más ácidos nucleicos que en los tejidos normales. En lesiones potencialmente malignas como la leucoplasia, el azul de toluidina tiñe las áreas de mayor actividad celular, como se muestra en la zona retromolar y mucosa de carrillo del lado izquierdo (Figura 1), eso sirve para identificar la zona donde se realizará posteriormente la biopsia bucal para confirmar el diagnóstico. La técnica para aplicar el azul de toluidina se debe iniciar pidiendo al paciente que se enjuague la boca con agua para limpiar la zona donde se aplicará la tinción para eliminar residuos de saliva o de alimentos, después con un hisopo de algodón se coloca ácido acético al 1% durante 30 segundos, y a continuación se aplica en la lesión la

solución de azul de toluidina al 1% con un hisopo de algodón durante 60 segundos, finalmente se elimina el exceso de tinción aplicando ácido acético por 30 segundos, la tinción se considera positiva si adquiere una coloración azul intenso. Esta prueba es sencilla, económica y rápida y puede ser utilizada por el estomatólogo en su práctica profesional.^{12,23-26}

El azul de toluidina también se utiliza para evaluar el estado de los márgenes alrededor del cáncer oral en el momento de la resección, y una prueba negativa no excluye la presencia de displasia o incluso cáncer oral.²⁷⁻²⁸

En contraste con la técnica de tinción con azul de toluidina, se encuentran la quimioluminiscencia y la autofluorescencia.

La quimioluminiscencia es una técnica que requiere del uso de una lámpara que emite una luz blanca-azul sobre los tejidos a los que se aplica una solución de ácido acético al 1% que destruye la barrera de glicoproteínas de la superficie mucosa y provoca deshidratación que deja penetrar la luz, la cual es absorbida por las células de los tejidos normales y reflejada por las células con núcleos anormales como las que se encuentran en tejidos displásicos, esto se observa con un aspecto blanquecino-deshidratado y más opaco de lo normal.²⁹⁻³¹

La técnica de autofluorescencia se debe a la presencia de fluoróforos endógenos en las células, se utiliza para identificar lesiones malignas en etapa temprana, registra actividad celular atípica en los tejidos anormales de la mucosa mediante su morfología y química. La técnica se basa en la emisión de una luz que es reflejada en la mucosa provocando su fluorescencia, en caso negativo se observa una coloración verde claro, y en caso positivo se observa un color oscuro opaco casi negro.^{20,29}

Estas tres técnicas son eficaces para diagnosticar las lesiones cancerígenas. Sin embargo, dado el análisis costo-beneficio, se prefiere el azul de toluidina. En este sentido, cuando se identifique alguna lesión oral donde se sospeche malignidad, debe aplicarse esta técnica complementaria para indagar cambios celulares de displasia leve, moderada o severa. En el Cuadro 1 se presentan 9 estudios donde se aplicó el azul de toluidina en lesiones malignas y se identifica su sensibilidad y especificidad, en cinco estudios se compara con la quimioluminiscencia y en uno con la autofluorescencia, la información analizada mostró que en dos estudios la sensibilidad del azul de toluidina fue de



Figura 1. Tinción positiva con azul de toluidina en lesión sospechosa de leucoplasia localizada en zona retromolar y mucosa de carrillo

86-100%, en seis estudios 57-75% y en uno 42%, la especificidad fue en dos estudios de 88-90%, en cuatro estudios de 68-77% y en tres de 30-50%.

Por lo anterior, se plantea que el azul de toluidina presenta variabilidad respecto a su sensibilidad y especificidad que va de moderada a alta, en ocho estudios la tinción se aplicó en DPMO y en siete en cáncer, los resultados muestran que el azul de toluidina tiene más sensibilidad en cáncer oral, por lo que se considera que es útil para la detección temprana de esta neoplasia maligna.²⁹⁻³⁷

A continuación se presentan algunos estudios donde se aplicó el azul de toluidina, en un estudio realizado en 2015 en 126 pacientes con leucoplasia, eritroplasia o displasia epitelial se aplicó la autofluorescencia, quimioluminiscencia y el azul de toluidina, mostraron una sensibilidad de 87%, 77% y 53 % y una especificidad de 2%, 27% y 68% respectivamente, donde se muestra que la autofluorescencia es la técnica que tiene más sensibilidad para detectar las lesiones que tienen cambios malignos, seguida de la quimioluminiscencia, sin embargo son pruebas que requieren recursos especializados.²⁹

