



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL
LABORATORIO DE HISTOLOGÍA Y MORFOLOGÍA ORAL

“Expresión Inmunohistoquímica de las Proteínas Ki-67 y CD105 en Carcinoma Oral de Células Escamosas según grado de diferenciación histológica”

Constanza Denisse Herrera Fuentes

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE
CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL
Prof. Dr. Enrico Escobar López

TUTORES ASOCIADOS
Prof. Cristián Peñafiel Ekdhal

Adscrito a Proyecto: DIFO 17-007

Santiago-Chile
Mayo 2019



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL
LABORATORIO DE HISTOLOGÍA Y MORFOLOGÍA ORAL

“Expresión Inmunohistoquímica de Proteínas Ki-67 y CD105 en Carcinoma Oral de Células Escamosas Según Grado de Diferenciación Histológica”

Constanza Denisse Herrera Fuentes

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE
CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL
Prof. Dr. Enrico Escobar López

TUTORES ASOCIADOS
Prof. Cristián Peñafiel Ekdhal

Adscrito a Proyecto: DIFO 17-007

Santiago-Chile
Mayo 2019

A mis padres

Jacqueline y Luis, por el apoyo incondicional que me dedican cada día, por el amor, valores y educación que me brindaron. Gracias.

A mis hermanos

Cristhián, Cristhel y Katherine, son un ejemplo a seguir para mí, agradezco la relación que tengo con ustedes, son el pilar fundamental de mi vida.

A mis amigos

Son 6 años de carrera que se finalizan, acompañándome en los altos y bajos, ofreciéndome risas y consejos cuando más lo necesitaba. Gracias.

A mis tutores

Dr. Escobar y Prof. Peñafiel, por estos 3 años en el laboratorio de Patología, por las enseñanzas y contribuir en el crecimiento y desarrollo profesional. Gracias.

A los funcionarios

A todo personal de la facultad de Odontología de la Universidad de Chile, por su disposición, porque una sonrisa al final de un cansado día hace la diferencia. Gracias.

A Dr. Fernán Gómez, Esteban Oyarzún y Pablo Jara

Por su indispensable y desinteresada ayuda.

A todos y todas las que de una u otra forma ayudaron en mi crecimiento personal o académico. Gracias.

ÍNDICE

1.- RESUMEN.....	7
2.- INTRODUCCIÓN.....	9
3. MARCO TEÓRICO	11
I. Definiciones.....	11
II. Epidemiología.....	12
III. Factores de riesgo	13
IV. Características clínicas	14
V. Características histológicas	14
VI. Estadificación clínica.....	17
VII. Pronóstico	18
VIII. Cáncer y proliferación celular.....	18
IX. Cáncer y angiogénesis.....	20
X. Rol de las proteínas Ki-67 y CD105 en cáncer	23
4. HIPÓTESIS.....	24
5. OBJETIVO GENERAL	24
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
7. MATERIALES Y MÉTODOS	25
I. Tipo de estudio.....	25
II. Universo y Muestra	25
III. Criterios de inclusión y exclusión:	25
IV. Recolección de muestras e información clínica	26
V. Procesamiento y procedimientos Inmunohistoquímicos.....	27
VI. Análisis de la información.....	29
8. RESULTADOS	31
I) Caracterización histológica y epidemiológica de las muestras.....	31
a) Caracterización histológica de las muestras	31
b) Distribución de las muestras por edad y sexo	33
II. Distribución de las muestras por localización anatómica.....	35
III. Inmunoexpresión de las proteínas Ki-67 en MO y COCE según grado de diferenciación.....	36
IV. MDV detectada mediante la inmunoexpresión de la proteína CD105 en MO y COCE según grado de diferenciación	39
V. Correlación entre la inmunoexpresión de la proteína Ki-67 y MDV (CD105) entre COCE según grado de diferenciación histológica	42
9. DISCUSIÓN.....	44
I. COCE: datos epidemiológicos	44
II. Marcadores biológicos	45
III. Proliferación celular y carcinogénesis.....	46
IV. Angiogénesis, microdensidad vascular y crecimiento y progresión celular.....	50
V. Correlación entre proliferación celular y MDV (CD105) en COCE	52
VI. Aplicabilidad y terapias antiproliferativas	54

VII. Aplicabilidad y terapias antiangiogénicas	55
10. CONCLUSIONES	57
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
12. ANEXOS.....	73
Anexo 1: Comité Ético Científico: Acta de Aprobación de Protocolo de Investigación	73
Anexo 2: Comité Institucional de Bioseguridad: Certificado	76
Anexo 3: Tabla de datos: IM para Ki-67 y MDV (CD105) en COCE y MO	77

1.- RESUMEN

Introducción: El carcinoma oral de células escamosas (COCE) corresponde a un carcinoma con diferenciación escamosa que surge del epitelio escamoso estratificado de la mucosa, el cual representa el 95% de todos los tumores malignos de la cavidad oral, afecta con mayor frecuencia a la lengua. El grupo etario más afectado se presenta en la sexta década de vida y en el sexo masculino. Las proteínas Ki-67 y CD105 son moléculas que intervienen en los procesos de proliferación celular y angiogénesis tumoral respectivamente, los cuales representan pilares esenciales en la carcinogénesis, progresión y crecimiento tumoral. El objetivo de este estudio fue describir la expresión y correlación entre las proteínas Ki-67 y la microdensidad vascular (MDV) detectada mediante la proteína CD105 en COCE de distintos grados de diferenciación histológica y en muestras de mucosa oral (MO).

Material y métodos: Se seleccionaron 58 muestras de COCE según grado de diferenciación histológica (carcinoma oral de células escamosas bien diferenciado (COCE-BD) (n=20), carcinoma oral de células escamosas moderadamente diferenciado (COCE-MD) (n=24) y carcinoma oral de células escamosas pobremente diferenciado (COCE-PD) (n=14)) y 13 muestras de MO. Se realizó técnica de inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales anti-Ki-67 y anti CD105. La cuantificación del antígeno Ki-67 se determinó mediante un método semicuantitativo, por campo de objetivo 40x a microscopía óptica convencional, en 5 campos por muestra, obteniendo un índice de marcación de proliferación para la proteína Ki-67 por muestra, en tanto, la MDV se definió como el número de vasos positivos para CD105 por 5 campos a objetivo de 40x para microscopía óptica convencional por muestra equivalente a un área total de 200x. Se realizó estadística descriptiva y analítica de los datos obtenidos.

