



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

INMUNOEXPRESIÓN DE erbB1, erbB2 Y TGFR- β I EN CARCINOMA ORAL DE
CELULAS ESCAMOSAS.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A:

HÉCTOR RAMÍREZ RANGEL

TUTOR: Mtro. LUIS FERNANDO JACINTO ALEMÁN

ASESORES: DR. JUAN CARLOS CUAUHTÉMOC HERNÁNDEZ GUERRERO
DRA. MARÍA DOLORES JIMÉNEZ FARFÁN
CD. CLAUDIO VIVEROS AMADOR.

MÉXICO, D.F. 2011

Este estudio fue financiado por el proyecto PAPIIT IN 228407-2, IN226809-2.



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.

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dándome ánimo, acompañándome en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

Agradezco a mis padres Gloria y Rafael por ser las personas que siempre me han apoyado incondicionalmente en todo.

Al Dr. Luis Fernando Jacinto Alemán por aceptarme para realizar esta tesis, por la paciencia y por la dirección de este trabajo, por su disponibilidad y sus siempre atentas y rápidas respuestas a las diferentes inquietudes surgidas durante todo este tiempo, además de su gran amistad. GRACIAS

Al Dr. Juan Carlos Cuauhtémoc Hernández Guerrero, por los consejos, el apoyo y el ánimo que me brindó, le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades necesarias para desarrollar este trabajo. GRACIAS

A la Dra. María Dolores Jiménez Farfán por sus comentarios en todo el proceso de elaboración de la Tesis y sus atinadas correcciones.

Al Dr. Claudio Viveros Amador por su apoyo, colaboración y amistad.

A la Universidad Nacional Autónoma de México la máxima casa de estudios por haberme dado la oportunidad de ser parte de ella y convertirse en todo este tiempo en mi segunda casa.

¡Gracias!

DEDICATORIAS

A mi madre, por todo el amor que siempre me ha tenido.

A mi padre, por ser mi gran ejemplo.

A ellos, porque gracias a ellos soy quien soy.

A mis hermanos Rafael, Alejandro y Heliana, que desde un principio hasta el día hoy siguen dándome ánimo para seguir adelante.

INDICE

Introducción	1
Antecedentes	2
Factores de riesgo de carcinoma oral de células escamosas	2
Características clínicas	4
Métodos de diagnóstico	4
Eventos relacionados con la carcinogénesis	6
erbB y cáncer	6
TGFR y cáncer	7
Planteamiento del problema	9
Justificación del problema	10
Hipótesis	11
Objetivo general	11
Objetivo específico	11
Tipo de estudio	11
Universo o población	11
Materiales y métodos	12
Obtención y análisis de muestras	13
Inmunohistoquímica	13
Observación y análisis de muestras	14
Recursos	15
Criterios de inclusión	15
Criterios de exclusión	15
Criterios de eliminación	15
Variable independiente	16
Variable dependiente	16
Método para procesamiento de datos	16
Análisis estadístico de datos	16
Resultados	17
Discusión	23
Conclusión	26
Bibliografía	27

RESUMEN

El Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE) es una neoplasia maligna de origen epitelial, más del 90% de todas las neoplasias malignas bucales pertenecen a este tipo de neoplasias. Diversos receptores de factores de crecimiento como el erbB1, erbB2 y TGFR- β I participan en la proliferación y diferenciación del tejido epitelial. Debido a la importancia de los receptores del factor de crecimiento en el desarrollo del tejido epitelial, el objetivo de este estudio fue determinar la correlación de la inmunoexpresión de erbB1, erbB2 y TGFR- β I con el grado de diferenciación del paciente con COCE. En 28 muestras de COCE se determinó el grado de diferenciación según la OMS y se realizó análisis inmunohistoquímico de erbB1, erbB2 y TGFR- β I de manera individual y se realizó análisis de correlación de Spearman. Los resultados obtenidos mostraron que erbB1 presentó una correlación en su nivel de expresión con el grado de diferenciación. El erbB2 presentó una expresión elevada y el TGFR- β I presentó disminución en su expresión en relación a la pérdida de diferenciación. Estos hallazgos nos proporcionan mayor información acerca del comportamiento biológico de esta neoplasia.

INTRODUCCIÓN

La cavidad bucal está cubierta por mucosa, la cual consta de epitelio plano estratificado y tejido conectivo vascularizado de sostén, también llamado lámina propia. La transformación maligna de este epitelio conduce a la formación de carcinomas.

El carcinoma oral de células escamosas es una neoplasia maligna de origen epitelial, más del 90% de todas las neoplasias malignas bucales pertenecen a este tipo de neoplasia. Este carcinoma puede variar en su grado de diferenciación, el cual está basado en el parecido de las células neoplásicas con el epitelio de origen.

El carcinoma oral de células escamosas a diferencia de otras neoplasias permanece en una situación local-regional por un largo periodo de tiempo, debido a que la metástasis a otros órganos se desarrolla solo en estados tardíos de la enfermedad.

El proceso de carcinogénesis se caracteriza por la desregulación de funciones celulares normales como la división, la diferenciación y la muerte celular.

Alteraciones en diversas moléculas, tales como citocinas, hormonas, incluyendo factores de crecimiento han sido señaladas en diversas investigaciones. La participación de la familia de receptores EGF y TGF en varios tipos de carcinomas, se ha relacionado con procesos de proliferación, diferenciación, adhesión y motilidad celular así como con características clínicas, histológicas y supervivencia de los pacientes. El establecimiento de relaciones entre la expresión de estas moléculas, con el grado de diferenciación podrían ayudar en la comprensión de la conducta biológica de esta neoplasia.

ANTECEDENTES

CARCINOMA EPIDERMÓIDE

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es una neoplasia maligna epitelial invasiva que presenta diversos grados de diferenciación, cuenta con un patrón de diseminación a linfonodos locales y regionales. Se presenta predominantemente entre la quinta y sexta década de la vida, mayormente en personas que consumen alcohol y tabaco.¹

En el año 2002, datos de la OMS reportaron la incidencia de 10.9 millones de nuevos casos de neoplasias malignas, 6.7 millones de muertes y la existencia de 24.6 millones de personas que viven con algún tipo de cáncer. El cáncer oral representó 274,000 casos a nivel mundial.² En México la incidencia de neoplasias malignas fue de 103,200 casos. El cáncer oral representó 0.75% del total (774 casos),³ así como el 1.2% del total de muertes por neoplasias.⁴

FACTORES DE RIESGO DE CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS

Dentro de los factores de riesgo asociados se ha considerado que el género, edad, condiciones socioeconómicas, estado nutricional, el consumo de tabaco y alcohol e incluso las infecciones por virus son factores de riesgo para el desarrollo de una neoplasia oral.⁵

Se considera que los hombres presentan una mayor proporción en su incidencia (2:1) en base a sus conductas sociales, sin embargo, el consumo de alcohol y tabaco por las mujeres ha promovido la equiparación de esta proporción.⁶ La edad se considera un factor proporcional, es decir, a mayor edad mayor riesgo. Diversos estudios han demostrado que el número de mutaciones en ADN aumentan, así como disminuye la capacidad de reparación en el material genético conforme se envejece.⁷

Leite y Koifman demostraron que el desarrollo y/o desenlace del carcinoma es negativo cuando los pacientes se relacionan o habitan en condiciones socioeconómicas y culturales bajas o limitadas. Esto se atribuye al pobre cuidado bucal, falta de aporte nutricional y a la carencia de servicios médicos.⁸⁻¹⁰

Dentro de los factores de riesgo para el desarrollo neoplásico el tabaco, alcohol e infección viral son considerados de amplia importancia. El 80 al 90% de los casos de cáncer oral y orofaringe se relacionan al fumar y/o mascar tabaco. Se ha comprobado que el humo del cigarrillo provoca mutaciones en el ADN, aterosclerosis y causa lesiones crónicas en los pulmones, además de aumentar el proceso de envejecimiento ya que impide la oxigenación tisular y deprimir el sistema inmune. Estas alteraciones son debidas a los componentes del tabaco tales como alquitranes, benzopirenos, nitrosaminas y CO₂.^{11,12} El alcohol se considera un factor de riesgo sinérgico al tabaco. El etanol al ser oxidado en la cavidad bucal por la enzima alcohol deshidrogenasa clase III conduce alteraciones en el metabolismo oxidativo. El riesgo relativo para el desarrollo de cáncer oral, orofaringe, faringe y laringe se incrementa cuando se consume en forma conjunta tabaco y alcohol.¹ De igual forma, la infección por virus de papiloma humano (VPH) es tomado en cuenta como un factor de riesgo importante, hasta el momento se han reconocido más de 100 subtipos, algunos con capacidad oncogénica. Los subtipos VPH 16, 18 y 32, que son virus ADN epiteliotrópicos, son reconocidos como oncogénicos en cérvix de útero y piel, además de encontrarse en carcinomas orales de células escamosas, carcinomas tonsilares y de orofaringe.^{14,15}

