



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**ALTERACIÓN EN EL PATRÓN DE SIALILACIÓN Y EL PERFIL
DE EXPRESIÓN DE DOS FACTORES DE CRECIMIENTO
EPIDÉRMICO EN CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS
ORAL.**

TESIS DE MAESTRIA

PRESENTA:

C.D. LUIS FERNANDO JACINTO ALEMÁN

PARA LA OBTENCIÓN DE GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

ÁREA DE ESPECIALIZACIÓN: BIOLOGÍA BUCAL

DIRECTOR:

DR. JUAN CARLOS CUAUHTÉMOC HERNÁNDEZ GUERRERO

ASESORES:

DRA. MARIA DOLORES JIMÉNEZ FARFÁN

LIC. AURORA DEL C SÁNCHEZ GARCÍA

Este estudio fue financiado por el proyecto PAPIIT IN228407



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE GENERAL

1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Antecedentes	4
3.1. Características clínicas	4
3.2. Métodos de diagnóstico	5
3.3. Eventos relacionados con la carcinogénesis	6
3.4. Factores de crecimiento epidérmico y cáncer	7
3.5. Sialilación y cáncer	8
4. Planteamiento del problema	11
5. Justificación del problema	12
6. Hipótesis	13
7. Objetivo general	13
7.1. Objetivos específicos	13
8. Tipo de estudio	13
9. Universo o población	13
10. Materiales y métodos	14
11. Recursos	21
12. Criterios de inclusión	21
13. Criterios de exclusión	22
14. Criterios de eliminación	22
15. Variables independientes	22
16. Variables dependientes	22
17. Métodos para procesamiento de datos	22
18. Análisis estadístico de datos	22
19. Resultados	23
19.1. Análisis Histopatológico	23
19.2. Análisis inmunohistoquímico	24
19.3. Análisis de co-inmunohistoquimioexpresión	25
20. Discusión	27
21. Conclusiones	33
22. Bibliografía	34
23. Apéndice A. Figuras	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	44
Figura 2	44
Figura 3	45
Figura 4	46
Figura 5	47
Figura 6	48
Figura 7	49
Figura 8	50
Figura 9	50
Figura 10	51
Figura 11	51
Figura 12	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	53
Tabla 2	53
Tabla 3	54
Tabla 4	54

1. RESUMEN

La familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico incluye EGFR o erbB1, erbB2 (Neu, HER 2), erbB3 y erbB4. Estos receptores participan en la carcinogénesis. En los carcinomas de células escamosas orales (CCEO) su sobreexpresión está asociada con estados avanzados y metástasis a linfonodos. Adicionalmente, esta sobreexpresión regula la expresión de otros factores responsables de la homeostasis celular. Ha sido reportado que cambios en la expresión de ácidos siálicos se efectúan durante la malignización. La co-expresión de estos factores puede estar relacionada con el grado de displasia o tumorigenicidad.

OBJETIVO: Determinar la correlación de la expresión de erbB1, erbB2, Neu5Ac y α 2,3,Neu5Ac con el grado de diferenciación y supervivencia de pacientes con CCEO.

METODOLOGIA: En 52 muestras de pacientes diagnosticados con CCEO se determinó el grado de diferenciación según la OMS al igual que seis parámetros histopatológicos (*pleomorfismo, tipo y profundidad de invasión, queratinización, número de mitosis e infiltrado linfocitario*). Se realizó el análisis inmunohistoquímico e histoquímico de erbB1, erbB2, Neu5Ac y α 2,3,Neu5Ac de manera individual así como sus colocalizaciones. Se realizó análisis de correlación de Pearson, análisis de supervivencia Kaplan-Meier (Log-Rank) y el análisis multivariado de Cox (-2 log).

RESULTADOS. En este estudio se mostró la correlación de los parámetros histológicos pleomorfismo y queratinización con el grado de diferenciación. El análisis inmunohistoquímico mostró que erbB1 modificó su zona de expresión en relación al grado de diferenciación, además de correlacionar su nivel de expresión con el grado de diferenciación lo mismo que Neu5Ac. erbB2 y α 2,3,Neu5Ac presentaron elevada positividad predominantemente en membrana celular. El análisis de Kaplan-Meier y el análisis multivariado de Cox no presentaron significancia estadística.

CONCLUSION: En base a los resultados obtenidos se concluyó que los parámetros de pleomorfismo y queratinización correlacionaron con el grado de

diferenciación. La expresión de erbB1 y Neu5Ac es dependiente del grado de diferenciación así como la elevada expresión de erbB2 y α 2,3,Neu5Ac de manera individual o coexpresando puede estar relacionada con el grado de displasia de los CCEO.

2. INTRODUCCIÓN

El carcinoma de células escamosas oral (CCEO) es la neoplasia más común de la cavidad bucal. La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a ésta en el octavo lugar respecto a la frecuencia de todas las neoplasias. Los métodos de diagnóstico pueden ser clínicos, radiológicos, histológicos, citológicos y moleculares. El sistema TNM ha sido ampliamente utilizado para la determinación de estadificación y/o conducta de una neoplasia. De igual manera, el análisis histopatológico del CCEO es considerado por otros investigadores como una herramienta fundamental para el diagnóstico y pronóstico. Investigaciones han mostrado que la determinación de parámetros tales como pleomorfismo, número de mitosis, grado de queratinización, profundidad y patrón de invasión e infiltrado linfocitario pueden aportar información sobre la relación neoplasia-huésped en relación con la conducta biológica.

Durante el proceso de transformación maligna se han evidenciado alteraciones en diversas moléculas, incluyendo factores de crecimiento y carbohidratos. La participación de la familia del receptor EGF ha sido ampliamente demostrada en diversos tipos de carcinomas, relacionándose con procesos de proliferación, diferenciación, adhesión y motilidad celular, así como con características clínicas, histológicas y supervivencia de los pacientes. De igual forma, la presencia de carbohidratos sobre la superficie celular es un factor importante para establecer el comportamiento y evolución de las lesiones neoplásicas. Se ha demostrado que cambios postraduccionales tales como la sialilación de los receptores erbB, pueden modificar la conducta del receptor. El establecimiento de la correlación clínica, histopatológica y supervivencia con la expresión de dos importantes miembros de la familia de receptores EGF (erbB1 y 2) y, ácidos siálicos (Neu5Ac y α 2,3,Neu5Ac) puede proveer mayor información respecto al fenotipo y conducta del CCEO.

3. ANTECEDENTES

El CCEO es una neoplasia epitelial maligna invasiva, que presenta diversos grados de diferenciación, extensión e invasión temprana, además de metástasis a linfonodos locales y regionales. Se presenta predominantemente en personas entre la quinta y sexta década de la vida que consumen alcohol y tabaco.¹

En el año 2002, datos de la OMS reportaron la incidencia de 10.9 millones de casos nuevos de neoplasias malignas, 6.7 millones de muertes y la existencia 24.6 millones de personas que viven con algún tipo de cáncer.² El CCEO representó 274,000 casos donde dos tercios de éstos se presentaron en hombres.

En México en el 2001, cifras de la Secretaria de Salud reportaron 102,657 tumores malignos, es decir, 101.6 casos por cada 100,000 habitantes. El CCEO representó 774 (0.75%) casos del total.³ La cifra de mortalidad por cáncer fue de 56,213 casos, lo que correspondió al 13% del total de defunciones en el mismo año, representado una tasa de 55.7 casos por cada 100,000 habitantes. El CCEO representó el 1.2% de la mortalidad total por neoplasias.⁴

El desarrollo de una neoplasia es considerado como un evento multifactorial. Dentro de los factores de riesgo asociados con el desarrollo del CCEO se ha considerado que el género, edad, condición socioeconómica, estado nutricional, el consumo de tabaco y alcohol e incluso la infección por virus papiloma humano.^{5, 6, 7, 8}

3.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

El desarrollo de un CCEO puede comenzar con una lesión premaligna evolucionando hasta la neoplasia franca. Una lesión premaligna se define como una alteración morfológica de tejido, la cual es más probable se desarrolle una neoplasia, comparado con su contraparte clínicamente normal.⁹ Dentro de las lesiones orales consideradas como premalignas se encuentra la leucoplasia que es una mancha o placa blanca que no puede ser caracterizada clínica o patológicamente como alguna otra enfermedad. Ésta puede presentar diferentes grados de displasia (del 15.6 al 39.2%).^{10, 11} Otra lesión conocida es la eritroplasia, menos frecuente que la leucoplasia, no obstante, presenta porcentaje de

transformación maligna del 14% al 50%.¹² El liquen plano es considerado como una lesión de tipo autoinmune que presenta tres formas clínicas: reticular, erosiva y atrófica. Se ha reportado que esta última forma cuenta con un porcentaje de transformación maligna del 2%.¹³ Por último, la fibrosis submucosa es una enfermedad inflamatoria crónica, ocasionada por el consumo del betel (nuez de areca, hoja de betel, tabaco y cal) con un rango de transformación maligna del 3% al 9%.^{14, 15}

El desarrollo del CCEO puede ocurrir en cualquier sitio anatómico de la cavidad bucal y dado que la mayoría del revestimiento bucal es epitelio estratificado, el 90% de los carcinomas bucales son CCEO. Los sitios de localización preferentes incluyen los dos tercios anteriores de lengua, parte dorsal, ventral y lateral, piso de boca, mucosa yugal, encía superior e inferior y, paladar duro.¹⁶

La sintomatología de los pacientes con pequeños CCEO es vaga o incluso ausente, al igual que los hallazgos físicos. Los pacientes pueden presentar lesiones leuco y/o eritroplásicas dentro o adyacentes a los carcinomas. Estas lesiones suelen presentarse como aumentos de tamaño con ulceraciones, aunado a problemas bucales como halitosis, dificultad de apertura, masticación, deglución y habla. Así mismo puede existir necrosis de estructuras circundantes como hueso, músculo y piel. En etapas terminales, los pacientes pueden presentar fístulas orocutaneas, hemorragias que puede ocasionar anemia y caquexia severa.¹⁷ La diseminación, invasión y metástasis está determinada en gran medida por su localización anatómica.^{18, 19, 20}

3.2. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Dentro de las estrategias para el diagnóstico de una neoplasia, los parámetros clínicos, radiológicos, histológicos y moleculares pueden aportar información importante. Uno de los métodos clínicos mayormente utilizados es el sistema TNM (tumor-linfonodo-metástasis). Este sistema analiza el tamaño tumoral, la presencia clínica de linfonodos infiltrados por la neoplasia y la presencia de metástasis. La combinación de estos parámetros ha permitido la formulación de pronósticos en base a la severidad de los mismos.²¹ Los métodos radiológicos intra y/o

extraorales han permitido identificar la invasión del carcinoma a hueso y linfonodos subyacentes, aportando información prequirúrgica importante.²² El análisis histológico, es el método por el cual se establece un diagnóstico definitivo de carcinoma. Las características más relevantes de los CCEO son la pérdida de la diferenciación histológica en los estratos celulares y la disrupción de la membrana basal por la transformación e invasión del estrato basal del epitelio hacia tejido conjuntivo.¹

Las características histológicas particulares o combinadas han sido utilizadas en el desarrollo de clasificaciones según su diferenciación (OMS),²³ grado de invasión (Meneses)²⁴ y hasta la conducta de la neoplasia (Jacobsson, Clark y Breslow).²⁵ La OMS clasifica al CCEO en tres tipos: bien, moderado y pobremente diferenciado. Esta clasificación analiza número y tipo de mitosis, queratinización, presencia de puentes intercelulares y pleomorfismo celular y nuclear para establecer su gradificación. El grado de diferenciación histológica y la agresividad son inversamente proporcionales, es decir, a menor diferenciación mayor agresividad. El mejor sitio para realizar la evaluación se considera el frente invasivo del tumor. Se ha planteado que el análisis de características propias de la neoplasia como pleomorfismo nuclear, número de mitosis y grado de queratinización son insuficientes,^{26, 27} por lo que parámetros como el patrón y estado de invasión e infiltrado inflamatorio,²⁸ también aportan información sobre la respuesta del huésped ante la neoplasia.^{29, 30}

Avances en genómica, proteómica y patología molecular han propuesto diversas moléculas candidatas con potencial para la determinación de un fenotipo, tratamiento y conducta de la neoplasia, sin embargo, aún no se ha logrado establecer una completa relación.³¹

3.3. EVENTOS RELACIONADOS CON LA CARCINOGENÉISIS

La carcinogénesis es resultado de la interacción de factores ambientales y genéticos. Entre los factores de riesgo ambientales se encuentran el tabaquismo, la dieta, el sobrepeso, factores reproductivos y hormonales, virus, bacterias, parásitos y la exposición a carcinógenos ambientales y ocupacionales. Dentro de

los factores genéticos asociados al cáncer destacan la presencia de mutaciones, polimorfismos y el riesgo familiar.³²

Hanahan y Weinberg describieron seis características esenciales de las células cancerosas. Estas características son: autosuficiencia de las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales de inhibición, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis, invasión tisular y metástasis.³³

Durante décadas se ha establecido que la activación de oncogenes y la inhibición de genes supresores de tumores son importantes en el desarrollo de neoplasias.³⁴

El desarrollo de un oncogen puede promover el potencial replicativo ilimitado. Los oncogenes pueden ser clasificados en: (1) Factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento (hst-1,int-2, EGFR/erbB, c-erbB2/Her-2, sis); (2) moléculas transductoras (ras, raf, stat-3); (3) factores de transcripción (myc, fos, jun); (4) reguladores del ciclo celular (Ciclina D1) y (5) algunas moléculas relacionadas con apoptosis (bcl-2 y bax).³⁵

3.4. FACTORES DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO Y CÁNCER

Los factores de crecimiento pueden encontrarse unidos a la membrana celular o bien estar disueltos en el líquido extracelular. Durante la carcinogénesis estas señales pueden perder su regulación debido a aumentos en los niveles del receptor, ligando y/o estimulación autócrina.³⁶

La familia de receptores erbB está formada por cuatro miembros: EGFR/erbB1, erbB2 (Neu, Her2), erbB3, erbB4. Todos los miembros cuentan con regiones extracelulares de unión a ligando, una región transmembrana y un dominio citoplasmático con capacidad tirosina cinasa.³⁷ Los genes de erbB1 y erbB2 están localizados en el cromosoma 7p13-q22 y 17q13-21.32, respectivamente.³⁸ Estos receptores son expresados en diversos tejidos de origen ectodérmico y mesenquimal. Bajo condiciones fisiológicas su activación es controlada por la exacta conjunción espacio-temporal de la expresión del receptor y unión de sus ligandos.^{39, 40} La familia de ligandos erbB está formada por EGF, TGF α , anfiregulina, betacelulina, epiregulina y neuroregulinas (NRG). El receptor erbB2 no cuenta con ningún ligando reconocido, sin embargo puede formar

heterodímeros con los otros tres miembros de la familia cuya capacidad de activación es variable de acuerdo al tipo de neoplasia.⁴¹ La formación de homo y heterodímeros de los receptores provoca la fosforilación de aminoácidos tirosina específicos dentro del dominio citoplasmático, iniciando una cascada de señalización intracelular que tiene como blanco el núcleo, para dar inicio a la proliferación celular. Las principales vías de señalización activadas son MAPK, PI3K-AKT y STAT.^{42, 43} Las neoplasias que presentan alteraciones en los receptores erbB tienden a ser más agresivas, asociándose a pronósticos clínicos pobres.⁴⁴

El primer receptor erbB en ser implicado de manera directa en el desarrollo de diversos carcinomas fue el erbB1.⁴⁵ Las primeras alteraciones reportadas han sido las amplificaciones del gen erbB1 y la sobreexpresión del receptor.⁴⁶ Así mismo, rearrreglos estructurales en el dominio extracelular y/o tirosina cinasa del receptor como resultado de deleciones o mutaciones puntuales en el gen, pueden provocar variantes en el subtipo del receptor y en la capacidad de activación del mismo.⁴⁷ Estudios realizados por Bei y col. reportan que la sobreexpresión del erbB1 es constante en la mayoría de los CCEO.^{48, 49}

