



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

INMUNOEXPRESIÓN DE VEGF, CD34, CD105, CYR61,
TGFB-1, FGF-1, FLG, TGFBR-II EN COCE.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

ITZEL LEGORRETA VILLEGAS

TUTOR: Dr. LUIS FERNANDO JACINTO ALEMÁN

ASESOR: Mtro. DAVID ALONSO TREJO REMIGIO

ASESORA: Mtra. CARLA MONSERRAT RAMÍREZ MARTÍNEZ

UNAM-PAPIIT IN226720.



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.

Dedicatoria

A mi amada Universidad Nacional Autónoma de México, por abrirme sus puertas y permitirme ser parte de ella, por ser mi segunda casa y darme los mejores momentos de mi vida. Mi querida Facultad de Odontología, por permitirme aprender de ella, por brindarme los conocimientos y habilidades que se requieren en esta bella profesión.

A mi madre y padre, por todo su amor, apoyo, por ser mis pilares, siempre creer en mí y no permitir que me rindiera, porque sin ustedes no lo habría logrado. Gracias.

A mi hermano, por ser quien sigue mis pasos, por animarme, y apoyarme en las buenas y en las malas. Te quiero

A mi tutor el Dr. Luis Fernando, por la paciencia, el tiempo y la dedicación, por enseñarme y por compartir sus conocimientos, por ser mi guía y un gran apoyo a lo largo de la carrera y sobre todo por creer en mí.

A mis asesores, la Dra. Carla y el Dr. David por el tiempo, paciencia, dedicación y apoyo que me brindaron.

A mis angelitos Vicman y Rosa (Mimi), por siempre creer en mí, por motivarme, por el cariño y por el apoyo que me brindaron en vida.

A mi profesor Jorge Lorenzana por participar y ser parte importante en mi crecimiento personal.

A mis amigas Keilah, Vianney, Diana, Ana, Tere e Iván, por ser un gran apoyo, por nunca dejarme y siempre impulsarme a ser mejor.

A Luis Alberto por tu amistad, apoyo y motivación de siempre ir por más.

"En la vida triunfa el que persevera,
el que se esmera, el que persiste,
el que sabe que no es fácil,
pero continúa insistiendo,
si se cansa descansa y continúa.

Por eso es que...
jamás me rendí,
jamás me rindo...
y jamás me rendiré."

INDICE

1. Resumen	6
2. Introducción	7
3. Antecedentes	8
4. Marco teórico	
4.1 Definición de cáncer	10
4.2 Epidemiología del cáncer oral	11
4.3 Etiología y factores de riesgo	11
4.3.1 Tabaco	12
4.3.2 Alcohol	13
4.3.3 Genética	14
4.3.4 Dieta	15
4.3.5 Factores infecciosos	
4.3.5.1 Bacterianas y micóticas	15
4.3.5.2 Virales	16
4.3.6 Otros factores	17
4.4 Carcinogénesis	17
4.4.1 Oncogén y protooncogén	18
4.5 Angiogénesis	20
4.5.1 Proceso de angiogénesis	21
4.5.2 Angiogénesis fisiológica	21
4.5.3 Angiogénesis patológica	22
4.6 Biomarcadores	23
4.6.1 VEGF	24
4.6.2 CD34	25
4.6.3 CD105	26
4.6.4 CYR61	27
4.6.5 TGFB-1	28
4.6.6 FGF-1	30
4.6.7 FLG	31
4.6.8 TGFBR-II	32
4.7 Carcinoma Oral de Células Escamosas	
4.7.1 Definición	32
4.7.2 Epidemiología	33
4.7.3 Características clínicas	34
4.7.4 Características histopatológicas	35
4.7.5 Grados de diferenciación (BD, MD, PB)	36
5. Planteamiento del problema	38
6. Justificación	39
7. Pregunta de investigación	39

8. Hipótesis	40
9. Objetivo	
9.1 General	40
9.2 Específico	40
10. Diseño de estudio	
10.1 Tipo de estudio	40
10.2 Universo de estudio	40
10.3 Tamaño de muestra	41
10.4 Criterios de inclusión	41
10.5 Criterios de exclusión	41
10.6 Criterios de eliminación	41
11. Variables	42
12. Materiales y métodos	
12.1 Histoquímica	44
12.2 Inmunohistoquímica	44
12.3 Análisis de inmunoexpresión	45
12.4 Análisis estadístico	45
13. Resultados	46
14. Discusión	51
15. Conclusiones	55
16. Agradecimientos	55
17. Referencias	56

1. Resumen

Introducción: El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es una neoplasia maligna con diferenciación escamosa que surge del epitelio oral y que se presenta frecuentemente entre la quinta y sexta décadas de vida. La angiogénesis como parte del microambiente tumoral es un tema de interés en el estudio del COCE.

Objetivo: Determinar la relación entre las variables clínicas e histológicas del COCE con la inmunexpresión de VEGF, CD34, CD105, CYR61, TGFB-1, FGF-1, FLG y TGFBR-II.

Metodología: se seleccionaron 9 casos de COCE (3 para cada grado de diferenciación) del Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial de la División de Estudios de Posgrado e Investigación; se realizó la técnica de inmunohistoquímica para identificar la expresión de VEGF, CD34, CD105, CYR61, TGFB-1, FGF-1, FLG y TGFBR-II. El análisis de inmunexpresión se realizó con el programa ImageJ. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis.

Resultados: el análisis de la inmunexpresión mostró que VEGF y CYR 61 tuvieron mayor expresión en COCE pobremente diferenciados (PD), FLG fue positivo en carcinomas bien diferenciados (BD), CD105 en moderadamente diferenciados (MD); mientras que FGF, TGFB-1, TGFBR-II y CD34 fueron negativos. El análisis de MVD indicó mayor número de vasos en los COCE PD a través de la detección de CYR61 y CD34; mientras que los carcinomas BD presentaron mayor presencia de vasos CD105 positivos.

Conclusión Los resultados obtenidos nos muestran mayor expresión de VEGF y cantidad vasos sanguíneos en los COCE PD, mientras que en los COCE BD es más común observar neoformación vascular.

2. Introducción

El diagnóstico de una lesión potencialmente maligna o un carcinoma se realiza en etapas avanzadas, esto puede deberse a que la población le da poca importancia o desconoce el cuidado del sistema estomatognático. Existe una cultura muy pobre acerca de la prevención, es decir el paciente solo acude al odontólogo cuando presenta dolor. Ante este escenario la capacidad del odontólogo debe ser manifiesta, es decir se debe realizar una revisión y exploración de todos los tejidos que comprenden cabeza y cuello, así como enseñar al paciente a realizar una autoexploración periódicamente con el objetivo de disminuir ese retraso en el diagnóstico y tratamiento de este tipo de lesiones.

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es la neoplasia maligna más frecuente de cavidad oral. Histológicamente puede ser categorizado en 3 grados de diferenciación (bien (BD), moderado (MD) y pobremente diferenciado (PD)). Cada grado de diferenciación es una entidad biológica diferente, es decir, el microambiente tumoral para cada caso es único y exclusivo. Si bien se considera que la angiogénesis es necesaria para el desarrollo tumoral se debe comprender que cada caso tendrá un proceso patogénico particular para este mecanismo.

Por ello este trabajo tiene la intención de analizar cuál es la expresión de VEGF, CD34, CD105, CYR61, TGFB-1, FGF-1, FLG y TGFBR-II; así como la densidad microvascular (MVD) en los tres grados de diferenciación del COCE.

3. Antecedentes

La paleontología brinda alguna evidencia de lesiones compatibles con el cáncer en humanos desde hace 150 000 años, aunque también muestra que era una enfermedad poco frecuente, que se habría incrementado a consecuencia de los cambios medioambientales desde el siglo XVIII.¹

El papiro de Smith es el más antiguo (1600 A.C.) y actualmente se encuentra en la Academia de Medicina de New York. Es un documento que ilustra las afecciones de la época, describiendo 8 casos de úlceras o tumores removidos con el uso de un “cauterio” y posibles osteosarcomas. En el papiro de Ebers (1500 A.C.), hay una mayor descripción de lesiones tumorales con referencia a órganos afectados, como la piel, el estómago, el útero, el ano y posiblemente la tiroides, así como relatos de extirpaciones quirúrgicas.²

En el *Corpus Hippocraticum*, se menciona la existencia de lesiones ulcerosas crónicas, algunas veces endurecidas, que se desarrollan progresivamente y sin control expandiéndose por los tejidos semejando las patas de un cangrejo, por lo que las denominó con la palabra griega *καρκίνοϛ* (se lee *karkinos*) dándole un significado técnico a la palabra griega cangrejo que se escribe igual.¹

Hipócrates creó el termino cáncer para designar los crecimientos malignos, palabra que significa cangrejo y sugiere el avance del proceso en todas direcciones.¹

Siglos después, al formarse el castellano se derivan de la palabra latina dos términos separados. Por una parte, usando un sufijo diminutivo, se forma la palabra cangrejo para denominar al crustáceo y, por otra parte, se consolida el término “cáncer” como un término médico para un tipo determinado de lesión.¹

Galeno médico griego del siglo II, recomendó el cauterio y la cirugía para los crecimientos tumorales, a los que denominó “oncos”, que quiere decir “hinchazón”.²

Hasta mediados del siglo XIX el tratamiento de tumores fue elemental en Europa, basado mayormente en la extirpación con técnicas muy rudimentarias. Gracias al uso de la mandrágora y plantas somníferas que contienen escopolamina, atropina y hioscina; fue posible usar el tratamiento quirúrgico en algunas tumoraciones, pero el éxito resultaba casi siempre nulo por la infinidad de complicaciones y la remoción incompleta con la cirugía de entonces.²

En 1838, se describió que el tejido canceroso estaba conformado por células con morfología alterada, y se postuló que la causa de esta enfermedad yacía en lesiones celulares.³

4. Marco teórico

4.1 Definición de cáncer

El cáncer no es una enfermedad, sino muchas enfermedades; es un término genérico usado para designar unas 200 entidades distintas que pueden afectar a cualquier parte del organismo.^{4,5} Actualmente, el cáncer es considerado como un desorden de células que se dividen anormalmente, lo que conduce a la formación de agregados que crecen dañando tejidos vecinos, se nutren del organismo y alteran su fisiología.³

El cáncer es el resultado de la interacción entre diferentes carcinógenos y promotores.⁶ Es una enfermedad que se origina a partir de un grupo de células epiteliales o mesenquimatosas “anormales” que han escapado a los controles de replicación y diferenciación; se multiplican de manera autónoma, sin control y de manera irregular. El cáncer posee la capacidad de invadir localmente y a distancia otros órganos y tejidos.⁷ Es un trastorno, caracterizado por una proliferación celular irregular, resultado de una acumulación de alteraciones en la secuencia genética,⁸ y los mecanismos normales de muerte celular, lo que conduce al desarrollo de clones capaces de invadir y destruir los tejidos adyacentes, así como diseminarse hacia órganos distantes deteriorando su función y conduciendo a la muerte.⁵

Entre los términos utilizados para designar a esta enfermedad se encuentran neoplasia y tumores malignos. Una de las características que define el cáncer es la generación rápida de células anormales que crecen más allá de sus límites normales y pueden invadir zonas adyacentes del organismo o diseminarse a otros órganos en un proceso que da lugar a la formación de las llamadas metástasis.⁴

Es importante tener en cuenta que el cáncer se está convirtiendo en la segunda causa de muerte en el mundo después de la enfermedad cardiovascular. La alta incidencia y elevado impacto socioeconómico hacen de este grupo de enfermedades un importante problema de salud tanto nacional como internacional.⁹

4.2 Epidemiología del cáncer oral

El cáncer bucal ocupa el sexto lugar de incidencia de neoplasias malignas en el mundo. Al menos, el 95% de las neoplasias de la cavidad bucal son carcinomas epidermoides. Aunque la mayor parte de estos carcinomas son fáciles de descubrir resulta desalentador que muchos se detectan tardíamente y que el 50% de estas lesiones resultan mortales.⁴

La frecuencia de cáncer oral en la población mexicana ha aumentado en las últimas décadas, y representa entre el 1% y el 5% total de las neoplasias malignas. Su elevada incidencia está ligada a diferentes factores como el hábito de fumar, el consumo de alcohol, el tipo de alimentación, la herencia, la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y por el virus del papiloma humano (VPH).^{6,10}

En México entre 1979 y 2003, el número de muertes debidas a cáncer oral fue de 15,579; por lo que actualmente es considerado un problema de salud pública.⁶

4.3 Etiología y factores de riesgo.

El cáncer tiene una etiología multifactorial, existen reportes a nivel mundial de que los factores de riesgo más comunes son el uso del tabaco, el consumo excesivo de alcohol, sin embargo, existen otros factores como dieta, factores infecciosos (bacterias, hongos y virus). La predisposición genética también es un factor importante en la carcinogénesis oral, ya que también se ha observado que ciertos polimorfismos en genes que codifican para enzimas involucradas en el metabolismo de tabaco y alcohol, pueden ser partícipes del proceso de carcinogénesis. Diversos estudios han demostrado que una historia familiar de cáncer de cabeza y cuello aumenta el riesgo de desarrollar la enfermedad. Otros pacientes con enfermedades hereditarias raras como la anemia de Fanconi o la Xerodermia pigmentosa también tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer oral.¹¹ Los factores de riesgo no son de manera precisa las causas directas, solo están asociadas con el evento.⁵ En todo el mundo 25% de los casos de cáncer

oral se le atribuye al consumo de tabaco, 7-19% al consumo excesivo de alcohol, 10-15% a deficiencias nutricionales y en algunas regiones el 50% al consumo de la nuez de betel. Se ha estimado que los bebedores y fumadores asiduos tienen un riesgo de casi 40 veces mayor que los abstemios de padecer cáncer oral.¹¹

