



## **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**EXPRESIÓN DE  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$ 1 Y MT1-MMP EN EL MICROAMBIENTE  
DE DISPLASIA EPITELIAL ORAL Y CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS  
ESCAMOSAS**

### **T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**

**C.D. Esp. ADRIANA MOLOTLA FRAGOSO**

**TUTOR: DRA. ELBA ROSA LEYVA HUERTA**

**Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial  
División de Estudios de Posgrado e Investigación, F.O. UNAM**



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.

## ÍNDICE

<b>1. Resumen</b>	<b>1</b>
<b>2. Antecedentes</b>	<b>2</b>
<b>3. Marco teórico</b>	<b>5</b>
3.1. Displasia Epitelial Oral	<b>5</b>
3.2. Carcinoma Oral de Células Escamosa	<b>8</b>
3.3. Microambiente tumoral	<b>11</b>
3.4. Fibroblastos asociados a cáncer o miofibroblastos	<b>14</b>
3.5. Factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1)	<b>18</b>
3.6. Metaloproteinasa de membrana tipo 1 (MT1-MMP oMMP14)	<b>22</b>
<b>4. Planteamiento del problema</b>	<b>25</b>
<b>5. Justificación</b>	<b>25</b>
<b>6. Pregunta de investigación</b>	<b>25</b>
<b>7. Hipótesis</b>	<b>25</b>
<b>8. Objetivo general</b>	<b>25</b>
<b>9. Objetivos específicos</b>	<b>26</b>
<b>10. Diseño del estudio</b>	<b>26</b>
10.1. Tipo de estudio	<b>26</b>
10.2. Universo de estudio	<b>26</b>
10.3. Tamaño de la muestra	<b>26</b>
10.4. Criterios de inclusión	<b>27</b>
10.5. Criterios de exclusión	<b>27</b>
<b>11. Variables</b>	<b>27</b>
<b>12. Materiales y métodos</b>	<b>29</b>
12.1. Histoquímica	<b>29</b>
12.2. Inmunohistoquímica	<b>29</b>
12.3. Análisis de la inmunoreacción	<b>31</b>
12.4. Análisis estadístico	<b>31</b>

<b>13. Resultados</b>	<b>32</b>
13.1. Análisis de la inmunexpresión de $\alpha$ -SMA en displasia epitelial oral y carcinoma oral de células escamosas	<b>33</b>
13.2. Análisis de la inmunexpresión de MMP14 en displasia epitelial oral y carcinoma oral de células escamosas	<b>37</b>
13.3. Análisis de la inmunexpresión de TGF- $\beta$ 1 en displasia epitelial oral y carcinoma oral de células escamosas	<b>41</b>
<b>14. Discusión</b>	<b>45</b>
<b>15. Conclusión</b>	<b>52</b>
<b>16. Referencias bibliográficas</b>	<b>53</b>
<b>17. Anexos</b>	<b>65</b>
17.1. Formato para la estandarización de displasia epitelial oral	<b>65</b>
17.2. Formato para la estandarización de carcinoma oral de células escamosas	<b>66</b>



## 1. Resumen.

### **Expresión de $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$ 1 Y MT1-MMP en el microambiente de displasia epitelial oral y carcinoma oral de células escamosas**

**Introducción.** Los organismos multicelulares están constituidos por células y matriz extracelular (*Werb et al 1997*). Bajo condiciones fisiológicas, las células toman el control para cambiar su microambiente y así satisfacer sus necesidades, cuando las células pierden el control sobre el microambiente, este se organiza incorrectamente afectando el comportamiento de ellas; la repetición o acumulación de eventos puede resultar en enfermedades como el cáncer, fibrosis, artritis y aterosclerosis. La evidencia indica que el desarrollo y progresión del cáncer no solo dependerá de sus características genéticas sino también de las interacciones con el microambiente, donde las células neoplásicas malignas pueden alterar el estroma subyacente y a su vez, las células estromales pueden promover la progresión del cáncer, favoreciendo la diseminación y la invasión (*Sternlicht et al 2011, Itho et al 2006*). Actualmente, se encuentra en estudios la interacción entre las células epiteliales y estromales como elemento esencial para la progresión tumoral.

**Objetivo.** Determinar la expresión de los marcadores  $\alpha$ -SMA, TGF-  $\beta$ 1 y MT1-MMP a través de reacciones inmunohistoquímicas en displasias epiteliales orales y carcinoma oral de células escamosas.

**Materiales y métodos.** Se seleccionaron 74 muestras de pacientes con displasia oral y 68 con COCEs del Departamento de Patología bucal de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, UNAM. Las displasias se clasificaron según los criterios de malignidad de la OMS y los COCE por la gradificación de Broders. Se realizó inmunohistoquímica para  $\alpha$ -SMA, TGF-  $\beta$ 1 y MT1-MMP. Las reacciones de inmunohistoquímica se analizaron con ImageJ y ACDSee.

**Resultados.** De las muestras analizadas en el estudio se pudo determinar que: 25 displasias fueron de bajo grado, 49 de alto grado, 36 COCEs bien diferenciados, 22 moderadamente diferenciados y 10 poco diferenciados. La expresión de los filamentos de  $\alpha$ -SMA en los miofibroblastos del estroma de las displasias epiteliales de bajo grado fue negativa; mientras que en las de alto grado el 48% presentó una expresión leve. Los COCEs poco diferenciados tuvieron una mayor expresión de  $\alpha$ -SMA en el 100% de los casos, mientras que los de moderadamente y bien diferenciados fueron positivos en un 95% y 83% respectivamente. El TGF- $\beta$ 1 y la MT1-MMP se expresaron tanto en el estroma como en las células neoplásicas en las displasias y COCEs. La expresión de estos marcadores en el microambiente de displasias epiteliales y COCE incrementa significativamente con respecto a la severidad y desdiferenciación celular.



## 2. Antecedentes.

Por muchos años, se consideró que los tumores malignos estaban conformados únicamente por células transformadas que adquieren proliferación autónoma, así como capacidades de supervivencia e invasión. Sin embargo, en los últimos años, se ha establecido que los tumores malignos son sistemas complejos que incluyen; las células neoplásicas, las células estromales asociadas al tumor y a los componentes de la matriz extracelular, como citocinas y quimiocinas; todos estos componentes incrementan la complejidad del microambiente tumoral.<sup>1,2</sup> Uno de los elementos críticos del estroma tumoral que contribuyen de manera sustancial al depósito de la matriz extracelular de los tumores sólidos son los fibroblastos asociados a cáncer (FAC) o miofibroblastos. En diferentes tipos de cáncer, la presencia de miofibroblastos aunado a la secreción de factores a partir de estas mismas células se ha correlacionado con un mal pronóstico.<sup>3</sup> Los tumores malignos de mama se encuentran entre las primeras enfermedades estudiadas en relación con el proceso de diferenciación fibroblasto - miofibroblasto y se utilizaron rápidamente como fuente de miofibroblastos para la investigación *in vitro*.<sup>4</sup>

Los primeros reportes sobre los cambios en el fenotipo que adquieren los fibroblastos en el estroma tumoral, similares a los observados en los fibroblastos durante el proceso de cicatrización, se iniciaron en los años 70. Los miofibroblastos fueron descritos por Gibbani en 1979; como fibroblastos modificados con características de células musculares lisas presentes en el tejido de granulación durante el proceso de cicatrización de heridas, lo que llevó a considerar que estas células tienen un papel importante en la producción de fuerzas contráctiles que están implicadas en este proceso.<sup>5,6</sup> Gibbani et. al analizaron la expresión de las proteínas  $\alpha$ -SMA, miosina y desmina en el tejido de granulación durante la curación de heridas abiertas en rata por medio de microscopía electrónica e inmunohistoquímica. Los microfilamentos de alfa actina de los fibroblastos estaban ausentes 4 días después de realizada la herida, acumulándose gradualmente.



A partir del día 6 hasta el día 15; eran evidentes en aproximadamente el 70% de las células miofibroblásticas, posteriormente decrecían estos filamentos. Con estos resultados ellos llegaron a la conclusión que los miofibroblastos se desarrollan gradualmente a partir de fibroblastos del tejido de granulación y expresan temporalmente un marcador de diferenciación de músculo liso.<sup>7</sup> Pevio a Gibbiani en 1986, Scalli et. al. demostraron la presencia de microfilamentos de alfa actina músculo liso en un cultivo mixto de fibroblastos dérmicos de rata y fibroblastos de embrión de pollo.<sup>8</sup>

En 1988 Sapinno et. al. utilizaron un anticuerpo monoclonal de ratón para el reconocimiento de alfa actina de músculo liso, permitiéndoles así estudiar las características de diferenciación de músculo liso en las células del estroma desmoplásico que soporta a los tumores mamarios; realizaron inmunohistoquímica a una serie de tejidos humanos de tumores malignos y no malignos de mama; observaron expresión de alfa actina de músculo liso en las células del componente desmoplásico en los 11 carcinomas de mama, mientras que no existió expresión en las células del estroma de los tejidos de mama histológicamente definido como normal. Las lesiones benignas mostraron una amplia variedad de inmunoexpresión, que fue desde un mínimo de células positivas hasta casi la totalidad de las células estromales positivas, estos resultados dependían del tipo de lesión.

Olumi et al. en 1999 describieron el papel que tenían los miofibroblastos para dirigir e iniciar la progresión de los tumores prostáticos en un modelo animal. En el mismo año, Sternlicht et. al. demostraron por primera vez que la metaloproteinasa 3; molécula de la matriz extracelular secretada por los fibroblastos que se expresa durante el desarrollo de la glándula mamaria normal y en la involución mamaria poslactancia, puede actuar como promotor "natural" del tumor en la carcinogénesis de mama, también jugando un papel en la transición epitelio-mesénquima.<sup>9,10,11,12</sup> La primera evidencia acerca del papel de los miofibroblastos en el carcinoma oral de células escamosas fue demostrada por Barth



et. al. reportando un cambio de fenotipo de fibrocitos  $CD34^+$  hacia células positivas a  $\alpha$ -SMA. Lewis et. al. demostraron poco después que esta transdiferenciación está inducida por el factor de crecimiento transformante beta 1 y factor de crecimiento de hepatocitos, lo cual promueve la invasión in vitro.<sup>2,13,14</sup>

Por otra parte; la degradación de los componentes de la matriz extracelular (MEC) es esencial para que las células neoplásicas invadan los tejidos circundantes y para formar focos de metástasis en órganos distantes y nódulos linfáticos. Este proceso de invasión involucra a múltiples enzimas proteolíticas, conocidas como: metaloproteinasas (MMPs), las cuales son secretadas por las células neoplásicas y sus sustratos. Yoshizaki et. al reportaron la expresión de MT1-MMP en la superficie de las células tumorales, mientras que los fibroblastos cercanos a estas células presentaron una expresión leve. La MT1-MMP se expresó tanto en carcinomas de estadios tempranos como avanzados. Los carcinomas que expresaron intensamente MT1-MMP fueron asociados a un menor grado de diferenciación celular<sup>15</sup>. Kurahara et. al reportaron incremento en la expresión de MT1-MMP en células neoplásicas de carcinomas altamente invasivos y con metástasis extensas. Zhang et al demostraron in vitro que la producción de MT1-MMP por los fibroblastos es la responsable de la degradación de la colágena tipo I, así como la reducción en la expresión de esta MMP reduce el potencial de crecimiento e invasión tumoral.



### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. Displasia Epitelial Oral

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a las lesiones orales con predisposición a transformación maligna como trastornos potencialmente malignos (TPM) entre los cuales encuentran la leucoplasia, eritroplasia, fibrosis submucosa, etc. La detección clínica de estas lesiones es trascendente, considerando la supervivencia de los pacientes, debido a que estas lesiones histológicamente pueden presentar un amplio espectro de alteraciones citoarquitectónicas que van desde una displasia de bajo grado hasta un carcinoma in situ y/o carcinoma invasor.<sup>16</sup>

Las estimaciones de la incidencia y prevalencia de los TPMs varían ampliamente entre las localidades y poblaciones geográficas, sin embargo estas estimaciones sugieren una cifra global entre el 2% y 3%. La distribución por edad y sexo de los TPMs depende principalmente del estilo de vida, ubicación geográfica y la etnia. En los países desarrollados, la leucoplasia generalmente se presenta entre la cuarta y la séptima década de vida, pero en los países en desarrollo se encuentra de 5-10 años antes. Las mujeres son comúnmente menos afectadas, lo que podría sugerir un mayor uso de agentes carcinogénicos en los hombres.<sup>17, 18</sup>

La identificación clínica e histopatológica de los TPMs es motivo de controversia entre médicos y odontólogos, debido a su comportamiento biológico incierto y riesgo de transformación maligna. Se considera que el 40% de los trastornos potencialmente malignos permanecen sin cambios, el 20 % pueden involucrar, y 20 % sufrirá transformación maligna, pero estas estimaciones son relativas, ya que la historia natural de la enfermedad sigue siendo desconocida.<sup>17,18,19</sup> En una revisión sistemática reciente se reporta que el 12% de los trastornos potencialmente malignos sufren transformación maligna en un promedio de 4.3 años.<sup>20</sup>



La displasia epitelial oral (DEO) se define como una serie de cambios arquitectónicos y atipias citológicas presentes en el epitelio escamoso de la mucosa oral, que están asociados con una alta probabilidad de progresión a carcinoma de células escamosas. La DEO es el término empleado para diagnosticar histológicamente a los TPMs<sup>21</sup>; sin embargo, evaluar el riesgo de la transformación maligna es un reto. Por lo que el diagnóstico precoz de estas lesiones es una prioridad para reducir la morbilidad y la mortalidad de los pacientes.<sup>22</sup>

Los TPMs histopatológicamente cubren un amplio espectro, los cuales son gradificados de acuerdo a los cambios preneoplásicos y severidad que presenta el epitelio. A través de los años, se han propuesto diferentes esquemas de gradificación, a menudo sujeto a una significativa variabilidad interobservador.<sup>23</sup> Los tres esquemas de clasificación referidos por la OMS son: Displasia epitelial, Neoplasia escamosa intraepitelial (SIN) y la clasificación de Ljubljana, de las cuales la clasificación SIN esta basada en una modificación de lesiones premalignas de cérvix y la clasificación de Ljubljana en neoplasias de laringe, por lo que la OMS en el 2017 realiza una modificación de los criterios diagnósticos para la displasia epitelial<sup>24</sup>, estableciendo un sistema binario de gradificación donde las lesiones que tradicionalmente correspondían a displasia leve se categorizaron como displasia de bajo grado, mientras que las displasia clasificadas como moderadas, severas y/o carcinoma en situ se categorizan como displasia de alto grado (**Figura 1**). Cabe destacar que la displasia es un término histológico que denota la presencia de características histológicas y citológicas sugestivas de malignidad; una mucosa con displasia epitelial tiene un mayor riesgo de desarrollar un carcinoma en comparación con la mucosa normal.<sup>25</sup>

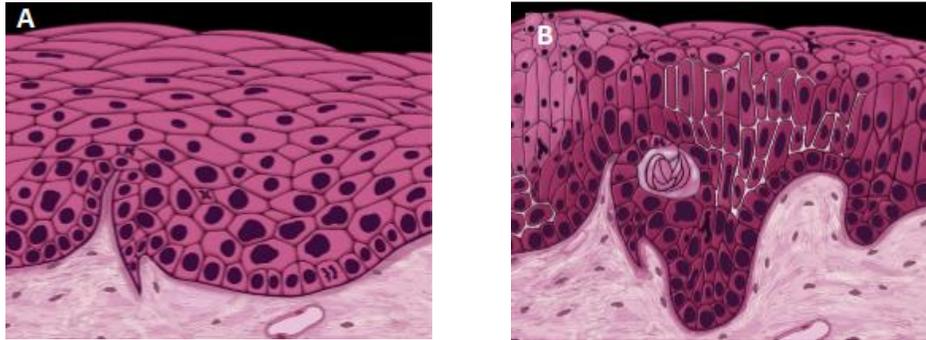


Figura 1. Esquema de los cambios citoarquitectónicos que se observan en las displasias de bajo grado (A) y en las displasias de alto grado (B).<sup>23</sup>

En la **tabla 1** se describen los cambios arquitectónicos y citomorfológicas que se emplean para definir a las displasias de bajo y alto grado <sup>24</sup>. En general, el sistema de gradificación es una acumulación cualitativa y cuantitativa de características citológicas que establece la severidad de los cambios para determinar el grado.

