



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas,
Odontológicas y de la Salud.

Facultad de Odontología.

División de Estudios de Posgrado e Investigación.

**Densidad microvascular y marcadores angiogénicos en neoplasias malignas de
glándulas salivales mayores**

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS BÁSICAS ODONTOLÓGICAS

P R E S E N T A

C.D. Esp. Carla Monserrat Ramírez Martínez.

Tutores

Dra. Elba Rosa Leyva Huerta.

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

Dra. Ma. de Lourdes Suárez Roa.

Instituto Nacional de Cancerología.

Ciudad Universitaria, CDMX, Noviembre de 2017.



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.

INDICE

Pág.

1 Resumen.	3
2 Abstract.	4
3 Antecedentes.	5
4 Marco teórico.	7
4.1 Glándula salival.	7
4.1.1 Unidad secretora.	7
4.1.2 Sistema de conductos.	10
4.1.3 Células mioepiteliales.	12
4.1.4 Glándula parótida.	13
4.1.5 Glándula submandibular.	14
4.1.6 Glándula sublingual.	15
4.2 Neoplasias de glándulas salivales.	16
4.2.1 Clasificación de la OMS.	17
4.2.2 Carcinoma mucoepidermoide.	18
4.2.3 Carcinoma adenoideo quístico.	20
4.2.4 Carcinoma de células acinares.	21
4.2.5 Adenocarcinoma de células basales.	22
4.2.6 Adenocarcinoma NOS.	23
4.2.7 Carcinoma del ducto salival.	24
4.2.8 Carcinoma mioepitelial.	25
4.3 Angiogénesis.	26
4.3.1. Densidad microvascular.	28
4.3.2 Marcadores angiogénicos.	29
4.3.3 CD34.	29
4.3.4 CD105.	30
4.3.5 Cyr61.	31
5 Planteamiento del problema.	32
6 Justificación.	32
7 Pregunta de investigación.	33
8 Hipótesis.	33
9 Objetivos.	33
9.1 Objetivo general.	33
9.2 Objetivos específicos.	33
10 Diseño de estudio.	33
10.1 Tipo de estudio.	33
10.2 Universo de estudio.	33
10.3 Tamaño de la muestra.	34
10.4 Criterios de inclusión.	34
10.5 Criterios de eliminación.	34
10.6 Criterios de exclusión	34

11 Variables.	35
12 Material y métodos.	36
12.1 Histoquímica.	36
12.2 Inmunohistoquímica.	37
12.3 Análisis de inmunoexpresión.	39
12.4 Análisis estadístico.	40
13 Resultados.	41
13.1 Diagnóstico histopatológico.	41
13.2 Análisis inmunohistoquímico	42
14 Discusión	45
15 Conclusiones	48
16 Bibliografía	49

1 RESUMEN

Densidad microvascular y marcadores angiogénicos en neoplasias malignas de glándulas salivales mayores.

Introducción: En las neoplasias malignas la señalización proangiogénica se encuentra incrementada contribuyendo al crecimiento tumoral y al comportamiento agresivo. La densidad microvascular (MVD) es una técnica basada en inmunohistoquímica que permite cuantificar directamente los vasos sanguíneos involucrados en la supervivencia tumoral y ha mostrado ser de utilidad como herramienta pronóstica de metástasis. Para esta técnica se han usado anticuerpos panendoteliales como CD34, pero al no ser específicos para discriminar entre los vasos preexistentes y los neoformados, se han propuesto marcadores como CD105 y Cyr61 los cuales se expresan en el endotelio activo. Las neoplasias malignas de glándulas salivales son un grupo diverso de patologías de cabeza y cuello que carecen de parámetros generales que puedan predecir su comportamiento biológico, ya que cada una de ellas cuenta con criterios individuales para otorgar el grado histológico.

Objetivo: Determinar la MVD usando los marcadores CD34, CD105 y Cyr61 en las neoplasias malignas de glándulas salivales mayores de acuerdo a su tipo y grado histológico.

Materiales y métodos: Se seleccionaron 60 casos que cumplieron con los criterios de inclusión, 46 del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) y 14 del Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología UNAM; 21 fueron carcinomas mucoepidermoides, 16 carcinomas adenoideos quísticos, 5 carcinomas de células acinares, 5 carcinomas ductales, 5 carcinomas mioepiteliales, 4 carcinomas epiteliales-mioepiteliales, 3 adenocarcinomas NOS y un adenocarcinoma de células basales. Se clasificaron de acuerdo a su grado histológico en neoplasias de bajo, intermedio y alto grado y se realizó la técnica de inmunohistoquímica para identificar la expresión de los anticuerpos CD34, CD105 y Cyr61. Para el análisis de los resultados se utilizó la prueba estadística Kruskal-Wallis con corrección Bonferroni.

Resultados: Se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre la cuantificación vascular de las neoplasias malignas de alto grado en comparación con las de grado intermedio y bajo grado al utilizar cualquiera de los anticuerpos. La mediana de cuantificación vascular fue mayor al utilizar el anticuerpo CD34 en las neoplasias malignas en comparación con Cyr61 y CD105, esto debido a que es un marcador panendotelial que no discrimina entre los vasos neoformados y los preexistentes. El anticuerpo que mostro un diferencia estadística mayor para discriminar entre neoplasias de alto, intermedio y bajo grado fue CD105.

Conclusión: La MVD puede ser un auxiliar diagnóstico que permita predecir el curso biológico de las neoplasias malignas de glándula salival, independientemente de sus características histológicas. Se requiere incrementar el número de casos que permita reproducir estos hallazgos.

2 ABSTRACT

Microvascular density and angiogenic markers in malignant neoplasms of the major salivary glands.

Introduction: In malignant neoplasm proangiogenic signaling is increased contributing to tumor growth and aggressive behavior. Microvascular density (MVD) is a technique based on immunohistochemistry that allows quantifying directly the blood vessels involved in tumor survival and has been shown to be useful as a metastasis prognostic. Panendothelial antibodies such as CD34 have been used for this technique, but they are not specific for discriminating between pre-existing and neoformed vessels, markers such as CD105 and Cyr61 have been proposed, which are expressed in the active endothelium. Malignant neoplasms of the salivary glands are a diverse group of head and neck tumors that lack general parameters that can predict their biological behavior, because each of them has individual criteria for this graduation.

Objective: To determine MVD using the markers CD34, CD105 and Cyr61 in the malignant neoplasms of major salivary glands according to their type and histological grade.

Materials and methods: We selected 60 cases that met the inclusion criteria, 46 from the National Institute of Cancerology (INCan) and 14 from the Department of Pathology, Oral and Maxillofacial Medicine of the Division of Postgraduate Studies and Research, School of Dentistry UNAM ; 21 were mucoepidermoid carcinomas, 16 adenoid cystic carcinomas, 5 acinar cell carcinomas, 5 ductal carcinomas, 5 myoepithelial carcinomas, 4 epithelial-myoepithelial carcinomas, 3 NOS adenocarcinomas, and one basal cell adenocarcinoma. They were classified according to their histological grade in low, intermediate and high grade neoplasms and the immunohistochemical technique was performed to identify the expression of the CD34, CD105 and Cyr61 antibodies. For the analysis of the results, the Kruskal-Wallis statistical test with Bonferroni correction was used.

Results: A statistically significant difference ($p < 0.05$) was found between the vascular quantification of high grade malignancies compared to intermediate and low grade malignancies when using any of the antibodies. Median vascular quantification was greater when using CD34 antibody in malignant neoplasms compared to Cyr61 and CD105, because it is a panendothelial marker that does not discriminate between neoformed and pre-existing vessels. The antibody that showed a greater statistical difference to discriminate between high, intermediate and low grade neoplasms was CD105.

Conclusion: MVD can be a diagnostic aid that allows predicting the biological course of malignant salivary gland neoplasms, regardless of their histological characteristics. It is necessary to increase the number of cases that allows reproducing these findings.

3. ANTECEDENTES

Las neoplasias de glándulas salivales representan el 3% de los tumores en humanos; dos terceras partes de ellas corresponden a tumores benignos y un tercio a malignos.¹ Éstas clínicamente poseen un comportamiento agresivo, con crecimiento infiltrante a tejidos adyacentes y destrucción de los mismos ocasionando defectos cruentos en los pacientes.

El crecimiento e invasión tumoral dependen de la angiogénesis, la cual se desencadena por señales químicas y moleculares por parte de las células neoplásicas ante la demanda nutricional atrayendo vasos sanguíneos del estroma adyacente.² Este proceso se lleva generalmente en cuatro pasos; en primer lugar, la hipoxia activa la degradación de la membrana basal del vaso sanguíneo por acción de las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs); posteriormente la células activadas del endotelio se desprenden y migran hacia el sitio de estímulo, donde ayudadas por factores proliferan formando una red. En tercer lugar se da la formación del lumen y por último, se estabilizan los nuevos capilares.² La angiogénesis puede cuantificarse mediante inmunohistoquímica en un proceso llamado densidad microvascular (MVD) que se define como el número de vasos pequeños en una determinada área tumoral.³

La MVD es utilizada en otras neoplasias de origen epitelial glandular con implicaciones pronósticas; ejemplo de ello es el carcinoma de mama y ovario.^{4,5} Sin embargo, la relación entre la angiogénesis y las neoplasias de glándulas salivales ha sido poco estudiada y las investigaciones que existen actualmente no incluyen a las neoplasias malignas de glándulas salivales más frecuentes.

En 2015, Theocharis y cols.¹ estudiaron la angiogénesis con el objetivo de determinar el significado clínico de la MVD en neoplasias benignas comparadas con las neoplasias malignas de glándulas salivales. Las neoplasias benignas estudiadas fueron adenoma pleomorfo, cistadenoma papilar linfomatoso y epiteloma; y las malignas, carcinoma mucoepidermoide y carcinoma de células acinares. Ellos reportaron que la MVD utilizando CD105 era mayor en neoplasias malignas que en benignas. En éste mismo año, Moghadam y cols.⁶ cuantificaron la MVD con CD34 en este mismo tipo de lesiones reportando resultados similares.

En Brasil, Fonseca y cols.⁷ analizaron la inmunexpresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en neoplasias malignas de glándulas salivales con el propósito de comprender la patogénesis de éstos tumores. La población de estudio fue carcinoma mucoepidermoide,

adenocarcinoma no específico y carcinoma adenoideo quístico; reportaron que la sobreexpresión del factor puede estar asociada a baja supervivencia de los individuos afectados. Marcaritescu y cols.⁸ realizaron un estudio utilizando el mismo anticuerpo VEGF para investigar la MVD en carcinomas de células acinares y reportaron que dicho factor está implicado en el crecimiento y progresión tumoral debido a su capacidad de inducir angiogénesis.

Tadbir y cols.⁹ estudiaron la expresión de Ki67 y CD105 como marcadores de proliferación y angiogénesis en el adenoma pleomorfo, carcinoma mucoepidermoide y carcinoma adenoideo quístico. Reportaron que ambos marcadores presentan una mayor expresión en neoplasias malignas comparadas con las benignas y que estos marcadores no se expresan en el parénquima glandular normal.

En 2013, Dhanuthai y cols.¹⁰ estudiaron MVD en neoplasias de glándulas salivales benignas y malignas, sin especificar los tipos histológicos y reportaron que la MVD es mayor en tumores que se originan de las células mioepiteliales.

En contraparte, existen actualmente algunos reportes en la literatura que indican que la MVD no puede predecir la agresividad y capacidad metastásica de las neoplasias malignas de glándulas salivales, como el publicado por de Glebber-Netto y cols.¹¹ que investigaron la angiogénesis y linfangiogénesis en el carcinoma mucoepidermoide utilizando los inmunomarcadores CD105 y VEGF. Dichos autores reportaron que la neoformación vascular, aun cuando es importante en la patogénesis del carcinoma mucoepidermoide, no puede predecir por si solo el comportamiento biológico de la neoplasia.

Aun cuando existen investigaciones previas sobre el impacto de la MVD en neoplasias malignas y benignas de glándulas salivales, es necesario continuar con los estudios sobre el tema, puesto que el pronóstico de las neoplasias malignas de glándula salival depende de su capacidad de crecimiento, infiltración y metástasis; donde la angiogénesis juega un papel fundamental.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Glándulas salivales.

Las glándulas salivales derivan del ectodermo y son glándulas tubuloacinares exocrinas con secreción merocrina, que vierten su contenido en la cavidad bucal. Tienen a su cargo la producción y secreción de la saliva, la cual humedece y protege la mucosa bucal, prepara a los alimentos para la digestión y controla la microbiota oral. Se clasifican de acuerdo a su tamaño e importancia funcional en glándulas salivales mayores y menores. Las glándulas salivales menores son numerosas y se distribuyen en la submucosa de la cavidad oral. Las glándulas salivales mayores producen la mayor parte de la saliva, están localizadas en pares y corresponden a la glándula parótida, submandibular y sublingual. La producción de la saliva se da mediante estímulos específicos regulados por el sistema nervioso parasimpático.¹² (Figura 1)

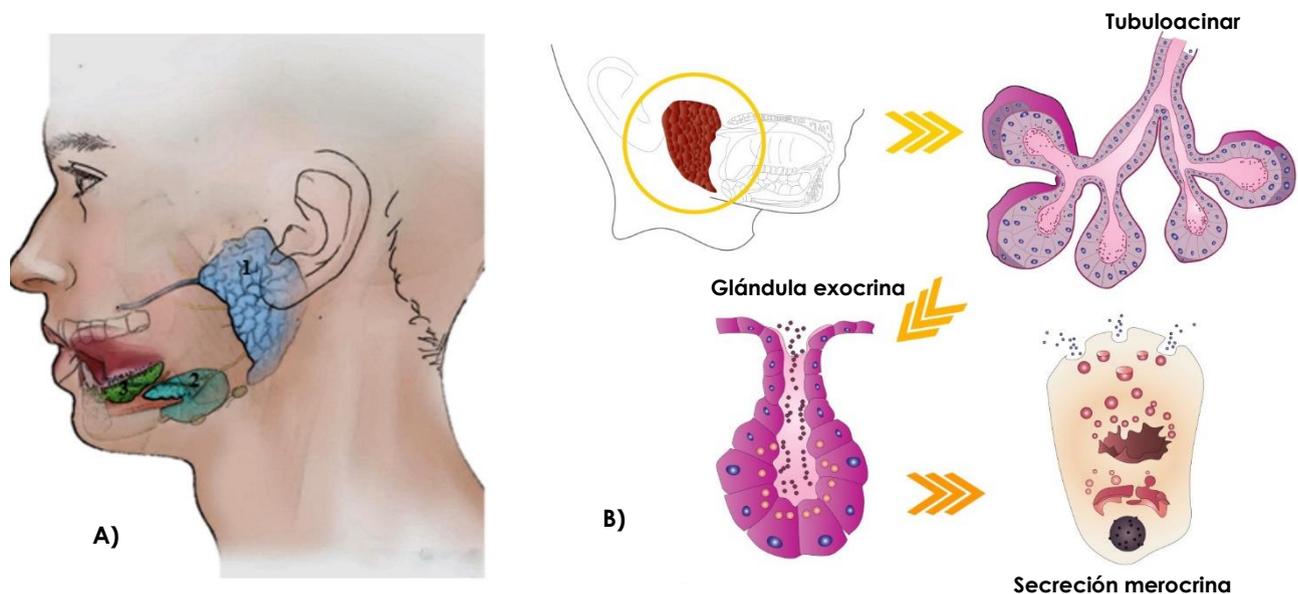


Fig 1. A) Glándulas salivales mayores: **1** Parótida, **2** Submandibular, **3** Sublingual. **B)** Estructura tubuloacinar y secreción merocrina característica de las glándulas salivales. **Propiedad del autor.**

4.1.1 Unidad secretora.

Las glándulas salivales se caracterizan por la agregación de numerosas unidades secretoras. Estas unidades o acinos que conforman el parénquima o porción funcional de la glándula es donde se produce la secreción salival y un sistema de conductos que transporta la secreción a la cavidad oral y regula la concentración de agua y electrolitos.¹³ Existen 3 tipos de acinos celulares, los serosos que contienen amilasa; los mucosos que secretan sialomucinas y los

mixtos compuestos tanto de células mucosas y serosas en proporciones variables De acuerdo al predominio de estos tipos de unidades secretoras, las glándulas salivales pueden clasificarse en 3 tipos: Parótida de tipo seroso, submandibular de tipo mixto y predominio de unidades serosas y sublingual de tipo mixto con predominio de unidades mucosas.¹⁴ La organización lobular de las glándulas está definida por las trabéculas anatómicas del tejido conjuntivo así como por el sistema de conductos excretores.¹⁵ (Figura 2)

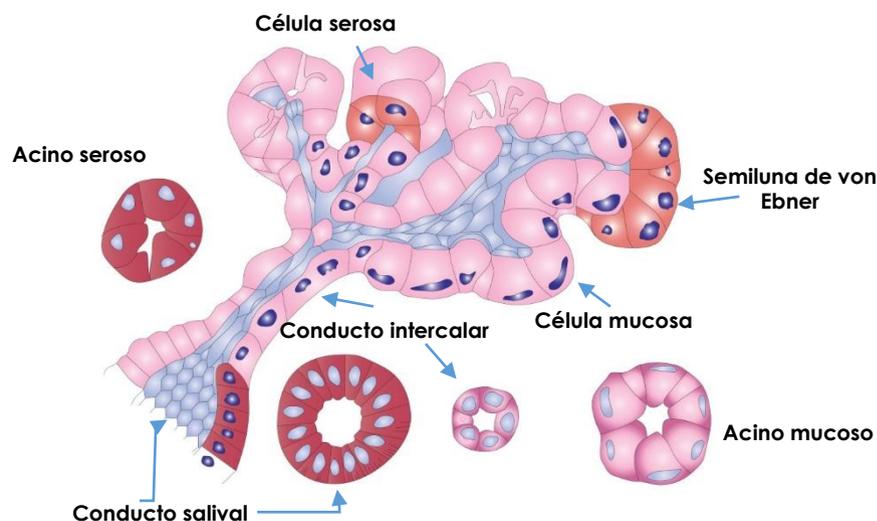


Fig 2. Unidad secretora. Propiedad del autor.