En el estudio realizado por Chaudhry et al. (2016), en 100 pacientes donde comparó la quimioluminiscencia con el azul de toluidina, mostró que ambas técnicas tienen utilidad para identificar displasia, en leucoplasia la quimioluminiscencia tuvo sensibilidad 85% y especificidad 41% y el azul de toluidina tuvo sensibilidad de 42% y especificidad 88%, si bien la quimioluminiscencia muestra mayor sensibilidad para la detección de cambios malignos, la identificación de pacientes que no presentan esos cambios es muy baja.³⁰

En desórdenes potencialmente malignos se ha aplicado la tinción con azul de toluidina mostrando que es efectiva para la detección temprana de cáncer oral, tal es el caso del estudio realizado en 2011 por Upadhyay en 47 pacientes, donde mostró que el azul de toluidina tuvo alta sensibilidad de 74% y especificidad de 30%, en este tipo de lesiones es cuando debería aplicarse la tinción para realizar un diagnóstico precoz de cáncer.³¹

En 2015 Chainani-Wu aplicó en 43 pacientes azul de toluidina para detectar displasia, carcinoma in situ y encontró alta sensibilidad de 94% (71-100, $p < 0.0003$) y especificidad de 45% (32-58, $p < 0.53$). En este estudio se muestra que en lesiones con diagnóstico de cáncer, se aumenta la sensibilidad de la tinción.³²

El cáncer oral puede originarse en desórdenes potencialmente malignos por lo que es necesario concientizar al paciente que debe acudir a revisión con el profesional de la salud al menos una vez al año, para poder identificar algún cambio en la mucosa bucal, sobre todo en aquellas personas que refieran factores de riesgo como tabaquismo, mascar tabaco (o nuez de areca como lo hacen en Nepal), ingesta de alcohol, obesidad, edad mayor de 60 años, infección por virus papiloma humano (principalmente en personas jóvenes y antecedente familiar de cáncer). En estos pacientes se debe aplicar la tinción con azul de toluidina cuando se identifique alguna lesión sospechosa de malignidad y cuando resulte positiva, es obligatorio realizar biopsia bucal para confirmar el diagnóstico definitivo de la lesión, así se podrá reducir la morbilidad por esta neoplasia maligna y mejorar la tasa de supervivencia de los pacientes, que actualmente es en promedio de cinco años.³⁸⁻⁴⁰

CONCLUSIONES

El azul de toluidina mostró una sensibilidad de moderada a alta para la detección de displasia en lesiones potencialmente malignas y cáncer oral, puede ser utilizada por el personal de salud cuando existan lesiones sospechosas de malignidad.

La quimioluminiscencia y la autofluorescencia son más sensibles que el azul de toluidina para detectar lesiones sospechosas de malignidad, sin embargo son técnicas que requieren más recursos.

AGRADECIMIENTOS

El manuscrito fue revisado y editado en el Programa para la Investigación Bibliográfica Científica sobre Salud (PIBCIS) de la FES Zaragoza, UNAM. También agradecemos a la especialista Grisel Alicia Corona González, por su colaboración y compartir la Figura 1, correspondiente a un paciente con leucoplasia a quien se le aplicó azul de toluidina.