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

El desarrollo de un COCE puede iniciar con el desarrollo de una lesión premaligna. Una lesión premaligna puede ser definida como una alteración morfológica de tejido, en la cual, es más probable que desarrolle una neoplasia comparado con su contraparte clínicamente normal.¹⁶ Dentro de las lesiones consideradas como premalignas se encuentra la leucoplasia, eritroplasia, liquen plano y la fibrosis submucosa.¹⁶

El COCE se puede presentar en cualquier sitio de la cavidad bucal pues la mayoría del revestimiento bucal es epitelio estratificado. Los sitios de localización preferente incluyen: mucosa yugal, encía superior e inferior, paladar duro, los dos tercios anteriores, parte dorsal, ventral y lateral de lengua y piso de boca.¹⁷

Los pacientes con COCE pueden referir signos y síntomas vagos, junto con hallazgos físicos mínimos o incluso ser asintomáticos. Los signos y síntomas pueden ser: aumento de tamaño con ulceraciones en mucosa, dolor, halitosis, dificultad para abrir la boca, dificultad para masticar, dolor al hablar, dolor a la deglución, y pérdida de peso. Los carcinomas de mayor avance se presentan como crecimientos ulceroproliferativos con áreas de necrosis con extensiones a estructuras circundantes, como hueso, músculo y piel.^{18,19} En etapas terminales, los pacientes pueden presentar fistulas orocutaneas, hemorragias constantes, con anemias y caquexias severas.^{19,20} Es importante considerar que las características clínicas varían de acuerdo con el sitio anatómico afectado.

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Para el establecimiento del diagnóstico definitivo de un COCE los parámetros clínicos, estudios radiológicos y principalmente el análisis histopatológico son necesarios.¹⁷⁻¹⁹ Actualmente el uso de estudios moleculares ha probado aportar mayor información sobre la conducta biológica de esta neoplasia.¹⁷⁻¹⁹

Las radiografías intrabucales en combinación con ortopantomografías pueden ayudar en la identificación del hueso subyacente afectado. Imágenes extrabucales tales como la tomografía axial computarizada y resonancia magnética son utilizadas para determinar el grado de invasión y afección de linfonodos subyacentes y así obtener información prequirúrgica.²¹ El análisis histopatológico es el método por el cual se obtiene el diagnóstico definitivo.

Las características más relevantes del COCE son la pérdida de la diferenciación histológica en los estratos celulares y la disrupción de la membrana basal por la transformación epitelial e invasión del estrato basal epitelial hacia tejido conjuntivo.¹

La OMS clasifica al COCE en tres tipos: bien, moderado y pobremente diferenciado. Esta clasificación analiza número y tipo de mitosis, la queratinización y pleomorfismo celular y nuclear. Se considera que el grado de diferenciación histológico y la agresividad de la neoplasia son inversamente proporcionales, es decir a menor diferenciación mayor agresividad. El mejor sitio para realizar esta evaluación lo constituye el frente invasivo del tumor.

Las características particulares de cada grado de diferenciación son:

- Carcinoma Bien diferenciado. Generalmente se consideran como los de comportamiento menos agresivo además de conservar la función activa de producción de numerosas perlas de queratina, importante queratinización individual con puentes intracelulares, menos de 2 mitosis por campo histológico, raras mitosis atípicas, pleomorfismo celular y nuclear reducido.²²
- Carcinoma Moderadamente diferenciado. Son neoplasias que producen escasa o nula queratina, presenta 2 a 4 mitosis por campo histológico, y presencias atípicas, moderado pleomorfismo celular y nuclear, puede ser todavía reconocible como epitelio plano estratificado a pesar de su importante desviación de la normalidad.²²
- Carcinoma Pobremente Diferenciado. Estas neoplasias generalmente presentan un comportamiento más agresivo, dado que no presentan perlas de queratina, es prácticamente inexistente la queratinización individual, existen más de 5 mitosis por campo histológico y frecuentes mitosis atípicas. El pleomorfismo celular y nuclear es pronunciado.²²

Actualmente avances en la biología celular y molecular han sido orientados a la búsqueda de moléculas (biomarcadores) que pueden ser asociados con parámetros clínicos, histológicos, formulación de fenotipos, tratamiento y conducta de una neoplasia, con la finalidad de mejorar el pronóstico del paciente.²³

EVENTOS RELACIONADOS CON LA CARCINOGENESIS

La carcinogénesis es un proceso por el cual factores ambientales y genéticos producen el desarrollo de una neoplasia. Entre los factores de riesgo ambientales se encuentra el tabaquismo la dieta y el sobrepeso, factores reproductivos y hormonales, virus y parásitos y la exposición a carcinógenos ambientales y ocupacionales. Dentro de los factores genéticos asociados al cáncer destaca la presencia de mutaciones, polimorfismos y el riesgo familiar.²⁴

Hanahan y Weinberg describieron seis características esenciales de las células cancerosas.²⁵

Estas características son: Autosuficiencia de las señales de crecimiento, Insensibilidad a las señales de inhibición, Evasión de la apoptosis, Potencial replicativo ilimitado, Angiogénesis e Invasión tisular y metastásis.²⁵

La autosuficiencia de señales se encuentra relacionada a la presencia y actividad de los oncogenes. Dentro de los oncogenes los factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento (EGFR/erbB1, c-erbB2/Her-2, TGFR- β I, etc.) han sido implicados ampliamente con la carcinogénesis.²⁶

erbB Y CÁNCER

Los factores de crecimiento son moléculas de naturaleza proteica, los cuales pueden encontrarse unidos a la membrana celular o bien estar disueltos en líquido extracelular. Su función principal es regular el ciclo celular. Durante la carcinogénesis estas señales pueden perder su regulación debido a aumentos en los niveles del receptor, ligando y/o estimulación autócrina.²⁷ Dentro de los factores de crecimiento implicados en el desarrollo del COCE, el factor de crecimiento epidérmico (EGF, epidermal growth factor) y sus receptores (erbB) han mostrado una gran participación.

La familia erbB esta formada por cuatro miembros: EGFR/erbB1, erbB2 (Neu, Her2), erbB3 y erbB4. Todos los miembros cuentan con regiones extracelulares de unión a ligando, una región simple transmembrana y un dominio citoplasmático con capacidad tirosina cinasa.²⁸ Los genes de erbB1 y erbB2 están localizados en el cromosoma 7p13-q22 y 17q13-21.32, respectivamente.²⁹⁻³¹

La familia de ligandos erbB está formada por EGF, TGF, anfíregulina, betacelulina, epiregulina y neuroregulinas. El primer receptor erbB en ser implicado de manera

directa en el desarrollo de diversos carcinomas fue el erbB1.³² Estudios realizados por Bei y col, reportan que la sobreexpresión del erbB1 es constante en la mayoría de los COCE.^{33,34} El receptor erbB2 no cuenta con ningún ligando reconocido, sin embargo, puede formar heterodímeros con los otros tres miembros de la familia otorgándole una capacidad de activación variable, de acuerdo al tipo de neoplasia.³⁰ La formación de homo y/o heterodímeros de los receptores provoca la fosforilación de aminoácidos tirosina específicos dentro del dominio citoplasmático, lo cual provoca una cascada de señalización intracelular, que tiene como blanco el núcleo para dar inicio a la proliferación celular.³¹ Las dos principales vías de señalización activadas son MAPK y PI3-AKT.

TGFR Y CÁNCER

El factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF- β I) es un regulador general de las actividades celulares con múltiples efectos biológicos. El TGF- β I fue identificado como un producto de células transformadas por el virus de sarcoma murino; sin embargo, actualmente se sabe que es sintetizado por diferentes tipos celulares incluyendo linfocitos, macrófagos, fibroblastos, miocitos, condrocitos, astrocitos, células epiteliales, renales, y plaquetas, así como por algunas células tumorales.³⁵⁻³⁷ su principal función es inducir reversiblemente la transformación e inhibir la proliferación en determinados tipos celulares.

Se han identificado cinco diferentes tipos de receptores para el TGF- β , estos son:

- 1) Los receptores funcionales, como son el tipo I (TGFR- β I de 53 a 65 kilodaltones-kDa-), y el tipo II (TGFR- β II de 83 a 110 kDa).
- 2) Los receptores no funcionales que incluyen el tipo III (TGFR- β III de 250 a 310 kDa), el tipo IV (TGFR- β IV de 60 kDa) y el tipo V (TGFR- β V de 400 kDa).³⁹

Los receptores TGFR- β I, TGFR- β II, TGFR- β III, y TGFR- β V son co-expresados en la mayoría de las células, mientras que el TGFR- β IV se ha identificado en células pituitarias.³⁸

Todas las células normales y la mayoría de las células neoplásicas tienen receptores en su superficie para el TGF- β I. Los receptores TGFR- β I y TGFR- β II son los responsables de los efectos biológicos de TGF- β I en las células de mamíferos. La activación de estos receptores induce eventos intracelulares que intervienen en la diferenciación celular;

induce cambios de expresión de los genes *jun-B*, *c-fos* y *c-myc*; induce recambio de iP3 y evita la inactivación de pRb.

