



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**EXPRESIÓN DE METALOPROTEINASAS EN DISPLASIAS  
Y CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS  
EN CAVIDAD BUCAL.**

**T E S I N A**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
C I R U J A N O   D E N T I S T A**

**P R E S E N T A:**

**RUBÉN CASTILLO QUEZADA**

**TUTORA: Dra. ELBA ROSA LEYVA HUERTA.**

**ASESORA: Esp. ADRIANA MOLOTLA FRAGOSO.**

**MÉXICO, Cd. Mx.**

**2016**



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.

En primer lugar agradecerle a Dios por darme la fuerza y salud para concluir una etapa tan importante en mi vida y poder seguir cumpliendo mis sueños.

*A mis padres.*

Alicia y Humberto que aunque se encuentran en el cielo ellos nunca han dejado de cuidarme y guiarme como lo hacían en vida, gracias a su esfuerzo hoy cosecho este éxito que va dedicado a ellos y que se estarían orgullosos de mi.

*A mi hermano.*

Israel por alentarme, cuidarme y darme consejos para poder seguir adelante y ser un hombre de bien.

*A mis primos*

Efraín y César que siempre han estado al pie del cañón conmigo, a pesar de nuestras fricciones nunca me han dejado abandonado por tal razón los considero como mis hermanos.

*A mis amigos.*

Gabriel, Ana Laura, Víctor que han estado en momentos difíciles y me han apoyado, por las alegrías de los buenos momentos y también por las tantas veces que me han extendido la mano cuando los he necesitado.

*A los Especialistas.*

Roberto Onner y Adriana Molotla por el conocimiento, la paciencia y el apoyo que me ofrecieron durante la realización del presente trabajo.

*A mi tutora.*

Dra, Elba Rosa Leyva Huerta que gracias a su profesionalismo, asesoría y apoyo se logró la realización del presente trabajo.

*A la Universidad*

Por darme la oportunidad de cumplir un sueño y dentro de esa oportunidad conocí excelentes profesores, muy buenos amigos, grandes vivencias, experiencias malas y buenas; y que gracias a todo esto forme mi criterio tanto para ejercer mi profesión como en lo personal.

## ÍNDICE.

1.	INTRODUCCIÓN.....	4
2.	ANTECEDENTES.....	5
3.	COMPOSICIÓN DE MATRIZ EXTRACELULAR.....	6
4.	INVASIÓN Y METÁSTASIS (CASCADA METASTÁSICA).....	10
5.	METALOPROTEINASAS.....	12
	5.1 Características químicas y función.....	12
	5.2 Clasificación.....	13
6.	REGULACIÓN DE METALOPROTEINASAS.....	16
7.	INHIBICIÓN DE METALOPROTEINASAS.....	16
8.	IMPORTANCIA DE LAS METALOPROTEINASAS EN DISPLASIAS EPITELIALES Y CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS.....	18
	8.1 Papel de las metaloproteinasas 2, 9 y 24 en las displasias y el carcinoma de células escamosas.....	19
9.	DISPLASIAS EPITELIALES.....	19
10.	CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS.....	22
	10.1 Sinonimia.....	22
	10.2 Definición.....	22
	10.3 Incidencia.....	23
	10.4 Etiología.....	24
	10.5 Características histológicas.....	25
11.	OBJETIVO GENERAL.....	26
12.	POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	27
13.	METODOLOGÍA.....	28
14.	RESULTADOS.....	30
15.	DISCUSIÓN.....	36
16.	CONCLUSIONES.....	38
17.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

# 1. INTRODUCCIÓN

La displasia epitelial es una combinación variable de fenómenos microscópicos indicativos de un desorden de la maduración epitelial y de una alteración de la proliferación celular, para su valoración no existen parámetros cuantificables y por lo tanto no siempre la displasia epitelial es signo de malignización.

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) o también llamado epidermoide es un padecimiento multifactorial, es el tipo de cáncer que se presenta con mayor frecuencia en la cavidad bucal. La variación de su frecuencia depende de varios aspectos como por ejemplo la localización anatómica, la región geográfica y el consumo de ciertas sustancias como el tabaco, el alcohol, en regiones como Asia el betel y Paan que son factores de riesgo predisponentes a este tipo de cáncer.

En el presente trabajo se valora un tipo de proteasas específicamente las metaloproteinasas que poseen actividad promotora para el desarrollo de metástasis; estas metaloproteinasas participan en muchos procesos fisiológicos. En un principio las metaloproteinasas se consideraron importantes solo como sustancias que favorecían la invasión y la diseminación metastásica; mediante diversos estudios se ha visto que las metaloproteinasas están involucradas en el proceso de carcinogénesis.

La importancia de las metaloproteinasas en estos procesos es elevada ya que en muchos tejidos cancerosos se detecta elevada expresión y activación de ciertas metaloproteinasas; también regulan la invasión tumoral remodelando componentes insolubles de la membrana basal y de la matriz intersticial, liberando los factores de crecimiento secuestrados en la matriz extracelular.

## 2. ANTECEDENTES

En 1970 se comenzó a identificar específicamente diferentes proteasas, pertenecientes a la familia de las metaloproteinasas.<sup>1</sup>

Las proteasas son moléculas que juegan un papel fundamental en múltiples procesos biológicos y se asocian con una gran variedad de situaciones patológicas, entre ellas el cáncer. Actúan como enzimas con una capacidad altamente selectiva de degradar substratos específicos, con influencia en el comportamiento y la supervivencia celular. Se pueden clasificar en intracelulares y extracelulares. La actividad de las proteasas intracelulares se asocia en general con la retirada o metabolización de sustancias dañadas o no deseables a nivel celular. La organización de estas enzimas intracelulares en cascadas proteolíticas actúa como un mecanismo de protección.<sup>1</sup>

Por el contrario, las proteasas extracelulares suelen encontrarse relacionadas con mecanismos que facilitan la carcinogénesis, encontrándose habitualmente sobreexpresadas en los tumores. Entre las proteasas extracelulares y pericelulares se encuentran las metaloproteinasas, desintegrinas, neprilisin, catepsinas, calicreinas, prostasinas y la dipeptil peptidasa 4.<sup>1</sup>

En el metabolismo de las células tumorales, las proteasas participan y regulan procesos que incluyen la proliferación, adhesión, migración, diferenciación, angiogénesis, envejecimiento, autofagia, apoptosis y evasión del sistema inmune.<sup>1</sup>

Entre las proteasas extracelulares figuran las metaloproteinasas cuya misión es degradar las proteínas integrantes de la matriz extracelular (MEC) en su medio ambiente inmediato y activar factores de crecimiento, receptores de superficie y moléculas de adhesión; así también, están relacionadas en el

desarrollo, la regeneración y la enfermedad.<sup>2</sup>

Gross y Lapiere en su artículo de 1962 mencionan la existencia de enzimas difusibles que degradaban geles de colágeno fibrilar nativo. Desde entonces se han ido identificando las metaloproteinasas, que se caracterizan por depender del  $Zn^{+2}$  para su actividad catalítica, por su potente capacidad para degradar proteínas estructurales de la MEC y por su secuencia evolutiva específica.<sup>2</sup>

El primer miembro de la familia de las MMP descubierto fue una colagenasa intersticial, descrita por Gross y Lapiere en 1962 en experimentos designados a explicar cómo la cola de los renacuajos, rica en colágeno, era reabsorbida durante el proceso de la metamorfosis.<sup>1</sup>

En 1971 se demostró que las MMP se sintetizaban como zimógenos inactivos que requerían ser activados por proteólisis y también la existencia de inhibidores titulares (TIMP) de su actividad.<sup>2</sup>

### 3. COMPOSICIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

La matriz extracelular (MEC) está formada por gran cantidad de componentes que se clasifican en tres grandes grupos: proteoglicanos y glucosaminoglicanos, proteínas estructurales (colágeno y elastina), y proteínas de adhesión (fibronectina y laminina).<sup>2</sup> (Ver Fig.1)

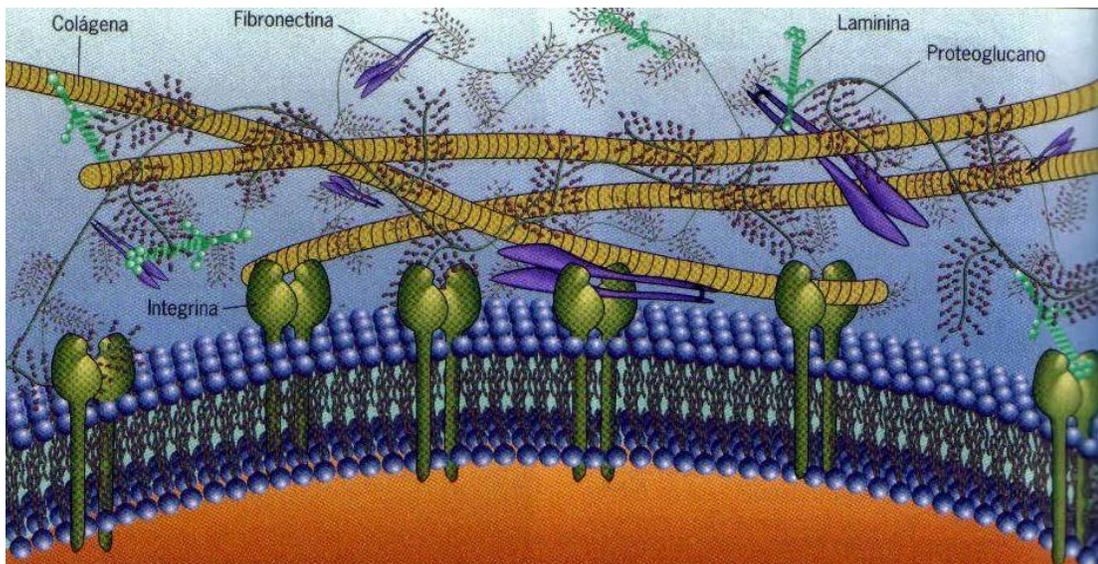


Fig. 1 Composición de matriz extracelular. Tomado de

[http://www.biowiki.com.br/doku.php?id=matriz\\_extracelular](http://www.biowiki.com.br/doku.php?id=matriz_extracelular).

