



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EXPRESIÓN DE CD105 COMO MARCADOR DE
ANGIOGÉNESIS ENTRE EL CARCINOMA ORAL DE
CÉLULAS ESCAMOSAS Y DISPLASIAS ORALES.

TESINA

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
CIRUJANA DENTISTA**

P R E S E N T A:

VICTORIA ISABEL NAVA LEYVA

TUTORA: Mtra. CARLA MONSERRAT RAMÍREZ MARTÍNEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



Estas líneas están dedicadas a mis grandes tesoros; mis padres Héctor y Blanca Iris que, con su amor, confianza y trabajo, me han impulsado para llegar a hacer lo que hoy soy, a enseñarme que hay que amar lo que haces y que cada día es una meta más en esta vida, que aún lejos siempre están junto a mí en cada paso que doy.

Gracias papi por tu ayuda para conmigo, por inculcarme que estudiando se abren las puertas del camino, pero sobre todo por darme todo tu cariño y tantos valores, te admiro y eres mi gran ejemplo a seguir, tanto profesionalmente, como padre y como persona.

Mami, mi agradecimiento por cada día estar al pie del cañón conmigo, por enseñarme que hay que luchar por nuestros sueños, que hay que ser fuertes para superarlos cada día, gracias por ser la mujer que se desveló, que se preocupó, que me vio llorar, que me vio reír, que me conoce completamente, gracias mamá por ser mi confidente y mi gran amiga.

Gracias papás por todo lo que me han dado, me siento muy feliz de decirles que están a un paso de terminar esto que hemos iniciado juntos, gracias de todo corazón por confiar en su peque, los amo.

A mis hermanos Héctor e Iris, por hacer de mi vida la mejor, por sus locuras, por su cariño, por cada momento inolvidable, pero sobre todo por apoyarme cada día, hermano gracias por impulsarme a salir adelante, y por enseñarme que hay que ser constantes para lograr lo que te propones, a mi hermana mi cómplice y confidente, mi amiga y mi consejera, la que me enseñó y me dio la pauta a esta arte de la odontología, y sé que juntas lograremos hacer un gran equipo, como siempre lo hemos hecho, gracias hermanos por ser mis compañeros del alma, de vida y de corazón, que juntos como lo hemos hecho haremos que nuestros sueños y metas se cumplan, con el amor que esta familia se tiene.



A mi abuelito Chago y a mis tres ángeles del cielo, Carlos, Noy y Guille, que fueron y son pilares fundamentales para mi existir.

A mi compañero de vida Ulises, gracias por impulsarme cada día a salir adelante, tu ayuda ha sido fundamental en este gran paso que doy, gracias por tus consejos y amor, pero sobre todo gracias por hacerme mejor persona. Eres parte de mi motivación en cada sueño y meta que tengo. ¡Te amo!

A mis amigas, que sé que están y estarán en todo momento, Anahí, Dulce, Karen, Lexy y Monchis gracias por siempre brindarme una sonrisa, por ayudarme con sus palabras y consejos, pero sobre todo por compartir conmigo el valor de la amistad.

A mi querida UNAM, por abrirme las puertas del saber y darme el trofeo más preciado: ser Cirujana Dentista.

Una mención especial a la Mtra. Carla Monserrat Ramírez Martínez, por su apoyo, tiempo y dedicación en la realización de este trabajo, de igual manera gracias al personal e instalaciones del laboratorio de Patología Clínica y Experimental DEPeI de la Facultad de Odontología UNAM, por brindarme los recursos para que este trabajo fuera realizado.

A todos y a cada una de las personas que confiaron, y contribuyeron a mi formación personal y profesional, que con sus conocimientos, consejos y apoyo llegue hasta aquí.

Solo me resta decir gracias a dios, a la vida y a mi familia por permitirme terminar esta meta, y sé que es el principio de algo mejor, ¡Vamos por lo que sigue!

Con cariño Victoria Isabel Nava Leyva



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	7
2. MARCO TEÓRICO	8
2.1 Angiogénesis	8
2.1.1 Definición	8
2.1.2 Células implicadas en la angiogénesis	8
2.1.3 Papel en el carcinoma oral de células escamosas	9
2.1.4 Medición de angiogénesis	11
2.2 Endogлина (CD105)	18
2.2.1 Definición	18
2.2.2 CD105 como marcador angiogénico	19
2.2.3 Relación con carcinoma oral de células escamosas y displasias orales	20
2.3 Displasias orales	21
2.3.1 Definición	21
2.3.2 Clasificación	21
2.4 Carcinoma oral de células escamosas	25
2.4.1 Definición	25
2.4.2 Epidemiología	25
2.4.3 Etiología	25
2.4.4 Localización	26
2.4.5 Características clínicas	26
2.4.6 Histopatología	27



2.4.7 Métodos de diagnóstico en el carcinoma oral	
de células escamosas.....	30
2.4.8 Tratamiento.....	36
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	37
4. JUSTIFICACIÓN	37
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	37
6. HIPÓTESIS.....	38
7. OBJETIVOS	38
7.1 Objetivo general.....	38
7.2 Objetivos específicos	38
8. DISEÑO DE ESTUDIO	38
8.1 Tipo de estudio.....	38
8.2 Universo de estudio	38
8.4 Muestra de estudio.....	38
8.5 Criterios de inclusión.....	39
8.6 Criterio de eliminación.....	39
8.7 Criterio de exclusión	39
9. MATERIALES Y MÉTODO.....	39
9.1 Histoquímica	39
9.2 Inmunohistoquímica (IHQ)	40
9.3 Análisis de inmunexpresión	42
9.4 Análisis estadístico	43



10. RESULTADOS	45
11. DISCUSIÓN	46
12. CONCLUSIONES	47
13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48



1. INTRODUCCIÓN

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es una neoplasia maligna que se origina de las células escamosas del epitelio que recubre la mucosa y es la más frecuente de la cavidad bucal.

Previo al desarrollo de COCE se pueden presentar en la mucosa oral determinadas alteraciones morfológicas, dentro de los cuales, algunas pueden tener un potencial aumentado que pueden sufrir transformaciones malignas, la serie de alteraciones celulares y tisulares compatibles con COCE, están restringidas al epitelio, denominada displasia epitelial, mientras más severa es la displasia epitelial, mayor probabilidad de transformación maligna.

Por otro parte, la angiogénesis es uno de los principales factores en la progresión de COCE, mediante la cuantificación de tejido, la angiogénesis se realiza contando micro vasos sanguíneos; densidad microvascular (MVD), en un área determinada por inmunohistoquímica en los que endogлина (CD105), es un potente marcador angiogénico pleiotrópico expresado en células endoteliales activadas durante la angiogénesis y se considera un marcador específico para la detección de la angiogénesis tumoral, y puede ser un indicador pronóstico importante para la resultado en una serie de neoplasias.

El presente estudio pretende analizar la expresión del marcador CD105 en muestras de COCE bien diferenciado, intermedio y mal diferenciado, así como displasias leves y severas, para evaluar la correlación de MVD determinadas por este marcador y ver si puede ser un elemento favorable y de utilidad para el diagnóstico diferencial de estas neoplasias.



2. MARCO TÉORICO

2.1 ANGIOGÉNESIS

2.1.1 Definición

La angiogénesis, es el proceso de formación de nueva microvasculatura¹, es decir, que se puede dar mediante dos procesos; ya sea por la movilización de las células precursoras endoteliales desde la médula ósea hacia el sitio de estímulo angiogénico, o desde microvasculatura existente.²

Esta es un componente muy importante en muchos procesos biológicos, tanto en condiciones fisiológicas, como la proliferación del endometrio, la formación del cuerpo lúteo y la embriogénesis, y como en condiciones patológicas; en la artritis reumatoide, la retinopatía diabética y en neoplásicas malignas y benignas.^{1,2}

La angiogénesis corresponde a un fenómeno estrictamente regulado que puede ocurrir durante toda la vida.³

2.1.2 Células implicadas en la angiogénesis.

La angiogénesis es un proceso dinámico y cuidadosamente equilibrado que comienza con la vasodilatación, el aumento de la permeabilidad vascular y la degradación de la matriz extracelular (MEC) en respuesta a un estímulo angiogénico como la hipoxia, que activa al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Las células endoteliales (EC) activadas proliferan y migran hacia el estímulo angiogénico, formando una red que posteriormente maduraran adquiriendo un lumen. Después se reclutan pericitos y células del músculo liso para estabilizar el vaso naciente en estado de reposo.⁴

Por lo tanto, la comunicación adecuada célula-célula entre EC, pericitos y células del músculo liso es fundamental para la remodelación vascular y la maduración.⁴ Figura 1

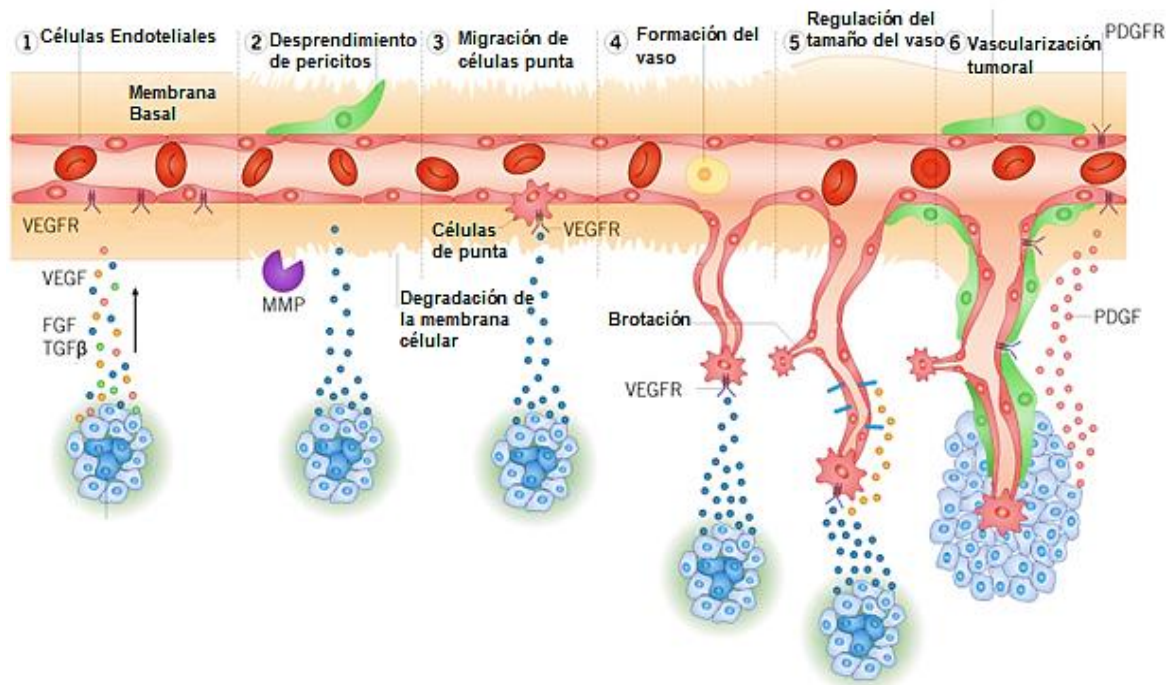


Figura 1 Proceso de angiogenesis.⁵

El proceso de formación de nuevos vasos esta mediada por el equilibrio de diversas moléculas que actúan como reguladores positivos y negativos. Las principales moléculas de acción positiva incluyen el factor básico de crecimiento de fibroblastos, VEGF, interleucina-8 (Il-8), factor de crecimiento derivado de plaquetas y factor de crecimiento de hepatocitos.^{1,3} Los principales inhibidores angiogénicos incluyen trombospondina-1, factor-4 plaquetario, angiostatina, endostatina, interferón alfa IFN- α e inhibidores tisulares de metaloproteinasas.¹