En el contexto de la proliferación celular, la principal función de los receptores del TGF- β I es transducir las señales para mantener a las células detenidas en la fase G1 del ciclo celular. Mutaciones en los receptores y genes involucrados en las vías de señalización para TGF- β I podrían permitir a la célula tumoral iniciar la proliferación celular.³⁹

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El COCE representa un problema de salud mundial debido a su incidencia y supervivencia menor al 50% de los casos diagnosticados, además de afectar considerablemente la calidad de vida de un paciente. Aunado a estos parámetros, el consumo de tabaco y alcohol de forma conjunta se ha incrementado en personas jóvenes, conllevando al aumento del riesgo relativo para padecer esta neoplasia. Dentro de las herramientas utilizadas para el diagnóstico y pronóstico de un paciente con COCE, el análisis histopatológico nos permite diagnosticar y clasificar al COCE en tres grados de diferenciación histológica. La agresividad de las neoplasias en la mayoría de los casos es inversamente proporcional a su grado de diferenciación histológica, es decir a menor diferenciación mayor agresividad. Sin embargo, el curso clínico de cada paciente es diferente a pesar de la presencia de características histológicas en común. Ciertas moléculas pueden ser asociadas a estos parámetros. Algunas pueden ser biomarcadores de exposición, dosis, estructura y función, susceptibilidad, subtipo y pronóstico. En este estudio se plantea la determinación inmunohistoquímica de erbB1, erbB2 y TGFR- β I y su relación con el grado de diferenciación histológico del COCE para el establecimiento de un fenotipo que guíe más clara y certeramente en el diagnóstico y posible comportamiento de la lesión.

JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

La salud oral no solo conlleva el diagnóstico y tratamiento de las estructuras dentales. Los tejidos blandos también requiere la inspección detallada cada vez que un paciente asiste a la consulta con el cirujano dentista. El retraso en el diagnóstico oportuno de lesiones premalignas e incluso ya de neoplasias es un problema serio en el campo odontológico. Esta problemática fomenta el diagnóstico de lesiones ya en estados avanzados, donde la expectativa sobre el pronóstico del paciente es muy variable. Considerando lo antes dicho, la determinación y establecimiento de diagnósticos apoyados en biomarcadores ayudaría a obtener mejores pronósticos.

Las investigaciones sobre la expresión de los receptores erbB1, erbB2 y TGFR- β I han demostrado su participación importante durante el COCE. erbB1 y erbB2 han sido implicados con características neoplásicas como el tamaño tumoral, invasión y metástasis, asociando su función principalmente como inductor de la proliferación celular. Por otro lado, TGFR- β I es considerado como un modulador de la diferenciación celular, al frenar la proliferación. En la actualidad ambos tipo de moléculas son consideradas como blancos terapéuticos. El determinar la inmunexpresión de moléculas en apariencia antagonistas, podría sugerir el fenotipo de expresión asociado en una población de pacientes mexicanos. Incrementando la información sobre la conducta biológica del carcinoma.

HIPÓTESIS

El grado de diferenciación histológico del COCE estará relacionado con cambios en la expresión de receptores para factores de crecimiento epidérmico (erbB1 y erbB2) y receptor del factor de crecimiento transformante β I (TGFR- β I)

OBJETIVO GENERAL

Determinar la correlación de la inmunexpresión de erbB1, erbB2 y TGFR- β I con el grado de diferenciación de pacientes con COCE.

OBJETIVO ESPECÍFICO

- ◆ Determinar las frecuencias medias y proporciones de sexo, edad y zona anatómica de pacientes con COCE.
- ◆ Determinar que grado de diferenciación presente mayor expresión de erbB1, erbB2 y TGFR- β I.
- ◆ Determinar la asociación del patrón de inmunexpresión de erbB1, erbB2 y TGFR- β I con el grado de diferenciación.

TIPO DE ESTUDIO

Descriptivo y retrospectivo.

UNIVERSO O POBLACIÓN

Seis muestras de mucosa sana obtenidas de pacientes que fueron atendidos en el servicio de Cirugía Maxilofacial de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología UNAM.

Veintiocho muestras de COCE obtenidas por medio de biopsias de pacientes con carcinoma primario que se presentaron a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología UNAM y Servicios de Oncología del Hospital General de México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material

Micropipetas ajustables Eppendorf

- ◆ 0.1-2.5 μ l
- ◆ 2-20 μ l
- ◆ 10-100 μ l
- ◆ 100-1000 μ l

Puntas para micropipeta Cole-parmer

- ◆ volumen 0.1-2.5 μ l
- ◆ volumen 20-200 μ l
- ◆ volumen 100-1000 μ l

Tubo para centrifuga de 2.0 ml Eppendorf

Portaobjetos normales Madesa

Cubre objetos Madesa

3 (Trimethoxysilyl) propyl methacrylate

Vasos de precipitados de vidrio

Matraz Elenmeyer

Vasos Koplín de plástico

Probetas de vidrio

Cámara OlympusC-3040 (Tokio Japón)

Software ImageLab

Anticuerpos

- ◆ erbB1 (rabbit polyclonal Sc-03, Santa Cruz, CA)
- ◆ erbB2 (Mouse monoclonal Sc-7301, Santa Cruz CA)
- ◆ TGFR- β I (rabbit polyclonal Sc-398, Santa Cruz CA)

Consumibles

- ◆ PBS 0.1 M, Ph 7.2
- ◆ Agua destilada
- ◆ Hematoxilina de Harris
- ◆ Resina de montaje hidrofóbica en Entellan (Merck, Darmstadt, Alemania)
- ◆ Lápiz hidrofóbicos (Dako Cytomation Pen)

OBTENCIÓN Y ANALISIS DE MUESTRAS

Se obtuvieron seis muestras de mucosa sana retromolar de pacientes sometidos a procedimientos de extracción de terceros molares que asistieron a la clínica de Cirugía Maxilofacial de la División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPeI).

Se obtuvieron veintiocho muestras del archivo de patología bucal de la DEPeI, así como de los acervos del servicio de oncología del Hospital General de México. Todas las muestras fueron de pacientes con diagnóstico histopatológico de carcinoma oral de células escamosas primario, que no recibieron quimio y/o radioterapia y contaban con datos de edad, sexo y zona anatómica de la lesión. Las muestras del departamento de patología bucal fueron proporcionadas por la Dr. Elba Rosa Leyva Huerta y el Dr. Luis Alberto Gaitán Cepeda. Las muestras del Hospital General de México fueron obtenidas gracias a la colaboración del Dr. Enrique Echeverría y Pérez.

Todas las muestras fueron procesadas de manera convencional para su inclusión en parafina y obtención de cortes seriados de 4µm, para efectuar tinción con Hematoxilina y Eosina. La gradificación histológica de los COCE según los parámetros de la OMS, fue realizada por dos patólogos bucales.

INMUNOHISTOQUÍMICA

Los cortes fueron desparafinados y rehidratados en baños de xilol y alcohol, para un posterior enjuague en solución buffer de fosfatos, (PBS) por 5 minutos. Se realizó la recuperación antigénica por medio de la técnica de buffer de citratos a 0.1M, se realizaron 3 enjuagues en PBS por 5' cada uno, se inhibió la peroxidasa por medio de una solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3% por 20', se efectuaron 3 enjuagues con PBS por 5' cada uno, se incubó a temperatura ambiente en cámara húmeda con una solución de albúmina al 2% por 20', se lavó 3 veces con PBS por 5' cada enjuague, Los cortes fueron inmersos en una solución de tritón x-100 al 0.2% por 20', fueron enjuagados 3 veces en PBS por 5' cada enjuague. Los cortes fueron incubados toda la noche a 4°C en cámara húmeda con los anticuerpos primarios. Posteriormente se lavó 3 veces con PBS por 5' cada enjuague, se incubó con el anticuerpo secundario sistema multilink (Dakocytomation) durante 30' a temperatura ambiente, se lavó 3 veces con PBS por 5' cada enjuague y se incubó durante 30' a temperatura ambiente con extravidina+HRP, se reveló con diaminobencidina (DakoCytomationLiquid DAB+

Substrate Chromogen System Carpinteria, CA), se contratiñó núcleos con hematoxilina de Harris por 10'' y montó las muestras con resina hidrofóbica. Se realizó la interpretación y cuantificación inmunohistoquímica (IHQ).