La amplificación del gen erbB2, al igual que erbB1, ha sido reportada en carcinomas de mama, ovario, gástricos, glándulas salivales y cavidad bucal.^{50, 51, 52} En carcinomas de cabeza y cuello la sobreexpresión de este receptor a menudo es relacionada con estadios avanzados y metástasis hacia linfonodos regionales.^{53, 54, 55} La coexpresión de los diferentes receptores erbB conduce a la formación de dímeros, este potencial de activación ha sido asociado con la conducta de la neoplasia.⁵⁶

3.5. SIALILACIÓN Y CÁNCER

La expresión de carbohidratos en tumores, a través de moléculas de membrana es una característica importante para la adhesión celular, motilidad e invasividad. La glicosilación de lípidos, gangliósidos, integrinas y receptores de factores de crecimiento han demostrado su participación en la modulación del cáncer.⁵⁷

Los carbohidratos ofrecen amplia variabilidad respecto a su estructura y configuración, además también pueden estar unidos a otras moléculas (lípidos o proteínas, nucleótidos) produciendo glicoconjugados.⁵⁸ Los glicoconjugados realizan actividades biológicas esenciales para el desarrollo, crecimiento, funcionalidad y supervivencia.⁵⁹

El proceso por el cual los carbohidratos pueden ser adicionados a lípidos y/o proteínas es denominado glicosilación. Este proceso enzimático co- y/o postraduccional es llevado a cabo en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi a través de glicosiltransferasas y glicosidasas que actúan en forma ordenada y jerárquica. Los tipos comunes de glicosilación encontrados en las células eucariontes son definidos de acuerdo a la naturaleza de las regiones de unión, siendo las más frecuentes las de tipo N y O. La N-glicosilación se caracteriza por la unión covalente de una cadena de oligosacáridos cuyo carbohidrato de unión (GlcNAc) se enlaza al grupo amino de la Asn, dentro de una secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr. En la O-glicosilación, el C-1 de la GalNAc se une covalentemente al grupo hidroxilo de los aminoácidos serina o treonina.^{60, 61}

Los carbohidratos son reconocidos por proteínas denominadas lectinas (del latín *legere*, seleccionar o elegir). Estas pueden ser definidas como proteínas oligoméricas diferentes a las enzimas e inmunoglobulinas que pueden unirse específicamente a carbohidratos por medio de diferentes dominios de reconocimiento.⁶² Estas moléculas se encuentran presentes en casi todos los seres vivos incluyendo el hombre. Así las lectinas han podido ser aisladas a partir de plantas, moluscos, insectos y leguminosas.^{63, 64}

Los carbohidratos conocidos como ácidos siálicos (Neu5Ac), que comprenden más de 50 diferentes derivados del ácido N- Acetilneuramínico, son cetoácidos de nueve carbonos con diversidad estructural debida a sustituciones en los carbonos 4, 5, 7, 8 y 9, además de uniones de diferentes radicales en el carbono 2 aunado a la migración de grupos O-acetil.⁶⁵ Los precursores del Neu5Ac son el ManNAc o el GlcNAc.⁶⁶ El Neu5Ac presenta dos subtipos comunes que son el α 2,3,Neu5Ac y α 2,6,NeuAc. Estos carbohidratos generalmente se encuentran localizados en los extremos terminales de glicoproteínas y glicolípidos, presentes principalmente en

las membranas plasmáticas, con funciones relacionadas a la proliferación, diferenciación, adhesión, reconocimiento celular y carcinogénesis.^{67, 68} Las formas α 2,3,Neu5Ac y α 2,6,Neu5Ac son reconocidos por las lectinas *Maackia amurensis* (MAA) y *Sambucus nigra* (SNA) respectivamente. La lectina *Limulus polyphemus* (LPA), puede detectar ambos subtipos. El α 2,3,Neu5Ac se encuentra de manera normal en células del estrato basal epidérmico y de mucosa gástrica y, es considerado como componente esencial en moléculas de adhesión y reconocimiento celular, mientras que el α 2,6,Neu5Ac puede ser expresado únicamente en displasias severas y carcinomas.^{69, 70, 71}

La gran mayoría de las proteínas y lípidos de células eucariontes pueden estar sialiladas.⁷¹ La función de moléculas presentes en la superficie celular como integrinas, mucinas, lípidos (gangliósidos) y receptores de factores de crecimiento depende en gran medida de la presencia de estos carbohidratos.^{72, 73} Debido a la carga negativa y posición terminal de este carbohidrato se le considera como parte del sistema de inhibición de interacciones moleculares y celulares, lo cual es importante en procesos como la proliferación y migración. Así mismo, su localización externa los hace accesibles a células y moléculas de señalización, facilitando una rápida respuesta a cambios en el medio ambiente.⁶⁷

Raval *et al.* y Rajpura *et al.* mostraron que los niveles de ácidos siálicos puede cambiar ante la presencia de una neoplasia. Demostraron que los pacientes con CCEO presentaban mayor cantidad de ácidos siálicos libres y unidos a lípidos en suero comparada con pacientes sanos o con lesiones premalignas.^{74, 75}

Las glicoproteínas receptoras erbB cuentan con una amplia cantidad de carbohidratos tales como manosa, N-GlcAc, N-GalAc y Neu5Ac.⁷⁶ El análisis de Neu5Ac ha mostrado su participación en funciones tales como el plegamiento y maduración de receptores, su traslocación a membrana plasmática, interacciones celulares proteína-proteína o carbohidrato-carbohidrato y proliferación celular.^{77, 78,}

79, 80

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CCEO representa un problema de salud mundial debido a que la supervivencia es menor al 50% de los casos diagnosticados. El curso clínico de cada paciente es diverso, no obstante la presencia de características histológicas en común. Algunas investigaciones han tratado de determinar la relación entre el grado de diferenciación, la agresividad y el comportamiento biológico del CCEO. Diversos estudios sobre moléculas reguladoras del ciclo celular, supresores de tumores u factores de crecimiento y carbohidratos han sido realizados en diferentes neoplasias, tratando de encontrar su asociación con alguna etapa o característica del proceso de carcinogénesis oral. La asociación en el patrón de expresión de proteínas involucradas en la proliferación celular como los receptores de factores de crecimiento epidérmico y los ácidos sialicos importantes para la adhesión y migración celular, con parámetros histológicos que definan el grado de diferenciación del CCEO, podrían auxiliar en el establecimiento de un fenotipo que guíe mas clara y certeramente en el diagnóstico y posible comportamiento de la lesión.

5. JUSTIFICACION DEL PROBLEMA

Las investigaciones sobre la expresión de los receptores erbB1 y erbB2 han demostrado su participación importante durante la carcinogénesis oral. Las alteraciones en la expresión de estos receptores se han asociado con características como el tamaño tumoral, el proceso de invasión, metástasis y la respuesta al tratamiento. Bergler demostró que la afinidad al ligando del receptor erbB1 y capacidad de proliferación de las células tumorales *in vitro* dependía del nivel de sialilación.⁷³ Los cambios en la expresión de ácidos siálicos se han observado en carcinomas de colon, pulmonares, cervicouterino y mama tratando de determinar cuál es su papel en la conducta de la neoplasia, no obstante no se ha determinado cual es su relación con parámetros histológicos.^{81, 82, 83, 84} Los estudios de Raval et al. y Rajpura et al. demostraron que el nivel de ácidos siálicos en suero de pacientes con CCEO presentaban relación con el grado de malignidad. La correlación en el nivel de expresión de ácidos siálicos y, erbB1 y erbB2 en biopsias de CCEO nos guiará en la determinación de un fenotipo celular en los diferentes grados de diferenciación en conjunción con parámetros histológicos. Así mismo nos permitirá obtener un mayor entendimiento sobre la relación de estas moléculas con la supervivencia de los pacientes con CCEO.

6. HIPOTESIS

El grado de diferenciación histológica y la supervivencia de pacientes diagnosticados con CCEO estarán relacionados con cambios en la expresión de receptores para factores de crecimiento epidérmico (erbB1 y erbB2) y el patrón de expresión de ácidos siálicos (Neu5Ac y α 2,3,Neu5Ac).

7. OBJETIVO GENERAL

Determinar la correlación de la expresión de erbB1, erbB2, Neu5Ac y α 2,3,Neu5Ac con el grado de diferenciación y supervivencia de pacientes con CCEO.

7.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar la relación de seis parámetros histopatológicos con el grado de diferenciación histológica y supervivencia de pacientes diagnosticados con CCEO.

Determinar el patrón de expresión de los receptores erbB1, erbB2, Neu5Ac y α 2,3,Neu5Ac y su correlación con los diferentes grados de diferenciación histológica y supervivencia de pacientes diagnosticados con CCEO.

Determinar el patrón de colocalización de las cuatro moléculas y su correlación con los diferentes grados de diferenciación histológica y supervivencia de pacientes diagnosticados con CCEO.

8. TIPO DE ESTUDIO

Descriptivo, retrospectivo y longitudinal.

9. UNIVERSO O POBLACION

Diez muestras de mucosa sana obtenida de pacientes atendidos en el servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de odontología, UNAM.

Cincuenta y dos muestras obtenidas por medio de biopsias de pacientes con CCEO primario que se presentaron a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, UNAM y Servicio de Oncológica del Hospital General de México.

10. MATERIALES Y METODOS

Material y reactivos

Micropipetas ajustables (Eppendorf)

- 0.1-2.5
- 2 - 20 μ l
- 10 - 100 μ l
- 100 - 1000 μ l

Carrusel para micropipetas

Puntas para micropipetas (Cole Parmer)

- Volumen 2.5 μ l
- Volumen 20 μ l
- Volumen 200 μ l
- Volumen 1000 μ l

Tubo microcentrifuga 2.0 ml (Eppendorf safe lock)

Portaobjetos (Rounden-corner Slides)

Aceite de inmersión

3-(Trimethoxysilyl)propyl methacrylate (Sigma)

Cajas de Poliestireno para 100 preparaciones

Vasos de precipitado

- 25 ml
- 50 ml
- 100 ml

Matraces Elenmeyer

Vasos Koplín

Probetas

- Volumen 100 ml
- Volumen 250 ml
- Volumen 1000 ml

Microscopio de fluorescencia Leica DMLS (Leica, Benheim, Germany)

Camara Olympus C-3040 (Tokyo Japon)

Camara Leica DFC 300FX (Leica, Benheim, Germany)

Anticuerpos

- erbB1 (rabbit polyclonal, sc-03 Santa Cruz, CA)
- erbB-2 (Mouse monoclonal, sc-7301, Santa Cruz, CA)

Lectinas

- *Limulus polyphemus agglutinin* (LPA, Neu5Ac, E-Y Laboratories, San Mateo, CA).
- *Maackia amurensis agglutinin* (MAA, Neu5Ac α 2,3Gal, E-Y Laboratories, San Mateo, CA).

Universal multilink, DakoCytomation LSAB+System-HRP (Dako Noth America, Inc, Carpinteria, CA).

DAB+substrate Chromogen System, DakoCytomation (Dako Noth America, Inc, Carpinteria, CA).

Estreptavidina Peroxidasas (Sigma St Louis, MO).

Resina hidrofóbica Entellan (Merck, Darmstadt, Alemania).

Antimouse-Rodamina (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)

Antirabbit-Rodamina (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)

Extravidin-FITC (Sigma St Louis, MO).

Vectashield+DAPI Mounting Medium for fluorescence (Vector laboratories, Inc. Burlingame, CA).

Barniz sellador

Lápiz hidrofóbico (Dako Cytomation Pen)

Obtención de muestras

Se obtuvieron 10 muestras de mucosa sana retromolar de pacientes sometidos a procedimientos de extracción de terceros molares que asistieron a la clínica de Cirugía Maxilofacial de la División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPeI), FO, UNAM.

Cuarenta y un muestras fueron obtenidas del archivo de Patología Bucal de la DEPeI del periodo 1997-2005, cuatro muestras fueron proporcionadas por los acervos del servicio de Oncológica del Hospital General de México y siete muestras fueron obtenidas de pacientes que se presentaron al laboratorio de

Inmunología de la DEPEI en el periodo 2004-2008. Todas las muestras fueron de pacientes con diagnóstico histopatológico de CCEO primario, sin quimio y/o radioterapia que contaran con datos clínicos sobre el seguimiento y evolución del paciente.

La obtención de muestras fue bajo la autorización del paciente firmando un consentimiento informado. Las muestras del Departamento de Patología Bucal fueron proporcionadas por la Dra Elba Rosa Leyva Huerta y Dr. Luis Alberto Gaitan Cepeda. Las muestras del Hospital General de México fueron obtenidas gracias a la colaboración del Dr. Enrique Echevarría y Pérez.

Metodología

Análisis Histopatológico

Todas las muestras fueron procesadas de manera convencional para su inclusión en parafina. Se realizaron cortes seriados de 4µm y se efectuó una tinción con Hematoxilina y Eosina para realizar la gradificación histológica de los CCEO según los parámetros de OMS. Se realizó la medición de seis parámetros histopatológicos (profundidad, pleomorfismo, número de mitosis, patrón invasivo, infiltrado linfocitario y queratinización). El análisis histopatológico y la gradificación fue realizado por dos patólogos bucales según los parámetros de la OMS:

- CCEO Bien Diferenciado. Conserva la función de producción de numerosas perlas de queratina, importante queratinización individual con puentes intercelulares, menos de dos mitosis por campo histológico, raras mitosis atípicas y escasas células multinucleadas con pleomorfismo celular y nuclear reducido.²⁵
- CCEO Moderadamente Diferenciado. Son neoplasia con escasas perlas de queratina y escasa queratinización individual, dos a cuatro mitosis por campo histológico, algunas mitosis atípicas, moderado pleomorfismo celular y nuclear, sin embargo, todavía es reconocible cierta arquitectura epitelial.²⁵
- CCEO Pobremente Diferenciado. Perlas de queratina es inexistente con presencia de queratinización individual, existen mas de cinco mitosis por

campo histológico, con frecuente mitosis atípicas, pleomorfismo celular y nuclear pronunciado y frecuentes células multinucleadas.²⁵

Los seis parámetros histológicos fueron medidos de la siguiente forma:

1.- Determinación de la profundidad. Se realizó en una magnificación a 10x gratificando de la siguiente manera:

- Grado 1. Neoplasia confinada al epitelio, carcinoma *in situ* o cuestionable invasión.
- Grado 2. Invasión que afecta claramente la lámina propia.
- Grado 3. Invasión por debajo de la lámina propia. Células neoplásicas adyacentes a músculo, glándulas salivales y/o periostio.
- Grado 4. Invasión a través del hueso o invasión profunda de planos musculares.

2.- Determinación de pleomorfismo nuclear. Se utilizaron cinco campos visuales de 40x donde se determinó el porcentaje de las células pleomórficas por medio de un promedio asignando un grado:

- Grado 1. Representa una población de células con poco pleomorfismo nuclear o celular (25%), en una población relativamente homogénea. Más del 75% de las células neoplásicas presentan maduración.
- Grado 2. Las células neoplásicas muestran moderado pleomorfismo nuclear (25-50%). Entre 50 y 75% de las células malignas indican maduración.
- Grado 3. Corresponde a una población de células con abundante pleomorfismo nuclear (50-75%). Entre 25 a 50% de la población de células neoplásicas denotan maduración.
- Grado 4. Hay notorio pleomorfismo nuclear (75%). Solo hay entre menos de 25% de células maduras.

3.- Determinación del número de mitosis. Se utilizaron cinco campos visuales a 40x donde se cuantificaron las células mitóticas realizando un promedio asignando un grado:

- Grado 1. Cero a una mitosis por campo.
- Grado 2. Dos a tres mitosis.
- Grado 3. Cuatro a cinco mitosis.

- Grado cuatro. Más de seis mitosis.

4.- Determinación de tipo de invasión. Se observó la longitud total de la lesión en un campo visual de 10x para determinar las características infiltrativas del tumor según la siguiente gradificación.