La MEC es una red de proteínas intersticiales que constituye una proporción significativa de cualquier tejido. Las interacciones entre células y matriz extracelular son esenciales para el desarrollo y la cicatrización, así como para el mantenimiento de la arquitectura tisular normal.<sup>4</sup>

Sus funciones son:

- Soporte mecánico: para el anclaje y la migración de células y el mantenimiento de la polaridad celular.<sup>4</sup>
- Control de la proliferación celular: la MEC sirve de depósito a distintos factores de crecimiento latentes que pueden ser activados en focos de lesión o inflamación.<sup>4</sup>

- Andamiaje para la renovación tisular; como el mantenimiento de la estructura tisular normal, requiere una membrana basal o un andamiaje estromal, la integridad de la membrana basal o del estroma de las células parenquimatosas es esencial para la regeneración organizada de los tejidos.<sup>4</sup>
- Establecimiento de microambiente: la membrana basal actúa como frontera entre el epitelio y el tejido conjuntivo subyacente, no se limita a dar soporte al epitelio, sino que también es funcional.<sup>4</sup>

Existen dos formas básicas de matriz extracelular, la primera la matriz intersticial y la membrana basal.<sup>4</sup>

- La matriz intersticial se encuentra en los espacios entre células en el tejido conjuntivo, y entre el epitelio y las estructuras de soporte subyacentes de vasos y músculo liso. La matriz intersticial es sintetizada por las células mesenquimatosas (fibroblastos), formando un gel tridimensional relativamente amorfo. Sus componentes principales son colágenos fibrilares y no fibrilares, además de fibronectina, elastina, proteoglucanos, hialuronato, etc.<sup>4</sup>
- La membrana basal: esta altamente organizada alrededor de las células epiteliales y endoteliales, formando la membrana basal especializada. En la síntesis la membrana contribuye el epitelio situado por encima y las células mesenquimatosas, formando una red laminar plana (en alambrada). Los elementos principales son colágeno tipo IV no fibrilar amorfo y laminina.<sup>4</sup>

Tanto la MEC como las moléculas de adhesión, son consideradas componentes fundamentales para mantener la estabilidad celular del tejido, órgano y sistema; además, participan en procesos vitales como: migración, multiplicación, preservación, procesos bioquímicos y de señalización celular (Ver fig 2). Algunas proteínas intracelulares como: selectinas, súper familia de las inmunoglobulinas, cadherinas e integrinas, se sobreexpresan por la ausencia de proteínas de adhesión, lo cual genera efectos como la proliferación desmedida, la invasión y las futuras metástasis. En cuanto a las metaloproteasas de matriz, tienen una participación compleja en la progresión del cáncer; puesto que participan en la degradación de la matriz extracelular permitiendo la migración de las células endoteliales.<sup>5</sup>

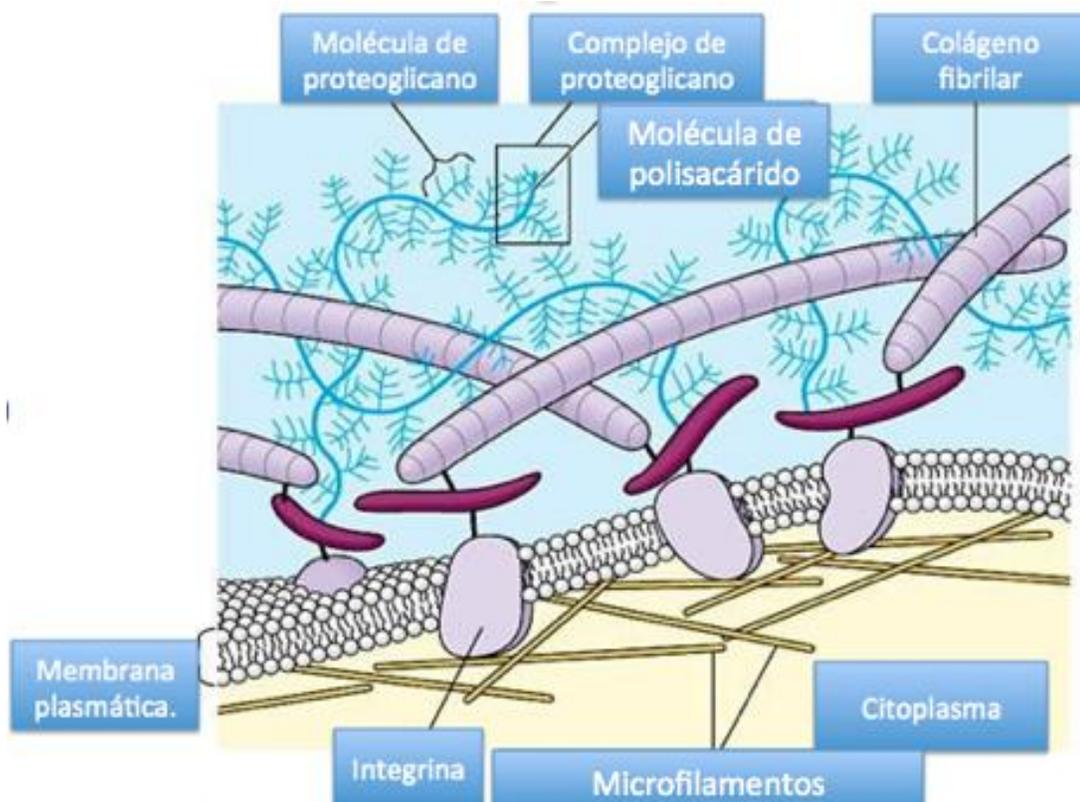


Fig. 2 Matriz extracelular. Tomado de <http://epidemiologiamolecular.com/matriz-extracelular/>

## 4. INVASIÓN Y METÁSTASIS

Son el resultado de complejas interacciones entre las células cancerosas y el estroma.<sup>4</sup>

La implantación de una célula o de una colonia metastásica es un fenómeno complicado, que implica la respuesta combinada de células tumorales y normales y considerándose como la consecuencia final de un proceso activo, continuo, complejo y multiescalonado denominado conocido como cascada metastásica que, en síntesis, tomando como modelo la vía de diseminación hematológica, está constituido por los siguientes pasos.<sup>7</sup>(Ver Fig.3)

- Invasión local de la matriz extracelular, comprendiendo la disolución de la membrana basal y la progresión a través del estroma intersticial, propiciado por las enzimas proteolíticas, fundamentalmente las metaloproteinasas.<sup>7</sup>
- Penetración en los vasos sanguíneos y/o linfáticos que se realiza mediante la adhesión, a la membrana basal por receptores específicos de superficie, lisis por disolución enzimática y migración celular al interior de los vasos, habitualmente mediante movimientos ameboides.<sup>7</sup>
- Diseminación de las células tumorales en el torrente circulatorio donde deberán sobrevivir al sistema de defensa del huésped y al trauma condicionado por la turbulencia sanguínea a la que están sometidas, lo que sólo es conseguido por menos del 0,001% de las células tumorales que se introducen en él, fenómeno conocido como ineficiencia metastásica.<sup>7</sup>
- Detención de las células a nivel de los capilares del órgano diana, mediada por receptores de membrana, órganos específicos existentes en las células tumorales y/o por factores quimiotácticos derivados del parénquima del órgano a invadir.<sup>7</sup>

- Extravasación de las células tumorales mediante un proceso similar, aunque en orden inverso, al utilizado para la penetración en el torrente circulatorio.<sup>7</sup>
- Infiltración de parénquima y crecimiento progresivo de la población metastásica, para lo cual será necesaria la presencia de factores de crecimiento tanto locales, factores hormonales producidos por el huésped y la existencia de angiogénesis que asegure el aporte de nutrientes, entre otros.<sup>7</sup>
- Evasión de las defensas del huésped, mediante resistencia a los macrófagos, células natural killer y linfocitos T activados, junto a un defecto en la expresión o bloqueo de antígenos específicos tumorales y resistencia al tratamiento a través de la amplificación de la resistencia genética a las drogas antitumorales.<sup>7</sup>

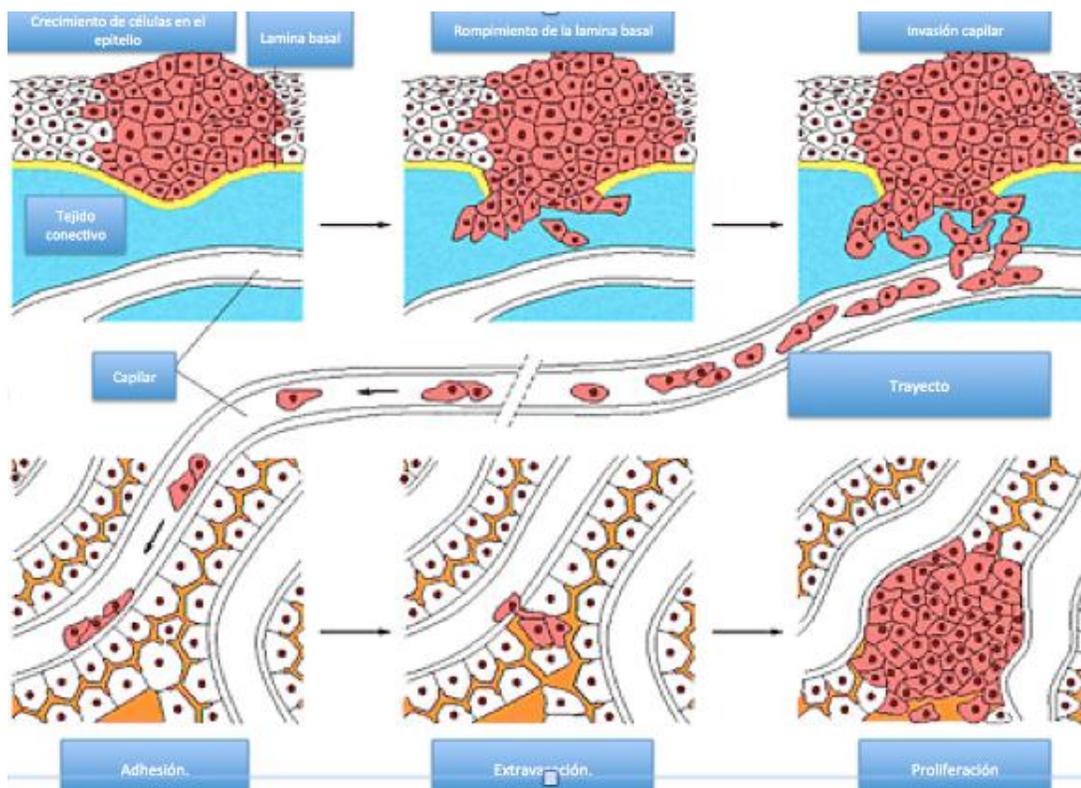


Fig. 3 Proceso de invasión y metástasis. Tomado de

<http://naukas.com/2011/02/25/los-siete-pecados-celulares/>

## 5. METALOPROTEINASAS

Las metaloproteinasas (MMP's) son metaloenzimas y se encargan de la degradación de colágenos y otros componentes de la matriz extracelular (MEC), son llamadas así por que dependen de iones metálicos, por ejemplo el zinc, para desarrollar su actividad.<sup>4</sup>