OBSERVACIÓN Y ANÁLISIS DE MUESTRAS

Las muestras fueron analizadas con el microscopio Olympus BX-40. Las imágenes fueron capturadas con la cámara Olympus C-3040. Las dimensiones de las fotomicrografías fueron de 640x480 pixeles de tres campos ópticos diferentes. Posteriormente para su análisis se utilizó el programa Imagelab (MCM Design Dinamarca).

Para obtener el índice de expresión digital se recurrió al porcentaje de células marcadas e intensidad de inmunotinción digital.

El porcentaje de células marcadas (PCM) del tumor de origen epitelial para cada caso, fueron contadas por el Imagelab® mientras que el observador las clasificaba como células positivas o negativas.

$$\text{PCM} = \frac{\text{número de células etiquetadas}}{\text{Total de células contadas}} \times 100 = \%$$

Imagelab® fue utilizado para cuantificar la intensidad del color. Para cada caso, las microfotografías usadas para determinar el PCM fueron consideradas. El promedio de la densidad óptica de estas aéreas fue calculado automáticamente y representa el promedio de color rojo, verde y azul (RGB) por el área del citoplasma a analizar, expresado en unidades ópticas por el micrómetro ajustado ($\text{ou}/\mu\text{m}^2$) el mismo procedimiento fue aplicado para obtener la densidad óptica del fondo (DOF) de un área sin tejido o espacio vascular para cada fotomicrografía. El color blanco absoluto que corresponde al máximo de la densidad óptica del fondo ($320.7 \text{ ou}/\mu\text{m}^2$) es compuesto por la totalidad de rojo, de verde y el azul. Para determinar la intensidad de inmunoexpresión digital (DOF) se uso la siguiente fórmula:

$$I_{\text{dig}} = 320.7 - \frac{320.7 \times \sum \text{DO}}{\sum \text{DOF}} = \text{ou}/\mu\text{m}^2$$

El índice digital de la expresión (IE_{dig}) fue obtenido por la multiplicación del PCM por la I_{dig} para cada caso.

$$IE_{dig} = \frac{PCM \times I_{dig}}{100} = ou/\mu m^2$$

RECURSOS

HUMANOS

Patólogos Bucales.

Asesor en inmunohistoquímica.

INFRAESTRUCTURA

Laboratorio de Inmunología de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología en la Universidad Nacional Autónoma de México.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Muestras que fueron diagnósticas histológicamente como COCE.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Muestras que no contaron con datos de identificación del paciente así como indicación de la zona anatómica.

Muestras de COCE recurrente o secundario.

Muestras de pacientes que recibieron radioterapia y/o quimioterapia.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Son todas aquéllas muestras que sufrieron daños en el tejido durante el procesado inmunohistoquímico.

VARIABLE INDEPENDIENTE

- ◆ Grado de diferenciación de las muestras obtenidas.
- ◆ Zona anatómica.
- ◆ Edad.
- ◆ Sexo.

VARIABLE DEPENDIENTE

Grado de expresión de erbB1, erbB2 y TGFR- β 1.

MÉTODO PARA PROCESAMIENTO DE DATOS

Los datos fueron agrupados en una tabla donde se registro edad, sexo, zona anatómica, grado de diferenciación histológica y expresión de las tres moléculas.

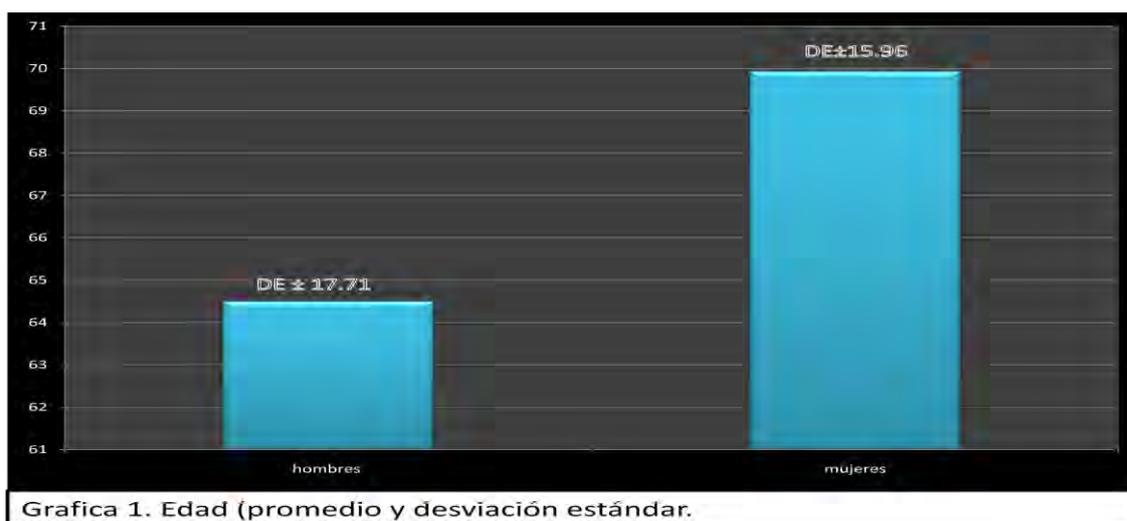
PACIENTE	EDAD	SEXO	ZONA ANATOMICA	GRADO DIFERENCIACION	erbB1	erbB2	TGFR β 1

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

Se realizaron mediciones de tendencia central y dispersión, así como la prueba de correlación de Spearman, utilizando el programa SPSS 10.0.

RESULTADOS

De los veintiocho casos obtenidos 12 (42.86%) pacientes fueron del género masculino y 16 (57.14%) del género femenino (gráfica 1). El promedio de edad fue de 67.60 (± 17.71) años. El promedio de edad del género masculino fue de 64.5 (± 20.11) años y del femenino de 69.93 (± 15.96) años. El rango de la edad fue de 31 a 93 años.



Respecto a la distribución según la zona anatómica, la región donde se localizó más frecuentemente el COCE fue la mucosa oral con 19 casos (67.86%), le siguió la lengua con 5 casos (17.86%) y paladar con 4 casos (14.28%); en piso de boca no se presentaron casos en este estudio. (Tabla 1)

Tabla 1. Sitios de localización de los 28 casos		
REGIÓN ANATÓMICA	# DE CASOS	PORCENTAJE
LENGUA	5	17.86%
PISO DE BOCA	0	0%
PALADAR	4	14.28%
MUCOSA	19	67.86%
TOTAL DE CASOS	28	100.00%

Al realizar el análisis histológico de las mucosas sanas y los carcinomas, la mucosa sana presento epitelio escamoso estratificado con proyecciones papilares hacia el tejido conjuntivo con mínimo/ausente infiltrado inflamatorio (Fig. 1a). Los COCE fueron gradificados según los parámetros de la OMS, obteniendo 9 casos de COCE bien diferenciado que correspondió al 32.14% (Fig. 1b), 12 fueron moderadamente diferenciados representando el 42.86% (Fig. 1c) y 7 casos fueron pobremente diferenciados representando el 25% (Fig. 1d).