- Grado 1. Neoplasia compuesta de áreas sólidas o mantos de células neoplásicas con bordes definidos o de tipo “empujante”.
- Grado 2. Neoplasia con infiltración en cordones sólidos, bandas o “listones”.
- Grado 3. Grupos pequeños de células o cordones delgados, que infiltran el estroma. El número de células en cada grupo debe ser mayor a 15 células.
- Grado 4. Neoplasia con marcada invasión, con células que infiltran de manera individual, o en grupos menores de 15 células.

5.- Determinación del infiltrado linfocitario. Se observó la longitud total de la lesión en un campo visual de 10x determinando la proporción de agregado linfocitario asignando un grado:

- Grado 1. Infiltrado intenso de linfocitos y/o células plasmáticas, en estrecha relación con células neoplásicas.
- Grado 2. Infiltrado moderado.
- Grado 3. Infiltrado escaso.
- Grado 4. Nulo.

6.- Determinación del grado de queratinización. Se observó la longitud total de la lesión en un campo visual de 10x asignando un grado:

- Grado 1. Se trata de neoplasias altamente queratinizantes, donde más de 50% de células neoplásicas muestran queratinización.
- Grado 2. Neoplasias moderadamente diferenciadas, de las cuales 20 a 50% de sus células muestran queratinización.
- Grado 3. Mínima queratinización, donde 5 a 20% de células neoplásicas presentan queratinización.

- Grado 4. Mínima a nula queratinización. La población celular neoplásica muestra poca o nula queratinización individual.

Se realizó el análisis estadístico de correlación de Pearson para determinar la significancia de cada parámetro respecto al grado de diferenciación según la OMS, así mismo como el análisis de regresión de Cox para determinar su relación con la supervivencia.

Pruebas inmunohistoquímicas

El desparafinado y rehidratación de los cortes del tejido fue realizado de manera convencional a través de baños en xilol y alcohol a diferentes concentraciones. Se realizaron tres lavados en PBS 1x pH 7.2. Posteriormente se realizó la recuperación antigénica a través de la inmersión de las muestras en buffer de citratos 1mM en ebullición. Se realizaron tres lavados con PBS y posteriormente el bloqueo de la actividad de peroxidasa endógena durante 10 minutos en peróxido de hidrogeno al 3%. Se realizaron tres lavados en PBS y se incubó dentro de una cámara húmeda con PBS-Albúmina 0.2% durante 20 minutos. Se delimitó la muestra con un lápiz hidrofóbico. Las muestras fueron lavadas en PBS. Posteriormente se colocó PBS 1x-Triton 0.2% por 10 minutos y se lavó con PBS. Las muestras fueron incubadas durante toda la noche con el anticuerpo primario (anti-erbB1 y anti-erbB2, dilución 1:100) a 4°C. Se realizaron lavados con PBS y se incubó en cámara húmeda con el anticuerpo secundario sistema multilink (DakoCytomation) durante 30 minutos, se lavó en PBS y se incubó durante 30 minutos con estreptavidina+HRP. Se realizó el revelado de la reacción con solución de 3'3' diaminobencidina (DAB) contratiñendo las muestras con hematoxilina de Harris y montando las muestras con resina hidrofóbica. Se realizó la interpretación Inmunohistoquímica (IHQ) y el análisis estadístico.

Pruebas histoquímicas

El desparafinado y rehidratación se realizó como ya fue mencionado. Se realizaron lavados en PBS. Se bloqueó la actividad de peroxidasa endógena por 10 minutos

con peróxido de hidrogeno al 3%. Se lavó con PBS y colocó durante 10 minutos en PBS 1x-Triton al 0.2%. Las muestras fueron incubadas con la PBS Ca^{2+} -lectina (dilución 1:50, LPA y MAA) durante dos horas a 37°C con 5% de CO_2 . Se lavó con PBS Ca^{2+} e incubó durante 1 hora a 37° con estreptavidina-peroxidasa, se lavó con PBS Ca^{2+} , se realizo el revelado con DAB, se contratiño con hematoxilina de Harris montando las muestras con resina hidrofóbica. Se realizo la interpretación histoquímica y el análisis estadístico.

Co-Immuno-histoquimioexpresión

El desparafinado, rehidratación, recuperación antigénica, incubación con PBS-Albúmina 0.2% e inmersión en PBS 1x-Triton 0.2% fue realizada como ya fue mencionado en la técnica de Inmunohistoquímica. Posteriormente se incubó a 37°C durante 2 horas con las lectinas LPA y MAA, se lavó con PBS Ca^{2+} , las muestras fueron llevadas al cuarto oscuro donde se colocó extravidin-FITC incubando a 37°C durante 1 hora, se lavo en PBS Ca^{2+} . Posteriormente se incubo las muestras a 37°C con 5% de CO_2 durante dos horas con el anticuerpo primario anti-erbB1 o anti-erbB2 (1:50), se lavo con PBS, posteriormente se incubo a 37°C con 5% de CO_2 durante 30' con el anticuerpo secundario (1:50) conjugado con rodamina. Se colocó el medio de montaje Vectashiel-DAPI y cubreobjetos sellando las orillas con barniz. Se determinaron las siguientes coexpresiones: erbB1- α 2,3 Neu5Ac; erbB1-Neu5Ac; erbB2- α 2,3 Neu5Ac y erbB2-Neu5Ac.

Se realizo la interpretación Inmunohistoquímica de las coexpresiones y el análisis estadístico.

Observación y análisis de las muestras.

Las muestras fueron analizadas con la ayuda de los microscopios Olympus BX-40 y Leica DMLS equipado con un sistema de fluorescencia. Las imágenes fueron capturadas con la cámara Olympus C-3040 y Leica DFC 300FX.

La interpretación de la inmunoexpresión por peroxidasa fue realizada a través del objetivo de 40x obteniendo microfotografías de 5 campos ópticos 200 x 200 μm , el análisis cualitativo y cuantitativo fue realizado a través de una rejilla armónica que

dividió cada campo óptico en 16 partes iguales (25 x 25 µm). Para considerar una muestra como positiva se debía de cumplir con más del 20% del área en tres campos ópticos diferentes. Las muestras de IHQ por peroxidasa consideradas como positivas fueron gratificadas en tres: leve (+), moderado (++) y elevado (+++), además de determinar la zona de expresión preferencial: citoplasma, membrana o ambos. La colocalización fue determinada por medio del programa Leica IM1000 que realizó el traslape para determinar cada muestra como positiva (+) o negativo (-).

11. RECURSOS

Humanos

Dos Patólogos Bucales

Asesor en inmunohistoquímica

Asesor en inmunofluorescencia

Físicos

- Laboratorio de Inmunología de División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Laboratorio de Enfermedades Neurodegenerativas. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” .

12. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Muestras con diagnóstico histológico de CCEO

Muestras de CCEO primario

13. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Muestras de las que no se tengan datos del paciente tal como edad, sexo y zona anatómica.

Muestras pequeñas menores a 5 mm.

Muestras de CCEO recurrentes o secundarios.

Muestras de pacientes que hayan recibido radioterapia y/o quimioterapia.

14. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Muestras que resulten dañadas durante el proceso de inmunohistoquímica.

15. VARIABLES INDEPENDIENTES

Grado de diferenciación tumoral.

Tiempo de supervivencia total de los pacientes.

Zona anatómica.

Edad

Sexo

16. VARIABLES DEPENDIENTES

Grado de expresión de factores de crecimiento epidermal.

Grado de expresión del patrón ácidos sialicos.

Coexpresión de factores de crecimiento epidermal y ácidos sialicos.

17. METODO PARA PROCESAMIENTO DE DATOS

Los datos fueron agrupados en una tabla donde se registraron datos tales como la edad, sexo, zona anatómica, grado de diferenciación histológica, supervivencia del paciente, nivel y zona de expresión de las cuatro moléculas de forma separada y la coexpresión positiva de las cuatro moléculas.

18. ANALISIS ESTADISTICO DE DATOS

De los resultados obtenidos se realizo pruebas de tendencia central y dispersión, análisis de correlación de Pearson, análisis de supervivencia total Kaplan Meir (Log Rank) y análisis multivariado de Cox (-2 Log) utilizando el programa SPSS 10.0.

19. RESULTADOS

De los 52 pacientes, el 55.8% (23) fueron mujeres y el 44.2% (29) hombres; el promedio de edad fue 61.39 (\pm 18.61) años. Referente a la zona anatómica trece casos se presentaron en lengua, 4 en piso de boca, 7 en paladar, 9 en encía, 7 en mucosa yugal y 12 en otros sitios mucosa bucal. (Tabla 1)

Al realizar la gradificación histológica en base a los parámetros de la OMS se obtuvieron 17 casos de CCEO bien diferenciados, 25 moderadamente diferenciados y 10 pobremente diferenciados. Los CCEO bien diferenciados presentaron las características histológicas propias de su gradificación al presentar gran cantidad de perlas de queratina, con rara presencia de mitosis y atípicas celulares. Los CCEO moderadamente mostraron menor grado de queratinización, presentado mayor atípica celular. Los CCEO pobremente diferenciados presentaron mayor pleomorfismo celular y nuclear, menor cohesividad.

19.1 Análisis Histopatológico

Se determinaron seis parámetros histológicos de cada carcinoma y fueron agrupados en relación a su grado de diferenciación. El parámetro *infiltrado linfocitario* mostró un patrón proporcional al grado de diferenciación. *Pleomorfismo*, *número de mitosis*, *patrón de invasión* y *queratinización* mostraron una conducta similar, no así con el parámetro *profundidad* en el que no se observó cambios importantes (Tabla 2). El análisis estadístico de correlación de los seis parámetros histopatológico en base al grado de diferenciación mostró significancia estadística en los parámetros *grado de queratinización* y *pleomorfismo nuclear* ($p=0.046$ y $p=0.015$ respectivamente). Los otros cuatro parámetros no mostraron significancia estadística. El análisis de Cox mostró significancia en tres parámetros que fueron *infiltrado linfocitario* ($p=0.016$), *pleomorfismo* ($p=0.046$) y *profundidad de invasión* ($p=0.039$).

19.2 Análisis inmunohistoquímico

Mucosa sana

La determinación IHQ de la expresión de las cuatro moléculas de forma individual fueron los siguientes: erbB1 fue constitutivo en el 100% de las muestras analizadas presentado un grado elevado de inmunoexpresión en células del estrato basal y espinoso (Fig.3 a, b) a nivel de citoplasma y membrana. La inmunoexpresión de erbB2 fue menor que erbB1, solo se expresó en el 30% de las muestras a nivel de membrana celular en los estratos granuloso y córneo (Fig.3 c, d). El patrón de expresión de Neu5Ac fue leve a moderado en el 70% de las muestras positivas, preferentemente en el estrato córneo a nivel de citoplasma (Fig.3 e, f). El α 2,3,Neu5Ac se presentó en el 40% de las muestras (Fig.3 g, h). La expresión fue moderada a nivel de membrana celular en estratos espinoso, granular y córneo, no así en el estrato basal que fue leve a nivel de citoplasma (Tabla 4).

CCEO

En el análisis inmunohistoquímico los CCEO bien diferenciados presentaron expresión de erbB1 y erbB2 predominantemente en membrana plasmática, con 64% y 65% respectivamente y baja expresión a nivel de citoplasma con 24% y 29% de las muestras respectivamente (fig. 4 a-d). La expresión de Neu5Ac fue leve a moderada, mostrando expresión tanto en tejido conectivo al igual que en los islotes epiteliales invasores, predominando ligeramente a nivel de membrana celular en un 53% (fig. 4 e, f). La expresión de α 2,3,Neu5Ac fue similar a Neu5Ac, sin embargo la periferia de las islas invasoras presentaron mayor expresión a nivel de membrana plasmática (fig. 4 g, h).

Los CCEO moderadamente diferenciados expresaron erbB1 de forma leve a moderada preferentemente en citoplasma en el 60% de los casos (Fig 5 a, b). erbB2 mostró positividad moderada a nivel de membrana plasmática en el 56% de las muestras analizadas (Fig. 5 c, d). La expresión de Neu5Ac fue de leve a moderada, los islotes epiteliales invasores presentaron expresión a nivel membrana preferentemente (Fig. 5 e, f). La expresión de α 2,3,Neu5Ac fue moderada localizada citoplasmáticamente (Fig. 5 g, h).

Los CCEO pobremente diferenciados presentaron expresión leve a nivel citoplasma para erbB1 en el 70% de las muestras (Fig. 6 a, b). erbB2 mostró una mayor intensidad de expresión comparado con erbB1. Esta expresión varió de moderada a elevada a nivel de membrana. Los islotes invasores de mayor profundidad fueron los que presentaron positividad mas elevada (Fig. 6 c, d). La expresión de los ácidos sialicos fue variada. Neu5Ac fue leve a modera a nivel de citoplasma en el 70% de las muestras consideradas positivas (Fig. 6 e, f), mientras que α 2,3,Neu5Ac se expreso de forma moderada a intensa. El sitio de expresión predominante fue membrana celular con 50% de las muestras (Fig. 6 g, h).

El análisis estadístico de Pearson para establecer la correlación entre el nivel y sitio de expresión con el grado de diferenciación indico que erbB1 y Neu5Ac presentaron significancia estadística entre el grado de diferenciación y el nivel de expresión ($p=0.035$ y $p=0.038$ respectivamente), mientras que α 2,3,Neu5Ac y erbB2 presentaron significancia estadística entre el sitio y el nivel de expresión ($p=0.013$ y $p=0.041$ respectivamente). El análisis log-rank no mostró significancia estadística entre el sitio de expresión y la supervivencia (Fig. 7). De igual forma el análisis de Cox no presento significancia estadística al correlacionar edad, sexo, grado histológico y sitio de expresión inmunohistoquímica con la supervivencia de los pacientes.

19.3 Análisis de co-inmunohistoquimioexpresión

Al determinar la coexpresión de las 4 moléculas se encontraron los siguientes resultados.

La colocalización en mucosa sana (Fig. 8) para erbB1-Neu5Ac se presento en menor medida, solo 60% de las muestras colocalizaron. erbB1- α 2,3,Neu5Ac fue del 20% de las muestras analizadas, presentándose en los estratos basal y espinoso preferentemente. Para erbB2- α 2,3,Neu5Ac y erbB2-Neu5Ac la expresión fue nula en todas las muestras analizadas (Tabla 4).

Los CCEO bien diferenciados presentaron positividad para erbB1-Neu5Ac fue positivo en 5 (47%) muestras analizadas. erbB1- α 2,3,Neu5Ac fue positivo en 4 (24%) muestras analizadas. erbB2-Neu5Ac en 7 (41%) muestras y erbB2- α 2,3,Neu5Ac mostró positividad en 6 (36%) (Fig. 9).

Los CCEO moderadamente diferenciados (Fig.10) presentaron positividad para erbB1-Neu5Ac en 9 (36%) casos, erbB1- α 2,3,Neu5Ac fue positivo en 7 (28%). erbB2-Neu5Ac presento positividad en 11 (44%) muestras y erbB2- α 2,3,Neu5Ac mostró positividad en 8 (32%).

Los CCEO pobremente diferenciados (Fig. 11) presentaron positividad para erbB1-Neu5Ac en 3 (30%) muestras, así como erbB1- α 2,3,Neu5Ac en 2 (20%). erbB2-Neu5Ac en el 5 (50%) erbB2- α 2,3,Neu5Ac mostraron positividad en 3 (30%) y.

El análisis de correlación de Pearson no encontró significancia entre las cuatro coexpresiones y el grado de diferenciación. En el análisis de supervivencia de Kaplan Meier (log rank) no se encontró significancia al comparar la coexpresión positiva con la supervivencia de los pacientes (Fig. 12).

El análisis de regresión de Cox de igual forma no mostró significancia al correlacionar la positividad de las cuatro coexpresiones con el sexo, edad, el grado de diferenciación y la supervivencia de los pacientes.