Los acinos de tipo seroso se encuentran conformados por células epiteliales con un núcleo basal, citoplasma denso y presencia de gránulos de zimógeno que varían en número dependiendo de las diferentes fases de secreción.¹⁶ La principal enzima presente en estos gránulos es la α amilasa salival, que degrada el almidón. Además presentan otras enzimas como la aglutinina, histatina, lisozima antibacteriana inespecífica, lactoferrina, tripsina, quimiotripsina, endopeptidasa y la histidina peptidasa. Los gránulos de zimógeno son densamente basófilos, refráctiles y reaccionan al ácido peryódico de Schiff con resistencia a la diastasa.¹⁷

A nivel ultraestructural, las células serosas muestran una morfología consistente de células con capacidad de secreción y exportación de proteínas. En su citoplasma presenta abundante retículo endoplásmico, complejo de Golgi, mitocondrias y gránulos secretores. Los gránulos secretores se encuentran localizados en la porción apical de la célula y se encuentran conformados por una membrana que encierra una matriz homogénea con baja densidad de electrones a la microscopía electrónica en los gránulos inmaduros y alta densidad de electrones en los gránulos maduros.¹⁸ La diferente densidad depende de las proteínas presentes dentro de cada gránulo. Todos los organelos membranosos presentes en el citoplasma aumentan durante la

fase de síntesis de proteínas y disminuyen durante la descarga de secreción. La superficie basal de la célula presenta numerosos pliegues de membrana plasmática y basal y se extienden más allá de los márgenes laterales de la célula lo que facilita la difusión de materiales en la célula.¹⁷

Los acinos de tipo mucoso son más grandes que los serosos y poseen un patrón irregular con células de abundante citoplasma lleno de mucinas. Contienen sialomucinas ácidas y neutras en diferentes concentraciones.¹⁹ Las sialomucinas ácidas son teñidas con azul alciano y mucicarmin; mientras que las sialomucinas neutras son positivas a la tinción de PAS. Ultraestructuralmente, las células mucosas presentan en su citoplasma abundantes vacuolas mucosas y complejo de Golgi; mientras que solo una pequeña porción basal y lateral contiene retículo endoplásmico y mitocondrias.²⁰ Por último, los acinos mixtos se encuentran formados por células mucosas cerca del conducto intercalado, rodeadas por células serosas en patrón de media luna.²¹

Las células secretoras se encuentran unidas en el polo apical por una zona adhesiva y en el polo basal por desmosomas.²² Entre estas uniones, los espacios virtuales forman los capilares secretores localizados en continuidad con el lumen central del acino a través del cual la secreción llega a los conductos intercalados. La transición del acino al conducto intercalado se da de forma gradual.²³ Durante este proceso la célula secretora va perdiendo sus organelos citoplasmáticos hasta convertirse en células epiteliales con núcleos relativamente grandes con escasas mitocondrias y con algunas cisternas de retículo endoplásmico.²⁴ En la superficie externa del conducto intercalado se localizan las prolongaciones de las células mioepiteliales; dichas células son fundamentales secreción salival debido a que poseen una función contráctil.²⁵ (Figura 3)

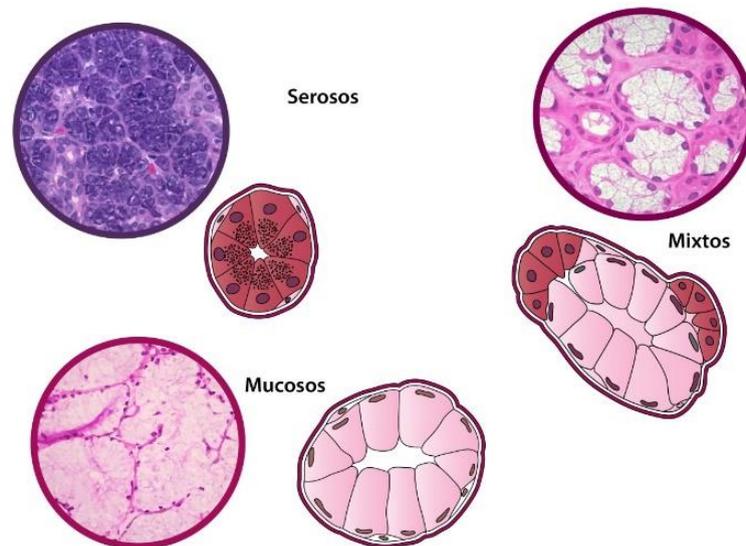


Fig 3. Tipos de acinos: Acinos serosos propios de la glándula parótida, acinos mixtos con predominio mucoso de la glándula submandibular y mixtos de predominio seroso de la glándula sublingual. **Propiedad del autor.**

4.1.2 Sistema de conductos.

El sistema de conductos transporta la saliva desde la glándula salival a la cavidad bucal. Durante este trayecto se modifica su composición química respecto a la concentración de agua y electrolitos.¹⁶ Posee tres segmentos principales; los dos primeros se denominan conductos secretores debido a su actividad metabólica, se localizan intralobularmente y corresponden al conducto intercalado y estriado, mientras que el tercer segmento o conducto excretor es interlobular.²⁶

El conducto intercalado se localiza contiguo al acino y se encuentra revestido por una capa de epitelio cúbico y una capa irregular de células mioepiteliales. Las células cubicas poseen en su citoplasma gran cantidad de lactoferrina y lisozima, mostrando una transformación progresiva entre las células secretoras y ductales. La longitud del conducto varía en las tres glándulas salivales mayores; en la glándula parótida el conducto es más largo y fácil de identificar, mientras que en la glándula submandibular y sublingual son cortos y apenas visibles. Las células son positivas para la tinción de inmunohistoquímica con citoqueratinas 13 y 16.²⁷

El conducto estriado posee un revestimiento de epitelio columnar simple con núcleos centrales. En la porción basal, posee estriaciones paralelas, en forma de dedos, causadas por invaginaciones de la membrana plasmática, y en el espacio entre estos pliegues se encuentran numerosas mitocondrias en disposición vertical; dicha conformación se encuentra relacionada al transporte de agua y electrolitos desde el sistema vascular hasta el lumen del conducto. Además, en el citoplasma de las células se encuentran enzimas como la adenosin trifosfatasa, succinil deshidrogenasa y la anhidrasa carbónica, las cuales le proporcionan un sistema metabólico capaz de concentrar los elementos en la saliva. La tinción eosinófila del conducto se debe a la abundante presencia de mitocondrias. Son más evidentes que los conductos intercalados debido a que longitudinalmente son más largos.¹²

Los conductos estriados desembocan en los conductos interlobulares localizados en los septos de tejido conjuntivo fibroso denso de las glándulas salivales. Los conductos interlobulares se encuentran revestidos por epitelio columnar pseudoestratificado con presencia de células mucosecretoras dispersas. Además del transporte de la saliva, actualmente se investiga su papel en la regeneración debido a la presencia células pluripotenciales indiferenciadas en el conducto. Estas células, en teoría, tienen la capacidad de seguir las mismas líneas celulares que en el desarrollo embrionario y pueden estar implicadas en las alteraciones metaplásicas y neoplásicas de las glándulas salivales.¹⁶

Por último, el conducto principal o excretor posee una capa gruesa de tejido conjuntivo fibroso denso con haces de fibras elásticas y se encuentra revestido por epitelio columnar, que se vuelve escamoso cercano a su salida en la cavidad oral. ¹²(Figura 4)

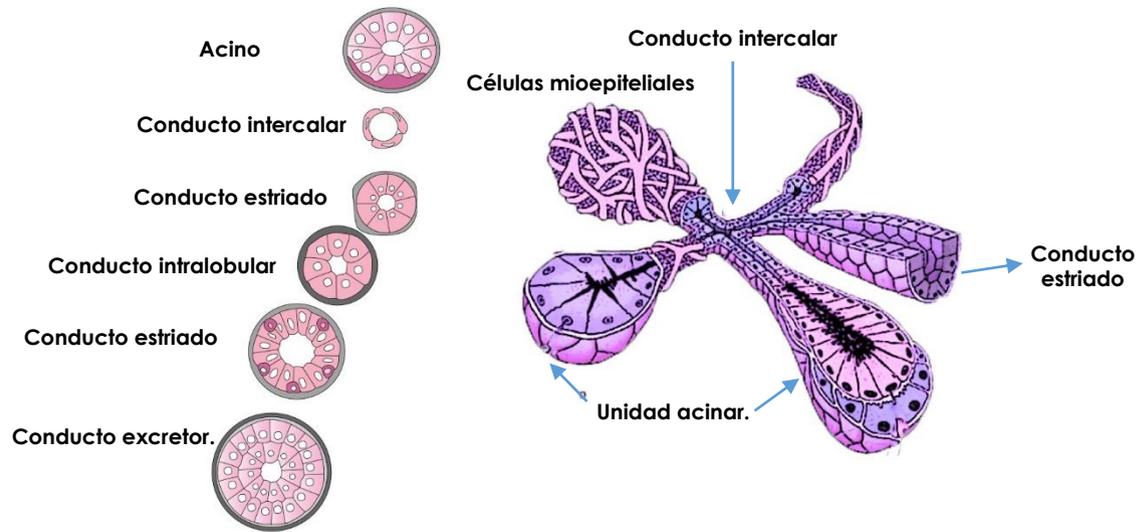


Fig 4. Sistema de conductos. Propiedad del autor.

4.1.3 Células mioepiteliales.

Las células mioepiteliales se derivan de la diferenciación de las células del conducto salival primario durante la décima semana de gestación. Se localizan entre las células epiteliales y la lámina basal del acino, en el conducto intercalado y en la unión de estos con el conducto estriado.²⁸ Su morfología generalmente es plana con largos procesos citoplasmáticos que se extienden sobre la superficie epitelial; sin embargo, estas células pueden asumir modificaciones morfológicas de acuerdo a las diferentes localizaciones anatómicas.²⁹

Ultraestructuralmente, la característica fundamental de las células es la presencia de filamentos citoplasmáticos en la porción basal; la mayoría de ellos corresponden a miofilamentos de actina, tropomiosina y miosina. Estos componentes le permiten presentar una función contráctil. Además, el citoplasma presenta numerosas mitocondrias, retículo endoplásmico, lisosomas y complejo de Golgi que le confieren una fuerte actividad ATPasa y fosfatasa alcalina.^{26, 30.}

Las células mioepiteliales poseen múltiples funciones entre las que se encuentran: acelerar la salida de saliva aumentando la presión sobre la unidad excretora, dar sostén al parénquima subyacente, producir fibronectina, laminina y colágena tipo III, componentes estructurales de la lámina basal y por último producir la glicoproteína tenascina componente de la matriz extracelular.^{31, 32, 33.}

Debido a su linaje ectomesenquimal, las células mioepiteliales neoplásicas pueden manifestar una o ambas morfologías; debido a ello, se les considera un factor clave en la variabilidad morfológica de distintas neoplasias de glándula salival.³⁴

4.1.4 Glándula parótida.

La parótida es una glándula de secreción serosa responsable de la mayor parte de producción salival. Durante la vida embrionaria, es la primera de las glándulas mayores en formarse comenzando su desarrollo entre la 5ª y 6ª semanas. Deriva del brote epitelial primitivo del epitelio oral y a medida que los primordios crecen se ramifican en un sistema tubular rodeado por tejido mesenquimal. Principalmente, la lámina basal del mesénquima juega un papel fundamental tanto en la arquitectura lobular de la glándula como en el desarrollo vascular y neural.³⁵

Durante la séptima semana, la glándula primitiva se mueve a la región preauricular y en la décima semana, es el desarrollo del nervio facial quien divide a la glándula en 2 lóbulos, superficial y profundo; siendo el lóbulo superficial en donde se originan la mayoría de los tumores.³⁶ Aproximadamente en el tercer mes de vida intrauterina las estructuras epiteliales de la glándula se disponen en lóbulos, delimitados por una cápsula de tejido conjuntivo, el cual posteriormente se coloniza por numerosos linfocitos que se dispondrán en ganglios linfáticos intra y extraglandulares, conformándose así la disposición general de la glándula.³⁷

La diferenciación celular comienza en el sistema de conductos, específicamente en los conductos excretores, en los cuales existe un cambio progresivo de la especialización de la superficie ciliada a células columnares, escamosas y mucosecretoras; seguida de la diferenciación acinar, la cual comienza alrededor del octavo mes de vida intrauterina. La histodiferenciación glandular salival finaliza con las células mioepiteliales, las cuales se disponen hacia la lámina basal de los acinos y de los conductos intercalados.^{38,39} (Figura 5)

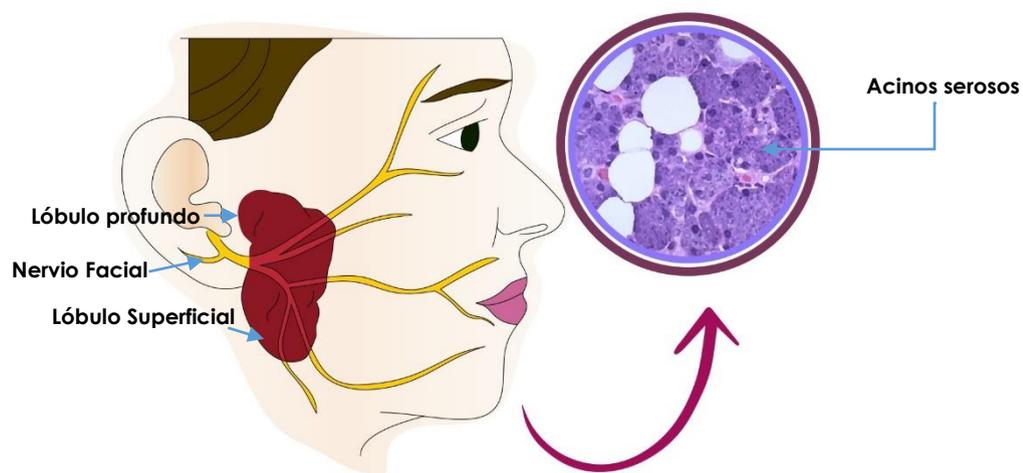


Fig 5. Glándula parótida. Propiedad del autor.

Anatómicamente, la parótida se localiza bilateralmente por detrás del nervio facial y por debajo del conducto auditivo externo. Se encuentra rodeada por una musculoaponeurosis superficial y por piel; irrigada por las ramas arteriales de la carótida externa e inervada por el nervio auriculotemporal. Está conformada por numerosas unidades tubuloacinares conectadas a través de los conductos excretores a su conducto principal o conducto de Stenon. ^{40,41,42.}

4.1.5 Glándula submandibular.

La glándula submandibular posee una secreción mixta, con predominio seroso. Su origen histológico es controversial ya que aunque se pensaba que derivaba del endodermo, estudios actuales sugieren que proviene del brote ectodérmico. La diferenciación celular y maduración de la glándula son similares a la parótida, con excepción del tejido linfoide el cual es menos evidente y no forma ganglios linfáticos intraglandulares.⁴³ Se encuentra cubierta por una fina cápsula de tejido fibroconjuntivo y se organiza en lóbulos conectados a un conducto extrector principal llamado conducto de Wharton.⁴⁴ El conducto desemboca en la superficie del piso de boca, en un pequeño orificio de la papila caruncula sublingualis a cada lado del frenillo lingual. Anatómicamente se encuentra localizada en la fosa sublingual mandibular, es irrigada por ramas de las arterias facial y sublingual e inervada por los nervios secretomotores de la rama parasimpática craneal del nervio facial. ^{14, 45} (Figura 6)

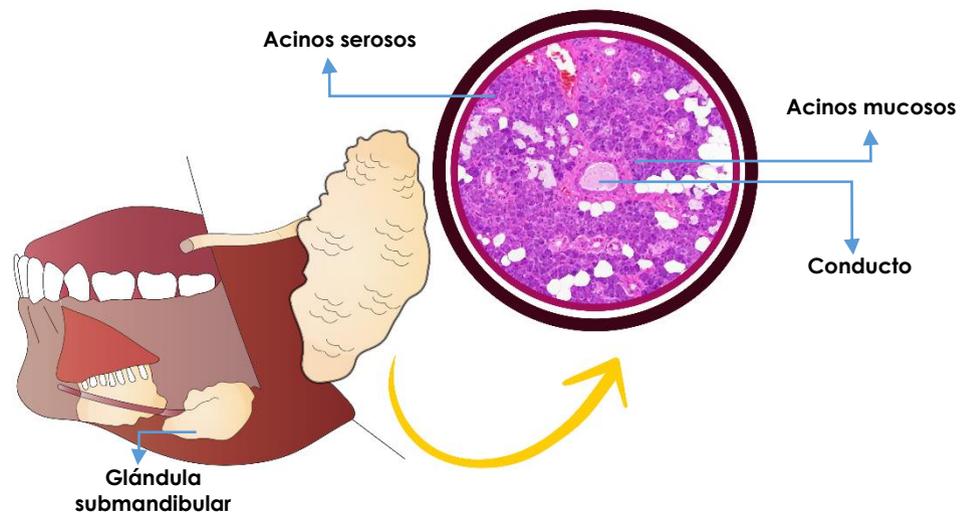


Fig 6. Ubicación de la glándula submandibular. *Propiedad del autor.*

4.1.6 Glándula sublingual.

La glándula sublingual posee una secreción mixta con predominio mucoso. Durante la vida embrionaria son las últimas de las glándulas salivales mayores en formarse. La organización y diferenciación de su parénquima son similares a la glándula submandibular y también se originan probablemente del endodermo. Anatómicamente se localiza en la fosa sublingual mandibular y se encuentra rodeada por tejido conjuntivo laxo. Su secreción desemboca a través del conducto principal llamado conducto de Bartholin, que a su vez desemboca en el conducto submandibular.⁴⁶ Los conductos de Rivinus son conductos excretores pequeños y accesorios que se abren paso a la cavidad bucal por separado en la plica sublingual o en el conducto submandibular. Se encuentra irrigada por las arterias sublinguales y submentales e innervada por los nervios secretomotores de la rama parasimpática craneal del nervio facial.⁴⁷ (Figura 7)