2.1.3 Papel en el carcinoma oral de células escamosas.

La angiogenesis tumoral consiste en una serie de complejos pasos consecutivos, en la cual la homeostasis entra moléculas de regulación

positivas y negativas se pierde, propiciando que la señalización proangiogénica se encuentra incrementada. Por lo tanto, se trata de un proceso esencial tanto para el crecimiento y nutrición del propio tumor como para el desarrollo de metástasis a distancia.⁶

El crecimiento tumoral se da en dos fases separadas³

- Fase prevascular

El tumor se desarrolla sin neovascularización. Rara vez sobrepasan los 2 a 3 mm³, suelen ser lesiones asintomáticas.^{3,6} Figura 2

- Fase angiogénica

Cuando el tumor necesita un crecimiento mayor de 2 a 3 mm³ este se vasculariza. A partir de este momento cambian las perspectivas clínicas, el tumor se convierte en clínicamente detectable, sintomático, hace metástasis y aumenta su grado de malignidad.³ Figura 2

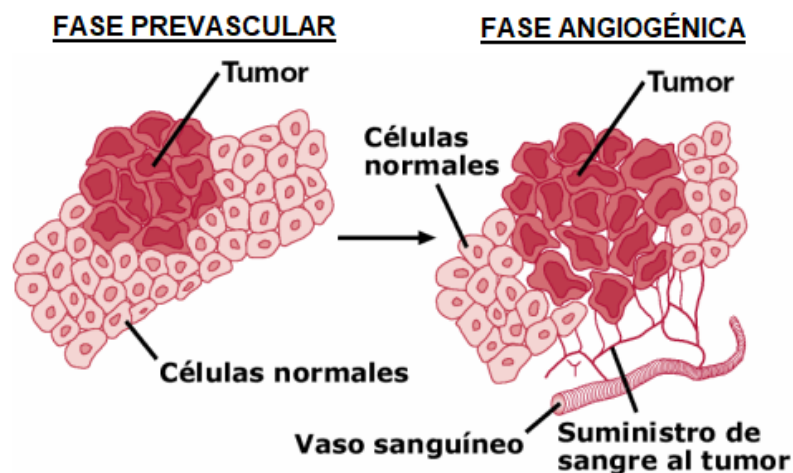


Figura 2 Crecimiento tumoral.⁷



Los vasos sanguíneos son un componente importante del estroma tumoral y por lo tanto la angiogénesis es un factor predictor del pronóstico en muchas neoplasias humanas y tanto es así, que se considera una correlación importante entre el número y la densidad de los vasos sanguíneos con los estados metastásicos, tamaño del tumor, tipo histológico y por consiguiente grado de malignidad tumoral.³ En la región de cabeza y cuello el carcinoma de células escamosas corresponde al tumor maligno más frecuente y constituye una amenaza para la salud pública.⁸

La angiogénesis es uno de los principales factores en la progresión del COCE.⁸ La cuantificación de la angiogénesis tisular se puede realizar con la densidad microvascular (MVD) que consiste en medir el número de vasos en un área determinada, previa tinción de inmunohistoquímica. Para este fin se ha utilizado una gama de anticuerpos para la tinción de las paredes de los vasos, la mayoría de los cuales están dirigidos a epítopes de las células endoteliales.⁸

2.1.4 Medición de angiogénesis

La densidad microvascular (MVD) se define como el número de vasos pequeños en una determinada área tumoral.⁹

La MVD consiste en utilizar una tinción de inmunohistoquímica con marcadores endoteliales para identificar las paredes del vaso, y más recientemente puede incorporar otras manchas secundarias para las células musculares que están asociadas con estos vasos. Una vez que se identifican las estructuras vasculares, se determina una medición de la densidad de microvasos usando una medición del área compuesta de la vasculatura general.⁹

Para la evaluación de la MVD se determinan principalmente mediante los siguientes tres enfoques⁹:

I. Análisis de "puntos calientes" o Hot Spot

Es un método para medir la densidad vascular máxima en una muestra. En la mayoría de los estudios, las regiones altamente vascularizadas se seleccionaron a bajo aumento (x 40 o x 100), y los microvasos se contarán usando un campo de alta potencia (x 200 o x 400). Muchos investigadores evalúan MVD en al menos tres campos no superpuestos y consideraron el nivel medio o mediano como el MVD final.⁹ Figura 3

Las ventajas de este enfoque son su simplicidad y relativa facilidad. De hecho, el enfoque de "punto caliente" es el método más popular y común para evaluar el estado angiogénico de muchos tipos de tumores sólidos.⁹

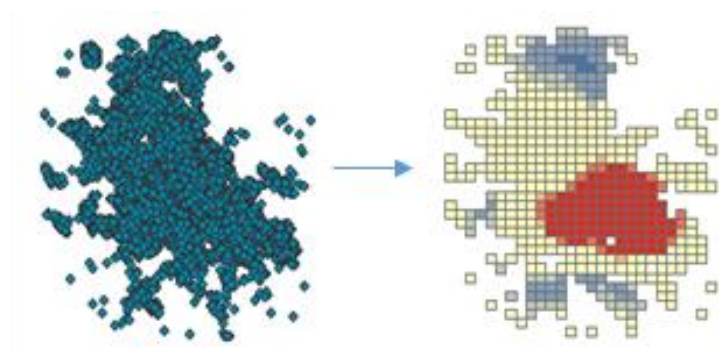


Figura 3 Hot Spot.¹⁰

El análisis de las imágenes histológicas se realiza con una herramienta llamada Image J el cual es un programa desarrollado en el National Institutes of Health (NIH), donde se hace un procesamiento de imágenes de código abierto para disminuir la subjetividad al analizar los datos.¹¹

Image J puede calcular el área y las estadísticas de valor de densidades ópticas de selecciones, puede medir distancias y ángulos, crear histogramas de densidad y gráficos de línea de perfil.^{10,11}

Es compatible con las funciones estándar de procesamiento de imágenes tales como operaciones lógicas y aritméticas entre imágenes, manipulación de contraste, análisis de Fourier, nitidez, suavizado, detección de bordes y también se proporcionan herramientas para ampliar y desplazar imágenes. (Figura 4)¹¹

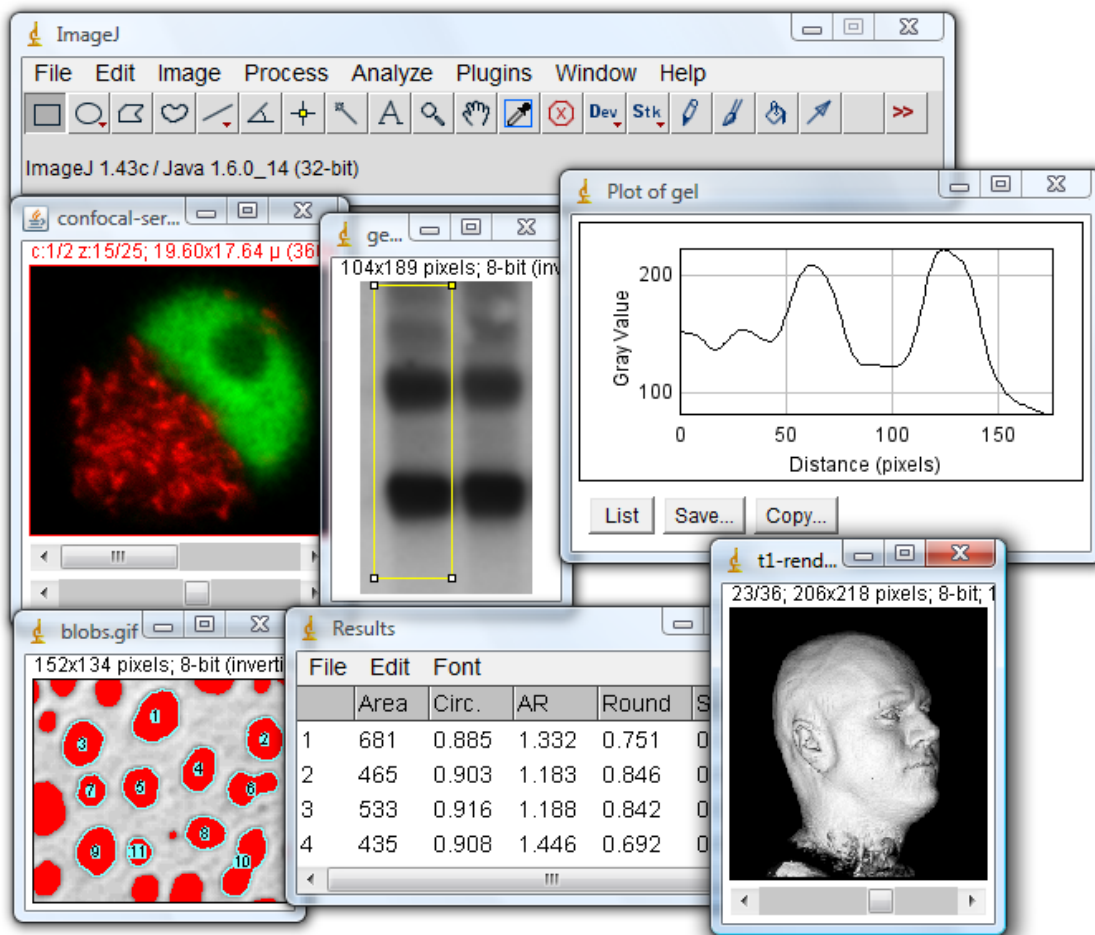


Figura 4 Programa Image J.