20. DISCUSIÓN

Diversas investigaciones han tratado de relacionar el grado de diferenciación histológica con la agresividad del tumor.^{12, 13, 16, 23, 25} Se ha sugerido que las formas bien diferenciadas son más benignas al producir menos metástasis ganglionares y/o recurrencias tumorales. Diferentes investigaciones han tratado de encontrar la relación de otros parámetros clínicos y socioculturales tales como la edad, género, tabaquismo, alcoholismo y estado buco-dental con parámetros histopatológicos tales como pleomorfismo nuclear, número de mitosis, grado de queratinización, patrón de invasión, estado de invasión tumoral e infiltrado linfoplasmocitario con la finalidad de mejorar el entendimiento sobre el CCEO. Broder en 1920 trató de encontrar esta relación, sin embargo, su sistema no presentaba correlación entre la gradificación y el pronóstico de los pacientes, debido principalmente a la heterogeneidad de la población celular de los CCEO.⁸⁵ Annroth y Bryne en 1987 y 1992, respectivamente mostraron una manera más efectiva de gradificar el CCEO, considerando además de la población celular de la neoplasia, la relación del tumor con el huésped, dando importancia al frente invasivo con lo cual se otorgaba un mejor pronóstico.^{86, 87}

En nuestro estudio se analizaron los seis parámetros histopatológicos utilizados por Annroth y Bryne y su relación con el grado de diferenciación. Los resultados indican que solo existió significancia en dos de los parámetros: pleomorfismo y grado de queratinización, lo cual concuerda con la gradificación de los CCEO utilizada por la OMS. Yuen y Simpson han mostrado que para poder otorgar un mejor valor a estos parámetros se debe considerar la utilización de campos ópticos predeterminados no aleatorios, sin embargo a pesar de esta consideración la heterogeneidad celular de un CCEO es determinante para la variabilidad.^{88, 89} Nuestro análisis de regresión de Cox para determinar la relación de los parámetros histológicos con la supervivencia de los pacientes, mostró significancia estadística en las variables: infiltrado linfocitario, pleomorfismo y profundidad de invasión. En relación a los resultados, diversos estudios han mostrado la importancia de estos parámetros en situaciones tales como la agresividad de la lesión y el estadio clínico de la neoplasia.^{26, 90, 91}

Gracias a los avances en la biología celular y molecular tumoral, se ha postulado que la presencia, ausencia o modificación de determinadas moléculas puede guiar para el establecimiento de un diagnóstico que auxilie en el establecimiento de un fenotipo y posible comportamiento de la neoplasia. Schliephake analizó diferentes estudios que postulaban a diversas moléculas involucradas en el crecimiento y supresión tumoral, angiogénesis y degradación de matriz extracelular como herramientas en la comprensión del cáncer. En su análisis, el receptor erbB se relacionó con los procesos de carcinogénesis y/o pronóstico del paciente.⁹² La amplia investigación sobre los receptores de la familia erbB ha demostrado que éstos se encuentran implicados en fenómenos de proliferación y diferenciación celular normal y, que la sobreexpresión, anomalías estructurales, coexpresión y heterodimerización de erbB1 y erbB2 están relacionadas con el proceso de transformación y metástasis del CCEO.³⁷⁻⁵⁶

Los resultados de nuestro análisis de 52 casos de CCEO mostraron que la expresión de erbB1 estaba relacionada con el grado de diferenciación puesto que su nivel de inmunexpresión disminuía conforme los CCEO perdían diferenciación. Así mismo, se modificó el sitio de expresión, es decir, que en los casos bien diferenciados la expresión fue predominante a nivel membrana plasmática, pero disminuía a media que incrementaba en citoplasma en los casos de CCEO pobremente diferenciados. Esto concuerda con los datos presentados por Hiraishi *et al.* y Maiorano *et al.* que mostraron que el grado y sitio de expresión de erbB1 en CCEO pobremente diferenciados presentaba modificaciones.^{93, 94} La función principal de erbB1 es inducir la activación de cinasas citoplasmáticas a través de la transducción de señales que comienzan a nivel de membrana plasmática al momento del reconocimiento ligando-receptor.³⁷⁻⁴⁰ Los cambios en el grado y sitio de expresión puede ser debido a la transformación maligna de los CCEO. Lin *et al.* y Hanada *et al.* demostraron que el receptor erbB1 puede traslocar de membrana hacia núcleo funcionando como un factor transcripcional de ciclina D1 y Myb-B, promoviendo la formación neoplásica.^{95, 96} En este sentido erbB2 es un receptor implicado principalmente en el proceso de embriogénesis y transformación celular.^{70, 78, 97} Una característica importante de este receptor es que no cuenta

con un ligando reconocido como los otros miembros de la familia, sin embargo, al formar heterodímeros con los otros tres receptores, su señalización puede ser mas intensa respecto a la cantidad de cinasas activadas.^{36, 38} La inmunoexpresión de erbB2 en nuestro estudio fue constante en los tres grados de diferenciación, predominando en membrana plasmática, lo cual sugiere su posible participación en la señalización y proliferación celular. Fong demostró que este receptor expresa escasamente en mucosa sana y que en CCEO su expresión se elevaba significativamente.⁹⁸ La presencia de este receptor a nivel de membrana puede estar involucrada en la activación de otras moléculas que no solo favorezcan la proliferación, sino que además le permitan a la célula neoplásica invadir y producir metástasis o incluso evadir mecanismos de inmunovigilancia, tal como lo demostró Silva *et al.*⁹⁹ La correlación en la expresión de moléculas implicadas en fenómenos aparentemente no relacionados apoya la teoría de un proceso de carcinogénesis como fenómeno múltiple y complejo donde diversos mecanismos participan de manera individual o sinérgica.

En la transformación maligna, también se encuentran modificaciones co- y post-traduccionales de las proteínas. La glicosilación y en particular la sialilación han mostrado una participación significativa en los procesos neoplásicos. Rajpura *et al.* han demostrado que los niveles de ácidos sialicos libres y unidos a lípidos presentes en suero de pacientes con cáncer oral, son significativamente altos comparado con los pacientes sanos. Nuestros resultados se relacionan con este dato en el sentido que la expresión de Neu5Ac a nivel de membrana celular aumentó en los CCEO pobremente diferenciados, comparado con los bien diferenciados. En el presente estudio, la determinación de la expresión de Neu5Ac sobre los CCEO resulta ser una estrategia de mayor especificidad al eliminar la estimación del Neu5Ac procedente de los eritrocitos en suero.¹⁰⁰ Actualmente se reconoce que el ácido siálico se encuentra relacionado con el proceso de invasión de células neoplásicas, debido a la hipersialilación de moléculas de adhesión intercelular como las integrinas.¹⁰¹ Diversos autores han postulado a los CCEO pobremente diferenciados como neoplasias más agresivas debido a su alto porcentaje de invasión, recurrencia y metástasis a linfonodos regionales y otros

órganos.^{17-23, 27, 28} Esta característica podría estar relacionada con la sobreexpresión de estos carbohidratos presentada por los CCEO analizados.

La expresión de ácidos sialicos específicos como $\alpha 2,3, \text{Neu5Ac}$ es una característica a considerar para la determinación de la conducta y diferenciación celular. Nuestros resultados concuerdan con la literatura, respecto a la expresión de este carbohidrato en células basales de mucosa, la cual decrece durante la maduración epitelial hacia el estrato córneo, donde se pierde su capacidad replicativa, propia de las células basales.⁷⁰ La determinación $\alpha 2,3, \text{Neu5Ac}$ en los CCEO analizados mostró expresión elevada a nivel de membrana plasmática del carbohidrato $\alpha 2,3, \text{Neu5Ac}$ en los tres grados de diferenciación, sugiriendo que las células neoplásicas presentan un perfil de expresión de carbohidratos similar al de células basales. Al considerar que las células normales del estrato basal son las únicas que presentan capacidad proliferativa y se encuentran en homeostasis con la membrana basal y tejido conjuntivo, las modificaciones de $\alpha 2,3, \text{Neu5Ac}$ encontradas en los CCEO podría imitar esta característica brindándoles las propiedades de proliferación y relación de homeostasis con el tejido conjuntivo.¹⁰²

La capacidad de proliferación epitelial depende de la activación de señales estimulantes al igual que la regulación de las señales de inhibición. Los receptores de factores crecimiento epidérmico son glicoproteínas que necesitan ser activadas por sus ligandos para inducir la proliferación celular. Sin embargo, cambios en su estructura proteica o glicosídica pueden modificar estas propiedades. Se ha reportado que el dominio extracelular de los receptores de la familia erbB cuenta con 10 a 11 y 7 sitios potenciales para la N-glicosilación en erbB1 y erbB2, respectivamente. Cada sitio puede ser ocupado por una cadena con tres o cuatro subcadenas de polisacáridos donde las porciones terminales pueden ser ácidos sialicos.¹⁰³ Estos carbohidratos representan del 24% al 59% del total de carbohidratos contenidos en el receptor.¹⁰⁴

Nuestros resultados mostraron que en mucosa sana la colocalización de erbB1-Neu5Ac y erbB1- $\alpha 2,3, \text{Neu5Ac}$ se localizó en los estratos basal y espinoso, sin evidencia en estratos superiores. Correlacionando esta característica y

considerando lo demostrado por Holikova *et al.* la coexpresión de erbB1- α 2,3,Neu5Ac puede ser una característica indicativa del potencial proliferativo.

Un resultado interesante fue la coexpresión negativa de erbB2-Neu5Ac y erbB2- α 2,3,Neu5Ac en mucosas sanas, característica que fue positiva en los tres grados de diferenciación de los CCEO. Esto se fundamenta en el hecho de que erbB2 es considerado como un receptor que sólo se expresa en procesos de transformación maligna, incluso en estadios tempranos de transformación, como en el caso de las displasias epiteliales.⁹⁸ Esta coexpresión puede ser considerado como una característica propia del CCEO. No obstante, sería interesante el determinar el perfil de expresión de estas moléculas en lesiones premalignas.

Diversos estudios han tratado de establecer la asociación de erbB con el tiempo libre de enfermedad o la supervivencia de un paciente con cáncer bucal, encontrando resultados diferentes y contrastantes.^{105, 106, 107, 108} En nuestro estudio no encontramos correlación estadística entre la expresión de las cuatro moléculas analizadas con el tiempo de supervivencia de los paciente. Xia *et al.* demostraron que de manera individual los miembros de la familia erbB pueden ayudar en el pronóstico de un paciente con CCEO, mostrando que el erbB2 presentaba mayor significancia, seguido por erbB4, erbB 3 y erbB 1, y que en conjunto, la combinación erbB2-3 era de mayor significancia. En este estudio solo se comprobó la expresión de erbB1 y erbB2. Al observar las curvas de supervivencia los pacientes que expresaban erbB1 y 2 en membrana celular éstos tuvieron mayor probabilidad de supervivencia que los que expresaban en citoplasma. Sin embargo estas comparaciones no fueron significativas, lo que sigue la importancia de utilizar otros parámetros como la invasión a linfonodos, metástasis o recurrencias en relación a la supervivencia.

De igual forma, la coexpresión de Neu5Ac y α 2,3,Neu5Ac con erbB1 y erbB2 no mostró significancia respecto a la supervivencia de los pacientes. Esto sigue la búsqueda de otras moléculas candidatas que vayan en relación con invasión a linfonodos, metástasis o recurrencias. Se ha demostrado que integrinas, mucinas, gangliósidos y esfingolípidos son capaces de modular la señalización esencial para el crecimiento, invasión y metástasis de células tumorales.^{72, 73, 81} La

búsqueda de marcadores sialilados que nos brinden mayor información sobre el fenotipo del CCEO brindará la posibilidad de aclarar su participación en el proceso de carcinogénesis y progresión del CCEO.

21. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos podemos concluir que los parámetros histológicos *pleomorfismo* y *grado de queratinización* se encuentran relacionados con el grado de diferenciación. De igual forma *pleomorfismo*, *profundidad de invasión* y *infiltrado linfocitario* son importantes en la supervivencia de los pacientes, lo cual sugiere su importancia para la determinación de la relación neoplasia-huésped. Por otra parte, la expresión de erbB1 y Neu5Ac fue dependiente del grado de diferenciación. La elevada expresión de erbB2 y α 2,3,Neu5Ac en la membrana celular de CCEO pobremente diferenciados podría estar relacionada con el alto grado de displasia y malignidad. En este sentido se mostró que la colocalización de erbB2 y ácidos sialicos en los tres diferentes grados de diferenciación es una propiedad característica de los CCEO y no de la mucosa sana. No obstante, sería interesante determinar el perfil de expresión de estas moléculas en lesiones premalignas. La expresión individual o conjunta de las cuatro moléculas no mostró correlación con la supervivencia de los pacientes, lo que reafirma la necesidad de ampliar la búsqueda de otras moléculas candidatas que puedan aportar mayor información relacionada a esta área de la oncología oral. Se sugiere profundizar en el estudio de moléculas como los erbB, integrinas, mucinas, gangliosidos y esfingolipidos que han mostrado relación con la invasión a linfonodos y que en el caso de los CCEO es una característica importante en el proceso de supervivencia.

22. BIBLIOGRAFIA

- 1 BARNES L, Evenson JW, Rihad D, Sidransky D. Pathology and genetic of Head and neck tumours. WHO. 2005. Chapter 4. Tumours of the oral cavity and oropharinx; 168-175.
- 2 PAKIN DM, Bray F, Pisani P. Global cancer staitics, 2002. CA Cancer J Clin. 2005; 55: 2-74.
- 3 Secretaria de Salud/Dirección General de Epidemiología/Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas/2001.
- 4 Sistema Epidemiológico y Estadístico de Defunciones (SEED)/Dirección General de Epidemiológica/Secretaria de Salud/2001.
- 5 O-CHAROENRAT P, Pillai G, Oatel S, Fisher C, Archer D, Eccles S, et al. Tumor thickness predicts cervical nodal metastases and survival in early oral tongue cancer. Oral Oncol. 2003; 39:386-90.
- 6 BUENO-CARDOSO A, Gutierrez-Salinas J, Morales-Gonzalez JA. El consumo de etanol incrementa los riegos de cáncer bucal. Med Int Mex. 2004;20:221-6.
- 7 LEITE ICG, Koifman S. Survival analysis in a simple of cancer patients at a reference hospital in Rio de Janeiro, Brazil. Oral Oncol. 1998;34:347-52.
- 8 GILLISON ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, *et al.* Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. J Natl Cancer Inst. 2000;92: 709-20.
- 9 SCHEPMAN KP, Van der Waal I. A proposal for classification and staging system for oral leukoplakia: a preliminary study. Oral Oncol Eur J Cancer. 1995;31B:396-8.
- 10 NEVILLE BW, Day TA. Oral Cancer and Precancerous Lesions. CA Cancer J Clin. 2002;52:195-215.
- 11 KRAMER IR, Lucas RB, Pindborg JJ. WHO Collaborating Center for Oral Precancerous Lesion. Definition of Leukoplakia and related lesions: An aid to studies on oral precancer. Oral Med Oral Pathol. 1978;46:518-39.
- 12 REICHART PA, Philipsen HS. Oral erythroplakia-a review. Oral Oncology. 2005;41:551-61.