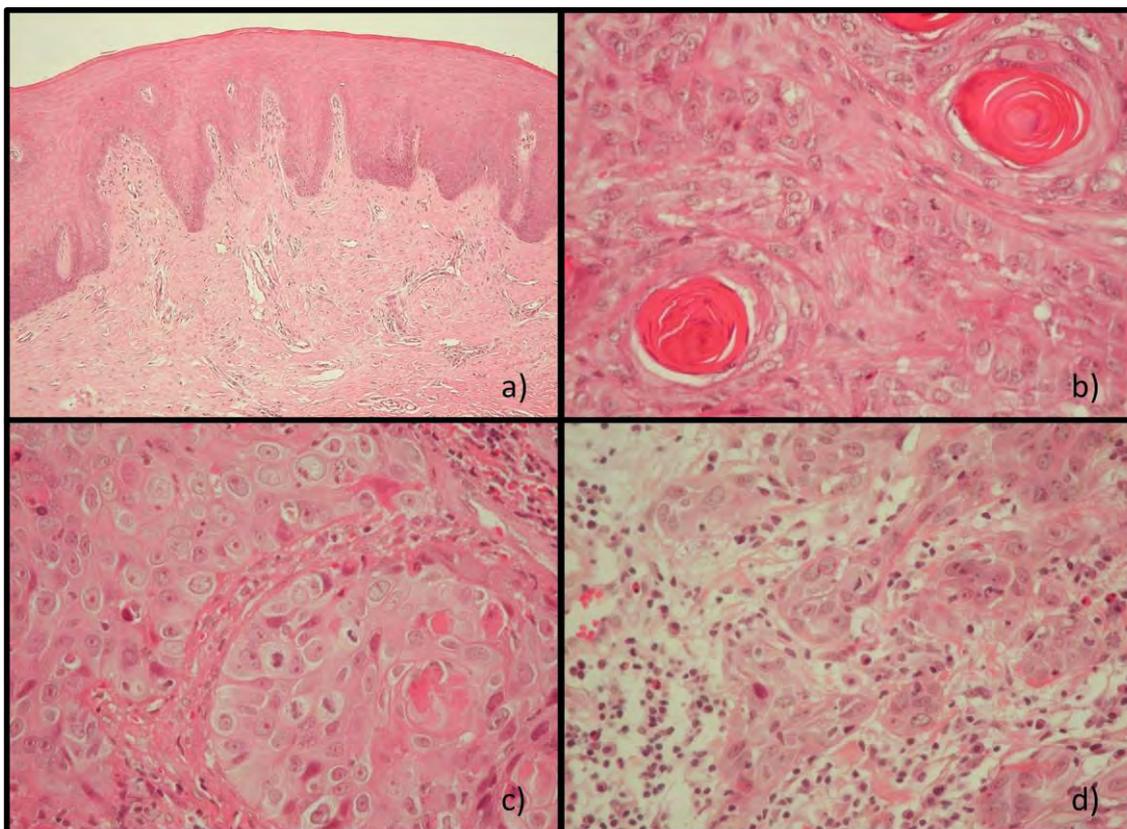
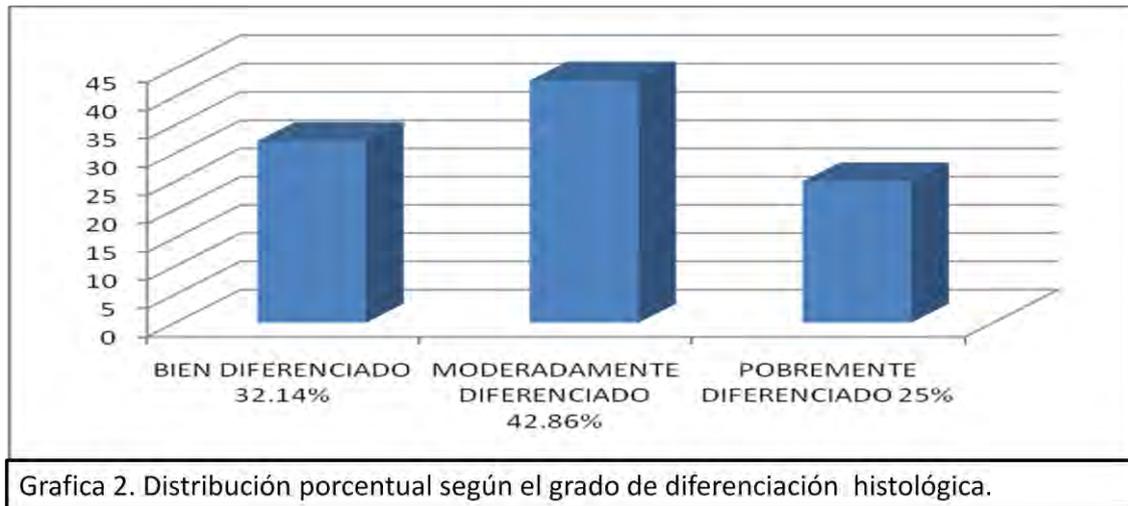


Figura 1. Fotomicrografías a 40x de a) Mucosa sana. b) COCE bien diferenciado. c) COCE moderadamente diferenciado. d) COCE pobremente diferenciado.



Análisis inmunohistoquímico

erbB1

El análisis inmunohistoquímico de mucosas sanas para erbB1 indicó positividad en el 100% de las muestras analizadas presentando mayor expresión en células del estrato espinoso a nivel del citoplasma y membrana. La densidad óptica promedio de inmunoexpresión digital fue de $82.38 \pm 6.41 \text{uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig. 2a). El análisis inmunohistoquímico de los COCE bien diferenciados indicó una expresión digital de $102.7 \pm 5.33 \text{uo}/\mu\text{m}^2$ con mayor expresión en membrana plasmática y citoplasma (Fig. 2b). Los COCE moderadamente diferenciados presentaron una expresión digital de $74.86 \pm 9.04 \text{uo}/\mu\text{m}^2$ preferentemente en citoplasma (Fig. 2c), Los COCE pobremente diferenciados presentaron expresión digital para erbB1 de $64.42 \pm 8.24 \text{uo}/\mu\text{m}^2$ a nivel citoplasma (Fig. 2d, Tabla 2),

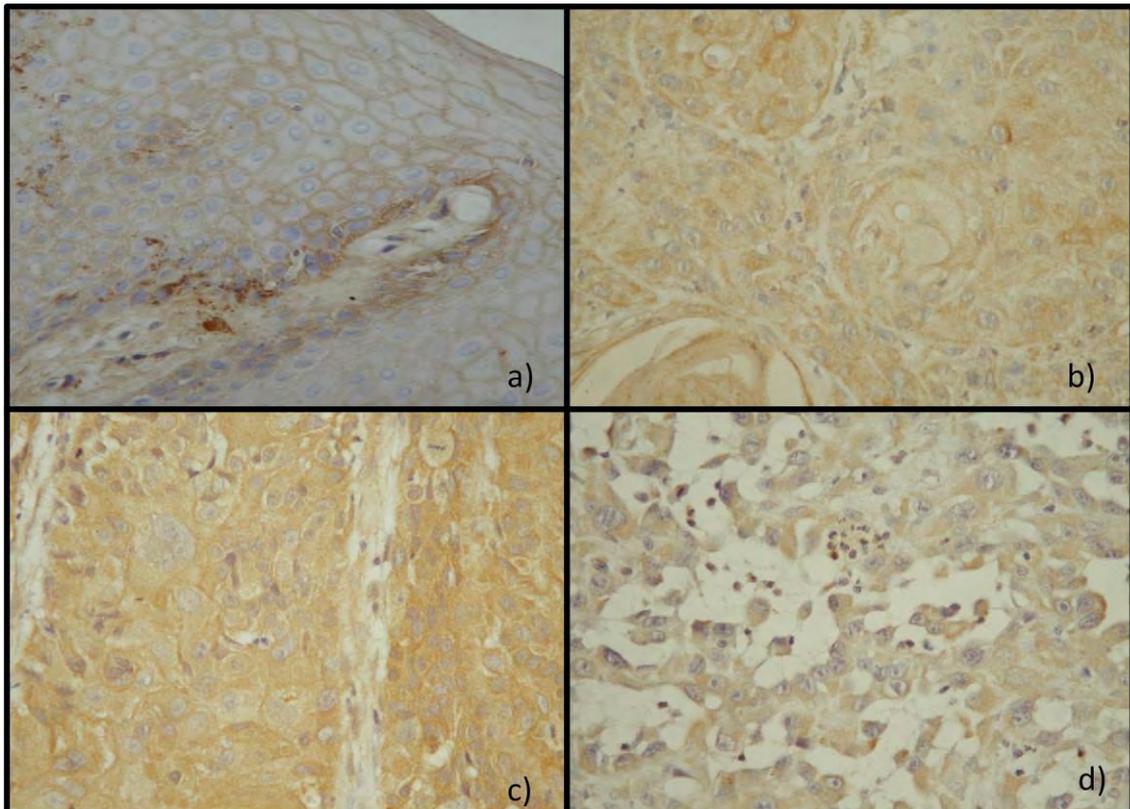


Figura 2. Fotomicrografías a 40x de con inmunotinción de erbB1 a) Mucosa sana. b) COCE bien diferenciado. c) COCE moderadamente diferenciado. d) COCE pobremente diferenciado.

erbB2

El análisis inmunohistoquímico de mucosas sanas para erbB2 presento menor expresión comparado con erbB1, localizándose principalmente a nivel de membrana en los estratos granuloso y corneo únicamente en el 33.3% de las muestras con una densidad óptica promedio de inmunoexpresión digital de $48.27 \pm 5.87 \text{uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig. 3a). El análisis inmunohistoquímico de los COCE bien diferenciados presentaron expresión predominante en membrana plasmática con menor expresión a nivel citoplasma, su densidad óptica promedio de inmunoexpresión digital fue $94.4 \pm 8.64 \text{uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig. 3b). Los COCE moderadamente diferenciados mostraron una densidad óptica promedio de inmunoexpresión digital de $83.36 \pm 10.8 \text{uo}/\mu\text{m}^2$ en membrana plasmática (Fig. 3c). Los COCE pobremente diferenciados presentaron expresión digital de mayor intensidad comparado con erbB1 con un promedio de densidad óptica de inmunoexpresión digital de $87.92 \pm 20.1 \text{uo}/\mu\text{m}^2$ a nivel de membrana (Fig. 3d, Tabla 2).