Son producidas por diversos tipos celulares (fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, células sinoviales y algunas células epiteliales) y su síntesis y secreción es regulada por factores de crecimiento, citocinas y otros agentes; también se ha demostrado que las metaloproteinasas están involucradas en procesos como la remodelación, angiogénesis y vascularización.<sup>4,9</sup>

### 5.1 Características químicas y función

Las MMPs son miembros de una familia de proteínas dependientes del zinc. Hasta el momento se han identificado más de 25 formas. La estructura básica de las MMPs contiene los siguientes dominios: un péptido de señal, que dirige a la MMP en el retículo endoplasmático durante su síntesis; un propéptido que mantiene la latencia de la enzima hasta que es eliminado; la unidad catalítica, con actividad enzimática; y finalmente un dominio hemopexina, que es el que determina la especificidad del sustrato y que cuenta con una pequeña zona de bisagra que le permite presentar el sustrato al core activo del dominio catalítico.<sup>1</sup> (Ver Fig. 4)

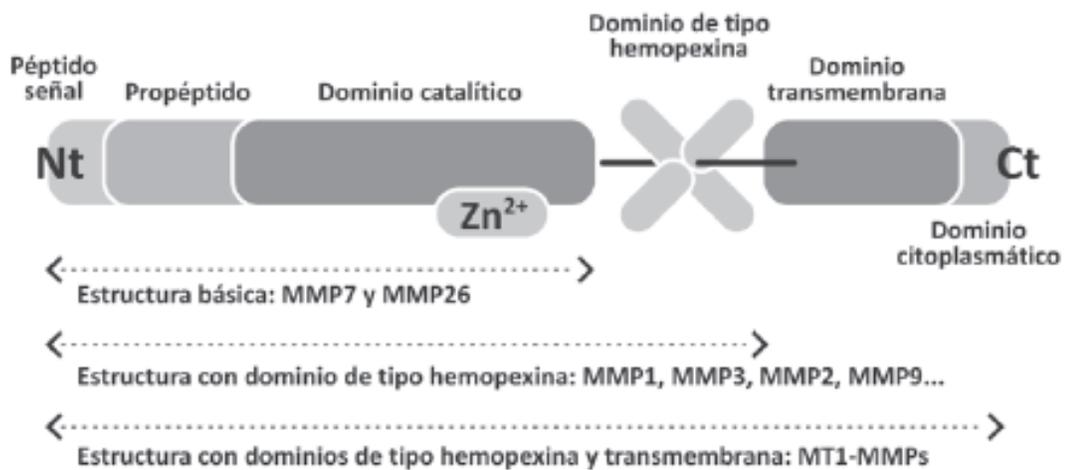


Fig. 4 Estructura básica de las metaloproteinasas. Tomado de <http://www.scielo.org.ar/pdf/medba/v72n6/v72n6a12.pdf>

La mayoría de MMPs son secretadas como formas inactivas, con un propéptido que debe ser liberado para conseguir la forma activa de la enzima. Este contiene un residuo rico en cisteína que interactúa con el zinc en la zona catalítica y previene la unión del sustrato.<sup>1</sup>

## 5.2 Clasificación de las metaloproteinasas

Inicialmente, las metaloproteinasas fueron descritas en base a su función específica, basada en el sustrato sobre la que actuaban. A medida que se descubrieron más moléculas pertenecientes a la familia de las metaloproteinasas se decidió nombrarlas a partir de su nombre genérico con un sufijo numérico correspondiente al orden de descripción.<sup>1</sup>

En el humano se conocen hasta el momento 25 MMPs que han sido clasificadas en subclases según la especificidad del sustrato o componente de la MEC que degradan.<sup>11,12</sup> (Ver Fig. 5)

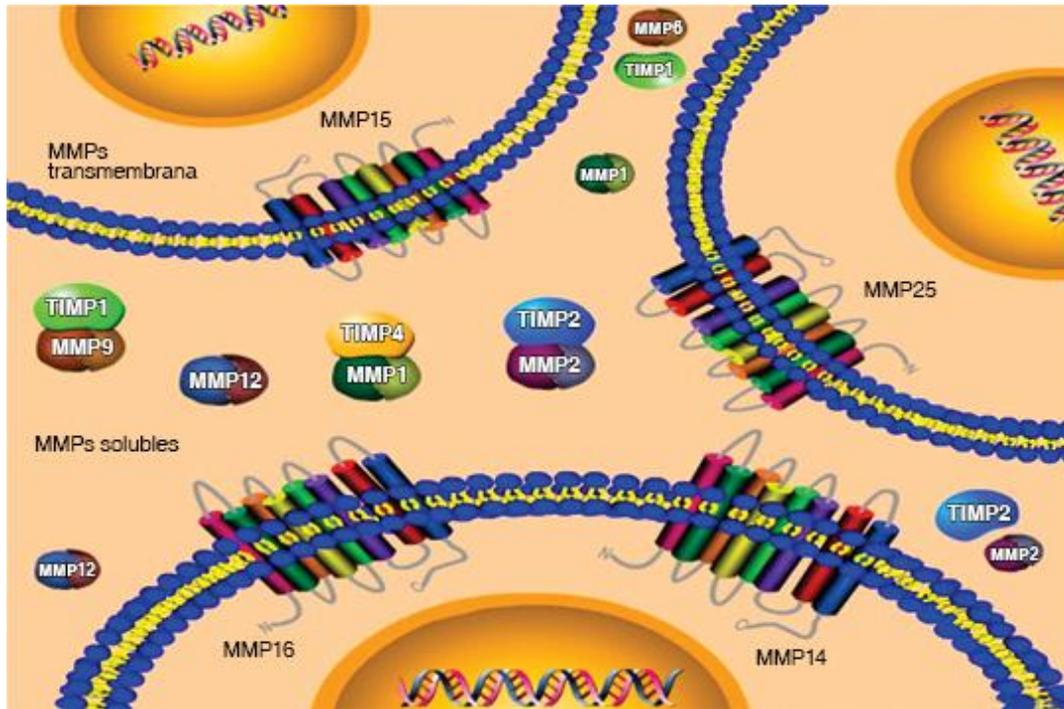


Fig. 5 Metaloproteinasas. Tomado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/neumo/nt-2014/nt142e.pdf>

Tabla 1: Clasificación de las metaloproteinasas según el sustrato que degradan.<sup>13</sup> (Ver tabla 1)

Clasificación	MMP	Sustrato
Colagenasas	MMP1	Colágeno: intersticial, 1, de neutrófilos y 2
	MMP8	Colágeno 3
	MMP13	Colágeno-4 (Xenopus)
	MMP18	RASI-1, RASI-6, MMP19
	MMP19	Colágeno 1
Gelatinasas	MMP2	Gelatina A
	MMP9	Gelatina B, colágeno-2
Estromelisinias	MMP3	Estromelisina-1
	MMP10	Estromelisina-2, transina-2
	MMP11	Estromelisina 3
Matrilisinias	MMP7	Matrilisina, matrina, metaloproteinasa-1 putativa, metaloendopeptidasa uterina
	MMP26	Matrilisina 2, endometasa
Metaloelastasas	MMP12	Elastasa de macrófago, metaloeslastasa
Metaloproteinasas de matriz	MMP14	MT1-MMP
	MMP15	MT3-MMP
	MMP16	MT3-MMP
	MMP17	MT4-MMP
	MMP24	Metaloproteinasa de matriz tipo 5, MT5-MMP
	MMP25	Metaloproteinasa de matriz tipo 5, leucolisina, MT6-MMP
	MMP28	Caseína
Otras MMPs	MMP20	Amelogenina
	MMP21	Pro-gelatina
	MMP22	Colágeno III, IV, IX, X
	MMP23	No referido
	MMP26	Colágeno tipo IV
	MMP27	MMP22
	MMP28	Caseína

RASI = Sistema de inhibidores renina-angiotensina-aldosterona (del inglés renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors).