II. Técnica de conteo de Chalkley.

Este método se sugirió como el método principal para la evaluación inmunohistoquímica de la angiogénesis en 1943. La retícula de Chalkley es una lente física sobre la cual se colocan 25 puntos aleatoriamente (Figura 5)⁹, y el recuento de Chalkley se calcula como la cantidad de puntos que golpean los vasos teñidos. Este método de conteo se recomendó en un informe de consenso internacional, porque es un método relativamente simple que es aceptable para el uso clínico diario.⁹

La variabilidad de los resultados entre los observadores es menor que la de otros métodos. Con base en estos hechos, apoyamos la opinión de que el método de Chalkley es confiable y versátil para contar el MVD en los tejidos cancerosos. Sin embargo, la frecuencia de uso de este método es menor que la de otros métodos. Figura ⁹

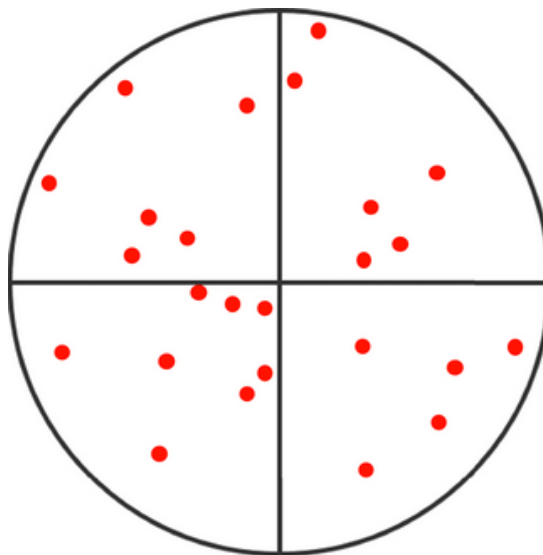


Figura 5 Un ejemplo de la técnica de Chalkley. Un círculo dividido en cuartos y poblado con 25 puntos. Se contaron los puntos en la retícula que golpeaban los vasos teñidos.



III. Análisis de imágenes aleatorias y automáticas / semiautomáticas.

Un enfoque aleatorio para la evaluación MVD es útil para las muestras con un área grande y para muchos tejidos. Sin embargo, dicho método es propenso a grandes variaciones en los datos intraobservadores y una falta de objetividad no científica. Por lo tanto, para apoyar dicha debilidad, se desarrollaron métodos de conteo automáticos / semiautomáticos que utilizan análisis de imágenes digitales y software de computadora. La selección del área de medición y la detección de microvasos son claramente objetivos, ya que las áreas temáticas se eligen al azar y los vasos con tinción positiva se detectan por un método que es menos dependiente de la experiencia del observador.⁹

Además, este análisis automatizado de imágenes puede medir varios parámetros de microvasos, incluyendo el área del vaso, el espesor de la pared del vaso y la compacidad del vaso, al mismo tiempo.⁹

Los análisis de MVD en tejidos de cáncer humano generalmente se han llevado a cabo con muestras fijadas en formalina y embebidas en parafina. Además, para la mayoría de los tumores sólidos, las muestras deshidratadas quirúrgicamente se usan comúnmente para contar el MVD.⁹

Como hemos mencionado la MVD corresponde una forma de cuantificación directa de la microvasculatura tumoral, y se ha evaluado mediante tinción con anticuerpos pan-endoteliales como el factor de von Willebrand, CD34 y CD31.⁹

- Factor de von Willebrand

El factor de von Willebrand (VWF) es una glicoproteína que regula la adhesión de las plaquetas, que se sintetiza y almacena en células endoteliales. Este factor se usa como marcador endotelial en tejidos humanos.⁹

VWF forma parte del sistema de la coagulación que se encarga del transporte de factor VIII en la sangre, por tanto, si existe poca cantidad de VWF, la adhesión y agregación plaquetarias se afectan, los niveles de factor VIII pueden disminuir, se tarda más en formar un coágulo de sangre y todo ello resulta una prolongación de sangrado.^{11,12} Figura 6

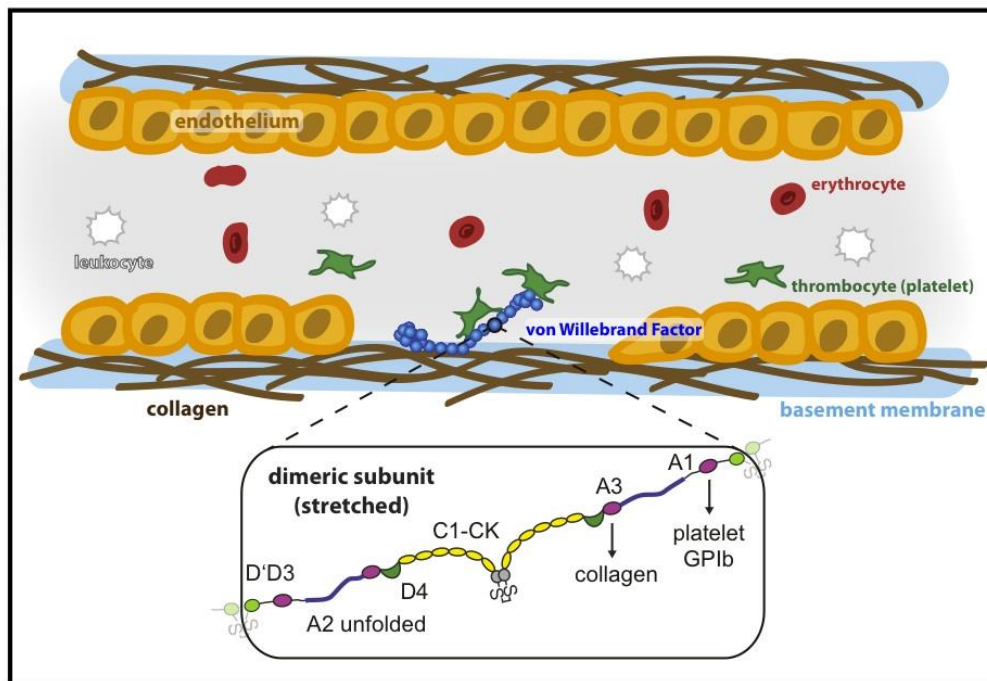


Figura 6 Papel y estructura del Factor VWF.¹³

El VWF fue el primer marcador específico de endotelio que se utilizó para determinar la presencia de microvasos en estudios de diagnóstico inmunohistoquímico. Se ha demostrado que es un marcador de tumores vasculares en múltiples órganos. Por otro lado, el VWF es el marcador vascular menos sensible de los que se utilizan habitualmente, siendo positivo en el 50-75% de los tumores vasculares. Además, al no producirse exclusivamente en las células endoteliales y circular en el suero, puede encontrarse en zonas de necrosis y hemorragias.¹²



- CD34

CD34 se conoce como antígeno de célula progenitora mieloide y con frecuencia se detecta en varios tipos de células, como células inflamatorias, células linfáticas y células endoteliales. Además, existe la opinión de que CD34 se expresa en células endoteliales de vasos pequeños, pero no de grandes. Según estas observaciones, el anticuerpo anti-CD34 podría ser un marcador sensible para detectar los vasos recién formados en los tejidos cancerosos.⁹

Debe notarse el hecho de que CD34 a menudo tiñe algunas células endoteliales linfáticas. Es decir, los vasos teñidos con CD34 podrían contribuir a una MVD falsamente elevada en los tejidos cancerosos. Además, aunque CD34 se detecta en vasos pequeños, se encuentra en vasculaturas recién formadas y preexistentes.⁹

- CD31

CD31 es una glicoproteína transmembrana que también se conoce como PECAM-1. Se ha informado que CD31 se detecta en vasos preexistentes y recién formados en tejidos cancerosos. Por lo tanto, todavía se usa ampliamente para medir la MVD en tejidos cancerosos humanos.^{9,12}

Además de las células endoteliales, CD31 también existe en las membranas de las plaquetas, las células plasmáticas y los macrófagos. Una porción de un microvaso se ve como un pequeño punto, y a menudo es difícil distinguir un microvaso del tumor, y se debe prestar atención al hecho de que la tinción puede reducirse parcialmente mediante la recuperación de antígenos de microondas.⁹



Aun cuando todos estos marcadores panendoteliales son útiles para identificar a las células endoteliales, no son capaces de discernir entre las células de la vasculatura pre existente y las recién formadas. Por lo tanto, se ha buscado nuevos marcadores específicos para nuevos vasos neoformados.¹²

CD105 ha demostrado poseer ventaja sobre otros marcadores para evidenciar las células endoteliales recién formadas.^{9,12}

2.2 ENDOGLINA (CD105)

2.2.1 Definición

La endoglina (ENG o CD105) es una glicoproteína transmembranal de 180 kDa, que pertenece a la superfamilia del factor de crecimiento transformante β esencial para la angiogénesis y el desarrollo vascular, se expresa predominantemente en células endoteliales y tiene funciones esenciales en el desarrollo vascular.¹⁴

Estructuralmente posee un dominio extracelular grande, un dominio transmembranal, hidrofóbico y un dominio intracelular corto. El dominio extracelular contiene un tripéptido Arg-Gly-Asp (RGD) y cuatro sitios de glicosilación unidos a *N* y una región de glicosilación unida a *O*. El dominio intracelular contiene muchos residuos de serina y treonina, algunos de los cuales son sitios de fosforilación.¹⁵

Existen dos isoformas de CD105 que son L y S, se diferencian entre sí por la longitud del dominio intracelular, la distribución tisular, el grado de fosforilación y por la cola citoplásmica.^{14,15} L-Endoglina contiene 47 aminoácidos en la cola citoplásmica, tiene un alto grado de fosforilación y se expresa predominantemente en células endoteliales Figura 7, mientras que S-endoglina contiene solo 14 aminoácidos.¹⁵

Ambas isoformas están fosforiladas constitutivamente y es probable que esto se deba al receptor TGF- β constitutivamente activo tipo II (TGF- β R2).^{14,15}

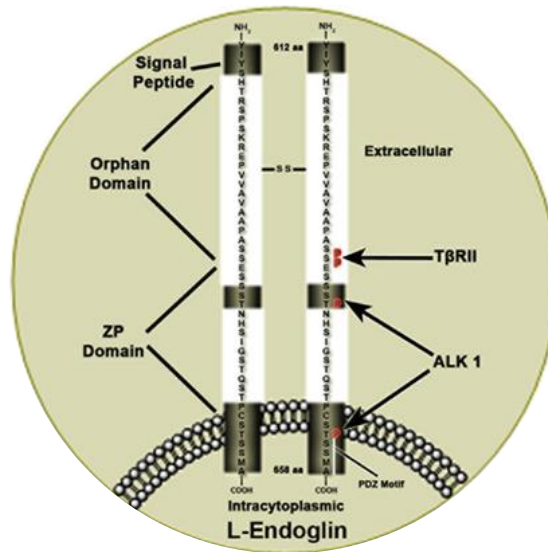


Figura 7 Estructura L-Endoglin¹⁶

También se identificó una forma soluble de endoglin en los sueros de pacientes sanos y con cáncer. Se han observado niveles elevados de endoglin soluble en sueros de pacientes con enfermedades como el melanoma metastásico y pacientes con cáncer de mama con riesgo de metástasis.¹⁵

En humanos, el gen CD105 está ubicado en el cromosoma 9q34 y está organizado en 14 exones.¹⁴

2.2.2 CD105 como marcador angiogénico.

Entre las moléculas de superficie expresadas en las células endoteliales, la endoglin (CD105) está emergiendo como un objetivo para la terapia contra el cáncer.¹⁴