**Cuadro 1. Uso de azul de toluidina en lesiones potencialmente malignas y cáncer oral.**

Autor(es)	Objetivo	Sujetos de estudio	Hallazgos Sensibilidad/especificidad
Awan <i>et al.</i> (2015) ²⁹	Evaluar la eficacia de la autofluorescencia, la quimioluminiscencia y el azul de toluidina en el diagnóstico de trastornos malignos.	126 pacientes con leucoplasia, eritroplasia y displasia epitelial	La sensibilidad del azul de toluidina 53%, fue menor que autofluorescencia 87% y quimioluminiscencia 77%. La especificidad del azul de toluidina fue mayor 68%, que autofluorescencia 21% y quimioluminiscencia 27%.
Chaudhry <i>et al.</i> (2016) ³⁰	Comparar la quimioluminiscencia y el azul de toluidina en el diagnóstico de displasia en leucoplasia.	100 pacientes con leucoplasia	El azul de toluidina mostró sensibilidad de 42%, la especificidad, 88%, el valor predictivo positivo 87%, el valor predictivo negativo de 44%. La quimioluminiscencia tuvo sensibilidad de 85% y especificidad 41%, el valor predictivo positivo de 73% y el valor predictivo negativo de 58%.
Upadhyay <i>et al.</i> (2011) ³¹	Evaluar la eficacia de la tinción vital azul de toluidina en la detección de lesiones orales potencialmente malignas.	47 pacientes con DPMO	La tinción del azul de toluidina dio una sensibilidad del 74% y una especificidad del 30%. El valor predictivo positivo fue de 55% y el valor predictivo negativo de 50%
Chainani-Wu <i>et al.</i> (2015) ³²	Detectar displasia en carcinoma y lesiones potencialmente malignas, con azul de toluidina.	43 pacientes con carcinoma y DPMO	La sensibilidad del azul de toluidina en la detección de carcinoma in situ fue de 94% y especificidad 45%, mientras que para el carcinoma, la sensibilidad fue de 100% y especificidad 39%.
Awan <i>et al.</i> (2012) ³³	Detectar lesiones potencialmente malignas de cavidad oral con el uso de azul de toluidina.	92 pacientes con lesiones potencialmente malignas	La prueba de azul de toluidina tuvo sensibilidad para detectar displasia leve o moderada 62% y en severa 71%, especificidad de 90%.

Cuadro 1. Uso de azul de toluidina en lesiones potencialmente malignas y cáncer oral.

Autor(es)	Objetivo	Sujeto de estudio	Hallazgos Sensibilidad/especificidad
Cancela-Rodríguez <i>et al.</i> (2010) ³⁴	Detectar lesiones orales premalignas y malignas con el uso de azul de toluidina.	160 pacientes con lesiones premalignas y malignas	La sensibilidad y especificidad del azul de toluidina en las lesiones malignas o premalignas fue del 65% y de 73%.
Vashisht <i>et al.</i> (2014) ³⁵	Detectar cambios displásicos en lesiones potencialmente malignas y cáncer con quimioluminiscencia (Vizilite) y azul de toluidina.	60 pacientes (25 con leucoplasia 10 pacientes con cáncer y 25 pacientes de alto riesgo sin evidencia clínica visible).	Sensibilidad y especificidad del azul de toluidina se calcularon en 86% y 77% y de quimioluminiscencia en 95% 84%.
Bagga <i>et al.</i> (2014) ³⁶	Realizar el análisis comparativo de lesiones y condiciones precancerosas por examen clínico, quimioluminiscencia y azul de toluidina.	100 pacientes con leucoplasia y fibrosis submucosa oral.	La quimioluminiscencia y el azul de toluidina tuvieron sensibilidad y especificidad de 75% y 57% y 55% y 44% respectivamente.
Shukla <i>et al.</i> (2018) ³⁷	Comparar el azul de toluidina y la quimioluminiscencia para la detección temprana de cáncer	42 pacientes con lesiones premalignas.	La sensibilidad del azul de toluidina fue de 63% y de la quimioluminiscencia 90%, la especificidad fue de 50%