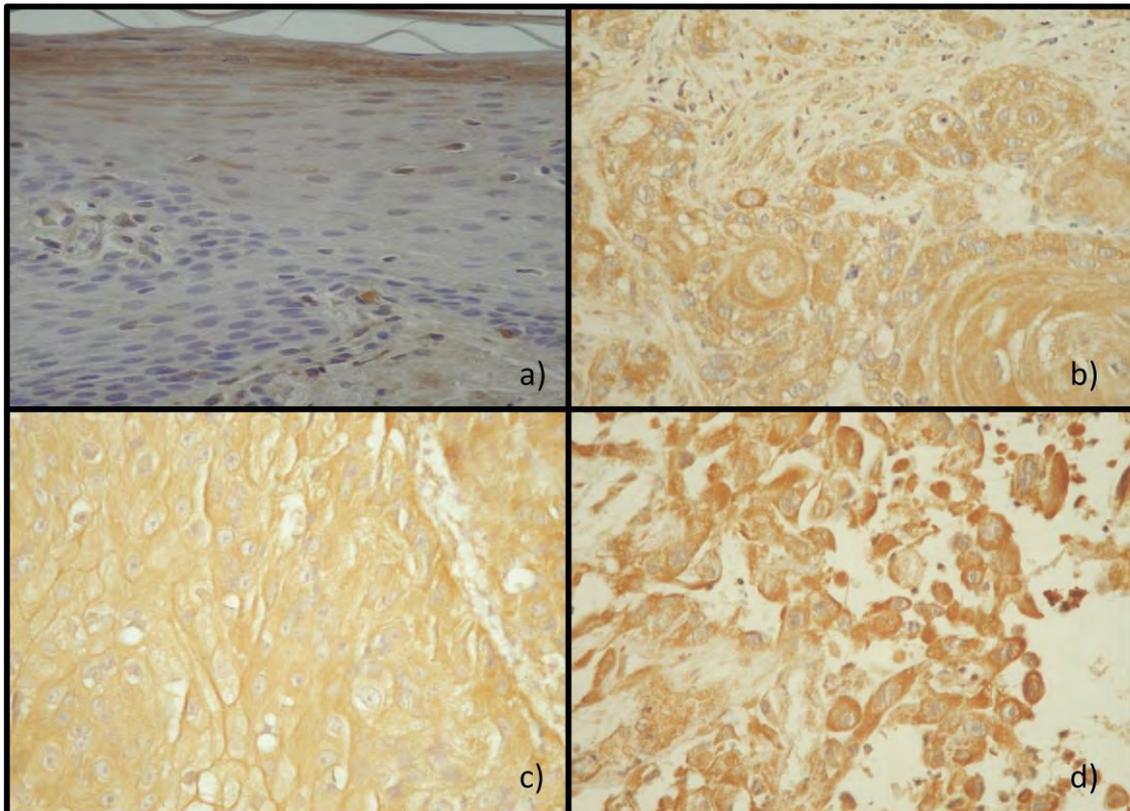


Figura 3. Fotomicrografías a 40x de con inmunotinción de erbB2 a) Mucosa sana. b) COCE bien diferenciado. c) COCE moderadamente diferenciado. d) COCE pobremente diferenciado.

TGFR-βI

El análisis inmunohistoquímico de mucosas sanas para TGFR-βI se expresó en el 100% de las muestras analizadas presentando mayor expresión en células del estrato espinoso y granuloso a nivel del citoplasma con una densidad óptica promedio de inmunoexpresión digital de $35.74 \pm 7.87 \text{ uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig.4a).

El análisis inmunohistoquímico de los COCE bien diferenciados para TGFR-βI presento mayor expresión a nivel citoplasmático; su densidad óptica promedio de inmunoexpresión digital fue de $30.91 \pm 3.53 \text{ uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig. 4b). Los COCE moderadamente diferenciados presentaron una expresión mayoritariamente en citoplasma, con un promedio de densidad óptica de inmunoexpresión digital de $22.07 \pm 14.45 \text{ uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig. 4c). Los COCE pobremente diferenciados presentaron expresión digital para TGFR-βI en citoplasma mostrando un promedio de densidad óptica de inmunoexpresión digital de $20.60 \pm 7.51 \text{ uo}/\mu\text{m}^2$ (Fig. 4d, Tabla 2).

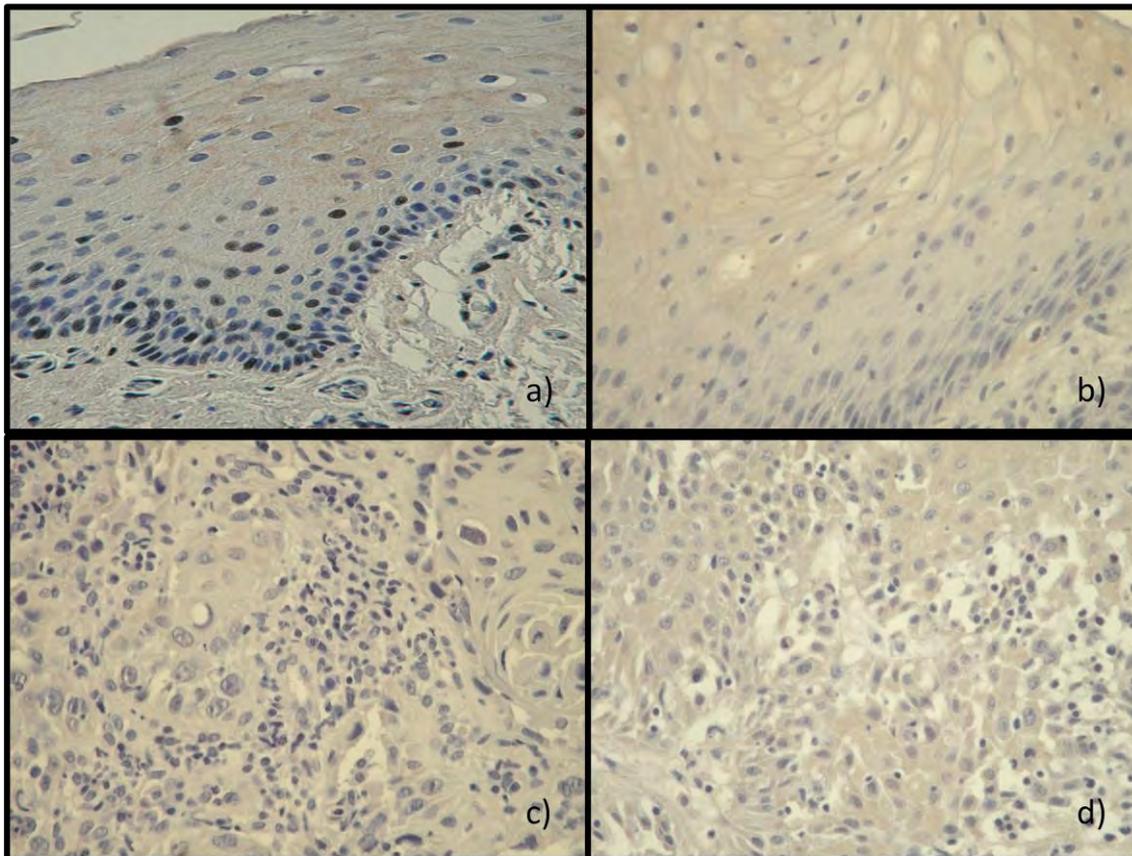


Figura 4. Fotomicrografías a 40x de con inmunotinción de TGFR-βI
a) Mucosa sana. b) COCE bien diferenciado. c) COCE moderadamente diferenciado. d) COCE pobremente diferenciado.

El análisis estadístico de correlación de Spearman entre el erbB1, erbB2 y TGFR-βI con el grado de diferenciación indico una correlación significativa para erbB1 ($p=0.035$).