<b>Tabla1. Criterios de displasia</b>		
<b>Displasia de bajo grado</b>	Arquitectura	<ul style="list-style-type: none"> <li>• En general la estratificación está conservada.</li> <li>• Hiperplasia bacilar</li> <li>• Acantosis</li> </ul>
	Citomorfolología	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pleomorfismo leve</li> <li>• Relación núcleo-citoplasma incrementada</li> <li>• Disqueratosis individual</li> <li>• Mitosis normales delimitadas al tercio inferior del epitelio</li> </ul>
<b>Displasia de alto grado</b>	Arquitectura	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pérdida de la maduración y estratificación</li> <li>• Pleomorfismo celular en más de la mitad del epitelio, suele ser severo</li> <li>• Membrana basal intacta y clavos epiteliales en gota</li> </ul>
	Citomorfolología	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disqueratosis grupal</li> <li>• Pleomorfismo marcado con variaciones en la forma y tamaño celular y nuclear; hiper cromatismo, incremento en el tamaño y número de nucleolos</li> <li>• Pérdida de la relación núcleo-citoplasma</li> <li>• Incremento de mitosis atípicas en cualquier estrato del epitelio</li> </ul>
<b>Tomado de Thompson L.</b>		



### 3.2. Carcinoma oral de células escamosas

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) se ha convertido en un problema de salud y se considerara como una epidemia en el último siglo; con una incidencia anual de 300,000 casos en todo el mundo y una tasa de mortalidad a 5 años en menos del 50% de éstos debido al diagnóstico tardío.<sup>26,27</sup> El COCE es la neoplasia maligna más frecuente en cavidad oral representando alrededor del 90% y ocupando el 8° lugar de todos los carcinomas en la economía del cuerpo humano.<sup>28,29</sup> Se define como una neoplasia epitelial maligna, invasiva con distintos grados de diferenciación escamosa y con propensión a metástasis ganglionares tempranas y extensas.<sup>30</sup>

Las zonas anatómicas principalmente afectadas son: bordes laterales de lengua, piso de boca, encía, paladar y mucosa bucal; estos datos varían significativamente con respecto al área geográfica debido a los hábitos de consumo de carcinógenos.<sup>31,32</sup> El tabaquismo y el consumo de alcohol son los principales factores de riesgo asociados al desarrollo de COCE. Además, el hábito de mascar tabaco, la exposición a la radiación, el VPH, así como la deficiencia inmune han sido implicados.<sup>33,34</sup> Existen registros de disminución en el número de COCE asociados al tabaco, sobre todo en los países donde las campañas contra el hábito tabáquico han sido implementadas exitosamente. A pesar de la disminución observada en la incidencia del COCE, es inquietante la tendencia hacia el aumento en el número de casos en lengua y orofaringe en pacientes jóvenes, mujeres y personas sin exposición a los factores de riesgo tradicionales; sin embargo, la infección con el virus del papiloma humano explica el aumento de pacientes con cáncer orofaríngeo.<sup>29,35</sup>

El COCE es una enfermedad que generalmente se presenta en pacientes después de la quinta década de la vida. La edad promedio de presentación en la población asiática es 52 años en comparación con 65 años en la población norteamericana.<sup>36</sup>



Otros estudios reportaron que del 4 al 6% de los COCEs de lengua ocurren en pacientes jóvenes entre los 20 a 40 años de edad.<sup>37</sup>

En todo el mundo, la incidencia de cáncer de cabeza y cuello es mayor en hombres en comparación con mujeres. Según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer en 2008 la incidencia media global por edad de cáncer oral y faringe excluyendo la nasofaringe fue de 8,7 / 100.000 habitantes para varones, en comparación con 3.3 para mujeres<sup>38</sup>; esto puede ser debido al mayor consumo de alcohol y tabaco en los hombres, sin embargo; el cáncer oral está aumentando significativamente en mujeres en algunas partes del mundo, en un metaanálisis realizado en Buenos Aires, Argentina mostró que la proporción hombre/mujer era de 1.24: 1 durante el período 1992- 2000 comparada con 7.1: 1 en el período 1950-1970, demostrando un alarmante incremento en el número de casos femeninos.<sup>39</sup> La incidencia de COCE en las mujeres es mayor o igual a la de los hombres en las zonas de alta frecuencia, como algunas regiones de la India, donde mascar el betel y nuez de areca es común entre las mujeres.<sup>40</sup>

En las últimas dos décadas, el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad ha mejorado, sin embargo la tasas de supervivencia a largo plazo no han aumentado significativamente. Los factores pronósticos específicos que se utilizan para el COCE son: el sitio de origen del tumor primario, el tamaño tumoral, invasión a la cadena ganglionar cervical y metástasis a distancia. El comportamiento biológico del COCE está relacionado a su heterogeneidad; por ejemplo, los tumores del mismo estadio clínico a menudo muestran diferencias en el curso clínico y la respuesta al tratamiento.<sup>41</sup> No obstante, es de suma importancia considerar otros parámetros, especialmente sus características histopatológicas, como factores que condicionan de forma decisiva el comportamiento y por tanto el pronóstico y tratamiento.<sup>42</sup>



Durante muchos años la estadificación TNM se ha utilizado como un indicador clínico de la respuesta estimada a la terapia y supervivencia. El tamaño del tumor se ha considerado un factor pronóstico especialmente fiable; sin embargo, hay muchos pacientes que mueren a pesar de que la neoplasia se estadificó clínicamente en estadio I y II. En dichos pacientes la evaluación de la estadificación clínica y citomorfología del COCE podría servir como una medida precisa para predecir el pronóstico y determinar el tratamiento.<sup>43</sup>

La clasificación de Broders se basa en la cantidad de la población celular de la neoplasia que semeja al epitelio escamoso normal; proporcionando así una escala cuantitativa.<sup>44</sup> Este sistema de clasificación agrupa al COCE como bien diferenciado o grado I cuando las células tienen gran producción de queratina o el 25 % de las células neoplásicas están indiferenciadas, el grado II o moderadamente diferenciado presenta queratinización y pleomorfismo moderado o el 50% de las células neoplásicas están indiferenciadas, mientras que el grado III o poco diferenciado tiene escasa o nula queratinización, anaplasia y el 75% de las células neoplásicas están indiferenciadas.<sup>45,46</sup>



### 3.3. Microambiente tumoral

Los organismos multicelulares están constituidos por células y matriz extracelular (MEC); donde las células tienen un papel fundamental en el funcionamiento de los tejidos y la MEC es esencial para el mantenimiento de la arquitectura de los mismos; ésta última proporciona andamios, señales de supervivencia y es un reservorio de factores de crecimiento, controlando así el ambiente celular local <sup>47</sup>; debido a que las células están directamente unidas a la MEC a través de receptores en la superficie celular, los cambios en el microambiente inmediato como: degradación o la deposición de diferentes componentes de la MEC; afectarán críticamente al comportamiento celular y al funcionamiento de los tejidos.<sup>48</sup> Bajo condiciones fisiológicas, las células toman el control para cambiar su microambiente y así satisfacer sus necesidades, cuando las células pierden el control sobre el microambiente, este se organiza incorrectamente afectando el comportamiento de ellas; la repetición o acumulación de eventos puede resultar en enfermedades como el cáncer, fibrosis, artritis y aterosclerosis.<sup>49</sup> La evidencia indica que el desarrollo y progresión del cáncer no solo dependerá de sus características genéticas sino también de las interacciones con el microambiente, donde las células neoplásicas malignas pueden alterar el estroma subyacente y a su vez, las células estromales pueden promover la progresión del cáncer, favoreciendo la diseminación y la invasión.

El desarrollo del tumor es causado por una acumulación de alteraciones genéticas; conduciendo a una dominancia clonal heterogénea del componente de invasión de células malignas.<sup>50</sup> La interacción entre las células epiteliales y mesenquimatosas es fundamental para la progresión tumoral (**Figura 2**). El papel del estroma tumoral es un punto clave y se ha convertido en un objetivo potencial para el tratamiento de intervención terapéutico.<sup>51</sup>

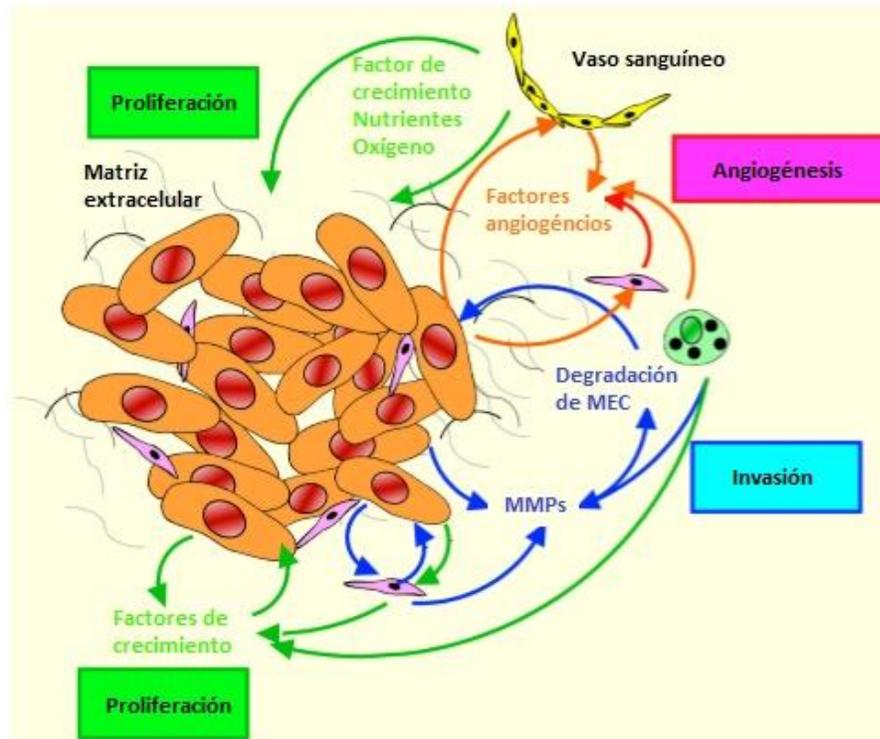


Figura 2. La interacción entre las células tumorales y el estroma en el COCE desencadena la sobreexpresión de factores de crecimiento que promueven el crecimiento del tumor, angiogénesis, degradación de la MEC facilitando la invasión y metástasis.<sup>54</sup>

El microambiente tumoral está conformado por las células neoplásicas, células epiteliales adyacentes, estroma, células del sistema inmune y la matriz extracelular (**Figura 3**). Los elementos celulares del microambiente tumoral a menudo coevolucionan con la neoplasia, donde los fibroblastos estromales, linfocitos T, macrófagos y otros tipos celulares desarrollan fenotipos anormales como una respuesta desorganizada ante la neoplasia.<sup>52,53</sup>

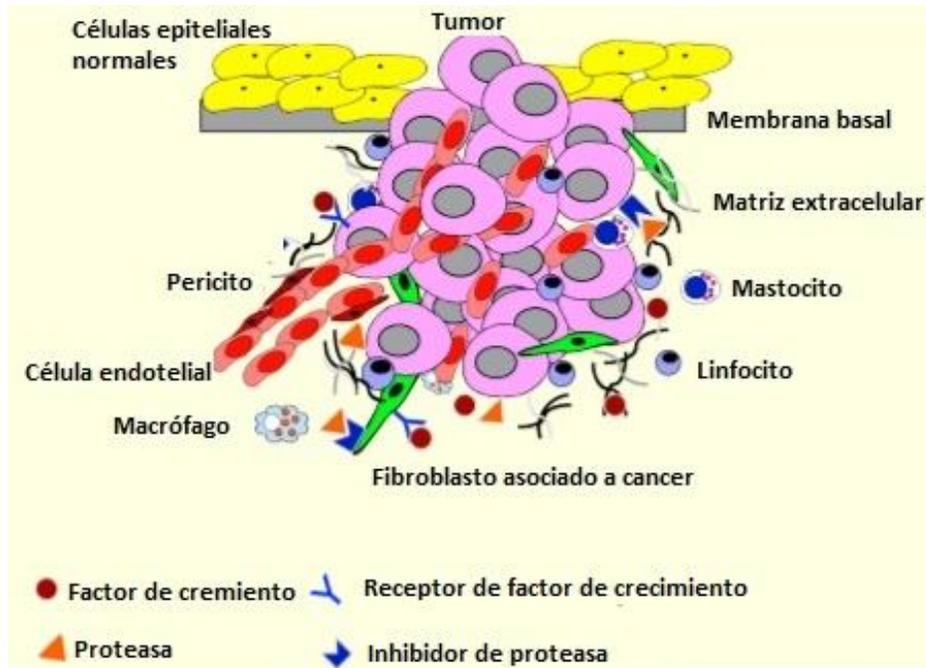


Figura 3. El microambiente comprende a diferentes elementos estromales en adición con las células neoplásicas.<sup>54</sup>



### 3.4. Fibroblastos asociados a cáncer o miofibroblastos

Posterior al daño tisular, los fibroblastos se diferencian a un tipo celular que adquiere capacidades contráctiles y secretoras, los miofibroblastos; los cuales en condiciones normales contribuyen al proceso de reparación del tejido durante la cicatrización. Cuando la contracción y secreción de proteínas de la MEC es excesiva la función orgánica puede verse severamente afectada como en las cicatrices hipertróficas, escleroderma, fibrosis renal y el cáncer.<sup>55</sup>

Los miofibroblastos son células multifuncionales que están presentes en tejido normal, como en septos alveolares, criptas intestinales y estroma de médula ósea.<sup>5</sup> Recientemente, los miofibroblastos son considerados células con un fenotipo híbrido con características de fibroblasto y célula de músculo liso.<sup>56</sup> Estas células derivan de diferentes progenitores mesenquimales tanto en procesos fisiológicos como patológicos, por ejemplo; durante el proceso de reparación los fibroblastos quiescentes, pericitos y células de músculo liso de paredes vasculares son fuentes celulares para la diferenciación miofibroblástica (**Figura 4**).<sup>57,58</sup> La transición epitelio-mesénquima o endotelio-mesénquima es una importante fuente de miofibroblastos, en la cual las células epiteliales o endoteliales diferenciadas pierden la expresión de proteínas como E (epitelial) y EV (endotelio vascular) caderina, CD31, ocluyente 1, mucina 1, desmoplaquinas y citoqueratina 18, y comienzan a expresar marcadores mesenquimales como vimentina, proteína específica de fibroblasto 1,  $\alpha$ -SMA, N-caderina, colágena tipo I y III, fibronectina, etc.<sup>59,60</sup> Se requieren al menos tres eventos para generar la diferenciación miofibroblástica y son: 1) acumulación de TGF- $\beta$ 1, 2) presencia de proteínas especializadas de la MEC como la fibronectina ED-A y 3) estrés extracelular.<sup>55</sup>

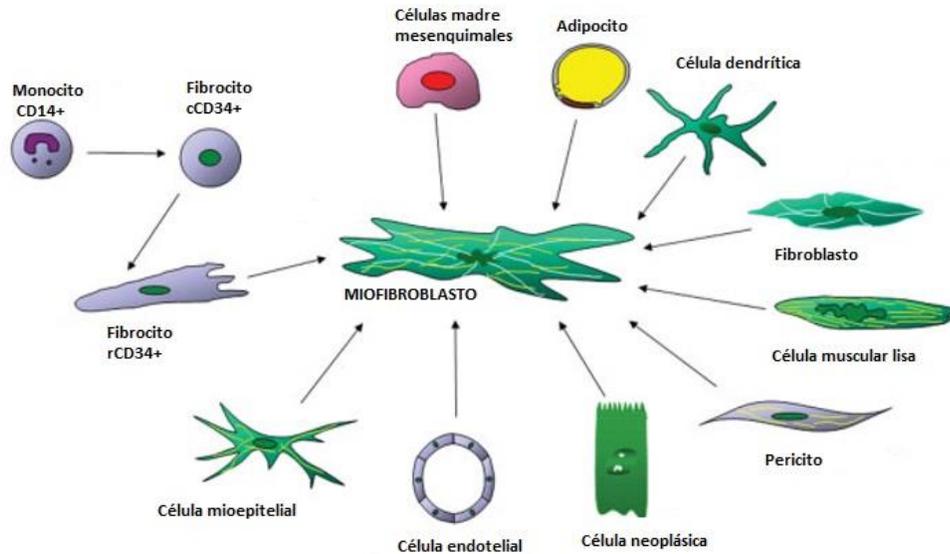


Figura 4. Múltiples fuentes celulares para la diferenciación miofibroblástica en el adulto.<sup>89</sup>

El cambio de fenotipo que presentan los fibroblastos en el estroma tumoral se ha estudiado desde 1970 y se han considerado como un componente fundamental del mismo estroma sobre todo en tumores sólidos como el carcinoma de mama, carcinoma hepatocelular y melanoma. Han recibido diferentes nombres como: fibroblastos peritumorales, fibroblastos estromales reactivos, fibroblastos asociados a cáncer o miofibroblastos. Morfológicamente, los miofibroblastos están caracterizados por la presencia de microfilamentos de actina asociados a proteínas contráctiles como la miosina no muscular, estas estructuras se denominan fibras de estrés. Los microfilamentos de actina terminan en la superficie del miofibroblasto en el fibronexo, que es un complejo de adhesión especializado con integrinas transmembrana que se unen internamente con la actina y extracelularmente con la fibronectina. Estas estructuras proveen un sistema de mecano-transducción, por lo que la fuerza generada por las fibras de estrés es transmitida a los componentes de la MEC y viceversa. Otra característica importante de los miofibroblastos es que están unidos directamente unos a otros por medio de uniones comunicantes (**Figura 5**).<sup>5,56,61,62</sup>