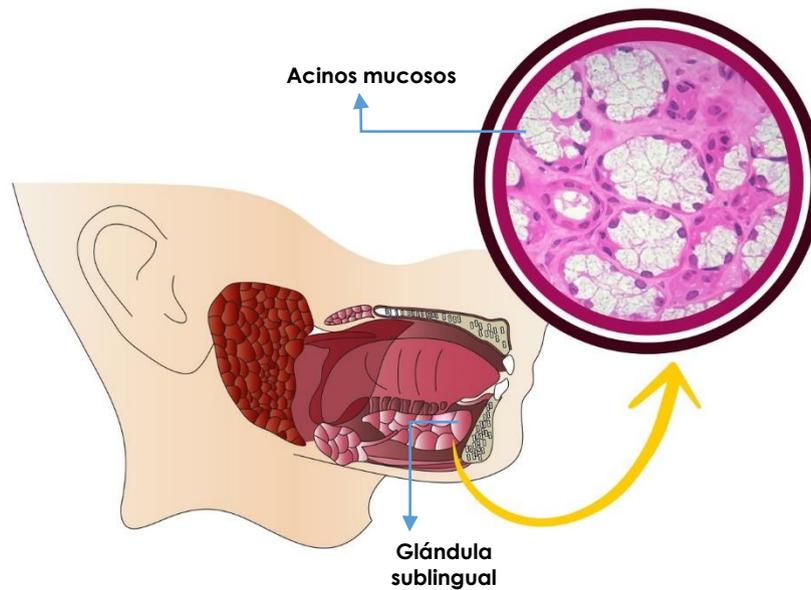


Fig 7. Ubicación de la glándula sublingual. *Propiedad del autor.*

4.2 Neoplasias de glándulas salivales.

Las glándulas salivales se caracterizan por tener la capacidad de formar un gran número de neoplasias histológicamente diversas. Corresponden del 3 al 10% de todas las neoplasias de cabeza y cuello, con una incidencia global del 2.5 por cada 100 000 casos al año y de las cuales, el 5% pertenecen a neoplasias malignas.⁴⁸

Es frecuente su presentación entre la 4º y 7º décadas de vida, con predilección por el género femenino. Dentro de la presentación en glándulas salivales mayores, la glándula parótida es habitualmente la más afectada, seguida por la glándula submandibular y sublingual. Debido a su heterogenicidad ha sido difícil definir los factores de riesgo asociados con su manifestación y permanecen inciertos los mecanismos moleculares implicados en su desarrollo.¹

Actualmente existen dos teorías principales que abordan su origen, la histogenética o teoría bicelular y la morfogenética o teoría multicelular.^{26, 49, 50, 51}

La teoría histogenética propuesta por Batsakis⁵² plantea que existen células de reserva de aspecto basal en las regiones proximal y distal del sistema de conducto y que corresponden a células troncales progenitoras de la unidad glandular. De acuerdo a ello, las células en la región proximal darán origen a las neoplasias que imitan el complejo ducto-acinar y las células de la región distal las neoplasias que imitan el sistema de conducto excretor. Aun cuando investigadores han demostrado por inmunohistoquímica la presencia de células basales de aspecto indiferenciado en los conductos salivales, estos estudios no son suficientes para sustentar que actúan como células troncales.⁵³

Por otra parte, el enfoque morfogenético o teoría multicelular propuesta por Dardick⁴⁹ relaciona la morfología con la diferenciación celular derivada de la expresión de diferentes genes en la células.⁵⁴ La relación entre la estructura normal de la glándula salival y la apariencia histológica de las neoplasias puede explicar las clasificaciones morfológicas. Sin embargo, se debe considerar que la similitud histológica no necesariamente implica que un tumor particular surge de la estructura que imita.⁵¹

En la clasificación morfológica de las neoplasias de glándulas salivales, el conducto intercalado representa el segmento más importante debido a que se ha relacionado con tumores benignos como el adenoma pleomorfo y el adenoma de células basales; y con tumores malignos

como el carcinoma adenoideo quístico, carcinoma epitelial-mioepitelial, carcinoma ductal y adenocarcinoma de células basales. Todos ellos muestran tanto diferenciación epitelial como mioepitelial,^{49, 53, 54, 55, 56} al igual que el conducto intercalado de la glándula salival normal. Los conductos intercalados de la glándula parótida son más largos que los de las glándulas submandibular y sublingual; esto podría explicar porque el 80% de las neoplasias se desarrollan en ésta glándula.⁵⁷

Por otra lado, el carcinoma de células acinares se ha relacionado con el segmento acinar que corresponde a la estructura más diferenciada de la glándula; el conducto estriado que presenta células con abundantes mitocondrias se ha encontrado analogía morfológica con el oncocitoma y de los conductos excretores más grandes el carcinoma mucoepidermoide.⁴⁹

4.2.1 Clasificación de la OMS

La clasificación más usada para agrupar a este tipo de neoplasias es la de la Organización Mundial de la Salud la cual fue modificada en el año 2017 y que las cataloga en neoplasias benignas y malignas de origen epitelial, lesiones epiteliales no neoplásicas, lesiones benignas de tejido blando, y neoplasias hematolinfoides.⁵⁸ (Tabla1)

En el grupo de neoplasias malignas de glándulas salivales se incluyen a 21 entidades. Entre las modificaciones realizadas en esta clasificación se encuentran el agrupamiento del cistadenocarcinoma, adenocarcinoma mucinoso y adenocarcinoma intestinal dentro del adenocarcinoma NOS; la inclusión del papiloma ductal, intraductal e invertido en un solo apartado; la introducción del carcinoma secretor como una nueva entidad dentro de ésta clasificación, la denominación de carcinomas neuroendocrinos y no neuroendocrinos indiferenciados en lugar de carcinomas de células pequeñas y grandes, y por último, la reclasificación del sialoblastoma y paraganglioma como entidades indeterminadas a malignas.⁵⁸

De acuerdo a esta clasificación, la neoplasia maligna de glándula salival mayor más frecuente es el carcinoma mucoepidermoide, seguido del carcinoma adenoideo quístico y de células acinares.⁵⁸

Clasificación de la OMS de neoplasias de glándulas salivales	
Neoplasias Malignas	Neoplasias Benignas
Carcinoma Mucoepidermoide Carcinoma adenoideo quístico Carcinoma de células acinares Adenocarcinoma polimorfo Carcinoma de células claras Adenocarcinoma de células basales Carcinoma Intraductal Adenocarcinoma NOS Carcinoma de ducto salival Carcinoma mioepitelial Carcinoma epitelias mioepitelial Carcinoma ex adenoma plemorfo Carcinoma secretor Adenocarcinoma sebáceo Carcinosarcoma Carcinoma pobremente diferenciado. Carcinoma linfoepitelial Carcinoma escamocelular Carcinoma oncocítico Neoplasias inciertas potencialmente malignas.	Adenoma Pleomorfo Mioepitelioma Adenoma de células basales Tumor de Wharthin Oncocitoma Linfadenoma Cistadenoma Sialadenoma prolifero Papiloma ductal Adenoma sebáceo Adenoma canalicular y otros adenomas ductales
Lesiones epiteliales no neoplásicas	Lesiones benignas de tejidos blandos
Adenosis poliquística esclerosante Hiperplasia nodular oncocítica Sialadenitis linfoepitelial Hiperplasia del ducto intercalado	Hemangloma Lipoma/Sialolipoma Facitis Nodular
Neoplasias hematolinfoides	
Linfoma extranodal de la zona marginal del tejido linfoide asociado a la mucosa (Linfoma MALT)	

Tabla I: Clasificación de neoplasias de glándulas salivales de la OMS 2017.

4.2.2 Carcinoma mucoepidermoide

Se define como una neoplasia epitelial maligna con proporciones variables de células mucosas, epidermoides e intermedias.⁵⁹ Corresponde a la neoplasia maligna de glándula salival más frecuente, representando en promedio el 16% de todos los tumores. Su formación se ha relacionado a radiaciones ionizantes. No presenta predilección de edad aunque si de género, siendo las mujeres ligeramente más afectadas que los hombres. Se presenta con mayor frecuencia en la glándula parótida seguida de las glándulas salivales menores. Clínicamente se observa como un aumento de volumen, generalmente asintomático y de crecimiento lento. Cuando son sintomáticos pueden manifestarse con dolor, parálisis facial y disfagia.⁶⁰

Macroscópicamente puede encontrarse bien circunscrito, parcialmente encapsulado o de periferia imprecisa. Al corte puede ser sólido o quístico, con superficie café claro o amarilla.⁶¹ Microscópicamente puede presentar patrones histológicos quístico y sólido con presencia de células mucosas, intermedias y epidermoides en proporciones variables. Para el establecimiento

del grado histológico se utiliza un sistema de puntaje en el cual, cada uno de los parámetros histológicos se suman para obtener un puntaje final. Los parámetros medidos son: Componente intraquístico inferior a 20% (2pts), invasión neural (2pts), presencia de necrosis(3pts), 4 o más mitosis por cada 10 campos de alto poder (3pts) y anaplasia (4pts). Se consideran de bajo grado las neoplasias con una puntaje de 0 a 4, de grado intermedio de 5 a 6 y de alto grado con puntaje mayor o igual a 7. El tratamiento para las neoplasias de bajo grado es la resección conservadora con preservación del nervio facial; mientras que para las de grado intermedio y alto es la resección completa con disección cervical. Las neoplasias de bajo grado no tienden a metastatizar; sin embargo las de grado intermedio y alto metastatizan a distancia en un 55 a 80%, siendo los órganos más afectados el pulmón, hueso y cerebro.⁶² (Figura 8)

Actualmente se realizan diferentes análisis moleculares con el fin de entender el comportamiento biológico de estas neoplasias. Los estudios citogénéticos han identificado en las neoplasias de bajo grado una translocación entre el gen MAML2 y MECT1, t(11;19)(q21-22;p13), aunque dicha traslocación no se manifiesta en neoplasias de alto grado.⁶³

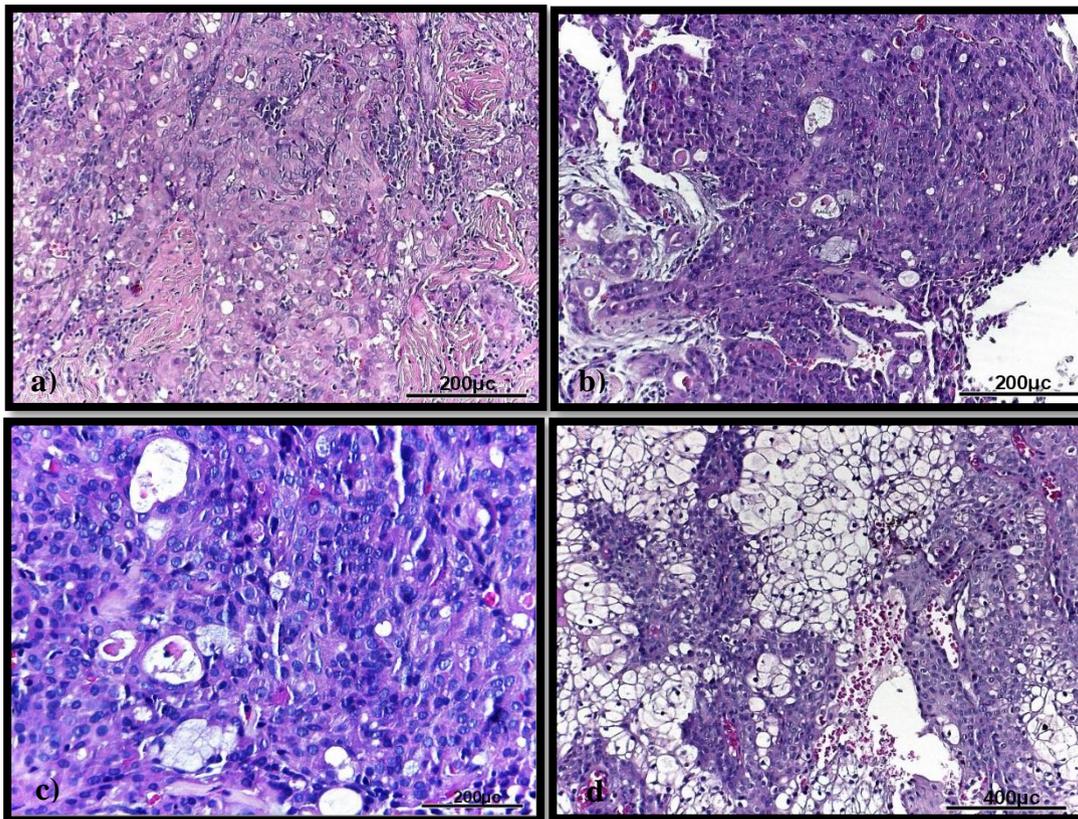


Fig. 8: H&E Carcinoma mucoepidermoide. **a)** Células epidermoides en patrón sólido, **b) y c)** Células mucosecretoras y epidermoides en patrón microquístico, **d)** Variante de células claras. **Obtenidas de bloque propiedad del Departamento de Patología Bucal DEPeI UNAM.**

4.2.3 Carcinoma adenoideo quístico

Se define como una neoplasia epitelial maligna con diferenciación mioepitelial y ductal.⁵⁸ Corresponde al cuarto tumor maligno más frecuente de glándula salival que se manifiesta tanto en glándulas salivales mayores y menores, siendo la glándula parótida la más afectada. Es frecuente en la 6° década de vida con predilección por el género femenino en una relación 3:2. Clínicamente se presenta como un aumento de volumen doloroso y que ocasiona parálisis facial.⁶⁴

Macroscópicamente no se encuentra circunscrito y al corte es sólido de color blanco a grisáceo. Microscópicamente corresponde a una neoplasia formada por células pequeñas con núcleos angulados y nucléolos prominentes, con invasión perineural típica y que infiltra tejidos profundos. Puede presentar tres patrones histológicos: cribiforme, tubular y sólido.⁶⁵ El patrón cribiforme se caracteriza por presentar nidos epiteliales que contienen pseudoquistes; estos no son verdaderas luces glandulares, sino que forman parte del estroma tumoral y contienen glucosaminglucanos amorfos y lámina basal hialinizada. En el patrón tubular las luces resultan más visibles, y se encuentran rodeadas por células ductales y una segunda capa de células mioepiteliales. Los nidos epiteliales se encuentran separados por estroma eosinófilo hialino. El patrón sólido presenta mayor grado de pleomorfismo nuclear, se asocia a un aumento en la actividad mitótica y presenta áreas de necrosis. Para considerar que la neoplasia presenta este patrón se necesita un 30% de crecimiento sólido como mínimo.⁶⁶ La gradificación depende principalmente del patrón histológico que predomina. Las neoplasias de bajo grado presentan un patrón tubular; las de grado intermedio un patrón cribiforme y las de alto grado un patrón sólido.⁵⁸ (Figura 9)

El tratamiento consiste en resección radical con quimioterapia adyuvante. La supervivencia a los 15 años depende del grado histológico, siendo del 39% en el grado I, del 26% en el grado II y del 5% en el grado III. Los factores de pronóstico desfavorable incluyen tumores de más de 4cm., metástasis a cadena cervical regional y metástasis a pulmón y hueso.⁶⁷

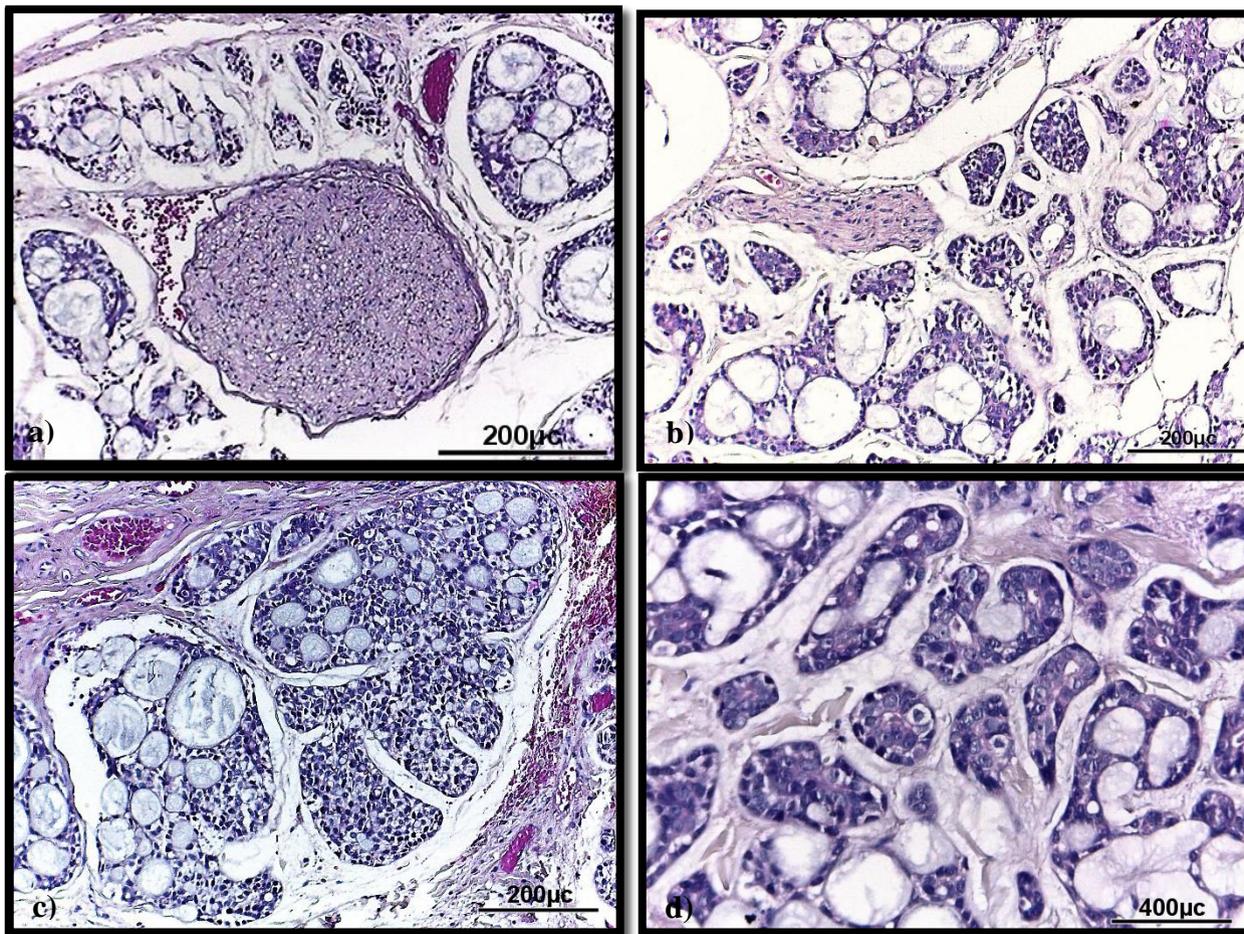


Fig. 9: H&E Carcinoma adenoideo quístico. **a) y b)** Células neoplásicas con invasión peri neural, **y c)** Patrón cribiforme, **d)** Patrón tubular. Obtenidas de bloque propiedad del Departamento de Patología Bucal DEPEI UNAM.