Resultados: La edad media de los pacientes con COCE fue de 65 años, siendo la mayor frecuencia en el sexo masculino (72,41%). La localización anatómica más frecuente fue lengua (27,58%). Se observó diferencia estadísticamente significativa en la inmunoexpresión de la proteína Ki-67 en COCE versus MO ($p < 0,05$) y en COCE-BD versus COCE-PD ($p < 0,001$). Para MDV detectada mediante

CD105 se observó diferencia estadísticamente significativa en COCE versus MO ($p < 0,001$), en COCE-BD versus COCE-PD ($p < 0,001$), en COCE-MD versus COCE-PD ($p < 0,0001$). Se encontró una correlación positiva entre Ki-67 y MDV detectada mediante CD105 en COCE-BD ($p = 0,018$).

Conclusión: Este estudio demuestra una alta expresión de la proteína Ki-67 y alta MDV detectada mediante CD105 en COCE comparada a la inmunexpresión en el epitelio escamoso estratificado de MO del antígeno Ki-67 y de la MDV detectada en la lámina propia de la MO. La sobreexpresión de la proteína Ki-67 en COCE comparado al detectado en el epitelio de la MO, podría explicar la intervención de esta molécula en los mecanismos que se involucran con promoción de la carcinogénesis en COCE. Asimismo, el aumento de la MDV detectada mediante CD105 se relacionaría con el crecimiento y progresión tumoral. Los resultados de este estudio sugieren que los anticuerpos anti-Ki-67 y anti-CD105 podrían indicarse como marcadores pronósticos en la determinación de la tasa de crecimiento y progresión tumoral, contribuyendo a predecir el comportamiento clínico-biológico de estas lesiones y mejorando el pronóstico y la tasa de supervivencia de los pacientes.

2.- INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define el término cáncer como un amplio grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento anormal de células más allá de sus límites habituales que luego pueden invadir regiones adyacentes del cuerpo y/o diseminarse a otros órganos. El cáncer es un sistema celular adaptativo complejo que presenta características metabólicas perjudiciales para el huésped, como el caso de la metástasis y la resistencia a medicamentos (OMS., 2017; Wild y cols., 2014).

El cáncer oral ha sido identificado como una amenaza significativa para la salud pública. Según la OMS, el COCE es el tipo más común de cáncer oral y es definida como una neoplasia maligna de origen epitelial, caracterizada por su alta capacidad de infiltración, velocidad de crecimiento y tendencia a metástasis. Entre los factores que afectan la terapéutica y el pronóstico se presentan parámetros histológicos (grado de diferenciación, número de mitosis, infiltración tumoral, invasión vascular e invasión perineural) y la estadificación para el sistema TNM entre otros. El estudio de las células cancerosas ha permitido mejorar de manera significativa su manejo clínico, en aspectos relacionados a: crecimiento tumoral, invasión y metástasis, entregando antecedentes que permitan predecir la sensibilidad a distintos tipos de terapia. Asimismo, el hallazgo de marcadores biológicos tumorales representa un avance notable en la detección y prevención en etapas temprana de la carcinogénesis oral y en el crecimiento y progresión tumoral. Estos biomarcadores revelarían cambios genéticos y moleculares en distintas etapas en el proceso de la carcinogénesis para el COCE. Entre los marcadores biológicos relacionados a crecimiento y progresión tumoral se describen la proteína endoglina (CD105), relacionada a angiogénesis tumoral y neovascularización, y a la proteína Ki-67, relacionada a proliferación celular. Las células tumorales presentan defectos en los circuitos regulatorios que controlan la proliferación celular normal y su homeostasis, por lo que, adquieren una variedad de propiedades especiales en la carcinogénesis y en la progresión tumoral aumentando la tasa de proliferación de células neoplásicas y de la microdensidad

vascular intratumoral (OMS., 2005; Sánchez., 2016; Tanaka e Ishigamori., 2011; Almangush y cols., 2017; Khalili y cols., 2015).

El objetivo de este estudio es determinar y analizar la expresión de las proteínas Ki-67 y CD105 mediante técnica inmunohistoquímica en COCE según grado de diferenciación histológica, con la finalidad de sustentar el uso de los anticuerpos monoclonales anti-Ki-67 y anti-CD105 como marcadores pronósticos para el COCE en sus distintos grados de diferenciación histológica. Asimismo, determinar la expresión de las proteínas Ki-67 y CD105 como marcadores biológicos para proliferación celular y angiogénesis respectivamente.

3.MARCO TEÓRICO

I. Definiciones

El COCE corresponde a un carcinoma con diferenciación escamosa que surge del epitelio de la mucosa, representa el 95% de todos los tumores malignos de la cavidad oral, el cual afecta con mayor frecuencia a las superficies posterior, lateral y ventral de la lengua. Los factores etiológicos bien establecidos de COCE incluyen: hábito tabáquico, consumo de bebidas alcohólicas, infección por virus del papiloma humano (VPH) e inflamación crónica. Los grados de diferenciación descritos para COCE son: bien, moderadamente y pobremente diferenciados. Diversos estudios han demostrado que el grado de diferenciación histológica no necesariamente se relaciona con el pronóstico y la sobrevida del paciente, sin embargo, parámetros histológicos como infiltración y profundidad tumoral en conjunto a la detección de marcadores biológicos tumorales durante el estudio anatomopatológico, se correlacionarían con la evolución clínica del paciente (OMS., 2017; Schalch y cols., 2018; Tanaka e Ishigamori., 2011; Liu y cols., 2018; Xu y cols., 2018).

Un marcador tumoral, también denominado marcador biológico o biomarcador, se define como una molécula, sustancia o un proceso que se altera cualitativa o cuantitativamente como resultado de una condición precancerosa o un cáncer, detectable mediante una prueba de laboratorio en sangre, en líquidos orgánicos o en tejidos. Desde el punto de vista de su origen, los marcadores biológicos se producen por el propio tumor o como respuesta a la lesión tumoral en el tejido circundante. En la actualidad existen diferentes tipos de marcadores biológicos tanto celulares como tisulares, que desde una perspectiva molecular proporcionan información adicional a la recopilada en el examen clínico y al estudio histopatológico. Entre los marcadores biológicos tumorales se destacan: Ki-67, que se indica como marcador de proliferación celular y endogлина CD105, una molécula con rol angiogénico (Campuzano Maya., 2010, Bertram., 2000).

La proteína Ki-67 está presente durante todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y mitosis), pero ausente de las células en reposo (G0), por lo que se considera un marcador biológico indicado para la determinación de la fracción de crecimiento de una población de células específicas. La fracción de crecimiento de cualquier tejido es la proporción de células involucradas con el ciclo celular, lo que indica el potencial de crecimiento intrínseco de actividad proliferativa de células/tejidos. En la actualidad se reconoce el valor de la expresión de la proteína Ki-67 como factor predictivo/pronóstico demostrando su utilidad para medir la respuesta a un determinado tratamiento adyuvante (Brown y Gatter., 2002).