Se expresa en las células endoteliales activadas durante la angiogénesis, por lo que se considera un marcador específico en la progresión tumoral.⁹ Posee ciertas ventajas sobre otros marcadores pan-endoteliales usados comúnmente (CD31, CD34, Factor VIII), ya que se une a las células endoteliales activadas que participan en la angiogénesis tumoral, pero la expresión es débil / negativa en el endotelio vascular de los tejidos normales.^{17,18}

2.2.3 Relación de CD105 con carcinoma oral de células escamosas y displasias orales.

El carcinoma oral de células escamosas corresponde a una neoplasia maligna de estirpe epitelial, caracterizada por la proliferación celular incontrolada.¹⁵ Existen múltiples procesos que están asociados con la progresión tumoral, uno de ellos es la angiogénesis, que representa un factor esencial para el crecimiento tumoral y la metástasis.¹⁸ La angiogénesis se cuantifica mediante la densidad microvascular que se basa en una evaluación inmunohistoquímica. Valores alterados en esta medición se han asociado a un mal pronóstico en diversos tipos de cáncer.¹⁹

Investigaciones recientes indican que CD105 se expresa intensamente en la vasculatura tumoral, y puede ser un indicador pronóstico importante para el resultado en una serie de tumores malignos.^{3, 20}

2.3 DISPLASIAS ORALES

2.3.1 Definición

El término “displasia”, que proviene del griego y significa “mala forma” o “mal modelo”.²¹ La displasia es la existencia de una combinación variable de fenómenos microscópicos indicativos de un desorden de la maduración epitelial y de una alteración de la proliferación celular, que puede ser en algunos casos reversible.^{22, 23}

Las anormalidades incluyen cambios de tamaño y configuración de la célula junto con cambios de su núcleo, así como disposición irregular de las células en el tejido.²⁴

2.3.2 Clasificación

La Organización Mundial de la Salud del 2005 (OMS) clasificó las displasias orales en leve, moderado y severo, y agrega de la misma al carcinoma in situ (CIS).^{22, 25}

- Displasia leve

En general, la perturbación arquitectónica limitada al tercio inferior del epitelio acompañado de atipia citológica, define los criterios mínimos de displasia (Figura 8)^{21,25, 26}

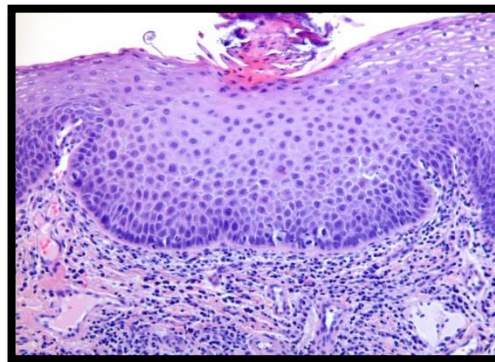


Figura 8 Fotomicrografía en HyE: se observa cambios estructurales en el tercio inferior del epitelio indicativos de displasia leve.

- Displasia moderada

Disturbios arquitectónicos que se extienden al tercio medio del epitelio. También presenta aumento en la atipia citológica (Figura 9).^{21,25,26}

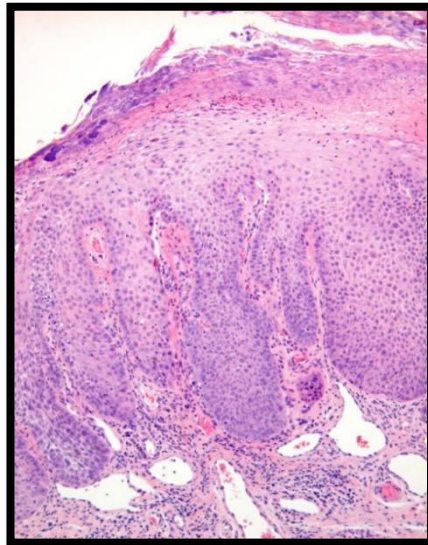


Figura 9 Fotomicrografía en HyE: se observa crestas epiteliales romas, alargadas y atipia cito-nuclear confinada en el tercio medio e inferior del epitelio.

- Displasia severa

El reconocimiento de la displasia severa comienza con más de dos tercios del epitelio, mostrando perturbaciones arquitectónicas y atipia citológica incrementada (Figura 10).^{21,25, 26}

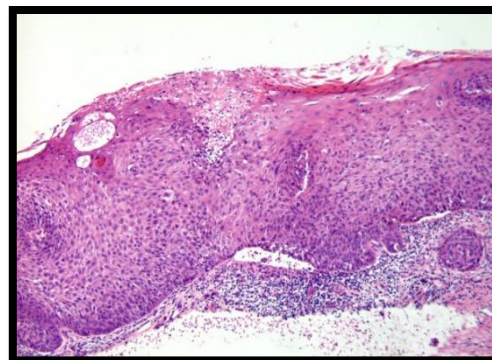


Figura 10 Fotomicrografía en HyE: se observa alteraciones epiteliales que afectan a todo el grosor epitelial.



- Carcinoma in situ

El concepto teórico de carcinoma in situ es que la transformación maligna ocurrió, pero la invasión no está presente. Presenta cambio estructural en el espesor completo del epitelio, atipia celular, así como mitosis aumentadas y atípicas.²¹

La OMS reconoce ciertos criterios que permiten clasificar a los diferentes tipos de displasia de manera objetiva y que se basan en las modificaciones citológicas y de arquitectura Tabla 1.²⁶

ARQUITECTURA		CITOLOGÍA
Estratificación epitelial irregular.		Variación anormal en el tamaño nuclear (anisonucleosis)
Perdida de polaridad de las células basales.		Variación anormal en la forma nuclear (polimorfismo nuclear)
Clavos epiteliales en forma de gota.		Variación anormal en el tamaño de las células (anisocitosis)
Incremento del número de mitosis		Variación anormal en la forma celular (polimorfismo celular)
Mitosis anormales.	superficiales	Incremento del tamaño nuclear. Figuras mitóticas atípicas.
Queratinización prematura.		Incremento del número y el tamaño de los nucleólos.
Pérdida de adhesión intercelular.		Hipercromatismo nuclear.

Tabla 1 Criterio usado en el diagnóstico de displasias mucosa en la cavidad oral.



Además de la OMS, existen dos sistemas de clasificación para las displasias orales que son las siguientes²⁵:

La clasificación de neoplasias intraepiteliales escamosas (SIN) es similar a la de la OMS, exceptuado que en esta la displasia severa y carcinoma in situ se combinan como SIN 3 Tabla 2.²⁵

La clasificación Ljubljana en el año 1971, relaciona los diferentes tipos de displasia con el seguimiento clínico del paciente Tabla 2.²⁵

Clasificación de la OMS 2005	Neoplasias intraepiteliales escamosas (SIN)	Clasificación de Ljubljana: Lesiones intraepiteliales escamosas (SIL)
Displasia leve.	SIN 1.	Hiperplasia de células basales/ parabasales. No requiere seguimiento cercano.
Displasia moderada	SIN 2.	Hiperplasia atípica. Seguimiento cercano
Displasia severa o grave.	SIN 3***	Hiperplasia atípica. Cirugía
Carcinoma in situ	SIN 3***	Carcinoma in situ. Cirugía y radioterapia.

Tabla 2 Clasificación displasias epiteliales

Aun cuando existen diferentes clasificaciones para las displasias orales, la clasificación de la OMS del 2005 es la más utilizada y en la cual nos basaremos en este trabajo.

2.4 CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS

2.4.1 Definición

El carcinoma oral de células escamosas (COCE), también denominado carcinoma espinocelular o carcinoma epidermoide, se define como una neoplasia de estirpe epitelial.^{26,27}

2.4.2 Epidemiología

Corresponde a la octava neoplasia epitelial maligna más común, representando el 90% de los tumores malignos en cavidad oral.²⁴ Generalmente se presenta en personas mayores de 40 años, aunque se han reportado casos en población de jóvenes.²⁷

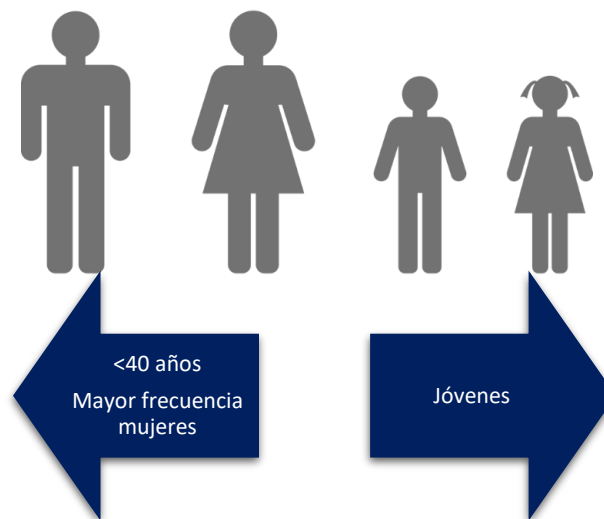


Figura 11 Epidemiología de COCE en México. Propiedad del autor.

2.4.3 Etiología

La etiología del carcinoma escamoso es multifactorial siendo los factores de riesgo más importantes el tabaquismo, el alcoholismo, sífilis, infecciones por virus del papiloma humano (VPH), liquen plano bucal, radiación, deficiencias

nutricionales, inmunosupresión (VIH), enfermedades preexistentes, higiene bucal deficiente, entre otros.^{27, 28, 29}

2.4.4 Localización

Los sitios más frecuentemente afectados son la lengua (borde lateral y ventral), paladar blando, labio inferior, piso de boca y área retromolar (Figura 12).^{27, 30}

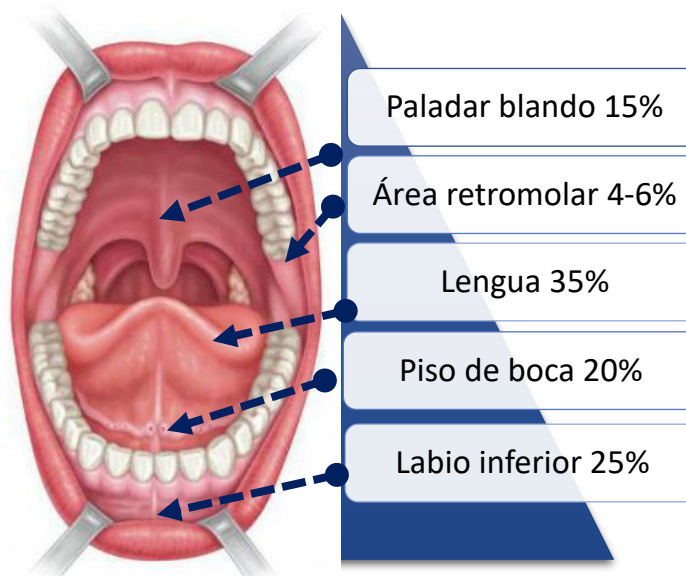


Figura 12 Localización COCE.