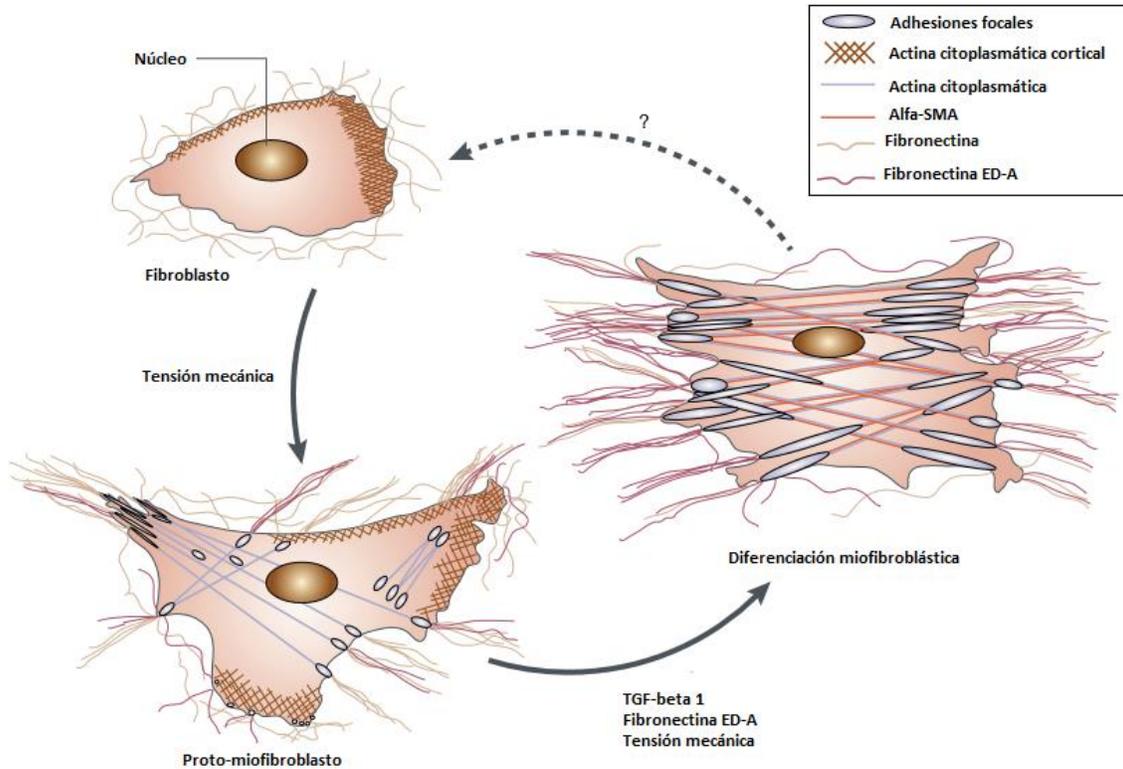


Figura 5. Modelo bifásico de diferenciación miofibroblástica.<sup>5</sup>

Está documentado que los miofibroblastos son participantes activos en el proceso de tumorigénesis, promoviendo el crecimiento y metástasis.<sup>63,64</sup> La trans-diferenciación de fibroblasto a miofibroblasto es un evento crucial y temprano en el proceso de carcinogénesis y está mediado por factores de crecimiento y citocinas expresadas por las células tumorales. Los factores genéticos y epigenéticos son capaces de afectar tanto al epitelio y lámina propia; se asume que la carcinogénesis es posible debido a una respuesta aberrante entre ambos componentes (**Figura 6**).<sup>65</sup>

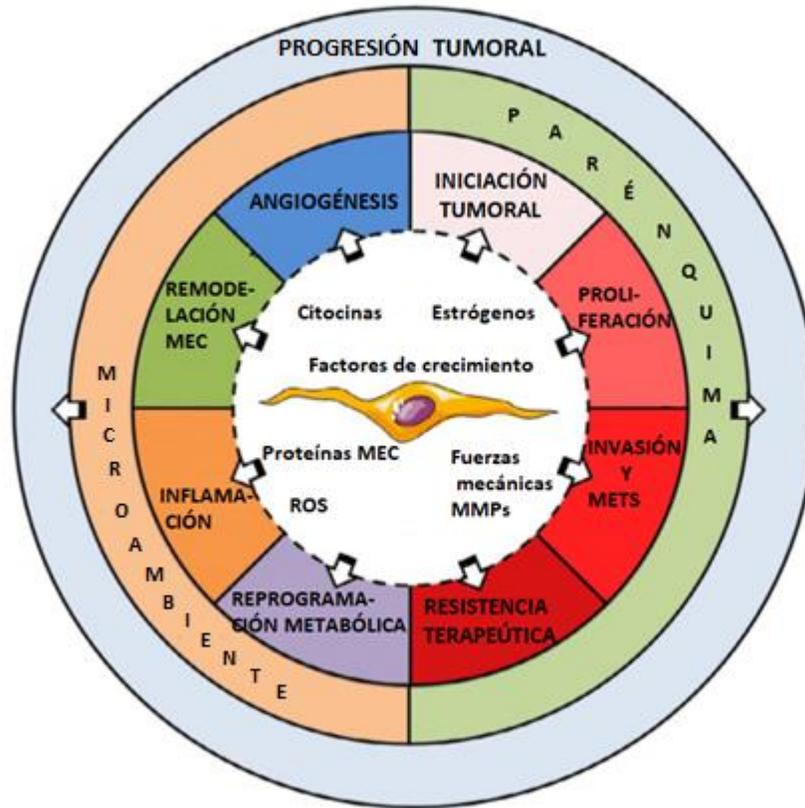


Figura 6. El miofibroblasto o fibroblasto asociado a cáncer ejerce múltiples efectos en todos los estadios del desarrollo tumoral así como diversos eventos microambientales que contribuyen a la progresión del cáncer.<sup>90</sup>



### 3.5. Factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF- $\beta$ 1)

La familia de citocinas del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) comprende a TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3, factores de crecimiento y diferenciación tales como activinas, inhibinas y proteínas morfogénicas óseas (BMPs). Estas moléculas juegan un papel crítico como reguladores multifuncionales de la proliferación y diferenciación de una amplia variedad de tipos celulares durante el desarrollo normal y anormal.<sup>66,67</sup>

Todos los miembros de la familia TGF- $\beta$  comparten motivos proteicos estructurales conservados y las vías de señalización se realizan por mecanismos similares. La señalización se inicia por unión al o del ligando a complejos tetraméricos formados por dos receptores de tipo I y dos receptores de tipo II, los cuales poseen actividad de serina-treonina y tirosina cinasa.

El TGF- $\beta$ 1 es un regulador de las actividades celulares con diversos efectos biológicos, sintetizado por diferentes células incluyendo linfocitos, macrófagos, fibroblastos, miocitos, condrocitos, astrocitos, células epiteliales, células de placenta y plaquetas, así como por algunas células tumorales (**Figura 7**).

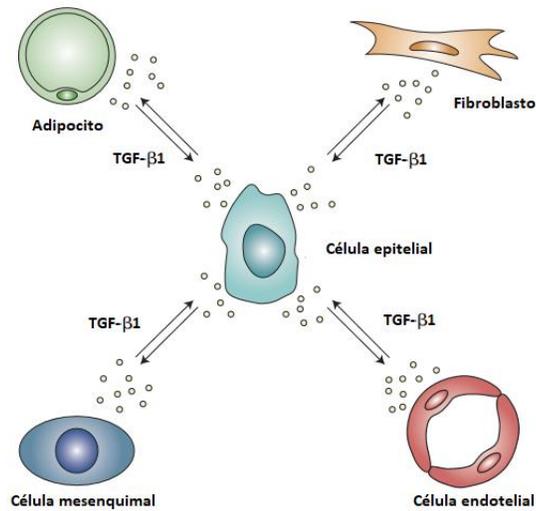


Figura 7. TGF- $\beta$ 1 es sintetizado por diversos tipos celulares y regula las actividades celulares con diversos efectos biológicos.<sup>91</sup>

El TGF- $\beta$ 1 puede actuar como un mitógeno indirecto sobre células mesenquimales o como estimulador de la síntesis de proteínas de la MEC, es también un potente inhibidor de la proliferación de células epiteliales, linfoides, endoteliales y mieloides. A partir de los estadios tempranos de la carcinogénesis, el TGF- $\beta$ 1 actúa como un supresor tumoral; sin embargo, con la progresión tumoral las células presentan una sobreproducción de este factor lo que provoca un incremento en la proliferación e invasión celular así como en la metástasis. Se han detectado cantidades elevadas de TGF- $\beta$ 1 en plasma en pacientes con cáncer y se ha empleado como un predictor temprano de metástasis. La presencia de este factor en el microambiente tumoral promueve el crecimiento del tumor mediante el acondicionamiento del estroma mejorando el soporte y angiogénesis, así como disminuyendo la vigilancia inmunológica.<sup>68,69,70</sup>



En diversas investigaciones se ha descrito el papel clave que tiene el TGF- $\beta$ 1 en la diferenciación miofibroblástica tanto in vivo como in vitro, mediante la inducción a la expresión de filamentos de  $\alpha$ -SMA así como uno de los principales promotores de la transición epitelio mesénquima. La diferenciación miofibroblástica inducida por TGF- $\beta$ 1 está mediada por vías de señalización dependientes de Smad y no dependientes de Smad.<sup>71</sup> El TGF- $\beta$ 1 generalmente se libera en una forma biológicamente latente (L-TGF- $\beta$ 1), que se almacena en la matriz extracelular, mediante el factor de unión a L-TGF- $\beta$ 1. Después de la escisión del factor de unión, el TGF- $\beta$ 1 se convierte en su forma activa, la cual se une a los receptores transmembranales tipo I y II conduciendo al ensamblaje de un complejo receptor con actividad serina / treonina (**Figura 8**). La subunidad del receptor tipo I se une y activa una serie de Smad. Estos posteriormente forman un complejo transcripcional con co-Smads para trasladarse al núcleo y activar la transcripción de los genes diana. La ruta de señalización de Smad es responsable del aumento de la expresión de PAI-1, colágeno tipo I y  $\alpha$ -SMA. Se ha identificado un elemento de respuesta a TGF- $\beta$ 1 que tiene una secuencia diferente a la conocida para la unión de Smad en el promotor de  $\alpha$ -SMA y parece ser esencial para la expresión de esta proteína en los miofibroblastos, sin embargo se desconoce el mecanismo por el cual se da la activación.<sup>5</sup>

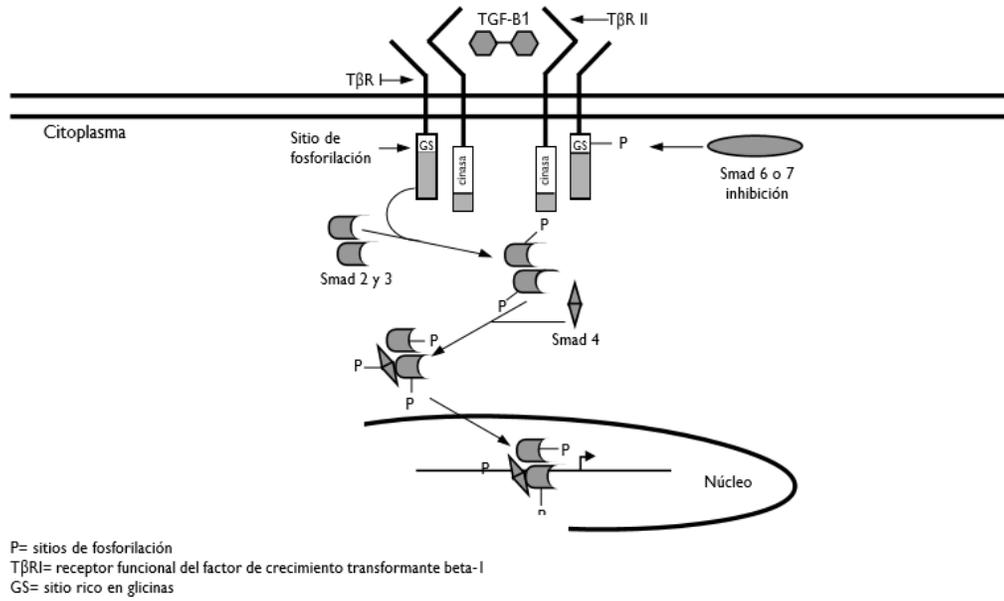


Figura 8. Modelo de la vía de transducción de señal inducida por el TGF-β1.<sup>66</sup>



### 3.6. Metaloproteinasa de membrana tipo 1 (MMP-T1 o MMP14)

La membrana basal y el estroma tumoral son barreras físicas y químicas que detienen el crecimiento del tumor, evitando su diseminación. Durante la carcinogénesis esta barrera es degradada e interrumpida por las células malignas facilitando la invasión y migración, adquiriendo movilidad para emigrar por la red vascular y colonizar sitios a distancia. Para que esto suceda, las células neoplásicas malignas deben: 1) desarrollar la capacidad de movilidad; 2) alterar la adhesión celular y 3) remodelar la matriz extracelular.<sup>53</sup>

El principal sistema enzimático implicado en los procesos de invasión y metástasis del COCE es la familia de las metaloproteinasas (MMP), estas endopeptidasas proteolíticas están involucradas en la remodelación de la estructura de la matriz extracelular (MEC) así como de la transmisión de señales entre células. De este modo, las MMPs controlan y regulan la migración celular, proliferación, apoptosis, invasión tumoral, diseminación y angiogénesis.<sup>72</sup> Las MMPs se describen como enzimas con multi-dominios dependientes de zinc, cuya función principal es degradar los componentes de la MEC.<sup>73</sup> De acuerdo a sus diferencias estructurales, éstas se han clasificado en colagenasas, gelatinasas, estromelinas, matricilinas y MMPs asociadas a membrana.<sup>74</sup> Las MMPs solubles son secretadas por las células en el medio extracelular y pueden difundirse a sitios lejanos. Por lo tanto, se piensa que este tipo de MMPs son útiles para la degradación de la MEC en áreas más amplias, por ejemplo, en la resorción de tejido. Por otra parte, las MT-MMPs se expresan en la superficie celular como proteínas transmembrana de tipo I o proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI), debido a esto, sólo pueden actuar en el espacio pericelular.<sup>75,76</sup> La distribución estricta de las MT-MMPs proporciona a estas enzimas una propiedad funcional única, ya que pueden alterar el microambiente inmediato que rodea a las células.<sup>77</sup> Recientemente se ha dado atención a la MT1-MMP; porque esta enzima afecta las funciones celulares en forma variable. Como todas las proteínas, la producción intracelular



de MMPs puede ser regulada a nivel transcripcional, mientras que la expresión es regulada por factores de crecimiento, hormonas, etc.

La metaloproteínasa de membrana tipo 1 (MT1- MMP) es una enzima proteolítica pericelular dirigida contra los componentes de la MEC; comparte una estructura común con otros miembros de la familia MMPs, formada por un pre/pro péptido, un dominio catalítico, una región bisagra, un dominio hemopexina, una región de tallo, un dominio transmembrana y una cola citoplásmica (**Figura 9**).<sup>75,77,78,79</sup> Al igual que otras MMPs, la enzima se produce como zimógeno y requiere una etapa de activación para eliminar proteolíticamente el propéptido.<sup>80,81</sup> De este modo, la activación de MT1-MMP tiene lugar durante la secreción en el aparato de Golgi , y la enzima se expresa en la superficie celular en su forma activa.<sup>82</sup> La MT1-MMP puede degradar una serie de macromoléculas de la MEC incluyendo las colágenas I, II y III, gelatina, lamininas 1 y 5, fibronectina, vitronectina, agregano, fibrina y lumicano.<sup>83,84,85,86</sup> Las MMP 2 y 13 pueden ser activadas por medio de la MT1-MMP<sup>87</sup> y la expresión de MT1-MMP sobre la superficie celular, junto con las MMP que activa, generan un amplio espectro de enzimas proteolíticas en el espacio pericelular y que permite cambios en el microambiente celular que pueden resultar en modificación de la función celular (**Figura 10**).

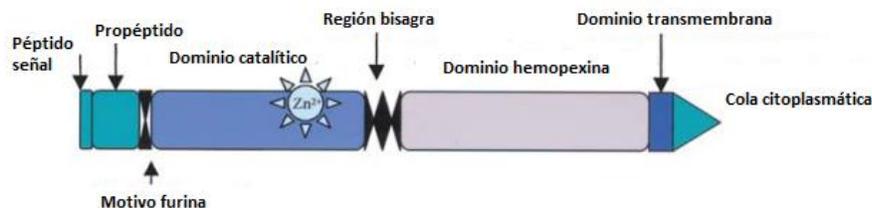


Figura 9. Estructura básica de la MT1-MMP.<sup>72</sup>



En una amplia variedad de tipos celulares, la MT1-MMP se emplea para activar el entorno y promover la remodelación del tejido, invasión y metástasis. La sobreexpresión de la MT1-MMP en tumores malignos está relacionada con un mal pronóstico y baja supervivencia; debido a que ésta enzima mejora la capacidad de invasión de las células tumorales en ensayos de migración en Matrigel. El silenciamiento del gen de MT1-MMP por medio de RNA de interferencia en células tumorales provoca la disminución de expresión, siendo esto suficiente para inhibir significativamente la invasión en Matrigel. Estos hallazgos sugieren que la MT1-MMP en efecto es un elemento crítico de la maquinaria de invasión.

