



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

CUANTIFICACIÓN DE LA DENSIDAD
MICROVASCULAR EN DISPLASIAS EPITELIALES
LEVES, MODERADAS Y SEVERAS

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

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

P R E S E N T A:

LILIANA CAMACHO AGUILAR

TUTORA: Mtra. CARLA MONSERRAT RAMÍREZ MARTÍNEZ

ASESOR: Mtro. DAVID ALONSO TREJO REMIGIO



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.

Agradezco a Dios por permitirme llegar hasta aquí.

A mi madre, gracias por ser mi mayor apoyo en este trayecto, por estar siempre pendiente de mí día a día e inspirarme a seguir adelante a pesar de todo, por todos tus desvelos y sacrificios, por preocuparte siempre por mí y darme lo mejor.

Gracias papás por enseñarme a luchar por mis sueños y por confiar en mí.

A mi hermano, gracias por ser mi guía más importante para ser siempre mejor y superarme. Por todo tu apoyo y confianza que tuviste en mí desde que inicié esta etapa, gracias por ser mi compañero de vida y por todo tu cariño.

A mis todos mis amigos que estuvieron conmigo en la carrera sobre todo a Andy, Elena, Sara y Ale.

A mis compañeros del trabajo que se convirtieron en mis grandes amigos y han estado conmigo todos estos años.

A todas las personas que en su momento me apoyaron y a los que estuvieron conmigo hasta el final.

Gracias a todo el equipo de patología bucal por todo su apoyo, a mi tutora Carla, al doctor Luis Fernando y David por toda su paciencia.

Agradezco a mi querida UNAM por abrirme sus puertas y aprender tanto de ella y por dejarme tantas experiencias.

“Por mi raza hablará el espíritu”

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN.....	4
2 MARCO TEÓRICO	5
2.1 ANGIOGÉNESIS	5
2.1.1 Principales promotores endógenos	7
2.1.2 Principales inhibidores endógenos	8
2.1.3 Angiogénesis en los procesos patológicos	9
2.2 DENSIDAD MICROVASCULAR.....	11
2.2.1 Medición de la angiogénesis	13
2.3 MARCADORES ANGIOGÉNICOS	16
2.3.1 CD34	16
2.3.2 CD31	17
2.3.3 Endogлина	18
2.3.4 CD105 como marcador angiogénico.....	19
2.4 DISPLASIA EPITELIAL	22
2.4.2 Clasificación	23
2.4.3 Aplicaciones clínicas	27
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
4 JUSTIFICACIÓN.....	28
5 HIPÓTESIS	28
6 OBJETIVOS	28
6.1 Objetivo general	28
6.2 Objetivos específicos	29
7 MATERIAL Y MÉTODO.....	29
7.1 Tipo de estudio.....	29
7.2 Universo de estudio.....	29
7.3 Muestra de estudio.....	29
7.4 Criterios de inclusión	29
7.5 Criterios de eliminación	29
7.6 Criterios de exclusión	30
7.7 Análisis Histopatológico H&E.	30
7.8 Análisis de Inmunohistoquímica (IHQ).....	30
7.9 Análisis de inmunoexpresión	31
8 RESULTADOS	32
9 DISCUSIÓN.....	34
10 CONCLUSIONES	35
11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1 INTRODUCCIÓN

La displasia epitelial es una alteración morfológica indicativa de un desorden en la maduración y una alteración de la proliferación celular que puede ser en algunos casos reversible y en otros puede tener una transformación maligna.

La angiogénesis es un proceso biológico indispensable para el crecimiento tumoral, ya que facilita el acceso de células neoplásicas a vasos sanguíneos anómalos y suministra el oxígeno y nutrientes a dichas células. Este proceso puede cuantificarse mediante el cálculo de la densidad microvascular, que se realiza analizando el número de los micro vasos sanguíneos en un área determinada por inmunohistoquímica, en los que la endoglina (CD105) es un potente marcador angiogénico expresado en células endoteliales activadas durante la angiogénesis y que se considera un marcador específico para la detección de la neo-vasculatura.

Este estudio pretende analizar la expresión de CD105 en muestras de displasias epiteliales leves, moderadas y severas para evaluar la densidad microvascular determinadas por este marcador y confirmar si puede ser un elemento favorable para el pronóstico de la transformación maligna.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 ANGIOGÉNESIS

La angiogénesis es el proceso que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasculatura preexistente. ¹

Para el crecimiento de cualquier tejido sano o patológico es necesario que haya un aporte sanguíneo continuo a través de la amplia red vascular que nutra a las células de elementos básicos como glucosa, oxígeno y otras moléculas necesarias para el desarrollo de sus funciones. La formación de estos vasos se da en dos procesos diferentes: la vasculogénesis y la angiogénesis. La primera se produce en la fase embrionaria a partir de angioblastos que se diferencian en células endoteliales encargadas de formar los primeros vasos sanguíneos. En la segunda se forman nuevos capilares a partir de los ya existentes por una migración y proliferación al espacio extravascular de células endoteliales. ²

Actúa en la cicatrización en los sitios de alguna lesión o en hipoxia. La angiogénesis comienza con una vasodilatación y aumento de la permeabilidad de los vasos preexistentes inducido por el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), éste es el principal regulador de células endoteliales (CE), promueve la migración celular y se encarga de la formación de vasos sanguíneos. ¹ Posteriormente se separan los pericitos de la superficie abluminal y se degrada la membrana basal que rodea las células endoteliales para permitir la formación de brotes vasculares. Al mismo tiempo se necesita la migración y proliferación de las células endoteliales hacia el área, hay una remodelación en los tubos capilares y comienza el reclutamiento de pericitos y células de músculo liso a fin de formar el vaso maduro.

Se proporciona estabilidad al nuevo vaso capilar con ayuda de algunos factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF-B).²

Finalmente se detiene la proliferación y migración endotelial y empieza a formarse la nueva membrana basal, así se establecen los mecanismos de adhesión celular y el flujo sanguíneo (figura 1).³

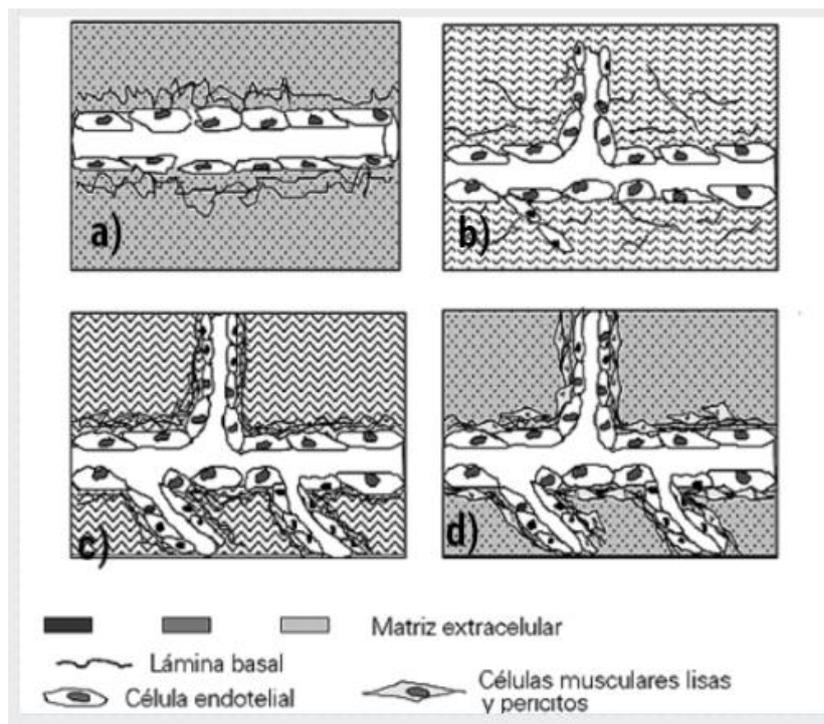


Figura 1 Fases de la angiogénesis a) aumento de la permeabilidad vascular, modificación de la membrana basal y de la matriz extracelular. b) migración y proliferación de las células endoteliales c) restructuración de la lámina basal y matriz extracelular d) reclutamiento de pericitos y células de músculo liso.