2.4.5 Características clínicas

En el estadio temprano puede aparecer como una lesión eritematosa (eritroplasia) asintomática o una lesión blanca (leucoplasia), o ambas (eritroleucoplasia).²⁷ Puede también aparecer como una erosión, una úlcera pequeña, un nódulo, o una lesión periodontal. En estadios avanzados puede presentarse como un aumento de volumen con superficie ulcerada, bordes elevados, indurado a la palpación y fijo a planos profundos.³¹ Figura 13



Figura 13 Características Clínicas. a) Fotografía extraóral, vista frontal de la paciente. b) Fotografía intraoral lateral de la lesión y c) Vista a detalle de la lesión en tercio medio y posterior de la lengua.³²

2.4.6 Histopatología

El carcinoma de células escamosas se caracteriza por presentar displasia epitelial severa, con presencia de pleomorfismo celular, pleomorfismo nuclear, mitosis incrementadas y anormales, nucléolos prominentes, queratinización individual, perlas de queratina, y pérdida de estratificación.³¹ Figura 14

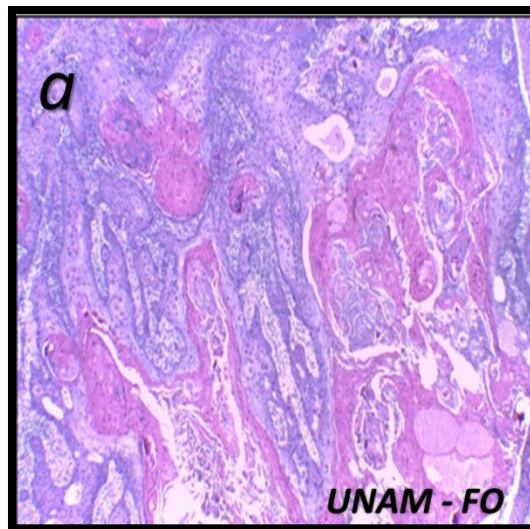


Figura 14 Fotomicrografía en HyE, aumento 10x: muestra el componente neoplásico del COCE.³²



El grado de diferenciación histológica del carcinoma de células escamosas de la cavidad oral, se obtuvo de acuerdo a la clasificación histológica según Broders modificada por la OMS en 2005 los cuales son; (Tabla 3)³³

Grados de diferenciación histopatológica		
Grado I	Bien diferenciado	Histológicamente son muy similares al epitelio escamoso. Las células neoplásicas conservan la capacidad de formar queratina, formando perlas o globos córneos dentro de unos límites bien definidos. Las mitosis son moderadas y hay escasas atipias celulares. Frecuentemente aparece un infiltrado peritumoral.
Grado II	Moderadamente diferenciado o intermedio	El número de mitosis aumenta y la queratinización celular va disminuyendo, dejando de formar globos córneos y queratinizándose células de forma aislada. El infiltrado tumoral va disminuyendo.
Grado III	Poco o mal diferenciado	Los celulares neoplásicas pierden su semejanza con las células de las que derivan y se rompe la adhesión intercelular facilitando las metástasis.

Tabla 3 Grados de diferenciación histológica.



Con el propósito de realizar una estimación más precisa acerca del comportamiento biológico de esta neoplasia, Bryne, publicó el sistema de graduación del FIT, en la cual, un pequeño número de variables histológicas son aplicadas a la zona de interfase entre el tumor y el huésped, demostrando ser útil en el pronóstico de la neoplasia. El sistema de graduación del frente de invasión tumoral (FIT) evalúa cuatro parámetros morfológicos, otorgándole a cada uno una puntuación de 1 a 4, determinando el grado de malignidad para cada tumor (puntuaciones altas sugieren un tumor indiferenciado)^{34,35}.

Los parámetros contemplan: grado de queratinización, polimorfismo nuclear, patrón de invasión y respuesta inflamatoria, donde el patrón de invasión muestra la forma en que la neoplasia se infiltra y desarrolla hacia los tejidos adyacentes, y la respuesta inflamatoria refleja la reacción inmunológica del individuo contra la neoplasia (Tabla 4)³⁵

Características morfológicas	Score por puntaje			
	1	2	3	4
Patrón de invasión	Bordes bien delimitados	Cordones y bandas infiltrativos.	Pequeños grupos o cordones de células infiltrativas (n>15)	Disociación celular marcada y desorganizada en pequeños grupos y/o células solas.
Respuesta inflamatoria	Marcada	Moderada	Leve	Ausente

Tabla 4 Clasificación de los parámetros patrón de invasión y respuesta inflamatoria según el sistema de graduación propuesta por Bryne.

Actualmente la consideración de la biología tumoral, específicamente sus características histológicas, ha sido utilizada para realizar un diagnóstico



precoz del COCE, teniendo un papel fundamental en su pronóstico. Las características histológicas del COCE pueden diferir ampliamente de un área a otra dentro del mismo tumor, por lo que se cree que la información pronóstica más útil puede ser deducida del FIT, zona donde residen las células tumorales más agresivas, considerándose la región más representativa de la neoplasia.³⁵

2.4.7 Métodos de diagnóstico en el carcinoma oral de células escamosas.

Para un diagnóstico temprano e importante para el COCE debe incluirse un examen exhaustivo de cabeza y cuello, los tejidos blandos y duros dentro de la cavidad oral, con una evaluación detallada de los ganglios linfáticos cervicales para determinar su ubicación, tamaño, movilidad, textura y sensibilidad. Una detección temprana de una lesión de la mucosa oral facilitará el diagnóstico en una etapa inicial; esto implica pasos claves para tratamientos necesarios, mejores resultados y menos invasivos, así como también de menor costo y sobre todo una disminución de la morbilidad y la mortalidad.³⁵

Las técnicas auxiliares de diagnóstico incluyen colorante azul de toluidina (kit de cáncer oral), técnicas citológicas exfoliativas, diagnóstico salival y sistemas de imágenes ópticas.³⁶

- Tinción con azul de toluidina

El azul de toluidina (también conocido como cloruro de tlonio) se ha utilizado para ayudar en la detección y selección del sitio de biopsia, para evaluar los márgenes del COCE de la mucosa oral.³⁶

Cuando se aplica tópicamente en forma de enjuague o hisopo, este colorante vital metacromático tiñe los tejidos con rápida división celular, incluidos los tejidos epiteliales inflamatorios, regenerativos y neoplásicos, el tejido

conectivo expuesto y las células epiteliales que albergan cambios atípicos de ADN.³⁶

El azul de toluidina es 100% sensible para identificar lesiones malignas en cavidad oral. Su uso puede ayudar a identificar lesiones sospechosas que alerten al odontólogo para remitirlo a médicos especialistas que le otorguen un diagnóstico y plan de tratamiento adecuado.³⁶ Figura 15

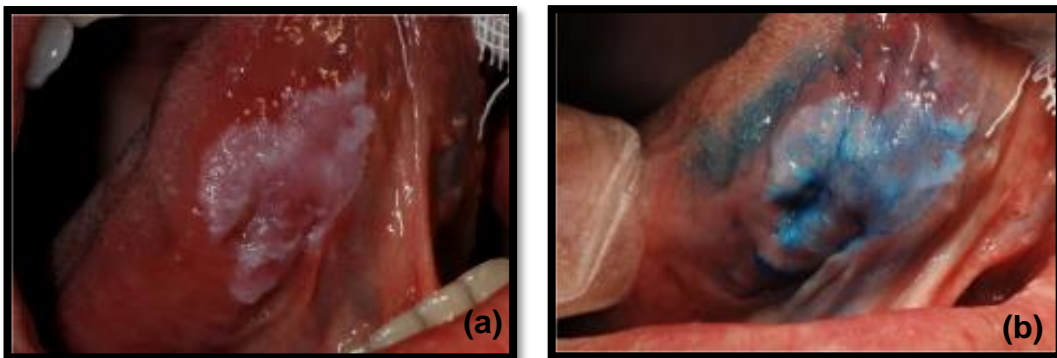


Figura 15 a) Leucoplasia en la superficie ventral de la lengua. b) Tinción azul de toluidina en áreas limitadas de la leucoplasia.³⁷

- Citología de cepillo

La citología con pincel permite la recolección de todo el grosor del tejido epitelial de la mucosa con el fin de examinar la morfología de las células descamadas bajo un microscopio óptico, siendo un método mínimamente invasivo y bien tolerado. Su uso ha sido recomendado en la práctica clínica para pacientes en los que la biopsia puede no ser posible.³⁶ Figura 16

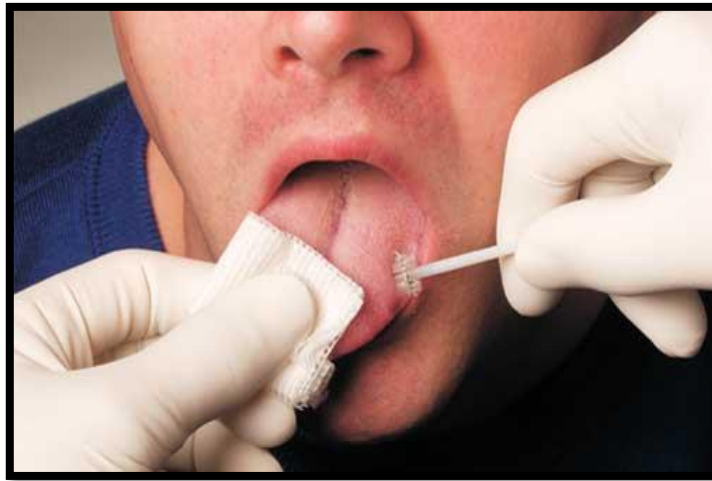


Figura 16 Citología exfoliativa³⁸

- Diagnóstico óptico

El principio de funcionamiento de estos sistemas se basa principalmente en la presencia de cambios metabólicos o estructurales anormales en las propiedades ópticas de los tejidos que se produce durante el desarrollo de la neoplasia oral. Las imágenes fluorescentes se basan en concentraciones de fluoróforos, enlaces cruzados de colágeno fluorescente, características de dispersión tisular, propiedades de absorción de hemoglobina y espesor del tejido.³⁶

Cuando se exponen a diversas formas de luz o energía, los tejidos de la mucosa revelan diferentes absorbancias y perfiles fluorescentes que pueden ayudar en la detección de tejido displásico. Son útiles para detectar zonas propicias para biopsia, y así facilitar el diagnóstico de COCE.³⁶

- Biomarcadores salivales

La detección de biomarcadores de cáncer junto con citología exfoliativa corresponden a métodos no invasivos para diagnosticar el COCE. Algunos de los biomarcadores encontrados en el flujo salival de pacientes con COCE son



8-oxoguanina ADN glicosilada, ácido hidroxieicosatetraenoico, carbonilos, ciclina D1, cistatina truncada SA-I, Cyfra 21-1. La proteína fosfatasa dual específica 1 (DUSP1), endotelina-1, fosfato sérico, galectinas 1, 3 y 7, inhibidor de la proteasa serina mamaria (Maspin), interleucina 1 beta, interleucina 8, Ki67, lactato deshidrogenasa, proteína M2BP, metaloproteinasas 2 y 9, proteína p53, proteína de unión a calcio (S100P), proteína autotrasportadora 1 (SAT1), telomerasa y transferrinas para evaluar el potencial maligno del COCE (Tabla 5)^{36,39}

BIOMARCADOR		TÉCNICA	OBSERVACIONES
8-Oxoguanina glicosilada	ADN	ELISA	Disminuye.
Ácido hidroxieicosatetraenoico		Cromatografía de gases, espectrometría de masas y la dilución de isótopos estables.	Aumentan, están involucrados en los procesos de metástasis e invasión tumoral
Carbonilos		Oxidación de proteínas	Aumentados, indica daño oxidativo de proteínas.
Ciclina D1		ELISA	Aumenta, se relaciona con la progresión celular y mal pronóstico.
Cistatinatruncada SA-I		SELDITOF	Aumenta, se relaciona con estadios de tumor
Cyfra 21-1		ELISA	Se relacionada con la recurrencia
DUSP1		PCR	Se aumentan en el cáncer oral.