4.2.4 Carcinoma de células acinares

Se define como una neoplasia epitelial maligna compuesta por células de características acinares.⁵⁸ Corresponde a la segunda neoplasia maligna de glándula salival más frecuente en niños. El promedio de edad de presentación es de 50 años, con una ligera predilección en el género femenino en una relación 1.5:1. El 90% de los casos afecta la glándula parótida. Clínicamente se presenta como un aumento de volumen, de lento crecimiento, con superficie uni o multinodular, que puede cursar con dolor y parálisis facial.⁴¹

Macroscópicamente se encuentra pobremente definida y al corte sólido. Microscópicamente corresponde a una neoplasia formada por células acinares y ductales, de morfología poligonal, con núcleo excéntrico y citoplasma generalmente basófilo y granular,

aunque también puede presentar citoplasma vacuolado, claro y oncocítico. Los patrones histológicos observados en esta neoplasia corresponden al folicular, microquístico y sólido.⁶⁸ El patrón folicular y microquístico se considera de bajo e intermedio grado respectivamente debido a su escaso pleomorfismo e infrecuentes mitosis. El patrón sólido se considera de alto grado o indiferenciado debido a que se asocia a zonas de necrosis, invasión neural e hialinización estromal.⁵⁸ Aun cuando el carcinoma de células acinares no es agresivo, una proporción puede metastatizar a ganglios linfáticos cervicales y a pulmón. Presenta una recurrencia alta del 35% con supervivencia a los 20 años del 90%; a excepción de los indiferenciados con una supevivencia promedio de 40 meses posterior al diagnóstico.⁶⁹ (Figura 10)

Los factores de pronóstico desfavorable incluyen tumores de gran tamaño, que involucren el lóbulo profundo de la glándula parótida y resección quirúrgica incompleta.⁷⁰

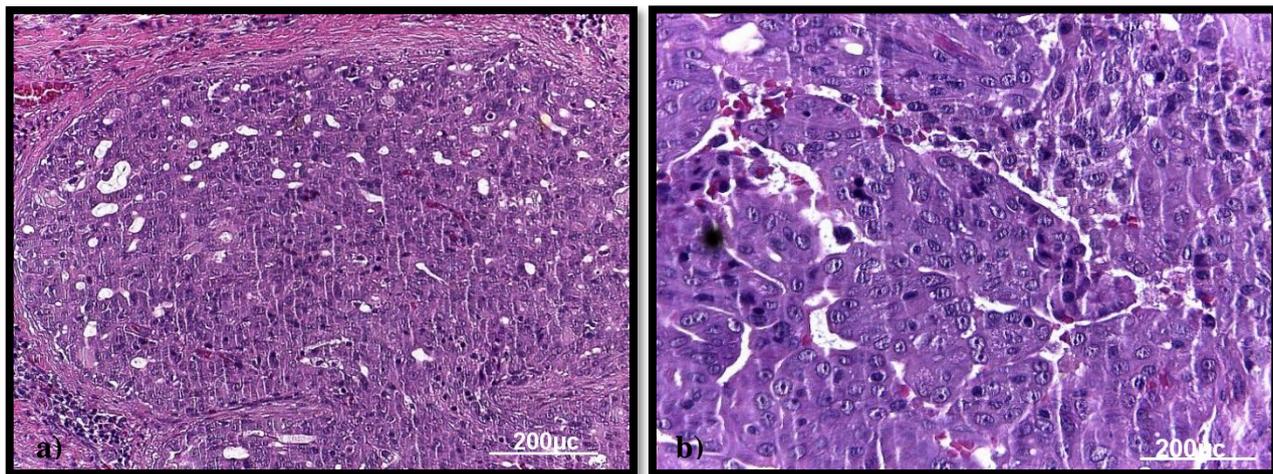


Fig. 10: H&E Carcinoma de células acinares. Fotomicrografías: **a)** Patrón microquístico **b)** Células con morfología poligonal y citoplasma granular. Obtenidas de bloque propiedad del Departamento de Patología Bucal DEPeI UNAM.

4.2.5 Adenocarcinoma de células basales

Se define como una neoplasia epitelial maligna compuesta por células basales y mioepiteliales que forman nidos y estructuras glandulares. Corresponde a una neoplasia infrecuente con una presentación promedio entre la 5 y 6° décadas de vida. No presenta predilección de género y afecta mayormente a la glándula parótida. Clínicamente se presenta como un nódulo, de lento crecimiento.⁵⁸

Macroscópicamente no presenta cápsula y al corte se observa sólida. Microscópicamente corresponde a una neoplasia formada por células basales que presentan palizada periférica y depósitos de material parecido a la membrana basal.⁷¹ Los patrones histológicos observados en

esta neoplasia corresponden al tubular, trabecular, membranoso y sólido. Independientemente del patrón que evidencie la neoplasia, este tipo de entidades se consideran de grado intermedio.(Figura 11) El 25% de los casos presenta invasión perineural y permeación vascular. Es infrecuente la metástasis regional a ganglios linfáticos y metástasis a distancia.⁷²

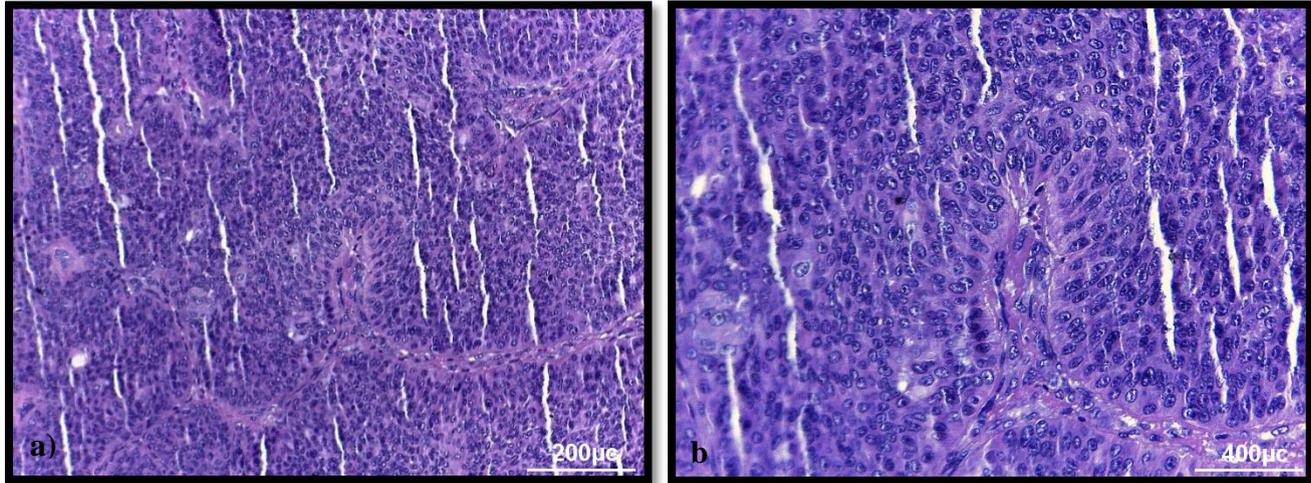


Fig. 11: H&E Adenocarcinoma de células basales. Fotomicrografías: **a)** Patrón sólido **y b)** Células basales neoplásicas con morfología columnar. **Obtenidas de bloque propiedad del Departamento de Patología Bucal DEPeI UNAM.**

4.2.6 Adenocarcinoma NOS

Representa un grupo de carcinomas epiteliales que forman estructuras ductales y glandulares. Incluye los carcinomas no clasificados, cistadenocarcinomas, los cistadenocarcinomas mucinoso y papilar, así como el adenocarcinoma tipo intestinal.⁵⁸ Corresponden del 10 a 15% de todas las neoplasias malignas de glándula salival, con una edad promedio de presentación de 58 años. Más del 50 % se originan en la glándula parótida, seguida de las glándulas salivales menores. Clínicamente se presentan como aumentos de volumen, generalmente asintomáticos, con consistencia que va de blanda a firme y con tiempo de evolución de 1 a 10 años.¹⁴

Macroscópicamente pueden presentarse tanto parcialmente circunscritos como infiltrantes. Al corte se observa sólido, de color amarillo con zonas de hemorragia y necrosis. El adenocarcinoma NOS corresponde a un diagnóstico por exclusión y microscópicamente puede presentar una gran variedad morfológica que va desde células cuboidales, columnares, poligonales y claras, hasta mucinosas, oncocíticas y plasmocitoides, arregladas en patrones ductal, quístico y sólido.⁵⁸ (Figura 12)

La gradificación de esta entidad se realiza en base al grado de atipia celular en bajo, intermedio y alto grado. La formación de estructuras glandulares y ductales son frecuentes en los tumores de bajo e intermedio grado y el patrón sólido es frecuente en los tumores de alto grado. El pronóstico depende del grado de la neoplasia y estadio clínico. Los adenocarcinomas de alto grado presentan una supervivencia a los 15 años del 3%, la cual es menor en comparación de los de grado intermedio que es de 31% y los de bajo grado de 54%.¹⁴

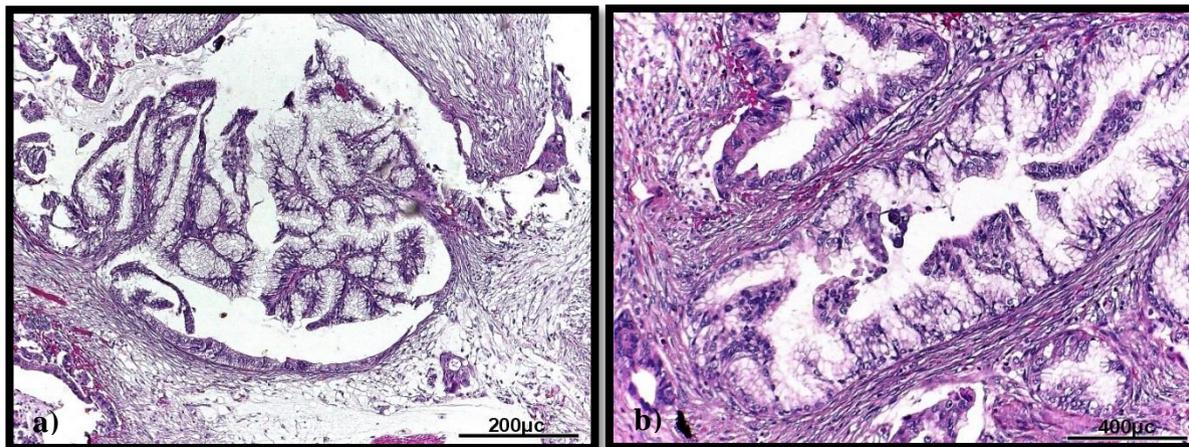


Fig. 12: H&E Adenocarcinoma NOS. Fotomicrografías: **a)** Cistadenocarcinoma gastrointestinal **b)** Patrón papilar. Obtenidas de bloque propiedad del Departamento de Patología Bucal DEPeI UNAM.

4.2.7 Carcinoma del ducto salival

Se define como una neoplasia epitelial maligna agresiva que asemeja al carcinoma ductal de mama.⁵⁸ Puede originarse de novo o derivarse como un componente maligno del adenoma pleomorfo. Corresponde al 10% de todas las neoplasias malignas de glándula salival, con ligera predilección por el género masculino y un pico de incidencia entre la 6° y 7° décadas de vida. Afecta con mayor frecuencia a la glándula parótida.⁷³

Clínicamente se presenta como un aumento de volumen de crecimiento rápido, frecuentemente asociado a parálisis facial, dolor y linfadenopatía cervical. En los hallazgos macroscópicos se identifica una neoplasia infiltrante que al corte se observa de blanca a gris, multiquística y con zonas de necrosis. Microscópicamente puede presentar tanto un patrón de formación ductal con comedonecrosis, así como un patrón cribiforme con características de letras romanas. Las células poseen características de secreción apocrina, con núcleo pleomórfico y cromatina dispersa con nucléolo prominente.⁷⁴ Se evidencian fácilmente figuras mitóticas y células

con características rabdoideas. Son negativas a la prueba de inmunohistoquímica para receptores de progesterona y estrógenos. (Figura 13)

Esta neoplasia se considera de alto grado, debido a su alta recurrencia y frecuente metástasis regional y a distancia ya sea por vía linfática o por vía o hematogena. Presenta una supervivencia a 5 años pobre, debido a que del 55 al 65% de los pacientes mueren a causa de la enfermedad.⁷⁵

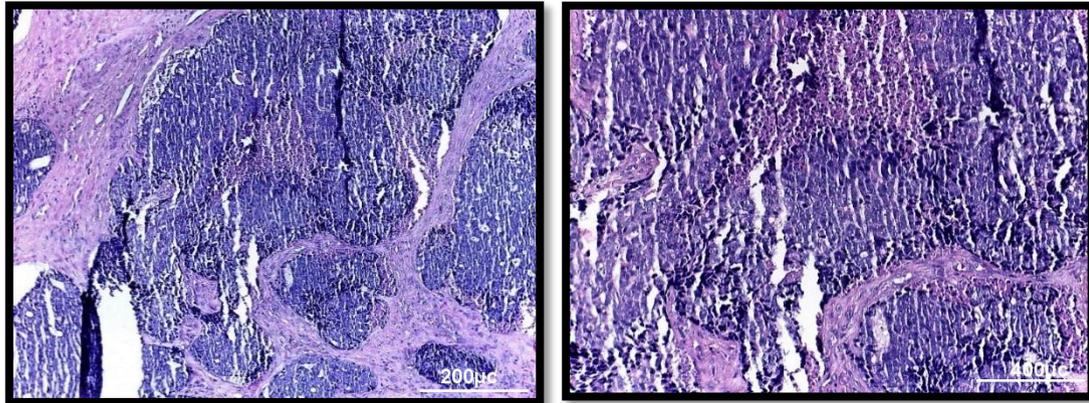


Fig. 13: H&E Carcinoma del ducto salival. Obtenidas de bloque propiedad del Departamento de Patología Bucal DEPeI UNAM.

4.2.8 Carcinoma mioepitelial

Se define como una neoplasia epitelial maligna compuesta en su totalidad por células neoplásicas mioepiteliales con crecimiento infiltrante.⁵⁸ Su presentación es infrecuente y no presentan predilección de edad ni de género. La mayoría de los casos afecta a la glándula parótida seguida de glándulas salivales menores y del paladar. Clínicamente se presenta como un aumento de volumen doloroso y de crecimiento rápido.¹⁴ En los hallazgos macroscópicos se identifica una neoplasia no encapsulada que puede ser firme o blanda. Al corte se observa de blanca a gris, con degeneración quística, zonas de hemorragia y necrosis.⁵⁸

Histopatológicamente se encuentra formada por nidos desorganizados de células mioepiteliales con bordes infiltrantes, en patrones sólido, trabecular y reticular. El estroma puede ser mixoide y hialino. Las células neoplásicas pueden presentar una morfología ahusada, estrellada, epitelioide, plasmocitoide y en anillo de sello. Algunas veces se observa alta actividad mitótica, pleomorfismo celular y necrosis.⁷⁶ Aunque los carcinomas mioepiteliales pueden surgir de novo, la mitad de los casos se desarrollan en adenomas pleomorfos o de mioepiteliomas benignos preexistentes. Generalmente se consideran neoplasias de grado intermedio debido a que pueden

afectar el hueso adyacente y presentar invasión perineural y vascular. La presencia de marcado pleomorfismo celular y necrosis se relaciona a neoplasias de alto grado. La metástasis regional y a distancia es infrecuente y aproximadamente un tercio de los pacientes mueren a consecuencia de la enfermedad.⁷⁶

4.3 Angiogénesis

La angiogénesis se define como un proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos, ya sea a partir de vasos preexistentes o por la movilización de células precursoras endoteliales desde la medula ósea hacia el sitio de estímulo angiogénico la cual se rige por factores compensatorios que la inducen o la inhiben⁷⁸. Esta cascada de señalización ocurre tanto en condiciones fisiológicas como el desarrollo fetal, en respuesta al daño y durante la cicatrización de heridas; como en condiciones patológicas como el cáncer.¹

Las células neoplásicas, al igual que las células sanas no pueden crecer sin un aporte de nutrientes, por lo cual, inducen la angiogenia sostenida (306 robins) en la cual la señalización proangiogénica se encuentra alterada contribuyendo al crecimiento tumoral y al comportamiento agresivo.⁷⁹

Folkman y cols⁸⁰, describen 2 etapas de crecimiento neoplásico, la fase avascular y la fase vascular. En la fase avascular los propios vasos del hospedero son suficientes para propiciar un crecimiento tumoral de 1 a 2mm, esto debido a que es la distancia máxima a través de la cual se difunden el oxígeno, los nutrientes y los desechos desde los vasos sanguíneos. Un crecimiento mayor a este diámetro necesita la formación de nuevos vasos que la suministren, por lo cual se activa la fase vascular. En esta fase las células endoteliales recién formadas estimulan el crecimiento de las células tumorales adyacentes al secretar factores de crecimiento. Además los vasos recién formados son permeables debido a que las uniones interendoteliales se encuentran incompletas lo que incrementa la permeabilidad vascular, permite el acceso de las células neoplásicas a los vasos y aumenta la capacidad de diseminación metastásica.⁷⁹ El proceso de angiogenia afecta a varias vías de señalización, interacciones célula-célula, proteínas de la MEC y enzimas tisulares.⁷⁸