Las proteínas de la matriz extracelular participan en la formación de brotes de nuevos vasos, por medio de interacciones con los receptores de integrinas en las células endoteliales aportando la infraestructura para el crecimiento vascular.⁴

El proceso de angiogénesis afecta varias vías de señalización como la vía de Notch, ésta regula la formación de brotes y la ramificación de nuevos vasos, asegura que estén en el espacio adecuado para irrigar el tejido en fase de cicatrización, interacciones célula-célula, proteínas de la matriz extracelular y enzimas tisulares. ³

La generación de nuevos capilares es el resultado del balance entre las señales positivas (factores proangiogénicos o estimuladoras) y las señales negativas (factores antiangiogénicos o inhibidores). ¹

Hay un gran número de moléculas que pueden promover o inhibir el proceso de angiogénesis; actúan sobre diferentes procesos, pero principalmente intervienen en el remodelado de la matriz extracelular o en la migración y proliferación de las células endoteliales. ⁴

2.1.2 Principales promotores endógenos

Son factores de crecimiento necesarios en condiciones fisiológicas, pero cuando se sobre expresan actúan sobre las células endoteliales tanto del vaso preexistente como del neovaso, estimulando la angiogénesis. Son imprescindibles para la supervivencia celular, ya que, en su ausencia, las células entran en apoptosis; sólo tras la unión a sus receptores celulares producen la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas. ³

Aunque se han descrito muchas moléculas que intervienen en la angiogénesis, algunos de los promotores más importantes son factores de crecimiento que actúan sobre las células endoteliales VEGF, PDGF, TGF α y β , TNF α . También hay otras moléculas como la angiopoyetinas 1 y 2 que participan en la maduración estructural de los nuevos vasos, IL-8, leptinas, prostaglandinas, lípidos, el HIF1, proteasas (activadores del plasminógeno) o ciertas MMP que intervienen en la degradación de la

matriz extracelular a fin de permitir la remodelación y la extensión de los conductos vasculares (figura 2).⁵

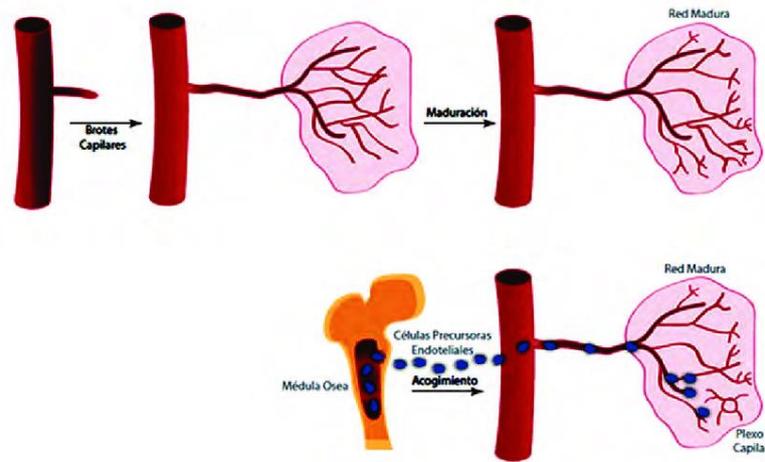


Figura 2 Angiogénesis. Mecanismos moleculares del crecimiento de los vasos sanguíneos.

2.1.3 Principales inhibidores endógenos

Estos inhibidores actúan principalmente estimulando la apoptosis de las células endoteliales, siempre de forma controlada, ya que, si no, se produciría la muerte del tejido, un efecto inverso al que producen los factores de crecimiento. Para el proceso de angiogénesis la sobreexpresión de promotores no es suficiente, ya que también es imprescindible que haya una regulación de las moléculas inhibitoras. ⁽³⁾

Entre ellos destaca la angiostatina como un potente inhibidor derivado del plasminógeno que impide la proliferación de la célula endotelial. La endostatina ejerce dos mecanismos de inhibición de la angiogénesis sobre la migración de las células endoteliales y su efecto en la apoptosis celular e inhibe la síntesis del óxido nítrico. ⁵

2.1.4 Angiogénesis en los procesos patológicos

La parte beneficiosa de la angiogénesis se encuentra en procesos de cicatrización de heridas, remodelación del esqueleto o tisular, en isquemia miocárdica; en estas situaciones puede favorecer la recuperación del paciente o frenar el desarrollo de la patología. En la parte perjudicial el crecimiento tumoral es el principal, situación en la que la angiogénesis favorece el desarrollo de la enfermedad. ¹

La angiogénesis patológica aparece cuando se alcanza y sobrepasa el umbral entre los estimuladores e inhibidores angiogénicos. Se pueden distinguir dos tipos de angiogénesis patológica; la activada y la inhibida, dependiendo de los niveles de las moléculas pro o anti-angiogénicas respectivamente. ¹

Existen diversas condiciones asociadas a la angiogénesis activada como las enfermedades malignas, además de estar implicada en obesidad, asma, diabetes, cirrosis, infecciones bacterianas y enfermedades autoinmunes. La angiogénesis inhibida aparece cuando hay isquemia y está asociada al mal funcionamiento de las células endoteliales a la regresión o malformación de los vasos además de prevenir la revascularización, cicatrización y regeneración. ¹

La angiogénesis desempeña un papel crucial en el comportamiento maligno, ya que facilita el acceso de las células tumorales a vasos anómalos. También aumenta el suministro de oxígeno, nutrientes a las células cancerosas y elimina los desechos. Además, estas vasculaturas anormales son importantes como vía para las células cancerosas desde un tumor primario hasta órganos distantes.³ Figura 3

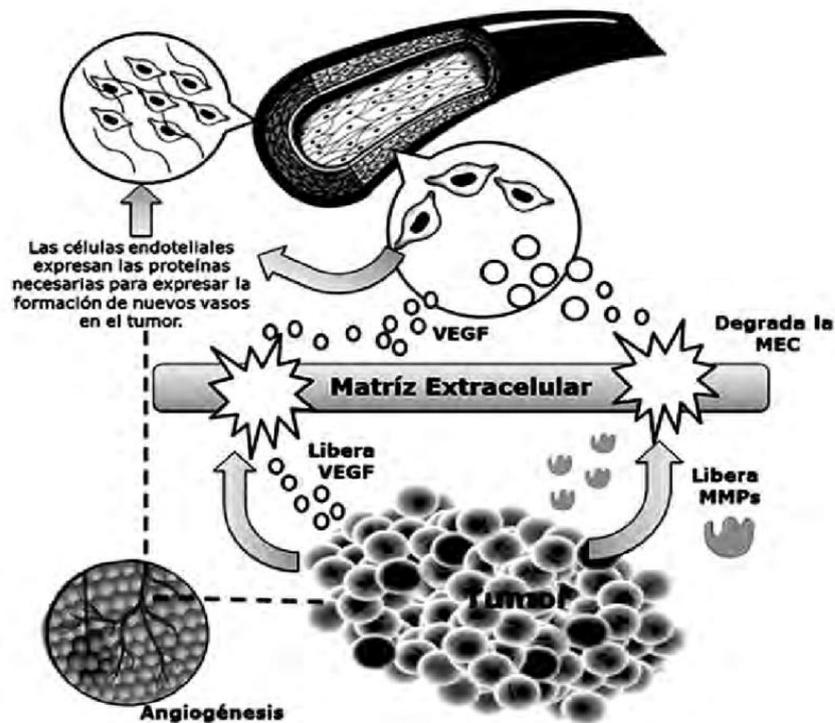


Figura 3 VEGF-en la angiogenesis tumoral. ⁵

Los vasos sanguíneos son un componente importante del estroma tumoral y por lo tanto la angiogenesis es un factor predictor en el pronóstico de muchas neoplasias, se considera que existe una correlación importante entre el número de la densidad de los vasos sanguíneos con los estados metastásicos, tamaño del tumor, tipo histológico y por consiguiente grado de malignidad tumoral. ⁴

Un tumor sólido no puede crecer por encima de 1-2 mm de diámetro, ya que representa la distancia máxima donde se difunden el oxígeno, nutrientes y la eliminación de productos de desecho a menos que puede inducir la angiogenesis. ³

Se ha reportado un aumento en la vascularidad de la angiogenesis cuando hay actividad proliferativa y transformación de las células epiteliales, lo cual permite su crecimiento. ⁶