-
- 13 DONOHUÉ CA, Leyva ER, Ponce S, Aldape B, Quezada D, Borges A. Distribución de condiciones y lesiones de la mucosa bucal en pacientes adultos mexicanos, Ver. Cubana Estomatol. 2007; 45 (1), on-line: http://bvs.sld.cu/revistas/est/vol44_1_07/est01107.html
- 14 YUSUF H, Yong SL. Oral submucous fibrosis in a 12-year-old Bangladeshi boy: a case report and review of literature. *Int J Paediatr Dent.* 2002;12:271–6.
- 15 DAS BR, Nagpal JK. Understanding the biology of oral cancer. *Med Sci Monit.* 2002;8(11):RA258-67.
- 16 MASHBERG A, Samit A. Early diagnosis of asymptomatic oral and oropharyngeal squamous cancers. *CA Cancer J Clin.* 1995; 45: 328-351.
- 17 KERDPON D, Sirlung H. Factors related to advanced stage oral squamous cell carcinoma in souther Thailand. *Oral Oncology.* 2001; 37: 216-21.
- 18 RAHIMA B, Shingaki S, Nagata M, Saito C. Prognostic significance of perineural invasion in oral and oropharyngeal carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 97:423-31.
- 19 MCGREGOR AD, MacDonald DG. Routes of entry of squamous cell carcinoma to the mandible. *Head Neck Surg.* 1988; 10: 294-301.
- 20 MCGREGOR AD, MacDonald DG. Patterns of spread of squamous cell carcinoma within the mandible. *Head Neck.* 1989; 11: 457-461.
- 21 COSTA ALL, Araujo-Junior RF, Ramos CCF. Correlation between TNM classification and malignancy histological features of oral squamous cell carcinoma. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2005; 71(2): 181-7.
- 22 NOMURA T, Shibahara T, Cui NH, Noma H. Patterns of mandibular invasion by gingival squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63(10):1489-93.
- 23 WAHI PM. Tipos histológicos de tumores orales y orofaríngeos. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 1971.
- 24 MENESES AG. Mosqueda-Taylor, Ruiz-Godoy LM. Patología quirúrgica de cabeza y cuello. México, Trillas, 2006.
- 25 JING J, Li L, He W, Sun G. Prognostic predictors of squamous cell carcinoma of the buccal mucosa with negative surgical margins. *J Oral Maxillofac Surg.* 2006;64(6):896-901.

-
- 26 WARBURTON G, Nikitakis NG, Roberson P, Marinos NJ, Wu T, Sauk JJ Jr, *et al.* Histopathological and lymphangiogenic parameters in relation to lymph node metastasis in early stage oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65(3):475-84.
- 27 TIMAR J, Csuka O, Remenar E, Repassy G, Kasler M. Progression of head and neck squamous cell cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 2005; 24: 107-27.
- 28 SICILIA S, López JD, Gutiérrez MA, Capitán LM, Labrot I, Castillo S, *et al.* Profundidad tumoral y variables histopatológicas en el carcinoma epidermoide lingual. Estudio retrospectivo sobre 60 pacientes. *Avances en odontoestomatología.* 2005; 21(5):241-9.
- 29 KEARSLEY JH, Thomas S. Prognostic markers in cancers of the head and neck region. *Anticancer Drugs.* 1993; 4: 419-29.
- 30 ROLAND NJ, Caslin AW, Nash J, Stell PM. Value of grading squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck.* 1992; 14: 224-229.
- 31 LUDWING JA, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nature Rev.* 2005;5:845-56.
- 32 PETO J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature.* 2001;411(6835):390-5.
- 33 HANAHAN D, Weinberg R. The Hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100: 57–70.
- 34 SIDRANSKY D. Molecular genetics of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol.* 1995;7:229-33.
- 35 FIELD JK. The role of oncogen and tumor supperessor genes in the aetiology of oral, head and neck squamous cell carcinoma. *J R Soc Med.* 1995; 88: 35-9.
- 36 TOOD R, Chou MY, Matossian K, Gallagher GT, Donoff RB, Wong DT. Cellular source of transforming growth factor-alpha in human oral cancer. *J Dent Res.* 1991;70:917-23.
- 37 KUTTAN NA, Bhakthan NM. Epidermal growth factor receptor (EGFR) in oral squamous cell carcinomas: overexpression, localization and therapeutic implications. *Indian J Dent Res.* 1997;8(1):9-18.

-
- 38 MASSANO J, Regateiro FS, Januario G, Ferreira A. Oral Squamous cell carcinoma: Review of prognosis and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102(1): 67-76.
- 39 RIESE DJ, Stern DF. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays.* 1998;20:41-48.
- 40 YARDEN Y, Sliwkowsky MX. Untangling the ErbB signaling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:127-37.
- 41 GRAUS-PORTA D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB2 the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.* 1997;16:1647-55.
- 42 OLAYIOYE MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* 2000;19:3159-67.
- 43 YU H, Jove R. The STATs of cancer-new molecular targets of age. *Nature Rev Cancer.* 2004;4:97-105.
- 44 HOLBRO T, Hynes NE. ErbB receptors: directing key signaling network throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44:195-217.
- 45 GSCHWIND A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nature Rev Cancer.* 2004;4:361-70.
- 46 EKSTRAND AJ, Sugawa N, James CD, Collins VP. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad USA.* 1992;89:4309-13.
- 47 SALOMON DS, Brandi R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1995; 19: 183-232.
- 48 BEI R, Pompa G, Vitolo D, Moriconi E, Ciocci L, Quaranta M, et al. Co-localization of multiple ErbB receptors in stratified epithelium of oral squamous cell carcinoma. *J Pathol.* 2001; 195: 343-8.
- 49 BEI R, Budillon A, Masuelli L, Cereda V, Vitolo D, Di Gennaro E, et al. Frequent overexpression of multiple ErbB receptors by head and neck squamous cell

carcinoma contrasts with rare antibody immunity in patients. *J Pathol.* 2004; 204:317-325.

50 CHEN CH, Lin YS, Lin CC, Yang YH, Ho YP, Tsai CC. Elevated serum levels of a c-erbB-2 oncogene product in oral squamous cell carcinoma patients. *J Oral Pathol Med.* 2004;33(10):589-94.

51 SALOMON DJ. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of HER-2/Neu oncogenes. *Science.* 1987; 235: 177-182.

52 HYNES NE, Stern DF. The biology of erbB-2/neu/Her-2 and its role in cancer. *Biochem Biophys Acta.* 1994; 1198: 165-84.

53 XIA W, Lau YK, Zhang HZ. Strong correlation between c-erb-2 overexpression and overall survival patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1997;3:3-9.

54 O-CHAROENRAT P, Rhys-Evans PH, Archer DJ, Eccles SA. c-erbB receptors in squamous cell carcinoma of the head and neck: clinical significance and correlation with metalloproteinases and vascular endothelial growth factors. *Oral Oncol.* 2002; 38:73-80.

55 O-CHAROENRAT P, Rhys-Evans PH, Modjtahedi H, Eccles SA. The role of c-ErbB receptors and ligands in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2002;38:627-40.

56 XIA W, Lau YK, Zhang HZ. Combination of EGFR, HER-2Neu and HER-3 is a strong predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members. *Clin Cancer Res.* 1999;5:4164-74.

57 KUNHNS WJ, Schoentag R. Carcinoma-related alterations of glycosyltransferases in human tissues. *Cancer Res.* 1981 Jul;41(7):2767-72.

58 VILLALOBO A, Gabius HJ. Signaling pathways for transduction of initial messages of the glycode into cellular response. *Acta Anat.* 1998; 161: 110-29.

59 JURGEN R. Subcellular organization of glycosylation in mammalian cells. *BBA.* 1987; 405-436.

60 GABIUS HJ, Andre S, Kaltner H, Siebert HC. The sugar code: Functional lectinomics. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1572: 165-77.

-
- 61 Jimenez MC, Trejo H, Sanchez A, Romero JL, Chavez R, Lascurain R, *et al.* Alteraciones de la glicosilación en enfermedades humanas. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 2002;15(1): 39-47.
- 62 POIRIER F, Kimber S. Cell surface carbohydrates and lectins in early development. *Molecular Human Reproduction.* 1997;3(10):907-18.
- 63 SHARON N, Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology.* 2004;14(11):53R–62R.
- 64 DVORAKOVA B, Motl J, Holiova Z, Vacı J, Smetana K Jr: *Dolichos biflorus* agglutininbinding site expression in basal keratinocytes is associated with cell differentiation. *Biol Cell.* 2002;94:365–373.
- 65 VARKI A. Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *FASEB.* 1997;11:248-55.
- 66 KEPPLER OT, Horstkorte R, Pawlita M, Schmidt C, Reutter W. Biochemical engineering of the N-acyl side chain of sialic acid: biological implications. *Glycobiology.* 2001 Feb;11(2):11R-18R.
- 67 ORNTOFT TF, Vestergaard EM. Clinical aspects of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Electrophoresis.* 1999; 20: 362-71.
- 68 WANG PH, Lo WL, Hsu CC, Lin TW, Lee WL, Wu CY, *et al.* Differentiation enzyme activities of sialyltransferases in gynecological cancer cell lines. *Eur J Gynaecol.* 2002; 23: 221-6.
- 69 STEHLE T, Yan Y, Benjamin TL, Harrison SC. Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment. *Nature.* 1994;369(6476):160-3.
- 70 HOLIKOVA Z, Hrdlickova-Cela E, Plzak J, Smetana K Jr, Betka J, Dvorankova B, Esner M, *et al.* Defining the glycophenotype of squamous epithelia by plant and mammalian lectins: Differentiation-dependent expression of -2,6- and -2,3-linked N-acetylneuraminic acid in squamous epithelia and carcinomas and its differential effect on binding of the endogenous lectins galectin-1 and -3. *APMIS.* 2002;110:845–856.
- 71 SATA T, Roth J, Zuber C, Stamm B, Heitz PU. Expression of alpha 2,6-linked sialic acid residues in neoplastic but not in normal human colonic mucosa. A lectin-

gold cytochemical study with Sambucus nigra and Maackia amurensis lectins. Am J Pathol. 1991;139(6):1435-48.

72 HAKOMORI S. Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. Cancer Res. 1996 Dec 1;56(23):5309-18.

73 TAYLOR ME, Drickamer K. Paradigms for glycan-binding receptors in cell adhesion. Curr Opin Cell Biol. 2007;19(5):572-7.

74 RAJPURA KB, Patel PS, Chawda JG, Shah RM. Clinical significance of total and lipid bound sialic acid levels in oral pre-cancerous conditions and oral cancer. J Oral Pathol Med. 2005;34(5):263-7.

75 RAVAL GN, Patel DD, Parekh LJ, Patel JB, Shah MH, Patel PS. Evaluation of serum sialic acid, sialyltransferase and sialoproteins in oral cavity cancer. Oral Dis. 2003;9(3):119-28.

76 SODERQUIST AM, Carpenter G. Glycosylation of the epidermal growth factor receptor in A-431 cells. The contribution of carbohydrate to receptor function. J Biol Chem. 1984;259(20):12586-94.

77 CUMMINGS RD, Soderquist AM, Carpenter G. The oligosaccharide moieties of the epidermal growth factor receptor in A-431 cells. Presence of complex-type N-linked chains that contain terminal N-acetylgalactosamine residues. J Biol Chem. 1985;260(22):11944-52.

78 BERGLER W, Stanek A, Riedel F, Petroianu, Hörmann. Role of sialoglycan structure for the function of the epidermal growth factor receptor and the in vitro proliferation of head and neck cancer. Eur Arch Otorhinolaryngol. 1998;255:414-9.

79 TAKAHASHI M, Yokoe S, Asahi M, Lee SH, Li W, Osumi D, *et al.* N-Glycan of erbB family plays a crucial role in dimmers formation and tumor promotion. Biochemica et Biophysica Acta. 2008;1780:520-4.

80 NEUMANIC MK, Whitehead JS, Elias PM. Alterations in membrane sugar during epidermal differentiation. Visualization with lectins and role of glycosidases. J Histochem Cytochem. 1983; 31:887-97.

81 GORELIK E, Galili U, Raz A. On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. Cancer Metast Rev. 2001;20:245-77.

-
- 82 HAKOMORI S. Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives. *Cancer Res.* 1985;45:2405-14.
- 83 COPIN MC, Devisme L, Busine MP, Marquette CH, Wurtz A, Aubert JP. From normal respiratory mucosa to epidermoid carcinoma: expression of human mucin genes. *Int J Cancer.* 2000;86:162-8.
- 84 BABINO A, Oppezzo P, Blanco S, Barrios E, Berois N, Navarrete H, et al. Tn antigen is a pre-cancerous biomarker in breast tissue and serum in n-nitrosamethylurea-induced rat mammary carcinogenesis. *Int J Cancer.* 2000;15:753-9.
- 85 BRODER AC. Squamous epithelium of lip: a study of five hundred and thirty seven cases. *JAMA.* 1929;74:656-64.
- 86 ANNEROTH G, Batsakis J, Luna M. Review of literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res.* 1987; 95: 229-49.
- 87 BRYNE M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinoma has high prognostic value. *J Pathol.* 1992; 166: 375-81.
- 88 YUEN APW, Lam KY, Chan AC, Wei WI, Lam LK. Clinicopathological analysis of local spread of carcinoma of tongue. *Am J Surg.* 1998; 175: 242-4.
- 89 SIMPSON JF, Dutt PL, Page DL. Expression of mitosis per thousand cells and cell density in breast carcinomas. *Hum Pathol.* 1992; 23: 608-11.
- 90 SIRIWARDENA BS, Tilakaratne A, Amaratunga EA, Udagama MN, Ogawa I, Kudo Y, *et al.* Analysis of histopathological and immunohistochemical differences of oral squamous cell carcinoma in young and old patients in Sri Lanka. *J Oral Pathol Med.* 2007;36(6):357-62.
- 91 COSTA A de L, Araújo Júnior RF, Ramos CC. Correlation between TNM classification and malignancy histological feature of oral squamous cell carcinoma. *Rev Bras Otorrinolaringol (Engl Ed).* 2005;71(2):181-7.
- 92 SCHLIEPHAKE H. Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer-A review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2003;32:233-45.

-
- 93 HIRAISHI Y, Wada T, Nakatani K, Negoro K, Fujita S. Immunohistochemical expression of EGFR and p-EGFR in oral squamous cell carcinomas. *Pathol Oncol Res.* 2006;12(2):87-91.
- 94 MAIORANO E, Favia G, Maisonneuve P, Viale G. Prognostic implications of epidermal growth factor receptor immunoreactivity in squamous cell carcinoma of the oral mucosa. *J Pathol.* 1998;185(2):167-74.
- 95 LIN SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, *et al.* Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol.* 2001;3(9):802-8.
- 96 HANADA N, Lo HW, Day CP, Pan Y, Nakajima Y, Hung MC. Co-regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor. *Mol Carcinog.* 2006;45(1):10-7.
- 97 CHAN R, Hardy WR, Laing MA, Hardy SE, Muller WJ. The catalytic activity of the ErbB-2 receptor tyrosine kinase is essential for embryonic development. *Mol Cell Biol.* 2002;22(4):1073-8.
- 98 FONG Y, Chou SJ, Hung KF, Wou HT, Kao SY. An investigation of the differential expression of Her2/Neu gene expression in normal oral mucosa, epithelial dysplasi and oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *J Chin Med Assoc.* 2008; 71(3):123-7.
- 99 SILVA SD, Agostini M, Nishimoto IN, Coletta RD, Alves FA, Lopes MA, *et al.* Expression of fatty acid synthase, ErbB2 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma. A clinicopathological study. *Oral Oncol.* 2004;40(7):688-96.
- 100 Venerando B, Fiorilli A, Croci GL, Tettamanti G. Presence in human erythrocyte membranes of a novel form of sialidase acting optimally at neutral. *Blood.* 1997;90(5):2047-56.
- 101 SEALES EC, Jurado GA, Brunson BA, Wakefield JK, Frost AR, Bellis SL. Hypersialylation of beta1 integrins, observed in colon adenocarcinoma, may contribute to cancer progression by up-regulating cell motility. *Cancer Res.* 2005;65(11):4645-52.
- 102 KANITAKIS J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol.* 2002;12(4):390-9.

103 TAKAHASHI M, Yokoe S, Asahi M, Lee SH, Li W, Osumi D, *et al.* N-glycan of ErbB family plays a crucial role in dimer formation and tumor promotion. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1780(3):520-4.

104 STROOP JMC, Weber W, Gerwing JG, Nimtz M, Kamaerling PJ, Vliegenthart FGJ. Characterization of the carbohydrate chains of the secreted form of the human epidermal growth factor receptor. *Glycobiology.* 2000;10:901-17.

105 IBRAHIM SO, Vasstrand EN, Liavaag PG, Johannessen AC, Lillehaug JR. Expression of c-erbB proto-oncogene family members in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res.* 1997;17(6D):4539-46.