## **6. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS METALOPROTEINASAS**

La actividad de las MMP es regulada a tres niveles: transcripción del gen que codifica para la MMP, activación del zimógeno e inhibición endógena de la enzima activa.<sup>14</sup>

Las citocinas proinflamatorias como interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6), el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y factores como el Crecimiento Epidérmico (EGF) o el de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) estimulan la síntesis de MMP. Además, la síntesis de MMP puede ser estimulada por una proteína de superficie denominada inductor de MMP extracelular, particularmente en procesos oncológicos. Además durante la activación de las MMP también activan la plasmina, tripsina, quimasa, elastasa y calicreína. Siendo la plasmina es el activador más potente en condiciones fisiológicas. El estrés oxidativo también puede activarlas al inducir cambios conformacionales.<sup>14</sup>

## **7. INHIBICIÓN DE METALOPROTEINASAS**

Los inhibidores específicos de MMP's son los TIMP's. Se unen a las MMP's de manera no covalente en complejos estequiométricos (1:1), formando un complejo reversible y de alta afinidad con dichas proenzimas. La molécula de TIMP consta de 184 a 194 aminoácidos subdivididos en un subdomino N-terminal y uno C-terminal.<sup>15</sup>

En el hombre se han reconocido cuatro moléculas con actividad inhibitoria de MMP's. Entre las cuatro, inhiben todas las MMP's conocidas hasta el momento difiriendo entre ellas en cuanto a su solubilidad, regulación y en su interacción específica con la proenzima. No actúan con la misma efectividad frente a todas las MMP's. TIMP-1 lo hace preferentemente sobre proMMP-9;

TIMP-2 con la proMMP-2, mientras que TIMP-3 inhibe preferentemente a ADAM's. TIMP-4 ha sido poco estudiado en comparación con los otros tres miembros del grupo pero, según Bourbulia y col. inhibiría MMP-1 y 2.<sup>15</sup>

Los TIMP's son proteínas multifactoriales involucradas en diferentes actividades biológicas independientes del efecto inhibitorio sobre las MMP's. Intervienen en la inducción de la proliferación celular, inhibición de la apoptosis, migración celular, invasión y angiogénesis.<sup>15</sup> (Ver Fig. 6)

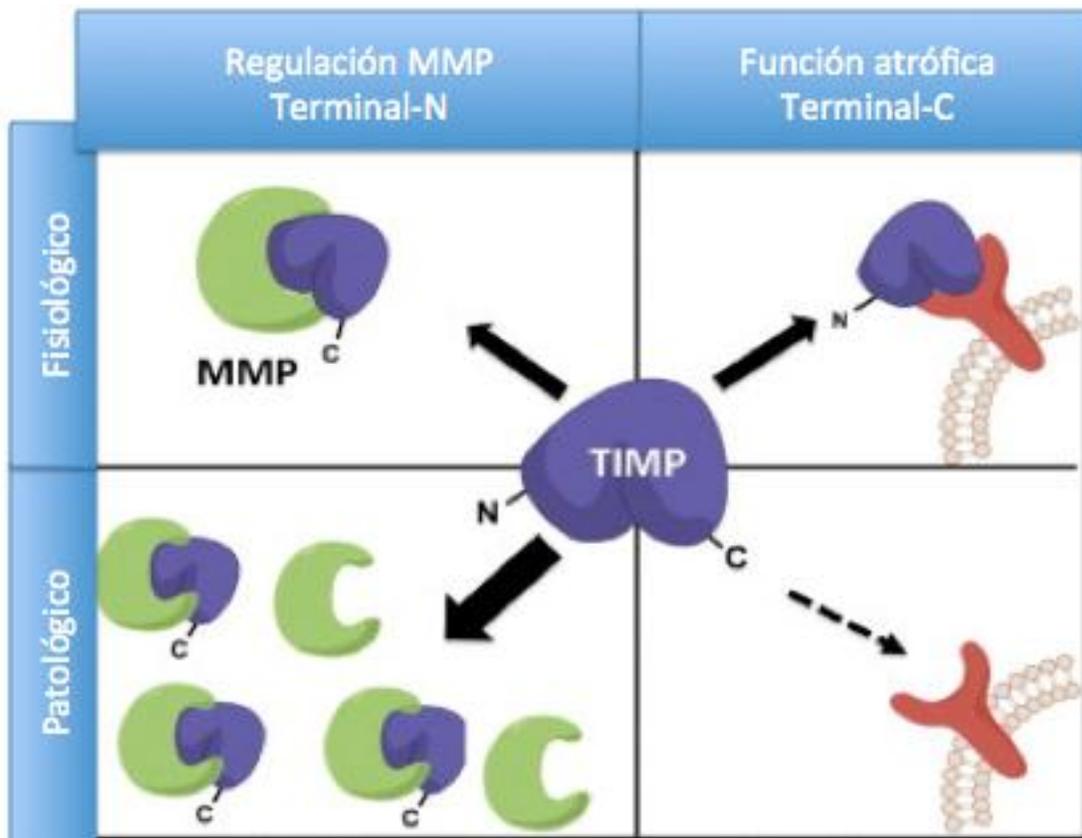


Fig. 6 MMP reguladas por la señalización de los TIMP. En condiciones fisiológicas hay un equilibrio homeostático entre la producción de MMP y la expresión de TIMP. En condiciones patológicas el aumento de la expresión de MMP da como resultado el agotamiento de las TIMP lo que conlleva en la pérdida de la señalización y tiene implicación en la patología de la enfermedad. Tomado de [http://ajp.amjpathol.org/article/S0002-9440\(11\)00898-4/fulltext](http://ajp.amjpathol.org/article/S0002-9440(11)00898-4/fulltext).

## **8. IMPORTANCIA DE LAS METALOPROTEINASAS EN LAS DISPLASIAS EPITELIALES Y EL CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS**

Se ha estudiado el papel de las principales enzimas involucradas en el desarrollo de las displasias epiteliales y el carcinoma de células escamosas. Entre ellos, las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP's) debido al hecho de que son proteinasas responsables de degradar muchos componentes de la matriz extracelular, haciendo posible la invasión de las células neoplásicas.<sup>12</sup>

El balance entre MMP's y sus inhibidores se ve alterado en el cáncer debido a la pérdida de las condiciones fisiológicas de equilibrio. La degradación de la MEC y consecuentemente el potencial invasivo y metastásico de las células tumorales es el resultado de un desbalance entre las actividades de las MMP's y sus inhibidores. La degradación de la matriz extracelular no sólo permite que el cáncer se propague sino también permite la liberación de citocinas.<sup>15,17</sup>

### **8.1 Papel de las metaloproteinasas 2, 9 y 14 en displasias y carcinoma de células escamosas**

Las MMP-2 y MMP-9 son metaloproteinasas que se ha demostrado su participación en la patogénesis del cáncer, ellas degradan el colágeno tipo IV, componente principal de la membrana basal, así como otros tipos de colágenos (I, II, III, V, VII y X), la elastina y fibronectina; están altamente expresadas en las células del estroma que rodea la zona de invasión y metástasis de tumores. La MMP-9 está casi ausente en tejidos normales y se encuentra limitada a monocitos y macrófagos. Sin embargo, su expresión puede ser inducida en caso de remodelación tisular como en el desarrollo

embrionario y cicatrización o invasión tumoral; además de que su secreción es en forma latente una vez activado es capaz de degradar el colágeno de la matriz extracelular incrementando la capacidad metastásica.<sup>15,18,19,20</sup>

La degradación proteolítica de los componentes de la matriz extracelular por la MMP-9 facilita la invasión de células de neoplásicas y conduce a la liberación de factores de crecimiento, tales como el VEGF, que mejoran la angiogénesis y la progresión tumoral. Las metaloproteinasas 2 y 9 se ha demostrado que tienen una elevada expresión en pacientes con periodontitis así como en el cáncer oral.<sup>17,21</sup>

Las metaloproteinasas asociadas a membrana denominadas MT-MMP (*membrane-type matrix metalloproteases*), forman parte de las membranas basales e intervienen en la actividad proteolítica de otras MMP's. Estas a su vez pueden ser de dos tipos.<sup>15,19</sup>

- Proteínas transmembrana: unidas a la misma por un sitio hidrófobo: MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-24.<sup>15</sup>
- Proteínas que poseen glicofosfatidilinositol (GPI): MMP-17 y MMP-25.<sup>15</sup>

MMP-14 participa en el crecimiento del tumor y la invasión; tiene actividad de colagenasa, además, la mayoría sobre sus estudios se centran principalmente en la angiogénesis y la invasión.<sup>12</sup>

## **9. DISPLASIA EPITELIAL**

Es un trastorno del crecimiento y de la maduración de los componentes celulares de un tejido, que puede estar asociado o no a estímulos persistentes y que remitirá al eliminar dicho estímulo. Se caracteriza por un grupo de alteraciones, como pérdida de la uniformidad de cada célula y desorientación arquitectónica. Las células displásicas presentan

pleomorfismo y con frecuencia contiene grandes núcleos hipercromáticos con un elevado índice nucleocitoplasmático. El tejido presenta una arquitectura desordenada.<sup>4,22</sup>

La displasia epitelial es un desorden de la maduración epitelial y de la alteración de la proliferación celular; para su valoración se utilizan ciertos criterios así como para dar un tipo de clasificación basado en lo siguiente<sup>23</sup>:

En la tabla se muestran los hallazgos arquitecturales y citológicos que definen la displasia epitelial según los expertos de la OMS.<sup>23</sup> (Ver Tabla 2)

Tabla 2: Datos histopatológicos de la displasia epitelial en la mucosas oral. <sup>23</sup>	
Datos estructurales	Datos citológicos
1.- Estratificación irregular.	1.- Variación anormal en el tamaño nuclear.
2.- Pérdida de la polaridad de las células basales.	2.- Variación anormal en la forma nuclear.
3.- Crestas epiteliales anormales.	3.- Variación anormal en el tamaño celular.
4.- Aumento del número de mitosis.	4.- Variación anormal en la forma celular.
5.- Mitosis anormales superficiales.	5.- Aumento en la proporción núcleo/citoplasma.
6.- Queratinización prematura de células aisladas.	6.- Aumento del tamaño nuclear.
7.- Perlas de queratina dentro de las crestas.	7.- Mitosis atípicas.
	8.- Aumento de número/tamaño nucleolos.
	9.- Hipercromatismo.