Existen dos etapas de crecimiento neoplásico: La fase avascular donde los propios vasos del hospedero son suficientes para propiciar un crecimiento tumoral de 1-2mm y cuando hay un crecimiento mayor a este diámetro necesita la formación de nuevos vasos por lo que se activa la siguiente fase de crecimiento: La vascular, en ella las células endoteliales recién formadas estimulan el crecimiento de las células tumorales adyacentes al secretar factores de crecimiento. ⁶ Figura 4

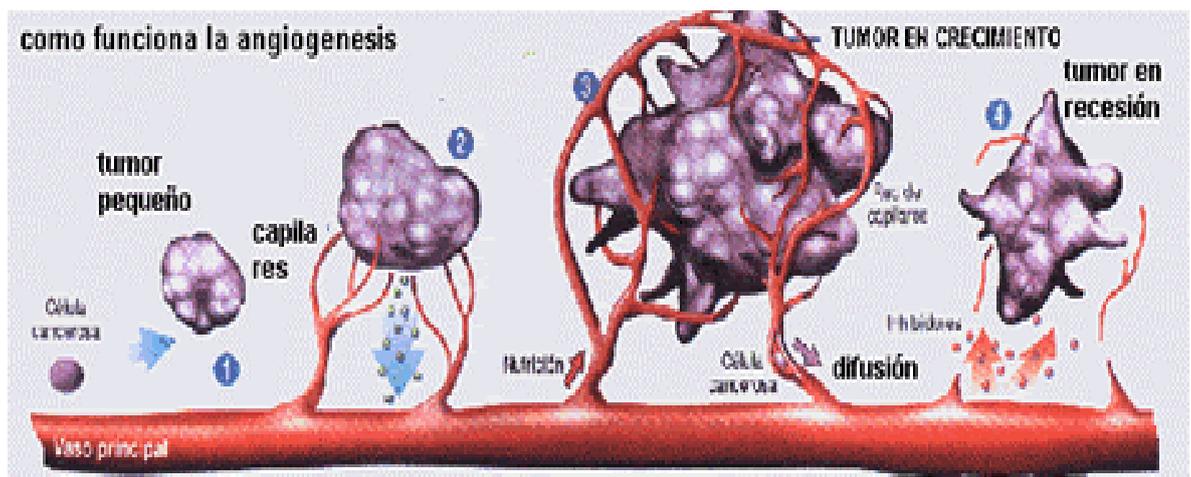


Figura 4 Crecimiento tumoral. ⁷

2.2 DENSIDAD MICROVASCULAR

Existen 3 formas de evaluar la angiogénesis tumoral: histológicamente (directa), radiológicamente (indirecta) y serológicamente con marcadores de actividad angiogénica (alternativa). Comúnmente es utilizada la evaluación histológica y con ella se realiza la medición de la angiogénesis y la densidad microvascular (MVD). ⁸ La cual se define como el número de vasos pequeños en una determinada área tumoral. ⁹

La MVD se evalúa examinando áreas seleccionadas al azar contando las zonas de mayor densidad, la MVD puede ser cuantificada con las áreas

de mayor neovascularización llamadas “focos calientes” obteniendo una escala logarítmica de espectro de baja y alta densidad, que va de 10 a 200 microvasos por cada campo. ⁽¹⁰⁾

La densidad vascular determina la respuesta angiogénica tumoral y así, establece relaciones con la progresión tumoral y el pronóstico en tumores sólidos a nivel de mama, próstata, ovario y colon. ⁽⁹⁾ Es uno de los marcadores biológicos más novedosos para la evaluación inicial y el pronóstico de enfermedades neoplásicas. Dicho marcador se ha correlacionado con algunos estudios con la etapa clínica, etapa patológica, metastásica y grado y grado histopatológico del cáncer. ⁽⁹⁾⁽¹¹⁾

Se ha reportado un aumento en la vascularidad y la angiogénesis durante la actividad proliferativa y de transformación de células epiteliales bucales en el orden de permitir su crecimiento. Generalmente las zonas donde hay mayor neovascularización se ubican en los márgenes del tumor. ⁽¹⁰⁾ Para que la densidad pueda cuantificarse es importante que exista un diverso espectro de densidades de los diferentes casos de una neoplasia. ⁽¹²⁾

En el endotelio vascular se encuentran presentes el antígeno relacionado al factor de Von Willebrand, las moléculas de adhesión a las células endoteliales, plaquetas, selectinas, algunos marcadores como CD105, CD34 y CD31. ⁽⁵⁾ Éstos se pueden emplear en diferentes métodos de tinción incluyendo técnicas de inmunohistoquímica ⁽¹⁰⁾

La mayoría de los estudios de MVD se han llevado a cabo con muestras fijadas con formalina e incrustadas con parafina. Los vasos sanguíneos inmaduros recién formados en tumores tienen características diferentes de los vasos maduros. ⁽⁹⁾ Es decir, las células cancerosas pueden penetrar las paredes de los vasos sanguíneos inmaduros más fácilmente

que las de los vasos maduros, porque los vasos maduros muestran una mayor permeabilidad y fragilidad. ⁽²⁾

En particular se analiza la relación entre el potencial maligno, la progresión del tumor, la supervivencia del tumor y las diferencias entre los anticuerpos utilizados para la detección de células endoteliales en detalle. ⁽¹¹⁾

2.2.1 Medición de la angiogénesis

Para evaluar el nivel de la angiogénesis en los tejidos cancerosos se han aplicado varios métodos diferentes; por ejemplo: la cuantificación de las moléculas relacionadas con la angiogénesis, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y las proteínas de los marcadores endoteliales. Sin embargo, la cuantificación de la densidad microvascular se considera el método más útil para medir tejidos cancerosos. Las áreas de mediada para la evaluación de la angiogénesis se determinan mediante los siguientes tres enfoques: análisis de imagen aleatorios y automatizados/ semiautomáticos; el método de Chalkley; y análisis de “puntos calientes”. ⁽¹⁰⁾

Análisis de imagen automatizado/ semiautomático

Se han desarrollado métodos de conteo automatizados/semiautomáticos que utilizan análisis de imágenes digitales y software de computadora. La selección del área de medición y la detección de microvasos son claramente objetivas, ya que las áreas de los sujetos se eligen al azar y los vasos teñidos positivamente se detectan mediante un método que depende menos de la experiencia del observador. Este análisis automatizado de imágenes puede medir varios parámetros de microvasos, incluyendo el área del vaso, el espesor de la pared del vaso y la compacidad del vaso, al mismo tiempo. Este método se ha utilizado en los últimos años para el examen de tejidos de cáncer de próstata. ⁽¹¹⁾

Técnica de conteo de Chalkley

Otro método para estimar la MVD en tejidos cancerosos es el método de Chalkley, que se sugirió como el método principal para la evaluación inmunohistoquímica de la angiogénesis en 1943. La retícula de Chalkley es una lente física en la que se colocan 25 puntos al azar y el recuento de Chalkley se calcula como el número de puntos que afectan a los vasos teñidos.

La variabilidad de los resultados entre los observadores es inferior a la de otros métodos. El método de Chalkley es confiable y versátil para contar el MVD en tejidos cancerosos. Sin embargo, la frecuencia de uso de este método es menor que la de otros. En un informe anterior, para usar este método para tejidos de cáncer, se coloca una retícula de ocular Chalkley de 25 puntos en el ocular, se gira y se proyecta en el "punto caliente" para que los 25 puntos aleatorios de la cuadrícula coincidan con tantos puntos vasculares como sea posible (figura 4).⁹

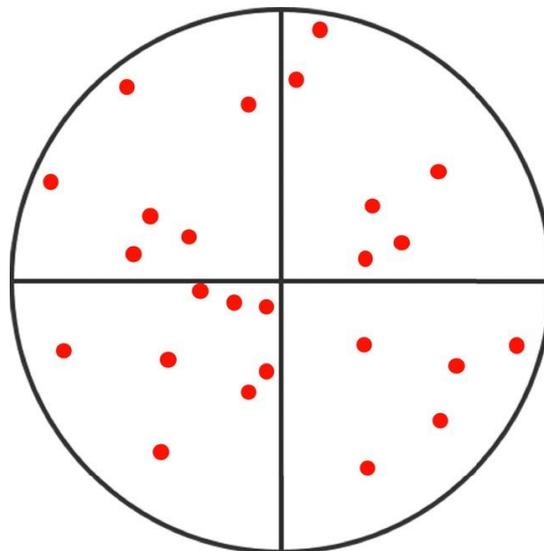


Figura 4 Rejilla de Chalkley. Un círculo dividido en cuartos y poblado con 25 puntos. Se cuentan los puntos en la retícula golpeando los vasos teñidos.