Endotelina-1	ELISA	Buen marcador para diagnosticar liquen plano
Fosfato sérico	ELISA	Disminuye
Galectinas 1, 3 y 7	Análisis inmunohistoquímico	Aumentada, relacionadas con la progresión del tumor.
Maspin	ELISA	Su disminución se relaciona con el crecimiento, progresión y metástasis.
Interleucina 1 beta	ELISA- PCR	Se aumentan en el cáncer oral.
Interleucina 8	ELISA- PCR	Se aumentan en el cáncer oral.
Ki67	ELISA	Aumentan, relacionadas con la progresión celular y mal pronóstico
Lactato deshidrogenasa	Espectrofotometría	Indicador de necrosis celular, se relaciona con el mal pronóstico y la recurrencia.
M2BP	ELISA	Se eleva principalmente en estadios Brinkmann, 2012 iniciales del cáncer oral.
Metaloproteinasas 2 y 9	ELISA	Aumentan, relacionada con la metástasis.
p53	PCR	Su disminución se asocia a la capacidad de aberraciones celulares.



S100P	Western Blot Espectrometría de masas	Se aumenta en el cáncer oral, se relaciona con la progresión, metástasis y angiogénesis.
SAT 1	PCR	Se aumentan en el cáncer oral.
Telomerasa	PCR ELISA	Biomarcador de cáncer pero no diferencia estadio de la lesión.
Transferrina	Eco-2D MALDI-TOF Western Blot y ELISA	El aumento de los niveles salivales de transferrina se correlaciona con el tamaño y etapa del tumor.

Tabla 5 Biomarcadores salivales y técnicas empleadas para su análisis.

- Biopsia de mucosa oral

La biopsia y el estudio histopatológico de la muestra sigue siendo considerado como el mejor método de diagnóstico de cáncer de mucosa oral. Este método permite determinar el tipo histológico de cáncer, el grado de diferenciación celular, la cohesión entre células neoplásicas, los límites del tumor y otros parámetros como grado de proliferación celular, si se analiza con técnicas de inmunohistoquímica.³⁶

Ante la sospecha de cáncer se debe tomar una biopsia incisional que incluya tejido aparentemente sano y afectado; la biopsia excisional debe evitarse ya que no incluirá un margen suficiente y si la lesión es maligna, el sitio afectado y el carácter de la lesión serán poco claros para el cirujano o el radioterapeuta.³⁶ Figura 17

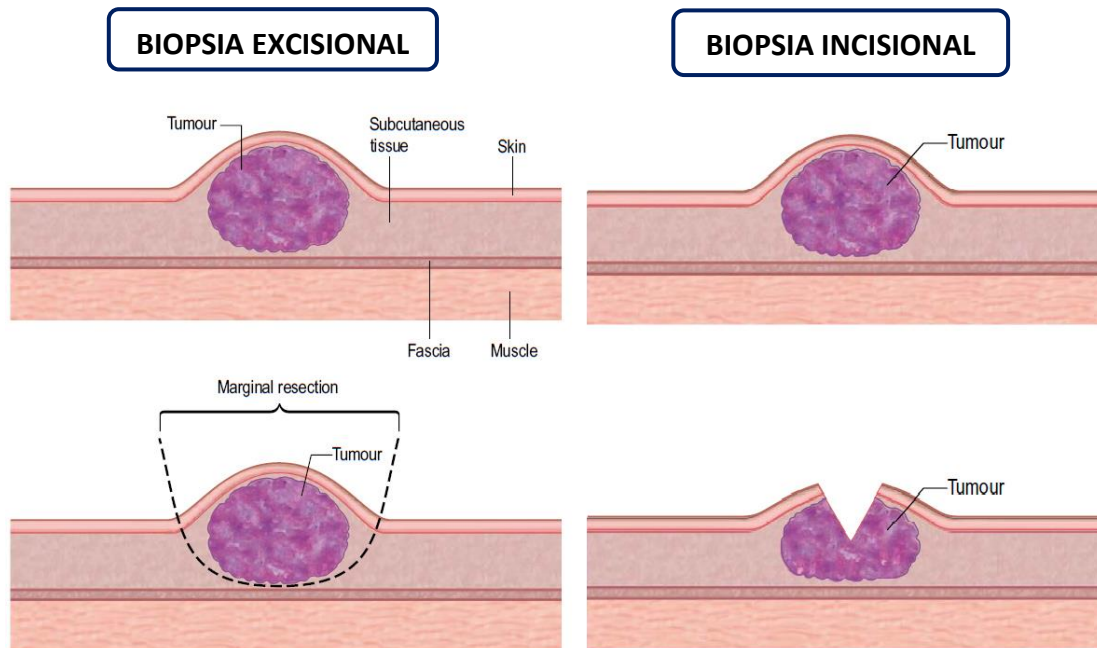


Figura 17 Biopsia excisional e incisional.⁴⁰

2.4.8 Tratamiento

Debido a su complejidad, para el tratamiento de esta, se debe tomar en cuenta si se encuentra en un estadio temprano o avanzado (según la estadificación T (tumor) N (metástasis a ganglios linfáticos), M (metástasis a distancia), la localización la cavidad bucal (labio, proceso alveolar y trígono retromolar, piso de boca, lengua, paladar duro, mucosa bucal), edad y el estado general del paciente.^{29,30}

El tratamiento incluye varias modalidades, entre las que se encuentran la extirpación quirúrgica, radioterapia, quimioterapia o ambos tratamientos.³⁰

Los cánceres en estadios temprano, presentan una supervivencia a dos años en el 90% de casos diagnosticados, utilizando la terapia de cirugía y radioterapia, en cambio casos de cánceres avanzados presentan una supervivencia a dos años, únicamente en el 45% de los casos, tratándose con una combinación de cirugía, radioterapia y quimioterapia.³⁰



3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las displasias orales son alteraciones morfológicas que dependiendo de su estadio se correlacionan con la capacidad de malignidad y pueden tener el riesgo de desarrollar COCE.

Un pronóstico temprano se desarrolla proporcionalmente a la supervivencia de los pacientes, por lo tanto, es importante el predecir este proceso utilizando moléculas expresadas en etapas tempranas de carcinogénesis. La expresión de CD105 en la vasculatura tumoral, podría ser un indicador importante de agresividad en neoplasias epiteliales.

4. JUSTIFICACIÓN

El COCE es la neoplasia maligna más frecuente, representando el 90% de los tumores malignos en la cavidad bucal. Actualmente existen hábitos perniciosos que han intervenido en la mayor prevalencia de COCE en personas jóvenes. Esto hace que la detección temprana de este tipo de lesiones repercuta en el tratamiento y pronóstico de los pacientes afectados. Se sabe que la angiogénesis juega un papel importante tanto en el crecimiento como capacidad metastásica de las células tumorales, por lo que evaluarla podría ser útil como marcador temprano de la transformación maligna.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la expresión de CD105 como marcador de angiogénesis en las displasias orales y el carcinoma oral de células escamosas?



6. HIPOTESÍS

La expresión de CD105 será mayor en los carcinomas orales de células escamosas que en las displasias orales.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Medir la expresión de CD105 como marcador de angiogénesis del carcinoma oral de células escamosas y las displasias orales.

7.2 Objetivos específicos.

1. Identificar la expresión de CD105 entre los diferentes grados de COCE.
2. Determinar la expresión de CD105 entre las diferentes displasias.
3. Comparar la expresión de CD105 entre los COCE y displasias orales.

8. DISEÑO DE ESTUDIO

8.1 Tipo de estudio

Observacional, transversal y retrospectivo.

8.2 Universo de estudio

Todos los carcinomas orales de células escamosas y displasias orales de DEPEl Clínica Medicina Bucal UNAM desde 2013 hasta 2017.

8.3 Muestra de estudio

Nueve casos de COCE, tres de cada grado (bajo, intermedio y alto), y seis casos de displasias orales, tres de cada grado; (leve y severa), de DEPEl Clínica Medicina Bucal UNAM.



8.4 Criterios de inclusión

1. Todos los casos que cuenten con bloque de parafina y con suficiente tejido para su análisis.
2. Los casos que en HyE se confirme el diagnóstico de COCE y displasias orales.

8.5 Criterios de eliminación

Casos donde no exista suficiente estroma

8.6 Criterios de exclusión

1. Casos que no cuenten con bloque de parafina.
2. Casos que no tengan suficiente tejido para valoración.

9. MATERIAL Y MÉTODO

9.1 Histoquímica

A los 15 casos obtenidos de DEPEI Clínica Medicina Bucal UNAM se les realizó 1 corte histológico a 5µm para un total de 15 cortes para el anticuerpo en estudio. Se observaron al microscopio óptico Leica DM750 las laminillas teñidas con HyE para confirmar el diagnóstico de COCE y displasias, determinando las zonas con mayor cantidad de estroma y realizar la estandarización tutora-alumna.

Se gradificarón histopatológicamente las lesiones con el fin de clasificar al COCE en bien diferenciado, intermedio y mal diferenciado, y displasias orales en leve y severa. Para este fin se utilizarán tablas de recolección de datos por cada una de las lesiones a estudiar basadas en la clasificación de la OMS 2017. Tabla 6



Carcinoma oral de células escamosas		Displasias orales	
Grado I	Bien diferenciado	Displasia bajo grado	
Grado II	Intermedio	Displasia alto grado	
Grado III	Mal diferenciado		

Tabla 6 Clasificación de COCE y displasias orales.

Previo a la lectura microscópica, se realizó el análisis de concordancia Kappa de Cohen tutora-alumna por triplicado utilizando las mismas tablas de recolección de datos; obteniendo un valor de kappa .91 interobservador y .93 intraobservador que indica una fuerza de concordancia casi perfecta.