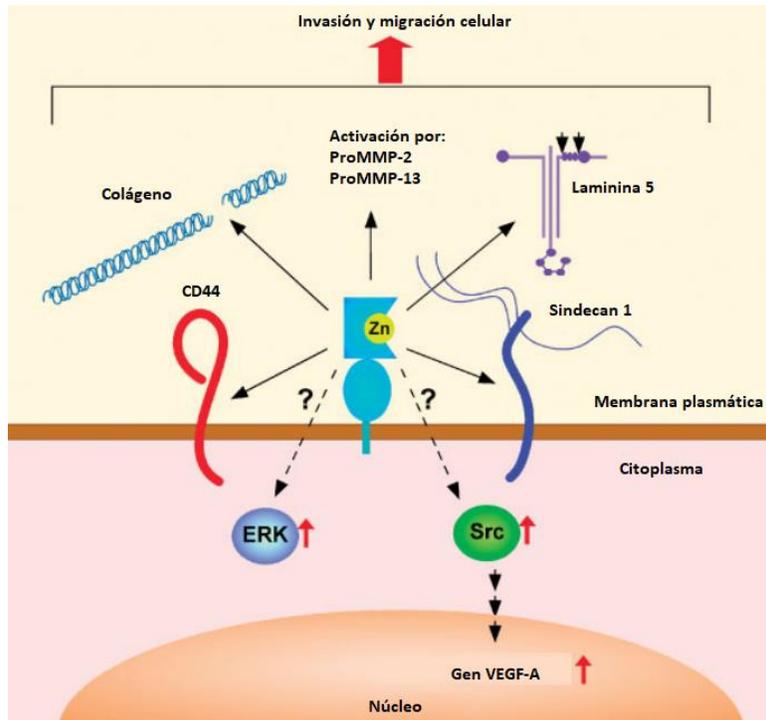


Figura 10. Funciones biológicas de MT1-MMP las cuales promueven la migración e invasión celular.<sup>76</sup>



#### 4. Planteamiento del problema.

El COCE sigue siendo una enfermedad mortal y deformante a pesar de los avances en el manejo terapéutico. La intervención temprana durante el proceso de la carcinogénesis, mejora los resultados y podría reducir sustancialmente la morbilidad y la mortalidad. Aunque la detección clínica de los trastornos potencialmente malignos es relativamente sencilla, la principal problemática es que la progresión a COCE es impredecible, y que los tumores malignos pueden surgir en el mismo sitio donde previamente se identificó la lesión precursora o como un carcinoma de novo en sitios distintos.

Durante la progresión y la invasión de un carcinoma, las células neoplásicas activan el tejido conjuntivo subyacente, generando así un estroma fenotípicamente alterado y específico, que probablemente influya en la migración y en el patrón de invasión de las células neoplásicas malignas. La identificación del intercambio de citocinas como el TGF- $\beta$ 1, proteínas de la matriz extracelular como  $\alpha$ -SMA y enzimas como la MT1-MMP entre las células estromales y las neoplásicas promueven directamente el crecimiento, proliferación y supervivencia de las mismas, y la proteólisis local de la matriz extracelular ayudando a la invasión tumoral así como al proceso de carcinogénesis de TPMs hacia COCE.

#### 5. Justificación.

La interacción entre las células epiteliales y mesenquimatosas es fundamental para la progresión tumoral. El papel del estroma y del parénquima tumoral es un punto clave que se ha convertido en un objeto potencial para determinar el pronóstico y tratamiento de los pacientes con DEO y COCE.

#### 6. Pregunta de investigación.

¿Cuáles son las diferencias en la inmunexpresión de  $\alpha$ -SMA, TGF-  $\beta$ 1 y MT1-MMP en el microambiente de las displasias epiteliales orales y el COCE?

#### 7. Hipótesis.

La inmunexpresión de  $\alpha$ -SMA, TGF-  $\beta$ 1 y MT1-MMP se encuentra incrementada durante el proceso de carcinogénesis en los diferentes grados de DEO y COCE.

#### 8. Objetivo general.

Determinar la expresión de los marcadores  $\alpha$ -SMA, TGF-  $\beta$ 1 y MT1-MMP a través de reacciones inmunohistoquímicas en DEO y COCE.



## 9. Objetivos específicos.

- Determinar la prevalencia de los COCEs y DEO por edad, sexo y localización.
- Establecer el grado de diferenciación de los COCEs según la clasificación de Broders.
- Establecer el grado de diferenciación de las displasias según la clasificación de la OMS.
- Determinar la intensidad de inmunexpresión de  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$ 1 y MT1-MMP en los diferentes grados de displasias orales.
- Determinar la intensidad de inmunexpresión de  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$ 1 y MT1-MMP en los diferentes grados COCE.
- Identificar la distribución de la población de miofibroblastos en las displasias orales y el COCE con el inmunomarcador  $\alpha$ -SMA.
- Cuantificar la población de miofibroblastos en las displasias orales y el COCE con el inmunomarcador  $\alpha$ -SMA.
- Comparar el inmunofenotipo de los diferentes grados de displasia con respecto al COCE.

## 10. Diseño del estudio.

### 10.1. Tipo de estudio.

Se realizó un estudio observacional transversal analítico prospectivo.

### 10.2. Universo de estudio.

Todos los casos con diagnóstico histopatológico de displasia epitelial leve, moderada o severa y carcinoma oral de células escamosas del Laboratorio de Patología Clínica y Experimental de la División de Estudios de Posgrado de Investigación de la Facultad de Odontología UNAM.

### 10.3. Tamaño de la muestra.

La selección de la muestra fue la total disponible. Se revisaron las solicitudes y los diagnósticos histopatológicos del archivo del laboratorio del año 2005 al 2015, basados en el diagnóstico emitido por los patólogos bucales adscritos; se obtuvieron 115 displasias epiteliales orales y 110 COCEs. Se solicitaron y localizaron las laminillas de los casos, las cuales fueron revaloradas para corroborar el diagnóstico de acuerdo a los criterios diagnósticos seleccionados: criterios de malignidad de la OMS para las displasias epiteliales y la clasificación de Broders para los COCEs.



#### 10.4. Criterios de inclusión.

- Bloques de parafina con diagnóstico histopatológico de displasia epitelial y COCE.
- COCE cuyo tratamiento primario haya sido resección quirúrgica.
- COCE localizado en cavidad bucal exceptuando los labios.
- Bloques de parafina con suficiente cantidad de tejido para realizar los cortes histológicos.

#### 10.5. Criterios de exclusión.

- COCE con tratamiento de radioterapia y quimioterapia adyuvantes.
- Bloques de parafina con insuficiente material biológico para realizar los cortes histológicos.

### 11. Variables.

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Categoría
Carcinoma oral de células escamosas Independiente cualitativa	Neoplasia epitelial invasiva con variedad en los grados de diferenciación escamosa con predisposición a metástasis temprana y extensa a nódulos linfáticos. <sup>30</sup>	Clasificación de Broders  Grado I: 25% de las células malignas están diferenciadas. Grado II: 50% de las células malignas están indiferenciadas. Grado III: 75% de las células malignas están indiferenciadas.	Clasificación de Broders  1.Grado I 2.Grado II 3.Grado III
Displasia epitelial Independiente cualitativa	Se definen como epitelio alterado con una mayor probabilidad para la progresión a carcinoma de células escamosas. El epitelio alterado muestra una variedad de cambios citológicos y arquitectónicos. <sup>30</sup>	Clasificación de la OMS 2017: Displasia de bajo grado: Alteraciones en la arquitectura limitadas al tercio inferior del epitelio acompañado de atipia citológica. Displasia de alto grado: Alteraciones en la arquitectura en más de dos tercios del epitelio con atipias citológicas asociadas.	Clasificación de la OMS 2017:  1.Bajo grado 2.Alto grado



<p>Expresión de <math>\alpha</math>- SMA Dependiente cualitativa</p>	<p>Proteína que se encuentra formando los microfilamentos del citoesqueleto, consta de 6 isoformas, que varían en la secuencia de aminoácidos, pero tienen la misma masa molecular de 42KDa.<sup>88</sup></p>	<p>Se tomaron como células positivas las que presentaron tinción de color marrón, categorizadas de acuerdo a su intensidad de expresión. Se tomaron en cuenta tres parámetros para su análisis.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Porcentaje de células positivas.</li> <li>• Intensidad del inmunomarcaje.</li> </ul> <p>Índice de la expresión</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Nula</li> <li>2. Leve</li> <li>3. Moderada</li> <li>4. Severa</li> </ol>
<p>Expresión de TGF-<math>\beta</math>1 Dependiente cualitativa</p>	<p>Proteína homodimérica producida por plaquetas, células endoteliales, linfocitos, etc, que participa en la regulación de la proliferación y diferenciación de una amplia variedad de tipos celulares.<sup>88</sup></p>	<p>Se tomaron como células positivas las que presentaron tinción de color marrón, categorizadas de acuerdo a su intensidad de expresión. Se tomaron en cuenta tres parámetros para su análisis.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Porcentaje de células positivas.</li> <li>• Intensidad del inmunomarcaje.</li> </ul> <p>Índice de la expresión</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Nula</li> <li>2. Leve</li> <li>3. Moderada</li> <li>4. Severa</li> </ol>
<p>Expresión de MT1-MMP Dependiente cualitativa</p>	<p>Metaloproteasa transmembrana que juega un papel importante en la remodelación de la matriz extracelular, directamente mediante la degradación de varios de sus componentes y la activación indirectamente por pro-MMP2.<sup>88</sup></p>	<p>Se tomaron como células positivas las que presentaron tinción de color marrón, categorizadas de acuerdo a su intensidad de expresión. Se tomaron en cuenta tres parámetros para su análisis.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Porcentaje de células positivas.</li> <li>• Intensidad del inmunomarcaje.</li> </ul> <p>Índice de la expresión</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Nula</li> <li>2. Leve</li> <li>3. Moderada</li> <li>4. Severa</li> </ol>



## 12. Materiales y métodos.

### 12.1. Histoquímica.

Se solicitaron cortes histológicos de 4  $\mu\text{m}$  de grosor con un total de 5 lamillas; de las cuales 1 se empleó para la tinción de rutina con H&E y cuatro para realizar la técnica de inmunohistoquímica para cada uno de los marcadores seleccionados. Las laminillas teñidas con H&E se utilizaron para el análisis histopatológico de la determinación del tipo de displasia y el grado de diferenciación de los COCEs. Se diseñaron dos formatos de recolección de datos (**Anexo 1 y 2**) para cada una de las entidades a estudiar, los cuales se utilizaron para realizar la prueba de concordancia inter e intra observador entre la tutora y la alumna, la comparación de los datos se realizó mediante la prueba estadística Kappa. Para la estandarización se seleccionaron 14 displasias epiteliales orales y 14 COCEs al azar. Las observaciones se realizaron con un fotomicroscopio Leica DM750 y el software Leica LAZ y se determinaron los criterios de cada una de las clasificaciones anteriormente mencionadas.

### 12.2. Inmunohistoquímica

La técnica de tinción de inmunohistoquímica se estandarizó para cada uno de los anticuerpos y determinar la dilución adecuada. Se utilizaron como controles positivos: intestino delgado, colon y amígdala. El procedimiento consistió en desparafinar en xilol las laminillas y rehidratar en baños secuenciales de alcohol a diferentes concentraciones y lavar en agua destilada desionizada, se realizó la recuperación antigénica en buffer de citratos con pH 6 al 0.1M y se llevó al horno de microondas por 5 minutos a potencia 100 y 15 minutos a potencia 50 en baño maría. Se realizaron 3 lavados con PBS (buffer fosfato salino) cada uno por 3 minutos, se inhibió la actividad de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% incubándolos por 20 minutos en cámara húmeda; se hicieron 3 lavados de PBS por 3 minutos y enseguida se permeabilizó con Tritón-X10 al 0.2% durante 20 minutos y se lavaron nuevamente 3 veces con PBS de 3 minutos. Posteriormente se realizó la incubación para el



bloqueo de marcaje inespecífico con PBS-albúmina al 0.2% durante 20 minutos en cámara húmeda, se realizaron 3 lavados de PBS de 3 minutos. Se colocaron los anticuerpos primarios (SMA, Vimentina, TGFB1, MT1-MMP) a diferentes diluciones (1:50, 1:100, 1:200, 1:400) durante toda la noche a 4°C. Después de la incubación con el anticuerpo primario se realizaron 3 lavados de 3 minutos para incubar el anticuerpo secundario.

El anticuerpo secundario utilizado fue anti-mouse/rabbit que se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente y 3 lavados en PBS de 3 minutos, se prosiguió a la incubación con HRP en cámara húmeda por 10 minutos seguido de 3 lavados con PBS de 3 minutos. Se empleó diaminobencidina (DAB) como cromógeno y se colocó a cada tejido durante 5 minutos. Después de aplicar el cromógeno se lavaron las laminillas con agua corriente para realizar la contratinción con hematoxilina y ser de nuevo lavados con agua corriente y deshidratados con alcohol y xilol a diferentes concentraciones para el montaje con resina hidrofóbica.

En la **Tabla 3** se muestran los clones y diluciones de los anticuerpos primarios que serán utilizados. En la **Tabla 4** se muestran los tejidos que se utilizaron como control positivo y los anticuerpos que se les aplicó.

**Tabla 3. Clona y dilución de los anticuerpos primarios**

<b>Alfa-SMA</b>	SC-53015	1:400
<b>Vimentina</b>	6023	1:400
<b>TGF beta 1</b>	SC-146	1:200
<b>MT1-MMP</b>	SC-30074	1:800

**Tabla 4. Controles positivos**

Tejido	Anticuerpo aplicado
Intestino delgado	Alfa – SMA
Amígdala	Vimentina
Amígdala	TGF beta 1
Colon	MT1-MMP

### 12.3. Análisis de la inmunoreacción

La inmunoreacción de las células se analizó por medio del programa ImagenJ® versión 1.46, ajustado a la escala micrométrica, en un microscopio óptico de la marca Leica DM750 con cámara digital para el análisis de imagen por computadora seleccionado para fines de este estudio, el número total de células por campo, el porcentaje de células positivas, la densidad óptica de inmunomarcaje y el índice digital de la expresión.

Se tomaron 5 fotomicrografías a 40x, en las cuales se contó el número de células con inmunoexpresión positiva (citoplasmática y/o membranal) en el estroma y parénquima así como en las displasias epiteliales así como de los COCEs; utilizando para tal fin la herramienta “Multi point”. Las imágenes con inmunoexpresión positiva se convirtieron a escala de grises y cambio de pixelaje a 2.0 para obtener la densidad óptica (DO). De acuerdo a la densidad óptica se gradificaron en: 13-50 DO como inmunoexpresión intensa; 51-89 DO como moderada; 90-150 leve y los valores por encima de 150 fueron considerados nulos.

### 12.4. Análisis estadístico

Se utilizó una prueba de análisis estadístico no paramétrica de Kruskal Wallis para la comparación del número de células positivas a los inmunomarcadores entre los múltiples grupos. Para las comparaciones entre los grupos se utilizó una prueba Post hoc (U de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni). Se consideró significativo un valor de p de 0.05. El software que se utilizó para el análisis de fue SPSS Statistics Versión 22.



### 13. Resultados

Del período comprendido de 2010-2015 en el Laboratorio de Patología Clínica y Experimental de la DEPEI FO, UNAM tuvimos un registro histopatológico de un total de 115 DEO y 110 COCEs.

En las displasias epiteliales orales el promedio de edad de los pacientes fue de 58 años  $\pm 16.06$ , con una mínima de 21 años y una máxima de 91. Los pacientes menores de 45 años correspondieron al 19.1% y los mayores de 45 años representaron el 80.8%; de los cuales, 58 casos (50.4%) correspondió al sexo femenino (promedio de edad 59.1 años  $\pm 14.8$ , rango 23 a 91 años), 57 casos (49.6%) al masculino (promedio de edad 56.9 años  $\pm 17.2$ , rango 21 a 86 años). Las regiones anatómicas involucradas fueron: 50 casos (43.5%) en borde lateral de lengua, 28 (24.3%) en encía, 19 (16.5%) en mucosa yugal, 11(9.6%) en paladar y 7 (6.1%) en piso de boca. En cuanto al diagnóstico histopatológico 44 (39.1%) fueron displasias epiteliales de bajo grado mientras que 70 (60.8%) correspondieron a displasias de alto grado.

En los carcinomas orales de células escamosas el promedio de edad de los pacientes fue de 64 años  $\pm 16.6$ , con una edad mínima de 19 años y máxima de 98 años. Los pacientes menores de 45 años correspondieron al 14.5% y los mayores de 45 años representaron el 85.4%. De ellos, 61 (55.4%) fueron sexo femenino (promedio de edad 64.7 años  $\pm 14.3$ , rango 26 a 95 años), y 49 (44.5%) del sexo masculino (promedio de edad de 63 años  $\pm 19.2$ , rango 19 a 98 años). Las zonas anatómicas involucradas fueron: borde lateral de lengua 53 casos (48.2%), encía 33 (30%), mucosa yugal 10 (9.1%), 10 (9.1%) en paladar y 4 (3.6%) en piso de boca. En relación al diagnóstico histopatológico 71 casos (64.5) correspondieron a COCE bien diferenciado, 29 (26.4%) moderadamente diferenciado y 10 (9.1%) poco diferenciado.