Análisis en un “punto caliente” o Hot Spot

La densidad vascular es una medida para determinar la respuesta angiogénica tumoral y así establecer relaciones con la progresión tumoral y el pronóstico en tumores sólidos a nivel de mama, ovario, próstata, colon y otros. ⁽¹⁰⁾

El enfoque de "punto caliente" es un método para medir la densidad vascular máxima en una muestra. Este método es el más comúnmente utilizado para los tejidos de cáncer. En la mayoría de los estudios las regiones altamente vascularizadas se seleccionan a un bajo aumento ($\times 40$ o $\times 100$) y los microvasos se cuentan utilizando un campo de alta potencia ($\times 200$ o $\times 400$). Muchos investigadores evaluaron la MVD en al menos tres campos no superpuestos, y consideraron el nivel medio como la MVD final. ⁽¹¹⁾

Las ventajas de este enfoque son su simplicidad y relativa facilidad, especialmente con tejidos enteros obtenidos por RP, de hecho, el enfoque de "punto caliente" es el método más popular y común para evaluar el estado angiogénico de muchos tipos de tumores sólidos, y también utilizamos este enfoque en muchos estudios anteriores. ¹¹⁾

Varios factores pueden influir en la MVD en los tejidos cancerosos. Sin embargo, muchos investigadores apoyan la opinión de que las discrepancias observadas aquí pueden atribuirse a los diferentes anticuerpos utilizados para la identificación de los microvasos relacionados con el cáncer. ¹¹

La cuantificación se analiza con ayuda de un software que mide la intensidad de densidades ópticas, así como la cuantificación objetiva de los vasos sanguíneos previamente teñidos con inmunohistoquímica.¹³

Figura 5

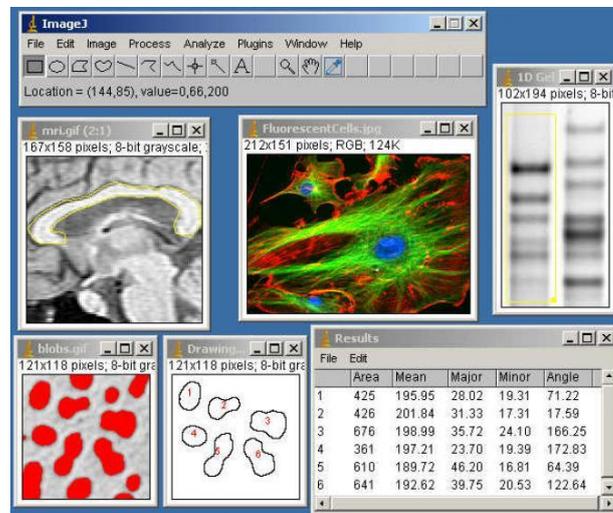


Figura 5 Programa Image J. ¹⁴

Dada las diferencias de diagnóstico es fundamental la utilización de marcadores biológicos que midan la proliferación celular y capacidad de transformación maligna y de esta manera lograr unificar criterios para establecer un mejor pronóstico. En diversos estudios tales marcadores se han utilizado para la determinación de la densidad vascular, mediante técnicas de inmunohistoquímica. ⁽¹⁰⁾

2.3 MARCADORES ANGIOGÉNICOS

2.3.1 CD34

Es una glucoproteína transmembrana de cadena simple. Se expresa selectivamente en células progenitoras hematopoyéticas mieloides y linfoides y en células endoteliales. Se ha utilizado ampliamente como un marcador para ayudar en la identificación y el aislamiento de células madre hematopoyéticas y progenitores en la preparación para pacientes

con trasplante de médula ósea. Promueve la adhesión de los linfocitos al endotelio vascular especializado en tejidos linfoides. ⁽¹⁵⁾

Un informe inicial lo describe como un marcador de cáncer testicular y postuló que podría ser un biomarcador sérico útil. Poco después se encontró que la regulación de CD34 se correlaciona con un resultado deficiente en el carcinoma de mama invasivo. Esto sugiere que los altos niveles de expresión de CD34 son un mejor marcador para predecir un resultado pobre que otros marcadores. ⁽¹¹⁾

CD34 valora la densidad de la microvascularización a través de la tinción de la membrana. Se cuenta el número de vasos CD34 positivos. ⁽¹⁶⁾ Se debe destacar el hecho de que CD34 puede teñir algunas células endoteliales linfáticas, por lo que los vasos teñidos con CD34 podrían contribuir a una MVD falsamente elevada en los tejidos cancerosos. Existe la opinión de que CD34 se detecta en vasos pequeños, pero no de vasos grandes, aunque el CD34 se detecta en vasos pequeños, se encuentra tanto en vasculaturas recién formadas como preexistentes y sus mediciones son muy altas. ⁽¹¹⁾

2.3.2 CD31

El antígeno CD31 (PECAM-1) es una glucoproteína transmembrana de cadena simple, pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y actúa en forma homofílica. Se expresa en la superficie de los granulocitos, monocitos y plaquetas. CD31 se encuentra en células endoteliales, membranas de las plaquetas, células plasmáticas y macrófagos. ⁽¹⁶⁾

Los anticuerpos específicos para CD31 inhiben la angiogénesis inducida por tumor in vivo en ratones, además de su papel como receptor inhibitorio en plaquetas y leucocitos circulantes. Se expresa altamente en las uniones de las células endoteliales, donde funciona como una proteína

adhesiva de respuesta ante el estrés para mantener la integridad de la unión de las células endoteliales y acelerar la restauración de la barrera de permeabilidad vascular tras una inflamación o evento trombótico.¹⁷

Se ha analizado que CD31 se detecta en vasos preexistentes y en vasos recién formados en tejidos cancerosos. Por lo que todavía se usa constantemente para medir la MVD en tejidos cancerosos humanos.⁽¹⁷⁾

Con respecto a las diferencias en la expresión de CD31, un estudio que involucró la cuantificación de ARNm informó que este marcador no era adecuado para distinguir entre tejidos normales y tumores. En contraste, los informes anteriores sobre CD31-MVD mostraron diferencias significativas entre el cáncer de próstata y los tejidos no tumorales. Por lo tanto, todavía hay problemas para resolver.⁽¹⁰⁾ Por lo cual, se han buscado nuevos marcadores específicos para nuevos vasos neorformados.⁽¹¹⁾ Se ha demostrado que CD105 posee ventaja sobre otros marcadores para evidenciar las células endoteliales recién formadas.⁽¹⁸⁾

2.3.3 ENDOGLINA

La endoglina (CD105) es una glicoproteína de membrana celular homodimérica unida por disulfuro de 180 kDa, las dos isoformas conocidas de CD105, L y S, difieren entre sí por la cola citoplasmática, ambas formas son fosforiladas constitutivamente, se expresa predominantemente en células endoteliales.⁽¹⁸⁾ El gen que codifica a la endoglina se localiza el cromosoma 9q34.⁽²⁰⁾

La endoglina funciona como un co-receptor para varios ligandos de la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-B), una citocina que modula la angiogénesis mediante la regulación de diferentes

funciones celulares incluida la proliferación, diferenciación y migración celular (figura 6).¹⁹

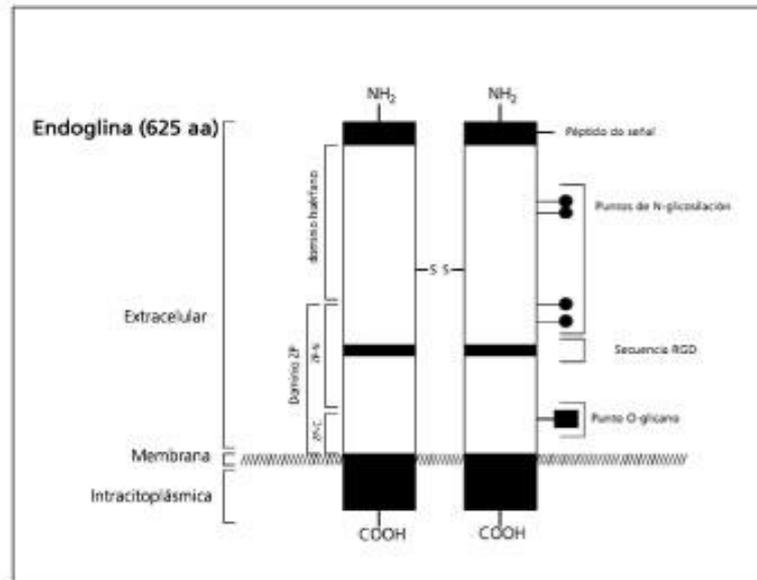


Figura 6 Esquema de la estructura de la endoglina, receptor de TGF-B de tipo III.