4.3.1 Tabaco

El tabaquismo y la exposición a sus carcinógenos es el factor de riesgo más importante para cáncer de las vías aerodigestivas superiores (VADS). El 90% de los cánceres de la cavidad oral en hombres y 60% en mujeres se atribuyen al consumo del tabaco.^{5,12}

Existe suficiente evidencia para vincular a los carcinógenos del tabaco como agentes etiológicos del cáncer de pulmón, bucofaríngeo, hipofaríngeo, laringe, esófago, páncreas, vejiga, cavidad nasal, carcinoma de células renales, cáncer de cuello uterino, adenocarcinoma de esófago, leucemia mieloide y cavidad bucal.⁵

Ocho de cada 10 pacientes con cáncer oral son fumadores de tabaco en sus diversas formas: cigarrillo, puros, tabaco de mascar, tabaco, pipa, etc.¹³ Entre los fumadores de habanos y pipa, el riesgo de padecer cáncer de la cavidad oral es mayor que en los no fumadores, aunque la tasa de cáncer de faringe y laringe es menor a la de los fumadores de cigarrillos; cuando se combina pipa-cigarrillos o habano-cigarrillos, el riesgo de cáncer de VADS es mayor en fumadores de pipa. Los cigarrillos light incrementan la frecuencia de consumo y por lo tanto incrementa el riesgo de cáncer, debido a la exposición del fumador a mayor dosis; finalmente, el cigarrillo hecho a mano incrementa dos veces el riesgo de cáncer. El hábito de colocarse tabaco en la mucosa oral, ya sea sublingual o en el carrillo, se asocia a cuatro o seis veces más al cáncer de la cavidad oral; este hábito poco popular en México, es frecuentemente en algunas regiones de Estados Unidos y Europa.¹²

Los productos del tabaco contienen más de 70 compuestos carcinógenos conocidos, y en el humo inspirado del tabaco existen más de 30 carcinógenos; en ambos los más importantes son nitrosaminas e hidrocarburos policíclicos como el benzopireno. Aunque estos últimos son los agentes cancerígenos más importantes de cigarrillo; en el tabaco sin combustión, las nitrosaminas son las que causan el mayor daño. Se ha demostrado que una deficiencia en la metabolización y desintoxicación de estos carcinógenos provoca la aducción de cancerígenos activos al ADN de los queratinocitos orales.^{11,12}

4.3.2 Alcohol

El consumo de alcohol es el segundo factor de riesgo de importancia después del tabaco, que se asocia a padecer cáncer.¹²

El etanol como tal no es cancerígeno, pero es metabolizado a acetaldehído, el cual ejerce múltiples efectos mutagénicos en el ADN. El alcohol también incrementa la permeabilidad de la mucosa oral, lo cual facilita el paso de carcinógenos a través del tejido epitelial.¹¹

Las personas que consumen alcohol, pero que nunca han fumado, podrían tener un riesgo significativamente mayor de carcinogénesis oral, aunque bien podría haber una tendencia a que un mayor consumo de alcohol esté relacionado con el observado incremento de padecer cáncer oral en pacientes jóvenes.¹¹

El riesgo de padecer cáncer en personas que consumen alcohol es seis veces mayor que en los que no consumen; y el riesgo de muerte por cáncer de orofaringe es cuatro veces mayor en los bebedores. El consumo de alcohol se relaciona estrechamente con los carcinomas epidermoides originados en la cavidad oral, orofaringe, laringe supraglótica e hipofaringe, además de cáncer de hígado, colon, recto, así como cáncer de mama.^{5,12}

Los mecanismos conocidos de la carcinogénesis alcohólica son deficiencias nutricionales e hipovitaminosis, factores metabólicos, deficiencia de células T y de su actividad mitótica, irritación local, disminución de la acción protectora de la

saliva, potencialización y solvencia de los carcinógenos del tabaco, lo que promueve su penetración en la mucosa, desregulación del sistema enzimático del citocromo p450, enzima que favorece el cambio de procarcinógeno, disminuye la actividad de enzimas reparadoras del ADN e incrementa el daño cromosómico e incrementa los niveles séricos de acetaldehído.¹²

El alcohol, al tener mecanismos cáusticos sobre las áreas de la mucosa y las vías aerodigestivas superiores, provoca atrofia del epitelio lo que hace a la mucosa oral más susceptible a otros carcinógenos y permite el pasaje de sustancias dañinas, como los productos derivados de la combustión de tabaco, lo cual resulta en un claro ejemplo de sinergia.⁶

4.3.3 Genética

Existe evidencia molecular epidemiológica que sustenta la hipótesis de mayor susceptibilidad genética: alteraciones en la capacidad de metabolizar carcinógenos, en el sistema de reparación del ADN y en el sistema de apoptosis.¹²

El cáncer se origina de mutaciones en el genoma y se ha encontrado una secuenciación de nucleótidos; se descubrieron más de 100 mutaciones somáticas correspondientes a las zonas de exones que codifican y se registraron en 210 tipos de cáncer. La susceptibilidad genética en la cavidad oral también se ha observado en lesiones orales potencialmente malignas, lupus eritematoso discoide y fibrosis submucosa.⁶

Las mutaciones de los genes de la carcinogénesis pueden ser heredadas o ser adquiridas de novo (o mutaciones somáticas) generalmente producto de la exposición a sustancias del ambiente (carcinógenos) o agentes biológicos (virus oncogénicos). En las últimas dos décadas se han descrito más de 50 síndromes de susceptibilidad a cáncer de alta penetrancia, ligados a la herencia de mutaciones en genes específicos.³

La presencia y acumulación de las mutaciones responsables de la progresión tumoral esta favorecida por un estado de inestabilidad genómica en las células tumorales.³

Las exposiciones ambientales también están implicadas en la génesis del cáncer, los contaminantes presentes en el aire, agua y otros medios se ha demostrado son carcinogénicos, excluyendo la exposición al asbesto y radón, exposición pasiva al humo del tabaco, emisiones de los motores diesel y contaminación por arsénico del agua.³

4.3.4 Dieta

El déficit de antioxidantes que se ingieren por la dieta constituye un factor predisponente al cáncer bucal. Los polifenoles dietéticos disminuyen la incidencia de carcinomas bucales y protegen contra cáncer por inducción de muerte celular e inhibición del crecimiento tumoral, invasión y metástasis. No solo la carencia de nutrientes, sino también la forma de ingerir los alimentos se convierte en una lección preventiva ya que los alimentos calientes, picantes, muy condimentados o de consistencia dura pueden representar agentes lesivos de una severidad igual a los factores de riesgo antes mencionados.^{11,14}

4.3.5 Factores infecciosos

4.3.5.1 Bacterianas y micóticas

Existen teorías sobre que las bacterias pueden participar en la carcinogénesis bucal mediante la inducción de inflamación crónica, por interferencia directa o indirecta con el ciclo celular y las vías de señalización o por el metabolismo de sustancias potencialmente cancerígenas.¹⁴ Se ha observado cierta relación con sífilis y glositis sífilítica, pero más bien debido a los fármacos empleados en el tratamiento de estas entidades como las sales de arsénico u otros metales pesados.¹³

Las nitrosaminas producidas por *Candida sp.* Pueden activar protooncogenes específicos; sin embargo, la transformación maligna asociada con otros factores de riesgo como el tabaco y el alcohol, postula la producción de un efecto sinérgico.¹⁴

4.3.5.2 Virales

Se reporta que los virus oncogénicos pueden relacionarse con el 10 y 15 % de los cánceres humanos. Su principal efecto sobre la inestabilidad genética, incluye mutaciones, aberraciones y daño del ADN.⁵

Los virus oncogénicos actúan en forma distinta, ya que aceleran la proliferación celular o inhiben la posibilidad de reparar o eliminar genes mutados.⁵

Durante los últimos años se ha puesto en evidencia la relación del VPH con la aparición de lesiones precancerígenas y con el COCE en este último caso se ha observado una prevalencia del 43.5% con predominio de los genotipos VPH-16 y VPH-18. Estos virus tienen especial tropismo por los epitelios de células escamosas (epiteliotropismo) donde se lleva a cabo su ciclo reproductivo.⁶

El VPH en la población mexicana ocupa un lugar especial en la patogenia del COCE, ya que la prevalencia en hombres y mujeres es de 43 y 17.5% respectivamente. El serotipo asociado con mayor frecuencia fue el 16. ¹⁰

Se ha detectado ADN del virus del papiloma humano (VPH) hasta en el 30-50% de los casos de cáncer bucal. Estos virus tienen gran afinidad por los queratinocitos y se encuentran principalmente en el tracto genital, uretral, piel, laringe y mucosa traqueo-bronquial y bucal.¹⁴

La evidencia de la infección por VPH, junto con la relación clonal entre el VPH y la neoplasia, se ha demostrado por la integración viral en el genoma de las células huésped, lo cual sugiere un rol causal en la carcinogénesis. De igual forma existen reportes que vinculan al Virus del Herpes Simple (VHS) y Epstein Barr con la carcinogénesis.¹

4.3.6 Otros factores

Existen otros factores de riesgo relevantes que incluyen rayos ultravioletas de la luz solar o radiaciones ionizantes. El envejecimiento y otros procesos virales también contribuyen generando moléculas con reactividad química que al reaccionar con el ADN dañan y mutan genes.⁵

El cáncer oral es mucho más común en grupos socioeconómicos más bajos y en poblaciones con altos índices de pobreza quienes muchas veces tienen poco acceso a cuidados dentales, tienen mala alimentación y estilos de vida menos saludables.¹¹

El consumo de nuez de Betel, nuez de areque y otras raíces utilizadas en el “aseo” dental, como la souke en la india y Túnez, se asocia a incremento en el riesgo de cáncer de encía y piso de la boca.¹²

4.4 Carcinogénesis

Se llama carcinógeno a todo agente que altera el ADN; un promotor es aquel que desencadena la actividad proliferativa de una célula alterada que conduce a la reproducción incontrolada de células anormales. El proceso de transformación de una célula normal en una célula maligna se denomina carcinogénesis.^{3,6,13}

Este proceso tiene etapas o fases (iniciación, promoción, progresión). La iniciación ocurre a nivel del genoma y las alteraciones pueden darse en los tumores benignos y malignos. Los agentes que actúan en la primera etapa pueden ser físicos-químicos o virales generando la mutación. La promoción representa la etapa del crecimiento o proliferación de las células iniciadas, así como también la angiogénesis y degradación de las matrices extracelulares. La progresión implica la capacidad de invadir tejidos vecinos o a distancia por parte de la célula tumoral maligna.¹⁵

4.4.1 Oncogén y protooncogén

Los protooncogenes son genes que cumplen funciones normales en el ciclo celular ya que participan en la proliferación y diferenciación.^{3,16} Cuando el protooncogén es activado debido a una mutación este suele contribuir a la génesis tumoral.^{3,5} Al hablar de oncogén se entiende como aquel segmento genético que es alterado en su estructura por agentes físicos, químicos o biológicos y cuyo resultado es la alteración estructural o funcional de la célula al cual pertenece, desencadenando de esta manera el aumento descontrolado de su expresión genética.¹⁶

Los oncogenes codifican para proteínas que desencadenan señales positivas de proliferación que mantienen a la célula estimulada para pasar de una mitosis a otra ¹⁷ son numerosos los mecanismos por los que un protooncogén puede transformarse en un oncogén: inserción de un promotor viral, traslocación, amplificación, hipometilación, mutación puntual y/o delección.⁵ Los oncogenes pueden ser clasificados de acuerdo a su función celular.

Tabla 1. Clasificación de oncogenes				
Clasificación	Protooncogén	Modo de activación	Tumor humano asociado	
Factores de crecimiento de Cadena β del PDGF	SIS (nombre oficial PBGFB)	Sobreexpresión	Astrocitoma Osteosarcoma Cáncer de estómago	
Factores de crecimiento fibroblástico	HST1 INT2 (nombre oficial FGF3)	Sobreexpresión Amplificación	Cáncer de vejiga Cáncer de mama Melanoma	
TGF-α	TGFA	Sobreexpresión	Astrocitomas	
HGF	HGF	Sobreexpresión	Carcinomas hepatocelulares Cáncer de tiroides.	
Receptores de factores de crecimiento Familia del receptor EGF	ERBB1 (EGFR), ERBB2	Sobreexpresión	Carcinoma de células escamosas de pulmón, gliomas Cánceres de mama y ovario	
Tirosina cinasa 3 similar a FMS	FLT3	Amplificación	Leucemia	
Receptor para factores neutrófilos	RET	Mutación puntual Mutación puntual	Neoplasia endocrina múltiple 2ª y B, carcinomas medulares de tiroides familiares	
Receptor PDGF	PDGFRB	Sobreexpresión	Gliomas, leucemias	
Receptor para el factor de células madres (de acero)	KIT	Translocación Mutación puntual	Tumores estromales gastrointestinales, seminomas, leucemias	
Proteínas implicadas en la transducción de señal			Tumor de colon, pulmón, y pancreáticos Tumor de vejiga y riñón	
Unión de GTP	KRAS	Mutación puntual	Melanomas, tumores malignos hematológicos	
Tirosina cinasa sin receptor	HRAS NRAS	Mutación puntual Mutación puntual	Leucemia mieloide crónica	
Transducción de señal RAS	ABL	Translocación	Leucemia linfoblástica aguda	
Transducción de señal WNT	BRAF B-catenina	Mutación puntual Mutación puntual Sobreexpresión	Melanomas Hepatoblastomas, carcinoma hepatocelular	
Proteínas reguladoras nucleares	C-MYC N-MYC	Translocación Amplificación	Linfoma de Burkitt Neuroblastoma, carcinoma de pulmón de células pequeñas.	
Activadores transcripcionales	L-MYC	Amplificación		
Reguladores del ciclo celular	Ciclina D	Translocación Amplificación	Linfoma de células del manto	
Ciclinas	Ciclina E	Sobreexpresión	Cáncer de mama y esófago glioblastoma,	
Cinasa dependiente de ciclina	CDK4	Amplificación o mutación puntual	melanoma sarcoma	

Fuente: tomado de Patología Estructural y Funcional. Robbins. 8ª. Edición. España: 2010 Elsevier

Investigaciones recientes han sugerido a los factores de crecimiento angiogénicos como los blancos terapéuticos más promisorios en el tratamiento del cáncer o cáncer oral.