106 XIA W, Lau YK, Zhang HZ, Xiao FY, Johnston DA, Liu AR, *et al.* Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members. *Clin Cancer Res.* 1999;5(12):4164-74.

107 Hitt R, Ciruelos E, Amador ML, Benito A, Sanchez JJ, Ballestin C, *et al.* Prognostic value of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and p53 in advanced head and neck squamous cell carcinoma patients treated with induction chemotherapy. *Eur J Cancer.* 2005;41(3):453-60.

108 Reimers N, Kasper HU, Weissenborn SJ, Stützer H, Preuss SF, Hoffmann TK, *et al.* Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. *Int J Cancer.* 2007;120(8):1731-8.

23. APENDICE A. FIGURAS

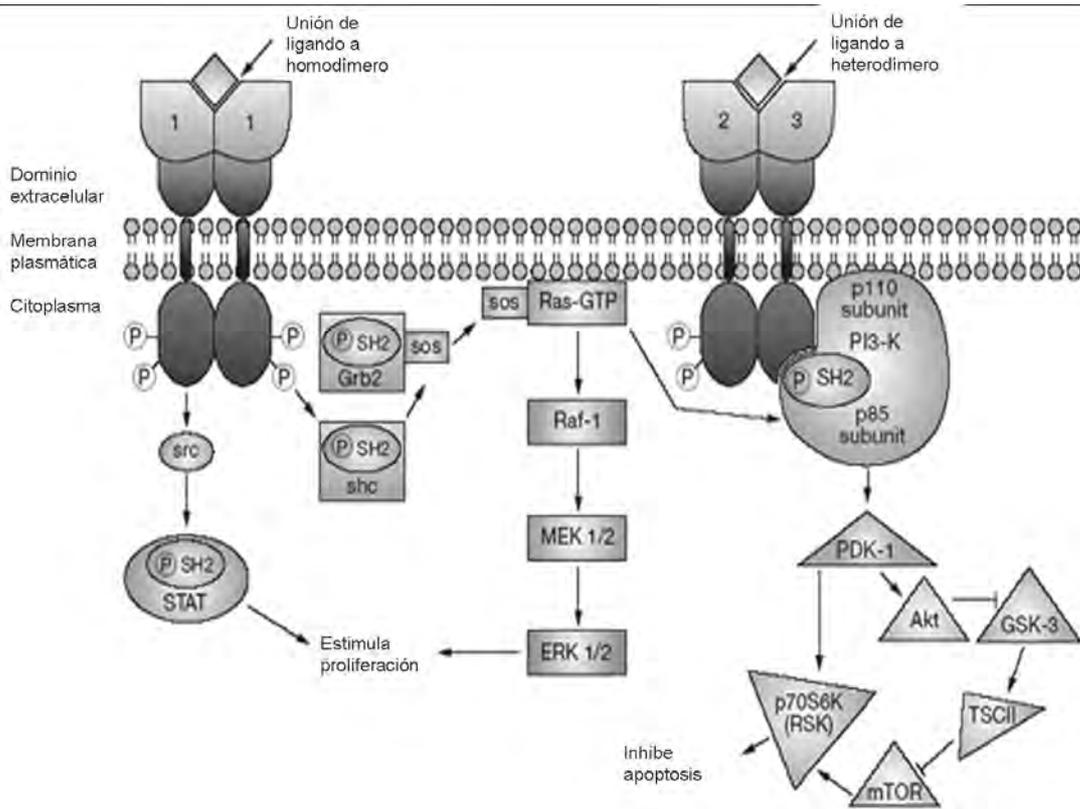


Figura 1. Cascadas de transducción de los receptores erbB. (Fuente: Nat Clin Prat Oncol 2004).

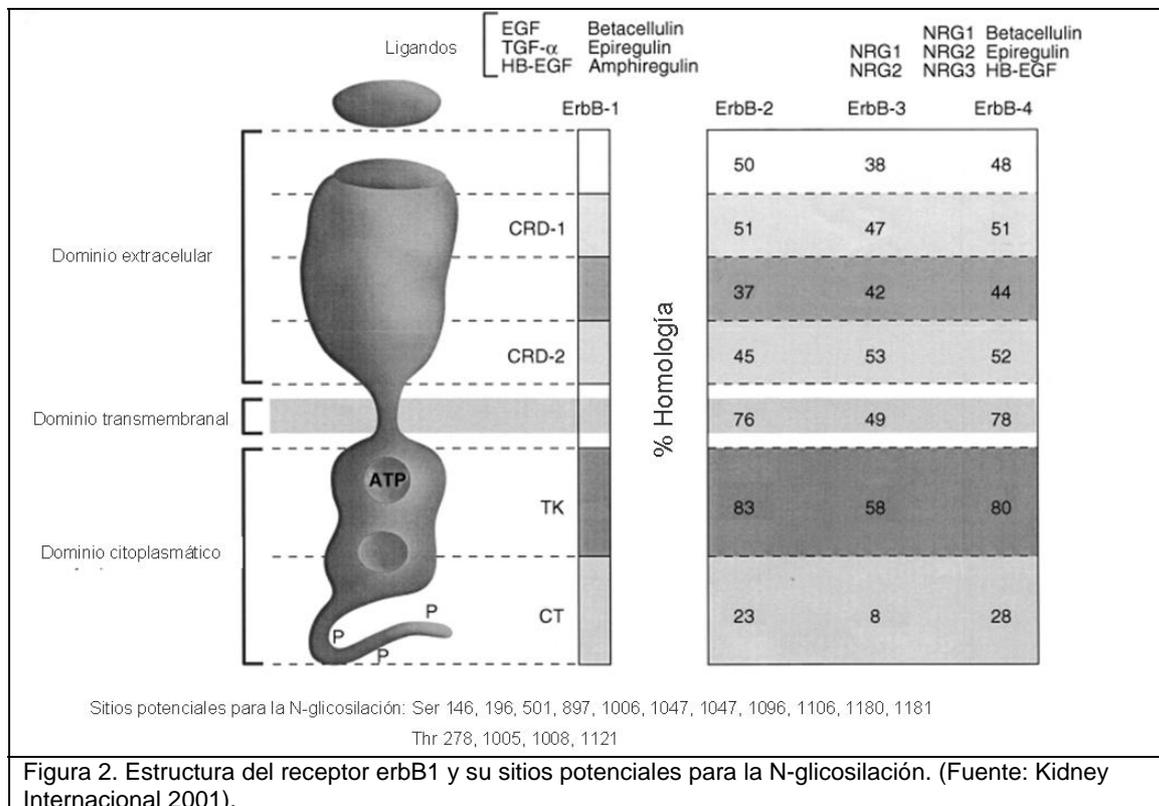


Figura 2. Estructura del receptor erbB1 y su sitios potenciales para la N-glicosilación. (Fuente: Kidney Internacional 2001).

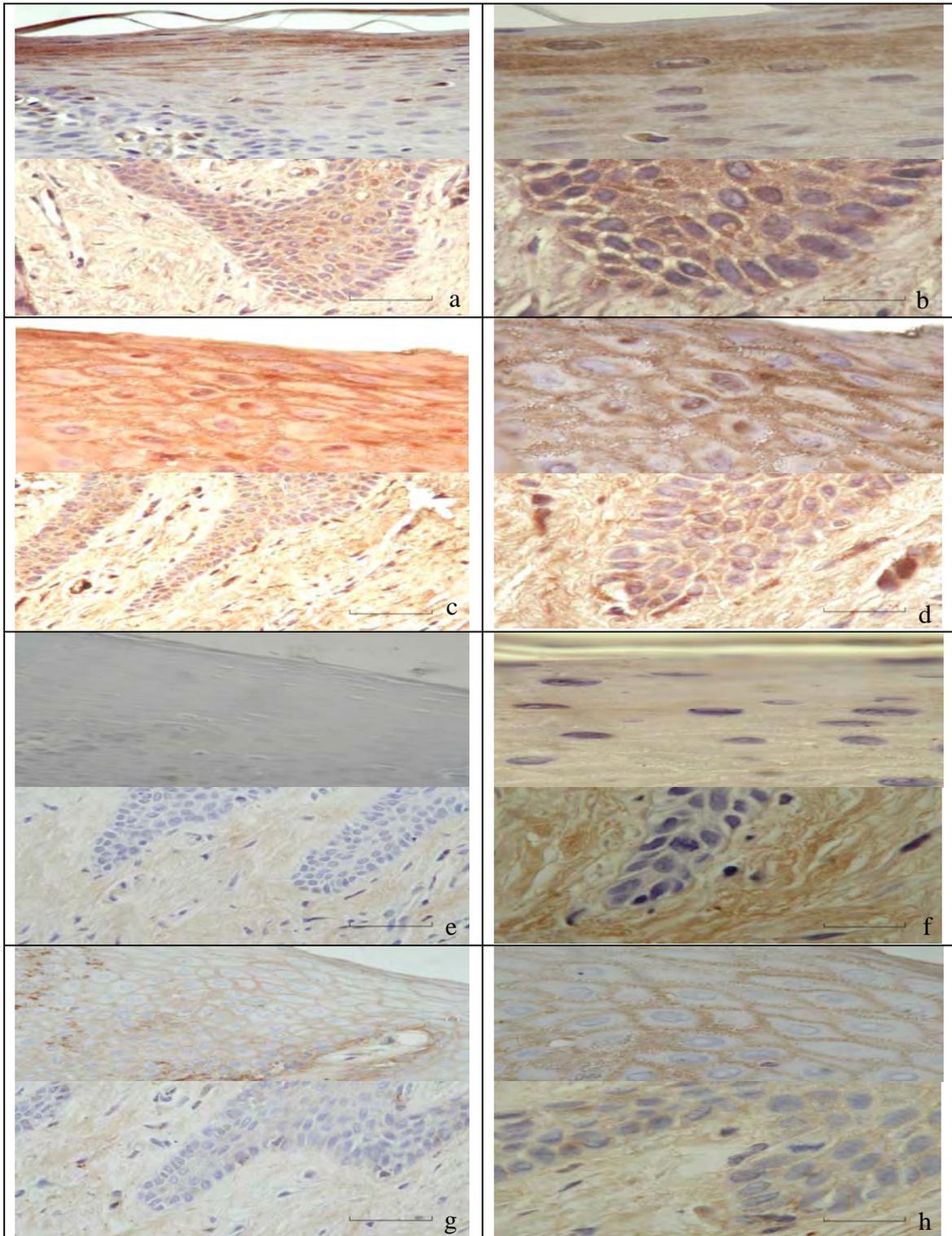


Figura 3. Inmuno-Histo-quimioexpresión en mucosa sana. a y b. Expresión de erbB1 amplia expresión a nivel de papilas epiteliales disminuyendo en estratos para basales; estrato corneo se observa saturación debido a los cambios morfológicos propios del epitelio. c y d. Inmunoexpresión de erbB2 cambio respecto al estrato, a nivel basal se expresa citoplasmáticamente cambiando a membrana a nivel de estrato corneo. e y f muestra la histoquimioexpresión de Neu Ac mínima a nivel de estratos corneos. g y h. Histoquimioexpresión de $\alpha 2, 3$ Neu Ac presenta cambio de expresión dependiente del estrato epitelial. Aumenta su expresión a nivel membrana en estrato corneo. (a, c, e y g 40X, barra=18 μ m; b, d, f y h 100X, barra= 7 μ m).

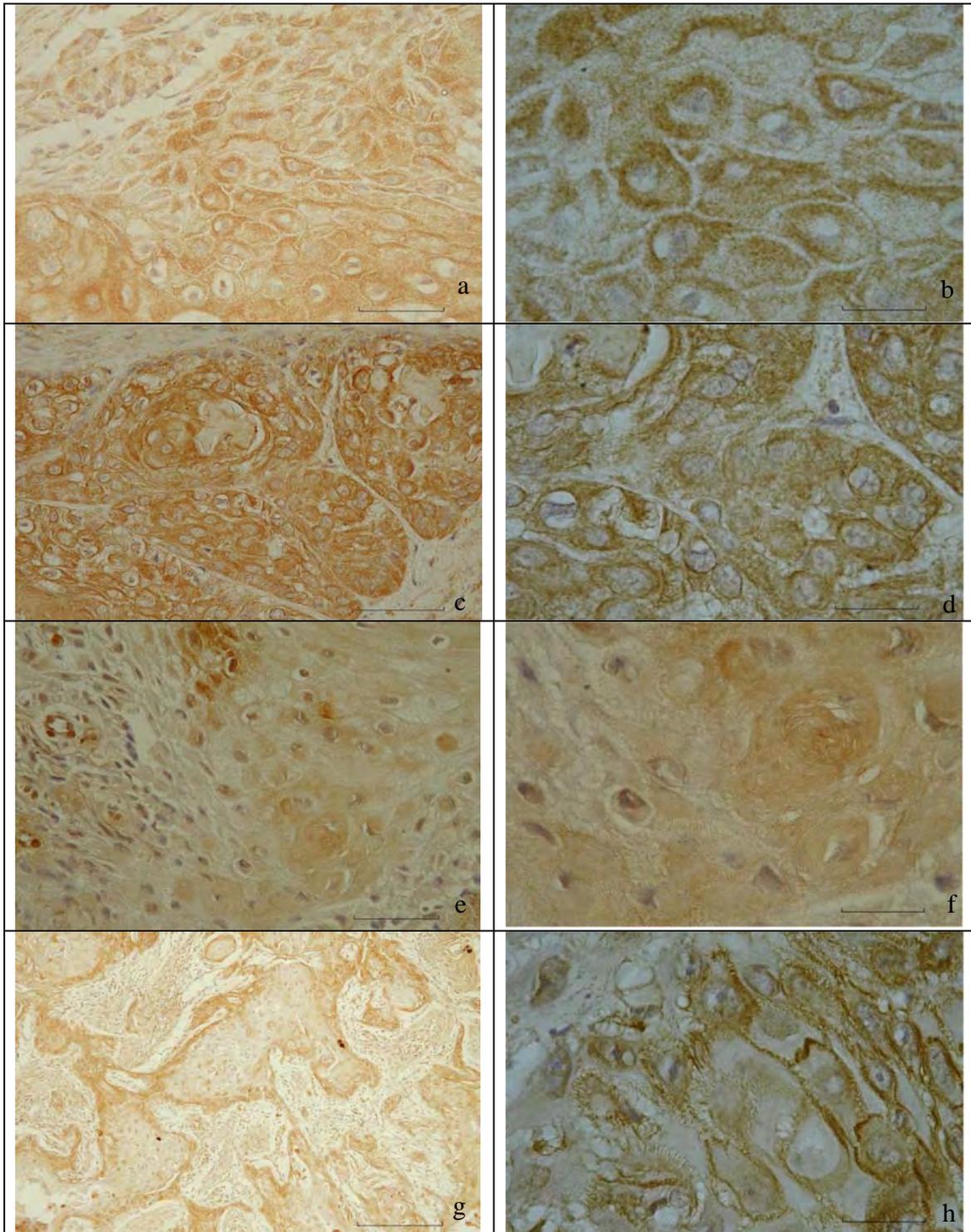


Figura 4. Inmunohistoquimioexpresión de CEO bien diferenciado. a, b. Inmunoexpresión de erbB1 de moderado a elevado en citoplasma de forma perinuclear. c, d. Expresión elevada de erbB2 con acentuación a nivel de membrana plasmática. e, f. Histoquimioexpresión de Neu Ac a nivel citoplasmático dentro islote de células invasoras. g, f. La expresión de α 2,3 Neu Ac muestra amplio predominio por membrana plasmática. (a, c, e y g 40X, barra=18 μ m; b, d, f y h 100X, barra= 7 μ m).