Para este estudio se seleccionaron 74 casos de DEO y 68 casos de COCEs que cumplieron con los criterios de inclusión. Las observaciones histológicas fueron realizadas por la tutora (observador 1) y alumna (observador 2), y registradas y analizadas (**anexos 1 y 2**) de acuerdo a los parámetros establecidos para displasias (criterios de malignidad de la OMS) y los COCEs (Clasificación de Broders) respectivamente. Se utilizó la prueba coeficiente Kappa para valorar la concordancia intra e interobservador. El observador 1 obtuvo un valor kappa de concordancia intraobservador de 0,90, mientras que el observador 2 fue de 0,89. Los valores interobservador del observador 1 con respecto al observador 2 para las displasias fueron de 0,88 y para los carcinomas de 0,91.

### 13.1. Inmunoexpresión de $\alpha$ -SMA en displasia epitelial oral y carcinoma oral de células escamosas.

La proteína  $\alpha$ -SMA presentó diversos grados de expresión en las displasias epiteliales así como en los COCEs. Las displasias epiteliales de bajo grado (DBG) tuvieron una expresión nula en la totalidad de los casos (25); con excepción de la capa muscular de los vasos sanguíneos que fungió como control positivo interno; mientras que para las displasias epiteliales de alto grado (DAG) el 34% (17 casos) tuvieron expresión positiva: 94% (16 casos) expresó levemente la proteína y 1 caso tuvo una expresión moderada, dicha expresión correspondió a un patrón subepitelial de células aisladas. En los COCEs bien diferenciados el 55.5% (20 casos) tuvieron expresión positiva citoplasmática en las células estromales en una disposición alrededor de las islas de células neoplásicas; de los cuales, el 55% (11 casos) tuvo una intensidad de expresión leve, 35% (7 casos) fueron moderadamente positivos y el 15% (3 casos) intensamente positivos. El 68.1% (15 casos) de COCEs diagnosticados como moderadamente diferenciado mostraron positividad; siendo el 26.6% (4 casos) levemente positivos, 22.7% (5 casos) moderadamente positivos y el 40% (6 casos) intensamente positivos. Por último, el 100% (10 casos) de los COCEs poco diferenciados fueron positivos a



la proteína, expresándose de forma moderada el 30% (3 casos) e intensamente el 70% (7 casos). Los 68 COCEs, independientemente de su grado de diferenciación mostraron el mismo patrón de distribución de miofibroblastos alrededor de las islas de células epiteliales. En la **figura 11** se muestra la expresión de  $\alpha$ -SMA en las displasias y COCEs.

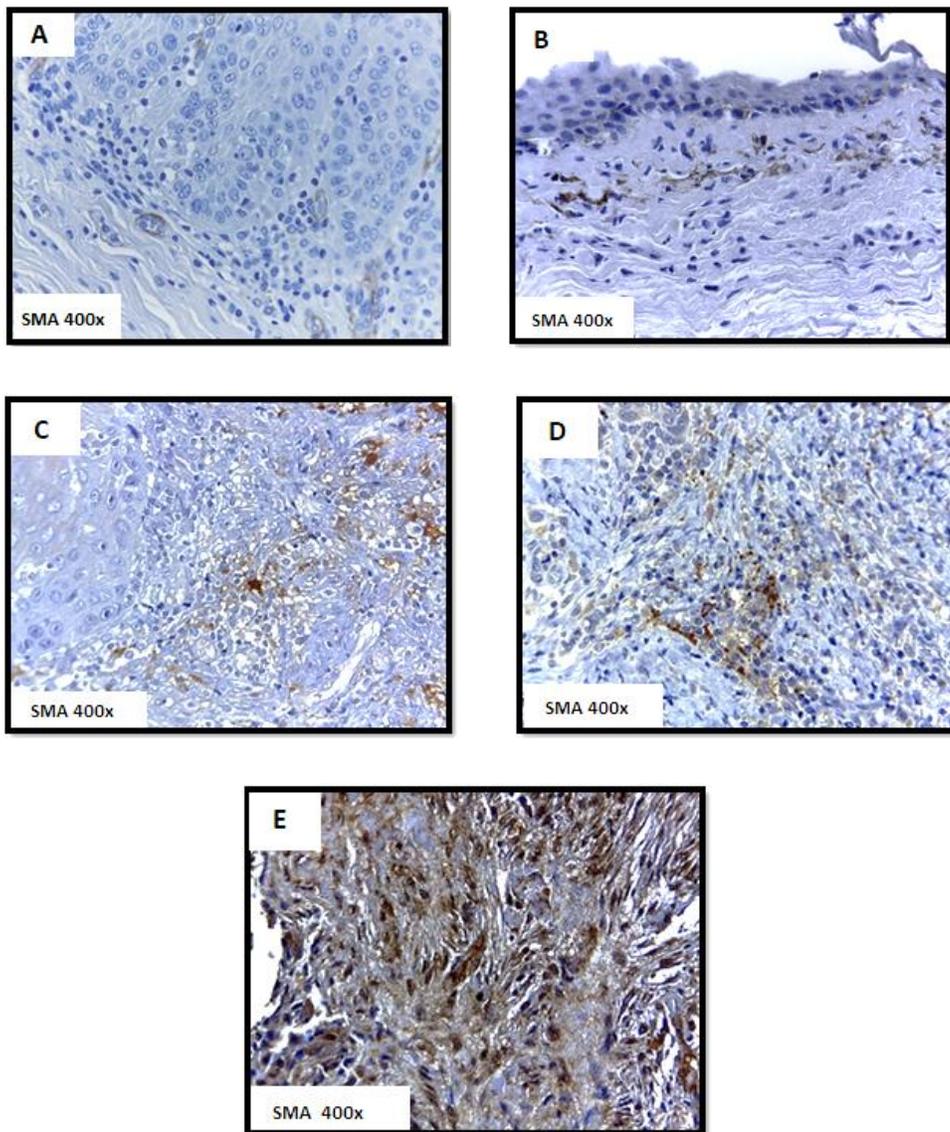


Figura 11. Intensidad y distribución de la expresión de  $\alpha$ -SMA en las DBG (A), DAG (B), COCE bien diferenciado (C), COCE moderadamente diferenciado (D) y COCE poco diferenciado (E).

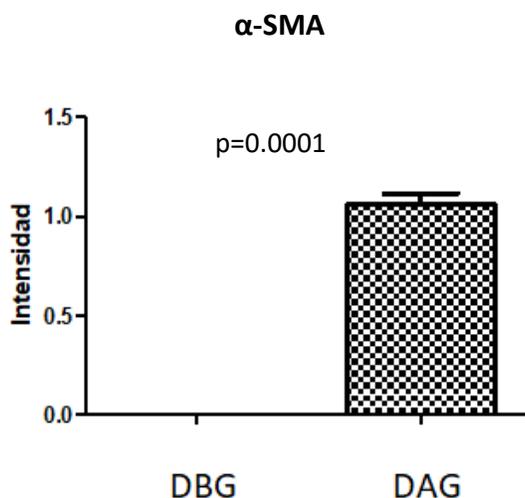
**Tabla 5. Expresión de  $\alpha$ -SMA en el total de las lesiones en estudio.**

Grupos	N	Casos positivos $\alpha$ -SMA	Expresión leve $\alpha$ -SMA	Expresión moderada $\alpha$ -SMA	Expresión intensa $\alpha$ -SMA
Displasia bajo grado	25	0	0	0	0
Displasia alto grado	49	17 (34%)	16 (94%)	1 (5.8%)	0
COCE bien diferenciado	36	20 (55.5%)	11 (55%)	7 (35%)	3 (15%)
COCE moderadamente diferenciado	22	15 (68.1%)	4 (26.6%)	5 (22.7%)	6 (40%)
COCE poco diferenciado	10	10 (100%)	0	3 (30%)	7 (70%)

Nulo= 0 células positivas, leve=1-33% células positivas, moderado=34-66% células positivas, intenso=67-100% células positivas.

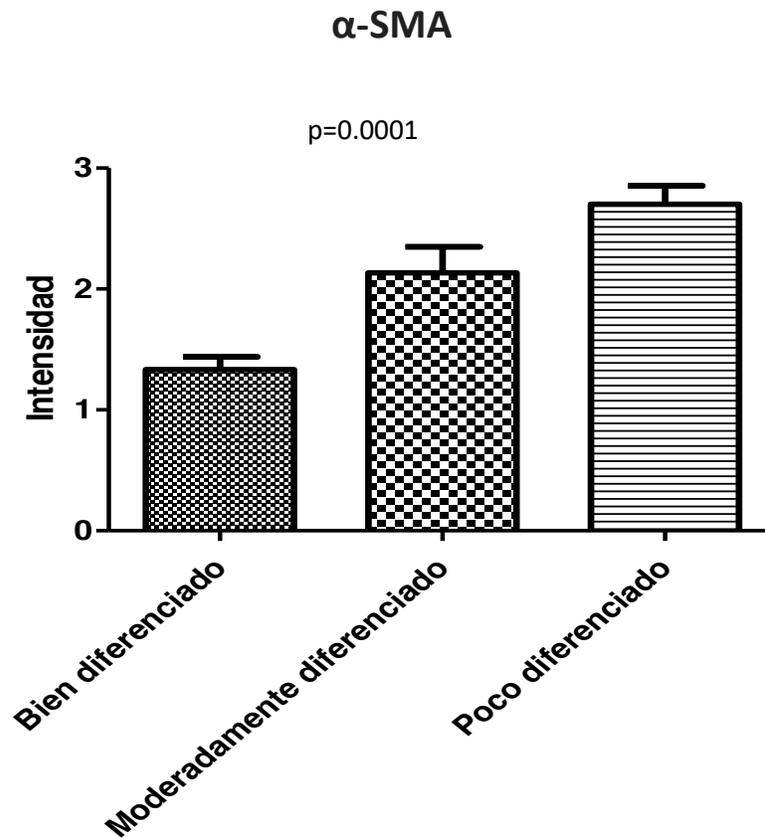
*Fuente directa*

La prueba de U-Mann Whitney mostró diferencias estadísticamente significativas en la expresión de  $\alpha$ -SMA entre los diferentes grados de displasia epitelial oral. La expresión de  $\alpha$ -SMA fue significativamente ( $p=0.0001$ ) más elevada en la DAG con respecto a las de DBG.

**Gráfica 1.**Gráfica 1. Intensidad de expresión de  $\alpha$ -SMA en DBG y DAG.



La prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencias estadísticamente significativas en la expresión de  $\alpha$ -SMA entre los diferentes grados de COCE ( $p= 0.0001$ ). La expresión de  $\alpha$ -SMA fue significativamente más alta en COCE moderadamente y poco diferenciado en comparación con el bien diferenciado ( $p = 0.0001$ ). **Gráfica 2.**



Gráfica 2. Intensidad de expresión de  $\alpha$ -SMA en COCE.



### 13.2. Análisis de la inmunexpresión de MMP-14 en displasias epiteliales orales y carcinoma oral de célula escamosas

La expresión de la proteína de membrana MMP-14 en las DBG fue positiva en el 92% de la muestra (23 casos) con una intensidad leve y una distribución predominantemente mixta (epitelio y estroma) en el 73.9% (17 casos), 13.04% (3 casos) con expresión epitelial y 13.04% (3 casos) con expresión estromal. Las DAG fueron positivas en el 77.5% (38 casos), con una expresión leve en las células epiteliales en el 50% (19 casos), el 42.1% (16 casos) tuvo una expresión tanto en las células epiteliales como en las mesenquimatosas y el 7.8% (3 casos) expresó la proteína en un patrón estromal. En la **Figura 12** se muestran la inmunexpresión de la MMP-14 en las displasias epiteliales orales.

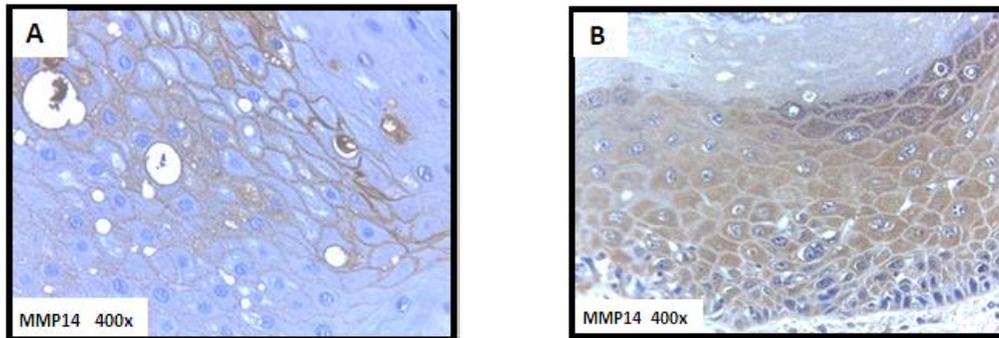


Figura 12 . Patrón e intensidad de expresión de MMP14 en las DBG en una disposición membranosa y citoplásmica en las células epiteliales (A). En las DAG observamos un patrón citoplásmico con expresión moderada (B).



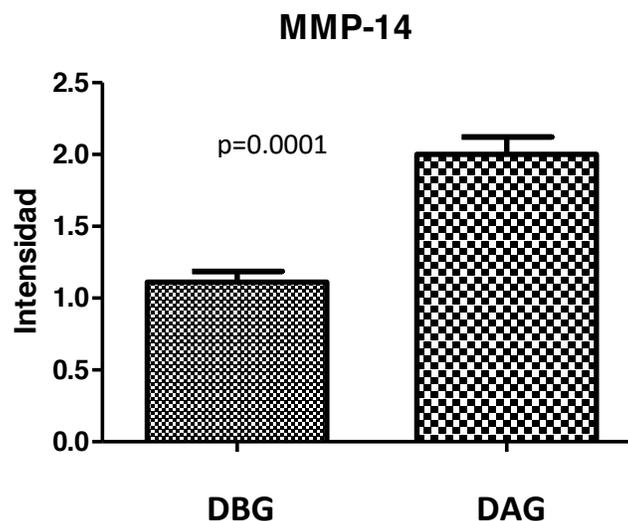
La intensidad de expresión para la MMP14, media y desviación estandar (DE) de la densidad óptica de las DBG y DAG se muestran en la **tabla 6**.

Tabla 6. Expresión de MMP14 en displasias epiteliales orales		
Intensidad, Media y DE	DBG	DAG
Intensidad de expresión	+	++
Media densidad óptica	96.4	78.8
Desviación estandar	±19	±14.6

Nulo=-,Leve=+,Moderado=++,Intenso=+++

Fuente directa

En el análisis estadístico de U-Mann Whitney entre las DBG y DAG se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.0001$ ) para la expresión de MMP14, siendo mayor la intensidad de expresión en las DAG. **Gráfica 3**.



Gráfica 3. Intensidad de expresión de MMP14 en displasias epiteliales orales.



Los COCEs bien diferenciados expresaron positivamente la MMP14 en el 83% (30 casos) con una intensidad en su mayoría moderada. La distribución del inmunomarcaje fue mixta en un 50% (15 casos), 43.3% (13 casos) con un patrón epitelial y 6.6% (2 casos) estromal. El 100% (22 casos) de los COCEs moderadamente diferenciados fueron positivos a la MMP14 con una expresión moderada. El patrón de expresión fue mixto en el 63% (14 casos), 22.7% en las células epiteliales y solo el 9% en el estroma tumoral. El COCE poco diferenciado tuvo una expresión intensa en el 100% (10 casos) los cuales mostraron un patrón de distribución exclusivamente mixto. En la **figura 13** y **tabla 7** se muestran los resultados obtenidos en la inmunoexpresión de la MMP14 en los COCEs.