La proteína endoglina (CD105) es un receptor para la transformación de la señalización del factor de crecimiento β , siendo una proteína inducida por hipoxia y un marcador potencial para las células endoteliales activadas, lo que implica neoangiogénesis en el contexto del crecimiento tumoral, por lo que desempeña un rol importante en angiogénesis y fibrogénesis (Dallas y cols., 2008).

II. Epidemiología

El cáncer de cabeza y cuello es uno de los seis tipos de cáncer más frecuentes en los seres humanos. Se estima que el 30% de estos corresponden a neoplasias malignas con localización en cavidad oral, entre las cuales el 95% corresponden a COCE (Campo-Trapero y cols., 2008; Huang y cols., 2019).

Según datos procedentes de Globocan 2018, dentro de todos los tipos de cáncer (excluyendo el melanoma de piel), el cáncer de cavidad bucal ocupa el lugar 16 en mortalidad con 177.384 fallecimientos al año y una incidencia estimada de más de 380.000 nuevos casos reportados anualmente a nivel mundial (Ferlay y cols., 2018).

La mortalidad por cáncer oral ha permanecido estable en Chile con un 1% durante las últimas 6 décadas, siendo el número de fallecidos proporcional al número de habitantes de cada región. Diversos estudios indican que el grupo de edad más afectado por COCE es entre 50-60 años y posee predilección por el sexo

masculino. En Chile, se ha reportado que los sitios anatómicos más frecuentes son lengua (40,1%) y piso de boca (26,3%), seguido por trígono retromolar, reborde alveolar, paladar y mucosa yugal (Ministerio de Salud., 2016; Candia y cols., 2018;García Kass y cols., 2013; De la Fuente y cols., 2016; Rojas-Alcayaga y cols., 2010).

Existe escasa información de la incidencia y prevalencia de cáncer oral a nivel nacional. A la fecha, el Ministerio Nacional de Salud (MINSAL) cuenta 3 Registros Poblacionales de Cáncer: Valdivia (1993), Antofagasta (1998) y Concepción (2003). En base a estos registros, en el año 2012, se pudo establecer que en Chile el cáncer oral y faríngeo se sitúa en el lugar 17 entre los cánceres más prevalentes con una incidencia de 3,2 por 100.000 habitantes (Ministerio de Salud., 2012).

III. Factores de riesgo

La mayoría de los cánceres están asociados con riesgos ambientales, al estilo de vida o exposiciones conductuales, diversos estudios y encuestas en Chileevidencian la existencia de estilos de vida no saludables, caracterizados por una elevada prevalencia de consumo de tabaco y alcohol, sedentarismo, sobrepeso y obesidad.Entre los factores de riesgo de COCE, se encuentran el alcohol, tabaco, infección por virus papiloma humano, dieta alta en azúcares refinadas y grasas trans, pobre higiene oral y mal estado periodontal, bajo nivel socioeconómico, inmunosupresión, entre otros. Además las personas que fuman y beben sinérgicamente aumentan el riesgo en un 50% de desarrollar COCE (Maraboli., 2014; Wild y cols.,2014; Ministerio de Salud., 2016; Boza., 2016).

IV. Características clínicas

La manifestación clínica de COCE es variada. En estadios tempranos se puede observar una lesión de aspecto clínico leucoplásica, eritroplásica, leucoeritroplásica o una úlcera asintomática. En etapas más avanzadas puede presentarse como una lesión exofítica o endofítica, con borde irregular e indurada y de fondo sucio(Momares y cols., 2014).

Una parte esencial del procedimiento de diagnóstico para el cáncer oral es la palpación de la lesión, que generalmente revela induración de bordes. Desafortunadamente, debido a la semejanza que poseen las etapas tempranas de COCE con lesiones no malignas de alta prevalencia en cavidad oral, existe una gran cantidad de diagnósticos tardíos (OMS., 2017).

Una de las áreas mayormente comprometidas es la lengua.Estas lesiones se presentan clínicamente como úlcera o lesión exofítica con bordes netos y grados de induración variables, generalmente asintomáticos. Su naturaleza silente se puede presentar concomitantemente con nódulos cervicales asintomáticos de consistencia pétreo que determina la presencia de etapas más tardías y, por tanto, peor pronóstico. Los pacientes raramente presentan disfagia, odinofagia o alteraciones en la fonoarticulación(García Kass y cols., 2013).

V. Características histológicas

Histológicamente, el COCE presenta una proliferación epitelial atípica que traspasa la membrana basal e invade el epitelio basal. El tumor puede invadir tanto tejido adiposo, como óseo y muscular, destruyéndolos en su progresión y siendo capaz de inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), una respuesta inflamatoria y ocasionalmente fibrosis densa. Además, puede generar metástasis en linfonodos regionales y a distancia (Maraboli., 2014).

Previo al desarrollo de COCE se pueden presentar en la MO determinadas alteraciones morfológicas, conocidas como desórdenes potencialmente malignos

(DPM). Estas alteraciones cuentan con un potencial incrementado de presentar transformación maligna. La presencia de displasia epitelial oral (DEO) corresponde a un conjunto de alteraciones de la arquitectura y de la celularidad epitelial, cuyo desarrollo es fuertemente asociado al aumento de riesgo de progresión a COCE (Boza y cols., 2017; OMS., 2017).

Las células cancerosas difieren notablemente de las células normales, tanto en su comportamiento como en su grado de diferenciación celular. Frente a esto, se han desarrollado diferentes clasificaciones de diagnóstico para cáncer oral según las células involucradas en su desarrollo (Barnes y cols., 2005).

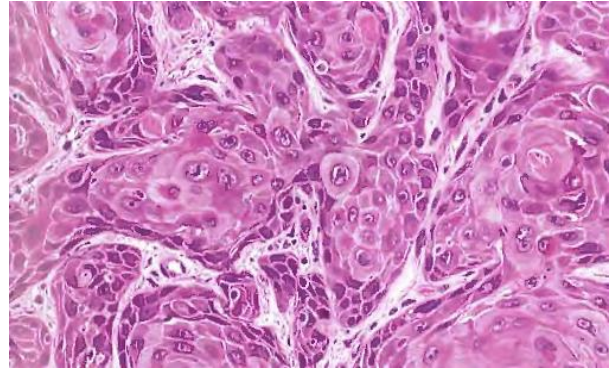
Las principales características histológicas de COCE corresponden a la diferenciación del estrato escamoso epitelial y la invasión celular. La diferenciación escamosa se caracteriza por queratinización (con o sin formación de perlas de queratina) y/o puentes intercelulares. Por otro lado, la invasión se manifiesta como la interrupción de la membrana basal y el crecimiento hacia basal de las islas tumorales, cordones o células tumorales aisladas en el tejido subyacente (OMS., 2017).