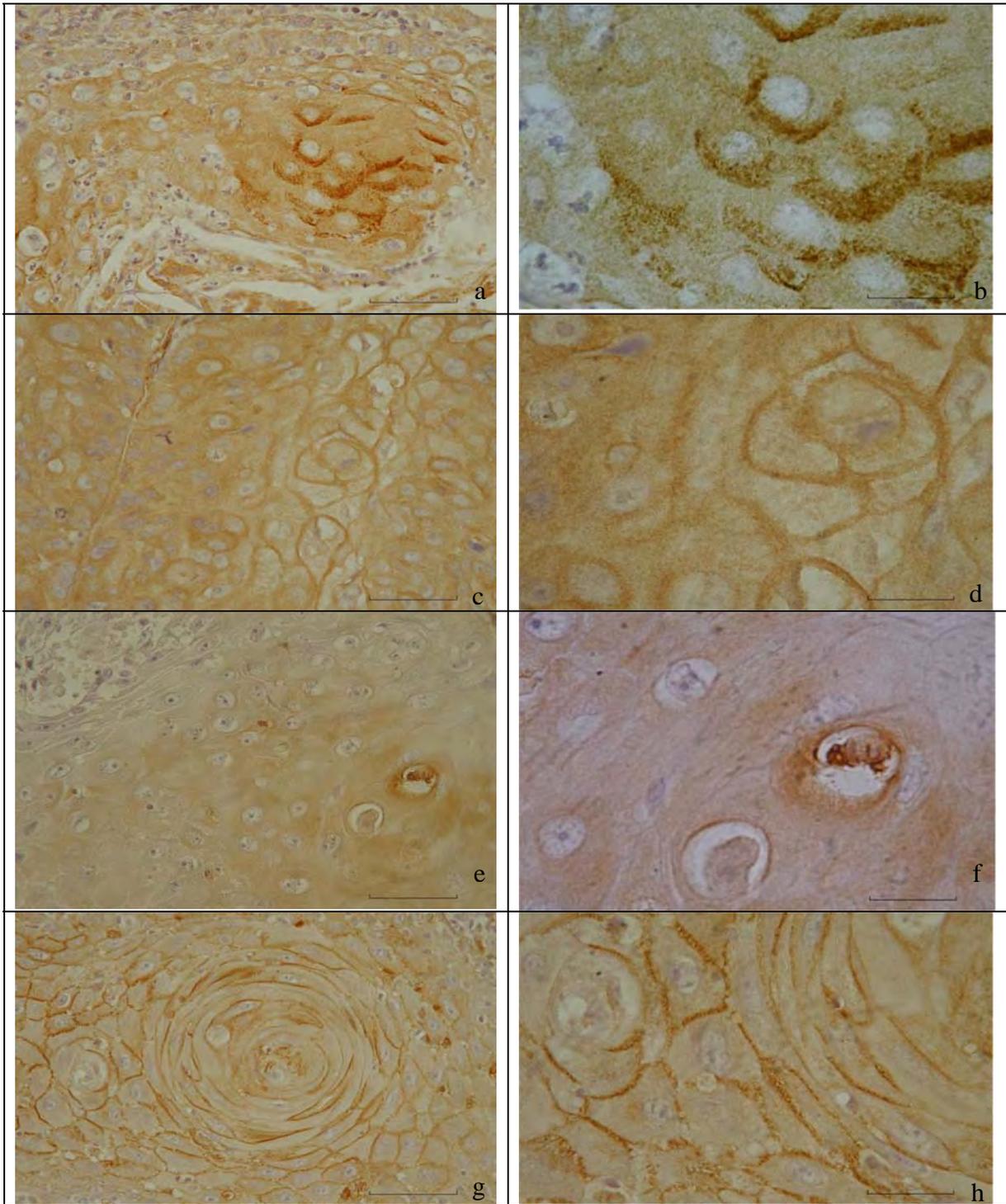


Figura 5. CEO moderadamente diferenciados. a y b) inmunoexpresión de erbB1 en nicho invasor no queratinizante con patrón citoplasmático perinuclear. c y d) Inmunoexpresión de erbB2 en conglomerado de invasor en forma de listo grueso con predominio de inmunoexpresión a nivel de membrana celular. e y f) Histoquimioexpresión de Neu Ac en nicho invasor de queratinización escasa en zona citoplasmático leve. g y h) Histoexpresión de α 2,3 Neu Ac en conglomerado invasor no queratinizante a nivel membrana celular con leve presencia a nivel de citoplasma. (a, c, e y g 40X, barra=18 μ m; b, d, f y h 100X, barra= 7 μ m).

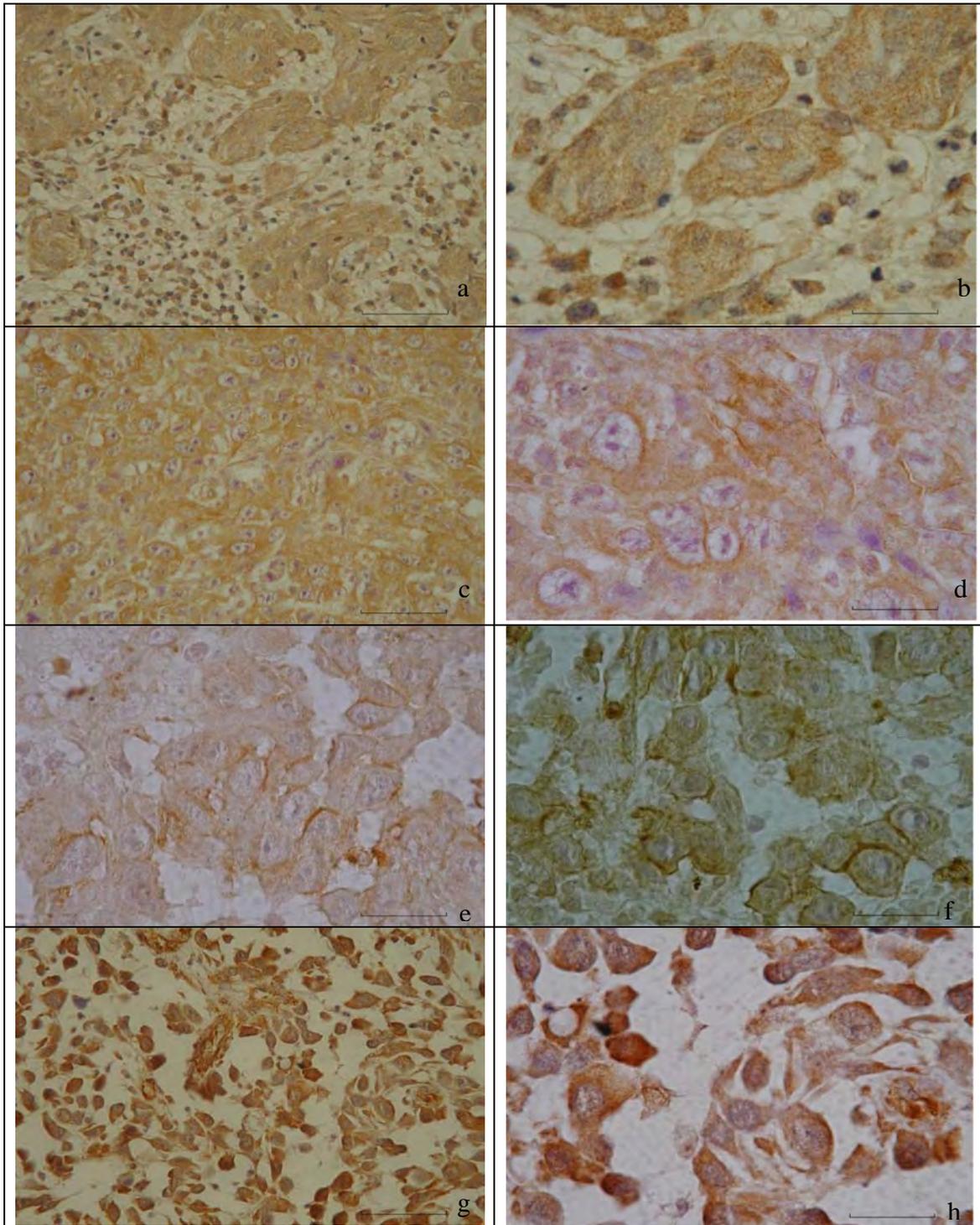


Figura 6. CEO pobremente diferenciados. a y b) Inmunoexpresión leve de erbB1 en citoplasma de las células de conglomerados invasores. c y d) Inmunoexpresión moderada de erbB2 en ambas zonas con predominio a nivel de membrana plasmática. e y f) Histoquimioexpresión elevada de Neu Ac con predominio a nivel de membrana plasmática. g) y h) Histoquimioexpresión elevada de 2,3NeuAc en ambas zonas ululares. (a, c, e y g 40X, barra=18 μ m; b, d, f y h 100X, barra= 7 μ m).

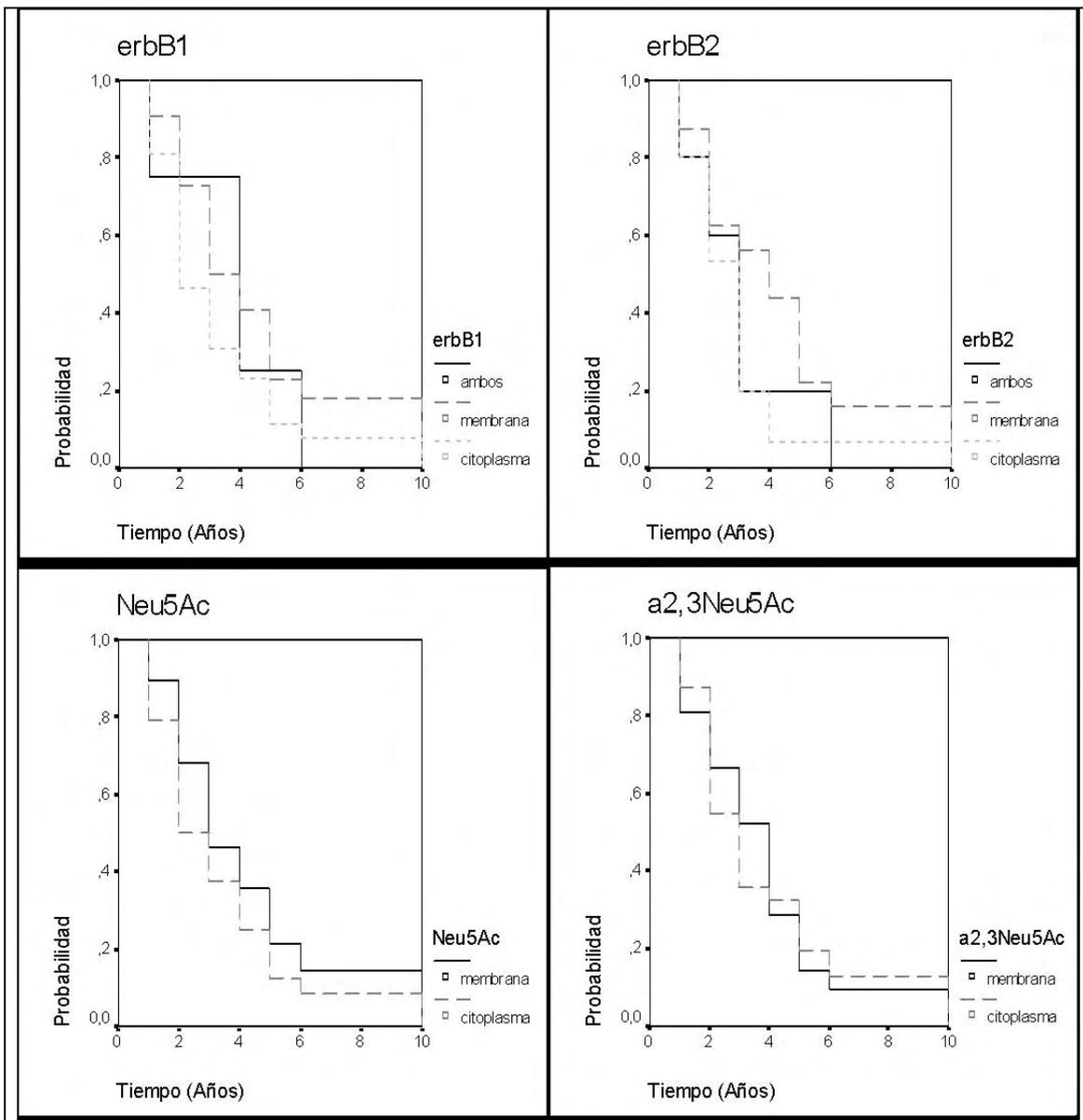


Figura 7. Análisis de supervivencia de los cuatro marcadores en relación con su zona de expresión. Las curvas de supervivencia fueron comparadas con el método de Kaplan–Meier.

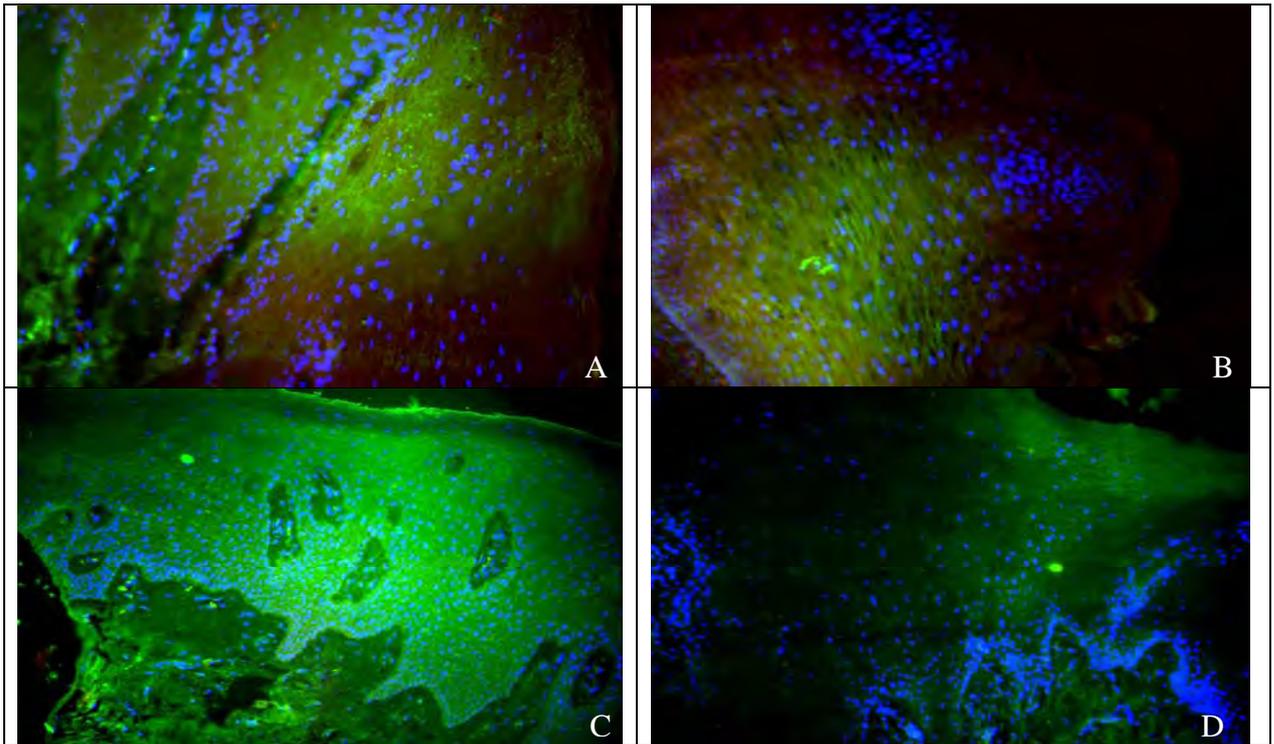


Figura 8. Colocalización en mucosa sana. A) Coexpresión de erbB1- α 2,3NeuAc en estratos basal y espinoso en papilas epiteliales. B) La coexpresión de erbB1-Neu5Ac siguió un patrón similar, respecto a la zona de coexpresión. C) Coexpresión nula de erbB2- α 2,3NeuAc, con disminución de la expresión de α 2,3NeuAc en el estrato corneo. erbB2-Neu Ac de igual forma no presenta positividad, se observa una menor expresión de Neu Ac comparada con α 2,3NeuAc en el epitelio. Aumentos de A, B, C y D a 20x.