4.5 Angiogénesis

La angiogénesis se define como un proceso fisiológico mediante el cual surge la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes y se ha caracterizado como un proceso esencial para la proliferación de células tumorales y la viabilidad.¹⁸

Es un proceso que implica una regulación estricta de múltiples vías de señalización; el proceso de la angiogénesis incluye la migración y proliferación de células endoteliales, la formación y organización de grupos celulares en estructuras tubulares que eventualmente se unirán, para finalmente madurar en vasos sanguíneos estables.¹⁹

En el proceso de la angiogénesis intervienen muchos factores de crecimiento como la angiopoyetinas (ANG-1, ANG-2), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).²⁰

Las células neoplásicas, así como las células inmunes infiltrantes y/o las células de los tejidos sanos son capaces de secretar sustancias con actividad angiogénica. Cuando estos factores de crecimiento se unen a sus receptores específicos presentes en las células endoteliales, se favorece la proliferación, migración, e invasión de las células endoteliales, con la consiguiente formación de los capilares sanguíneos.⁹

La angiogénesis es a menudo provocada por bajas concentraciones de oxigenación en los tejidos (hipoxia), lo que conduce a la expresión de múltiples factores de crecimiento a través de los factores inducidos por hipoxia por las células cancerosas.¹⁸

Los vasos sanguíneos intratumoral son conocidos por jugar un papel importante en el crecimiento del cáncer por proveer de oxígeno y nutrientes, así como excreción de productos metabólicos y están asociados con metástasis.²¹

La angiogénesis es un proceso importante en la cicatrización de heridas, así como en la progresión de diversas enfermedades tales como neoplasias, retinopatías y

la artritis reumatoide. Los primeros pasos de este proceso incluyen la colagenasa de las células endoteliales y la producción de la proteasa para la degradación de la membrana basal vascular y estroma matriz extracelular, para la migración y la proliferación.²²

4.5.1 Procesos de angiogénesis

La angiogénesis se lleva a cabo principalmente por los siguientes pasos:

- a) Las células endoteliales precursoras dan origen a los vasos sanguíneos.
- b) Las células endoteliales se ensamblan formando un laberinto vascular primitivo de capilares pequeños (vasculogénesis)
- c) El plexo vascular se expande de manera progresiva debido al nacimiento de los vasos.
- d) El dicho plexo se remodela formando una red vascular altamente organizada de vasos grandes que se ramifican en vasos pequeños.
- e) Los canales recién formados por las células endoteliales son cubiertos por pericitos y células de músculo liso, las cuales regulan la contracción y dilatación de los vasos sanguíneos proporcionando resistencia y permitiendo la regulación de la perfusión de los vasos.^{19,23}

4.5.2 Angiogénesis fisiológica

La angiogénesis fisiológica es crucial para el desarrollo embrionario, el crecimiento y diferenciación en los niños, reparación de heridas y funciones de reproducción y continua después del nacimiento en el desarrollo temprano postnatal.^{19,20}

A lo largo del desarrollo, así como en la vida adulta, la angiogénesis fisiológica ocurre únicamente en el ovario en mujeres menstruales, debido a que el crecimiento folicular y el desarrollo del cuerpo lúteo dependen de la proliferación de nuevos vasos capilares y en la placenta durante el embarazo.¹⁹

4.5.3 Angiogénesis patológica

En la progresión del cáncer, angiogénesis patológica es impulsado por la sobreexpresión de factores pro-angiogénicos. Esto crea un desequilibrio local entre los factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos, lo que conduce al reclutamiento de un nuevo suministro vascular. A diferencia de la cicatrización de heridas, en donde la angiogénesis se somete a una fase de resolución, la angiogénesis tumoral continua anormalmente en los tumores en crecimiento, ya que requieren el suministro vascular para proporcionar nutrientes esenciales y oxígeno a la proliferación de células de cáncer.¹⁸

La angiogénesis tumoral, consiste en una serie de complejos pasos que llevan en un último lugar a la formación de neovasos que suministran sangre y nutrientes a la neoplasia. Es un proceso esencial para el crecimiento de la neoplasia como para el desarrollo de metástasis a distancia. La angiogénesis patológica aparece cuando se alcanza y sobrepasa el umbral entre los estímulos e inhibidores angiogénicos.²⁰

En la angiogénesis tumoral se dan dos fases separadas por el llamado “cambio angiogénico”; la primera fase es avascular, en la que los tumores alcanzan un diámetro inferior a 1-2 mm; mientras que la segunda una fase vascular el tumor crece exponencialmente.²⁰

El tumor que se desarrolla sin neovascularización, rara vez sobrepasan los 2 a 3 mm.⁵, suelen ser lesiones asintomáticas y clínicamente no detectables; la fase angiogénica o vascular se declara cuando un subgrupo de células se desvía hacia un “fenotipo angiogénico” y el tumor se vasculariza. A partir de este momento cambian las perspectivas clínicas, el tumor se convierte clínicamente detectable, sintomático, hace metástasis y aumenta su grado de malignidad. El aumento de vasos de neoformación se relaciona con un peor pronóstico en las neoplasias.²⁴

Al igual que el tejido normal, los tumores requieren sustento en forma de nutrientes y oxígeno, ya que también tienen la capacidad de evacuar los desechos metabólicos y el dióxido de carbono; la neovasculatura asociada al tumor,

generada por el proceso de angiogénesis, aborda estas necesidades. En los últimos años se ha postulado la posibilidad de analizar el proceso de angiogénesis a través de biomoléculas o biomarcadores que nos indiquen cual es la conducta de este fenómeno en ciertas neoplasias para así mejorar nuestro entendimiento de las mismas.⁸

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. La realización del crecimiento tumoral requiere de nuevos vasos y la identificación de los factores que median la angiogénesis permite comprender este proceso patológico y abre nuevos horizontes hacia el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad.²⁴

El empleo de técnicas de inmunohistoquímicas, permite cuantificar la angiogénesis mediante marcadores endoteliales. La cuantificación de la angiogénesis puede:

- Predecir la ocurrencia de metástasis
- Predecir la recurrencia de neoplasias
- Diferenciar procesos neoforativos
- Predecir la involución de las lesiones.²⁴

4.6 Biomarcadores

El término “biomarcador” se utiliza para medir una interacción entre un sistema biológico y un agente de tipo químico, físico o biológico, la cual es evaluada como una respuesta funcional o fisiológica, que ocurre a nivel celular o molecular y además está asociada con la probabilidad del desarrollo de una enfermedad.²⁵

Son moléculas que se expresan en niveles anormales en ciertos tipos de cáncer y pueden ser utilizadas para diagnosticar o analizar la evolución de una enfermedad.³

4.6.1 VEGF

Fue identificado en la década de 1980 como factor de permeabilidad vascular y como factor de crecimiento específico de células endoteliales vasculares y de la formación de vasos sanguíneos. VEGF fue descubierto por su habilidad para incrementar la permeabilidad de los microvasos, principalmente las vénulas postcapilares, y pequeñas vénulas. Posee actividad mitogénica altamente específica para las células endoteliales.^{19,23}

El factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) de la familia de los factores de crecimiento y sus receptores VEGFR-1 involucrados en la iniciación y promoción de la angiogénesis tumoral. Existen 4 miembros de la familia de VEGF (A; B; C y D); el VEGF-A actúa como molécula clave en la angiogénesis, puesto que estimula el crecimiento de las células endoteliales vasculares. El VEGF-B se ha relacionado con la angiogénesis tumoral, el VEGF-C intervienen en la linfangiogénesis y se ha encontrado que tiene una relación con la angiogénesis tumoral.^{19,20} El VEGF-A y PlGF se han relacionado con la angiogénesis tumoral, VEGF-B con el mantenimiento de nuevos vasos sanguíneos, VEGF- C/D con linfangiogénesis y la angiogénesis, VEGF-A/C con la permeabilidad vascular, VEGF-A y PlGF con quimiotaxis y la migración. El VEGF-A inicialmente descubierto como el factor de permeabilidad vascular (VPF), es un mediador crítico de la angiogénesis tumoral en muchos tumores sólidos.¹⁸

Es considerado el factor de crecimiento angiogénico más importante. Mediante el cual la señalización de VEGF estimula las vías celulares que conducen a la formación y ramificación de nuevos vasos sanguíneos tumorales, promueve el crecimiento rápido del tumor y facilita el potencial metastásico. Se identificó inicialmente como un mitógeno específico de células endoteliales con la capacidad de inducir angiogénesis fisiológica y patológica.²⁴

El VEGF responde a varios estímulos tales como la hipoxia principalmente mediante el factor inducible de hipoxia, a distintos factores de crecimiento, a oncogenes activados, a distintas citosinas, p53 mutado, estrógeno y óxido nítrico. La hipoxia resulta esencial en el proceso de la angiogénesis tumoral.^{19,20}

El VEGF promueve la migración celular e inhibe la apoptosis, incrementa la conductividad hidráulica de microvasos aislados, y vasodilatación. Como resultado del óxido nítrico (NO) derivado de los vasos sanguíneos y participa en la vasculogénesis y en la linfangiogénesis.²⁶

Factor de permeabilidad vascular, es una unión a heparina, glicoproteína dimérica con un efecto mitogénico en células endoteliales, y es el agente más potente y específico entre las moléculas capaz de inducir angiogénesis.²⁶

Promueve angiogénesis en los procesos de inflamación crónica, cicatrización y en tumores. Es secretado por muchas células del mesénquima y del estroma.²⁷

4.6.2 CD34

El antígeno CD34 es una glicoproteína monomérica de peso molecular entre 110 y 120 kDa con una región amino terminal extracelular que contiene un dominio proximal de 66 aminoácidos. Conformados por seis residuos de cisteína y al parecer con una forma globular. Esta sialomucina, fue el primer marcador de diferenciación reconocidos en las células madres hematopoyéticas (CMH) humanas y se continúa usando para aislar progenitores y CMHs para uso clínico. Este marcador también se expresa en células endoteliales de vasos pequeños y en fibroblastos embrionarios. Aunque su función no está completamente dilucidada, se ha considerado que puedes servir como ligando de selectina L, dependiendo de su adecuada glicosilación y sulfatación. También se cree que el antígeno CD34 juega un papel importante tanto en la adhesión intercelular como en las de las células con matriz extracelular, induciendo la polimerización de actina. Como ya se mencionó, se ha demostrado que la regulación de la expresión del antígeno CD34 está implicada en el mantenimiento de la actividad hematopoyética norma gracias a la inhibición de la proliferación de células progenitoras, mediada por contacto y agregación celular.²⁸ CD34, es un marcador de endotelio vascular, es utilizado para evaluar la densidad microvascular (MVD)

en numerosos tumores, e intratumoral MVD puede establecer la predilección de metástasis.²⁶

La molécula de CD34 se encuentra en asociación con microprocesos endoteliales que ocurre en las puntas de los brotes vasculares, lo que sugiere que desempeñan un papel en la adhesión celular y/o la migración. Es un marcador sensible para el endotelio vascular de los tejidos.²⁶

4.6.3 CD105

También llamada endogлина; se descubrió a finales de la década de 1980 como un marcador de células endoteliales humanas mediante un anticuerpo monoclonal. Estudios han demostrado que la endogлина también se expresa en los macrófagos, los precursores de eritroides, los sincitiotrofbastos de la placenta terminal y en las células del estroma.²⁹

La endogлина se une con gran afinidad a distintas isoformas de TGF-B en las células del endotelio y desempeña un papel importante en la angiogénesis. Una serie de estudios clínicos indican que las mutaciones de la endogлина producen la THH1(telangiectasia hemorrágica hereditaria tipo I) y que esta constituye un potente marcador de la neovascularización que se asocia a los tumores. Desde un punto de vista experimental, se ha demostrado claramente que la endogлина resulta esencial para la señalización del TGF-B en las células endoteliales, pues es capaz de modular las respuestas celulares al TGF-B1, y que interviene activamente en el proceso angiogénico al antagonizar el efecto inhibitorio de TGF-B1.²⁹

Es una proteína de proliferación asociada e inducible por hipoxia abundantemente expresado en las células endoteliales angiogénicas, pero no en otros tejidos normales. Es una glicoproteína de membrana homodimérica de 180kDa que participa en la formación del complejo de receptor de factor de crecimiento transformante. Se une a las células endoteliales activadas en la angiogénesis.³⁰