Entre las moléculas de superficie expresadas en las células endoteliales, la endoglina (CD105) está emergiendo como un objetivo vascular primario para la terapia antiangiogénica del cáncer. ⁽²¹⁾

CD105 se expresa principalmente en las células endoteliales activadas asociado al tumor que funciona como un componente accesorio del complejo del factor de crecimiento transformante - receptor β y está involucrado en el desarrollo vascular y la remodelación. La evaluación de la positividad a CD105 se evalúa en regiones peritumorales para disminuir la probabilidad de contar vasos sanguíneos pre existentes. ⁽²⁰⁾

Figura 7

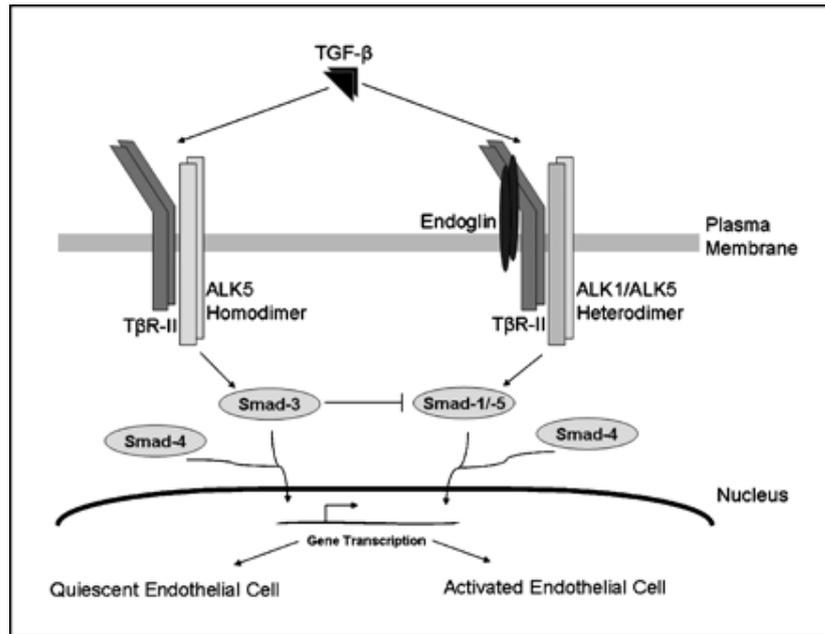


Figura 7 El papel de la endogлина en las células endoteliales. ²²

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. ²³

2.3.4 CD105 como marcador angiogénico

Se ha sugerido que la cuantificación de la densidad de microvasos intratumoral por tinción con CD105 y de CD105 soluble en circulación tiene importancia pronóstica en tumores sólidos y hematopoyéticos como: tumores de mama, próstata, cervical, colorrectal, mieloma múltiple y leucemia de células pilosas. ^{(22) (24)}

La cuantificación de la densidad de microvasos tumorales, determinada por la tinción inmunohistoquímica para CD105, es un indicador significativo de mal pronóstico en pacientes con tumores sólidos como:

Cáncer colorrectal

En un estudio se investigaron con inmunohistoquímica 54 casos de adenomas colorrectales y 20 casos de carcinomas con CD34 y CD105 y se contó la densidad de microvasos. Los microvasos positivos para CD34 se distribuyeron uniformemente en los adenomas. En contraste los microvasos positivos para CD105 se observaron preferentemente en la periferia de los adenomas colorrectales. ²³

En otro estudio se analizaron 150 pacientes con carcinoma colorrectal, en el cual CD105 demostró significativamente más microvasos neoplásicos en proliferación que CD31. ²⁴ La evaluación con CD34 y CD31 puede ser no precisa, ya que no siempre se expresan en todos los vasos tumorales. CD31, aunque es un buen marcador para células endoteliales, tiñe vasos grandes y pequeños con la misma intensidad, así como vasos sanguíneos en tejido tumoral y normal y en algunas ocasiones tiñe células del carcinoma colorrectal. ²³

La tinción de microvasos con endoglina estuvo presente en todos los casos estudiados, tiñó pequeños vasos con alta sensibilidad en y alrededor del tumor y los vasos de tejido no neoplásico no se tiñeron. Esto concuerda con estudios previos en los que CD105 se expresó en vasos sanguíneos en proliferación, mientras que CD31 y CD34 tiñeron todos los vasos sanguíneos. ⁽¹⁸⁾

Cáncer de próstata

Varios infirmes han demostrado que la MVD aumenta con la carcinogénesis y se asocia significativamente con características patológicas y resultados en pacientes con cáncer de próstata. ²⁵

En el cáncer de próstata la endoglina se encuentra en vasos sanguíneos nuevos e inmaduros. La inmunohistoquímica apoya la asociación entre la expresión de la endoglina y el progreso de la enfermedad. La endoglina

puede ser extremadamente útil como marcador de enfermedad metastásica en personas con presunción de cáncer de próstata. ²⁶

Un estudio demostró que CD105 se correlaciona positivamente con el cáncer de próstata. ⁽¹¹⁾

2.4 DISPLASIA EPITELIAL

Se considera displasia epitelial oral a la serie de alteraciones o modificaciones de la normalidad histológica y que se correlaciona con la capacidad de malignización de su epitelio escamoso. ²⁷

Sólo puede determinarse mediante el estudio microscópico de un espécimen de biopsia. La concordancia en la valoración de la displasia epitelial está directamente relacionada con algunos datos como: inflamación, localización y de la técnica de la biopsia. ²⁸

Las células displásicas están separadas de los tejidos circundantes por la membrana basal. Si no se administra tratamiento las células tumorales penetran la membrana basal y se propagan hacia tejidos circundantes. ¹¹ Tanto los epitelios inflamados como los regenerativos pueden mostrar cambios epiteliales reactivos. ²⁸

Si las células son displásicas y el estímulo que genera la displasia se elimina, las células recuperan su estado normal si el estímulo se retira y las células siguen reproduciéndose sin control, entonces está teniendo lugar un proceso neoplásico, de ahí la importancia de un diagnóstico precoz. ²⁹

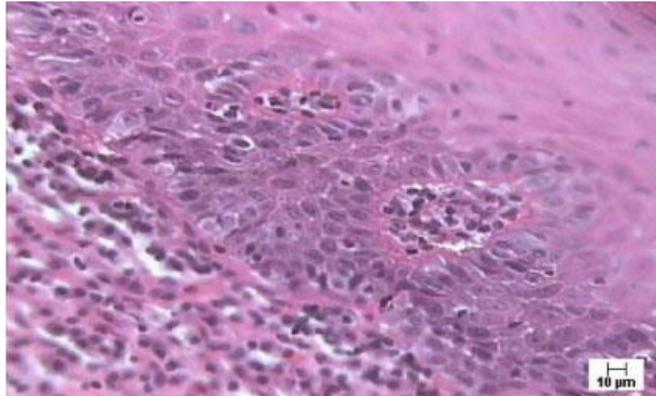


Figura 10 Se observa displasia epitelial ligera con signos de hiperplasia y pérdida de la polaridad de células basales, además de pleomorfismo celular y nuclear. Coloración H/E. 400X.³⁰

2.4.1 Clasificación

La Organización mundial de la salud (OMS) en 2005 clasificó las displasias epiteliales en leves, moderadas, severas y carcinoma in situ según la presencia y la gravedad de la atipia celular y las características arquitectónicas basadas en el grosor de las capas displásicas en comparación con el epitelio total.³¹

Displasia leve: se limita al tercio inferior del epitelio (capas basales y parabasales) que presenta alteraciones citológicas y / o arquitectónicas.