La mayoría de los carcinomas de la cavidad oral son histológicamente bien o moderadamente diferenciados, en tanto, el COCE-PD es menos frecuente. El COCE-BD se caracteriza por nidos, cordones e islas de células grandes con citoplasma rosado, puentes intercelulares prominentes y núcleos redondos, que pueden no ser obviamente hipercromáticos. Las células disqueratósicas y las perlas escamosas son prominentes. El pleomorfismo celular y nuclear, la hipercromasia nuclear y las figuras mitóticas (incluidas las formas atípicas) aumentan con el grado tumoral. La clasificación no se correlaciona bien con el pronóstico. En el COCE-PD las características de la diferenciación escamosa son mínimas o inexistentes, lo que requiere confirmación inmunohistoquímica. Los tumores bien diferenciados tienden a invadir en islas grandes, mientras que los tumores menos diferenciados tienden a tener proyecciones dentadas o pequeñas islas y células individuales dispersas en el frente invasivo. Se puede observar un estroma desmoplásico significativo con respuesta inflamatoria del hospedador

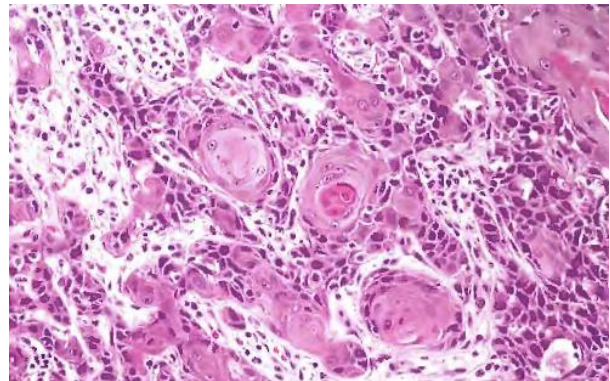
alrededor de los nidos de células tumorales invasoras. La mucosa adyacente muestra con frecuencia varios grados de displasia epitelial. Se observa invasión perineural y linfovascular, más frecuentemente en tumores poco diferenciados (OMS., 2017).

Grado de diferenciación histológica del carcinoma oral de células escamosas según la clasificación de tumores de cabeza y cuello de la OMS del año 2017

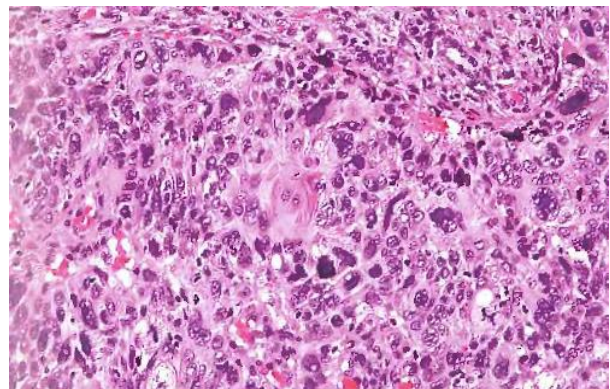
Carcinoma de células escamosas bien diferenciado: Islas de células tumorales con diferenciación escamosa claramente visible y pleomorfismo nuclear y celular leve.



Carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado: Islas y cordones de células tumorales con clara diferenciación escamosa y pleomorfismo nuclear y celular moderado.



Carcinoma de células escamosas mal diferenciado: crecimiento sólido de células tumorales con marcado pleomorfismo nuclear y celular, alta tasa de mitosis y diferenciación escamosa apenas distinguible.



VI. Estadificación clínica

De acuerdo al sistema de estadificación TNM que realiza la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC)(Tabla 1) se describe tanto el tamaño del cáncer como su diseminación en el cuerpo del paciente mediante 3 letras: **T** describe el tamaño del tumor primario y la diseminación del cáncer hacia el tejido cercano, la letra **N** número y ubicación de linfonodos afectados y la letra **M** describe la presencia de metástasis a distancia

Los carcinomas de la cavidad oral en etapa más temprana se denominan etapa 0 (carcinoma in situ) y luego varían de las etapas I (1) a IV (4). Como regla general, cuanto menor sea el número, menor será la propagación del cáncer. Un número más alto, como el estadio IV, significa que el cáncer se ha diseminado a otros tejidos (Divner y cols., 2017).

Tabla 1. Clasificación TNM de carcinomas de labio y cavidad oral según la 8ª edición de la American Joint Committee on Cancer (AJCC).	
T: tamaño del tumor primario y la diseminación del cáncer hacia el tejido cercano	
TX	No se puede evaluar el tumor primario.
Tis	Carcinoma in situ.
T1	Tumor ≤2 cm., profundidad de invasión ≤5 mm.
T2	Tumor ≤2 cm., profundidad de invasión >5mm. y ≤10 mm. o tumor >2 cm. pero ≤4cm., y ≤10 mm. de profundidad de invasión.
T3	Tumor >4 cm. o todo tumor >10 mm. de profundidad de invasión
T4	Enfermedad local moderadamente avanzada o muy avanzada.
T4a	Enfermedad local moderadamente avanzada (labio). El tumor invade a través del hueso cortical o afecta al nervio alveolar inferior, piso de boca o piel de cara (mentón o nariz), (cavidad oral). El tumor invade solo las estructuras adyacentes (por ejemplo, a través del hueso cortical de la mandíbula o maxilar, o involucra el seno maxilar o piel de cara). Nota: erosión superficial del hueso / alvéolo dentario (aislado) por un tumor primario gingival no es suficiente para clasificar un tumor como T4.
T4b	Enfermedad local muy avanzada El tumor invade el espacio masticatorio, las láminas de la apófisis pterigoides o base de cráneo y/o limita la arteria carótida interna.
N: número y ubicación de linfonodos afectados	
NX	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales.
N0	No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales.
N1	Metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral, ≤3 cm en su dimensión mayor.
N2	Metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral, >3 cm, pero ≤6 cm en su mayor dimensión.
N2a	Metástasis en múltiples ganglios linfáticos ipsilaterales, ninguno >6 cm en su mayor dimensión.
N2b	Metástasis en ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales, ninguno >6 cm en su mayor dimensión. Metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral, >3 cm, pero ≤6 cm en su mayor dimensión.
N2c	Metástasis en múltiples ganglios linfáticos ipsilaterales, ninguno >6 cm en su mayor dimensión.
N3	Metástasis en ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales, ninguno >6 cm en su mayor dimensión. Metástasis en un ganglio linfático >6 cm en su mayor dimensión.
M: metástasis a distancia	
M0	No hay metástasis a distancia.
M1	Metástasis a distancia.