4.6.4 CYR61

CYR 61 fue descrita por primera vez por O'Brien et al. En 1990 se proporcionó una primera base informativa para esbozar su papel potencial como funcional.³¹

Promueve la proliferación celular, la quimiotaxis, la angiogénesis y la adhesión celular. Parece desempeñar un papel en la curación de heridas mediante la regulación al alza, en fibroblastos de la piel, la expresión de varios genes implicados en la angiogénesis, la inflamación y remodelación de la matriz, incluidos VEGF-A VEGF-C, MMP1, MMP3, TIMP1, UPA, PAI-1 e integrinas alfa-3 y alfa-5. La regulación génica mediada por CCn1 depende de la unión a heparina. Regula a la baja expresión de las subunidades alfa-1 y alfa-2 del colágeno tipo 1. Promueve la adhesión celular y señalización adhesiva a través de la integrina alfa-6/ beta-1, la migración celular a través de la integrina alfa-v/ beta-5 y la proliferación celular a través de la integrina alfa-v/ beta-3.³²

Durante el desarrollo embrionario CYR61 regula un gran número de procesos cruciales tales como la neovascularización o la condrogénesis. Esta proteína está implicada en un gran número de vías de señalización de regulación de la angiogénesis, inflamación, fractura de hueso y la reparación de heridas. Correspondiente a sus propiedades fisiológicas, actividad de la proteína CYR61 también ejerce características funcionales comparables en configuración patológicos, tales como la tumorigénesis, y la metástasis del cáncer en una gama de diferentes neoplasias malignas de órganos. Debido a la actividad reguladora CYR61 la proteína promueve importantes funciones celulares asociados a tumores como adhesión, migración o transición epitelial a mesenquimal.³¹

4.6.5 TGFB-1

El TGF-B1 es una citocina dimérica que comparte una estructura de nudo de cisteína conectada entre si mediante enlaces disulfuro intramoleculares; fue identificado como un producto de células transformadas por el virus de sarcoma murino; sin embargo, actualmente se sabe que es sintetizado por diferentes tipos celulares incluyendo linfocitos, macrófagos, fibroblastos, miocitos, condrocitos, astrocitos, células epiteliales, células de riñón, células de placenta y plaquetas, así como por algunas células tumorales.³³

La forma activa del TGF-B1 está constituida por dímeros de 25 kDa, que en condiciones de reducción generan monómeros de 12.5 kDa. Su función es inducir reversiblemente la transformación e inhibir la proliferación de fibroblastos normales, pero actualmente ha sido posible aislarlo de fuentes como el glioblastoma humano y de médula ósea bovina. Los miembros de la super familia del TGF-B son reguladores multifuncionales de la proliferación y diferenciación de una amplia variedad de tipos celulares.³³

El TGF-B1 puede ser considerado como el prototipo de una citocina multifuncional, debido a los efectos que tiene sobre los diferentes blancos celulares. Es el inhibidor más potente de la proliferación de células de origen mieloide, mesenquimal, epitelial, linfoide, endotelial y de varios tipos de células malignas.³³

El TGF-B1 tiene un espectro muy amplio de funciones, las cuales dependen del estado de activación, de su conocimiento, del balance de expresión de otras citocinas y de las condiciones fisiológicas de las células sobre las que actúa; por este motivo, la distribución celular de su expresión in situ e in vivo está directamente asociada con el estado de diferenciación celular.³³

Varias evidencias indican una correlación entre el aumento de la expresión de la proteína y del RNAm del TGF-Bs con los estados avanzados de la tumorigénesis; estos hallazgos sostienen la hipótesis de que el aumento de la expresión del TGF-B1 lleva a la pérdida de la respuesta inhibitoria de la proliferación celular inducida por este, y puede representar un mecanismo de escape de la célula tumoral que

favorece la evolución del proceso neoplásico. Una vez que la célula tumoral pierde su capacidad para inhibir su proliferación por el TGF-B1 produce cantidades masivas de citocina. Esta condición proporciona una ventaja selectiva para la sobrevivencia de la célula tumoral, ya que el TGF-B1 induce de novo la angiogénesis y el desarrollo de un estado inmunosupresor.³³

La función del TGF-B1 no es tener una acción intrínseca, sino servir como un mecanismo para el acoplamiento de la célula a su entorno, de tal manera que la célula tiene la plasticidad para responder apropiadamente a los cambios en el medio ambiente o cambiar en su estado de diferenciación. Esto significa que la multifuncionalidad del TGF-B1 está acompañada por un aumento de su expresión por la activación de sus receptores, por la vía de transducción de señal que induce y por la regulación del ciclo celular; todo lo cual sirve para aumentar las respuestas o inhibir las actividades de las diferentes poblaciones celulares. Finalmente, el avance en el conocimiento de las funciones del TGF-B1, ha permitido entender no solo los mecanismos de regulación de la expresión de esta citocina, sino también los mecanismos de inhibición de la proliferación celular, y comprender que las alteraciones en los receptores y/o vías de transducción de señal inducidos pueden contribuir al desarrollo del proceso neoplásico.³³

Mediante técnicas inmunohistoquímicas, se detectó fuertemente TGF-B1, en la corteza suprarrenal, megacariocitos y otras células de la medula ósea, miocitos cardíacos, condrocitos, túbulos distales renales, células glandulares ováricas y células coriónicas de la placenta y también en cartílago, corazón, páncreas, piel y útero.

Tiene un papel importante en el control del desarrollo, la reparación de tejido, la defensa inmunitaria, la inflamación y la tumorigénesis. Además, está involucrado en las interacciones entre los epitelios y la mesénquima circundante, promoviendo la transición epitelial a mesenquimatosas.³³

Estimula la proliferación celular en el desarrollo tumoral por un mecanismo autocrino, e induce la angiogénesis tumoral mediante un mecanismo paracrino.²⁷

4.6.6 FGF-1

Fue descubierto en 1940 cuando se informó que en el cerebro existía gran cantidad de sustancias que estimulaban la división de los fibroblastos primarios en cultivo. Controla múltiples procesos biológicos como la proliferación, supervivencia, migración y diferenciación de una variedad de tipos de células. La familia FGF humana y de ratón consta de 22 miembros que se expresan en casi todos los tejidos.^{34,35}

El FGF-1 carece de la secuencia de señal clásica, ya que emplea una vía no clásica para ser secretada.³⁵

Es un mitógeno para numerosos tipos de células diferentes in vitro. El FGF1 se ha implicado en una variedad de procesos fisiológicos, incluidos el desarrollo, la morfogénesis, la cicatrización de heridas y la angiogénesis.³⁵

Los FGF son factores de crecimiento de unión a heparina que comprenden una familia de 23 miembros. En primer lugar se purificó el denominado FGF básico, que entre 16000 y 18000 daltons de peso molecular, y más tarde se aisló el FGF ácido, de 15000 daltons, aunque actualmente se piensa que representan solo a dos miembros de una gran familia de factores tróficos relacionados estructuralmente entre sí. Ambos fueron encontrados en tejido neuronal, pero hoy sabemos que se sintetizan y se almacenan en numerosos tejidos que derivan del mesodermo y neuroectodermo o en que aquellas células con un gran potencial angiogénico.³⁴

Su función está regulada por un gran número de moduladores como son la heparina o el sulfato de protamina; y consiste en una alta capacidad mitogénica para todas aquellas células derivadas del mesodermo, siendo capaz de estabilizar la expresión fenotípica de las células en cultivo. De igual forma, tiene un efecto en la diferenciación celular por su capacidad para controlar la síntesis y depósito de varios componentes de la matriz extracelular que son conocidos al afectar a la polaridad de la superficie celular y la expresión genética, como son el colágeno, la fibronectina y los proteoglicanos.³⁴

En la carcinogénesis, el efecto más importante de los FGFs parece estar relacionado con la angiogénesis, antes que con la proliferación de las propias células tumorales. Esta función angiogénica también se observa en los tejidos normales. El mecanismo de secreción en este caso sería paracrino; el factor formado por los macrófagos estimularía la proliferación endotelial.³⁶

Aumenta el índice de actividad mitótica (estimula la migración de las células endoteliales) y síntesis de ADN facilitando la proliferación de varias células precursoras, como el condroblasto, colagenoblasto, osteoblasto, que forman el tejido fibroso, de unión y soporte del cuerpo. Participa en procesos de angiogénesis tumoral y oncogénicos.²⁷

4.6.7 FLG

Es un Protooncogén homólogo de la familia de receptores FGF en los últimos años se ha llevado a cabo una extensa investigación sobre su función y su implicación en distintos trastornos cutáneos y extra cutáneos. Se ha comprobado que las mutaciones en el gen que la codifica, el gen FLG, son la causa de la ictiosis vulgar y confieren un mayor riesgo de desarrollo dermatitis atópica y otras enfermedades atópicas, además de agravar algunas enfermedades.³⁷

Proporciona instrucciones para producir una proteína grande llamada profilagrina que se encuentra en las células que forman la capa más externa de la piel. El proceso adicional de la proteína filagrina produce otras moléculas que desempeñan un papel en la hidratación de la piel.^{38,39}

Es miembro de una familia de factores de crecimiento de polipéptidos multifuncionales que estimulan la proliferación de las células mesenquimales, epiteliales y de origen neuro ectodérmico. Al igual que otros factores de crecimiento, los FGF actúan uniéndose y activando receptores de la superficie celular específicos. Estos incluyen el receptor FLG(FGFR-1), el receptor Bek (FGFR-2) FGFR-3, FGFR-4, FGFR-5 y FGFR-6. Estos receptores normalmente contienen una región a ligando extracelular contiene tres dominios similares a

inmunoglobulina, un dominio transmembrana y un dominio de tirosina cinasa citoplasmática. El gen que codifica FLG humano se ubica en el cromosoma 8p11.23 y se empalman alternadamente para producir varias isoformas. El gen FLG está implicado en la translocación cromosómica con ZNF 198, CEP110 y FOP, que puede conducir a detener el linfoma leucemia de células.⁴⁰

4.6.8 TGFBR-II

Este receptor transmite señales de la superficie celular a la célula a través de un proceso llamado transducción de señales; abarca la membrana celular, de modo que un extremo de la proteína se proyecta desde la superficie externa de la célula y el otro extremo permanece dentro de la célula.³⁹

Las señales transmitidas por el complejo del receptor de TGF b desencadenan diversas respuestas por parte de la célula, incluido el crecimiento y la división de las células, la maduración de las células para llevar a cabo funciones específicas, el movimiento celular y la muerte celular controlada. Debido a que el receptor de TGF-B tipo 2, ayuda a evadir que las células crezcan y se dividan con rapidez o de manera incontrolada, puede suprimir la formación de tumores.³⁹

4.7 Carcinoma Oral de Células Escamosas

4.7.1 Definición

El COCE es una neoplasia con diferenciación escamosa que surge del epitelio de la mucosa, es más frecuentemente en la quinta y sexta década de vida y generalmente se asocia con factores de riesgo como consumo de alcohol y tabaco.⁴¹

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el COCE como una neoplasia epitelial invasiva con diferentes grados de diferenciación escamosa y propensa a metastatizar hacia los ganglios linfáticos en estadio temprano.⁶

3.7.2 Epidemiología

El COCE es la neoplasia maligna más frecuente en la cavidad oral, representa el 5% de todas las neoplasias. El carcinoma epidermoide o de células escamosas de la cavidad bucal ocupa el número 12 de todas las neoplasias malignas en el mundo, con variación de porcentaje de acuerdo a la región. En México, la secretaria de Salud menciona que de las defunciones (5,327) causadas por neoplasias malignas en 1999, el 0,7% son de cavidad bucal. Se presenta con una mayor frecuencia entre los 50 y 60 años de vida.^{6,42}

En México se han descrito varios informes acerca de su frecuencia, incidencia y morbilidad; podemos iniciar con un reporte del Instituto Nacional de Cancerología de México donde revisaron 10 años de archivos (1985-1994) donde reportan que el cáncer de cavidad oral ocupa el quinto lugar en hombres y mujer, debido a que hoy en día las mujeres fuman y consumen bebidas etílicas con mayor frecuencia. La tasa de supervivencia es una de las más bajas de los cánceres mayores y no ha aumentado significativamente en las últimas dos décadas.^{42,43}

El COCE representa más del 90% de las neoplasias malignas de la boca. Sus principales zonas anatómicas son la lengua, piso de boca, encías, paladar, mucosa oral, y otros sitios en la boca. Las zonas anatómicas o en los sitios afectados varían según las áreas geográficas.^{44,45}

El carcinoma de células escamosa de cabeza y cuello es el sexto cáncer sólido más frecuente en el mundo, diagnosticándose anualmente más de 500.000 nuevos caos. El carcinoma de la cavidad oral constituye el 30% de todos los cánceres de cabeza y cuello.⁴⁴

Características clínicas

Clínicamente se presentan cambios como áreas blancas, eritematosas, mixtas, crecimientos nodulares y úlceras.⁴¹

La úlcera sin cicatrización es una característica que sugiere malignidad; sin embargo, en un estudio reciente, las úlceras en COCE se observó que eran poco presentes en menos de la mitad de los casos.⁴¹

Según la literatura, la localización anatómica más común para un COCE es la lengua, específicamente en su superficie posterolateral y ventral, con el 50% de los casos, seguida por el piso de boca (35%). En los casos de COCE localizados en encía /reborde, se puede observar una destrucción del hueso subyacente una vez ocurrida la invasión submucosa. La tumoración puede o no ser dolorosa.⁴⁶