REFERENCIAS

1. Salgado-Ramírez B, Rivera-Martínez CG, Altamirano Díaz VM. Frecuencia de carcinoma de cavidad oral en un Hospital de tercer nivel. *Rev. Sandi Milita Mex.* 2014; 68(3): 172-176.
2. Ramírez AV, Anaya IG. Cáncer bucal. En: Hernández PRD, Mendoza NVM, Martínez ZIA, Morales ML. *Odon-togeriatría y Gerodontología.* México: Trillas/UNAM; 2016.p. 223-227.
3. Epstein J, Zhang L, Rosin M. Advances in the diag-nosis of oral premalignant and malignant lesions. *J Can Dent A.* 2002; 68(10): 617-621.
4. Lee SC, Tang IP, Avatar SP, Ahmad N, Selva KS, Tay KK et al. Head and neck cancer: possible causes for delay in diagnosis and treatment. *Med J Malaysia.* 2011; 66:101-104.
5. Felippu AWD, Freire EC, de Arruda Silva R, Gui-marães AV, Dedivitis RA. Impact of delay in the diag-nosis and treatment of head and neck cancer. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2016; 82:140-143.
6. El-Naggar A, Chan J, Grandis J, Takata T, Slootweg P, WHO. Classification of head and neck tumours. 4a edition. Geneva: WHO; 2017. p.112-113.
7. García DM, Figueiro AC, Lucia LV. Prevention and early diagnosis of oral cancer -a literatura review. *Rev Odonto Cienc.* 2017; 32(4):204-212.
8. Hussein A, Helder M, Visscher J, Leemans C, Bra-akhuis B, Vet H, Forouzanfar T. Global incidence of oral and oropharynx cancer in patients younger than 45 years versus older patients: A systematic review. *Eur J Can.* 2017; 82: 115-127.
9. Chaturvedi P, Vaishampayan S, Nair S, Nair D, Agarwal JP, Kane SV, Pawar P, Datta S. Oral squamous cell carcinoma arising in background of oral submucous fibrosis: a clinicopathologically distinct disease. *Head Neck.* 2013; 35(10): 1404-1409.
10. Khan N, Bavle R, Makarla S, Amulya S, Konda P, Suhakara M. Oral cancer and potentially premalignant oral epithelial lesions: A survey approach. Emerging of a new system and professionals. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2019; 23(2):248-256.
11. Walsh T, Liu JLY, Brocklehurst P, Glenny AM, Lin-gen M, Kerr AR, Ogden G, Warnakulasuriya S, Scully C. Clinical assessment to screen for the detection of oral cavity cancer and potentially malignant disorders in apparently healthy adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;2013 (11):CD010173.
12. Sharma N, Mubeen. Non -invasive diagnostic tools in early detection of oral epithelial dysplasia. *J Clin Exp Dent.* 2011; 3(3):184-8.
13. Moctezuma-Bravo GS, Moctezuma-Dávila M. Cán-cer oral en un hospital general de zona del Instituto Mexicano del Seguro Social en México, (1988-2005). *Gaceta Mexicana de Oncología.* 2015; 14(6): 323-328.
14. Ujaoney S, Motwani MB, Degwekar S, Wadhwan V, Zade P, Chaudhary M, Hazarey V, Thakre TP, Ma-mtani M. Evaluation of chemiluminescence, toluidine blue and histopathology for detection of risk oral pre-cancerous lesions: A cross-sectional study. *BMC Clin Pathol.* 2012, 12:6. doi:10.1186/1472-6890-12-6. Avail-able from: <https://bmcclinpathol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6890-12-6>
15. García M, Figueiro A, Lucia V. Prevention and early diagnosis of oral cancer-a literature review. *Rev Odonto Cienc.* 2017; 32(4): 204-212.
16. Buelvas A, Agudelo A. Gradiente social, envejeci-miento y diagnóstico tardío del cáncer oral. *Rev Fac Nac Salud Pública.* 2011; 29(3): 321-328.
17. García-Roco ON. Arredondo M. Castillo EM. Facto-res contribuyentes al diagnóstico tardío del carcinoma bucofaríngeo. *Rev Cubana Estomatol.* 2006; 43(1). Dis-ponible en: <http://www.revestomatología.sld.cu/index.php/est/article/view/2469>.
18. Pascual A, Franch M, Muela R, Manresa C, Barluen-ga N, Aparicio C. Cáncer oral. Actualidad en técnicas de detección. *Periodoncia y Osteointegración.* 2009; 20(4): 265-271.
19. Liviu F, Johan L. Oral squamous cell carcinoma: epi-demiology, clinical presentation and treatment. *J Cancer Ther.* 2012; 3:263-268.
20. Bagan J, Sarrion G, Jiménez Y. Oral cancer clini-cal features. *Oral Oncol.* 2010; 46(6): 414-417. doi: 10.1016/j.oraloncology.2010.03.009