Displasia moderada: muestra una maduración desordenada desde la capa basal que se extiende hasta la porción media de la capa espinosa (tercio medio).

Displasia grave: revela una maduración anormal que se extiende desde las células basales a un nivel por encima del punto medio del epitelio (tercio superior) a todo el espesor del epitelio.

Carcinoma in situ: Si la alteración displásica es intensa y afecta a todo el espesor del epitelio, pero la lesión no penetra la membrana basal, se habla de neoplasia preinvasiva o de carcinoma in situ.³⁰ Una vez que las células tumorales rompen la membrana basal, se habla de un tumor invasivo o infiltrante.²⁷

Los rasgos que identifican una displasia epitelial se clasifican en alteraciones arquitectónicas y alteraciones celulares.²⁸ Tabla 1

Tabla 1 Criterio usado en el diagnóstico de displasia en la mucosa oral. ²⁷

Datos arquitectónicos	Datos citológicos
Estratificación epitelial irregular	Variación normal en el tamaño nuclear
Pérdida de la polaridad de las Células basales	Variación anormal en la forma nuclear
Crestas epiteliales en forma de gota	Variación anormal en la forma celular
Aumento del número de mitosis	Variación anormal del tamaño celular
Mitosis anormales superficiales	Aumento en la proporción núcleo/citoplasma
Queratinización prematura de células aisladas	Mitosis atípicas
Perlas de queratina dentro de las crestas	Aumento del número y tamaño de los nucléolos
	Hipercromatismo

Tanto las características citológicas como arquitectónicas se utilizan cuando se desarrollan criterios para clasificar la displasia epitelial oral. Los puntos de corte para una lesión de alto riesgo definida como "susceptibilidad potencial para la transformación maligna" y una lesión de bajo riesgo definida como "no tiene la susceptibilidad potencial para la transformación maligna" fueron al menos 4 cambios arquitectónicos y 5 cambios citológicos, respectivamente. Usando este esquema de clasificación, no todas las lesiones de alto riesgo son sinónimo de displasia grave o carcinoma in situ. ³¹

Utilizando los criterios de la OMS de 2005 para diagnosticar la displasia, se desarrolló un sistema binario de clasificación basado en la combinación de cambios en la arquitectura y la citología (figura 11)³¹

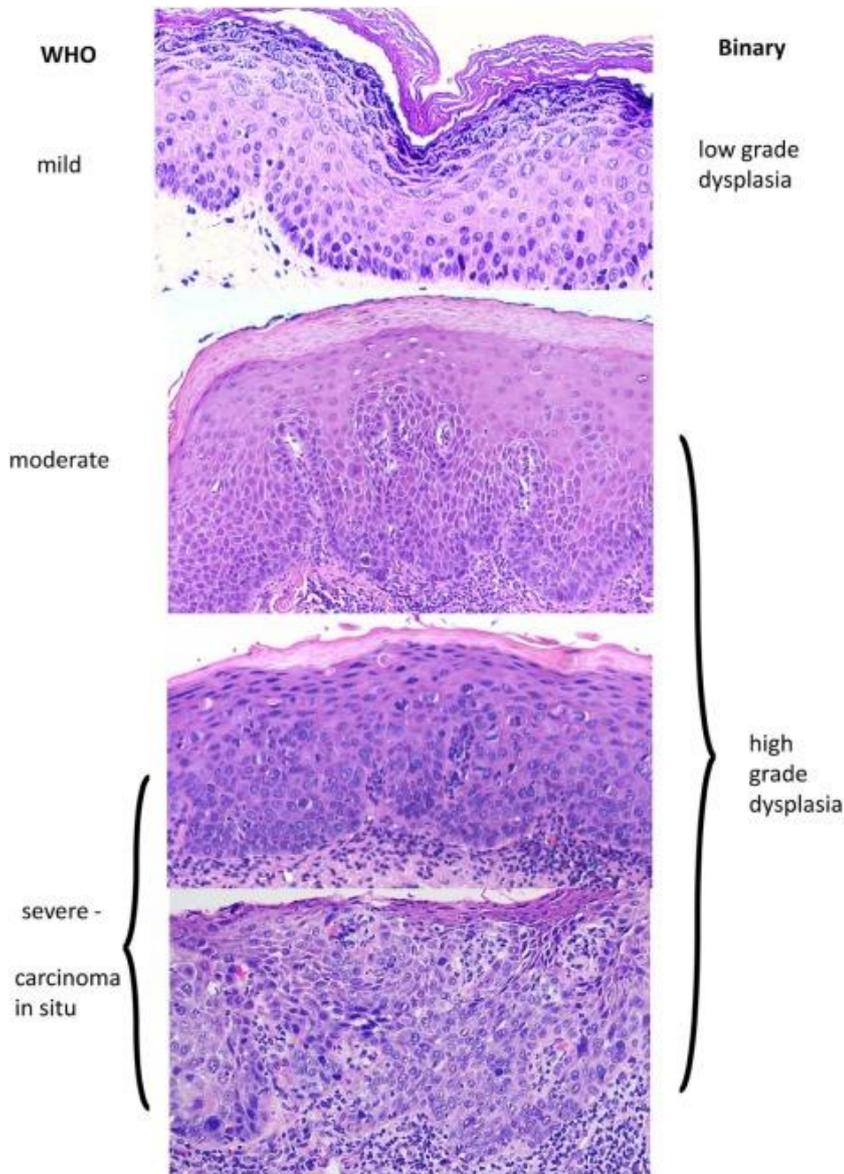


Figura 11 Comparación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y sistemas binarios de clasificación de displasia epitelial oral .

Las alteraciones displásicas suelen encontrarse cerca de focos de carcinoma invasivo. Aunque la displasia se considera una lesión precursora de la transformación maligna, no siempre evoluciona a cáncer.

Es importante señalar que el grado de displasia epitelial puede aumentar con el tiempo. Este factor varía entre individuos, desde meses hasta años.

La valoración de las displasias epiteliales es un proceso subjetivo ya que todavía no existen parámetros cuantificables, por lo que no siempre es sinónimo de malignización. Todavía no disponemos de marcadores definitivos que nos puedan señalar su existencia o no y lo que es más importante: su evolución. ³³

2.4.2 Aplicaciones clínicas

Las aplicaciones de la angiogénesis toman importancia en el diagnóstico y pronóstico de procesos patológicos como:

- Predecir la ocurrencia de metástasis.
- Predecir la recurrencia de un tumor.
- Diferenciar procesos neoforativos.

El análisis histológico de muchos tumores revela la presencia de numerosos vasos de neoformación asociados con el tejido tumoral. Estos vasos constituyen un elemento esencial del estroma tumoral y por lo tanto la densidad vascular puede constituir un factor pronóstico importante para la evolución de esta enfermedad. ⁴

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las displasias epiteliales son alteraciones morfológicas que dependiendo de su estadio se relacionan con la capacidad de malignidad y desarrollar alguna neoplasia.

Es importante un pronóstico temprano y predecir este proceso utilizando moléculas expresadas en etapas tempranas de carcinogénesis. La expresión de CD105 en displasias orales, podría ser un indicador importante de su posible progresión de leve a un perfil de severidad.

¿Cuál es la cuantificación de la densidad microvascular con CD105 en las displasias epiteliales leves, moderadas y severas?

4 JUSTIFICACIÓN

La displasia se considera una lesión potencialmente maligna, esto hace que la detección temprana de estas lesiones repercuta en el pronóstico de los pacientes afectados.

La angiogénesis es un proceso importante que permite el crecimiento tumoral, y que ha sido útil como marcador pronóstico de malignidad. Es importante identificar si la angiogénesis, medida con la cuantificación de la densidad micro vascular puede ser útil para predecir el grado de displasias orales que repercuta en el pronóstico de los pacientes.

5 HIPÓTESIS

La cuantificación de la densidad microvascular con CD105 es mayor en displasias epiteliales severas que en las displasias epiteliales leves.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Determinar la cuantificación de la densidad microvascular con CD105 en displasias epiteliales leves, moderadas y severas.

6.2 Objetivos específicos

Comparar la cuantificación de la densidad microvascular con CD105 en displasias epiteliales leves, moderadas y severas.