La metástasis del COCE ocurre principalmente por vía linfática e ipsilateral en los linfonodos de la zona afectada. Los linfonodos con metástasis de COCE son usualmente duros a la palpación, asintomáticos y de mayor tamaño. Si la metástasis ha perforado la cápsula del linfonodo e invade los tejidos circundantes, este se sentirá fijo a la palpación. Los sitios más habituales de metástasis a distancia son los pulmones, hígado y huesos, pero cualquier parte del cuerpo puede ser afectada.⁴⁶

La presentación clínica es variable, en un inicio asintomática y precedida por cambios de color en la mucosa, siendo la eritroplasia, leucoplasia o la combinación de ambas las lesiones más importantes también se pueden presentar como una erosión, una úlcera pequeña o una masa exofítica de textura granular o verrugosa. En estadios avanzados puede presentarse como un tumor grande con o sin ulceraciones, úlcera profunda con una especie vegetante irregular, bordes elevados y un infiltrado duro de los tejidos bucales; propenso a la rápida diseminación hacia los ganglios linfáticos y a la metástasis.⁴⁵

Los pacientes con carcinomas primarios y que acostumbran fumar y beber alcohol pueden presentarse con múltiples lesiones precancerosas y cancerosas, conocido como cancerización de campo, a través del tracto digestivo superior.⁴²

Radiográficamente se aprecia como un moteado radiolúcido y puede provocar invasión perineural, previa a la metástasis.⁴⁶

3.7.3 Características Histopatológicas

Entre los factores pronósticos histopatológicos se encuentra la localización, ya que los tumores de región posterior de la cavidad oral se relacionan con mayor incidencia de metástasis ganglionares, tamaño tumoral, invasión linfovascular perineural, participación ósea, sialoadenotropismo (este último asociado a mayor riesgo de recurrencias). También las metástasis de COCE a piel están asociadas a bajos índices de supervivencia; el tipo histológico, desde bien diferenciado, moderadamente diferenciado hasta poco diferenciado, de los cuales este último tiene peor pronóstico; la presencia de ganglios linfáticos metastásicos y desmoplasia, entre otros. De estos factores, el de mayor importancia pronostica es el grosor tumoral; se observó que los pacientes con tumores > 5mm tienen menor supervivencia.⁴²

Las características histológicamente relevantes incluyen la pérdida de la membrana basal y alteraciones en las características del epitelio, arquitectónicas y citológicas con invasión del tejido conectivo. El COCE presenta una proliferación epitelial atípica que traspasa la membrana basal e invade la submucosa. El tumor puede invadir el tejido adiposo, óseo y muscular, destruyendo estos en su progresión y es capaz de inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), una respuesta inflamatoria y ocasionalmente una fibrosis densa; además puede dar metástasis en ganglios linfáticos regionales y a distancia.⁴⁶

Existe una clasificación respecto al grado de diferenciación. La clasificación sola no se correlaciona bien con el pronóstico. Los tumores bien diferenciados tienden a invadir islas grandes, mientras que los tumores menos diferenciados tienen

proyecciones irregulares o con forma de dedos o islas pequeñas y células individuales dispersas en el frente invasivo.⁴¹

Se ha encontrado un importante estroma dermoplásico con respuesta inflamatoria del huésped alrededor de los nidos de células tumorales invasoras. La mucosa adyacente muestra con frecuencia varios grados de displasia epitelial. Se observa invasión perineural y linfovascular, más frecuentemente en tumores poco diferenciados.⁴¹

En distintos estudios, se ha clasificado al carcinoma de células escamosas de acuerdo a su grado de diferenciación histológica, a la semejanza de células epiteliales y de su producción de queratina o no.⁴²

3.7.4 Grados de Diferenciación

La mayoría de los cánceres de la cavidad y la lengua están moderadamente o bien diferenciados; el carcinoma de células escamosas mal diferenciados es menos frecuente. Esencialmente no hay diferencia a nivel microscópico entre los carcinomas de células escamosas que surgen en la cavidad oral y los que se ven en los otros sitios anatómicos. Ha sido habitual calificar estas neoplasias en un intento de predecir su agresividad y, por lo tanto, establecer un pronóstico para el paciente o un indicador para el tratamiento más efectivo. Esta clasificación generalmente se basa en el método originalmente descrito por Broders, que tiene en cuenta una evaluación subjetiva del grado de queratinización, pleomorfismo celular y nuclear y actividad mitótica.⁴⁷ Los grados son:

- **Bien diferenciado**

Las características histológicas y citológicas se asemejan mucho a las del revestimiento epitelial escamoso de la mucosa oral. Existen diversas proporciones de células basales y escamosas con puentes intercelulares; la queratinización es una característica prominente: se observan pocas figuras mitóticas y las mitosis atípicas o las células epiteliales multinucleadas son extremadamente raras; el pleomorfismo nuclear y celular es mínimo.⁴⁷

El COCE bien diferenciado se caracteriza por nidos, cordones e islas de células grandes con citoplasma rosado, puentes intercelulares prominentes y núcleos redondos, que pueden no ser obviamente hipercromáticos. Las células disqueratóticas y las perlas escamosas son prominentes. Los pleomorfos celulares y nucleares, la hipercromasia nuclear y las figuras mitóticas aumentan con el grado del tumor.⁴⁷

- **Moderadamente diferenciado**

Se trata de una neoplasia con característica intermedias entre el bien diferenciado y mal diferenciado. En comparación con los carcinomas de células escamosas bien diferenciado, estos tienen menos queratinización y más pleomorfismo nuclear y celular; hay más figuras mitóticas y algunas son de forma anormal; los puentes intercelulares son menos conspicuos.⁴⁷

- **Pobrementemente diferenciado**

Histológicamente y citológicamente solo existe una ligera semejanza con el epitelio escamoso estratificado normal de la mucosa oral, la queratinización rara vez está presente y los puentes intercelulares son extremadamente escasos. La actividad mitótica es frecuente y la mitosis atípica se puede encontrar fácilmente; El pleomorfismo celular y nuclear son obvios y las características de diferenciación pobremente escamosa son mínimas o están ausentes, requiriendo confirmación inmunohistoquímica; AE1/AE3, CK5/6, p63, y p40 son marcadores útiles.^{41,47}

5. Planteamiento del problema

Desde la época antigua, se han encontrado descripciones acerca de la presencia clínica del cáncer oral, con el paso del tiempo se ha ido describiendo otros aspectos relacionados al cáncer oral y se ha descrito los factores de riesgo que llevan a padecer esta enfermedad. A pesar de que el cáncer oral es un problema que no es nuevo, su diagnóstico suele ser en etapas avanzadas, cuando el tratamiento es muy radical o ya no es factible un tratamiento. El tema de cáncer oral se ha estudiado de manera aislada, sin embargo, en los últimos años se ha comenzado a estudiar acerca de su microambiente, en el cual está implicada la angiogénesis y la modificación de la matriz extracelular mediante enzimas.

6. Justificación

El complejo del microambiente en la angiogénesis implica la participación de moléculas, que derivan directamente del endotelio y otras de células y la matriz extracelular. El entender cuál es la relación de marcadores tales como VEGF, CD34, CD105, CYR 61, TGFB-1, FGF-1, FLG, TGFBR-II con el grado de diferenciación del COCE podría ayudar en el entendimiento de esa relación reciproca entre el grado de malignidad, la angiogénesis y/o la progresión de un tumor. Por lo cual estos ensayos brindarían mayor conocimiento en el área de la oncología bucal.

7. Pregunta de investigación

¿Cuál es la inmunexpresión de VEGF, CD34, CD105, CYR61, TGFB-1, FGF-1, FLG, TGFBR-II en COCE?

8. Hipótesis

La inmunexpresión de los marcadores VEGF CD34, CD105, CYR 61, TGFB-1, FGF-1, FLG, TGFBR-II será mayor en los COCE pobremente diferenciados en comparación de los moderadamente y bien diferenciados.

9. Objetivo

9.1 General

- Determinar la inmunexpresión de VEGF, CD34, CD105, CYR61, TGFB-1, FGF-1, FLG, TGFBR-II en COCE.

9.2 Específicos

- Identificar la expresión de VEGF, FGF-1, FLG, TGFB-1, TGFBR-II en los diferentes grados de diferenciación del COCE.
- Evaluar la expresión de los marcadores angiogénicos (CD34, CD105, CYR 61), en los diferentes grados de diferenciación de COCE.
- Analizar la relación entre las variables clínicas e histológicas con la inmunexpresión de VEGF, CD34, CD105, CYR61, TGFB-1, FGF-1 FLG y TGFBR-II de casos de COCE.

10. Diseño de estudio

10.1 Tipo de estudio

Observacional, descriptivo, transversal.

10.2 Universo de estudio

Casos diagnosticados histopatológicamente como COCE en la base de datos del Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México de un periodo comprendido entre los años 2011-2018.

10.3 Tamaño de la muestra

La muestra utilizada correspondió a 9 casos, los cuales fueron analizados microscópicamente por la asesora para la confirmación del diagnóstico, asegurando que se contará con el tejido suficiente para ser procesado.

10.4 Criterios de inclusión

- Casos con diagnóstico de COCE en sus diferentes grados de diferenciación.
- Casos que tengan sus datos clínicos demográficos completos.

10.5 Criterios de exclusión

- Casos que no tengan sus datos clínicos demográficos y diagnóstico histopatológico completo.
- La muestra es pequeña para su estudio inmunohistoquímico

10.6 Criterio de eliminación

- Casos donde la muestra se desprenda de la laminilla.

11. Variables

Tabla 2. Variables del estudio

Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de medición/ escala
Edad (independiente)	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento de un individuo	Indicará la edad fue diagnosticada y registrada la lesión	Años (cuantitativo)
Género (independiente)	Identidad sexual de los seres vivos	Indicará si son hombres o mujeres.	Femenino o masculino (cualitativo)
Zona anatómica (independiente)	Ubicación específica de una parte del cuerpo	Indicará si la lesión está presente en: lengua, carrillo, piso de boca, paladar, mucosa yugal, reborde alveolar, maxilar o cuerpo mandibular.	Politómico (cualitativo)
Grados de diferenciación (independiente)	Hace referencia al grado de parecido con sus ancestros normales	Indicará si el coce histológicamente es: Bien diferenciado, moderadamente diferenciado o pobremente diferenciado	Bien diferenciado, moderadamente diferenciado y pobremente diferenciado. (cualitativo, ordinal)
VEGF (Dependiente)	Sustancia que estimula la formación de nuevos vasos sanguíneos	Inmunoexpresión del marcador VEGF.	Unidades de densidad óptica (número de pixeles) (cuantitativo) razón
CD34	Glucoproteína	Inmunoexpresión	Unidades de

(dependiente)	transmembranal expresada en células hematopoyéticas.	del marcador CD34	densidad óptica (número de pixeles) (cuantitativo)
CD105 (dependiente)	Glucoproteína de membrana tipo I	Inmunoexpresión del marcador CD105	Unidades de densidad óptica (número de pixeles) (cuantitativo)
CYR61 (dependiente)	Proteína secretada básica localizada en la superficie celular.	Inmunoexpresión del marcador CYR61.	Unidades de densidad óptica (número de pixeles) (cuantitativo)
TGFB-1 (dependiente)	Regulador general de las actividades celulares con múltiples efectos biológicos.	Inmunoexpresión del marcador TGFB-1	Unidades de densidad óptica (número de pixeles) (cuantitativo)
FGF-1 (dependiente)	Factor de crecimiento y una proteína de señalización	Inmunoexpresión del marcador FGF-1	Unidades de densidad óptica (número de pixeles) (cuantitativo)
FLG (dependiente)	Proteína estructural.	Inmunoexpresión del marcador FLG	Unidades de densidad óptica (número de pixeles) (cuantitativo)
TGFBR -II (dependiente)	Receptor de la proteína TGFB-II	Inmunoexpresión del marcador TGFBR-II	Unidades de densidad óptica (número de pixeles) (cuantitativo)

12. Materiales y métodos

12.1 Histoquímica

Se realizó una búsqueda de casos diagnosticados como COCE en sus tres grados de diferenciación, en las bitácoras de Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial del DEPEI; valorando si cumplen con sus datos clínico demográficos. Una vez verificados esos datos, se solicitaron las laminillas de H&E para la confirmación de diagnóstico y selección de los casos cumplan con los requisitos para su procesado. Se selecciono un total de 9 casos los cuales corresponden 3 BD, 3 MD, 3 PD.

12.2 Inmunohistoquímica

Los cortes se realizaron a 4 µm sobre laminilla previamente sialinizadas.

Se realizó el proceso de desparafinación de laminillas, en 3 baños de xilol de 5 minutos cada uno, 2 baños en alcohol 100% de 3 minutos cada baño, y 2 baños más de alcohol 90% de 3 minutos. Al termino de los baños se realizó un lavado con agua desionizada Seguido de la recuperación de antígenos, utilizando un buffer de citratos, el cual se llevó a baño maría en horno de microondas durante 4 minutos a potencia 70. Al término del baño maría se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Se realizaron 3 lavados con buffer de fosfato (PBS) de 3 minutos cada uno, se inhibió la actividad de la peroxidasa endógena, colocando en un vaso copplin las laminillas con peróxido de hidrógeno al 3%, durante 20 minutos. Nuevamente se realizaron 3 lavados con PBS de 3 minutos cada uno, Se delimitaron las muestras con lápiz hidrofóbico, y se realizó el bloqueo del marcaje inespecífico con PBS-albúmina al 1% durante 20 minutos en cámara húmeda y se realizaron 3 lavados con PBS de 3 minutos cada uno, se dejaron sumergidas las laminillas en Tritón x-100 para permeabilizar el tejido, durante 20 minutos. Se realizaron 3 lavados de PBS de 3 minutos. Y se colocaron los anticuerpos primarios VEGF, CD34, CD105, CYR 61, TFGB1, FGF, FLG, TGFBR1, marca Santa Cruz ®Biotecnology, en una dilución 1:200. Se dejaron en incubación durante 24 horas en cámara húmeda.