VII. Pronóstico

El pronóstico para COCE depende del estadio de la enfermedad, del tamaño de la tumoración, de la afectación de las cadenas ganglionares y de las metástasis a distancia. Estudios recientes muestran un escaso índice de supervivencia global a los cinco años, inferior al 50%, derivado de su diagnóstico tardío, y la diseminación metastásica cervical incontrolada que representa una mortalidad del 85%, (Boza y cols., 2017; Zhong y cols., 2018; Sánchez y cols., 2005).

Se debe considerar que la clasificación en los distintos grados de diferenciación histológica no posee correlación con los resultados clínicos y el pronóstico de COCE por lo que se deben considerar otros factores pronósticos como un patrón de invasión no cohesivo, invasión perineural y linfovascular, invasión ósea y grosor > 4 mm. Los márgenes de la muestra de resección predicen mejor el control local que los márgenes del lecho tumoral. Asimismo, la diseminación extracapsular a partir de metástasis en el cuello, dos o más linfonodos afectados y la pesquisa de patrones propios de los niveles IV y V se correlacionan con un peor pronóstico (Wild y cols., 2014).

El COCE corresponde a una neoplasia agresiva altamente invasiva con una elevada capacidad de metástasis a linfonodos cervicales, pudiendo ocasionar casos de desfiguración facial, disfunción, trauma psicológico, afectando la calidad y esperanza de vida, lo que destaca la necesidad de encontrar nuevos objetivos terapéuticos (Martínez-Cortez y cols., 2011).

VIII. Cáncer y proliferación celular

La proliferación celular se considera uno de los mecanismos más importantes en la oncogénesis. Es un proceso biológico de importancia fundamental controlado por mecanismos altamente coordinados. Las redes reguladoras complejas median en el desarrollo embrionario y desarrollo normal siendo responsables de la respuesta sistémica a las heridas y la infección, mientras que su desregulación

puede dar como resultado la formación de tumores (Xie y cols., 2016; Schluter y cols., 1993).

Durante el crecimiento tumoral sólido del cáncer oral de células escamosas, las células adquieren una proliferación crónica sostenida y son desafiadas por el estrés metabólico causado por el agotamiento de nutrientes, las alteraciones del pH y la hipoxia. Las principales estrategias fisiológicas de las células cancerígenas para la adaptación metabólica incluyen la inhibición del ciclo celular y la inducción de la autofagia. Por lo tanto, las células tumorales pueden sufrir un período de disminución de la tasa de crecimiento tumoral como un cambio adaptativo que les permite superar este estrés metabólico o sufrir apoptosis (Diniz y cols., 2015).

Numerosos estudios han demostrado la importancia pronóstica del aumento de la actividad proliferativa en algunos tipos de cáncer (Gonzalez-Moles y cols., 2010).

Los métodos inmunohistoquímicos usados en la evaluación de proliferación celular presentan ventajas particulares sobre otras técnicas debido a la mantención de la arquitectura celular y tisular, la relativa simplicidad de la técnica y la rapidez en los resultados (Shear "a".,2002; Shear "b"., 2002).

Ki-67 es una proteína no histona que se expresa en el núcleo durante todo el ciclo celular, excepto en la fase G0 y en las primeras fases de G1, por lo cual es un marcador inmunohistoquímico eficiente de células que proliferan. Debido a su alta sensibilidad y especificidad en el etiquetado de la proliferación celular en tejidos neoplásicos, se ha utilizado para evaluar la agresividad de una neoplasia. Ki-67 proporciona información sobre la fracción total de células en proliferación, lo que significa que Ki-67 marca la proporción de células en el tumor que han ingresado al ciclo celular. Además, la expresión de este biomarcador también puede aparecer cuando se bloquea la síntesis de ADN o en células que experimentan apoptosis (Dragomir y cols., 2012; Lopes y cols., 2017).

El análisis de la expresión de Ki-67 se usa para determinar el índice de proliferación de las células en tejido normal y en muestras de tumor. Estudios previos han demostrado que los altos índices de Ki-67 observados en COCE

estaban correlacionados con la gravedad de la enfermedad y con un peor pronóstico (Iamaroon y cols., 2004).

Otros estudios indican que la importancia pronóstica de la expresión de la proteína Ki-67 en COCE es aún controversial, probablemente debido a que es un marcador de la fracción total de células en proliferación, que corresponde no sólo a las células en proliferación constante, sino también a las células proliferantes destinadas a la diferenciación terminal (González- Moles y cols., 2010).

IX. Cáncer y angiogénesis

La angiogénesis corresponde al crecimiento y la proliferación de los vasos sanguíneos de la vasculatura existente. Este evento es relevante en el contexto de una serie de procesos fisiológicos normales que incluyen crecimiento y desarrollo, reparación y reproducción. El proceso típicamente involucra brotación, ramificación y crecimiento diferencial de vasos sanguíneos preexistentes y el empleo de células de soporte asociadas con el endotelio, incluyendo células de músculo liso y pericitos. El suministro adecuado de células tumorales con nutrientes y oxígeno y un drenaje eficiente de los metabolitos es proporcionado por una red compleja de microvasculatura sanguínea tumoral (Kargahi y cols., 2018; Kabiraj y cols., 2018).

El fenotipo angiogénico participa de manera preponderante en el desarrollo carcinogénico en múltiples etapas de la progresión tumoral. Además de formar redes microvasculares (angiogénesis), las células endoteliales también pueden afectar el crecimiento del tumor mediante la liberación de citocinas y proteasas, que actúan exacerbando el comportamiento proliferativo e invasivo de las células tumorales adyacentes. Varios marcadores biológicos relacionados a neovascularización tumoral y angiogenesis, han sido investigados, estudiados y desarrollados con el fin de implementar medidas preventivas y de pronóstico para pacientes con COCE (Basnaker., 2014; Kabiraj y cols., 2018). Entre estos marcadores biológicos se ha descrito una glicoproteína de membrana tipo I denominada endoglina (CD105).