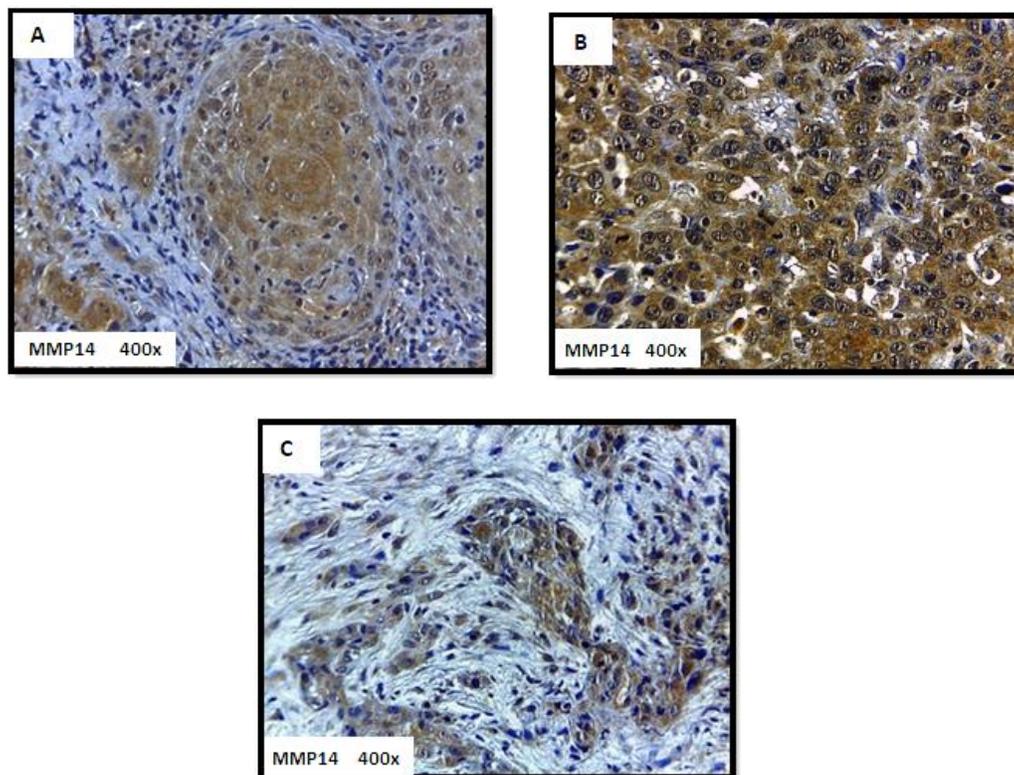


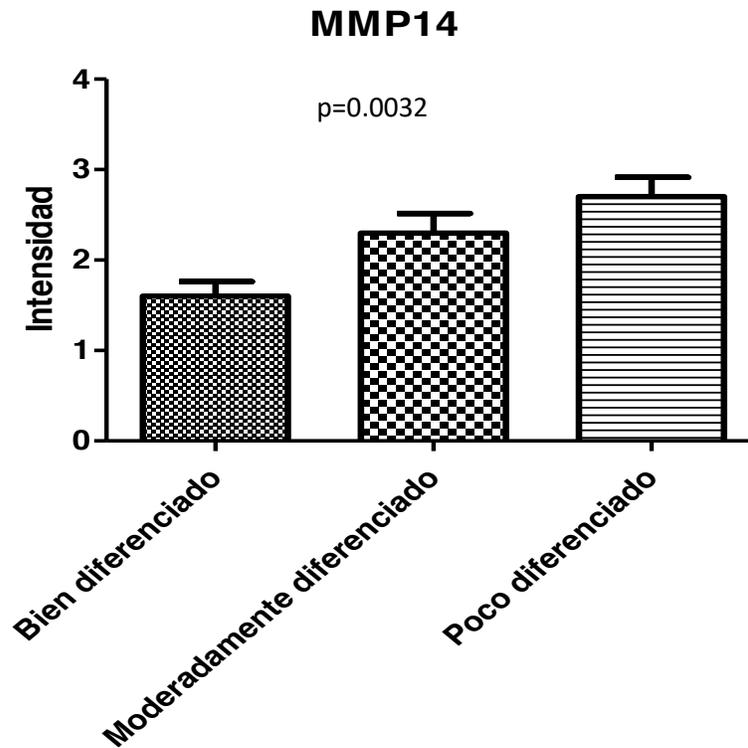
Figura 13. COCE bien diferenciado con expresión moderada en células neoplásicas y estromales (A), COCE moderadamente diferenciado con expresión moderada en células neoplásicas (B) y COCE poco diferenciado con expresión intensa en patrón mixto (C).



Tabla 7. Expresión de MMP14 en COCEs

Intensidad, Media y DE	Bien diferenciado	Moderadamente diferenciado	Poco diferenciado
Intensidad de expresión	++	++	+++
Media densidad óptica	59.5	60.37	30.44
Desviación estandar	±12.1	±13.2	±10.1
Nulo=-,Leve=+,Moderado=++,Intenso=+++			
Fuente directa			

La prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencias estadísticamente significativas en la expresión de MMP14 entre los diferentes grados de COCE. La expresión de MMP14 fue significativamente más alta en COCE poco diferenciado en comparación con el bien diferenciado ( $p = 0.0032$ ). *Gráfica 4.*



Gráfica 4. Intensidad de expresión de MMP14 en los COCEs.



### 13.3. Análisis de la inmunexpresión de TGF- $\beta$ 1 en displasias epiteliales orales y carcinoma oral de célula escamosas

La expresión de la proteína TGF- $\beta$ 1 en las DBG fue positiva en el 60% (15 casos), de los cuales el 40% (6 casos) presento una patrón de expresión epitelial, el 33.3% (5 casos) una distribución mixta y el 20% (3 casos) se expresó en el estroma. La intensidad de expresión fue leve en el 100% de los casos positivos. Las DAG expresaron una intensidad moderada de TGF- $\beta$ 1 en el 47% (23 casos) con una distribución en células epiteliales del 52% (12 casos), 26% (6 casos) en un patrón mixto y el 17.3% (4 casos) en células del estroma. En la **figura 14** y **tabla 8** se muestran los resultados obtenidos de la inmunexpresión de la TGF- $\beta$ 1 en las displasias epiteliales orales de bajo y alto grado.

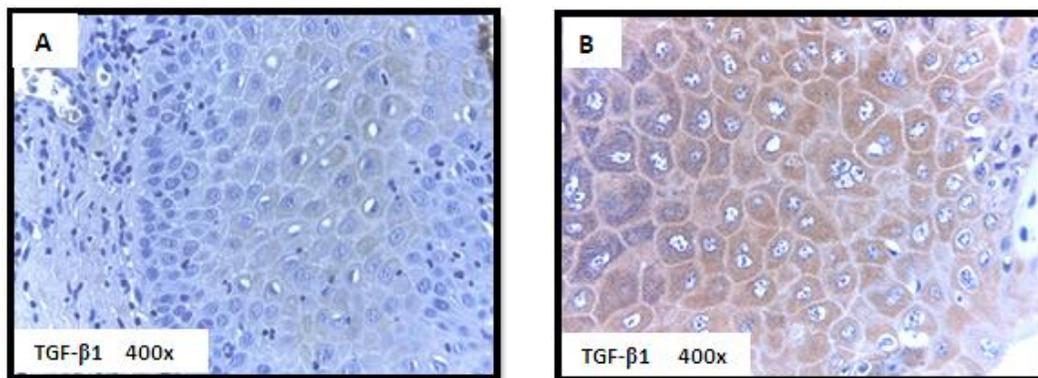
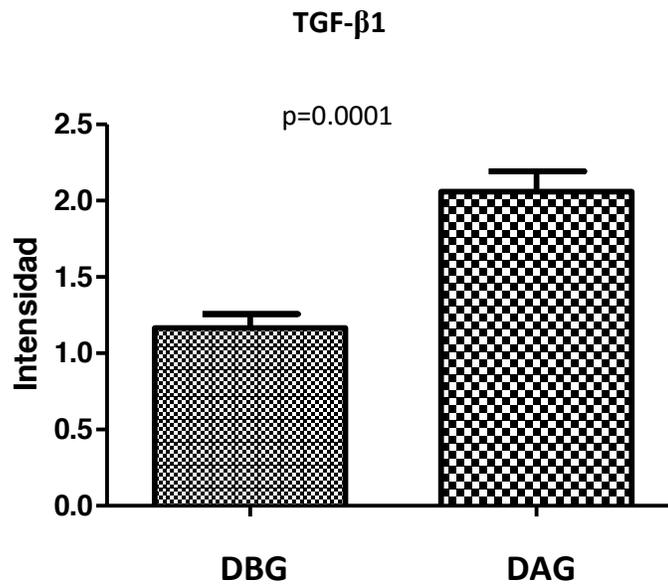


Figura 14. Patrón e intensidad de expresión de TGF- $\beta$ 1 en las DBG en una disposición citoplasmática leve en las células epiteliales (A). En las DAG observamos un patrón citoplasmático con expresión de moderada (B).


**Tabla 8. Expresión de TGF- $\beta$ 1 en displasias epiteliales orales**

Intensidad, Media y DE	DBG	DAG
Intensidad de expresión	+	++
Media densidad óptica	116.3	71.5
Desviación estandar	$\pm 14.6$	$\pm 10.6$
Nulo=-,Leve=+,Moderado=++,Intenso=+++		
Fuente directa		

En las DAG en comparación con las DBG se encontró una mayor diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.0001$ ) en la intensidad de expresión de TGF- $\beta$ 1. **Gráfica 5.**



Gráfica 5. Intensidad de expresión de TGF- $\beta$ 1 en las displasias epiteliales orales.



Los COCEs bien diferenciados mostraron expresión moderada de TGF- $\beta$ 1 en el 69% (25 casos) con un patrón de distribución principalmente epitelial en el 56% (14 casos), el 28% (7 casos) se expresaron en el estroma y epitelio, y el 16% (4 casos) con una distribución exclusivamente en el estroma. Expresión positiva para la proteína TGF- $\beta$ 1 en los COCEs con diferenciación moderada se observó en el 91% (20 casos) con un intensidad de expresión moderada y una distribución mixta en el 75% (15 casos), seguido del 15% (3 casos) con inmunomarcaje en las células neoplásicas y 10% (2 casos) en las células estromales. El 100% (10 casos) de los COCEs poco diferenciados expresaron intensamente la proteína TGF- $\beta$ 1 en los siguientes patrones de distribución; mixto en el 80% (8 casos) y el 20% (2 casos) en las células neoplásicas. En la **figura 15** y **tabla 9** se muestran los resultados obtenidos de la inmunoexpresión de la TGF- $\beta$ 1 en los diferentes grados de diferenciación del COCE.

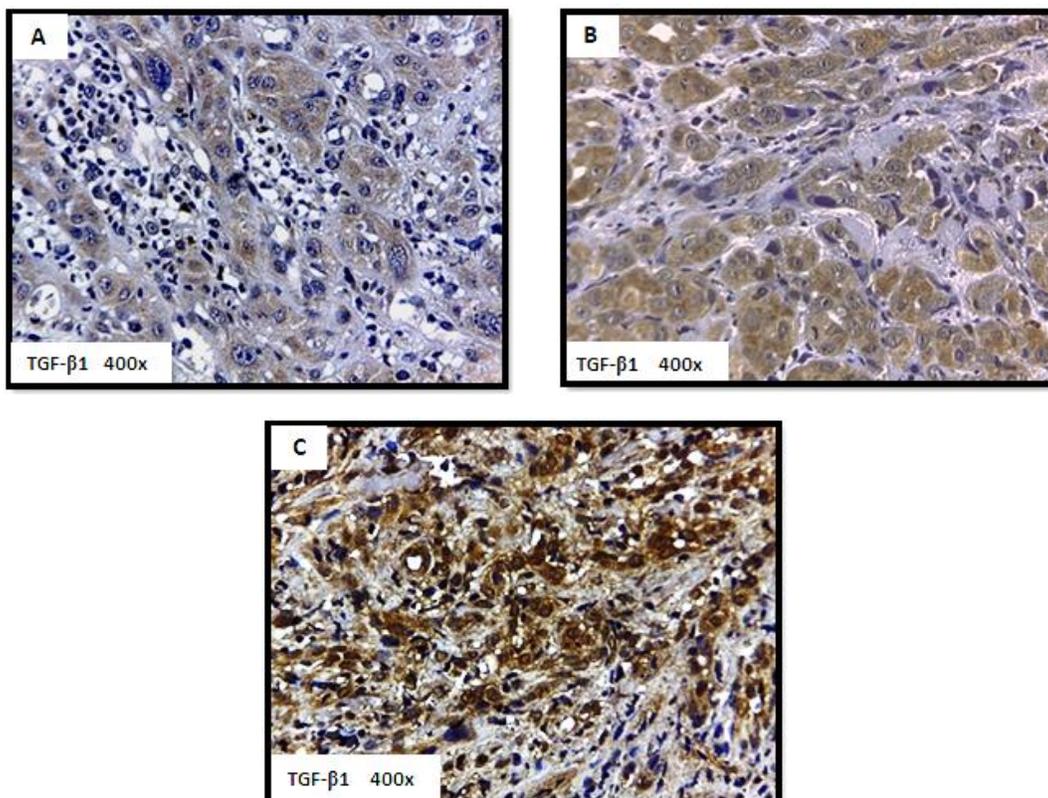


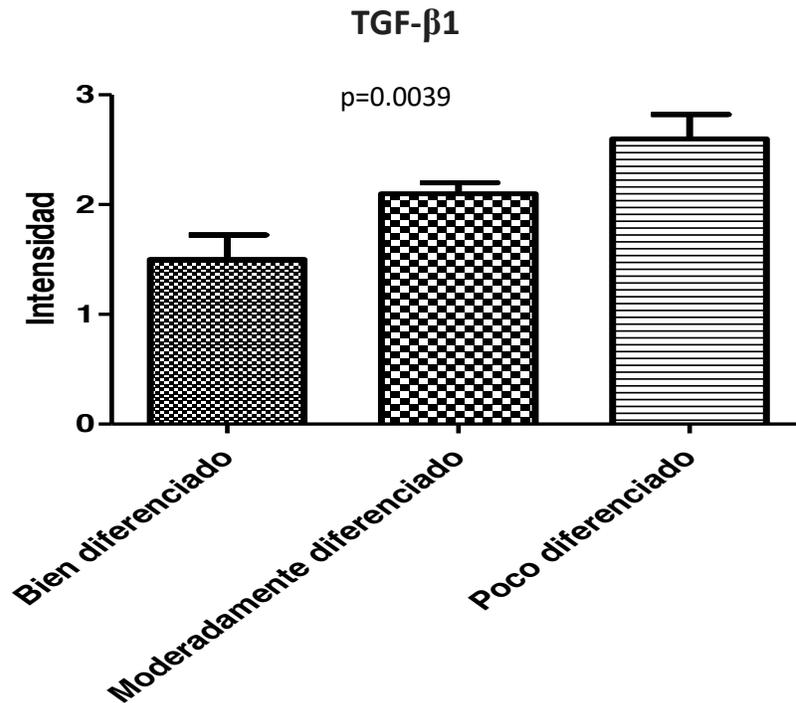
Figura 15. COCE bien diferenciado con expresión leve en células neoplásicas (A), COCE moderadamente diferenciado con expresión moderada en células neoplásicas (B) y COCE poco diferenciado con expresión intensa en patrón mixto (C).



Tabla 9. Expresión de TGF- $\beta$ 1 según el grado de diferenciación del COCE.

Intensidad, Media y DE	Bien diferenciado	Moderadamente diferenciado	Poco diferenciado
Intensidad de expresión	+	++	+++
Media densidad óptica	89.6	45.8	29.1
Desviación estandar	$\pm 11.3$	$\pm 8$	$\pm 7.2$
Nulo=-,Leve=+,Moderado=++,Intenso=+++			
Fuente directa			

La prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencias estadísticamente significativas en la expresión de TGF- $\beta$ 1 entre los grados de COCEs, siendo la diferencia más significativa ( $p=0.0039$ ) entre el COCE bien diferenciado versus el COCE poco diferenciado. **Gráfica 6.**



Gráfica 6. Intensidad de expresión de TGF- $\beta$ 1 en los grados de COCE.



#### 14. Discusión.

El cáncer había sido considerado como una enfermedad que consiste en células transformadas que adquieren capacidades ilimitadas y autónomas de proliferación, invasión y supervivencia. En consecuencia, las estrategias terapéuticas contra el cáncer se han centrado y se han limitado a dirigirse a la propia célula tumoral.

Sin embargo, la evidencia actual indica que para tener un control efectivo del cáncer, éste debe ser considerado como una enfermedad que implica complejas interacciones multicelulares entre las células neoplásicas y estromales. Por lo cual, se propuso el concepto de microambiente tumoral como parte integrante y esencial del tejido neoplásico; conformado por diversos tipos de celulares, incluyendo fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliales, pericitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células cebadas, linfocitos T y B, macrófagos y células dendríticas.<sup>54</sup> Numerosas investigaciones han demostrado el papel esencial de los miofibroblastos, macrófagos y células endoteliales, en la promoción, crecimiento y progresión del tumor. Mientras que la mayoría de los componentes celulares del sistema inmunológico son capaces de rechazar tumores, en el microambiente tumoral, básicamente, son esclavizados por las células neoplásicas para promover el crecimiento tumoral y la invasión. Por estas razones, el conocimiento y el control de microambiente tumoral es esencial para una mejor comprensión de la biología del cáncer y desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos.<sup>92,93</sup>

Chaudhary et al. evaluaron y compararon la presencia de miofibroblastos en el estroma tumoral de 37 COCEs, 15 carcinomas verrucosos (CV), 15 DBG, 15 DAG y 15 muestras de mucosa normal. Histopatológicamente, tuvieron 20 casos de COCE bien diferenciado y 17 de moderadamente diferenciado.<sup>50</sup> En nuestro estudio tuvimos 36 COCEs bien diferenciados, 22 moderadamente diferenciados y 10 poco diferenciados; 25 DBG y 49 DAG. Ellos realizaron



inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo  $\alpha$ -SMA demostrando la ausencia de miofibroblastos en el estroma de la mucosa normal y las DBG. El 97.29% de los COCEs tuvieron expresión positiva para  $\alpha$ -SMA, así como el 86.6% de los CV y las DAG en un 46.6%. Mencionan que la expresión de las DAG fue positiva en un patrón focal y que la disposición de las células positivas en el COCE y CV fue predominantemente alrededor de los nidos de células neoplásicas. Contrario a lo reportado por ellos, nosotros encontramos que las DBG fueron negativas para la proteína  $\alpha$ -SMA exceptuando la capa muscular de los vasos sanguíneos. El 34% de las DAG fueron positivas en un patrón focal subepitelial, los miofibroblastos que rodeaban las islas de células neoplásicas fueron positivos en el 66.1% de los COCEs a diferencia de lo reportado por Chaudhary, de los cuales los bien diferenciados fueron positivos el 55.5%, 68.1% de los moderadamente diferenciados y el 100% de los poco diferenciados. En ambos estudios, la expresión miofibroblástica fue nula en las DBG, observándose expresión en DAG, CV y COCE. Esto refuerza aún más la hipótesis de que las células epiteliales y estromales mutadas así como las interacciones epitelio-mesénquima alteradas pueden ser igualmente responsables de la inducción de la carcinogénesis.