Después de la incubación del anticuerpo primario, se realizaron 3 lavados con TBS de 3 minutos cada uno, se colocó el super enhancer y se dejó incubar durante 20 minutos, después se realizaron 3 lavados con TBS de 3 minutos, para colocar la peroxidasa de rábano y se deja en incubación durante 30 minutos. Pasado el tiempo se realizaron 3 lavados de TBS de 3 minutos cada uno para aplicar el cromógeno DAB (diaminobencidina) durante 5 minutos. Se lavo con agua corriente para eliminar el excedente de “cromógeno/pintura” y se dejó 1 minuto en agua desionizada. La contratinción se realizó sumergiendo las laminillas en hematoxilina durante 2 minutos, pasado el tiempo se llevó a agua corriente para eliminar el excedente de tinción. Se realizó el aclarado y deshidratación con alcoholes de diferentes concentraciones y con xilol para realizar su montaje con resina hidrofóbica.

12.3 Análisis de Inmunoexpresión

Se tomaron las fotomicrografías con el microscopio Leica DM750 y el programa Leica Las-Ez versión 3.2.0. Con los cuales se seleccionaron los campos donde se encontró mayor inmunoexpresión a 400 aumentos. Cuando se obtuvieron las fotomicrografías, se realizó la cuantificación con ayuda del programa ImageJ y la opción de “multi point” para cuantificar las células neoplásicas color marrón. Para la MVD se tomaron 3 fotografías de cada caso de los marcadores angiogénicos (cd34, cd105, cyr61) para hacer el conteo de vasos sanguíneos.

12.4 Análisis Estadístico

Se realizaron medidas de tendencia central y dispersión (media \pm desviación estándar) así como un análisis estadístico no paramétrico Kruskal- Wallis para determinar la relación de la MVD con los grados de diferenciación considerando una $p < 0.05$ como significativa.

13. Resultados

Se seleccionaron 9 casos del departamento de Patología, Medicina bucal y Maxilofacial, los cuales cumplieron los criterios de inclusión, en ellos obtuvimos un rango de edad que va de los 39 a los 75 años con un promedio de 55.3 ± 11.7 años. Se observó que existe una mayor prevalencia por el género femenino, 6 casos fueron mujeres y 3 fueron hombres. Su localización anatómica, fue mayor frecuencia en lengua presentándose en 4 casos, seguido de 2 en mandíbula, 1 en piso de boca, 1 en mucosa yugal, y 1 en paladar. (tabla 3).

El COCE, en el bien diferenciado se observó proliferación neoplásica de estirpe epitelial compuesta por células poligonales que forman perlas de queratina; en el moderadamente diferenciado, caracterizado por formación de islas de células con pleomorfismo células y nuclear y reforzamiento de la membrana basal, mientras que el pobremente diferenciado se observa atipia celular. (Fig. 1)

Tabla 3. Datos Clínico Demográficos

GRADO DE DIFERENCIACIÓN	CASO	EDAD	GÉNERO	LOCALIZACIÓN
BD	BD1	57	F	BORDE LATERAL DE LA LENGUA
	BD2	52	F	BORDE LATERAL DE LA LENGUA
	BD3	58	M	MUCOSA YUGAL
MD	MD1	65	F	PISO DE BOCA
	MD2	39	F	MANDÍBULA
	MD3	39	F	MANDÍBULA DERECHA
PD	PD1	75	F	BORDE LINGUAL
	PD2	62	M	VESTIBULO Y HEMIPALADAR IZQUIERDO
	PD3	51	M	ZONA LINGUAL DE 46-48

Fuente directa

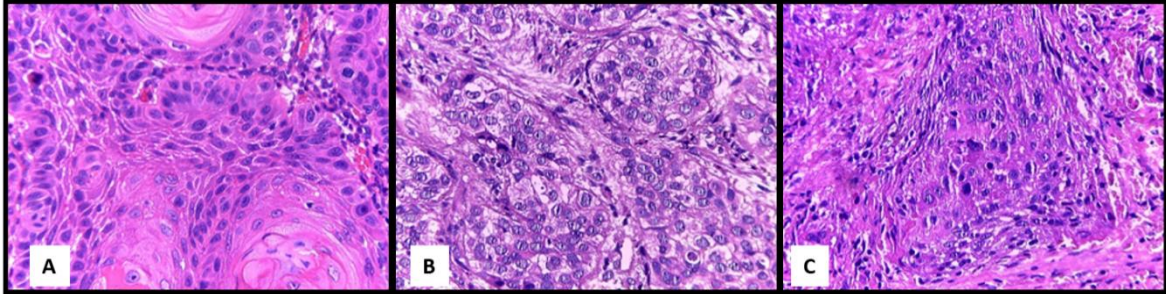


Fig.1. Fotomicrografía de COCE a 400 aumentos. A) Bien diferenciado Pleomorfismo celular y nuclear, B) Moderadamente diferenciado, islas y cordones con pleomorfismo moderado, C) Pobrementemente diferenciado. Fuente directa.

La inmunexpresión de VEGF se observó predominio en los COCE PD (32.39 uo), seguido por los MD (29.87 uo) y los BD (16.74 uo). Respecto a su proporción de células positivas; observamos variaciones que van de 1 a 3 (fig. 2, tabla 4 y 5).

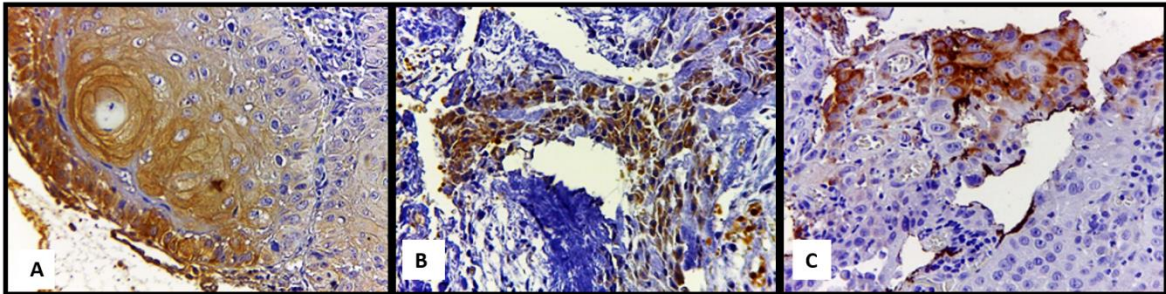


Fig.2. Fotomicrografías 400 aumentos, inmunexpresión de VEGF en COCE A) bien diferenciado, B) moderadamente diferenciado, C) Pobrementemente diferenciado. Fuente directa

La inmunexpresión de FLG en el COCE mostró una mayor expresión en los BD (19.12 uo), seguido por los PD (17.38 uo), con una menor expresión en los MD (8.64 uo); con una proporción de células positivas que va de 2-3. (fig. 3, tabla 4 y 5)

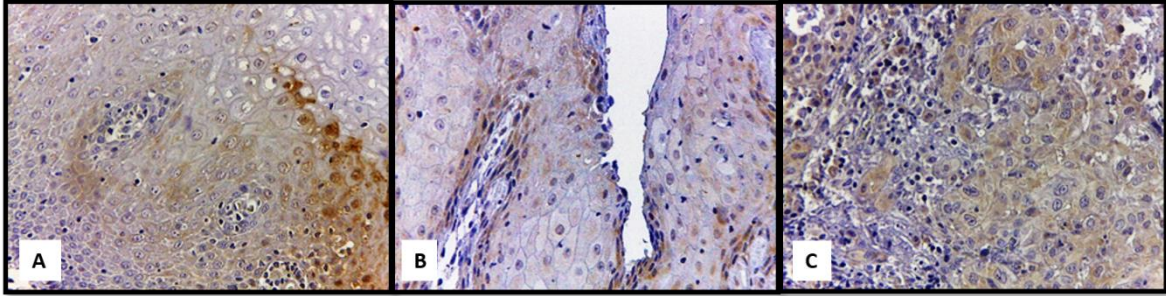


FIG 3. Fotomicrografías 400 aumentos, inmunexpresión de FLG en COCE A) bien diferenciado, B) moderadamente diferenciado, C) Pobrementemente diferenciado. Fuente directa

La expresión de FGF-1, TGFB-1 y TGFBR-II fue negativa. (fig. 4-6, tabla 4 y 5)

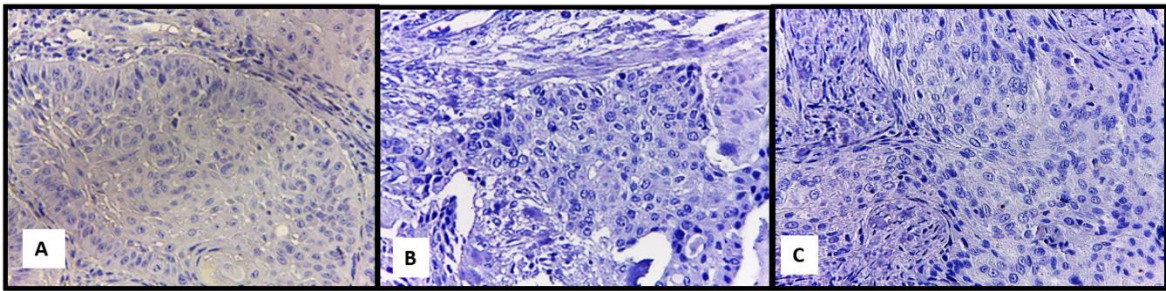


FIG 4. Fotomicrografías 400 aumentos, inmunexpresión de FGF en COCE A) bien diferenciado, B) moderadamente diferenciado, C) Pobrementemente diferenciado. Fuente directa

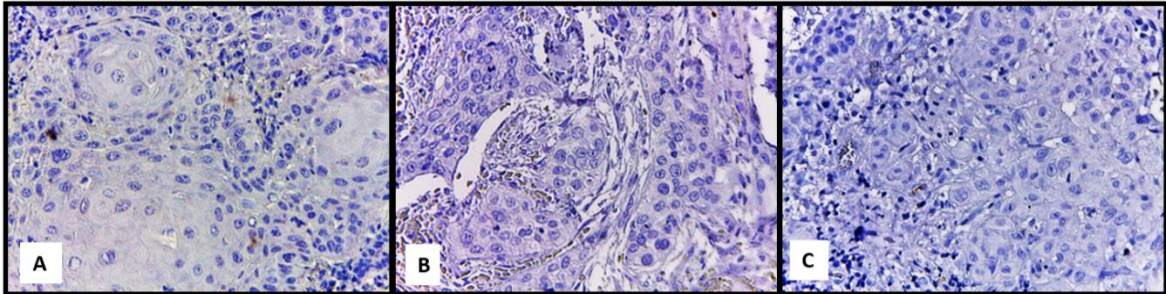


FIG 5. Fotomicrografías 400 aumentos, inmunexpresión de TGFB-1 en COCE A) bien diferenciado, B) moderadamente diferenciado, C) Pobrementemente diferenciado. Fuente directa

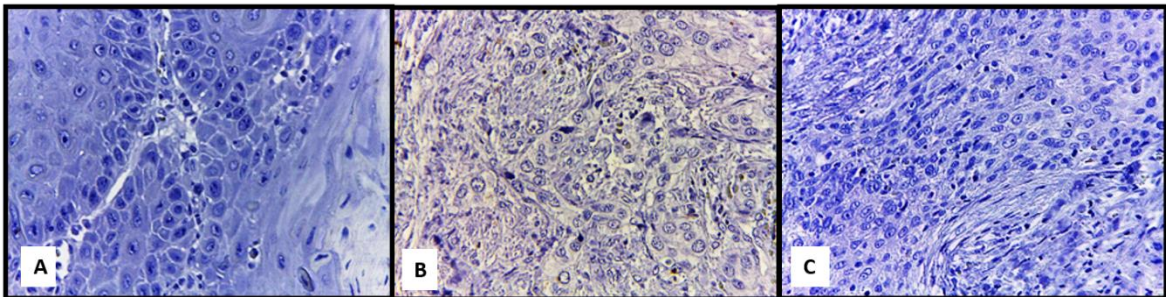


FIG 6. Fotomicrografías 400 aumentos, inmunexpresión de TGFBR-II en COCE A) bien diferenciado, B) moderadamente diferenciado, C) Pobrementemente diferenciado. Fuente directa

Tabla 4. INTENSIDAD DE INMUNOEXPRESIÓN	DE		
	BD	MD	PD
VEGF	16.74	29.87	32.39
FGF-1	0	0	0
FLG	19.12	8.64	17.38
TGFB-1	0	0	0
TGFBR-II	0	0	0
CD34	0	0	0
CD105	24.63	28.54	10.45
CYR61	36.5	25.38	48.64

Unidades ópticas (uo). Fuente directa

Tabla 5. PROPORCION DE CELULAS POSITIVAS	DE		
	BD	MD	PD
VEGF	3	1 – 2	3
FGF-1	0	0	0
FLG	2	3	3
TGFB-1	0	0	0
TGFBR-II	0	0	0
CD34	0	0	0
CD105	2 - 3	1 – 2	1 - 2
CYR61	3	2 – 3	3