Kujan y cols. realizarón una valoración de estos parámetros de la OMS para la displasia epitelial, definiendo las dos siguientes situaciones:<sup>23</sup>

Lesiones de “Bajo Riesgo” para aquellas lesiones displásicas que presentasen menos de 4 datos arquitecturales y menos de 5 citológicos y otra de “Alto Riesgo” para las lesiones displásicas que presentaban más de 4 datos arquitecturales y más de 5 citológicos.<sup>23</sup>

Warnakulasuriya en 2001, después de revisar diferentes autores realiza una clasificación basándose en localización, cantidad e intensidad de las alteraciones del epitelio de la mucosa bucal y basado en esto clasifica a las displasias epiteliales en leve, moderada y severa.<sup>24</sup>

- Displasia epitelial leve.  
Cuando las alteraciones se producen en el tercio basal del epitelio y solo dos criterios histológicos de displasia.<sup>24</sup>
- Displasia epitelial moderada.  
Cuando los cambios displásicos afectan a los dos tercios inferiores del epitelio y estén presentes entre dos y cuatro criterios histológicos.<sup>24</sup>
- Displasia epitelial severa.  
Cuando los cambios afectan más de dos tercios del espesor del epitelio sin llegar a involucrarlo por completo y que estén presentes más de cinco criterios histológicos de displasia.<sup>24</sup>

Cuando el epitelio está afectado en su totalidad ya no se considera una displasia severa sino un Carcinoma in situ, término que hace referencia a la presencia de un carcinoma intraepitelial que no ha roto la membrana basal, no ha penetrado al corion subyacente y no posee capacidad invasiva.<sup>24</sup>

## **10. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS**

### **10.1 Sinonimia**

Carcinoma escamoso, carcinoma epidermoide, carcinoma espino celular, carcinoma oral de células escamosas.<sup>25</sup>

### **10.2 Definición**

Tumor maligno derivado del epitelio escamoso de la cavidad oral y orofaringe y el cérvix por ejemplo.<sup>26</sup>

Neoplasia maligna del epitelio plano estratificado que puede producir proliferación destructiva local y metástasis a distancia.<sup>27</sup>

Representa el 90% de todos los tumores malignos de la cavidad oral y el 5% de las neoplasias malignas en el ser humano.<sup>28</sup>

El carcinoma de células escamosas suele ser la etapa final de la alteración del epitelio plano estratificado, iniciándose como una displasia epitelial y evolucionando hasta que las células epiteliales displásicas rompen la membrana basal e invaden el tejido conjuntivo. Puede originarse también in novo a partir del epitelio plano suprayacente y no tener una fase premaligna.<sup>27</sup>

### 10.3 Incidencia

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es el cáncer más frecuente en la cavidad bucal, representa el 5% de todas las neoplasias y ocupa el número 12 de todas las neoplasias malignas en el mundo.<sup>29</sup>

La incidencia en Estados Unidos y el Reino Unido se observa entre los 55 y 65 años, mientras que en la India es menor, entre los 40 y los 45 años.<sup>24</sup>

Se da en proporción 3:1 hombres > mujeres.<sup>26</sup>

El tumor se puede identificar en cualquier parte de la boca, pero algunos sitios se comprometen con mayor frecuencia: son los labios sobre todo el inferior, la parte ventral de la lengua, la parte anterior del piso de boca, la mucosa bucal en la región del surco alveolo-lingual y el paladar, así como también en las amígdalas palatinas y la base de la lengua.<sup>26</sup> (Ver Fig. 7)



Fig. 7 Carcinoma de células escamosas, ulceración necrótica sobre el borde lateral de la lengua. Tomado de <http://www.canceroral.org/p/caracteristicas-microscopicas-y.html>

## 10.4 Etiología

La etiología del carcinoma oral de células escamosas es multifactorial, pero se implican varios factores etiológicos, tales como:

- El tabaquismo y la masticación de tabaco.<sup>4,28</sup>
- Fumar en pipa.<sup>28</sup>
- El alcoholismo crónico.<sup>4,28</sup>
- Infección por papiloma humano, en particular los tipos 16, 18 y 33.<sup>4,28</sup>
- Exposición a la luz solar o radiación actínica.<sup>4,28</sup>
- En India y Asia, el consumo de betel y *paan* masticados es un factor predisponente regional importante, ya que sus ingredientes la nuez de areca, la cal y el tabaco, envueltos en una hoja de betel son potenciales generadores de carcinógenos.<sup>4</sup>
- En años recientes ha aumentado la incidencia del carcinoma de células escamosas en personas menores de 40 años sin factores de riesgo conocidos ni infectados por el virus del papiloma humano.<sup>4</sup>

## 10.5 Características histológicas

Empiezan como lesiones displásicas, que pueden progresar a un carcinoma in situ o no antes de invadir el estroma subyacente de tejido conjuntivo. Los COCES varían desde neoplasias queratinizantes bien diferenciados hasta tumores anaplásicos, a veces sarcomatoides, y desde procesos de crecimiento lento hasta tumores de crecimiento rápido. Estos tumores tienden a la infiltración local antes de metastatizar hacia otros puntos; las vías de propagación dependen de su localización primaria.<sup>4</sup>

El COCE se caracteriza por la proliferación de nidos, cordones o islotes neoplásicos que recuerdan en mayor o menor grado el epitelio escamoso de

donde derivan y que penetran en el tejido conectivo. Se han propuesto diversas clasificaciones siendo la más aceptada la clasificación de la OMS que los divide en tres grados de malignidad, según el grado de queratinización, el pleomorfismo celular y nuclear y la actividad mitótica.<sup>31</sup>

- Bien diferenciados: crestas epiteliales alargadas irregularmente que invaden el tejido conjuntivo y contienen acumulaciones aberrantes de queratina (perlas de queratina) o como queratinización individual. Se observa un infiltrado inflamatorio crónico peritumoral bastante marcado formado por linfocitos y células plasmáticas.<sup>18,27,31</sup>
- Moderadamente diferenciados: posee menor semejanza con las células epiteliales, presenta pérdida de cohesión celular y disminuye la formación de perlas de queratina y la queratinización individual.<sup>27,31</sup>
- Poco diferenciados: capas de células que carecen de patrón arquitectónico y muestran anomalías celulares intensas que consisten en hiperchromatismo y pleomorfismo nuclear además de un elevado número de mitosis.<sup>27,31</sup>

## **11. OBJETIVO GENERAL**

Realizar un ensayo para las metaloproteinasas MMP-2, MMP-9 y MMP-14 en displasias y carcinoma oral de células escamosas en búsqueda de su expresión y zonas de inmunoreacción en el parénquima neoplásico y en el estroma.

## **12. POBLACIÓN DE ESTUDIO**

Se utilizaron 6 displasias epiteliales: 2 leves, 2 moderadas, 2 severas; y 6 carcinomas de células escamosas: 2 bien diferenciados, 2 moderadamente diferenciados y 2 poco diferenciados disponibles del laboratorio de Patología Clínica y Experimental DEPel.

### 13. METODOLOGÍA

Se utilizaron los casos diagnosticados como displasia leve, moderada y severa; y carcinoma de células escamosas bien diferenciado, moderadamente diferenciado y poco diferenciado en el período comprendido del 2005 al 2014.

De los casos seleccionados se solicitaron los bloques de parafina a partir de los cuales se obtuvieron cortes histológicos teñidos con H&E; así como cortes de 4 $\mu$  de los tejidos incluidos en parafina para realizar la técnica de inmunohistoquímica con los anticuerpos MMP-2, MMP-9 y MMP-14.

Se analizaron las laminillas con la inmunoreacción para determinar las zonas positivas en el parénquima neoplásico y en el estroma.

Técnica inmunohistoquímica.

Los tejidos se desparafinaron en xilol y se rehidrataron en alcoholes a diferentes concentraciones, se realizó doble recuperación antigénica con citrato de sodio al 0.1% en horno de alto poder por 5 minutos a potencia 100, posteriormente a 15 minutos a potencia 70. Se dejó enfriar a temperatura ambiente por 20 minutos. Se realizaron 2 lavados de 4 minutos cada uno con PBS al 1% y se inactivó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 0.9% por 20 minutos a temperatura ambiente, una vez pasado el tiempo se realizaron 2 lavados de 4 minutos cada uno con PBS al 1% y se coloca la albumina por 20 minutos. se realizan dos lavados con PBS de 4 minutos cada uno y se coloca el Tritón por 20 minutos, se realizaron lavados con PBS. Los tejidos se incubaron durante 24 horas con los anticuerpos primarios MMP-2 y MMP-9 a una dilución 1:50 y MMP-14 a una dilución de 1:800. Se lavaron con TBS al 1%, se agregó el anticuerpo secundario por 10

minutos, se realizaron lavados con TBS al 1%. Se colocó el complejo estreptavidina/peroxidasa por 10 minutos. Se realizó la observación de la reacción con diaminobencidina para después teñirlas con hematoxilina de Mayers, por último se realizó el montaje.

Se analizó la inmunoreacción de los anticuerpos en un microscopio de campo claro para observar las células positivas en las displasias epiteliales o y el COCE.

## 14. RESULTADOS

Se obtuvieron los siguientes resultados en las displasias epiteliales:

En la displasia epitelial leve la expresión de la MMP-2 es positiva de leve a moderado en las células estromales y citoplasma (Ver Fig. 8 A); la MMP-9 es positiva de moderada a intensa en las células epiteliales del estrato basal (Ver Fig. 8 B) y la MMP-14 es positiva leve en las células epiteliales del estrato espinoso y el citoplasma (Ver Fig. 8 C).