La base molecular de la fase vascular es la sobreproducción de factores angiogénicos y/o pérdida de sus inhibidores. Estos factores son producidos por las propias células neoplásicas, por las células del sistema inmune como los macrófagos y por células estromales asociadas al tumor. Estas proteínas crean un gradiente que estimula la proliferación de las células endoteliales y guían el crecimiento de nuevos vasos hacia el tumor. La señalización pro-angiogénica comienza por la falta relativa de oxígeno secundaria a hipoxia que estabiliza al factor inducido por hipoxia alpha (HIF- α) y que a su vez activa al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A).⁸⁰ El VEGF-A estimula

la migración y proliferación de células endoteliales, aumenta la permeabilidad vascular al activar la vasodilatación mediada por óxido nítrico y contribuye a la formación de la luz vascular. Posteriormente, las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) degradan la membrana basal para permitir la formación de brotes vasculares. Las células endoteliales denominadas “de la punta” migran hacia el sitio de estímulo angiogénico y gracias al factor de crecimiento fibroblástico (FGF-2) proliferan inmediatamente por detrás del borde anterior de las células que migran. Las angiopoyetinas 1 y 2 (Ang1 y Ang2) son factores de crecimiento que participan en la maduración estructural de los nuevos vasos mediante reclutamiento de pericitos y células de músculo liso. Los factores de crecimiento PDGF y TGF- β también intervienen en el proceso de estabilización; el PDGF recluta células de músculo liso y el TGF- β inhibe la proliferación y migración endoteliales y potencia la producción de proteínas de MEC.⁷⁸ (Figura 14)

Por otra parte también se sabe que las mutaciones en las proteínas supresoras tumorales promueven la angiogénesis. Un ejemplo de ello es la proteína p53, que en condiciones normales propicia la expresión de moléculas antiangiogénicas como la trombospondina 1, y reprime la expresión de moléculas proangiogénicas, como el VEGF. La pérdida de función de p53 no solo elimina los puntos de regulación del ciclo celular y altera el metabolismo de las células tumorales, sino que, además, proporciona un entorno más permisivo para la angiogenia.⁷⁹

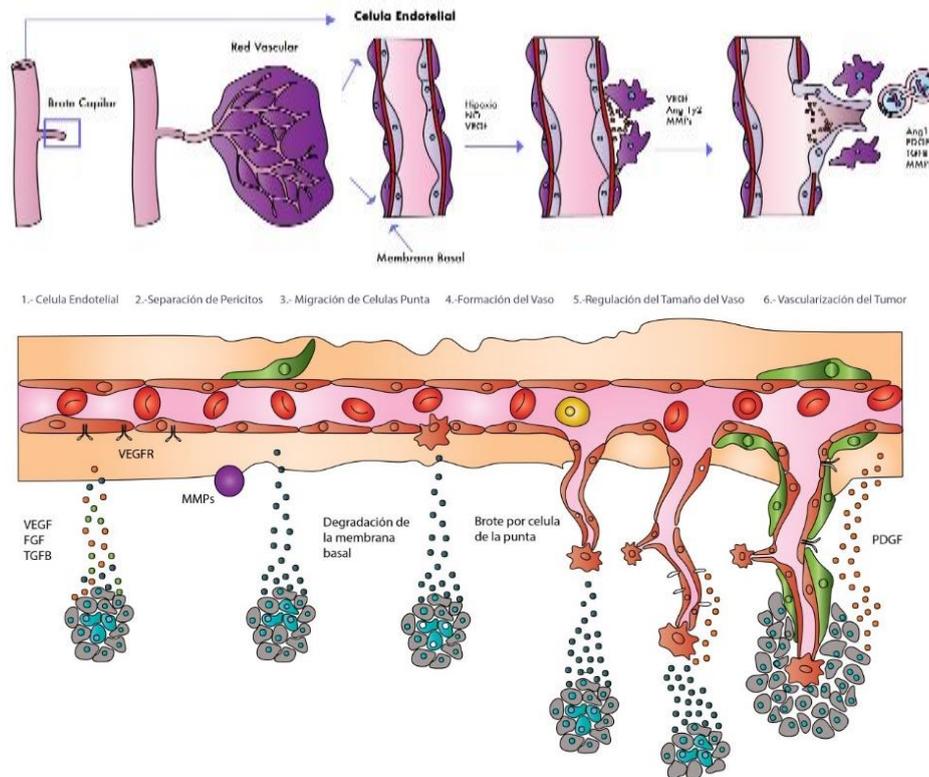


Fig. 14: Angiogénesis tumoral. Propiedad del autor.

4.3.1 Densidad microvascular (MVD)

Existen tres métodos para evaluar la angiogénesis tumoral: histológicamente con marcadores de inmunohistoquímica, la cual es una técnica directa y corresponde al método más utilizado para evaluar neoformación vascular; radiológicamente por ultrasonido doppler que es considerada una técnica de evaluación indirecta y serológicamente con marcadores de actividad angiogénica.⁸¹

La angiogénesis se puede evaluar mediante inmunohistoquímica mediante la MVD, la cual se define como el número de vasos pequeños en una determinada área tumoral. Ésta técnica fue desarrollada en 1990 por Weidner y cols. se considera un importante predictor del potencial metastásico asociado a un pobre pronóstico en neoplasias malignas de alto grado de neoplasias de origen glandular como mama y próstata.³

La evaluación por inmunohistoquímica de la MVD consiste en seleccionar 3 áreas de mayor densidad vascular llamadas "focos calientes" en un corte histológico a 40 aumentos, y posteriormente de cada área cuantificar los vasos sanguíneos obteniendo una escala logarítmica de espectro de baja a alta densidad, que va de 10 a 200 microvasos por cada campo de 200 aumentos o de 0.74mm². Las zonas de mayor neovascularización generalmente se ubican en los márgenes de tumor.⁸²

Para que la densidad pueda cuantificarse, es importante que exista un diverso espectro de densidades de los diferentes casos de una determinada neoplasia, que nos permita clasificar mediante una escala logarítmica el espectro de baja a alta densidad. Las densidades son un continuo que se extiende desde aproximadamente 10 a 200 microvasos por cada campo de 200 aumentos o de 0.74mm².⁷⁹

4.4 Marcadores angiogénicos

Los inmunomarcadores más utilizados para medir la neoformación vascular son CD31 y CD34, pero su utilidad para demostrar la verdadera actividad angiogénica ha sido debatida. Por lo que actualmente se han propuesto inmunomarcadores como la proteína receptora de membrana CD105 y la proteína de matriz extracelular Cyr61 como principales moléculas proangiogénicas.¹

4.4.1 CD34

El antígeno CD34 es una glicoproteína de adhesión transmembranral de cadena simple de 110 kDa.⁸³ Se expresa selectivamente en las células progenitoras hemopoyéticas mieloides y linfoides, así como en las células de la punta del endotelio vascular. Mientras que la mayoría de las células endoteliales permanecen quiescentes en el vaso sanguíneo durante la angiogénesis, las células de la punta son células especializadas que promueven el brote de la red vascular.⁸⁴ Se sitúan en el borde delantero del brote formando protuberancias o filopodios que guían la migración celular hacia la fuente de factores de crecimiento angiogénico.⁸⁵ En consecuencia, la expresión de CD34 solo se puede observar en células durante la angiogénesis, pero esta expresión se pierde en células endoteliales en reposo. Por otra parte, CD34 no sólo reacciona en los vasos recién formados, sino también con los vasos normales atrapados dentro de los tejidos tumorales.⁸⁶ (Figura 15)

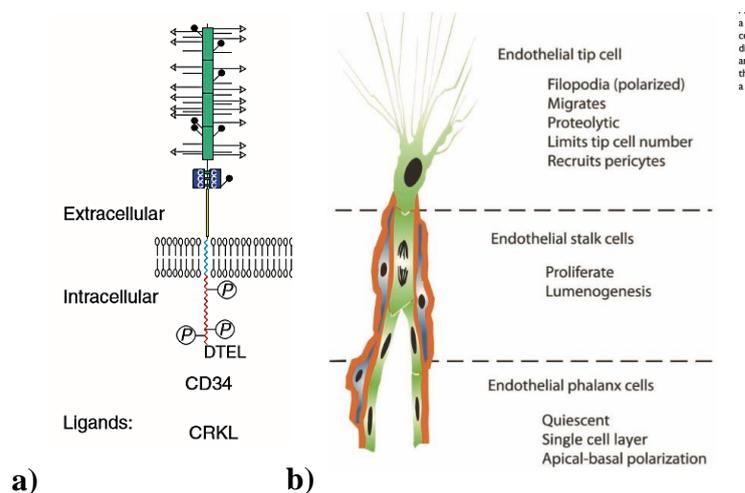


Fig. 15: a) Estructura de CD34: Dominio extracelular rico en serina, treonina y prolina, un dominio globular que contiene cisteína y dominios cinasa citoplasmáticos. **b)** Célula de la punta cuya morfología estimula la migración celular.^{87, 88}

4.4.2 CD105

La Endogлина o CD105 es una glicoproteína transmembranral de 180 kDa que contiene un dominio extracelular de 561 residuos aminoácidos y una región citoplasmática rica en serina y treonina de 47 residuos.^{89,90} El gen que codifica la endogлина se ha localizado en el brazo largo del cromosoma humano 9⁹¹ y las mutaciones de este gen son las responsables de un trastorno vascular autosómico dominante denominado telangiectasia hemorrágica hereditaria de tipo 1 (THH1).⁹² La endogлина es un receptor alternativo de del TGF- β en las células endoteliales y desempeña un papel importante en la angiogénesis.⁹³ Se expresa predominantemente en linajes celulares dentro del sistema vascular y se sobreexpresa en células endoteliales proliferantes que participan en la angiogénesis tumoral, con expresión débil o negativa en el endotelio vascular de tejidos normales.⁹⁴ Los investigadores han demostrado recientemente que la endogлина (CD105) es un marcador de microvasos más específico y sensible que otros anticuerpos panendoteliales como CD31 o CD34 usados en neoplasia malignas del cerebro, mama, colon, esófago, vejiga y pulmón^{95, 96}.

La hipoxia originada por el crecimiento neoplásico es un estímulo potente para la expresión del gen CD105 en las células endoteliales vasculares, lo que a su vez atenúa la apoptosis celular y, por tanto, contribuye a la angiogénesis.⁹⁸ (Figura 16)

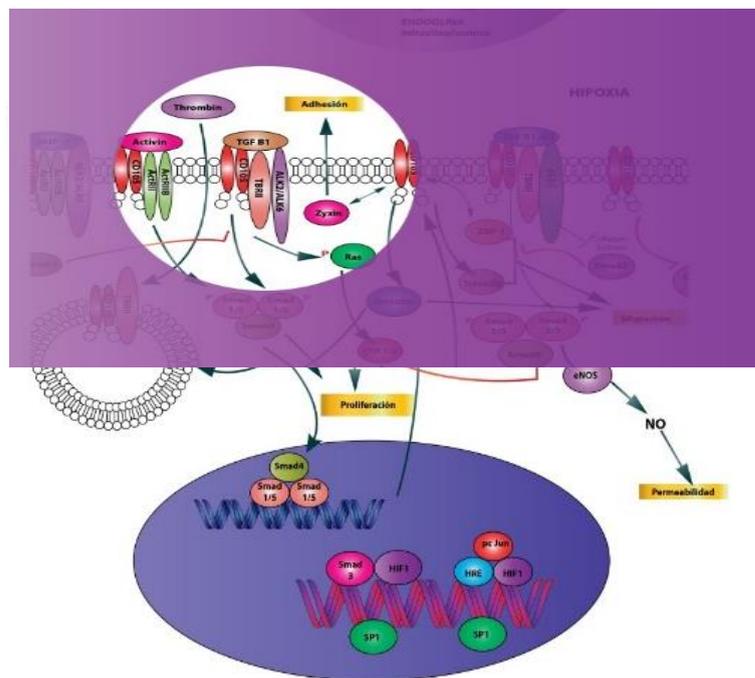


Fig. 16: Estructura de CD105 como receptor alternativo del TGF- β . **Propiedad del autor.**

4.4.3 Cyr61

Cyr61 es una proteína de matriz extracelular de unión a heparina rica en cisteína de 40 kDa que promueve la adhesión de las células endoteliales a través de la interacción con la integrina $\alpha v \beta 3$. Es considerada un inductor angiogénico que promueve el crecimiento tumoral.⁹⁹

Las respuestas genómicas a la estimulación de factores de crecimiento incluyen la activación de los receptores de genes inmediatos tempranos, que codifican proteínas que median los efectos biológicos de dichos factores.¹⁰⁰ Uno de estos genes inmediato-tempranos identificados en los fibroblastos es CYR61¹⁰¹, el cual promueve la adhesión y estimula la migración celular.¹⁰² La proteína CYR61 estimula la migración dirigida de células endoteliales mediante una vía dependiente de $\alpha v \beta 3$ induciendo angiogénesis.¹⁰¹

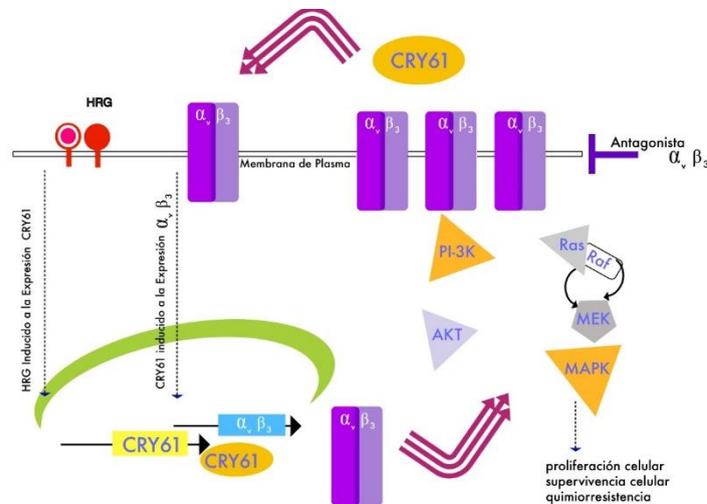


Fig. 17: a) Estructura de Cyr61 como proteína de matriz extracelular. Propiedad del autor

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Si bien es cierto que el parénquima neoplásico es el principal responsable de la invasión tumoral, consideramos que la neoformación vascular juega un papel fundamental y aún más importante que la misma capacidad de invasión de las células neoplásicas.

En neoplasias malignas de diferentes estirpes celulares con comportamiento agresivo se ha reportado que la MVD podría estar jugando un papel fundamental en el crecimiento y supervivencia de las células tumorales, además de favorecer el potencial metastásico.

La valoración histopatológica del grado de formación de nuevos vasos sanguíneos depende fundamentalmente, tanto del muestreo de la pieza quirúrgica como de la observación microscópica de la neoplasia por parte del patólogo, haciendo que los criterios utilizados puedan ser subjetivos. Dicha subjetividad lleva consigo una variabilidad en la interpretación de los criterios en cualquier escala de estadificación. También por ello, proponemos que la cuantificación de la MVD puede ser útil para disminuir la diferencia interobservador y crear conocimiento nuevo que posteriormente pueda ser aplicado en clínica.

6. JUSTIFICACIÓN

Las neoplasias malignas de glándulas salivales poseen una gran variedad histológica y un comportamiento biológico agresivo. Clínicamente estas entidades son de rápido crecimiento y producen invasión a zonas vecinas ocasionando un grave daño estructural con consecuentes defectos físicos. Histológicamente estos tumores presentan diferentes patrones celulares relacionados con el grado de agresividad, y en general, las neoplasias que presentan un patrón sólido o de mayor desdiferenciación llegan a comprometer la vida del individuo. La tasa de metástasis aproximada observada es del 50% y la supervivencia depende del estadio clínico y el grado de tumor.

La neoformación vascular es uno de los puntos clave para el crecimiento tumoral, por lo que ha sido estudiada en muchos tipos de neoplasias malignas con el fin de predecir su comportamiento biológico. Recientemente en países como Brasil, Irán y Francia se han realizado investigaciones en neoplasias de glándulas salivales que se enfocan a identificar el papel de la angiogénesis como factor predictor de metástasis y agresividad, sin embargo, por una parte, solo incluyen como neoplasias malignas al carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoideo quístico y carcinoma de células acinares, sin importar su grado histológico o localización; y por otra parte, solo se han enfocado a comparar la MVD en neoplasias malignas en comparación con las neoplasias benignas. Además, los anticuerpos utilizados en la mayoría de los estudios son CD31, CD34 Y VEGF los cuales no diferencian entre vasos preexistentes y vasos recién formados.

Debido a esto, nosotros proponemos estudiar el papel de la angiogénesis en el, crecimiento y capacidad metastásica tumoral de las neoplasias malignas que afectan más frecuentemente las glándulas salivales mayores, ya que hasta la fecha no se han realizado estudios que asocien el grado de desdiferenciación celular y la capacidad metastásica con el potencial de la neoplasia de formar nuevos vasos sanguíneos.

7. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la MVD en los diferentes tipos y grados histológicos de neoplasias malignas de glándulas salivales mayores?

8. HIPÓTESIS

La MVD se encuentra incrementada en las neoplasias malignas de glándula salival mayor con grado histológico alto.

9. OBJETIVOS.

9.1 Objetivo General

Determinar la MVD en las neoplasias malignas de glándulas salivales mayores de acuerdo a su tipo y grado histológico.

9.2Objetivos Específicos

- Evaluar la expresión del anticuerpo CD105, para establecer la MVD.
- Valorar la expresión del anticuerpo CD34, para establecer la MVD.
- Medir la expresión del anticuerpo Cyr61, para establecer la MVD.
- Analizar las diferencias de expresión entre los anticuerpos CD34, CD105 y Cyr61.
- Comparar la MVD entre las neoplasias malignas de glándula salival de bajo, intermedio y alto grado.