CD105 es una glicoproteína de membrana celular homodimérica unida a disulfuro con un peso molecular de 180 kDa. En humanos, el *gen CD105* se encuentra en el cromosoma 9q34 y está organizado en 14 exones. Las mutaciones de este gen son las responsables de un trastorno vascular autosómico dominante que se denomina telangiectasia hemorrágica hereditaria de tipo 1. La proteína CD105 es un componente del complejo receptor del factor de crecimiento transformante -b1, una citoquina que modula la angiogénesis. Otros estudios mostraron que endogлина CD105 se expresaba también en macrófagos, precursores eritroides, sincitiotrofoblastos de la placenta terminal y en células estromales (Tabla 2) (Marioni y cols., 2013; García-Pozo., 2008; Khalili y cols., 2015; García-Pozo., 2008; Dallas y cols., 2008).

Aparte de su importancia biológica en procesos fundamentales de las células endoteliales, el reconocimiento del rol biológico que posee la endogлина CD105 es cada vez mayor. En ese sentido, estudios tanto in vitro como in vivo han confirmado el potencial de la proteína endogлина CD105 como diana terapéutica para el cáncer humano, observándose que los anticuerpos monoclonales anti-CD105 conjugados con inmunotoxinas inducen supresiones duraderas del crecimiento tumoral y las metástasis en modelos animales. Varias neoplasias han sido estudiadas para la expresión de endogлина CD105: cáncer colorrectal; carcinomas de mama; carcinoma de células claras renales; carcinoma endometrial; adenocarcinoma de esófago; carcinoma gástrico; carcinoma de células escamosas laríngeo y carcinoma de páncreas, sin embargo, escasos estudios describen la expresión de CD105 en tumores de cabeza y cuello (Rajendran., 2006).

La densidad microvascular (MDV) es el parámetro más utilizado para cuantificar la angiogénesis intratumoral. La MDV en tumores se ha evaluado mediante tinción con anticuerpos pan-endoteliales contra antígenos como el factor de Von Willebrand (Factor VIII), CD34 y CD31. Las células endoteliales son muy heterogéneas y, por lo tanto, se ha sugerido que los marcadores pan-endoteliales no son ideales para estimar la presencia de vasos patológicos o activados en un

tumor. En cambio, la proteína CD105, se expresa por las células endoteliales activadas en la angiogénesis y se considera un marcador específico en la angiogénesis en curso de los tumores (Marioni y cols., 2017;Khalili y cols., 2015).

La MDV se puede determinar mediante la evaluación inmunohistoquímica con distintos marcadores de células endoteliales, en el que la endogлина CD105 es un potente factor angiogénico pleiotrópico que se expresa en células endoteliales activadas durante la angiogénesis y se considera como un marcador específico para la detección de la angiogénesis del tumor. Lo anteriormente descrito se basa en estudios en el que CD105 se presentaba intensamente en el endotelio de varios tejidos tumorales en comparación con tejidos normales (Rajendran., 2006).

Localización	Tipo de células
Sistema Cardiovascular	Células endoteliales Células vasculares de músculo liso
Sistema Hematopoyético	Fibroblastos estromales de médula ósea Células B progenitoras Precursores eritroides Células CD34+ circulantes
Sistema Reticuloendotelial	Macrófagos intersticiales en pulpa roja esplénica Monocitos activados Macrófagos diferenciados Células dendríticas foliculares en órganos linfoides
Sistema Genitourinario	Células intersticiales extraglomerulares del riñón Células del mesangio glomerular de riñón Células basales de túbulos seminíferos
Desarrollo embrionario del sistema tegumentario	Melanocitos Sincitiotrofbastos de placenta Células embrionarias mesenquimales de corazón
Fuente: Dallas y cols., 2008.	

X. Rol de las proteínas Ki-67 y CD105 en cáncer

El desarrollo y la progresión del cáncer se caracterizan por desequilibrios de la proliferación, diferenciación y muerte celular, todos los cuales se consideran son el resultado de alteraciones en el control del ciclo celular. Estudios previos han demostrado que las alteraciones en los reguladores del ciclo celular se presentan en diversos tipos de cáncer humano (Sawair y cols., 2016).

La evaluación de los marcadores biológicos involucrados en el ciclo celular tumoral ha indicado que los tumores con una mayor tasa de proliferación muestran comportamientos clínicos más agresivos en comparación con los tumores con una baja tasa de proliferación (Khalili y cols., 2015).

La angiogénesis, definida como la formación de nuevos vasos capilares a partir de vasos preexistentes, es esencial para la progresión y crecimiento de la mayoría de los tumores sólidos. Asimismo, la progresión y crecimiento tumoral se presenta afectado por el aumento de la tasa de proliferación celular. Por lo tanto, es posible que alteraciones en la angiogénesis y/o neovascularización tumoral puedan influir o verse influidas por el incremento de la proliferación en células tumorales (Khalili y cols., 2015).

4. HIPÓTESIS

Existe una mayor expresión de la proteína Ki-67 y aumento de la MDV, detectada mediante la inmunexpresión de la proteína CD105, en COCE respecto a la inmunexpresión de estas proteínas en MO. Asimismo, hay mayor inmunexpresión de la proteína Ki-67 y aumento de la MDV, detectada mediante la inmunexpresión de la proteína CD105, en COCE-PD comparados con COCE-MD y COCE-BD.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión inmunohistoquímica de las proteínas Ki-67 y CD105 en muestras de COCE según grado de diferenciación histológica: COCE-BD, COCE-MD y COCE-PD y muestras de MO del Servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar, comparar y analizar la inmunexpresión de la proteína Ki-67 en células epiteliales neoplásicas en muestras de COCE según grado de diferenciación histológica y en muestras de MO.
2. Cuantificar, comparar y analizar MDV detectada mediante la inmunexpresión de la proteína CD105 en células endoteliales en COCE según grado de diferenciación histológica y en MO.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

I. Tipo de estudio

Estudio observacional descriptivo transversal.

II. Universo y Muestra

Se seleccionaron 58 muestras de biopsias provenientes del Servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile que cumplan con el diagnóstico histopatológico de COCE. Estas muestras se clasificaron según su grado de diferenciación histológica (COCE-BD (n=20), COCE-MD (n=24) y COCE-PD (n=14) y 13 muestras de MO. Las muestras de COCE se seleccionaron según criterios de inclusión y exclusión del estudio. Estas muestras correspondían a los envíos de biopsias para solicitud de informe anatomopatológico con fines diagnósticos, principalmente de hospitales públicos y servicios de cirugía máxilofacial universitarios de la Región Metropolitana de Santiago de Chile entre los años 1984 y 2013.

III. Criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de inclusión

- a) Muestras que correspondan a diagnósticos de COCE según grado de diferenciación histológica OMS 2017.
- b) Muestras de MO que correspondan mucosa de revestimiento y mucosa masticatoria.