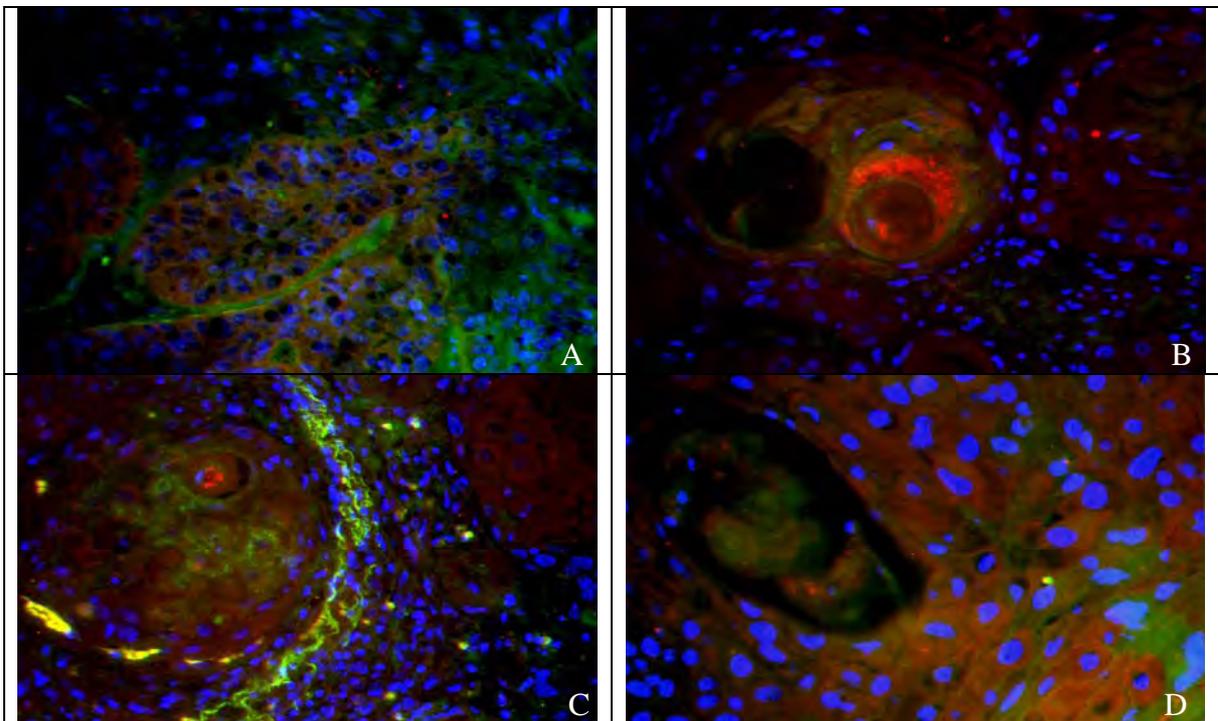


Figura 9. CEO Bien diferenciados A) Colocalización de erbB1- α 2,3Neu Ac presente en nicho invasor con expresión moderada en la totalidad de su arquitectura, con positividad de ácido sialico α 2,3Neu Ac en periferia del nicho. B) Colocalización moderada de erbB1-Neu5Ac en nicho queratinizante invasor. C) colocalización leve en nicho invasor paraqueratinizante. D) Colocalización moderada en conglomerados invasores con predominio a nivel intercelular.

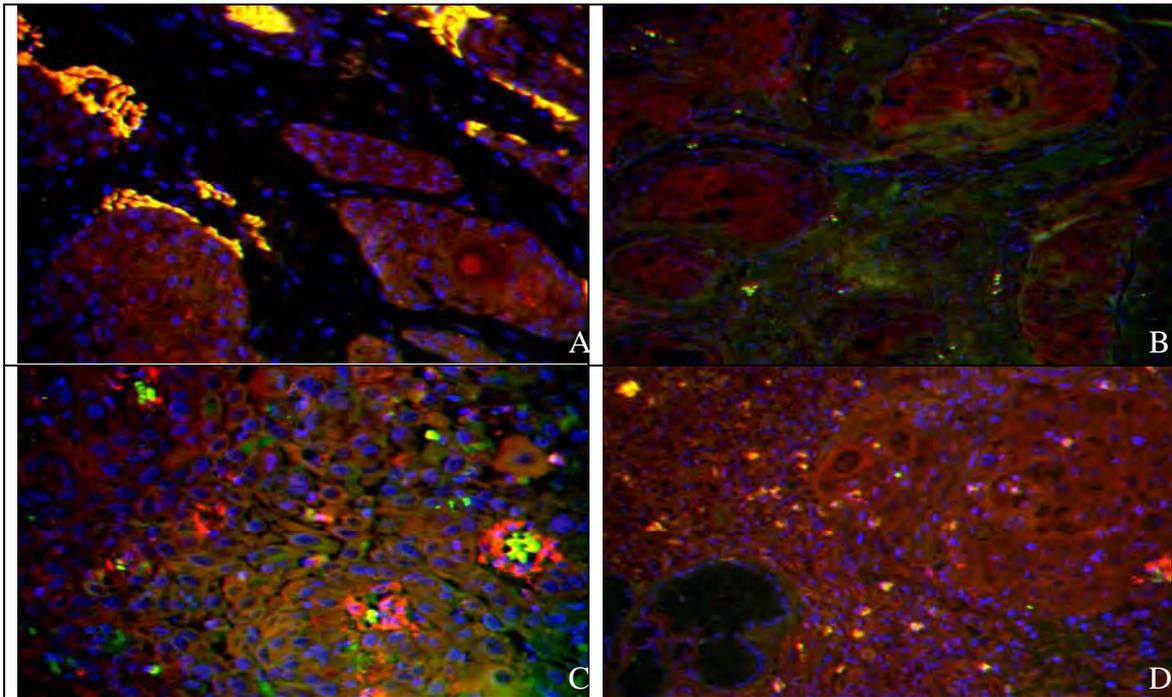


Figura 10. CEO moderadamente diferenciados. A) Colocalización de erbB1- α 2,3Neu Ac leve e la zona central de islotes invasores. B) Colocalización leve de erbB1-Neu5Ac en parte central de nichos invasores. C) Colocalización elevada en zona de mayor cohesión en epitelio invasor. D) Colocalización leve focal en epitelio invasor.

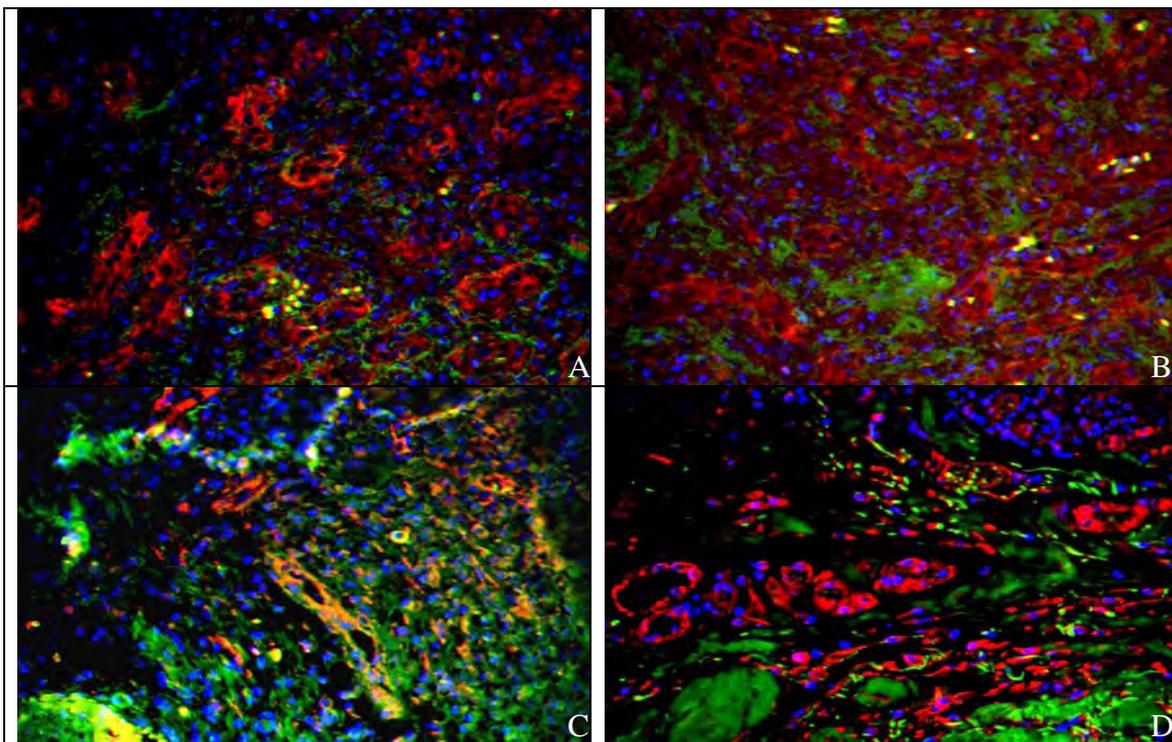


Figura 11. CEO pobremente diferenciados. A) Colocalización de erbB1- α 2,3Neu Ac leve en célula pleomórfica invasora. B) Colocalización leve de erbB1-Neu5Ac en células invasoras con apariencia ahusada. C) Colocalización elevada en células invasoras pleomórficas. D) Colocalización leve de erbB2-Neu Ac en célula invasora.

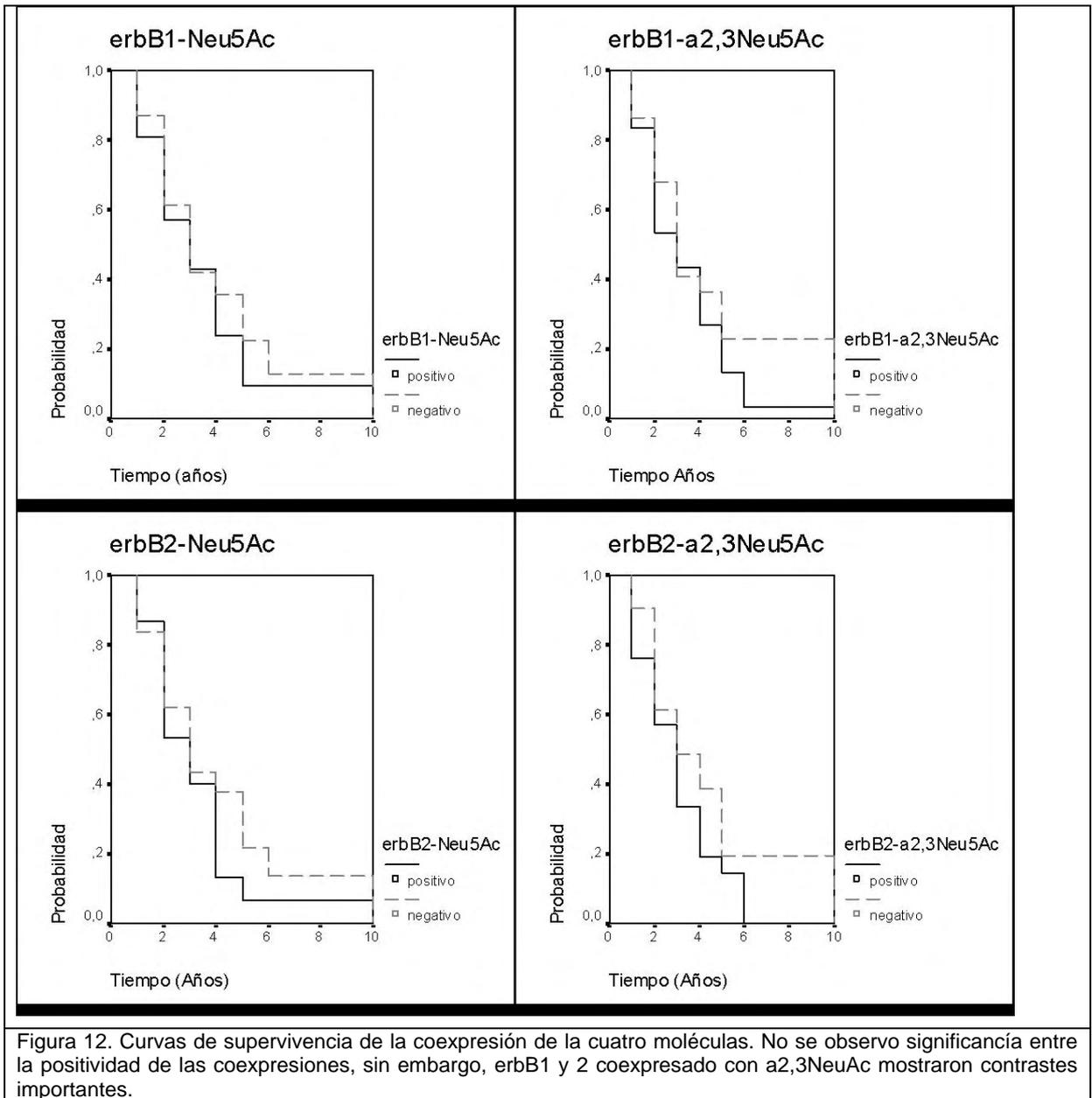


Figura 12. Curvas de supervivencia de la coexpresión de la cuatro moléculas. No se observó significancia entre la positividad de las coexpresiones, sin embargo, erbB1 y 2 coexpresado con a2,3NeuAc mostraron contrastes importantes.

24. APENDICE B. TABLAS

Tabla 1. Datos Demográficos	
Genero	
Masculino	23 (44.2%)
Femenino	29 (55.8%)
Edad	
Media (DE)	61,39 (18.61)
Zona Anatómica	
Lengua	13
Piso de boca	4
Paladar	7
Encía	9
Mucosa yugal	7
Otros sitios de mucosa	12
Grado Histológico	
Bien Diferenciado (grado I)	17
Moderadamente diferenciado (grado II)	25
Pobremente diferenciado (grado III)	10

Tabla 2. Expresión de parámetros histopatológicos en relación al grado de diferenciación.							
Grado de diferenciación	Profundidad (mm)	Profundidad	Pleomorfismo	No. mitosis	P. Invasión	I. Linfocitario	Queratinización
Bien diferenciado	5.31	3	2	3	2	1	2
Moderadamente diferenciado	5.27	3	3	3	2	2	3
Pobremente diferenciado	2.7	3	3	4	3	3	3

		erbB1	erbB2	Neu5Ac	α2,3 NeuAc
Mucosa Sana		10 (100%)	3 (30%)	7 (70%)	4 (40%)
Bien Diferenciado	Citoplasma	4 (24%)	5 (29%)	8 (47%)	7 (39%)
(grado I)	Membrana	11 (64%)	11 (65%)	9 (53%)	7 (41%)
	Ambos	2 (12%)	1 (6%)		
Moderadamente diferenciado	Citoplasma	15 (60%)	7 (28%)	9 (36%)	4 (24%)
(grado II)	Membrana	10 (40%)	14 (56%)	16 (64%)	9 (36%)
	Ambos		4 (16%)		
Pobrementemente diferenciado	Citoplasma	7 (70%)	3 (30%)	3 (30%)	3 (30%)
(grado III)	Membrana	1 (10%)	7 (70%)	7 (70%)	5 (50%)
	Ambos	2 (20%)			

	erbB1-Neu5Ac	erbB1-α2,3Neu Ac	erbB2-Neu5Ac	erbB2-α2,3Neu Ac
Mucosa Sana	6 (60%)	2 (20%)	0 (0%)	0 (0%)
Bien Diferenciados				
Grado I	5 (30%)	4 (24%)	7 (41%)	6 (36%)
Moderadamente Diferenciados				
Grado II	9 (36%)	7 (28%)	11 (44%)	8 (32%)
Pobrementemente Diferenciados				
Grado III	3 (30%)	2 (20%)	5 (50%)	3 (30%)