0: ausencia; 1: 0% a 10%; 2: 11% a 50%; 3: superior a 50%. Fuente directa

La inmunexpresión de CD34 no mostró positividad en las células neoplásicas. Su densidad microvascular obtuvo una mayor presencia en los COCE PD (8.33 uo), seguidos de los MD (7.3uo), por último, los BD (1.21uo). (fig.7, Tabla 4-6)

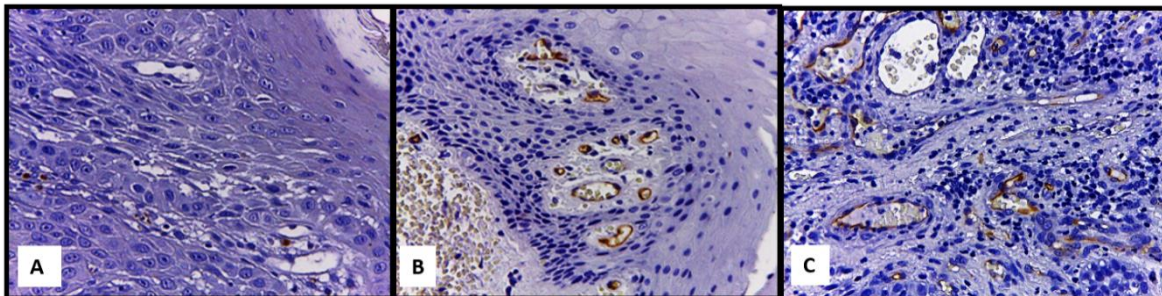


FIG 7. Fotomicrografías 400 aumentos, inmunexpresión de CD34 en COCE A) bien diferenciado, B) moderadamente diferenciado, C) Pobrementemente diferenciado. Fuente directa

La inmunexpresión de CD105 mostró un predominio en los COCE MD (28.54 uo), seguido por los BD (24.63 uo), y los PD (10.45 uo). Mientras que la proporción de células positivas es de 1-3. Y su densidad microvascular se obtuvo mayor presencia de vasos en los BD (10.55), PD (9.55) y menor en los MD (7.44). (fig.8, tabla 4,5 y 6)

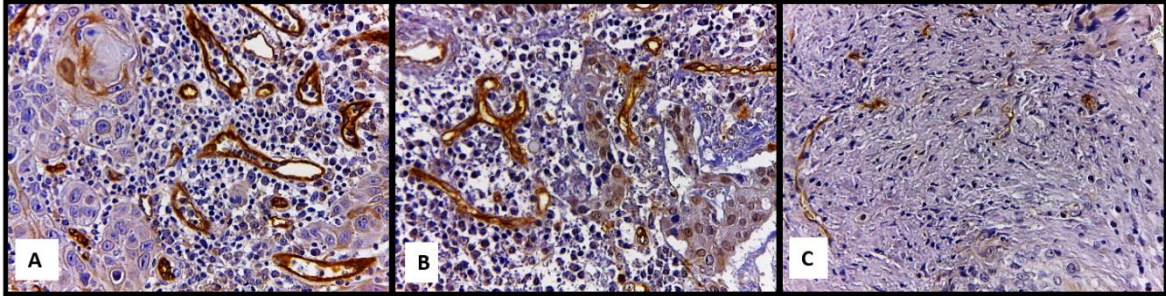


FIG. 8. Fotomicrográficas 400 aumentos, inmunexpresión de CD105 en COCE A) bien diferenciado, B) moderadamente diferenciado, C) Pobremente diferenciado. Fuente directa

La inmunexpresión de CYR61 obtuvo un predominio mayor en los COCE PD (48.64 uo), seguido de los BD (36.5 uo) y los MD (25.38 uo), con una proporción de células positivas que va de 2-3. Mientras que la densidad microvascular tuvo una mayor presencia de vasos en los PD (3.99), seguido de los BD (3.22), y los MD (1.44) (fig.9, tabla 4, 5 y 6).

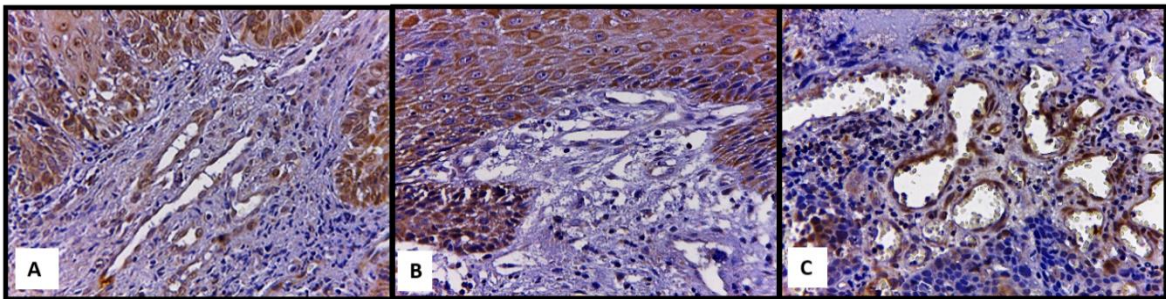


FIG 9. Fotomicrográficas 400 aumentos, inmunexpresión de CYR61 en COCE A) bien diferenciado, B) moderadamente diferenciado, C) Pobremente diferenciado. Fuente directa.

Tabla 6 . Promedio de vasos (MVD)

DENSIDAD MICROVASCULAR			
	BD	MD	PD
CD34	1.21	7.3	8.33
CD105	10.55	7.44	9.55
CYR61	3.22	1.44	3.99

Fuente directa

14. Discusión

El cáncer oral es un problema de salud pública a nivel mundial. Datos de Globocan en 2018 reportaron 354 864 nuevos casos y 177 384 muertes.⁴⁸ Si consideramos que aproximadamente el 90% de los casos de cáncer oral son COCE, su investigación clínica-histopatológica-molecular es necesaria.

Según la OMS el COCE se presenta más frecuentemente en pacientes de la quinta y sexta década de la vida.⁴¹ De nuestros 9 pacientes la edad promedio fue de 55.3 ± 11.7 años, lo cual concuerda con lo expresado anteriormente por otros autores.⁴⁹ Este fenómeno puede tener relación con el tiempo de exposición ante los factores de riesgo ambientales (tabaco y alcohol), sin embargo, también existen reportes donde sugieren que el COCE se puede presentar en pacientes más jóvenes⁵⁰, dejando abierta la discusión a la búsqueda de otros factores de riesgo. Respecto a la distribución del género en nuestro estudio, observamos que 6 casos (67%) correspondían a mujeres, mientras que 3 casos (33%) eran hombres. Tradicionalmente se ha considerado que es el género masculino era el mayormente afectado⁵¹ aunque en fechas recientes se ha reportado mayor frecuencia en el género femenino⁵⁰, esto puede ser debido a cuestiones conductuales tales como la mayor exposición a tabaco y alcohol, lo cual puede conducir a similitudes en la distribución.

La zona anatómica más frecuente en este estudio fue lengua. Kademani et al, Villanueva et al y Meza et al. Reportan a la lengua como el sitio más común.^{42, 50, 51} Lo cual puede ser relacionado al hecho de que esta zona es la primera en entrar en contacto con los factores de riesgo clásicos, así como presentar con mayor frecuencia de lesiones potencialmente malignas, tal como displasia.

Este dato epidemiológico es de importancia clínica, ya que, al momento de realizar la exploración intraoral de pacientes con antecedentes de tabaquismo y consumo de alcohol, la lengua es una región que no debe pasar desapercibida.

El análisis de los resultados inmunohistoquímicos indicó que la expresión de VEGF fue mayor en los COCE pobremente diferenciados, seguido por los moderados y bien diferenciados. Astekar et al. reportaron un patrón inverso donde los bien diferenciados son los de mayor expresión.⁵² Esto nos confirma la

necesidad de más estudios relacionados con esta molécula, ya que, al ser considerado el candidato más potente para la inducción de la angiogénesis en el crecimiento tumoral, podría significar un blanco terapéutico a futuro.

Otra molécula asociada a la angiogénesis y otros eventos en la carcinogénesis es el receptor FLG, el cual es el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos. En nuestro análisis inmunohistoquímico se observó mayor expresión en los COCE bien diferenciados. Haq et al. reportaron que la expresión de este receptor en los COCE es factible.⁵³

La expresión de FLG esta correlacionada con una pobre diferenciación, un mayor potencial de invasión y un mal pronóstico en pacientes con COCE, además de influir en la transición epitelio-mesénquima. La expresión de FLG en fibroblastos en el frente invasivo de COCE se correlaciono con casos más invasivos, metástasis en ganglios linfáticos y de pronóstico pobre.⁵⁴

La expresión de FLG se ha relacionado con la transición epitelial-mesenquimal (TEM) en COCE.⁵⁵ Nguyen et al. encontraron una mayor expresión de FLG en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y en las líneas celulares TEM. Además, la expresión de FLG se correlacionó con pleomorfismo nuclear, patrón de invasión y diferencia histológica. Cuando las líneas celulares fueron tratadas con un Inhibidor de FLG, mostraron tasas disminuidas de proliferación e invasión, además de cambiar de su forma de huso original a una morfología de adoquines, lo que indica que FLG juega un papel en TEM.⁵⁵

El factor de crecimiento fibroblástico básico (FGF-b) es un potente factor angiogénico en tejidos normales y enfermos. La expresión de la proteína FGF-b se ha descrito como mayor en carcinomas escamosos orales que en mucosas normales; con expresión más intensa en más tumores mal diferenciados, mientras que otros no encontraron sobreexpresión de FGF-b en carcinomas y sin correlación entre la vascularización y la expresión de FGF-b.⁵⁶

Forootan menciona que la expresión citoplasmática granular de la proteína FGF-b fue presente en 50 carcinomas y 70% de los carcinomas mostró expresión nuclear

de la proteína FGF-b, incluyendo el carcinoma que no mostró expresión citoplasmática. La intensidad del marcador varió dentro de cada carcinoma y entre carcinomas. La intensidad de la expresión de la proteína FGF-b en carcinomas fue similar, o mayor que, en el epitelio normal en el 82% de casos.⁵⁶

Los TGF-b1 regulan la proliferación de muchas células normales; sin embargo, en las células tumorales ocurre la pérdida de respuesta a esta citocina. Existen hallazgos que sostienen la hipótesis de que el aumento de la expresión del TGFb1 lleva a la pérdida de la respuesta inhibitoria de la proliferación celular inducida por este, y puede representar un mecanismo de escape de la célula tumoral que favorece la evolución del proceso neoplásico.³³

En este trabajo la expresión de FGF-1, TGFB-1 y TGFBR-II fue negativa, lo que difiere de los reportado con Forootan et al. y Peralta et al.^{33,56} esta variación puede deberse a diferencias metodológicas (diferentes tipos de anticuerpos).

Existen tres formas de evaluar la angiogénesis tumoral: histológicamente (directa), radiológicamente (indirecta) y serológicamente con marcadores de actividad angiogénica (alternativa). La evaluación histológica es la más común y con ella se realiza la medición de la angiogénesis y la densidad microvascular (MVD).⁵⁷ La MVD se define como el número de vasos pequeños en una determinada área tumoral.⁵⁸ Se evalúa observando áreas seleccionadas al azar contando las zonas de mayor densidad vascular. La MVD puede ser cuantificada en las áreas de mayor neovascularización, llamadas “focos calientes”⁵⁷

La MVD se considera la herramienta más representativa y útil para evaluar los tejidos cancerosos. De hecho, numerosos estudios apoyan la hipótesis de que la MVD es un factor predictivo significativo para la progresión y el pronóstico de varios tipos de tumores malignos.⁵⁸

En nuestros resultados la inmunexpresión de CD34 no mostró positividad en las células neoplásicas, sin embargo, su densidad microvascular obtuvo una mayor presencia en los COCE PD. Jamshidi menciona que algunos autores creen que CD34 no puede hacer una distinción entre la sangre primaria del huésped vasos y

los nuevos vasos; no obstante, este marcador es ampliamente empleado en la evaluación de la densidad vascular en lesiones tumorales⁵⁹

La endogлина (CD105) permite la identificación de células endoteliales proliferantes y, por la misma razón, la localización de la neoangiogénesis activa. Dales et. al confirmaron la expresión de CD105 con la tasa de supervivencia total y el aumento del riesgo de metástasis. Mientras que Kumar et. al, menciona que el hallazgo más importante que surge en su estudio es que el anticuerpo monoclonal para CD105, es más específicamente reactivo con las células endoteliales de los vasos sanguíneos en los tejidos que sufren angiogénesis, demostró ser un reactivo ideal para cuantificar microvasos en las neoplasias malignas de mama.⁶⁰ La expresión de CD105 es una de las características más llamativas de los vasos sanguíneos recién formados; sin embargo, su expresión es negativa o insignificante en los vasos sanguíneos previamente formados.⁵⁹

En nuestro estudio la inmunoexpresión de CD105 mostró un predominio en los COCE MD, seguido por los BD, y los PD. La pérdida en la inmunoexpresión de CD105 significaría la disminución en la neoformación vascular. Esto puede ser debido a que la velocidad de proliferación celular en las neoplasias pobremente diferenciadas se encuentra incrementada en comparación al tiempo de formación de vasos sanguíneos, dando como resultado la presencia de zonas de necrosis, la cual es una característica primordial en estas neoplasias. El aumento en la neoformación vascular en los COCES MD puede ser debido a que en esa etapa se presenta un mayor crecimiento tumoral, debido a ello, se activa el switch angiogénico que permite la nutrición y proliferación neoplásica.