Criterios de **exclusión**

- a) Muestras que no dispongan información clínica relacionada a edad y/o sexo y/o localización anatómica.
- b) Muestras de COCE obtenidas posterior al tratamiento quirúrgico que incluyan quimioterapia o radioterapia.
- c) Muestras de COCE que correspondan a recurrencias y/o recidivas post-tratamiento quirúrgico.
- d) Muestras de MO que presenten infiltrado moderado (>15 a 50 células por campo de alta potencia) a severo (>50 células por campo de alta potencia) (Clark y cols, 2006).

IV. Recolección de muestras e información clínica

Recopilación de muestras: Se obtuvieron bloques de parafina de las muestras registradas en la base de datos digital del Servicio de Anatomía Patológica, registrados entre los años 1984-2013 para lesiones que presenten el diagnóstico histopatológico de COCE. Se realizaron los procedimientos de laboratorio correspondientes a la obtención de nuevas laminillas para tinción corriente hematoxilina-eosina. Posteriormente, se reevaluaron las laminillas según los criterios histopatológicos acordados (OMS, 2017) para tinción hematoxilina-eosina (HE) a microscopia óptica a distintos aumentos (objetivos: 4x, 10x, 40x). Estas observaciones microscópicas se realizaron en forma ciega, en un microscopio Olympus BX41.

Recopilación de datos clínicos: La información clínica se obtuvo a partir de las fichas clínicas de los pacientes registradas en la base de datos digital del Servicio de Anatomía Patológica (Microsoft®Access2003). La información obtenida fue recopilada en una planilla del programa Microsoft Office: Microsoft Excel 2016.

V. Procesamiento y procedimientos Inmunohistoquímicos

Se seleccionaron 20 bloques de parafina de COCE-BD, 24 bloques de parafina de COCE-MD, 14 bloques de parafina de COCE-PD y 13 bloques de parafina de MO. Estas muestras fueron fijadas en formalina buffer al 10% y procesadas para técnica histológica convencional. Se obtuvieron secciones de 3 µm de espesor en un micrótopo de rotación Leitz-Wezlar, para obtener 2 cortes de cada muestra, una para uno de los anticuerpos utilizados, para ser depositados en portaobjetos adhesivos con superficie con carga positiva (CELLPATH®, Colourcoat+ Adhesión, WhiteCoat). Posteriormente fueron desparafinados e hidratados mediante una batería de desparafinación consistente en xilol y alcoholes descendentes (absoluto y 96°), hasta llegar a un último baño de agua destilada, para luego ser lavados con PBS (buffer fosfato salino) a pH 7.4. La recuperación de los sitios antigénicos se realizó en buffer citrato a pH 6.0 con calor húmedo en vaporera por 20 minutos. Posteriormente se deja enfriar el recipiente que contiene los portaobjetos con las muestras en una caja coplin horizontal de vidrio en hielo hasta alcanzar una temperatura de 21° Celsius, para continuar con el bloqueo de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3% con metanol por 20 minutos y bloqueo de antígenos inespecíficos con albúmina sérica bovina según protocolo del sistema de inmunodetección por 20 minutos. Los anticuerpos monoclonales primarios usados fueron los siguientes: Ki-67 y CD105 (tabla 3). La incubación con los anticuerpos primarios se realizó toda la noche (“overnight”) a temperatura entre 4°-8° Celsius. Para la inmunodetección se utilizó el método avidina-biotina-peroxidasa y revelado con diaminobenzidina (BSB 0003; Mouse /Rabbit ImmunoDetector DAB HRP Brown Detection System). La contraincubación se realizó con hematoxilina de Harris por 1 minuto. Entre cada etapa, desde la recuperación antigénica hasta el término de la aplicación del kit del sistema de inmunodetección, los portaobjetos con las muestras fueron lavados en una caja coplin vertical de vidrio con PBS por 30 minutos.

Anticuerpo primario	Numero de catalogo	Presentación anticuerpo	Tipo de anticuerpo	Clon	Isotipo	Especie reactividad	Reactividad	Localización	Dilución	Incubación
Ki-67, RMab	BSB 5712	Concentrado	Ratón, monoclonal	EP5	IgG	Humano	Parafina	Nuclear	1:50	Overnight
CD105, RMab	BSB 2870	Concentrado	Conejo, monoclonal	EP274	IgG	Humano	Parafina	Citoplasmática	1:50	Overnight

A. Controles positivos y negativos

Se emplearon las siguientes muestras para los controles positivos externos:

- Ki-67: Adenocarcinoma colon humano.
- CD105: Linfoma no Hodgkin humano y amígdala humana.

Para los controles negativos se omitió el anticuerpo primario y secundario en las muestras empleadas como controles positivos y se reemplazó por solución PBS pH 7,4.

B. Cuantificación de los antígenos en estudio

La presencia y cuantificación de células marcadas a la inmunotinción para la proteína Ki-67 se determinó mediante un método semi cuantitativo, contabilizando visualmente el número de células con tinción nuclear color marrón, por campo de (objetivo) 40x para microscopia óptica convencional (Olympus BX41) en 5 campos por muestra estudiada. Se tomó una microfotografía por cada campo estudiado utilizando la cámara digital Color HD 2,5 Mgpixl, modelo MC120 HD, marca Leica. se procesó con el software Leica LAS EZ 3.4.0 y se almacenó en formato JPEG (Joint Photographic Experts Group). El área por campo de 40x fue de 0,13 mm². Se cuantificó el número de células epiteliales neoplásicas con inmunotinción nuclear para Ki-67 por medio del programa de dominio público ImageJ (v1.51k, National Institutes of Health, USA). Se obtuvo el índice de marcación (IM) entre el cociente de células marcadas (positivas) para inmunotinción nuclear y el número total de células (marcadas y no marcadas) por cada campo de 40x. Este recuento

se realizó en forma ciega por dos observadores. Para cuantificar el grado de concordancia de los examinadores se realizó el Test estadístico de Kappa. El promedio del IM de cada muestra se obtendrá de 5 campos estudiados y se expresó en términos de porcentaje (%), para ser analizados en el programa estadístico correspondiente. La información obtenida fue recopilada en una planilla del programa Microsoft Office: Microsoft Excel.