Tabla 2. Nivel de inmunoexpresion uo/ μm^2			
TEJIDO	erbB1	erbB2	TGFR-βI
MUCOSA SANA	82.38 ± 6.41	48.27 ± 5.87	35.74 ± 7.87
BIEN DIFERENCIADO	102.7 ± 5.33	94.4 ± 8.64	30.91 ± 3.53
MODERADAMENTE DIFERENCIADO	74.86 ± 9.04	83.36 ± 10.8	22.07 ± 14.45
POBREMENTE DIFERENCIADO	64.42 ± 8.24	87.92 ± 20.1	20.60 ± 7.51

DISCUSIÓN

Es conocido que el COCE se presenta con mayor proporción en hombres que en mujeres (2:1); esto es atribuido a sus conductas sociales, sin embargo, el consumo de alcohol y tabaco cada vez mayor por las mujeres ha promovido la equiparación de esta proporción.⁶

En nuestros resultados se observó mayor frecuencia en el género femenino con 16 casos. Lo WL y cols, en el 2003 reportaron que debido al aumento en el consumo de alcohol y tabaco en la mujer se aumenta el riesgo de adquirir COCE.⁶

De igual forma se considera que la edad de mayor incidencia para el COCE se presenta predominantemente entre la quinta y sexta década de la vida, mayormente en personas que consumen alcohol y tabaco.¹

En nuestra muestra de estudio obtuvimos un promedio de edad de 67.6 (± 17.71) años. Se sabe que entre mayor es la edad mayor es el riesgo de desarrollar cáncer, debido al largo tiempo de exposición a los factores de riesgo y también a la disminución de la reparación celular.^{7,52}

A través del análisis histológico podemos establecer el diagnóstico definitivo de una neoplasia, en el COCE el conocimiento de su grado histológico nos puede indicar el grado de agresividad esperado en la neoplasia.^{17-20,22,40} Datos indican que el grado de diferenciación histológica más frecuente es el bien diferenciado.⁴⁸⁻⁵⁰

Los resultados de este estudio indicaron que el grado de diferenciación más frecuente fue el moderado, con 12 casos. La importancia de clasificar el grado de diferenciación histológico del COCE radica en la planificación del tratamiento y el diagnóstico del paciente para tener un mejor pronóstico.⁴⁸⁻⁵⁰

En diversos trabajos se ha demostrado que la actividad proliferativa de las células del tumor, la inactivación de genes supresores de tumores y sobreexpresión de los factores de crecimiento pueden jugar un papel importante en el desarrollo del COCE.^{33,41}

La identificación de las distintas moléculas que están asociadas con transformación maligna ha llevado a un aumento en el número de marcadores moleculares postulados, que han demostrado estar relacionados con estadio del tumor, clasificación, pronóstico y/o curso clínico de la enfermedad.⁴³

Gracias a los avances en biología celular y molecular, se ha postulado que la presencia, ausencia o modificación de determinadas moléculas pueden guiar para el

establecimiento de un diagnóstico que auxilie en el establecimiento de un fenotipo y posible comportamiento de la neoplasia.⁴³ La variación de los niveles de inmunoexpresión de erbB1, erbB2 y TGF β -I han sido asociados con el pronóstico de muchos tipos de cáncer.^{38, 41, 42}

La amplia investigación sobre los receptores de la familia erbB ha demostrado que estos se encuentran implicados en fenómenos de proliferación y diferenciación celular normal y que la sobreexpresión y heterodimerización de erbB1 y erbB2 están relacionados con el proceso de transformación y metástasis del COCE.^{29, 30}

Todos los casos de COCE analizados fueron positivos para el marcador erbB1, observando relación con el grado de diferenciación, puesto que su nivel de inmunoexpresión disminuía conforme los COCE perdían diferenciación. Hiraishi en 2006 demostró que el erbB1 se presentó en todos los tejidos con carcinoma oral que analizó.⁴⁴ Esto coincide con nuestro estudio donde también hubo una expresión de erbB1 en todas nuestras muestras, con la diferencia que nosotros observamos que hubo una disminución de erbB1 conforme el COCE perdía diferenciación. Por lo que podemos pensar que la expresión de erbB1 se encuentra directamente asociado al grado de diferenciación histológica. Probablemente la disminución del erbB1 se debe a que hay una sobreexpresión del receptor erbB2 y este desplaza a erbB1.^{53, 54}

El erbB2 es un receptor implicado en el proceso de embriogénesis y transformación celular.⁴⁵ Una característica importante de este receptor es que no cuenta con un ligando reconocido como los otros miembros de la familia, sin embargo, al formar heterodímeros con los otros tres receptores, su señalización puede ser más intensa, respecto a la cantidad de cinasas activadas.^{27, 29} Al comparar los resultados de este estudio observamos que los COCE presentaban aumento de su expresión comparado con mucosa sana. Fong demostró que este receptor se expresa escasamente en mucosa sana y que en COCE su expresión se eleva significativamente.⁴⁶ Esta sobreexpresión en COCE puede obedecer a que las células neoplásicas presentan un comportamiento parecido a las células embrionales que también expresan mayor cantidad de erbB2 en comparación con epitelio sano adulto.

Investigación sobre el TGF β -I han demostrado que se encuentra implicado en procesos de diferenciación celular normal y que los cambios en su expresión están relacionados con el proceso de transformación y metástasis del COCE. La disminución de la expresión de TGF β -I en COCE es conocida ya que existen investigaciones que apoyan su disminución de la expresión en relación con el grado histológico.^{38, 41, 42, 51}

Los resultados del trabajo indicaron que hubo disminución de inmunoexpresión digital de TGFR- β I en relación a la pérdida de diferenciación.

Mincione en el 2007 indica que el TGFR- β I se expresa intensamente y de forma homogénea en todos los epitelios normales y COCE bien diferenciado, sin embargo, se presentaba disminución progresiva de la expresión en los carcinomas moderado y pobremente diferenciados.⁴¹ Coincidiendo con nuestros resultados. Al disminuir la expresión, los carcinomas menos diferenciados pueden presentar característica de mayor agresividad como mayor proliferación, invasión y metástasis.⁴¹ Por otra parte, Hidayatullah G. y cols. mostraron que la expresión y activación de TGF- β I, TGFR- β I y TGFR- β II conducen la expresión de MMP-2 y MTI-MMP, lo cual promueve la degradación del tejido conjuntivo adyacente permitiendo mayor invasión de las células neoplásicas. Esto quiere decir que si tenemos una sobreexpresión de TGFR- β I habrá mayor expresión y actividad de MMP-2 y MTI-MMP en los COCE, lo cual podría estar relacionado con la amplia agresividad de este grado histológico observado en los resultados de este estudio.⁴⁷

CONCLUSION

En base a los resultados de este estudio, podemos concluir que el COCE se presentó con mayor frecuencia en mujeres con 16 casos (57.14%), con una edad promedio de 69.93 (± 15.96) años y en hombres con 12 casos (42.86%), con una edad promedio de 64.5 (± 20.11) años. Con una preferencia de mucosa oral con 19 casos (67.86%).

Con los datos obtenidos podemos decir que la expresión de erbB1 disminuye conforme el COCE pierde diferenciación. Por otra parte erbB2 presenta una expresión constante para los tres grados de diferenciación del COCE. Por lo que podemos decir que erbB2 es una molécula clave en el comportamiento biológico de esta neoplasia. El TGF β 1 disminuye su expresión conforme aumenta el grado de diferenciación.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 BARNES L, Evenson J, Reichard P, Sidranky D. Pathology & Genetics Head and Neck Tumors. WHO Classification Head and Neck Tumors. Lyon. IARC: 2005
- 2 PAKIN DM, Bray F, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 2005; 55: 2-74.
- 3 SECRETARIA DE SALUD/Dirección General de Epidemiología/Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas/2001
- 4 SISTEMA EPIDEMIOLÓGICO Y ESTADÍSTICO DE DEFUNCIONES (SEED)/Dirección General de Epidemiología/Secretaría de Salud 2001.
- 5 MENESES AG. Adalbero M T, Luz Ma R G. Patología quirúrgica de cabeza y cuello. México Trillas c 2006.
- 6 LO WL, Kao SY, Chi LY, WongYK, Chang RCS. Outcomes of oral squamous cell carcinoma in Taiwan after surgical therapy: factors affecting survival. J Oral Maxillofacial Surg 2003; 61: 751-8.
- 7 FUTREAL PA, Coin L, Marshall M, Down T, et al. A census of human cancer gen. Nature Rev. 2004 4. 177-83.
- 8 LEITE ICG, Koifman S. Survival analysis in a sample of cancer patients at a reference hospital in Rio de Janeiro, Brazil. Oral Oncol 1998;34:347-52.
- 9 NOTANI PN, Jayana K. Role of diet in upper aerodigestive tract cancer. Nutr Cancer 1987; 10: 103-13.
- 10 NEGRI E, Franceschi S, Boseti C. Selected micronutrients and oral and pharyngeal cancer. Int J Cancer 2000;86: 122-7.
- 11 GHOSHAL S, Mallick I, Panda N, Sharma S. Carcinoma of the buccal mucosa: Analysis of clinical presentation, outcome and prognostic factors. Oral Oncology 2006 Article in press.
- 12 SAPP J.P. Lewis R. Eversole, George Pwyssocki. Patología oral y maxilofacial Contemporánea. Madrid Elsevier. 2005.
- 13 BUENO-CARDOSO A, Gutiérrez-Salinas J, Morales-González JA. El consumo de etanol incrementa los riesgos de cáncer bucal. Med Int Mex 2004;20:221-6.
- 14 SCULLY C. Oral cancer; the evidence for sexual transmission British Dental Journal 2005; 199:203-7.