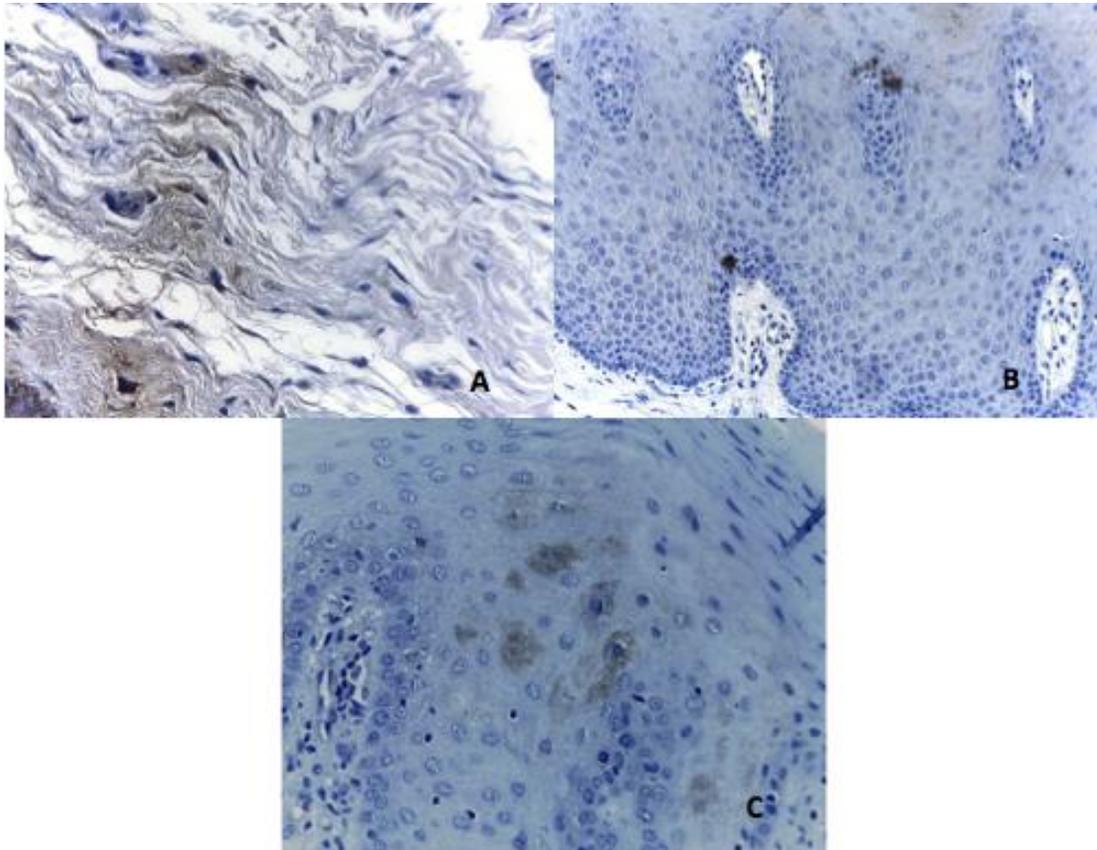


Fig. 8 MMP-2 positivo en células estromales 400x; B. MMP-9 positivo en células estromales 200x; C. MMP-14 positivo en células epiteliales y citoplasma 400x.

En la displasia epitelial moderada la expresión de la MMP-2 es positiva focal en células estromales cercanas a vasos sanguíneos (Ver Fig. 9 A); la MMP-9 es positiva levemente en las células epiteliales en el estrato espinoso (Ver Fig. 9 B) y la MMP-14 es positiva intensamente en el citoplasma de células epiteliales de estrato espinoso y granular (Ver. Fig. 9 C).

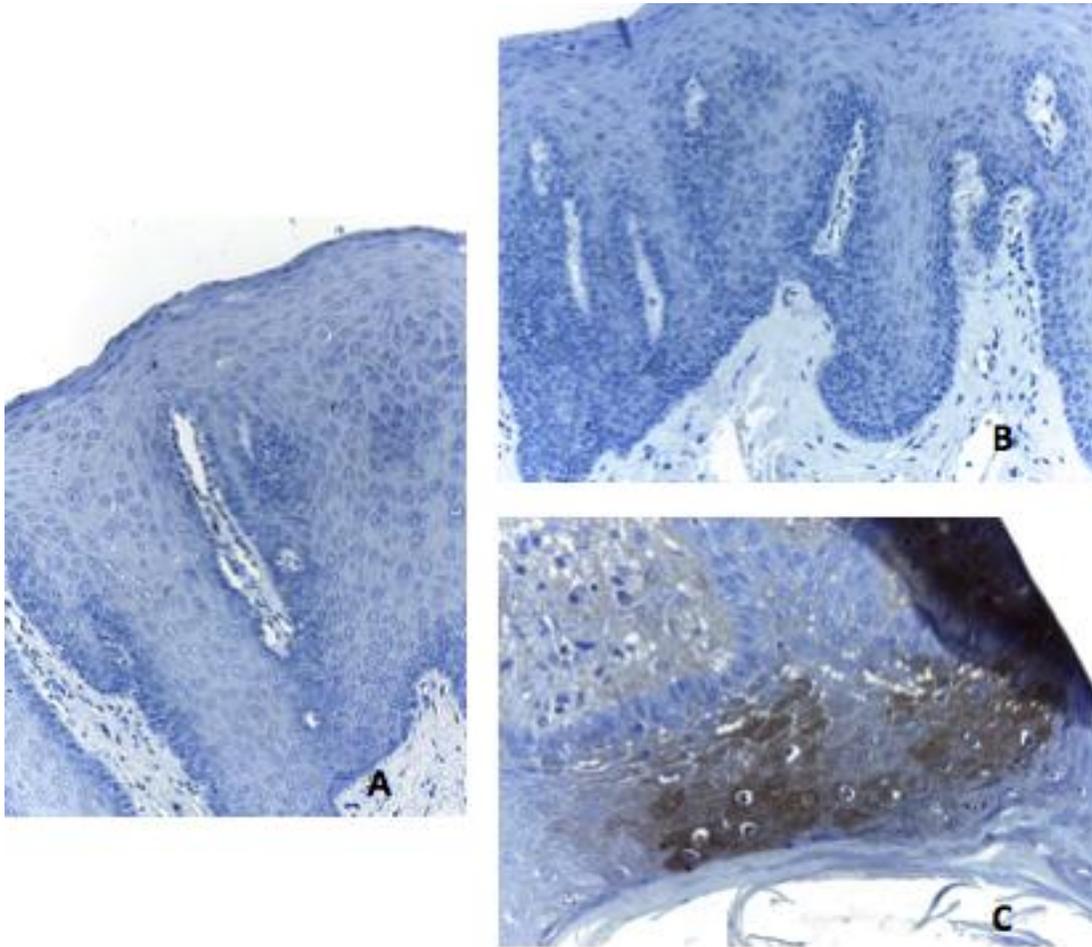


Fig. 9 A. MMP-2 positivo en células estromales 200x; B. MMP-9 positivo en células epiteliales 200x; C. MMP-14 positivo en el citoplasma de células epiteliales 400x.

En la displasia epitelial severa la expresión de MMP-2 es negativa en células epiteliales y estromales (Ver Fig. 10 A); la MMP-9 es negativa en células epiteliales y estromales (Ver Fig. 10 B) y la MMP-14 es positiva de intenso a moderada en células epiteliales de estrato espinoso y granular, positividad membranar leve y citoplasmática intensa (Ver Fig. 10 C).

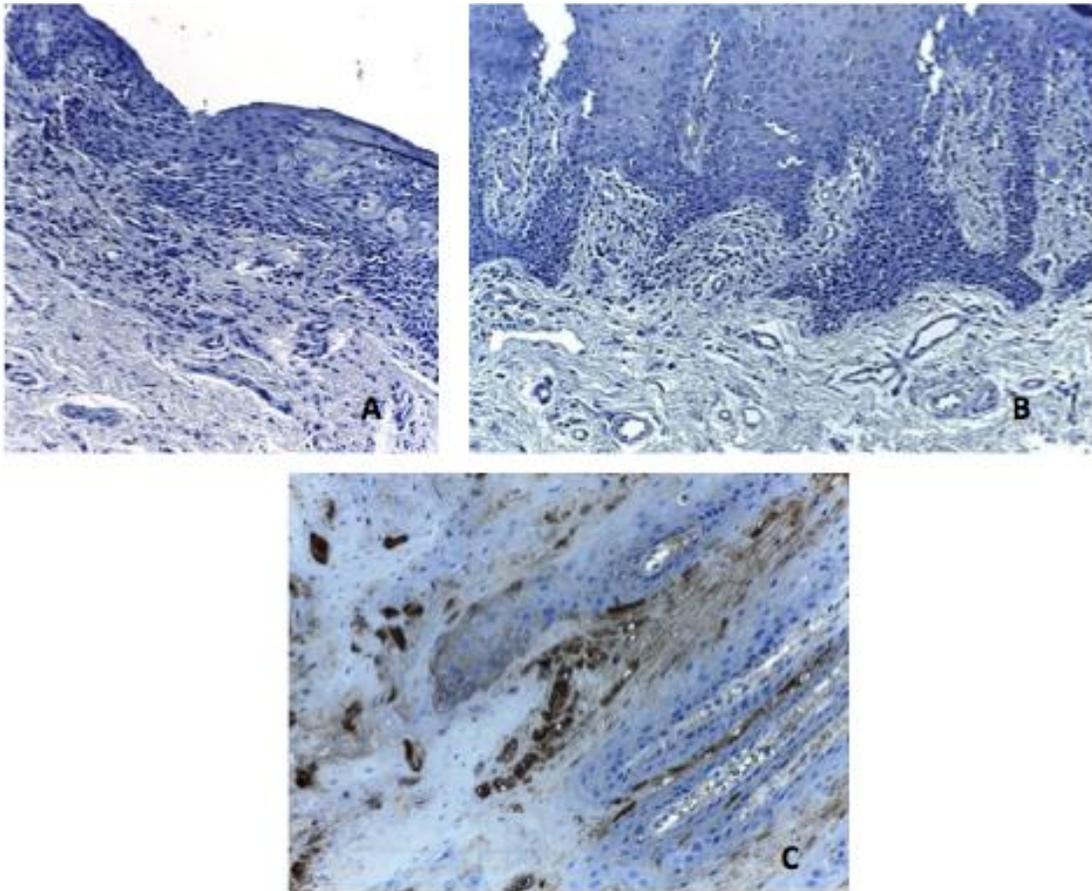


Fig. 10 A. MMP-2 negativa 200x; B. MMP-9 negativa 200x;  
C. MMP-14 positivo en citoplasma, membrana y células epiteliales 200x.