10. DISEÑO DEL ESTUDIO

10.1 **Tipo de estudio:** Es un estudio transversal observacional descriptivo, la selección de muestra se realizó por conveniencia.

10.2 **Universo de estudio:** Casos diagnosticados histopatológicamente como neoplasia maligna de glándula salival mayor en la base de datos del INCan y 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 período comprendido entre los años 2011-2015.

10.3 **Tamaño de la muestra:** La muestra utilizada correspondió a 60 casos, de los cuales 46 se obtuvieron del INCan y 14 del Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM. Fueron analizados microscópicamente por la tesista y la tutora para su confirmación diagnóstica, asegurando que se contara con suficientes áreas estromales así como con el tejido suficiente para ser procesado.

10.4 **Criterios de inclusión:** Todos los bloques de parafina correspondientes a tejido de glándula salival diagnosticados como neoplasia maligna y con suficiente muestra para ser procesada para H&E e inmunohistoquímica.

10.5 **Criterios de eliminación:** Casos en los que no se observó suficiente tejido estromal.

10.6 **Criterios de exclusión:** Bloques de parafina con escaso tejido o que no estaban en condiciones para realizar los procedimientos requeridos.

11. VARIABLES

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Categoría	Escala de medición
Densidad Microvascular. Dependiente	Método directo para evaluar la angiogénesis tumoral utilizando marcadores de inmunohistoquímica(*).	Se contarán las células positivas en tres zonas de mayor inmunorreacción o con tinción marrón intensa, (hot spots) utilizando cada uno de los inmunomarcadores CD34, CD105 y Cyr61. Las zonas se erigirán a 40x.	Número de vasos pequeños en un área tumoral de 0.74mm ² .	Cuantitativa discreta
Neoplasias malignas de glándulas salivales. Independiente	Enfermedad originada en las glándulas salivales en la que existen células anormales que proliferan sin control y que pueden invadir los tejidos cercanos o diseminarse hasta otras partes del cuerpo a través del torrente sanguíneo o por vía linfática(**).	Se estadificarán de acuerdo a la clasificación de la OMS del 2017, que las clasifica en bajo, intermedio y alto grado de acuerdo al patrón histológico, atipia celular, permeación linfovascular, invasión perineural, necrosis y mitosis aumentadas.	1- Bajo grado. 2. Grado intermedio. 3. Alto grado.	Cualitativa Ordinal

* 17. Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. American Journal of Pathology. 1995; 147(1): 9-19

**20. El-Naggar A, Chan J, Grandis J, Takata T, Slootweg P. IARC WHO Classification of Head and Neck Tumours. 2017; 9.

Tabla II: Variables del estudio. **Propiedad del autor.**

12. MATERIAL Y MÉTODO

12.1. Histoquímica

A los 14 casos obtenidos del Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial se les realizaron cortes histológicos a 5µm para un total de 4 laminillas por bloque; 1 laminilla para H&E y 3 para los diferentes anticuerpos en estudio. Se observaron al microscopio óptico Leica DM750 las laminillas teñidas con H&E para confirmar el diagnóstico de neoplasia maligna de glándula salival, determinar las zonas con mayor cantidad de estroma y realizar la estandarización tutora-alumna.

Se gradificarón histopatológicamente las lesiones con el fin de clasificar a las neoplasias en bajo, intermedio y alto grado. Para este fin se utilizaron tablas de recolección de datos por cada una de las lesiones a estudiar basados en la clasificación de la OMS 2017. (Tabla 3)

Criterios de Clasificación: Carcinoma Mucoepidermoide									
Caso	Grado	Localización	Metástasis	Patrón hx	Células que predominan	Invasión vascular	Invasión perineural	# mitosis por 10 campos hp	Anaplasia Necrosis
Número de caso	1. Bajo grado 2 Grado intermedio 3 Grado alto	1 Parótida Submandibula 3 Sublingual	1 Local 2 A distancia	1 Quístico 2 Sólido	1 Mucosas 2 Intermedios 3 Epidermoides	1 Presente 2 Ausente	1 Presente 2 Ausente	1 Menos de 4. 2 Más de 4.	1 Presente 2 Ausente

Tabla III: Ejemplo de tabla de recolección de datos para la clasificación del carcinoma mucoepidermoide. **Propiedad del autor**

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

12.2. Inmunohistoquímica (IHQ)

Los cortes histológicos de la muestra del INCan se obtuvieron mediante la técnica de microarreglos de tejidos donde cada laminilla contenía 23 casos, obteniéndose 2 laminillas para realizar inmunohistoquímica para cada uno de los anticuerpos. Previo a la realización de la técnica de IHQ, se recibió entrenamiento y se estandarizó la técnica para cada anticuerpo y se determinó la dilución a utilizar para ellos. Se estableció una dilución 1:800 para Cyr61 y una dilución de 1:600 para CD34 y CD105.

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

Se realizaron 3 lavados con Buffer de fosfato (PBS) por 3 minutos cada uno y se inhibió la actividad de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% incubándolo durante 20 minutos en cámara húmeda; y transcurrido el tiempo se hicieron 3 lavados de PBS por 3 minutos más. Se delimitó la muestra con lápiz hidrofóbico y enseguida se permeabilizó con Tritón-X10 al 0.2% durante 20 minutos. Se lavó nuevamente con PBS 3 veces durante otros 3 minutos. Posteriormente se realizó el bloqueo del marcaje inespecífico con PBS-albúmina al 0.2% durante 20 minutos en cámara húmeda y se realizaron 3 lavados de PBS de 3 minutos. Se colocaron los anticuerpos primarios CD34, Cyr61 y CD105 marca Santa Cruz @Biotechnology, esta operación se realizó por separado para cada uno de los anticuerpos.

Después de la incubación con el anticuerpo primario se realizaron 3 lavados de 3 minutos para colocar el anticuerpo secundario anti-mouse/rabbit en cámara húmeda por 20 minutos a temperatura ambiente seguido de 3 lavados en PBS de 3 minutos cada uno. Se prosiguió a la incubación de la peroxidasa de rábano (HRP) en cámara húmeda por 10 minutos seguido de 3

lavados con PBS de 3 minutos. Se empleó diaminobencidina (DAB) como cromógeno y se colocó a cada tejido durante 3 minutos. Después de aplicar el cromógeno se lavaron las laminillas con agua corriente, se dejaron en agua destilada desionizada durante 1 minuto. Se realizó la contratinción con hematoxilina de Mayers durante 10 minutos y posteriormente se lavaron con agua corriente. Se realizó la deshidratación de los tejidos con alcoholes de diferentes concentraciones y xilol para realizar el montaje con resina hidrofóbica.

Se utilizaron controles positivos y negativos; como control positivo de CD34 se utilizó placenta, para CD105 riñon y para Cyr61 hígado humano. El control negativo se obtuvo por la omisión del anticuerpo primario sustituido por PBS en los tejidos anteriores (Tabla IV).

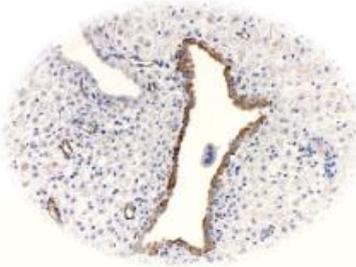
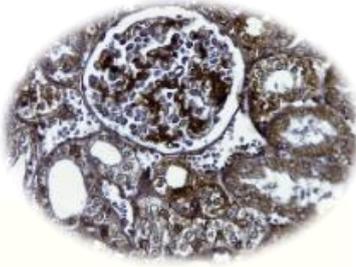
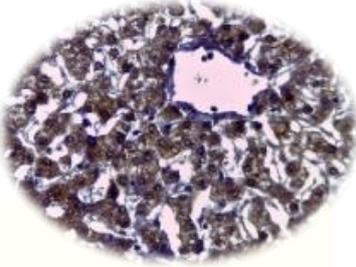
Anticuerpos			
	CD34	CD105	Cyr61
			
Control +	Placenta	Riñón	Hígado
Dilución	1:200	1:200	1:400
Clona	SC-19587 Mouse monoclonal IgG ₃	SC-20632 Rabbit polyclonal IgG	SC-13100 Rabbit polyclonal IgG <small>*Tejido humano. Santa Cruz®Biotechnology</small>

Tabla IV: Controles positivos, diluciones y clonas de cada anticuerpo. **Propiedad del autor**

12.3 Análisis de inmunoexpresión

Para evaluar la expresión inmunohistoquímica y debido a las diferentes técnicas metodológicas utilizadas para la obtención de muestras tanto en los casos del INCan como en los del Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial; el análisis de imágenes se realizó mediante 2 sistemas, Aperio ImageScope para los microarreglos de tejidos y Leica Las-Ez para los cortes histológicos cuyo procedimiento se menciona a continuación.

Se tomaron fotografías de los casos del Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial con el programa Leica Las-Ez versión 3.2.0. Se seleccionaron los campos de mayor inmunoreacción a 40 aumentos y se volvieron a tomar fotografías a 200 aumentos para realizar el conteo vascular. Mientras que de los casos del INCan se obtuvieron fotografías con el sistema Aperio ImageScope y de igual forma se seleccionaron los campos de mayor inmunoreacción a 40 aumentos y posteriormente se tomaron fotografías para realizar el conteo vascular a 200 aumentos.

Las fotografías fueron analizadas con el software ACDSee 10 Photo Manager colocándoles una cuadrícula de medición en donde cada 0.025cm correspondía a una micra, esto se realizó con el fin de hacer una medición vascular cuantitativa objetiva. Una vez colocada la cuadrícula se procedió a la cuantificación vascular con ayuda del software ImageJ® versión 1.46 previamente calibrado. Se realizó el conteo de vasos teñidos de color marrón por medio de la herramienta "Multi point". Se procedió a convertir las fotografías a escala de grises y cambio de pixelaje a 2.0 obteniendo las densidades ópticas. En la figura 18 se muestran las imágenes y la secuencia metodológica diseñada y utilizada en este estudio.

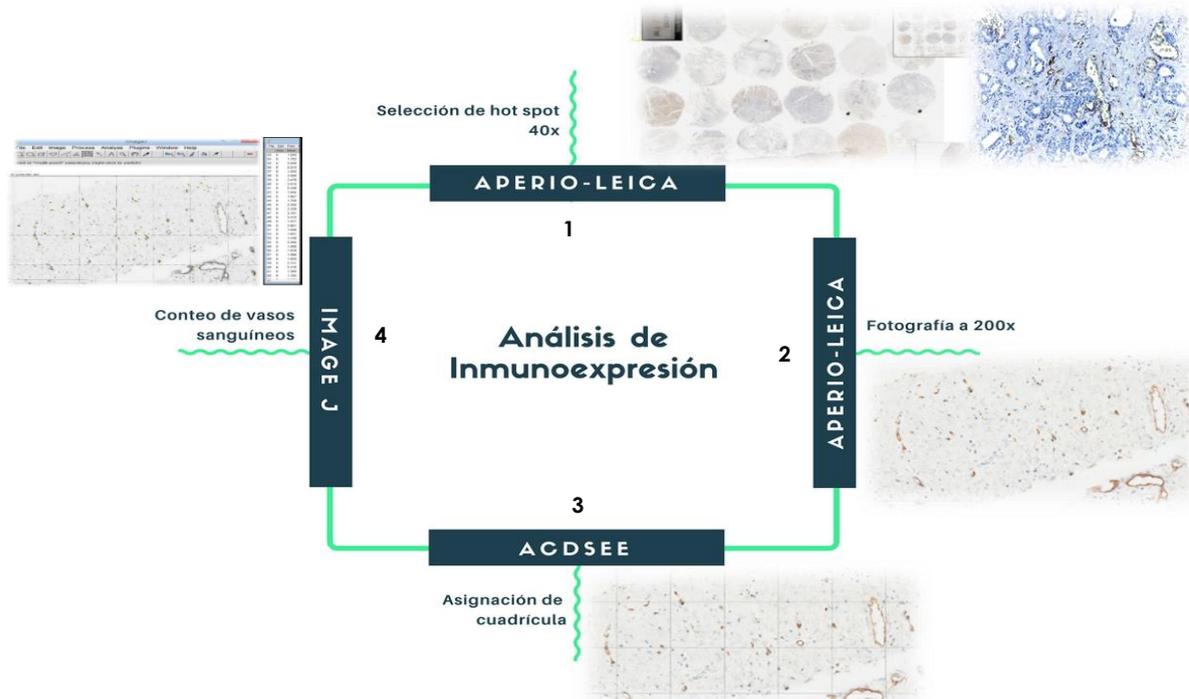


Fig18. Imagen que muestra el procedimiento realizado para la cuantificación vascular.

12.4 Análisis estadístico

Para la cuantificación de vasos sanguíneos, se utilizó mediana como medida de tendencia central y rango intercuartilar como medida de dispersión. Se realizó análisis estadístico no paramétrico Kruskal- Wallis con pruebas post hoc U de Mann Withney y Dunn para determinar la diferencia en la cuantificación entre los grados histológicos bajo, intermedio y alto de las neoplasias así como para comparar los distintos valores obtenidos con cada anticuerpo. El software que se utilizó para el análisis de los datos fue SPSS Statistics Versión 22 y para la obtención de gráficas GraphPad Prism5 versión 5.04.

13. RESULTADOS

Para este estudio se seleccionaron 60 casos que cumplieron con los criterios de inclusión, 46 del INCan y 14 del Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial UNAM. De ellos, 37 (61.6%) correspondieron al género femenino y 23 (38.4%) al masculino. La edad promedio de los pacientes en el total de la muestra fue de 53 años \pm 16.51. La glándula salival afectada con mayor frecuencia fue la parótida en 51 casos (83%), seguida por la submandibular en 8 casos (15%) y la sublingual en 1 caso (2%). El tamaño promedio reportado en los casos del INCan fue de 5.15 cm \pm 2.85. De los 11 casos registrados en el INCan que reportaron metástasis, 7 casos (63.3%) presentaron metástasis vía sistémica, siendo los órganos afectados pulmón en 3 casos (43%), hígado en 1 caso (14%), huesos en 1 caso (14%) y diseminada en 2 casos (29%). Reportaron metástasis regional 4 casos (36.7%), afectando la piel en 2 casos (50%), tejidos blandos en 1 caso (25%) y ganglios linfáticos en 1 caso (25%). La supervivencia de los pacientes 5 años fue del 58%. Los casos del Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial no reportaron datos de metástasis o de supervivencia.

13.1. Diagnóstico histopatológico

De los 60 casos revisados con microscopia fotónica de campo claro, 21 se diagnosticaron como carcinomas mucoepidermoides, 16 carcinomas adenoideos quísticos, 5 carcinomas de células acinares, 5 carcinomas ductales, 5 carcinomas mioepiteliales, 4 carcinomas epiteliales-mioepiteliales, 3 adenocarcinomas NOS y un adenocarcinoma de células basales. De acuerdo a los criterios de gradificación de la OMS⁵⁸ y para fines de este estudio, 18(30%) se diagnosticaron como neoplasias malignas de bajo grado, 20(33%) como neoplasias malignas de grado intermedio y 22(37%) de alto grado independientemente del subtipo histológico. (Tabla V)

	CME	CAQ	CCA	CD	CM	CEM	NOS	ACB
BAJO GRADO	6	1	4	0	1	3	2	1
GRADO INTERMEDIO	9	10	0	0	0	0	1	0
ALTO GRADO	6	5	1	5	4	1	0	0

CME: Carcinoma mucoepidermoide, CAQ: Carcinoma adenoideo quístico, CCA: Carcinoma de células acinares, CD: Carcinoma ductal, CM: Carcinoma mioepitelial, CEM: Carcinoma epitelial-mioepitelial, NOS: Adenocarcinoma NOS, ACB: Adenocarcinoma de células basales.

Tabla V: Clasificación de las lesiones en estudio de acuerdo a la clasificación de la OMS.