- 15 IBIETA BR, Lizan M, Frias-Mendivil M, Barrera JL, Carrillo A, Ruiz-Godoy LM, et al. Human papilloma virus in oral squamous cell carcinoma in a Mexican population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99:311-5.
- 16 SCHEPMAN KP, Van der Waal I. A proposal for classification and staging system for oral leukoplakia: a preliminary study. *Oral Oncol Eur J Cancer* 1995;31B:396-8.
- 17 MASHBERG A, Samit A. Early diagnosis of asymptomatic oral and oropharyngeal squamous cancer. *CA Cancer J Clin* 1995; 45: 328-351.
- 18 BELLO-SANTOS P, Reyes-Velásquez JO, Vejar-Alba I. El papel del Cirujano Dentista en la detección oportuna del cáncer bucal. Presentación de un caso. *Med Oral* 2001; 3(2): 65-8.
- 19 PITIPHAT W, Diehl SR, Laskaris G, Cartsos V, Douglass CW, Zavras AI. Factors associated with delay in the diagnosis of oral cancer. *J Dent Res* 2002; 81(3): 192-7.
- 20 KERDPON D, Sirlung H. Factors related to advanced stage oral squamous cell carcinoma in southern Thailand. *Oral Oncology* 2001; 37: 216-21.
- 21 RAHIMA B, Shingaki S, Nagata M, Saito C. Prognostic significance of perineural invasion in oral and oropharyngeal carcinoma. *Oral Surg Oral Med ORAL Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97:423-31
- 22 WAHI PM. Tipos histológicos de tumores orales y orofaríngeos. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 1971.
- 23 KEARSLEY JH, Thomas S. Prognostic markers in cancers of the head and neck region. *Anticancer Drugs* 1993;4:419-29.
- 24 PETO J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature*. 2001; 411 (6835): 390-5.
- 25 HANAHAN D, Weinberg R. The Hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70.
- 26 FIELD JK. The role of oncogen and tumor suppressor genes in the aetiology of oral, head and neck squamous cell carcinoma. *JR soc med* 1995;88:35-9.
- 27 TODD R, Chou MY, Matossian K, Gallagher GT, Donoff RB, Wong DT, Cellular source of transforming growth factor-alpha in human oral cancer. *J Dent Res* 1991;70:917-23.
- 28 KUTTAN NA, Bhakthan NM. Epidermal growth factor receptor (EGFR) in oral squamous cell carcinomas: overexpression, localization and therapeutic implications. *Indian J Dent Res*. 1997; 8(1):9-18.

- 29 GRAUS-PORTA D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB2 the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors is a mediator of lateral signalling. *EMBO J* 1997; 16:1648-55.
- 30 OLAYIOYE MA, NeveRm, Lane Ha, Hynes Ne. The ErbB signalling network: receptor heterodimerization in development and cancer.*EMBO J* 2000;19:3159-67.
- 31 GSCHWIND A, Flscher Om, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine Kinases: targets for cancer therapy. *Nature Rev Cancer* 2004; 4:361-70.
- 32 BEI R, Pompa g; Vitolo D, Moriconi E, Ciocci L, Quaranta M, et al..Colocalization of multiple ErbB receptors in stratied epithelium of oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2001; 195:343-8.
- 33 BEI R, Budillon A, Masuelli L, Cerada V, Vitolo D, Di Gennaro E, et al..Frecuent overexpression of multiple ErbB receptors by head and neck squamous cell carcinoma contrasts wih rare antibody immunity in patients. *J Pathol* 2004;204:317-325.
- 34 DELarco JE, Todoro GJ. Growth factors form murine sarcome virustransformedcells. *ProcNatlAcadSci USA* 1978;75:4001-4005.
- 35 DA Cunha A, Vitkovic L. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta) expression and regulation in rat cortical astrocytes. *J Neuroimmunol* 1992;36:157-169.
- 36 LYONS RM, Moses HL. Transforming growth factor and the regulation of cell proliferation. *Eur J Biochem* 1990;187:467-523.
- 37 MASSAGUE J, Cheifetz S, Igotz RA, Boyd FT. Multiple type-beta transforminggrowth factors and their receptors. *J Cell Physiol Suppl.* 1987;suppl 5:43-47.
- 38 MASSAGUE J. Receptor for the TGF-beta family. *Cell* 1992;69:1067-1070.
- 39 SUN L, Wu G, Willson JK, Zborowska E, Yang J, Rajkarunanayake Y *et al.*Expression of transforming growth factor- β type II receptor leads to reduced malignancy in human breast cancer MCF7 cells. *J BiolChem* 1994;269:26449-26455.
- 40 COSTA ALL, Araujo-Junior RF, Ramos CCF. Correlation between TNM clasification and malignancy hitological features of oral squamous cell carcinoma. *RevBrasOtorrinolaringol* 2005; 71(2): 181-7.

- 41 MINCIONE G, Di Marcantonio MC, Artese L, Vianele G, Piccirelli A, Piccirelli M, Perrotti V, Rubini C, Piattelli A, Muraro R. Loss of TGF- β I and T β RII correlates with differentiation in human oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2008; 32: 323-331.
- 42 MINCIONE G, Esposito D, Di Marcantonio MC, Piccirelli A, cama A, Colletta G. TGF- β I modulation of IGF-I signaling pathway in rat thyroid epithelial cells. *Experimental Cell Research* 2003; 287: 411-423.
- 43 SCHILIEPHAKE H, Prognostic relevance of molecular markers of cáncer-A Review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003;32:233-45
- 44 HIRAISHI Y, Wada T, Nakatani K, Negoro K, Fujita S. Immunohistochemical expression of EGFR and p-EGFR in oral Squamous cell carcinomas. *PotholOncol Res.* 2006; 12(2):87-91 Epub 2006 Jun 24.
- 45 BERGLER W, Stanek A, Riedel F, Petroianu, Hormann. Role of sialoglycan structure for the function of the epidermal growth factor receptor and the in vitro proliferation of head and neck cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1998; 255:414-9.
- 46 FONG Y, Chou Sj, Hung KF, Wou HT, Kao SY. An investigation of differential expression of Her2/neu gene espression in normal oral mucosa, epithelial dysplasia and oral Squamous cell carcinoma in Taiwan. *J Chin Med Assoc* 2008; 71(3):123-7.
- 47 HIDAYATULLAH G. Munshi Yi I. Wu, SubhenduMukhopadhyay, Adam J. Ottaviano, AntonellaSassano, Jennifer E. Koblinski, Leonidas C. Plataniias, and M. Sharon Stack. Differential Regulation of Membrane Type 1-MatrixMetalloproteinase Activity by ERK 1/2- and p38 MAPK-modulatedTissue Inhibitor of Metalloproteinases 2 Expression ControlsTransforming Growth Factor-_1-inducedPericellularCollagenolysis. *J. Biologicalchemistry* 2004; 279:39042-50.
- 48 MEZA GARCÍA G, Muñoz Ibarra JJ, Páez Valencia C, Cruz Legorreta B, Aldape Barrios B. Carcinoma de células escamosas de cavidad bucal en un centro de tercer nivel de atención social en la ciudad de Mexico. *Experiencia de 5 años. Av. Odontoestomatol* 2009; 25 (1): 19-28.
- 49 ODELL E.W. The prognostic value of individual histologic grading parameters in small lingual squamous cell carcinomas. *Cancer* 1994;74:789-94.

- 50 DE VISSCHER J. Surgical treatment of squamous cell carcinoma of the lower lip: evaluation of longtermresults and prognostic factors-a retrospective analysis of 184 patients. *J Oral Maxillofac Surg* 1998;56:814-20.
- 51 ROSELLE J.Eisma, BS, Jeffrey D. Spiro, MD, S.E. von Biberstein, MD, Richard Lindquist, MD,Donald L. Kreutzer, PhD, *Am J Sot-g.* 1996;101:641-645.
- 52 FINKEL T, Serrano M, Blasco M. The common biology of cancer and ageing. *J. Nature.* 2007;448: 767-774.
- 53 RAUTAVA J,Jee K, Miettinen P, Nagy B, Myllykangas S, Odell E, Soukka T, Morgan P, Heikinheimo K, ERBB receptors in developing, dysplastic and malignant oral epithelia. *Journal Oral Oncology.* 2008; 44:227-235.
- 54 JIMENEZ M, Inmunoexpresión de EGF-R y erbB-2 y patron de sialilacion en la odontogénesis de murinos expuestos a etanol durante la gestación. Tesis Facultad de Odontología UNAM. 2005.