21. Súchil L. Epidemiología del cáncer de cavidad oral y laringe. En Meneses GA, Mosqueda TA, Ruíz-Godoy RL. *Patología quirúrgica de cabeza y cuello*. México: Trillas, 2006. p.13-23.
22. Brandizzi D , Gandolfo M , Velazco ML , Cabrini RL , Lanfranchi HE Características clínicas y evolución del cáncer oral: estudio de 274 casos en Buenos Aires, Argentina. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008; 13 (9): E544-548.
23. González DA, Hernández PR, Salazar VM. Diagnóstico precoz de cáncer bucal en un grupo de adultos mayores del Estado de México. *Odont Act*. 2012; 9(109): 6-8.
24. Deepak TS, Karthikeya P, Mahima VG, Manjunath GV. Efficacy of in vivo staining in the early detection of oral potentially malignant disorders in comparison with expression of Ki-67 proliferative marker. *Int J Current Res*. 2016; 8(3):28493-28500.
25. Carrera TA., Cobos FM.J., Gallardo Cl., Caballero AJ., Martínez-Sahuquillo MA. Quimioluminiscencia como método de screening de cáncer oral. *Av Odon-toestomatol*. 2011; 27(6): 301-311.
26. Hernández RD, Solís MA, Gálvez G, Ríos J, Gómez Y, Quezada D. *Citología exfoliativa y biopsia en cavidad bucal*. México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM; 2000. p. 95.
27. Mehrotra R, Gupta D. Exciting new advances in oral cancer diagnosis: avenues to early detection. *Head Neck Oncol*. 2011; 3:33. doi: 10.1186/1758-3284-3-33.
28. Junaid M, Choudhary M, Sobani Z, Murtaza G, Qadeer S, Ali N, Khan M, Suhail A. A comparative analysis of toluidine blue with frozen section in oral squamous cell carcinoma. *World J Surg Onc*. 2012; 10: 57. Available from: <https://doi.org/10.1186/1477-7819-10-57>
29. Awan KH, Morag, Warnakulasuriya S. Assessing the accuracy of autofluorescence, chemiluminescence and toluidine blue as diagnostic tools for oral potentially malignant disorders a clinicopathological evaluation. *Clin Oral Invest*. 2015; 19: 2267–2272.
30. Chaudhry A, Manjunath M, Ashwatappa D, Krishna S, Krishna AG. Comparison of chemiluminescence and toluidine blue in the diagnosis of dysplasia in leukoplakia: a cross-sectional study. *J Inv Clin Dent*. 2016; 7(2): 132-140.
31. Upadhyay J, Rao N, Upadhyay RB, Agarwal PK. Reliability of toluidine blue vital staining in detection of potentially malignant oral lesions. *Asian Pacific J Cancer*. 2011; 12: 1757-1760.
32. Chainani-Wu N, Madden E , Cox D , Sroussi H, Epstein J , Silverman S Jr. Toluidine blue aids in detection of dysplasia and carcinoma in suspicious oral lesions. *Oral Dis*. 2015; 21(7): 45.
33. Awan Kh, Yang Y, Morgan P, Warnakulasuriya. Utility of toluidine blue as a diagnostic adjunct in the detection of potentially malignant disorders of the oral cavity—a clinical and histological assessment. *Oral Dis*. 2012; 8(8): 728-733.
34. Cancela-Rodríguez P, Cerero-La piedra R, Esparza-Gamez G, Llamas-Martínez S, Warnakulasuriya S. The use of toluidine blue in the detection of premalignant and malignant oral lesions. *J Oral Pathol Med*. 2011; 40(4): 300-304.
35. Vashisht N, Ravikiran A. Samatha Y, Rao PC, Naik R, Vashisht D. Chemiluminescence and toluidine blue as diagnostic tools for detecting early stages of oral cancer: an in vivo study. *J Clin Diagn Res*. 2014; 8(14): 35-38.
36. Bagga M, Kumar A, Bhatnagar D. Comparative morphological analysis of precancerous lesions and conditions by clinical examination, chemiluminescence, and toluidine blue. *J Ind Acad Oral Med Rad*. 2017; 29 (4): 249-253.
37. Shukla A, Singh N, Adsul S, Kumar S, Shukla D, Sood A. Comparative efficacy of chemiluminescence and toluidine blue in the detection of potentially malignant and malignant disorders of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2018; 22(3): 442. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP_261_17.
38. Giovannacci I, Vescovi P, Manfredi M, Meleti M. Non-invasive visual tools for diagnosis of oral cancer and dysplasia: A systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2016; 21(3): 305-315.
39. Rimal J, Sherestha A, Maharjan I, Shrestha S, Shah P. Risk Assessment of smokeless tobacco among oral precancer and cancer patients in Eastern developmental region of Nepal. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019; 20(2): 411-415.
40. Nomares B, Contreras G, Martínez B, Ávalos N, Carmona L. Sobrevida en carcinoma espinocelular de mucosa oral: Análisis de 161 casos. *Rev Chil Cir*. 2014; 66(6): 568-676.