Análisis inmunohistoquímico

Para efectuar la cuantificación vascular, se consideró tinción positiva cuando se presentó marcaje tanto a nivel membranar como en citoplasma de las células endoteliales utilizando cualquiera de los 3 anticuerpos. Se contaron como vasos sanguíneos las células endoteliales positivas aun cuando no presentarán lumen. El número de vasos cuantificados con el anticuerpo CD34 en las neoplasias de bajo grado fue de 96 (60-132), en las de grado intermedio de 221 (112-330) y en las de alto grado 566(303-825). Con el anticuerpo CD105 la mediana de vasos cuantificados en las neoplasias malignas de bajo grado fue de 27(14-40), en las de grado intermedio de 146 (106-190) y en las de alto grado 197(100-294). Mientras que con el anticuerpo Cyr61 la cuantificación de vasos en las neoplasias malignas de bajo grado fue de 25(12-38), en las de grado intermedio 45(34-58) y en las de alto grado 70 (29-110). (Tabla VI)

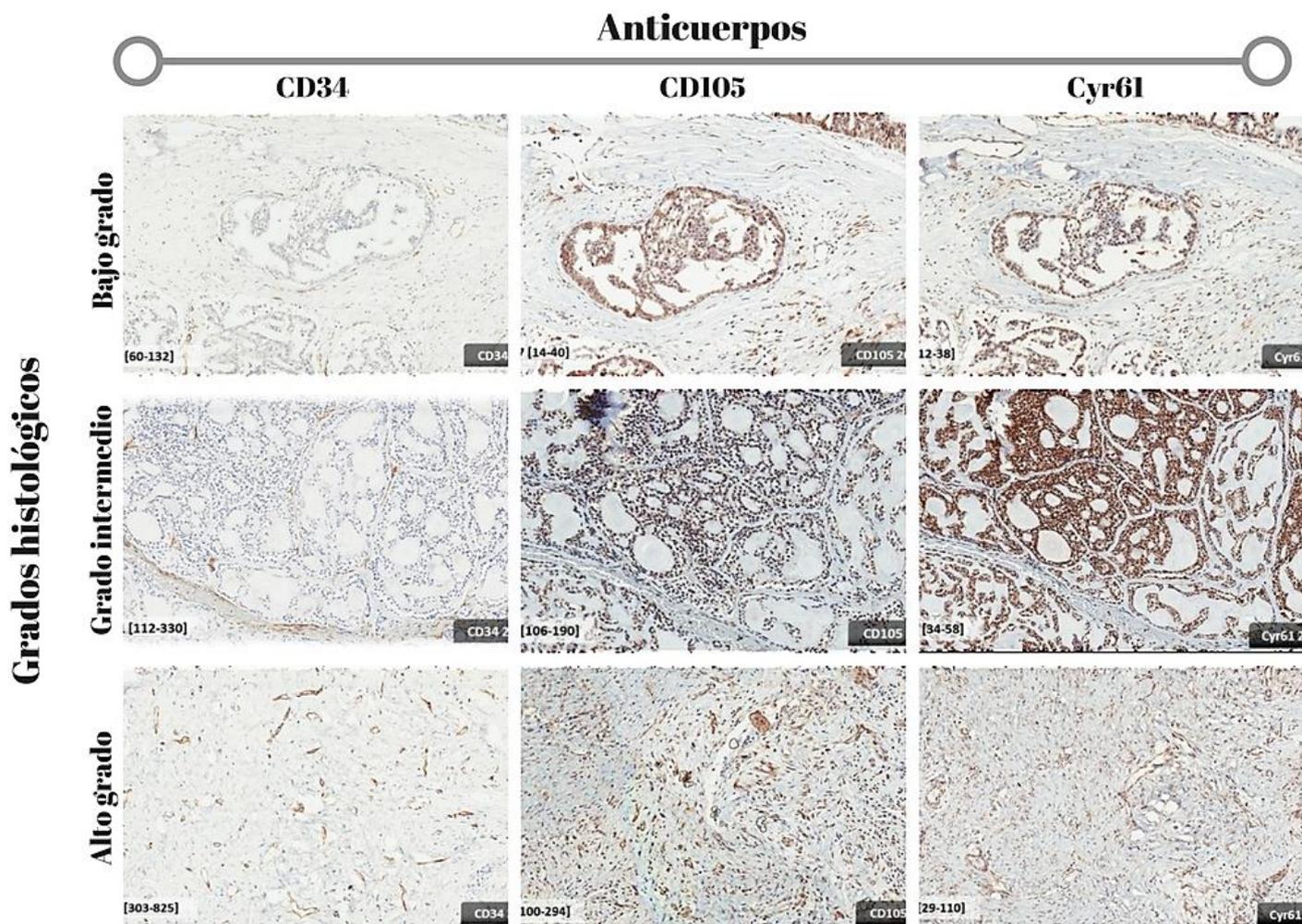


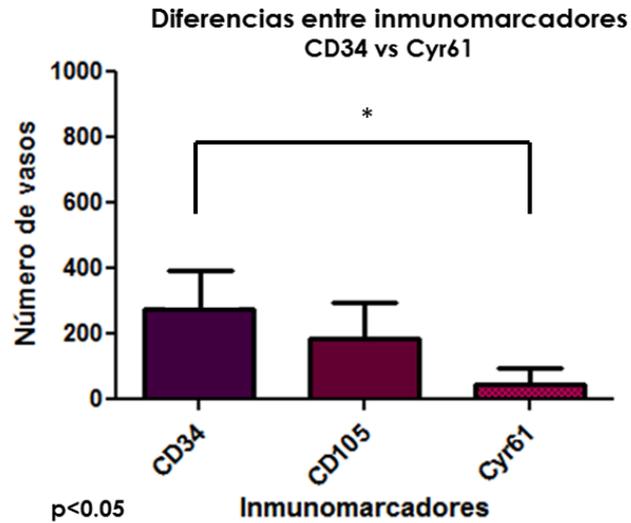
Fig. 19: Inmunoeexpresión citoplasmática y membranar de los diferentes anticuerpos en neoplasias malignas de glándula salival: Bajo grado (Adenocarcinoma NOS), Grado intermedio (Carcinoma adenoideo quístico) y Alto grado (Carcinoma mucoepidermoide).

Grado Histológico			
Anticuerpo	Bajo grado.	Grado intermedio.	Alto grado.
CD34.	96 (60-132).	221 (112-330).	566 (303-825).
CD105.	27 (14-40).	146 (106-190).	197 (100-294).
Cyr61.	25 (12-38).	45 (34-58).	70 (29-110).

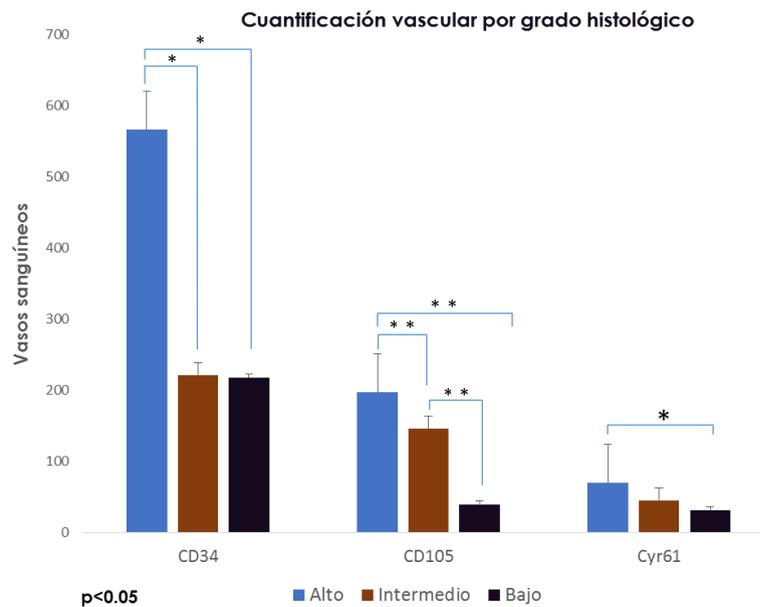
Tabla VI: Medianas y rango intercuartilar obtenidas de acuerdo al grado histológico I con los diferentes anticuerpos.

Al realizar el análisis estadístico con la prueba Kruskal-Wallis, encontramos una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la cuantificación vascular utilizando CD34 en comparación del marcador Cyr61. No se encontraron diferencias significativas entre el uso de CD105 en comparación de CD34 y Cyr61 (Gráfica 2).

Con la prueba de Dunnn para comparación entre grupos, CD34 presento diferencias significativas entre la cuantificación de los vasos en las neoplasias de alto grado en comparación con las de intermedio y bajo grado ($p < 0.05$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las neoplasias de intermedio y bajo grado. Con CD105 se encontraron diferencias significativas en el conteo vascular entre los tres diferentes grados histológicos ($p < 0.05$). Por último, para Cyr61 solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las neoplasias de alto y bajo grado así como entre las neoplasia de bajo grado y grado intermedio ($P < 0.05$). No se encontraron diferencias significativas entre las neoplasias de grado intermedio y alto para Cyr61 (Gráfica 3).



Grafica 2: Se muestra una diferencia estadísticamente significativa entre la cuantificación de la vascularidad con el anticuerpo CD34 en comparación con Cyr61. La cuantificación vascular con CD34 y CD105 fue similar.



Grafica 3: Existió una diferencia estadísticamente significativa entre la vascularidad de las neoplasias de alto grado en comparación con las de grado intermedio y bajo grado utilizando el anticuerpo CD105.

14. DISCUSIÓN

Las neoplasias de glándulas salivales comprenden un grupo morfológicamente heterogéneo, debido al potencial de las glándulas para desarrollar tumores de cualquiera de las estructuras que conforman su unidad secretora e inclusive su estroma. El comportamiento agresivo e impredecible de este tipo de neoplasias, reiteran la necesidad de un diagnóstico adecuado que impacte directamente en el pronóstico y calidad de vida de los pacientes. La angiogénesis es un proceso de formación de nuevos vasos a partir de la vasculatura preexistente y que se considera un marcador distintivo del desarrollo del cáncer.⁷⁸ Existen investigaciones que relacionan el crecimiento y capacidad metastásica en tumores sólidos, con la capacidad angiogénica promovida por las células. Dicha capacidad es evaluada de forma directa por la MVD y se ha demostrado ser capaz de discriminar entre neoplasias de glándulas salivales benignas y malignas.¹

Tadbir y cols. evaluaron la posible asociación entre angiogénesis usando el anticuerpo CD105, y la proliferación celular usando Ki-67 en 20 casos de adenoma pleomorfo, 20 de carcinoma mucoepidermoide y 19 de carcinoma adenoideo quístico. Como control utilizaron glándula salival normal. Ellos encontraron que el tejido glandular normal era negativo para CD105, mientras que el 51.6% de las neoplasias examinadas eran CD105 positivas. Dicha positividad fue significativamente mayor en las neoplasias malignas en comparación con las benignas. Además reportaron que los casos de carcinoma mucoepidermoide mostraron mayor inmunoreacción que los de carcinoma adenoideo quístico. El índice de proliferación celular medido por la positividad con el anticuerpo Ki-67 también se encontró incrementado en las neoplasias malignas en comparación con las benignas, aunque no encontraron una correlación significativa entre la MVD y la proliferación celular.⁹ Nosotros encontramos una fuerte positividad de los anticuerpos CD105 y Cyr61 en tejido de glándula salival normal; mientras que CD105 mostro fuerte positividad en el parénquima glandular normal, Cyr61 fue positivo tanto en el parénquima como en el estroma, lo que dificulto la cuantificación vascular en algunas neoplasias. Esto puede ser relacionado a que Cyr61 es una proteína de matriz extracelular que reacciona no solo en vasos sanguíneos recién formados, sino también en diversos blancos tisulares, lo que la hace inespecífica para la cuantificación vascular.

Cardoso et al. evaluaron las MVD intratumoral en 139 casos de neoplasias de glándulas salivales benignas y malignas de diferentes subtipos histológicos utilizando el anticuerpo CD105. Su muestra correspondió a 29 adenomas pleomorfos, 51 carcinomas adenoideos quísticos, 51 adenocarcinomas polimorfos de bajo grado y 40 carcinomas mucoepidermoides. Observaron que la angiogénesis fue mayor en neoplasias malignas que en benignas, y fue significativamente mayor

en el carcinoma mucoepidermoide en comparación del carcinoma adenoideo quístico y el adenocarcinoma polimorfo de bajo grado.¹⁰⁴ Nosotros encontramos que la MVD utilizando el anticuerpo CD105 fue mayor en neoplasias de alto grado, al compararlas con las de grado intermedio y bajo grado sin importar los subtipos histológicos examinados. Aun cuando nuestra muestra fue heterogénea e incluyó una gran variedad histológica de neoplasias malignas de glándulas salivales, obtuvimos una cuantificación significativamente mayor en las neoplasias más agresivas o de alto grado en comparación con las de subtipo histológico menos agresivo. Además el hecho de que la MVD se incrementa en las neoplasias malignas en comparación con las benignas en los estudios mencionados, podría indicar que la angiogénesis contribuye o refleja la agresividad en las neoplasias de glándulas salivales.

En otro estudio realizado en 82 neoplasias malignas de glándulas salivales encontraron una diferencia significativamente mayor entre la MVD medida con CD34 y CD105 en las regiones intratumorales en comparación de las áreas peritumorales.¹⁰⁵ Nosotros en este estudio evaluamos las áreas peritumorales en los casos de neoplasias malignas tomando en consideración que en las áreas intratumorales se encuentran habitualmente los vasos que suministraban al tejido para darle nutrición y que se encuentran presentes de forma previa a la formación neoplásica. El hecho de evaluar estas áreas podría resultar en falsos positivos en cuanto a la medición de la actividad angiogénica, ya que la MVD siempre se encontraría significativamente incrementada en estas zonas en comparación de las áreas peritumorales.

Dhanuthai y cols. demostraron que el anticuerpo CD105 fue más eficaz que otros marcadores panendoteliales como CD31 o CD34 para diferenciar a las neoplasias malignas de las benignas. Ellos analizaron la MVD en 2 lesiones benignas: 21 adenomas pleomorfos, 2 cistadenomas papilar linfomatosos y 2 malignas: 8 carcinomas mucoepidermoides y 9 carcinomas adenoideos quísticos. Reportaron que la MVD con el anticuerpo CD31 fue mayor que con el anticuerpo CD105. No se demostró diferencia estadísticamente significativa entre la MVD de las neoplasias benignas y malignas utilizando CD31; mientras que con el anticuerpo CD105 si se alcanzó un nivel de significancia entre ambos tipos de neoplasias¹⁰⁶ Estos resultados son similares a los obtenidos en nuestro estudio, ya que se demostró una mayor MVD utilizando el marcador panendotelial CD34 en comparación de los anticuerpos CD105 y Cyr61. La mayor diferencia estadística se encontró al comparar la cuantificación entre CD34 y Cyr61. La explicación a estos resultados puede deberse en primer lugar, a que CD34 es una glicoproteína constitutiva de la superficie de la célula endotelial que se expresa tanto en vasos preexistentes como en vasos recién formados; con lo cual, la cuantificación vascular podría verse incrementada; y en segundo lugar, a que se ha demostrado

que CD105 y Cy61 son anticuerpos expresados solo en las vasos sanguíneos recién formados, lo que explicaría la disminución del número de vasos en la MVD en las neoplasias malignas. Además, al igual que en el estudio de Dhanuthai y cols, en este trabajo consideramos que el anticuerpo más útil es CD105 puesto que mostro una diferencia estadísticamente significativa al comparar neoplasias de alto, intermedio y bajo grado. CD34 sólo presento diferencias significativas entre la cuantificación de neoplasias de alto grado en comparación con las de intermedio y bajo grado, pero no mostro significancia entre las neoplasias de intermedio y bajo grado. Por último Cyr61 no mostro diferencias significativas entre las neoplasias de intermedio y alto grado de malignidad.

En cuanto a la relación de la MVD con el grado histológico de las neoplasias malignas de glándulas salivales, Yang y cols. realizaron una comparación de la cuantificación vascular en los diferentes patrones histológicos del carcinoma adenoideo quístico. ¹⁰⁷ Ellos reportaron un incremento significativo de la MVD en el patrón sólido que corresponde a un alto grado, en comparación de los patrones tubular y cribiforme que corresponden a neoplasias de intermedio y bajo grado respectivamente. Nuestros resultados son similares, ya que independientemente del tipo de neoplasia maligna, observamos que las neoplasias con un patrón histológico de alto grado presentaron mayor cuantificación vascular. Aunado a esto pudimos identificar que las neoplasias que reportaron mayor MVD correspondían a los casos que presentaron metástasis regionales y a distancia; estos resultados pueden relacionarse con un estudio realizado por Zhang y cols. quienes vincularon la MVD medida con CD34, con el estadio clínico, tamaño tumoral, invasión vascular, recurrencia y metástasis, concluyendo que la MVD tuvo un efecto pronóstico independiente para la supervivencia global de los pacientes. ¹⁰⁸

Aun cuando la expresión del anticuerpo Cyr61 se ha evaluado en carcinomas adenoideos quísticos y se ha correlacionado con la expresión de Ki67¹⁰⁹ asociando su sobreexpresión a neoplasias con subtipos sólidos, invasión perineural y vascular, estadio avanzado de la enfermedad, recurrencia y metástasis a distancia; los resultados obtenidos en nuestro estudio indican que dicho anticuerpo no mostro ser eficaz para evaluar la MVD. Al ser una proteína de la matriz extracelular y mostrar positividad para diferentes blancos celulares, las imágenes obtenidas no fueron representativas debido a la falta de especificidad.

Estos resultados ponen en manifiesto el papel fundamental que desempeña la angiogénesis en la agresividad y progresión tumoral. Las diferencias encontradas en los datos de nuestro estudio en comparación con otras investigaciones pueden deberse a las diversas metodologías utilizadas. La explicación a dichas diferencias podría ser la elección de múltiples tipos de anticuerpos, los

parámetros que definen su positividad, la elección de hot spots, el uso de distintas medidas de tendencia central y diseños estadísticos, el número pequeño y heterogeneidad de la muestra.

15. CONCLUSIONES

- La MVD es capaz de discriminar entre neoplasias malignas de alto, intermedio y bajo grado independientemente del subtipo histológico que presenten, debido a que la cuantificación vascular es directamente proporcional al grado de las neoplasias malignas de glándulas salivales mayores.
- La MVD se encontró incrementada con el anticuerpo CD34 en comparación a CD105 y Cyr61. Estos datos se deben a que es una glicoproteína constitutiva de la superficie de la célula endotelial y por lo tanto es positiva tanto en los vasos preexistentes como en los vasos recién formados.
- El anticuerpo CD105 fue el más útil para evaluar la MVD debido a que mostro diferencias estadísticamente significativas al comparar neoplasias de alto, intermedio y bajo grado. Además posee la ventaja de reconocer sólo vasos recién formados en comparación con otros marcadores endoteliales.
- Debido a la naturaleza del anticuerpo Cyr61, éste demostró ser inespecífico para evidenciar actividad angiogénica.

Perspectivas futuras:

Incrementar el tamaño de la muestra, analizar la utilidad de los anticuerpos en estudio en otras lesiones de glándula salival, realizar el estudio en piezas quirúrgicas completas para elegir las zonas representativas o específicas de neoformación vascular y reconsiderar la utilidad de Cyr61 como marcador angiogénico debido a su inespecificidad. Además realizar investigaciones futuras donde se evalué el papel de los cambios epigenéticos en la manifestación y agresividad de éste tipo de neoplasias.