9.1 Inmunohistoquímica (IHQ)

Previo a la realización de la técnica de IHQ, se recibió entrenamiento y se estandarizó la técnica para el anticuerpo y se determinó la dilución a utilizar y se estableció una dilución 1:600 para CD105.

El procedimiento para IHQ fue realizado de acuerdo a la reportado por Goldstein y Watkins en 2008. Primero las laminillas se desparafinaron en 3 baños de xilol durante 15 minutos y rehidratación en 2 baños en alcohol de 100%, seguidos de 2 más en alcohol de 96% durante 3 minutos cada uno. Posteriormente se lavaron con agua destilada desionizada y se realizó la recuperación antigénica utilizando un buffer de citratos con Ph 6 al 0.1 M y se llevó en baño de agua al horno de microondas durante 5 minutos a potencia 800W y posteriormente 15 minutos más a potencia 400 W.

Se realizaron 3 lavados con Buffer de fosfato (PBS) por 3 minutos cada uno y se inhibió la actividad de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% incubándolo durante 20 minutos en cámara húmeda; y transcurrido el



tiempo se hicieron 3 lavado de PBS por 3 minutos más. Se delimitó la muestra con lápiz hidrofóbico y enseguida se permeabilizó con Tritón-X10 al 0.2% durante 20 minutos. Se lavó nuevamente con PBS 3 veces durante otros 3 minutos. Posteriormente se realizó el bloque del marcaje inespecífico con PBS-albúmina al 0.2% durante 20 minutos en cámara húmeda y se realizaron 3 lavados de PBS de 3 minutos.

Se colocó el anticuerpo primario CD105 marca Santa Cruz ®Biotechnology, esta operación se realizó por separado para cada uno de los anticuerpos. Después de la incubación con el anticuerpo primario se realizaron 3 lavado de 3 minutos para colocar el anticuerpo secundario anti-mouse/rabbit en cámara húmeda por 20 minutos a temperatura ambiente de 3 lavados en PBS de 3 minutos cada uno.

Se prosiguió a la incubación de la peróxidasa de rábano (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 3 minutos. Después de aplicar el cromógeno se lavaron las laminillas con agua corriente, se dejaron en agua destilada desionizada durante 1 minuto.

Se realizó la contratinción con hematoxilina de Mayers durante 10 minutos y posteriormente se lavaron con agua corriente. Se realizó la deshidratación de los tejidos con alcohol de diferentes concentraciones y xilol para realizar el montaje con resina hidrofóbica.

Se utilizaron controles positivos y negativos; como control positivo de CD105 riñón. El control negativo se obtuvo por la omisión del anticuerpo primario sustituido por PBS en los tejidos anteriores. Tabla 7

Anticuerpo	
	CD105 
Control + Dilución	Riñón 1:600
Clona	SC-20632 Rabbit Polyclonal IgG

Tabla 7 control positivo, diluciones y clonas del anticuerpo.

9.2 Análisis de inmunoexpresión

Para evaluar la expresión inmunohistoquímica y debido a las diferentes técnicas metodológicas utilizadas para la obtención de muestras de DEPEl Clínica Medicina Bucal UNAM; el análisis de imágenes se realizó con el Leica Las-Ez e Image J.

Se tomaron fotografías de los casos del Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial con el programa Leica Las-Ez versión 3.2.0. Se seleccionaron los campos de mayor inmunoreacción a 40 aumentos y se volvieron tomar fotografías a 200 aumentos para realizar el conteo vascular.

Las fotografías fueron analizadas con el software ACDSee 10 photo Manager colocándoles una cuadrícula de medición en donde cada 0.025cm

correspondía a una micra, esto se realizó con el fin de hacer una medición vascular cuantitativa objetiva. Una vez colocada la cuadrícula se procedió a la cuantificación vascular con ayuda del software ImageJ® versión 1.46 previamente calibrado. Se realizó a convertir las fotografías a escala de grises y cambio pixelaje a 2.0 obteniendo las densidades ópticas. En la figura 18 se muestra la secuencia metodológica diseñada y utilizada en este estudio.

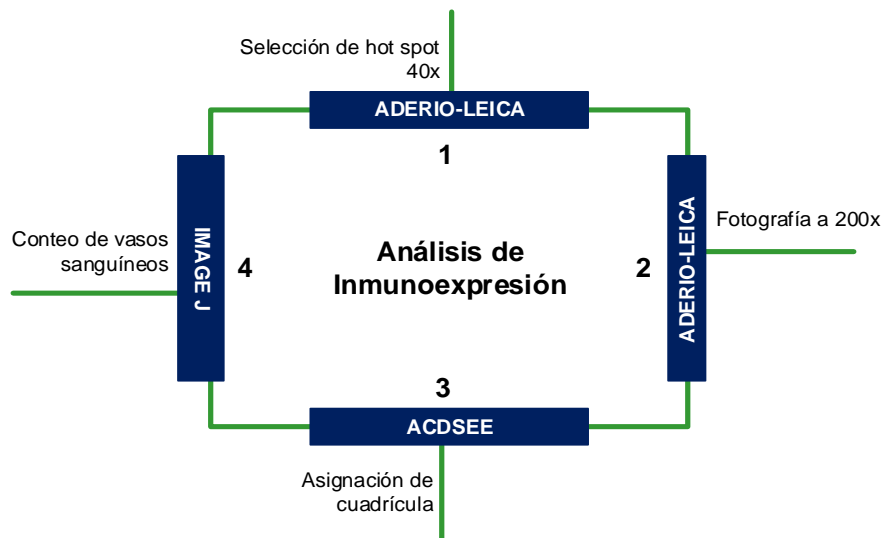


Figura 18 Imagen que muestra el procedimiento realizado para la cuantificación vascular.

9.3 Análisis estadístico

Para la cuantificación de vasos sanguíneos se utilizó mediana como medida de tendencia central y rango intercuartilar como medida de dispersión. Se realizó análisis estadístico no paramétrico Kruskal- Wallis con pruebas post hoc U de Mann Withney y Dunn para determinar la diferencia en la cuantificación entre los grados histológicos del COCE bien diferenciado, intermedio y mal diferenciado, y de las displasias leves y severas, así como para comparar los distintos valores obtenidos con el anticuerpo. El software

que se utilizó para el análisis de los datos fue SPSS Statistics Versión 22 y para la obtención de graficas GraphPad Prism5 versión 5.04. Figura 19 y 20

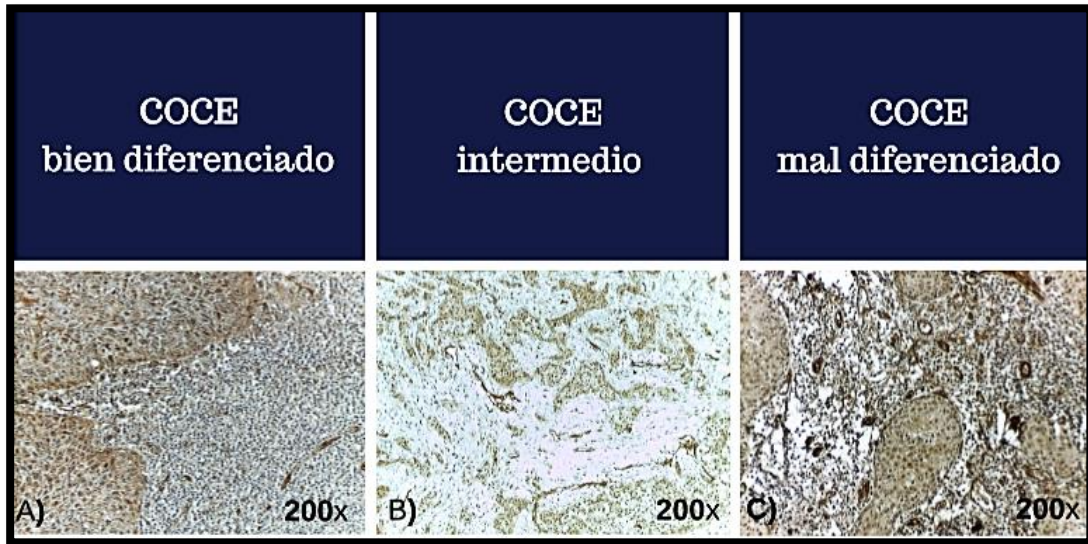


Figura 19 Fotomicrografía inmunohistoquímica CD105. A) COCE de bajo grado, B) COCE grado intermedio, C) COCE de alto grado. Fuente directa.

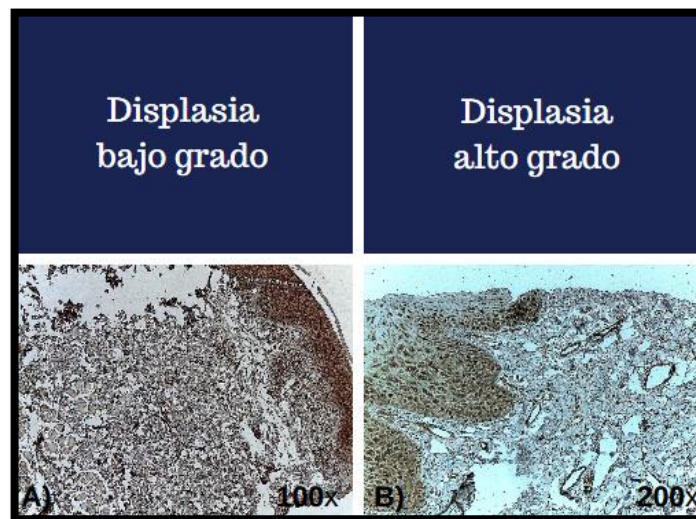


Figura 20 Fotomicrografía inmunohistoquímica CD105. A) Displasia de bajo grado, B) Displasia de alto grado. Fuente directa



10. RESULTADOS

	COCE BIEN DIFERENCIADO	COCE MAL DIFERENCIADO	COCE INTERMEDIO	DISPLASIA BAJO GRADO	DISPLASIA ALTO GRADO
# de vasos	20	28	44	4	15

Tabla 8 Conteo de vasos sanguíneos de medianas.

Debido a que el conteo de vasos sanguíneos se realizó en medianas tabla 8, se realizó un análisis estadístico no paramétrico para la diferencia entre grupos.

Al realizar la prueba de Kruskal-Wallis, encontramos una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$), al comparar los diferentes grados histológicos del COCE. Se realizó prueba de post hoc Dunn para identificar que grupo poseía mayor diferencia. Se obtuvo una $p < 0.018$ al comparar el COCE bien diferenciado con el COCE poco diferenciado, una $p < 0.025$ al comparar COCE bien diferenciado con COCE intermedio y una $p < 0.025$ de COCE intermedio del COCE poco diferenciado.

En cuanto a las displasias, se realizó una prueba estadística no paramétrica para la comparación de dos grupos. En el análisis de U de Mann Whitney indico que no existe diferencia estadísticamente significativa al comparar el conto de vasos de las displasias leves con las displasias severas ($p < 0.22$).