7 MATERIAL Y MÉTODO

7.1 Tipo de estudio

Observacional y transversal.

7.2 Universo de estudio

Displasias epiteliales del Departamento de Patología, Medicina Bucal y Maxilofacial UNAM, en un periodo de 2014 a 2018.

7.3 Muestra de estudio

Seis casos de displasia epitelial oral, dos de cada grado (leve, moderado y severo) de Departamento de Patología, Medicina Bucal y maxilofacial UNAM.

7.4 Criterios de inclusión

Los casos que en HyE se confirme el diagnóstico de displasias epitelial oral leve, moderada y severa.

7.5 Criterios de eliminación

Casos con diagnóstico de displasia epitelial leve, moderada y severa, que en la revisión histológica no coincidan con el diagnóstico.

Casos con muestra insuficiente de tejido.

Casos que no cuenten con bloque de parafina

7.6 Criterios de exclusión

Casos que durante el procesamiento se pierda el tejido.

7.7 Análisis Histopatológico H&E.

De los casos seleccionados se realizó el análisis histopatológico y gradificación de su diferenciación con el fin de clasificar considerando los criterios de la OMS, con apoyo de un especialista de patología bucal.

7.8 Análisis de Inmunohistoquímica (IHQ)

Previo a la realización de la técnica de IHQ se estandarizó la técnica para el anticuerpo y se determinó la dilución a utilizar.

En el primer paso las laminillas se desparafinaron en 2 baños de xilol durante 5 minutos cada uno y rehidratación en 2 baños de alcohol de 100% 3 minutos cada uno, seguidos de dos más en alcohol de 90% durante 3 minutos.

Posteriormente se lavaron con agua corriente, se realizó la recuperación antigénica utilizando un buffer de citratos y se llevó en baño de agua al horno de microondas durante 4 minutos a potencia de 700 W.

Se hicieron 3 lavados con TBS por 3 minutos cada uno para limpiar los residuos y se inhibió la actividad de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrogeno al 3% incubandolo durante 20 minutos en cámara húmeda; y transcurrido el tiempo se hicieron 3 lavados más de TBS por 3 minutos.

Se delimitó la muestra con un lápiz hidrofóbico y enseguida se permeabilizó con Triton X100. Se lavó nuevamente con TBS 3 veces durante otros 3 minutos. Posteriormente se realizó el bloqueo del marcaje

inespecífico con PBS- albumina durante 20 minutos en cámara húmeda y se realizaron 3 lavados de TBS durante 3 minutos.

Se colocó el anticuerpo CD105 dilución 1:200 (marca Santa Cruz Biotechnology ®) en cada laminilla, incubando a 37°C por una hora. Después de la incubación con el anticuerpo se realizaron 3 lavados de 3 minutos con solución TBS. Se incubó por 20 minutos con SuperEnhancer (Super Sensitive Polymer-HRP kits ®) a temperatura ambiente y después se realizaron 3 lavados por 3 minutos con solución TBS.

Se prosiguió a colocar el polímero (HRP) por 20 minutos a 37° C seguido de 3 lavados por 3 minutos con TBS.

Se utilizó diaminobencidina (DAB) como cromógeno y se colocó a cada tejido por 3 minutos. Después de aplicar el cromógeno se lavaron las laminillas con agua corriente, se dejaron en agua destilada desionizada por 5 minutos.

Se realizó la contratinción con hematoxilina por 2 minutos y posteriormente se lavaron con agua corriente y se colocó en agua desionizada. Se realizó la deshidratación de los tejidos con alcohol de diferentes concentraciones y xilol para realizar el montaje con resina hidrofóbica. Y se dejaron secar para después poder observar en el microscopio.

7.9 Análisis de inmunexpresión

Para evaluar la expresión inmunohistoquímica el análisis de imágenes se realizó con el programa Leica 750 e ImageJ. Se analizaron a 200 aumentos los sitios con mayor inmunotinción o llamados hot spots. De ellos se tomaron 5 fotografías de cada caso a 400 aumentos con ayuda del fotomicroscopio Leica 750. Se hizo la cuantificación vascular con ayuda del software ImageJ versión 1.8.0 previamente calibrado, y con la

herramienta multipunto. Esto se realizó con el fin de hacer una medición vascular cuantitativa objetiva.

8 RESULTADOS

En los casos de displasias leves y moderadas, se observó una inmunoexpresión nula en los vasos sanguíneos para CD105. Estos datos sugieren que estas displasias no presentan un proceso de neoformación vascular.

En cuanto a las displasias severas se observó una inmunoreacción positiva para CD105 en los vasos de la periferia, cercanos al epitelio de la mucosa. El número de los vasos sanguíneos se reportó en medianas con valores máximos y mínimos. Se obtuvo una mediana de cuantificación de 12 con un valor mínimo de 5 y máximo de 11 vasos contados (Tabla 2).

Tabla 2 Cuantificación densidad microvascular con CD105 en displasias leves, moderadas y severas.

DISPLASIAS	N° de vasos.
Leve	0
Moderada	0
Severa	12 (5-15)

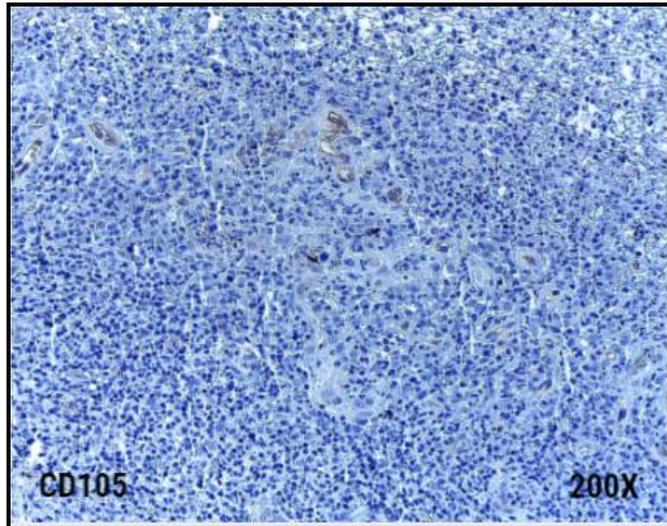


Foto 5 Fotomicrografía Inmunohistoquímica CD105 en Displasia epitelial severa. Evaluación de los sitios de mayor inmunoreacción. F.D

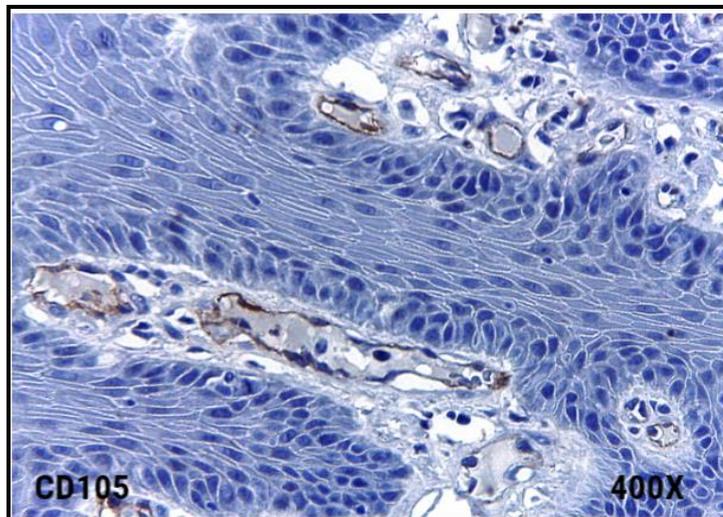


Foto. Fotomicrografía Inmunohistoquímica CD105 en Displasia epitelial severa. Áreas de cuantificación vascular. F.D

9 DISCUSIÓN

Las displasias epiteliales orales son alteraciones que no siempre se transforman en neoplasias malignas. Se ha visto que no hay una regla en cuanto a la progresión de las displasias orales, es decir, no siempre una displasia leve pasará una mediana hasta llegar a severa. Una displasia epitelial leve puede convertirse en meses o años en una displasia severa, o involucionar.

Existen casos de displasias severas que no llegan a ser carcinomas, por lo tanto, sería importante utilizar métodos biomoleculares que nos permitan identificar el grado de progresión de estas lesiones.