16. BIBLIOGRAFÍA

1. Teocharis S, Gribilas G, Giangis C. Angiogenesis in salivary gland tumours: from clinical significance to treatment. *Expert Opin Targets*. 2015; 19(6): 807-19.
2. Yoo SY, Kwon SM. Angiogenesis and its therapeutic opportunities. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013: 127179.
3. Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *American Journal of Pathology*. 1995; 147(1): 9-19.
4. Weidner N, Semple J, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma. *Eng J Med*. 1991; 324(1): 1-8.
5. Cwiklinska A, Sobstyl M, Kwasniewski W. Microtissue density prognostic factor evaluation based on antigens CD34 and CD105 in ovarian cancer patients. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2013; 4: 838-842.
6. Moghadam SA, Abadi AM, Mokhtari S. Immunohistochemical analysis of CD34 expression in salivary gland tumors. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2015; 19(1): 30-3.
7. Fonseca FP, Basso MP, Marianor V, Kowalski LP. Vascular endothelial growth factor immunoexpression is increased in malignant salivary gland tumours. *Ann Diagn Pathol*. 2015; 19(13): 169-74
8. Margaritescu C, Munteaby MC, Miteiscu MC. Acinic cell carcinoma of the salivary gland: an immunohistochemical study of angiogenesis in 12 cases. *Rom J Morphol Embryol*. 2013; 34(2): 275-84.
9. Tadbir A, Pardis S, Adhkavandi Z. Expression of Ki67 and CD105 as proliferation and angiogenesis markers in salivary gland tumors. *Asian Pac J. Cancer Prev*. 2012; 13 (10): 5155-5159.
10. Dhanuthai K, Sappayatosok K, Yodsangas. An analysis of microvessel density in salivary gland tumours: a single centre study. *Surgeon*. 2013; 11(3):147-52
11. Gleber-Netto, Florencio TN, de Sousa SF. Angiogenesis and lymphangiogenesis in mucoepidermoide carcinoma of minor salivary glands. *J Oral Pathol Med*. 2012; 41 (8): 603-609.
12. Mills SE. *Histology for Pathologists*. 3rd ed. Virginia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
13. Bloom W, Fawcett DW. *A textbook of histology*. 11th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1986.
14. Hu Mc, Rosenblum N. Genetic regulation of branching morphogenesis lessons learned from loss-of-function phenotypes. *Pediatr Res*. 2003; 54: 433-438.
15. Takano K, Malamud D, Bennick A, Oppenheim F, Hand AR. Localization of salivary proteins in granules of human parotid and submandibular acinar cells. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993.

16. Gómez de Ferraris ME, Campos Muñoz A. *Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental*. 3ed. México: Editorial Médica Panamericana; 2009.
17. Reitamo S, Konttinen YT, Segerberg-Konttinen M. Distribution of lactoferrin in human salivary glands. *Histochemistry*. 1980; 66:285-291.
18. Xu L, Lal K, Santarpia RP III, Pollock JJ. Salivary proteolysis of histidine-rich polypeptides and the antifungal activity of peptide degradation products. *Arch Oral Biol*. 1993; 38: 277-283.
19. Quintarelli G. Histochemical identification of salivary mucins. *Ann N y Acad Sci*. 1963; 106: 339-363.
20. Reddy MS, Bobek LA, Haraszthy GG, Biersbrock AR, Levine MJ. Structural features of the low-molecular-mass human salivary mucin. *Biochem J*. 1992; 287(2): 639-643.
21. Seifert GA, Miehke A, Haubrich J, Chilla R. *Diseases of the Salivary Glands: Pathology, Diagnosis, Treatment, Facial Nerve Surgery*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1986.
22. Scott BL, Pease DC. Electron microscopy of the salivary and lacrimal glands of the rat. *Am J Anat* 1959;104: 115-161.
23. Tandler B. Ultrastructure of the human submaxillary gland. I. Architecture and histological relationships of the secretory cells. *Am J Anat* 1962; 111: 287-307.
24. Tandler B, Denning CR, Mandel ID, Kutscher AH. Ultrastructure of human labial glands. III. Myoepithelium and ducts. *J Morphol* 1970; 130: 227-246.
25. Bloom W, Fawcett DW. *A Textbook of Histology*. 11th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1986.
26. Riva A, Serra GP, Proto E, Faa G, Puxeddu R, Riva FT. The myoepithelial and basal cells of ducts of human major salivary glands: a SEM study. *Arch Hisyol Cytol*. 1992; 55: 115-124.
27. Burns BF, Dardick I, Parks WR. Intermediate filament expression in normal parotid glands and in pleomorphic adenomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*.1988; 413:103-112.
28. Tandler B, Denning CR, Mandel ID, Kutscher AH. Ultrastructure of human labial glands. III. Myoepithelium and ducts. *J Morphol*. 1970; 130: 227-246.
29. Tamerin A. Submaxillary gland recovery from obstruction II. Electron microscopic alterations of acinar cells. *J Ultrastruct Res*. 1971; 34: 288-302.
30. Norberg L, Dardick I, Leung R, Burford-Mason AP, Rippstein P. Immunogold localization of actin and cytokeratin filaments in myoepithelium of human parotid salivary gland. *Ultrastruct Pathol*. 1992; 16: 555-568.
31. Azumi N, Battifora H. The cellular composition of adenoid cystic carcinoma. An immunohistochemical study. *Cancer*. 1987;.60:1589-1598.
32. Kallioinen M. Immunoelectron microscope demonstration of the basement membrane components laminin and type IV collagen in the dermal cylindroma. *J Pathol*. 1985; 147: 97-102.

33. Takano K, Malamud D, Bennick A, Oppenheim F, Hand AR. Localization of salivary proteins in granules of human parotid and submandibular acinar cells. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993;4: 399-405.
34. Lee SK, Hwang Jo, Chi JG, Yamada K, Mori M. Prenatal development of myoepithelial cell of human submandibular gland observed by immunohistochemistry of smooth muscle actin and rhodamine-phalloidin fluorescence. *Pathol Res Pract.* 1993; 189: 332-341.
35. Adi MM, Chisholm DM, Waterhouse JP. Stereological and immunohistochemical study of development of human fetal labial salivary glands and their S-100 protein reactivity. *J Oral Pathol Med.* 1994; 23: 36-40.
36. Lee SK, Kim EC, Chi JG, Hashimura K, Mori M. Immunohistochemical detection of S-100, S-100 alpha, S-100 beta proteins, glial fibrillary acidic protein, and neuron specific enolase in the prenatal and adult human salivary glands. *Pathol Res Pract.* 1993; 189: 1036-1043.
37. Line SE, Archer FL. The postnatal development of myoepithelial cell in the rat submandibular gland. An immunohistochemical study. *Virchows Arch B Cell Pathol.* 1972; 10: 253-262.
38. Gresik EW. Postnatal developmental changes in submandibular glands of rats and mice. *J Histochem Cytochem.* 1980; 28: 860-870.
39. Strum JM. Unusual peroxidase-positive granules in the developing rat submaxillary gland. *J Cell Biol.* 1971; 51: 575-579.
40. Yamashina S, Barka T. Localization of peroxidase activity in the developing submandibular gland of normal and isoproterenol-treated rats. *J Histochem Cytochem.* 1972; 20: 855-872.
41. Testut L. *Traité d'Anatomie Humaine.* Paris: Octave Doin; 1931.
42. Gray H, Gross CM, eds. *Gray's Anatomy of the Human Body.* 29th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1973.
43. Hamilton WJ, Boyd JD, Mossman HW. *Human Embryology, Prenatal Development of Form and Function.* London: Williams & Wilkins; 1972.
44. Evans RW, Cruickshank AH. *Epithelial Tumors of the Salivary Glands.* Philadelphia: WB Saunders; 1970.
45. Sakai T, Larsen M, Yamada KM. Fibronectin requirement in branching morphogenesis. *Nature.* 2003; 423: 876-881.
46. Testut L. *Traité d'Anatomie Humaine.* Paris: Octave Doin; 1931.
47. Gray H, Gross CM, eds. *Gray's Anatomy of the Human Body.* 29th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1973.
48. Politi M, Toro C, Zerman N. Myoepithelioma of the parotid gland: Case report and review of literature. *Oral Oncology Elsevier.* 2005; 41: 104-108.

49. Dardick I, Bireck C, Lingen M, Rowe PE. Differentiation and the cytomorphology of salivary gland tumors with specific reference to oncocytic metaplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999; 88:691-701.
50. Thackray AC, Lucas RB. Tumors of the major salivary glands. In: *Atlas of Tumor Pathology, Series 2, Fascicle 10.* Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology. 1974:11-14
51. Eversole LR. Histogenetic classification of salivary tumors. *Arch Pathol.* 1971; 92: 433-443.
52. Batsakis JG. Salivary gland neoplasia: an outcome of modified morphogenesis and cytodifferentiation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1980; 49: 229-232.
53. Dardick I, Burford-Mason AP. Current status of the histogenetic and morphogenetic concepts of salivary gland tumorigenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993 4: 639-677.
54. Dardick I, van Nostrand AW, Jeans MT, Rippstein P, Edwards V. Pleomorphic adenoma. II. Ultrastructural organization of a stromal regions. *Hum Pathol.* 1983; 14: 798-809.
55. Shear M. The structure and function of myoepithelial cells in salivary glands. *Arch Oral Biol.* 1966; 11: 769-780.
56. Palmer RM. Epithelial-myoepithelial carcinoma: an immunocytochemical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985; 59: 511-515.
57. Nico, Benagiano, Mangieri, Maruotti, Vacca. Evaluation of microvascular density tumors: pro and contra. *Histology and Histopathology.* 2008; 23: 601-607
58. El-Naggar A, Chan J, Grandis J, Takata T, Slootweg P. IARC WHO Classification of Head and Neck Tumours. 2017; 9.
59. Cheuk W. Advances in salivary gland pathology. *Histopathology.* 2007; 51 (1): 1-20.
60. Do Prado RF. Calcifications in a clear cell mucoepidermoid carcinoma: a case report with histological and immunohistochemical findings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 105 (5): e40-44.
61. Barnes L. *Pathology of the head and neck: volume 1.* 3^oed. Pennsylvania: Informa health care; 2008: pág 475.
62. Triantafillidou K. Mucoepidermoid carcinoma of minor salivary glands: a clinical study of 16 cases and review of the literature. *Oral Dis.* 2006; 12 (4): 364-370.
63. Haddad R. Herceptin in patients with advanced or metastatic salivary gland carcinomas. A phase II study. *Oral Oncol.* 2003; 39(7): 724-727.
64. Iatek A. Patterns of recurrence and survival of head and neck adenoid cystic carcinoma after definitive resection. *Laryngoscope.* 2010; 109 (1): 109-116.
65. Barret W. Perineural invasion in adenoid cyst carcinoma of the salivaryglands: a valid prognostic indicator? *Oral Oncol.* 2009; 45 (11): 936-940.

66. Friedrich RE. Adenoid cystic carcinoma of salivary and lacrimal gland origin: localization, classification, treatment results and long-term follow-up control in 84 patients. *Anticancer Res.* 2003; 23(2A): 931-940.
67. Araújo Vc. The cribiform features of adenoid cyst carcinoma and polymorphous low-grade adenocarcinoma: cytokeratin and integrin expression. *Ann Diagn Pathol.* 2001; 5(6) : 330-334.
68. Al-Zaher. Acinic cell carcinoma of the salivary glands: a literature review. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2009; 2(1): 259-264.
69. Daneshbod Y. Diagnostic difficulties in the interpretation of fine needle aspirate samples in salivary lesions: diagnostic pitfalls revisited. 2009; 53 (1): 53-70.
70. Skálová A. Acinic cell carcinoma with high-grade transformation: a report of 9 cases with immunochemical study and analysis of TP53 and HER-2/neu genes. *Am J Sur Pathol.* 2009; 33(8): 1137-1145.
71. Klijanienko J. Comparative cytologic and histologic study of fifteen salivary basal- cell tumors: differential diagnostic considerations. *Diagn Cytopathol.* 1999; 21(1) :30-34.
72. Quddus MR. Basal cell adenocarcinoma of the salivary gland: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999; 87 (4): 485-492.
73. Kashiwagi N. Salivary duct carcinoma of the parotid gland: clinical and MR features in six patients. *Br J Radiol.* 2009; 82 (982): 800- 804.
74. Simpson RH. Salivary duct carcinoma in situ of the parotid gland. *Histopathology.* 2008; 53(4): 416-425.
75. Nabili V. Salivary duct carcinoma: a clinical and histologic review with implications for trastuzumab therapy. *Head Neck.* 2007; 29(10): 907-912.
76. Yang S. Myoepithelial carcinoma of intraoral minor salivary glands: a clinicopathological study of 7 cases and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 110 (1): 85-93.
77. Losito NS. Clear-cell myoepithelial carcinoma of the salivary glands: a clinicopathologic, immunohistochemical and ultrastructural study of two cases involving the submandibular gland with review of the literature. *Pathol Res Pract.* 2008; 204 (5): 335-344.
78. Hanahan D, Coussens L. Accessories to the crime: Functions of cells riveted to the tumor microenvironment. *Cell.* 2012; 20: 309-319.
79. Kumar, Abbas, Fausto, Aster, Robbins y Cotran. *Patología Estructural y Funcional.* Elsevier Saunders, 8ªed, España, 2010.
80. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 1992; 267: 10931-10934.

81. Jiménez-Ríos, Solares-Sánchez. Angiogénesis en cáncer renal. *Cancerología*. 2006; 1: 113-121.
82. Cwiklinska A, Sobstyl M, Kwasniewski W. Microtissue density prognostic factor evaluation based on antigens CD34 and CD105 in ovarian cancer patients. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2013; 4: 838-842.
83. Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID (1986) Monoclonal-antibody 12-8 recognizes a 115-Kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors. *Blood* 67(3):842-84.
84. Nielsen JS, McNagny KM (2009) CD34 is a key regulator of hematopoietic stem cell trafficking to bone marrow and mast cell progenitor trafficking in the periphery. *Microcirculation* 16(6):487-496
85. Hellwig SMM, Damen CA, van Adrichem NPH, Blijham GH, Groenewegen G, Griffioen AW (1997) Endothelial CD34 is suppressed in human malignancies: role of angiogenic factors. *Cancer Lett* 120(2):203-21.
86. Delia D, Lampugnani MG, Resnati M, Dejana E, Aiello A, Fontanella E, Soligo D, Pierotti MA, Greaves MF (1993) CD34 expression is regulated reciprocally with adhesion molecules in vascular endothelial cells in vitro. *Blood* 81(4):1001-1008
87. Nielsen J, McNagny. Novel functions of the CD34 family. *Journal of Cell Science* 121(22):3683-3690.
88. Siemerink M, Klaassen I, Van Noorden C, Schlingemann R. Endothelial Tip Cells in Ocular Angiogenesis: Potential Target for Anti-Angiogenesis Therapy. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 61(2): 101-115.
89. Gougos A, Letarte M. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem* 1990; 265: 8361-4.
90. Bellón T, Corbi A, Lastres P, Cales C, Cebrian M, Vera S, et al. Identification and expression of two forms of the transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur J Immunol* 1993; 23: 2340-5.
91. Fernández-Ruiz E, St Jacques S, Bellón T, Letarte M, Bernabéu C. Assignment of the human endoglin gene (END) to chromosome 9q34-qter. *Cytogenet Cell Genet* 1993; 64: 204-7.
92. McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, et al. Endoglin, a TGF- β binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nature Genet* 1994; 8: 345-51.
93. Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: Evidence and potential applications. *FASEB J*. 2003; 17: 984-92.

94. Balza E, Castellani P, Zijlstra A, Neri D, Zardi L, Siri A. Lack of specificity of endoglin expression for tumor blood vessels. *Int J Cancer*. 2001; 94: 579-585.
95. Bodey B Jr, Siegel SE, Kaiser HE. Upregulation of endoglin (CD105) expression during childhood brain tumor-related angiogenesis. *Anti-angiogenic therapy. Anticancer Res*. 1998; 18:1485-1500.
96. Minhajat R, Mori D, Yamasaki F, Sugita Y, Satoh T, Tokunaga O. Organ-specific endoglin (CD 105) expression in the angiogenesis of human cancers. *Pathol Int*. 2006; 12:717-723.
97. Saad RS, EL-Gohary Y, Memari E, Liu YL, Silverman JF: Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in esophageal adenocarcinoma. *Hum Pathol*. 2005; 36: 955-96.
98. Li C, Hampson IN, Hampson L, Slevin M, Kumar P, Bernabeu C, Kumar S. CD105 (endoglin) antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor on human vascular endothelial cells. *FASEB J*. 1999; 14: 55-64.
99. Babic A, Kireeva M, Kolesnikova T, Lau L. CYR61, a product of a growth factor-inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Sci* 1998; (95): 6355-6360.
100. Lau, L. F. & Nathans, D. *Genes Induced by Serum Growth Factors* eds. Cohen, P. & Foulkes, J. G. Elsevier. 1991; 257-293.
101. Herschman, H. R. *Annu. Rev. Biochem*. 1991; 60: 281-319. 5.
102. Yang, G. P. & Lau, L. F. *Cell Growth Differ*. 1991; 2: 351-357. 7.
103. Goldestein M, Watkins S. *Immunohistochemistry. Current Protocols in Molecular Biology*. 2008; 14.6.1-14.6.23.
104. Cardoso SV, Souza KC, Faria Pr. Et. añ. Assessment of angiogenesis by CD105 antigen in epithelial salivary gland neoplasm with diverse metastatic behavior. *BMC. Cancer*. 2009; 9:391.
105. Costa AF, Demasi AP, Bonfitto VL, et.al. Angiogenesis in salivary carcinomas with and without myoepithelial differentiation. *Virchows Arch*. 2008; 453: 359-367.
106. Dhanuthai K, Sappayatosok K, Yodsanga S, et al. An analysis of microvessel density in salivary gland tumors: a single Centre study. *Surgeon* 2013; 11: 147-152.
107. Yang X, Dai J, Li T, et al. Expression of EMMPRIN in adenoid cystic carcinoma of salivary glands: correlation with tumor progression and patients' prognosis. *Oral Oncol*. 2010; 46:755.
108. Zhang J, Peng B, Chen X. Expressions of nuclear factor kappa β , inducible nitric oxide synthase, and vascular endothelial growth factor in adenoid cystic carcinoma of salivary glands: correlations with the angiogenesis and clinical outcome. *Clin Cancer Res*. 2005; 11: 7334-43.

- ¹⁰⁹. Tang QL, Fan S, Li HG, et al. Expression of Cyr61 in primary salivary adenoid cystic carcinoma and its relation to Ki-67 and prognosis. *Oral Oncol.* 2011;47:365-70.