11. DISCUSIÓN

El carcinoma oral de células escamosas es el cáncer oral más común que ha sido identificado como una amenaza para la salud pública en nuestro país.

Saavedra nos dice en su estudio que la importancia de la angiogénesis en el crecimiento tumoral sólido está bien reconocida. La angiogénesis tumoral se considera el resultado de un desequilibrio entre los factores pro y anti-angiogénicos producidos, tanto por la malignidad como por las células normales.

Khalili y Marioni menciona que endogлина (CD105) es una glicoproteína inducida por hipoxia asociada a la proliferación que parece ser clínicamente mayor a otros marcadores en la evaluación selectiva de la angiogénesis tumoral.

Varios estudios han revelado una regulación de CD105 en una amplia gama de endotelios tumorales. Desde 2002, la expresión de CD105 endotelial también se ha investigado de forma retrospectiva en pacientes con carcinoma oral de células escamosas.

Por lo tanto, la angiogénesis y la actividad proliferativa desempeñan papeles clave en el crecimiento tumoral, así la evaluación de la angiogénesis en COCE ayuda a predecir el pronóstico del tumor; sin embargo, hay hallazgos contradictorios ante displasias que no son realmente favorables. Estas contradicciones pueden estar relacionadas con las diferencias en los métodos de cuantificación para el endotelio teñido y el anticuerpo utilizado como marcador de angiogénesis



De acuerdo a nuestro estudio se sugieren que la endoglina (CD105) es un potente marcador de neovascularización que nos permite discernir entre los diferentes grados de carcinomas orales de células escamosas. Al estudiar los diferentes tipos de displasias no encontramos ninguna diferencia entre ellas, esto puede ser debido a que las displasias corresponden a un cambio en la estructura del epitelio que no propicia una alteración en el tejido conjuntivo adyacentes.

Basados en nuestros resultados sugieren que CD105 se podría utilizar de forma independiente como un marcador de pronóstico clínico, ya que es muy específico en el COCE. Además, el aumento de la positividad de CD105 se correlaciona directamente con una mayor densidad microvascular del tumor y esto está relacionada con el pronóstico en el grado de diferenciación de COCE

12. CONCLUSIÓN

La expresión de CD105 en carcinoma oral de células escamosas es positivamente mientras que para displasias no es recomendada, ya que no hay diferencias significativas.

Por lo tanto, endoglina tiene un papel significativo en el desarrollo de COCE y podría ser relativamente más específico que los marcadores endoteliales comunes. Así que la MVD es capaz de distinguir la diferenciación de COCE en bien, intermedio o mal diferenciado debido a que la cuantificación vascular es proporcional al grado del COCE, por este marcador.

Se necesitan estudios con una muestra mayor que permitan corroborar los resultados obtenidos.



13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tae K., El-Naggar A.K., Yoo E, Feng L, Lee J.J., Hong W.K., Hittelman W.N. et al. Expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density in head and neck tumorigenesis. Clin Cancer Res. 2000; 6 : 2821-2828.
2. Saavedra J. S., Zúñiga L. F., Freyre S. I., Muñoz G. W., & Salguero C. El rol de VEGF en la Angiogénesis fisiológica y tumoral. Medicina; 2017: 39(3), 190-209.
3. Sánchez V. Papel de la angiogénesis en el crecimiento tumoral. Rev Cubana Invest Biomed. 2001;20(3):223-30.
4. Tian H., Ketova T., Hardy D., Xu X., Gao X., Zijlstra A., et al. Endoglin Mediates Vascular Maturation by Promoting Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Spreading. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2017; 37(6): 1115–1126.
5. Kumar H , Cancer Research, 3ª ed. Product Guide, [Citado el 15 de abril de 2018] Disponible en; <https://www.tocris.com/cell-biology/angiogenesis>
6. Khosravi P., Del Castillo A., Pérez G. Angiogénesis neoplásica. An. Med. Interna. 2008; 25(7): 366-369.
7. Inhibidores de la proteína Haspina , CHR-6494 - Cánceres Información [citado 13 de abril de 2018] Disponible en: <http://cancerres.info/?farmaco=inhibidores-proteina-haspina>



8. Khalili, M., Mahdavi, N., Beheshti, R., & Baghai F. Immunohistochemical Evaluation of Angiogenesis and Cell Proliferation in Tongue Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Dentistry*, (2015): 12(11), 846–852.
9. Miyata Y., Sakai H. Reconsideration of the clinical and histopathological significance of angiogenesis in prostate cancer: Usefulness and limitations of microvessel density measurement. *Internacional Journal of Urology*. (2015): 22 (9), 806-815.
10. Análisis de puntos calientes optimizado—ArcGIS Pro _ ArcGIS [Internet] Desktop [Citado el 14 de abril de 2018] Disponible en; <https://pro.arcgis.com/es/pro-app/tool-reference/spatialstatistics/optimized-hot-spot-analysis.htm#L>
11. Image J [Internet]. NIH. [Citado el 21 de marzo 2018] Disponible en: <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>
12. Folpe, A.L., Gown, A.M., Immunohistochemistry for analysis of soft tissue tumors, *Soft Tissue Tumors*. Mosby, Inc., St. Louis, Missouri, 2001, pp. 199-245.
13. Biophysics and Molecular Materials [Internet] LMU Munich. [Citado el 14 de abril de 2018] Disponible en; https://www.biophysik.physik.uni-muenchen.de/research/cell_biophysics/vwf/index.html
14. Fonsatti E., Altomonte M., Nicotra M., Giorgio P., Maio M., Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenic blood vessels. *Nature Publishing Group*, 2003, (22). 6557-6563.



15. Nassiri F., Cusimano M., Scheithauer B., Rotondo F., Fazio A., Yousef G., et al. Endoglin (CD105): A Review of its Role in Angiogenesis and Tumor Diagnosis, Progression and Therapy. *Anticancer Research*, 2011; (31). 2283-2290.
16. Valluru M., Staton C.A, Reed M., Brown N.J. Transforming growth factor- β and endoglin signaling orchestrate wound healing. *Front Physiol.* 2011; (2):1-12.
17. Saad R.S., Liu Y.L., Nathan G., Celebrezze J., Medich D., Silverman J.F. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. *Modern Pathology* .2004 ;17(2):197–203.
18. Nair S., Nayak R., Bhat K., Kotrashetti V.S., Babji D. Immunohistochemical Expression of CD105 and TGF-b1 in Oral Squamous Cell Carcinoma and Adjacent Apparently Normal Oral Mucosa and its Correlation With Clinicopathologic Features. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2016;24(1):35–41.
19. Basnaker M, Sr S, Bnvs S. Expression of Endoglin (CD-105) and Microvessel Density in Oral Dysplasia and Squamous Cell Carcinoma. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR.* 2014;8(9): ZC91-4.
20. Margaritescu C, Simionescu C, Mogoanta L, Badea P, Pirici D, Stepan a, et al. Endoglin (CD105) and microvessel density in oral squamous cell carcinoma. *Romanian journal of morphology and embryology.* 2008;49(3):321–6.



21. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. 1ra ed. EU; Editorial; World Health Organization Classification of Tumours. IARC. 2005;(9):163–75.
22. Echebarr A, Urizar A. Displasia epitelial. Concepto y significación. Av. Odontoestomatol. 2008;24(1):81-88,
23. DeLong L. Burkhart N. Patología oral y general en odontología. 2da Ed. México, Editorial: Wolters Kluwer, 2015, Pp. 20.
24. Castellanos J.L., Displasias y Carcinomas de la mucosa oral. Revista ADM. 2002, 54, 155-156.
25. Fleskens S, Slootweg P. Grading systems in head and neck dysplasia: their prognostic value, weaknesses and utility. Head Neck Oncol. 2009;1: Pp.11.
26. Fletcher C., Diagnóstico Histopatológico de Tumores, 4ta Ed., EU, Editorial Elsevier Inc, 2016; 1; 246-252
27. Boza Y.V., Carcinoma oral de células escamosas: Reporte de caso y revisión de literatura. ODOVTOS-Int J. Dent. Sc. 2017; 19 (1): 43-50.
28. Boza Y.V., Carcinoma oral de células escamosas: Reporte de caso y revisión de literatura ODOVTOS-Int J. Dent. Sc. 2016; 18: 61–67.
29. Meza G.G., Muñoz I. JJ., Páez V.C., Cruz L.B., Aldape B.B. Carcinoma de células escamosas de cavidad bucal en un centro de tercer nivel de atención social en la ciudad de México: Experiencia de cinco años. Av.



Odontoestomatol. 2009;25(1):19–28.

30. Napier L., Albuquerque A., Rodriguez A. C., Santiago R., da Costa Reis P.M., López R. Carcinoma escamocelular bucal diagnosticado precozmente. Rev Cubana Estomatol. 2010;47(3):347–54.
31. Gaitan L., Quezada D., Medicina y patología bucal; Guía de diagnóstico de lesiones de la mucosa oral. 1ra Ed. México; Editorial Trillas, 2015, Pp.110-114.
32. Odontología UNAM. [Internet] Carcinoma oral de células escamosas_ reporte de un caso y su relación con la inmunohistoquímica. [Citado el 14 de abril de 2018] Disponible en; <http://www.odonto.unam.mx/index.php?IDPagina=Tema%20del%20mes%20Febrero%202013>.
33. Anneroth G, Hanses L. A methodologic study of histologic classification and gradin of malignancy in oral squamous cell carcinoma. Departament of oral pathology. 1993
34. Cantín M., Suazo I., Venegas B., Zavando D. Carcinoma de Células Escamosas de Labio Inferior: Asociación entre Grado de Angiogénesis, Graduación Histológica y Frente de Invasión Tumoral. Int J Morphol. 2008;26(1):77–82.
35. Arriagada O., Venegas B., Cantín M. , Zavando D. , Manterola C., Suazo I. Rol de las características clínicas e histológicas como factores pronósticos para la sobrevida en pacientes con carcinoma de células escamosas de la cavidad oral. Rev Chil cirugía. 2010;62(5):441–8.



36. Güneri P, Epstein JB. Late stage diagnosis of oral cancer: Components and possible solutions. *Oral Oncology*. 2014;50(12):1131–6.
37. Petruzzi M., Lucchese A., Nardi G.M., Lauritano D., Favia G., Serpico R., et al. Evaluation of autofluorescence and toluidine blue in the differentiation of oral dysplastic and neoplastic lesions from non dysplastic and neoplastic lesions: a cross-sectional study. *J Biomed Opt*. 2014;19(7): 1-8
38. Medical Expo [Citado el 13 de marzo de 2018] Disponible en: <http://www.medicalexpo.es/prod/cdx-diagnostics/product-84835-545677.html>
39. Anaya M. Biomarcadores de cáncer oral en saliva. *Av. Odontoestomatol*.2013;(1):293–302.
40. Biopsia incisional y biopsia escisional [Citado el 17 de abril de 2018] Disponible en: <http://histopat.blogspot.mx/2012/08/biopsia-incisional.html>