Respecto a CYR61, nuestros resultados mostraron predominio en los COCE PD, seguido de los BD y los MD, mientras que la densidad microvascular tuvo una mayor presencia de vasos en los PD, seguido de los BD, y los MD. Babic et. al reporta en sus resultados que la expresión de CYR61 promueve el crecimiento tumoral y vascularización.

Los tumores que expresan CYR61 son más vascularizados, la interpretación más directa de estos resultados es que CYR61 promueve el crecimiento tumoral a

través de la inducción de neovascularización, sin embargo, no se puede descartar la posibilidad que CYR 61 puede poseer actividades distintas a la angiogénesis las cuales también contribuyen al crecimiento tumoral⁶¹

15. Conclusiones

De acuerdo a los resultados podemos concluir que el COCE:

- Se presenta entre la quinta y sexta década de la vida, así como ser más frecuente en la población femenina, principalmente en lengua.
- La inmun expresión de VEGF puede ser mayor en los carcinomas PD, mientras que para FLG en los carcinomas BD. Confirmando la compleja patogénesis del cáncer.
- Se observó mayor expresión de VEGF y cantidad vasos sanguíneos en los COCE PD, mientras que en los COCE BD es más común observa vasos sanguíneos nuevos.
- El análisis de la MVD es dependiente del tipo de marcador empleado. Ya que la expresión de CD34 y CD105 observamos un patrón inverso, es decir, en los casos donde se observó mayor expresión de vasos CD34 positivos existía baja presencia de vasos CD105 positivos.
- Los resultados obtenidos nos muestran mayor expresión de VEGF y cantidad vasos sanguíneos en los COCE PD. Así como sugieren presencia de vasos sanguíneos nuevos en los COCE BD.
- Con estos resultados observamos resultados interesantes que necesitan ser validados en una población de casos mayor. Buscando establecer un vínculo más amplio respecto a su utilidad como una especie de indicador o biomarcador.

16. Agradecimientos

Investigación realizada gracias al programa UNAM-PAPIIT IN226720

17. Referencias

1. Salaverry O. La etimología del cáncer y su curioso curso histórico. *Rev Perú Med Exp Salud Publica* 2013;30(1):137-41
2. Graña A. Breve evolución histórica del cáncer. *Carcinos* 2015; 5(1):26-31
3. Sánchez N. C. Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: fisiopatología del cáncer. *Rev. Med. Clin. Condes-* 2013; 24(4): 553-562
4. García CB, Gálvez MM, De la hoz RL. Acciones educativas sobre factores de riesgo del cáncer bucal en estudiantes de preuniversitario. *Medicent Electron.* 2019; 23(3):271-277.
5. Granados G. Tratamiento del cáncer: Oncología médica, quirúrgica y radioterapia. 1ª ed. México: El Manual Moderno;2016
6. De la fuente HJ, Muñoz MP, Patrón BC, Ramírez TM, Rojas MHJ, Acosta TL. Aumento de la incidencia de COCE. *Salud (i) Ciencia.* 2014 (20); 636-642.
7. De la Garza SJ, Juárez SP. El cancer
8. De vita V. *Cancer: principles & practice of oncology.* 10 ed. Philadelphia: Wolters kluwer;2015.
9. Pérez CR, Cárdenas CE, Mondragón TP, Erazo VA. Biología molecular del cáncer y las nuevas herramientas en oncología *Rev Esp Med Quir.* 2017; 22:171-181
10. Carrillo RJ, Simón NE, Gil RG, Rodríguez FR. Cancer oral en México. Revisión bibliográfica y presentación de caso clínico. *Revista Mexicana de Cirugía Bucal y Maxilofacial.* 2011; 7(3): 104-108.
11. Thomson P. Precáncer oral: diagnóstico y tratamiento de lesiones potencialmente malignas. 1ra Ed. Colombia Amolca; 2015
12. Gallegos HJ. El cáncer de cabeza y cuello. Factores de riesgo y prevención. *Cir, Ciruj* 2006; 74:287-293.
13. García V, Bascones M. Cáncer oral: puesto al día. *Av. odontoestomatol.*2009; 25 (5): 239-248.
14. García C, Salas M, Gil J. Algunas consideraciones sobre etiología y fisiopatogenia del carcinoma epidermoide bucal. *Medisur.* 2018 16(1): 63-75.
15. Martin MT, Civeta JD. Carcinogénesis. *Salud Publica Mex.*2011; 53:405-414.
16. Delgadillo J, Ticona A. Oncogenes. *Rev, Act. Clin. Med.*2014; 43:2291,2294.
17. Hernández M, Ríos M. Oncogenes y cancer. *Rev. Cuba oncol.* 1999; 15(2): 131-139.

18. Ramjiawan RR, Griffith oen A. W, Duda D. G. Anti-angiogenesis for cancer revisited: Is there a role for combinations with immunotherapy?. *Angiogenesis*.2017; 20:185-204.
19. Martínez JD, Herrera LA. Angiogénesis: VEGF/VEGFRs como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cancer. *Cancerología*. 2006; 83-96.
20. Khosravi P, Del castillo A, Perez G. Angiogénesis neoplásica. *An. Med. Interna* 2008; 25: 366-369.
21. Nagatsuka H, et al. Various immunostaining patterns of CD31, CD34 and endoglin and their relationship with lymph node metástasis in oral squamous cell carcinomas. *J oral pathol Med*. 2005; 34: 70-76.
22. Yoshida H, Fujita S, Nishida M, Lizuka T. angiogénesis in the human temporomandibular joint studied by immunohistochemistry for cd34 antigen. *J oral pathol Med*. 1999; 28:289-292.
23. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/Vascular endotelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogénesis. *American Journal of Pathology*. 1995; 146(5): 1029-1039.
24. Sánchez SV. Papel de la angiogénesis en el crecimiento tumoral. *Rev. Cubana Invest Biomed*. 2001; 20 (3): 223-230
25. Arango SS. Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública* 2011; 30(1): 75-82
26. Kumamoto H, Ohki K, Ooya K. association between vascular endotelial growth factor (VEGF) expresión and tumor angiogénesis in ameloblastomas. *J oral Pathol Med*. 2002; 31: 28-34.
27. Saavedra T J, Zuñiga CL, Freyre BS, Muñoz OG, Salguero C. El rol de VEGF en la angiogénesis fisiológica y tumoral. *Med*. 2017; 39 (3): 190-209
28. Mera C., Roa A. Ramírez A. Células madre hematopoyéticas, generalidades y vías implicadas en sus mecanismos de autorrenovación. *Rev cienc. Salud*.2007; 5(1): 67-89
29. García- pozo L. Miquilena-Colina ME, Lozano- Rodríguez T, García Monzón C. Endoglina: estructura, funciones biológicas y papel en la fibrogenesis. *Rev Esp Enferm Dig* 2008; 100:355-360.
30. Chih-yen Ch., et al. Clinicopathologic significance of cd105 expression in squamous cell carcinoma of the hypopharinx. *Head & neck*. 2006; 441-446.
31. Mayer S. Gabriel B., Erbes T., Timme-Bronsert S., Jäger M., Rücker G., Kuf F., Bouda J., Bartakova A., Hausen AZ., Stickeler E., Gitsch G., Hitschfeld M. Cyr 61 Expression Pattern and Association with Clinicopathological Factors in Patients with Cervical Cancer. *Anticancer research*.

32. chih- Ch, Fan-E M, Lester FL. The angiogenic factor cyr 61 activates a genetic program for qowound healing in human skin fibroblasts. . The journal of biological Chemistry-. 2001; 276(50):47329- 47337
33. Peralta-Zaragoza O, Lagunas-Martínez A, Madrid-Marina V. Factor de crecimiento transformante beta-1: estructura, función y mecanismos de regulación en cancer. Salud pública Mex 2001; 43:340-351.
34. Ibero Sagastibelzal, Castro Lara J, Bascones Martínez A. Factores de crecimiento y periodoncia. Una revisión bibliográfica actualizada. AV. Periodon Implantol. 2002; 14,3: 115-128
35. Seiji M, Yoshikazu T. FGF1 (fibroblast growth factor 1 (acidic)). Atlas Genet Cytogenet oncol. Haematol. 2014; 18(3).
36. Barbeito CG, Laube PFA. Los factores de crecimiento. Aspectos básicos y potencialidades terapéuticas. Analecta Veterinaria. 2005;25 (1):8-27.
37. Armengot C, Hernández A, Torrelo A. Filagrina: papel en la barrera cutánea y en el desarrollo de patología. actas dermosifiliogr. 2015;106 (2): 86-95
38. Aguirre MA, Sotelo J. Tumores cerebrales. 1era ed. México: Medica Panamericana, 2008
39. GNR: Genetics home reference. EE.UU. GNR: noviembre 2018.
40. Santa Cruz Biotechnology, Inc.
41. El-Naggar A, Chan J, Grandis J, Takata T, Slootweg J. WHO Classification of Head and Neck Tumours. 4ta Ed. IARC: Lyon 2017.
42. Meza García G, Muñoz Ibarra JJ, Páez Valencia C, Cruz Legorreta B, Aldape Barrios 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.
43. Gallegos MJ, Chimenos E, López J, Roselló X. Cancerización de campo: revisión del concepto. Av. Odontoestomatol. 2007;23(1):35-44
44. García V, González MA, Bascones A. Bases Moleculares del cáncer oral. Revisión bibliográfica. Av. Odontoestomatol. 2005;21-6: 287-295.
45. BOZA Y., 2016: COCE: Reporte de caso y revisión de literatura.- ODOVTOS-Int. J. Dental Sc.,18 Special Clinical Issue: 61-67
46. Maraboli SE. Características sociodemográficas y clínicas en pacientes con COCE diagnosticados en la facultad de odontología de la universidad de chile, 2000-2012.Santiago-chile, adscrito a proyecto FONDECYT 1120248. 2014
47. Pindborg J, Reichart P, Smith C, Van der Waal I. Histological Typing of cancer and precancer of the oral mucosa. 2ª Ed. Berlin, Germany; Spring. 1997
48. Globocan: Global cancer observatory. Lyon, Franncce: international Agency for Reserch on cancer;2018
49. Sang-Heng K, Hao-Hueng Ch, Ju-yi T, Hsin-Chia H, Chiao-Ying L, Chun-Pin Ch. Cheing-Meei L, Mark Yen-ping K. expression of cyr61 (CCN1) inhuman oral squamous cell carcinoma:an independent marker for por prognosis. head and neck 2010; 32 (12): 1665-73.

50. Villanueva-Sanchez Francisco G, Leyva-Huerta ER, Gaitán-Cepedea LA. Cáncer en pacientes Jóvenes (Parte 1): Análisis clínico e histopatológico de carcinoma de células escamosas de la cavidad bucal en pacientes jóvenes. Un estudio descriptivo y comparativo en México. *Odontoestomatología*. 2016; 18(27): 44-48
51. Kademani D, Lewis JT, Lamb DH, Rallis DJ, Harrington Jr. Angiogénesis and cd34 expression as a predictor of recurrence in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009; 67 (9): 1800-5.
52. Astekar M, Joshi A, Ramesh G, Metgud R. expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density in oral tumorigenesis. *Journal of oral and maxillofacial pathology*, 2012;16(1):22-26
53. Haq F, sung Y, Park I, Kayani M, Yousuf F, Hong S, Ahn S. FGFR1 expression defines clinically distinct subtypes in pancreatic cancer. *Journal of translational medicine*.2018; 16:374
54. Mariz B, Soares CD, Morais TML, Fonseca FP, de Carvalho MGF, Jorge J. expresión de FGF-2/ FGFR-1 en mucosa normal, glándula salival, lesiones preneoplásicas y neoplásicas de la cavidad oral.. *J oral pathol Med*. 2018;47 (9): 816-822
55. Nguyen PT, Tsunematsu T, Yanagisawa S, Kudo Y, Miyauchi M, Kamata N, Takata T. The FGFR1 inhibitor PD173074 induces mesenchymal–epithelial transition through the transcription factor AP-1. *Br J cancer*. 2013; 109 (8): 2248-58
56. Forootan S.S., Ke.Y, Jones A.S., Helliwell T.R. basic fibroblast growth factor and angiogenesis in squamous carcinoma tongue. *Oral oncology*. 2000;36: 437-443
57. Jimenez MA, Solares ME. Angiogénesis en cancer renal. *Canerologia*. 2006;1:113-121.
58. Miyata Y, Sakai H. reconsideration of the clinical and histopathological significance of angiogenesis in prostate cancer: usefulness and limitations of microvessel density measurement. *International journal of urology*. 2015, 22:806-815.
59. Jamshidi Sh, Zargarán M, Baghaei F, Shojaei S, Zare Mahmoodabadi R, Dehghan A, Moghimbeigi A. An Immunohistochemical Survey to Evaluate the Expression of CD105 and CD34 in Ameloblastoma and Odontogenic Keratocyst. *J Dent Shiraz Univ Med Sci., December 2014; 15(4): 192-198*.
60. Kumar S, Ghellal A, Li Ch, Byrne G, Haboubi N, Wang J, Bundred N. Breast carcinoma: vascular density determined using cd105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer research*. 1999.56:856-861.
61. Babic A, Kireeva M, Kolesnikova T, Lau L. CYR61, a product of growth factor- inducible immediate early gen, promotes angiogenesis and tumor growth. *Medical Sciences*. 1998;95:6355-6360.