Kellerman et al. demostraron la presencia de miofibroblastos en el estroma de COCEs por medio de inmunohistoquímica en una muestra de 38 pacientes, de los cuales el 60.52% (23 n) tuvieron positividad a la proteína  $\alpha$ -SMA, de estos, el 47.82% mostraron una expresión escasa y el 51.1% una expresión abundante la cual se correlacionó significativamente con el estadio de la enfermedad, la recurrencia regional y potencial de proliferación de las células tumorales, asociándose así la presencia de miofibroblastos con una mal pronóstico y una enfermedad más agresiva. También realizaron cultivos de líneas celulares de COCE y fibroblastos orales en las que demostraron que las células tumorales inducen la transdiferenciación de fibroblasto a miofibroblasto por medio de la secreción de TGF- $\beta$ 1.<sup>64</sup> Nuestros resultados fueron similares a lo reportado en un 66.1% de COCEs con expresión de  $\alpha$ -SMA y se observó un aumento significativo de la expresión con respecto al grado de diferenciación celular del COCE. La intensidad de expresión del TGF- $\beta$ 1 igualmente aumento



de forma significativa entre los COCEs bien diferenciados (expresión leve) y poco diferenciados (expresión intensa).

Gupta et al. evaluaron y compararon la distribución de miofibroblastos con anti  $\alpha$ -SMA en mucosa bucal normal, leucoplasia oral, fibrosis submucosa y COCE donde encontraron que el 100% y el 85% de las muestras de mucosa bucal normal y leucoplasia, respectivamente fueron negativas al anticuerpo, mientras que el 81% de las fibrosis submucosas orales mostraron un índice de expresión en el 21-40% de los miofibroblastos y el 100% de los COCEs fueron positivos con diversos índices de expresión desde 1-20% (3n), 21-40% (11n), 41-60% (7n) y >60% (4n).<sup>94</sup> Sin embargo los autores no especifican el diagnóstico histopatológico (DEO, carcinoma in situ o carcinoma invasor) de las lesiones clínicas (leucoplasia oral y fibrosis submucosa) impidiendo asociar la expresión de miofibroblastos con una enfermedad más agresiva. Nosotros obtuvimos que el 100% de las DBG fueron negativas evidenciando una ausencia de miofibroblastos, sin embargo, se mostró un incremento en la expresión directamente proporcional de miofibroblastos con respecto al proceso de carcinogénesis, donde el 34% de las DAG y el 55.5% de los COCEs bien diferenciados se expresaron en el 33% de los miofibroblastos, el 68.1% de los COCEs moderadamente diferenciados fueron positivos en el 34-60% y el 100% de los COCEs poco diferenciados mostraron -positividad en el 67-100% de los miofibroblastos, resultados que coinciden con nuestro estudio.

Seifi et al. analizaron la frecuencia y distribución de miofibroblastos con  $\alpha$ -SMA en displasia epitelial, hiperqueratosis y COCE, destacando que existió una expresión de miofibroblastos en el 67% de los COCEs en un patrón alrededor de las islas de células neoplásicas, 22% de las displasias fueron positivas en un patrón focal y el 6% de las hiperqueratosis expresaron la proteína de forma escasa.<sup>95</sup> En nuestra investigación los porcentajes de casos positivos de



COCE así como el patrón de distribución coinciden con los autores; confirmando con ambos estudios que la población de miofibroblastos así como su distribución en el estroma tumoral están relacionadas con la progresión, invasión tumoral y proceso de carcinogénesis.

Por otra parte, Yoshizaki et. al analizaron por medio de inmunohistoquímica la expresión de MMP-14 en 27 muestras de carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello; de los cuales 11 correspondían a cavidad oral. La MMP14 se expresó en las células neoplásicas en el 89% de la muestra, mientras que las células estromales peritumorales tuvieron una expresión escasa. También observaron un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) de la expresión de MMP-14 con respecto al grado de diferenciación entre los COCEs bien y moderadamente diferenciados contra los poco diferenciados.<sup>15</sup> De acuerdo a nuestro estudio el 91% de los COCEs mostraron positividad a MMP-14 con una distribución mixta (células neoplásicas y estromales), mientras que el aumento de expresión moderada de los COCEs bien y moderadamente diferenciados fue significativo comparado con la expresión intensa de los COCEs poco diferenciados.

Kurahara et. al estudiaron la expresión de MMP14 en biopsias de COCEs para determinar si esta proteína está asociada a las características clínico patológicas de los carcinomas. El 76.3% de las muestras fueron positivas a MMP14 en las células tumorales, además de encontrar diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) en el aumento de la expresión de la proteína asociado con el grado de invasión y metástasis ganglionares.<sup>96</sup> En el presente estudio, se obtuvo una patrón de expresión con distribución en las células neoplásicas como estromales así como una aumento en la expresión con respecto a un menor grado de diferenciación de las neoplasias.

Zhang et. al examinaron el papel de la MMP 2, 9 y 14 derivada de fibroblastos en el crecimiento e invasión tumoral de los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello in



vivo e in vitro. Ellos demostraron la influencia de la MMP14 derivada de fibroblastos contra la colágena tipo I durante el crecimiento e invasión tumoral in vivo, mientras que la pérdida de la expresión de la proteína disminuye los procesos anteriormente mencionados.<sup>97</sup> En nuestro estudio observamos un patrón de expresión de MMP14 mixto, es decir, tanto en las células tumorales como en las células estromales en los COCEs bien y moderadamente diferenciados.

De Vicente et. al determinaron la asociación de la expresión de la MMP7 y MMP14 con la progresión del COCE y su uso como indicador pronóstico. Los resultados de su estudio sugieren que estas dos proteasas son marcadores útiles para determinar la progresión tumoral y quizás ayuden a identificar a pacientes que puedan beneficiarse con tratamientos con inhibidores de MMPs.<sup>41</sup>

De acuerdo a la búsqueda y revisión de la literatura realizada durante nuestra investigación, no encontramos estudios sobre la expresión de la MMP14 en las displasias epiteliales orales. Nosotros demostramos una expresión de intensidad leve en el 92% y 77.5% de las DBG y DAG respectivamente. Ambos grados de displasia mostraron un patrón de distribución predominantemente mixto. Okada et. al reportaron la expresión de MMP14 en los fibroblastos del tejido de granulación en el proceso de cicatrización de heridas en ratas.<sup>15,98</sup> Sin embargo, en nuestro estudio, el aumento paulatino en la intensidad de la expresión de la MMP14 se relaciona con el grado de desdiferenciación, sugiriendo así una modificación, remodelación y pérdida del microambiente pericelular llevando a la célula epitelial a la pérdida de proteínas de adhesión y diferenciación, lo que podría relacionarse con el proceso de carcinogénesis.



La proteína TGF- $\beta$ 1 es un miembro de la familia de citocinas que regula una amplia variedad de procesos celulares, incluyendo proliferación, diferenciación, motilidad, síntesis de matriz extracelular, angiogénesis y respuesta inmunológica.<sup>99,100,101</sup> La evidencia científica sugiere que la modificación o cambios en la vía de señalización de TGF- $\beta$ 1 contribuye al desarrollo de varios tipos de cáncer. Sin embargo, se han descrito efectos contrarios de la proteína indicando un papel dual, actuando como inhibidor de proliferación en estadios tempranos pero, también contribuyendo a la progresión e invasión en estadios avanzados.<sup>102,103,104</sup> En otros estudios, el aumento en los niveles de TGF- $\beta$ 1 han sido asociados con un mal pronóstico. Otras investigaciones han demostrado que la disminución en la expresión de TGF- $\beta$ 1 se asocian a progresión tumoral, pérdida de la diferenciación celular y comportamiento biológico más agresivo.<sup>105,106</sup>

Chen et. al realizaron un estudio para determinar el papel del TGF- $\beta$ 1 en el COCE mediante inmunohistoquímica con anti-TGF $\beta$ 1 obteniendo expresión de este anticuerpo en el 62% de los COCEs con incremento significativo en las áreas tumorales con respecto al tejido adyacente no neoplásico, así mismo, encontraron correlación positiva entre la expresión de esta proteína con la incidencia de metástasis ganglionares y la recurrencia de la enfermedad; también realizaron estudios en cultivos celulares de COCE (SCC4 y SCC25) los cuales fueron transfectadas con un vector de TGF- $\beta$ 1 así como un silenciador de la misma proteína, demostrando que la expresión de TGF- $\beta$ 1 en las líneas celulares tiene efectos significativos sobre la proliferación celular y la expresión de MMP9, factor de crecimiento de endotelio vascular; mientras que el silenciamiento de la proteína con el vector o con el anti- TGF- $\beta$ 1 inhiben la invasión, habilidad de movilidad e induce a las células neoplásicas a incrementar sus características epiteliales aumentando la expresión de E-cadherina.<sup>107</sup>



Salvadori et. al analizaron el contenido de Ki-67, TGF- $\beta$ 1 y elastina en 96 casos de queilitis actínica (QA) y 176 carcinomas de células escamosas de labio inferior (CCELI) por medio de inmunohistoquímica. El 100% de los casos de QA y CCELI fueron positivos a TGF- $\beta$ 1 citoplasmáticamente tanto en el parénquima como estroma. Encontraron una correlación inversa entre los queratinocitos positivos y el grado de displasia y CCELI, donde los casos más severos de displasia y carcinoma presentaban un menor grado de inmunomarcaje tanto en las células epiteliales como en las estromales.<sup>108</sup> Sin embargo, en otro estudio Glick et. al determinaron que la pérdida o disminución de la expresión de TGF- $\beta$ 1 en las células tumorales es sustituida por un aumento de la expresión en las células estromales de carcinomas de ratón y humano mejorando la capacidad de proliferación de las células neoplásicas.<sup>109</sup> Bae et. al demostraron que la sobreexpresión de TGF- $\beta$ 1 en los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello se correlaciona con estadios avanzados y reducción en la supervivencia; además, promueve la tumorigénesis de forma paracrina incrementando la angiogénesis e inflamación.<sup>110</sup>

En nuestros resultados observamos que el TGF- $\beta$ 1 se expresó levemente en el epitelio en el 60% (15 casos) de las DBG; mientras que en las DAG solo el 47% (23 casos) con una positividad moderada en la misma población celular. Con respecto a los COCEs observamos un aumento gradual en la intensidad de expresión del TGF- $\beta$ 1 así como un cambio en el patrón de expresión, siendo en los COCEs bien diferenciados predominantemente en las células epiteliales 56% (14 casos) a un patrón mixto (epitelio/estroma) en el COCE moderadamente en el 75% (15 casos) y en el poco diferenciado 80% (8 casos). Estos datos sugieren, como en otras publicaciones, que la sobreexpresión de TGF- $\beta$ 1 está asociada a estadios más avanzados de COCE, así como un cambio en la localización de la expresión disminuyendo en el epitelio e incrementando en las células estromales, siendo estas últimas cruciales para favorecer el microambiente tumoral con la secreción de MMPs, así como citocinas relacionadas con la angiogénesis.



## 15. Conclusiones

- En nuestros resultados encontramos una prevalencia mayor de COCE en mujeres que en hombres.
- La expresión de  $\alpha$ -SMA en el estroma de displasias epiteliales y COCE incrementa significativamente con respecto a la severidad y desdiferenciación celular.
- La influencia de los miofibroblastos en el microambiente tumoral mejora y favorece la invasión y metástasis de los COCEs, por lo que la transdiferenciación de fibroblasto a miofibroblasto podría ser usado como factor pronóstico así como en la toma de decisión en el tratamiento para displasias epiteliales y COCEs.
- La expresión de MMP14 y TGF- $\beta$ 1 en las displasias orales indica el inicio de la modificación de la MEC del microambiente favoreciendo la severidad de la displasia.
- La expresión de TGF- $\beta$ 1 serviría como una molécula predictora, así como un blanco en el tratamiento de displasias y COCEs.
- La expresión de estas moléculas podrían servir como métodos auxiliares para determinar el comportamiento biológico de las displasias epiteliales orales y COCEs aunado a los métodos histológicos.



## 16. Referencias bibliográficas

1. Franco O, Shaw A, Strand D, Hayward S. Cancer associated fibroblast in cancer pathogenesis. *Seminars in cell & Developmental Biology* 21 (2010)33-39.
2. Sobral L, Bufalino A, Lopes M, Graner E, Salo T, Coletta R. Myofibroblasts in the stroma of oral cancer promote tumorigenesis via secretion of activin A. *Oral Oncology* 47(2011) 840-846.
3. Leef G, Tomas SM. Molecular communication between tumor-associated fibroblast and head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 49(2013) 381-386.
4. Barsky SH, Green WR, Grotendorst GR, Liotta L. Desmoplastic breast carcinoma as a source of human myofibroblasts. *Am J Pathol* 115 (1984) 329-333.
5. Tomasek J, Gabbiani G, Hinz b, Chaponnier C, Brown A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling. *Nature* 3(2002) 349-3363.
6. Gabbiani G, Ryan G, Majno G. Presence of modified fibroblast in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 27(1971) 549-550.
7. Gabbiani, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* 200(2003) 500–503.
8. Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzonana G, Gillessen D, Gabbiani G. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe of smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 103(1986) 2787-96.
9. Hansen RK, Bissel MJ. Tissue architecture and breast cancer: the role of extracellular matrix and steroid hormones. *Endocr Relat Cancer* 7(2000) 95-113.
10. Lochter A, Sternlicht MD, Werb Z, Bissell MJ. The significance of matrix metalloproteinases during early stages of tumor progression. *Ann N Y Acad Sci* 23(1998) 180-93.



11. Sternlicht MD, Lochter A, Sympson CJ, Huey B, Rougier JP, Gray JW, Pinkel D, Bissell MJ, Werb Z. The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell* 23(1999) 137-46.
12. Lochter A, Galosy S, Muschler J, Freedman N, Werb Z, Bissell MJ. Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial to mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J Cell Biol* 29(1997)1861-72.
13. Barth P, Schweinsberg S, Ramaswamy A, Moll R. CD34+ fibrocytes, alpha smooth muscle antigen positive myofibroblasts, and CD117 expression in the stroma of invasive squamous cell carcinomas of the oral cavity, pharynx and larynx. *Virchows Arch* 444(2004)231-234.
14. Lewis MP, Lygeo KA, Nystrom ML, Anderson WP, Speight PM, Marshall JF, Thomas GJ. Tumor-derived TGF- $\beta$ 1 modulates myofibroblasts differentiation and promotes HGF/SF-dependent invasion of squamous carcinoma cells. *British Journal of Cancer* 90(2004) 822-832.
15. Yoshizaki T, Sato H, Maruyama Y, Murono S, Furukawa M, Park C, Seiki M. Increased expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase in head and neck carcinoma. *Cancer* 79(1997) 139-144.
16. Gurkan Y, Zekayi K, Burhan E, Yalcin T. "Precancerous lesions of oral mucosa". *World J Clin Cases* (2014) 16:866-872.
17. Napier S, Speight P. "Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature". *J Oral Pathol Med* (2008) 37:1-10.
18. Young MR, Neville BW, Chi AC, Lathers DM, Boyd Gillespie M, Day TA. Oral premalignant lesions induce immune reactivity to both premalignant oral lesions and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 56 (2007) 1077-1086.
19. Speight P. "Update on oral epithelial dysplasia and progression to cancer". *Head Neck Pathol* (2007) 1:61-6.



20. Mehanna H, Rattay T, Smith J, et. al. "Treatment and follow up of oral dysplasia – a systematic review and meta-analysis". *Head Neck* (2009)31:1600-9.
21. Thomson PJ, McCual JA, Ridout F, Hutchison. To treat...or not to treat? Clinicians views on the management of oral potentially malignant disorders. *Br J Oral Maxillofac Surg* 30(2015) 1-5
22. Umma H, Yasunori T. Over Expression of HuR and Podoplanin may predict the development of oral cancer in patients with oral preneoplastic lesion. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* 119(2015)105-117
23. Thompson L. Laryngeal dysplasia, squamous cell carcinoma, and variants. *Surgical Pathology* 10(2017) 15-33.
24. Müller Susan. Update from the 4th Edition of the World Health Organization of Head and Neck Tumours: Tumours of the Oral Cavity and Mobile Tongue. *Head and Neck Pathol* 11(2017) 33–40.
25. Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. "Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, weaknesses, and scope for improvement". *J Oral Pathol Med* (2008)37:127-133.
26. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No.11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 15/3/2014.
27. Gopinath D, Thannikunnath B, Neermunda S. Prevalence of carcinomatous foci in oral leukoplakia: A clinical study of 546 indian samples. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 10(2016) ZC78-ZC83.
28. Tandon A, Singh NN, Brave VR, Sreedhar G. Image analysis assisted study of mitotic figures in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma using differential stains. *J Oral Biol Craniofac Res Suppl*1(2016) S18-S23
29. Jia H, Gopalakrishna N, Tan MH, Edgren G. Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: A global study. *Head and Neck* 39(2017) 297-304.