Se obtuvieron los siguientes resultados en el COCE:

En el COCE bien diferenciado la expresión de MMP-2 es positiva de moderado a leve en células neoplásicas y citoplasma (Ver Fig. 11 A); la MMP-9 es positiva de moderada a leve en células neoplásicas e intensa en células estromales (Ver Fig. 11 B) y la MMP-14 es negativo en células epiteliales y estroma (Ver Fig. 11 C).

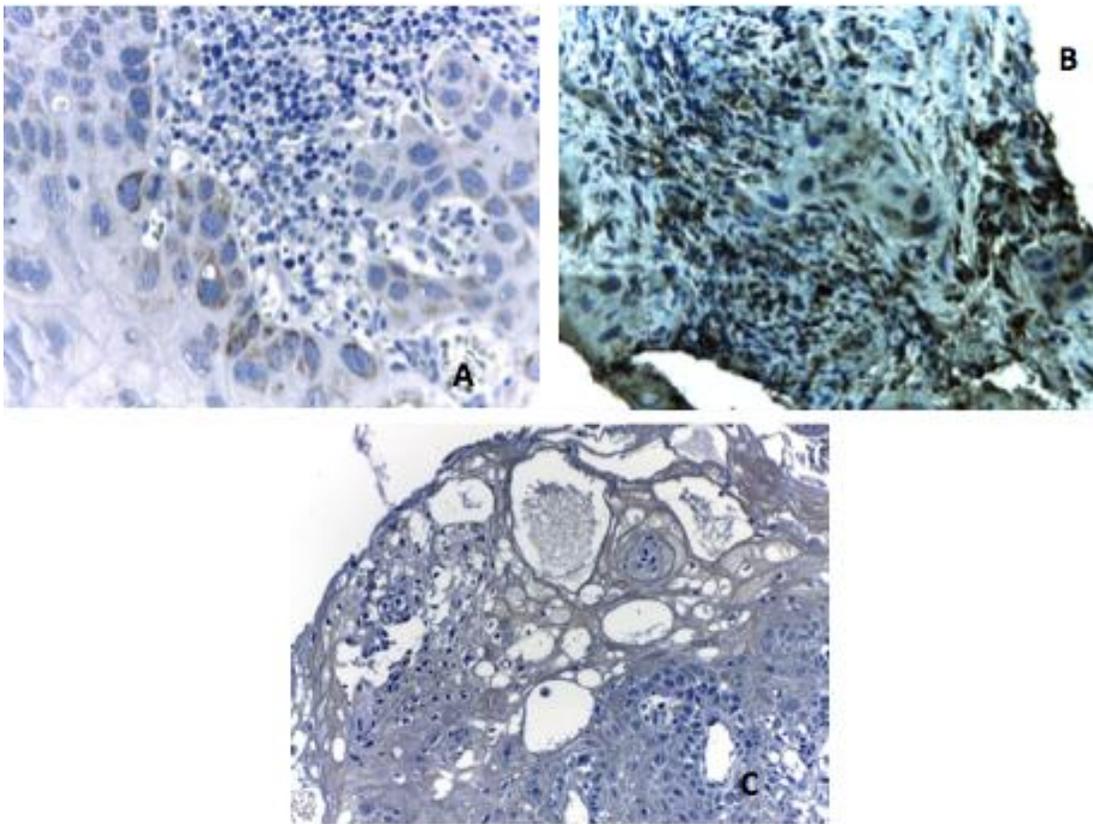


Fig. 11 A. MMP-2 positivo en células neoplásicas y citoplasma 400x;  
B. MMP-9 positivo en células estromales y neoplásicas 400x; C. MMP-14  
negativo 400x.

En el COCE moderadamente diferenciado la expresión de MMP-2 es positiva de leve a moderada en las células epiteliales de los conductos epiteliales (Ver Fig. 12 A); la MMP-9 es positiva focal intensa en células estromales al igual que en células epiteliales de los conductos salivales (Ver Fig. 12 B) y la MMP-14 es positivo en membrana, citoplasma y células neoplásicas (Ver Fig. 12 C)

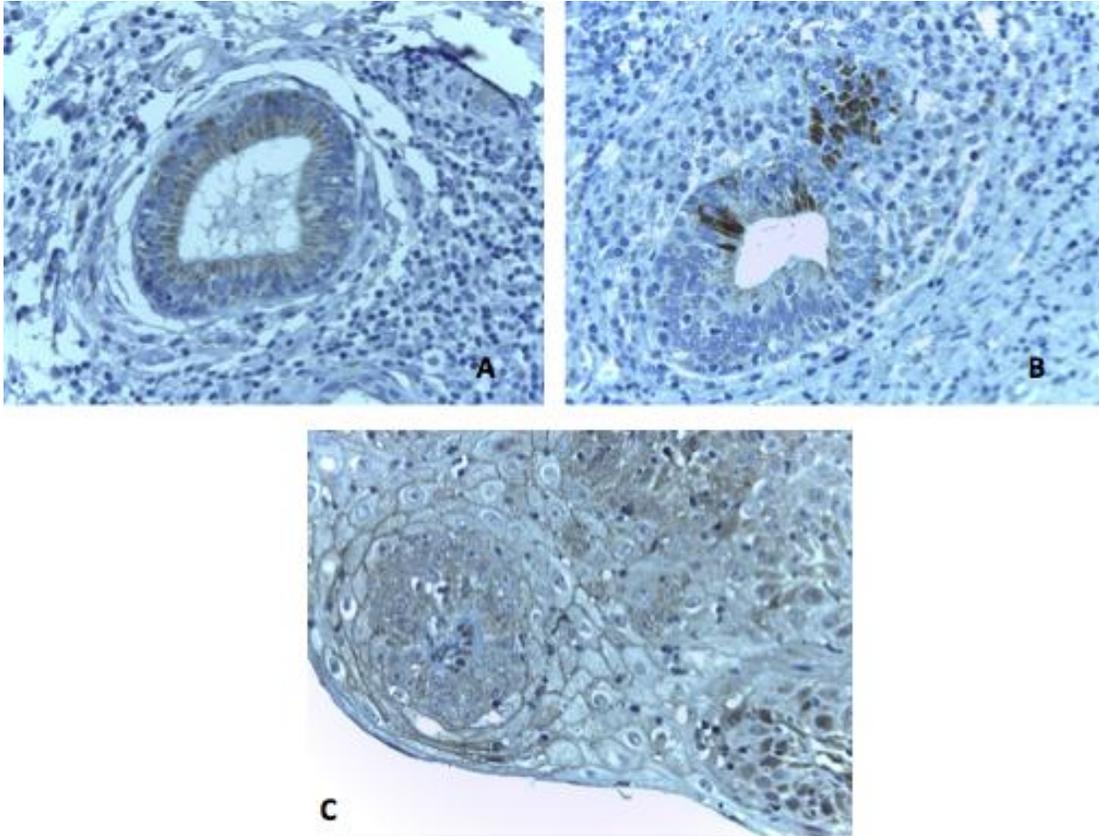


Fig. 12 A. MMP-2 positivo en células epiteliales 400x; B. MMP-9 positivo en células estromales y epiteliales 400x; C. MMP-14 positivo en membrana, citoplasma y células neoplásicas 400x.

En el COCE poco diferenciado la expresión de MMP-2 y MMP-9 son negativas en células estromales y neoplásicas (Ver Fig. 13 A y B) y la MMP-14 es positiva moderada en la membrana y células neoplásicas (Ver Fig. 13 C).

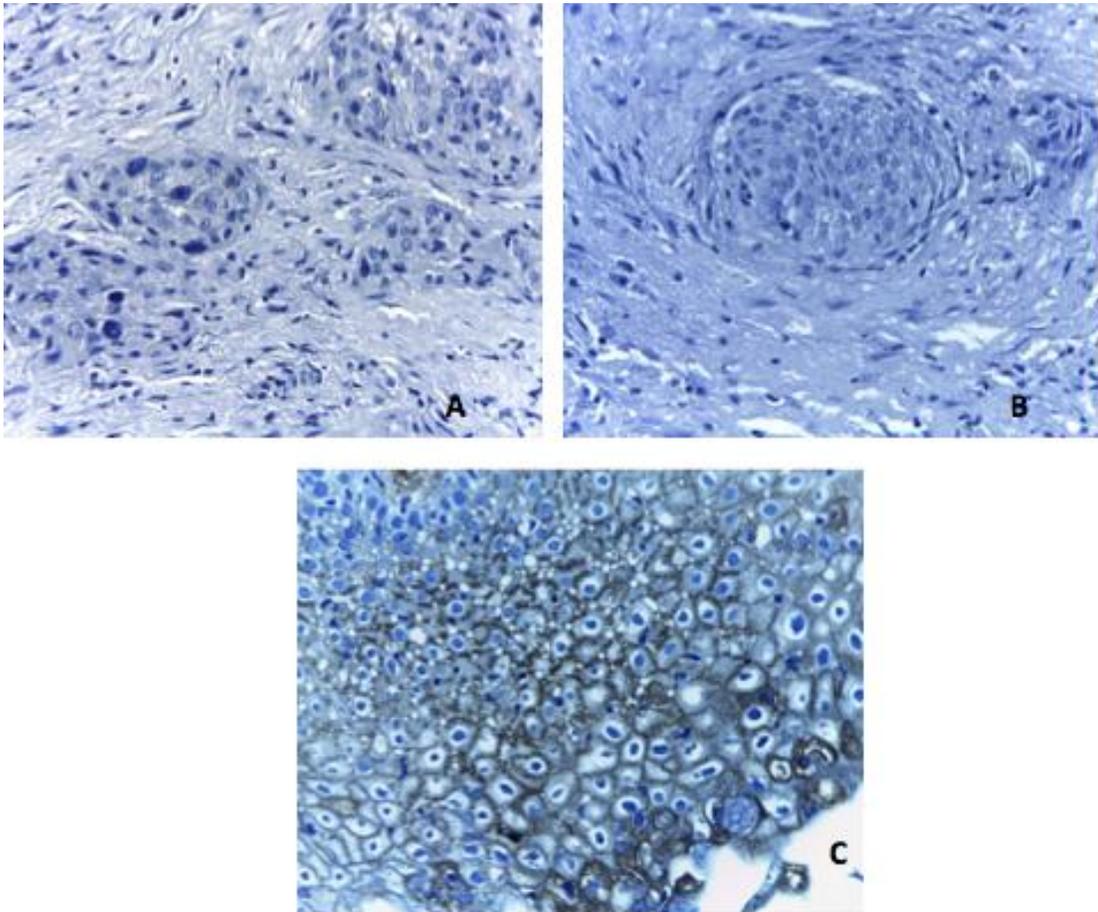


Fig. 13 A. MMP-2 negativo 400x; B. MMP-9 negativo 400x; C. MMP-14 positivo en membrana y células neoplásicas 400x.