Dada las diferencias de diagnóstico por parte de los observadores es fundamental considerar la utilización de marcadores biológicos que midan proliferación celular y capacidad de transformación maligna; y de esta manera lograr unificar criterios para establecer un mejor pronóstico.³⁰ La endogлина está asociada a la proliferación e inducida por la hipoxia y en varios estudios se ha utilizado como marcador de células endoteliales, esto se asocia con el resultado obtenido en nuestro estudio donde se observó que el anticuerpo CD105 posee la ventaja de reconocer sólo los vasos sanguíneos recién formados.

En un estudio de Folkman se reporta un aumento en la vascularidad y angiogénesis durante la actividad proliferativa y de transformación de células epiteliales bucales en el orden de permitir su crecimiento.⁶ En nuestro estudio se observó que en las displasias epiteliales severas hubo aumento de la densidad microvascular. Por lo que la cuantificación de la densidad microvascular tiene un papel significativo para proveer información pronóstica sobre las displasias epiteliales.

10 CONCLUSIONES

En este estudio observamos que la MVD es útil para diferenciar las displasias epiteliales leves y moderadas de las severas, debido a que éstas últimas mostraron valores de cuantificación con CD105 mucho mayores.

No encontramos diferencias entre la cuantificación de las displasias epiteliales leves y moderadas, lo cual puede ser debido a que éste es un estudio piloto, con una muestra pequeña. Se sugiere realizar estudios posteriores con un mayor número de casos que nos permita identificar si existe o no dicha diferencia.

Por último, proponemos en estudios futuros, comparar los resultados de MVD en las displasias con el carcinoma oral de células escamosas, que nos permita evidenciar si a mayor severidad habrá una mayor formación de vasos sanguíneos. Reiterando que la terapia antiangiogénica contra las células endoteliales es evaluada actualmente como una terapia novedosa para enfermedades malignas.

11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Martínez JD, Herrera LA. Angiogénesis: VEGF/VGFRs como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer. Instituto Nacional de Cancerología-Instituto de Investigaciones Biomédicas. Taller de Biología Molecular del Cáncer, Facultad de Ciencias, UNAM. 2006.
2. Cotran R.S, Kumar, V. y Collins T. Robbins Patología Estructural y Funcional. 9ª edición Madrid: Editorial Mc Graw-Hill Interamericana, Ediciones Mosby. 2015. Pp. 103-105.
3. Rosell A, Montaner J, Álvarez J. Implicación de la angiogénesis en la isquemia cerebral humana. Rev. Neurología 2004; 4; 38 (11): 1076-10821076
4. Sánchez V. Papel de la Angiogénesis en el crecimiento tumoral. Rev cubana Invest Bioméd. 2001, vol.20, n.3 [citado 2019-02-19], pp.223-230.
5. Saavedra JS, Zuñiga LF, Freyre SI, Wilson G, Salguero C. El rol de vegf en la angiogénesis fisiológica y tumoral. Rev Medicina, 39(3) 2017.
6. Folkman J, Shing Y. Angiogénesis. J Biol Chem. 1992;267:10931-10934.
7. Biología celular del cáncer. 2015. Disponible en: <https://d12015.wordpress.com/2015/03/31/biologia-celular-del-cancer/>
8. Jiménez R, Solares S. Angiogénesis en cáncer renal. Cancerología. 2006;1: 113-121. Angiogenia Fuente: Adaptado y modificado a

partir de los desarrollos de Edward M. Conway. Mecanismos moleculares del crecimiento de los vasos sanguíneos. Cardiovasc Res. 2001; 49 (1): 507-21.

9. Miyata Y, Sakai H. Reconsideration of the clinical and histopathological significance of angiogenesis in prostate cancer: Usefulness and limitations of microvessel density measurement. International journal of urology. (2015): 22(9), 9806-815.

10. Cwiklinska A, Sostyl 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

11. Mayor M.C, Pacheco DJ. Correlación clínico-histopatológica del cáncer de próstata localmente avanzado y la angiogénesis.
12. Kumar, Abbas, Fausto, Aster, Robbins y Cotran. Patología estructural y funciones. Elsevier Saunders, 8ª ed, España, 2010.

13. Análisis de puntos calientes optimizado- ArcGISPro_ArcGIS Desktop (citado el 20 de febrero de 2019) disponible en: <https://pro.arcgis.com/es/proapp/toolreference/spatialstatistics/optimized-hot-spot-analysis.htm#L>

14. ImageJ. disponible en: <https://www.filecluster.es/programas/ImageJ-118530.html> .

15. Julie S, Nielsen , Kelly M, Andrews R.G, Singer JW. Novedosas funciones de la familia de CD34. Journal of cells Science. 2008; 121:3683-3092

16. Macías C. CD31: Molécula de adhesión de células endoteliales plaquetarias-1. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 2006

17. Danying L, Heng M, Newman PJ, Lertklatmongkoil P, Liao D. Funciones endoteliales de la molecula de adhesión de las células plaquetarias/ endoteliales y (CD31). Curro pin Hematol. 2016; 23 (3) 253-9.
18. Saad RS, Liu YL, Nathan G, Celebrezze J, Medich D. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer JO - Modern PathologyPY - 2003
19. García L, Miquilena ME, Lozano T, García C. Endoglina: estructura, funciones biológicas y papel en la fibrogénesis. Rev. Esp Enferm Dig 2008; 100: 355-360.

Folpe, AL, Gown, AM. Inmunohistochemistry for análisis of soft tissue tumors, soft tissue Tumors, Mosby, In C, St, Missouri, 2001, pp 199-245
20. Fonsatti, E, Altomonte M, Nicotra M, Giorgio P, Maio M, Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenetic blood vessels. Nature publishing Group, 2003, (22). 6557-6563
21. Metcalfe E, Arik D, Oge T, Etiz D, Yalcin OT, Kabukcuoglu S, et al. CD105 (endoglin) expression as a prognostic marker of angiogenesis in squamous cell cervical cancer treated with radical radiotherapy. J Can Res Ther 2018; 14:1373-8.9.
22. Dallas N, Shaija S, Ling X , Fan F , Michael J.G , Sherry J. Endoglin (CD105) A Marker of Tumor Vasculature and Potential Target for Therapy. American association for cancer reserch. 2008.

23. Akagi, Kazunari ET. Estimation of angiogenesis with anti-CD105 immunostaining in the development process of colorectal cancer Cirugía, Volumen 131. Pub Med. 2002.
24. Reda S, Yulin L, Girija N, James C, David M. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. Modern Pathology. E.U.A y Canadá, 2003.
25. Fernández MT, Fantova MJ, Abadal M, Gómez JM. Cáncer de mama estudio RM de angiogénesis vascular e índice de proliferación celular. Rev sociedad española de radiología médica. 2012;10.1954.
26. Miyata Y, Mitsunari K, Akihiro A, Kosuke K. Significación patológica y función pronóstica de la densidad de los microvasos, evaluada mediante CD31, CD34 y CD105 en pacientes con cáncer de próstata después de una prostatectomía radical con terapia neoadyuvante. PubMed; 2013.
27. Echebarr A, Urizar A. Displasia epitelial: Concepto y significación. *Odontoestomatol.* 2008, vol.24, n.1 (citado 2019-02-27).
28. DeLong L. Burkhart N. Patología oral y general en odontología. 2da Ed. México; Editorial Wolters kluwer, 2015.pp 37-38. 20.
29. Fleskens S, Slootweg P. Sistemas de clasificación en displasia de cabeza y cuello: valor pronóstico, debilidades y utilidad. *Cabeza Cuello Oncol.* 2009; 10.1186 / 1758-3284-1-11
30. Fernández M E, Rodríguez I, Miranda J, Batista Z. Displasia epitelial como característica histopatológica del liquen plano bucal. Rev Habanera de ciencias médicas. 2009.

31. Kujan O, Richard J.O, Ammar K, Stephen AR, Nalin T, Philip S. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. Rev. Oral oncology Elsevier, 2005.

32. Müller S, DMD Oral epithelial dysplasia, atypical verrucous lesions and oral potentially malignant disorders: focus on histopathology. Volume 125, Issue 6. Rev Elsevier. 2018.

33. Castellanos J.L Displasias y carcinomas de la mucosa oral. Revista ADM. 2002, 54, 154-156.