30. Barnes L, Everson J, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. Head and Neck Tumours 1n ed. Lyon: IARC Press (2005).167-175.
31. Hernández JC, Jacinto LF, Jiménez MD, Macario A, Hernández F, Alcántara A. Prevalence trends of oral squamous cell carcinoma. Mexico city's General Hospital experience. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2(2013) 306-11.
32. Neville B, Damm D, Allen C, Chi A. *Oral and Maxillofacial Pathology*. Editorial ELSEVIER 4° Edición
33. Saba N, Goodman M, Ward K, Flowers C, Ramalingam S, Owonikoko T, Chen A, Grist W, Wadsworth T, Beitler J, Khuri F, Shin D. Gender and ethnic disparities in incidence and survival of squamous cell carcinoma of the tongue, base of tongue, and tonsils: a surveillance, epidemiology and end results program-base analysis. *Oncology* 81(2011) 12-20.
34. Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med* 37(2008) 127-33.
35. Brägelmann J, Dagogo-Jack I, El Dinali M, Stricker T, Brown CD, Zuo Z, Khattri A, Keck M, McNerney ME, Longnecker R, Bieging K, Kocherginsky M, Alexander K, Salgia R, Lingen MW, Vokes EE, White KP, Cohen EE, Seiwert TY. Oral cavity tumors in younger patients show a poor prognosis and do not contain viral RNA. *Oral Oncol* 49(2013) 525-33.
36. Johnson N. Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J Dent Educ* 65(2001) A328-39
37. Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people--a comprehensive literature review. *Oral Oncol* 37(2001) 401-18



38. Bray F, Ren JS, Masuyer M, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *International Journal of cancer* 132(2013). 1133-1145.
39. Brandizzi D, Gandolfo M, Velazco ML, Cabrini RL, Lanfranchi HE. Clinical features and evolution of oral cancer: A study of 274 cases in Buenos Aires, Argentina. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 13(2008) E544-8.
40. Chung CH, Yang YH, Wang TY, Shieh TY, Warnakulasuriya S. Oral precancerous disorders associated with areca quid chewing, smoking, and alcohol drinking in southern Taiwan. *J Oral Pathol Med* 34(2005) 460-6.
41. De Vicente J, Lequerica-Fernández P, Santamaría J, Fresno M. "Expression of MMP-7 and MT1-MMP in oral squamous cell carcinoma as predictive indicator for tumor invasion and prognosis". *J Oral Pathol Med* 36(2007) 415-24.
42. Sánchez López JD, Sicilia Gutiérrez MA, Capitán Cañadas LM, Labrot Moleón I, Martínez-Villalobos Castillo S, Valencia Laseca E Profundidad tumoral y variables histopatológicas en el carcinoma epidermoide lingual. Estudio sobre 60 pacientes. *Avances en Odontología* 21(2005) 241-249.
43. Sasaki T, Moles DR, Imai Y, Speight PM Clinico-pathological features of squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients <40 years of age. *J Oral Pathol Med* 34 (2005) 129-33.
44. Anneroth G, Hansen L. A methodologic study of histologic classification and grading of malignancy in oral squamous cell carcinoma. *European Journal of oral Sciences* 92(1984)448-468.
45. Bhargava A, Saigal S, Chalishazar M. Histopathological Grading Systems In Oral Squamous Cell Carcinoma: A Review. *J. Int Oral Health* 2(2010)
46. Cuevas JC, Maya I, Villanueva G, Gaitán L, Leyva E. Standardization in the observation and classification of premalignant and malignant epithelial lesions. *Int J morphol* 29(2011) 706-710.



47. Werb Z. EMC and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 91(1997) 439-442.
48. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17(2001) 463-516.
49. Itho Y. MT1-MMP: A key regulator of cell migration in tissue. *Life* 58(2006) 589-596.
50. Chaudhary M, Ramchandra A, Vidhale G, Mankar M. "Comparison of Myofibroblasts Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma, Verrucous Carcinoma, High Risk Epithelial Dysplasia, Low Risk Epithelial Dysplasia and Normal Oral Mucosa. *Head and Neck Pathol* 6(2012) 305-313.
51. Walter-Yohrling J, Pratt BM, Ledbetter S, Teicher BA. "Myofibroblasts enable invasion of endothelial cells into three dimensional tumor cell clusters; a novel in vitro tumor model". *Cancer Chemother Pharmacol* 25(2003) 263-9.
52. Pietras K, Östman A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Experimental cell research* 316(2010) 1324-1331
53. Curry J, Sprandio J, Cognetti D, Luginbuhl A, Bar-ad V. Tumor Microenvironment in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Seminars in Oncology* 41(2014) 217-234.
54. Koontongkeaw S. The Tumor Microenvironment Contribution to Development, Growth, Invasion and Metastasis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Cancer* 4(2013) 66-83.
55. Hinz B, Phan S, Thannickal V, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *The American Journal of Pathology* 170(2007) 1807-1816.
56. Carneiro Lucio P, Leite A, Muniz A, Pina G, Weegw F. Myofibroblasts and their relationship with oral squamous cell carcinoma. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology* 79(2013) 112-118.
57. Li B, Wang J. Fibroblasts and Myofibroblasts in wound healing: force generation and measurement. *J Tissue Viability* 20(2011) 108-120.



58. McAnulty RJ. Fibroblasts and Myofibroblast: their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39(2007) 666-671.
59. Desmouliere A, Guyot C, Gabbiani G. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of the tumor cell behavior. *Int J Dev Biol* 45(2004) 509-17.
60. XiaoHong Y, Bo Ch, Tao L, XiaoHong C. Reversal of myofibroblasts differentiation: a review. *European Journal of Pharmacology* 784(2014) 83-90.
61. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 16(2016) 582-598.
62. Ramos C, Becerril C, Cisneros J, Montaña M. El miofibroblasto, una célula multifuncional en la patología pulmonar. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias* (2004)17, 215-31.
63. Leef G, Thomas M. Molecular Communication between Tumor-Associated Fibroblasts and Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Oral Oncol* 49(2013) 381–386.
64. Kellermann M, Lays M. da Silva D, Zecchin K, Graner E. “Mutual paracrine effects of oral squamous cell carcinoma and normal oral fibroblasts: Induction of fibroblast to myofibroblast transdifferentiation and modulation of tumor cell proliferation”. *Oral Oncology* 44(2008) 509-517.
65. Beacham DA, Cukierman E. Stromagenesis: the changing face of fibroblastic microenvironments during tumor progression. *Semin Cancer Biol* 15(2005) 329-341
66. Peralta-Zaragoza O, Lagunas-Martínez A, Madrid-Marina V. Factor de crecimiento transformante beta-1: estructura, función y mecanismos de regulación en cáncer. *Salud Pública de México* 43(2001) 340-351.
67. Gallo E, Haupt J, Dietz H, shore E. TGF- $\beta$  Family signaling connective tissue and skeletal diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2017) 1-41.



68. Bhowmick N, Chytil A, Plieth D, Gorska A, Dumont N, Shappell S, Washington K, Neilson B, Moses H. TGF- $\beta$  Signaling in Fibroblasts Modulates the Oncogenic Potential of Adjacent Epithelia. *Science* 303(2004) 848-851.
69. Chen ZY, Wang PW, Shieh DB, Chiu KY, Liou YM. Involvement of gelsolin in TGF-beta 1 induced epithelial to mesenchymal transition in breast cancer cells. *Journal of Biomedical Science* 22(2015) 1-11
70. Tsushima H, Ito N, Tamura S, Matsuda Y, Inada M, Yabuuchi I, et. al. Circulating Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 as a Predictor of Liver Metastasis after Resection in Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research* 7(2001) 1258-1262.
71. Leask A, Abraham D. TGF- $\beta$  signaling and the fibrotic response. *The FASEB Journal* 18(2004) 816-827.
72. Sounni NE, Noel A. Membrane type-matrix metalloproteinases and tumor progression. *Biochimie* 87(2005) 329-342.
73. Bodnar M, Lukasz S, Wojciech K, Andrzej M. "Differentiated expression of membrane type metalloproteinases (MMP-14,MMP-15) and pro-MMP2 in laryngeal squamous cell carcinoma. A novel mechanism". *J Oral Pathol Med* (2013)42:267-274.
74. Suárez M, Asbun-Bojalil J, Ruíz-Godoy L, Meneses A. "Inmunoexpression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in different areas of oral squamous cell carcinoma. *Australian Dental Journal* (2012)57:300-307.
75. Sato H, Okada Y, Seiki M. Membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in cell invasion. *Thrombosis and Haemostasis* 78(1997) 497-500
76. Itoh Y, Seiki M. MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenviroment. *Journal of Cellular Physiology* 206(2006) 1-8.
77. Seiki M, Mori H, Kajita M, Uekita T, Itoh Y. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase and cell migration. *Biochem Soc Symp* 70(2003)253-62.



78. Itoh Y, Nagase H. Matrix Metalloproteinases in Cancer. *Essays Biochem* 38(2002) 2-36.
79. Zucker S, Pei D, Cao J, Lopez C. Membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMP). *Current Topics in Development Biology* 54(2003) 1-74.
80. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 378(1997) 151-160.
81. Seiki M. Membrane-type matrix metalloproteinases. *APMIS* 107(1999) 137-143.
82. Mazzone M, Baldassarre M, Beznoussenko G, Giacchetti G, Cao J, Zucker S, Luini A, Buccione R. Intracellular processing and activation of membrane type 1 matrix metalloprotease depends on its partitioning into lipid domains. *J Cell Sci* 117(2004)6275-6287.
83. Li YY, Zhou CX, Gao Y. Moesin regulates the motility of oral cancer cells via MT1-MMP and E-cadherin/p120-catenin adhesion complex. *Oral Oncol* 51(2015) 935-943.
84. Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MR, Weiss SJ. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell* 95(1998) 365-377.
85. Koshikawa N, Giannelli G, Cirulli V, Miyazaki K, Quaranta V. Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *J Cell Biol* 148(2000) 615-24.
86. Li Y, Aoki T, Mori Y, Ahmad M, Miyamori H, Takino T, Sato H. Clavege of lumican by membrane type matrix metalloproteinase 1 abrogates this proteoglycan mediated suppression of tumor cell colony formation in soft agar. *Cancer Res* 64(2004)7058-7064.
87. Knäuper V, Will H, López-Otin C, Smith B, Atkinson SJ, Stanton H, Hembry RM, Murphy G. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem* 29(1996) 17124-17131.



88. Dabbs D. Diagnostic Immunohistochemistry. 2 ed. USA Elsevier(2006)
89. De Wever O, Demetter P, Marcel M, Bracker M. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth . Int J Cancer 123(2008) 2229-2238.
90. Haotun L, Gang T, Zhirmin L, Manran L. Cancer associated fibroblasts: A multifaceted driver of breast cancer progression. Cancer Letters 361(2015) 155-163.
91. Seoane J, Gomis R. TGF- $\beta$  Family signaling in tumor suppression and cancer progression. Cold Spring Harb Prespect Biol (2017) 1-30.
92. Liotta L, Kohn E. The microenvironment of the tumour-host interface. Nature 411(2007) 375-379.
93. Albini A, Sporn MB. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. Nat Rev Cancer 7(2007) 139-147.
94. Gupta K, Metgud R, Gupta J. Evaluation of stromal myofibroblasts in oral leukoplakia, oral submucous fibrosis, and oral squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study. Journal of Cancer Research and Therapeutics 11(2015) 893-898.
95. Seifi S, Shafaei S, Shafigh E, Sahabi SM, Ghasemi H. Myofibroblasts Stromal presence and Distribution in Squamous Epithelial Carcinoma, Oral Dysplasia and Hyperkeratosis. Asian Pacific Journal or Cancer Prevention. 11(2010) 359-364.
96. Kurahara S, Shinohara M, Ikebe T, Nakamura S, Beppu M, Hiraki A, Takeuchi H, Shirasuna K. Expression of MMPs, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. HEAD NECK 21(1999) 627-638.
97. Zhang W, Matrisian L, Holmbeck, Vick C, Rosenthal L. Fibroblast-derived MT1-MMP promotes tumor progression in vitro and in vivo. BioMed Central 6(2006) 1-9
98. Okada A, Bellocq JP, Rouyer N, Chenard MP, Río MC, Chambon P, et al. Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas. Proc Natl Acad Sci USA 92(1995) 2730-2734.



99. Beck C, Schreiber H, Rowley D. Role of TGF-beta in immune evasion of cancer. *Microsc Res Tech.* 52(2001) 387–395.
100. Bertolino P, Deckers M, Lebrin F, ten Dijke P. Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders. *Chest.* 90(2005) 585–590.
101. Kim HS, Shang T, Chen Z, Pflugfelder SC, Li DQ. TGF-beta1 stimulates production of gelatinase (MMP-9), collagenases (MMP1, -13) and stromelysins (MMP-3, -10, -11) by human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res.* 79(2004)263–274.
102. Coffey Jr RJ, Bascom CC, Sipes NJ, Graves-Deal R, Weissman BE, Moses HL. Selective inhibition of growth-related gene expression in murine keratinocytes by transforming growth factors. *Mol Cell Biol.* 8(1988) 3088–3093.
103. Chambard JC, Pouyssegur J. TGF-s inhibits growth factor induced DNA synthesis in hamster fibroblasts without affecting the early mitogenic events. *J Cell Physiol.* 135(1988)101–107.
104. AkhurstRJ, DerynckR. TGF-b signaling in cancer—a double edged sword. *Trends Cell Biol.* 11(2001) 44–51.
105. Mincione G, Di Marcantonio MC, Artese L, Vianale G, Piccirelli A, Piccirilli M, et al. Loss of expression of TGF- $\beta$ 1, T $\beta$ RI, and T $\beta$ RII correlates with differentiation in human oral squamous cell carcinomas. *Int J Oncol.* 32(2008) 323–333.
106. Muro-Cacho CA, Anderson M, Cordero J, Muñoz-Antonia T. Expression of transforming growth factor beta type II receptors in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 5(1999) 1243–1248.
107. Chen MF, Wang WH, Lin PY, Lee KD, Chen WC. Significance of the TGF- $\beta$ 1/IL-6 axis in oral cancer. *Clinical Science* 122(2012) 459-472.
108. Salvadori G, dos Santos JN, Martins MA, Vasconcelos AC, Meurer L, Varvaki P, Carrard VC, Domingues M. Ki-67, TGF- $\beta$ 1, and elastin content are significantly altered in lip carcinogenesis. *Tumor Biol* 35(2014) 7635-7644.



109. Glick A, Lee M, Darwiche N, Kulkarni A, Karlsson S, Yuspa S. Targeted deletion of the TGF- $\beta$ 1 gene causes rapid progression to squamous cell carcinoma. *Genes & Development*. 8 (1994) 2429-2440.
110. Woo JB, Sang HL, Young SR, Bon SK, Young ChL. Transforming growth factor  $\beta$ 1 enhances stemness of head and neck squamous cell carcinoma cells through activation of Wnt signaling. *Oncology Letters* 12(2016) 5315-5320.



17. Anexos

17.1. Anexo 1

Formato para la estandarización de displasias epiteliales orales

N° DE CASO	
<b>Datos arquitecturales</b>	
1. ESTRATIFICACIÓN EPITELIAL IRREGULAR	1/3..... ( ) 2/3..... ( ) 3/3..... ( )
2. HIPERPLASIA BASILAR Y PÉRDIDA DE LA POLARIDAD	SI..... ( ) NO..... ( )
3. CRESTAS EPITELIALES ANÓMALAS	SI..... ( ) NO..... ( )
4. AUMENTO EN EL NÚMERO DE MITOSIS	MENOS DE 4 MITOSIS POR 10 CAMPOS DE ALTO PODER..... ( ) 4 O MÁS MITOSIS POR 10 CAMPOS DE ALTO PODER..... ( )
5. MITOSIS SUPERFICIALES ANORMALES	SI..... ( ) NO..... ( )
6. DISQUERATOSIS Y PERLAS DE QUERATINA EN CLAVOS EPITELIALES	SI..... ( ) NO..... ( )
<b>Datos citológicos</b>	
7. PLEOMORFISMO CELULAR	SI..... ( ) NO..... ( )
8. PLEOMORFISMO NUCLEAR	SI..... ( ) NO..... ( )
9. VARIACIONES EN EL TAMAÑO NUCLEAR	SI..... ( ) NO..... ( )
10. VARIACIONES EN EL TAMAÑO CELULAR	SI..... ( ) NO..... ( )
11. AUMENTO EN LA PROPORCIÓN NUCLEO CITOPLASMA	SI..... ( ) NO..... ( )
12. AUMENTO DEL NÚMERO/TAMAÑO DE NUCLÉOS	SI..... ( ) NO..... ( )
13. HIPERCROMATISMO NUCLEAR	SI..... ( ) NO..... ( )
2 C. arquitecturales + 3 C. citológicos 4 C. arquitecturales + 6 C. citológicos 6 C. arquitecturales + 8 C. citológicos	DIAGNÓSTICO FINAL DISPLASIA EPITELIAL LEVE..... ( ) DISPLASIA EPITELIAL MODERADA..... ( ) DISPLASIA EPITELIAL SEVERA..... ( )