## 15. DISCUSIÓN

La matriz extracelular juega un papel muy importante debido a que en su composición se encuentran las metaloproteinasas las cuales se encargan de la degradación de colágenos y otros componentes de la matriz extracelular, así como también participan en procesos patológicos por ejemplo en la metástasis en el carcinoma oral de células escamosas.

Las MMPs en el cáncer han sido descrito hace décadas. Desde entonces se han realizado numerosos estudios para la identificación estructural y funcional de las MMPs responsables de la actividad proteolítica durante la progresión tumoral. Durante la carcinogénesis las células tumorales interaccionan con factores de crecimiento, citoquinas y distintas células, tales como células endoteliales, fibroblastos, macrófagos, mastocitos y pericitos presentes en el microambiente tumoral.<sup>15</sup>

De acuerdo con Hai-Xia Fan y cols.<sup>32</sup> la MMP-2 y MMP-9 se expresan severamente en las displasias epiteliales así como en el COCE, según sus resultados la expresión de estas metaloproteinasas en el carcinoma de células escamosas en lengua y en mucosa oral displásica, la expresión de dichas MMP's es elevada, lo que concuerda con la inmunoreacción positiva que obtuvimos en los resultados de nuestro ensayo, así como la MMP-14 también se encuentra expresada en las displasias epiteliales y el COCE.

El grado de expresión en nuestro ensayo de las MMP-2, MMP-9 y MMP-14 en las displasias epiteliales se observa de leve a moderado a excepción de las MMP-2 y MMP-9 en la displasia epitelial severa en donde es negativa la expresión de dichas metaloproteinasas.

En el carcinoma oral de células escamosas hay variaciones en las cuales en el COCE bien diferenciado se observa la expresión positiva de las MMP-2 y MMP-9 pero la MMP-14 no se encontró dicha expresión. Caso contrario en el COCE poco diferenciado en el cual las MMP-2 y MMP-9 su expresión es negativa y la MMP-14 es positiva moderadamente.

Manikkath y cols.<sup>33</sup> en su estudio demostró que la expresión de la MMP-2 y MMP-9 es elevada en el citoplasma en etapas tempranas del carcinoma de células escamosas en lengua y que concuerda con nuestros resultados del ensayo ya que donde se localizo una positividad moderada en general es en el citoplasma, así como en la membrana.

## **16. CONCLUSIONES**

La importancia del presente ensayo fue localizar la expresión de las MMP-2, 9 y 14 en las displasias epiteliales y el COCE con el fin de que se puedan utilizar como factores pronósticos para estas lesiones.

En las displasias epiteliales la MMP-2, MMP-9 y MMP-14 fueron positivas a excepción de la displasia epitelial severa con MMP-2 y MMP-9 su expresión fue negativa; en general podemos pensar que pueden utilizarse como biomarcadores para estas lesiones, al igual que en el COCE.

En conclusión se cumplió el objetivo que se planteo el cual fue observar la expresión de la MMP-2, MMP-9 y MMP-14 en las displasias epiteliales y COCE.

## 17. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Zarraonandia Andraca I. La expresion de las metaloproteinasas en carcinomas de cabeza y cuello [Tesis doctoral]. Barcelona: Facultad de medicina, Departamento de cirugia. Universidad autonoma de Barcelona. 2011.
- 2.- Cascales M, Álvarez JA. Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. An. R. Acad. Nac. Farm., 2010; 76 (1): 59-84.
- 3.- [http://www.biowiki.com.br/doku.php?id=matriz\\_extracelular](http://www.biowiki.com.br/doku.php?id=matriz_extracelular).
- 4.- Robbins y Contran. Patología estructural y funcional. 9ª. ed. Barcelona, España. Editorial Elsevier. 2015. Pp. 20-24, 105, 270-271, 307-310, 731-734.
- 5.- Saavedra J, Zúñiga L, Vásquez J, Navia C, Mosquera L, Bernal S. La matriz extracelular: un ecosistema influyente en la forma y comportamiento de las células. Morfolia. 2015. Vol. 7:12-35.
- 6.- <http://epidemiologiamolecular.com/matriz-extracelular/>
- 7.- Roman C. El proceso metastásico. I: invasión local de la matriz extracelular. Actas Dermosifiliogr 1999; 90:143-155.
- 8.- <http://naukas.com/2011/02/25/los-siete-pecados-celulares/>
- 9.- Fontana V, Coll TA, Sobarzo CMA, Pérez L, Calvo JC, Cebal E. Matrix metalloproteinase expression and activity in trophoblast- decidual tissues at organogenesis in CF-1 mouse. J Mol Hist. 2012; 43: 487–496.

- 10.- Figura 4: <http://www.scielo.org.ar/pdf/medba/v72n6/v72n6a12.pdf>
- 11.- Hernandez J, Perez G, Perez J, Montaña M, Ramos C, Ramirez A, et al. Participación de las metaloproteinasas de matriz extracelular en la EPOC. *Neumol Cir Torax* 2014; 73: 128-137.
- 12.- Costa A, Dias Do Cormo E, Dias Da Silva MA, Blumer LE. Matrix metalloproteinase gene polymorphisms and oral cáncer. *J Clin Exp Dent*. 2012; 4(5):e 297-301.
- 13.- <http://www.medigraphic.com/pdfs/neumo/nt-2014/nt142e.pdf>
- 14.- Perez N, Ibanes C, Vargas G, Martinez N, Monroy IE, Valente B, et al. Participación de las metaloproteinasas de matriz en el síndrome isquémico coronario agudo (SICA). *Gaceta Médica de México*. 2013;149:655-67
- 15.- Coronato S, Laguens G, Di Girolamo V. Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral. *Medicina (Buenos Aires)* 2012; 72: 495-502.
- 16.- [http://ajp.amipathol.org/article/S0002-9440\(11\)00898-4/fulltext](http://ajp.amipathol.org/article/S0002-9440(11)00898-4/fulltext).
- 17.- Díaz A, Méndez D, Martínez E, Orozco J, Velásquez MA. Metaloproteinasas de la matriz en Odontología y sus consideraciones desde el campo de la química computacional. *Rev. Cubana Estomatol*. 2014; 51 (1): 80-92.
- 18.- Anaya M.. Biomarcadores de cáncer oral en saliva. *Av. Odontoestomatol* 2013; 29 (6): 293-302.
- 19.- Arvelo F, Cotte C. Metaloproteasas en la progresion tumoral. *Revision. Invest Clin* . 2006; 47(2): 185-205.

- 20.- Andisheh-Tadbir A, Mardani M, Pourshahidi S, Nezarati K, Bahadori P. Prognostic value of matrix metalloproteinase-9 expression in oral squamous cell carcinoma and its association with angiogenesis. J Clin Exp Dent. 2016;8(2):e130-5.
- 21.- Vilen ST, Salo T, Sorsa T, Nyberg P. Fluctuating Roles of Matrix Metalloproteinase-9 in Oral Squamous Cell Carcinoma. The Scientific World Journal. 2013; 1: 1-11
- 22.- Rubin R. Patología, fundamentos clínico patológicos en medicina. 6ª. ed. Phyladelphia, Pennsylvania Editorial Walters Kluwer. 2012. Pp. 12-13, 71-73, 100.
- 23.- Aguirre P, Aguirre JM. Displasia epitelial. Concepto y significación. Av. Odontoestomatol 2008; 24 (1): 81-88.
- 24.- Moret Y, López J, García M, Piñango V. Displasia epitelial bucal. Acta odontol. Venez. 2008; v. 46 n.1
- 25.- Martin R. 1ª. ed. Madrid, España. Editorial Medica Ripano. 2011. Pp. 266.
- 26.- Thompson L. Patología de cabeza y cuello. 2ª. ed. Caracas, Venezuela. Editorial AMOLCA. 2014. Pp. 218-225.
- 27.- Saap P. Patología oral y maxilofacial contemporánea. 2ª. ed. Madrid, España. Editorial Harcourt. 2000. P. 174-182
- 28.- Harsh M. Patología. 6ª. ed. Buenos Aires, Argentina. Editorial Medica Panamericana. 2012. Pp. 526-527.

29.- De la Fuente J, Muñoz P, Patrón CE, Ramírez MA, Rojas HJ, Acosta LS. Aumento de la incidencia de carcinoma oral de células escamosas. Salud (i) Ciencia. 2014; 20:636-642.

30.- <http://www.canceroral.org/p/caracteristicas-microscopicas-y.html>

31.- Sarrion Pérez G. Estudio clínico del carcinoma oral de células escamosas y su relación con la expresión de los linfocitos t reguladores infiltrantes en el tejido tumoral. [Tesis doctoral]. Valencia: Servei de publicacions. Universitat de Valencia. 2011.

32.- Fan HX, Li HX, Chen D, Gao ZX, Zheng JH. Changes in the expression of MMP2, MMP9, and ColIV in stromal cells in oral squamous tongue cell carcinoma: relationships and prognostic implications. Journal of Experimental & Clinical Cancer 2012, 31:90

33.- Aparna M, Rao L, Kunhikatta V, Radhakrishnan R. The role of MMP-2 and MMP-9 as prognostic markers in the early stages of tongue squamous cell carcinoma. J. Oral Pathol. Med. (2015) 44: 345–352