Los índices angiogénicos para las muestras de COCE se determinó sobre la base de la inmunotinción para la proteína CD105 en células endoteliales. El análisis cuantitativo de la MDV se realizó de acuerdo con Weidner y cols. Cada sección histológica se examinó con microscopía óptica convencional (Olympus BX41) a aumento de objetivo de 40x y se seleccionaron cinco campos con el mayor grado de vascularización. Se tomó una microfotografía por cada campo estudiado (5 campos) y se procesó con el software Leica LAS EZ 3.4.0 y se almacenó en formato JPEG. A continuación, se contabilizó en estos 5 campos (40x) el número de vasos positivos a inmunotinción citoplasmática para CD105, hasta completar un área equivalente de 200x, que corresponde a un área de $0,7386 \text{ mm}^2$. Por lo tanto, la microdensidad vascular se definió como el número de vasos positivos para CD105 por 5 campos ópticos de 40x hasta un área total equivalente a un aumento de 200x. Este recuento se realizó en forma ciega por dos observadores. Para cuantificar el grado de concordancia de los examinadores se realizó el Test estadístico de Kappa. La información obtenida fue recopilada en una planilla del programa Microsoft Office: Microsoft Excel.

VI. Análisis de la información

Se realizó análisis exploratorio mediante estadística descriptiva para caracterizar las variables demográficas de la muestra. La estadística analítica se realizó usando los programas GraphPad Prisma v6.2 e IBM® SPSS® Statics v23. Se llevó a cabo la estadística descriptiva con el fin de reconocer las medidas de tendencia central, posición y dispersión. Se determinó el tipo de distribución de los datos a través de la prueba de D'Agostino-Pearson. Para comparar las medias entre estos grupos, se usó test paramétrico ANOVA y test no paramétrico Mann

Whitney. Posteriormente, se utilizó la prueba de chi- cuadrado de Pearson y Spearman (en casos de distribución no Normal) para determinar la asociación entre las distintas variables categóricas (sobreexpresión de proteína a través del IM y según grado de diferenciación). Finalmente, se utilizó la prueba post-hoc de Tukey y corrección de Bonferroni como test de comparaciones múltiples. Un valor $p < 0,05$ fue considerado como límite de significancia, con un intervalo de confianza del 95%.

8. RESULTADOS

I) Caracterización histológica y epidemiológica de las muestras

a) Caracterización histológica de las muestras

Las muestras de MO(Figura1: A, B y C) presentaban un epitelio escamoso estratificado con y sin queratinización dependiendo del tipo de mucosa seleccionada: mucosa masticatoria (gingiva y paladar duro), mucosa de revestimiento (cara interna labio) y mucosa especializada (cara dorsal lingual). La lámina propia era de tipo fibrocolagenosa.

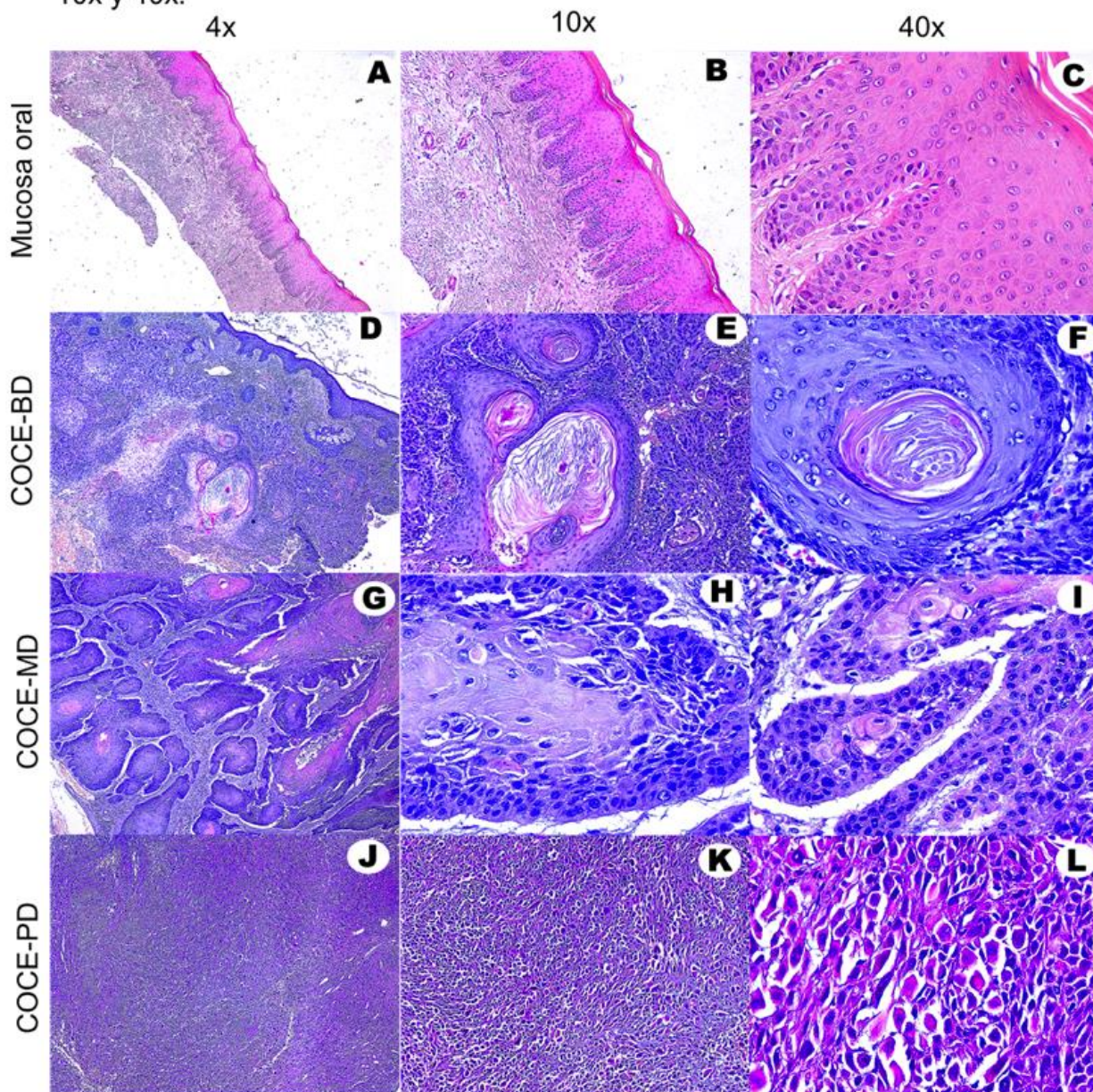
Las muestras de COCE se tipificaron según grado de diferenciación:

COCE-BD, (figura 1: D, E y F) caracterizada por islotes de células tumorales con grados variables muy visibles de diferenciación escamosa (formación de perlas de queratina), pleomorfismo nuclear y celular leve y escasa figuras mitóticas atípicas.

COCE-MD, (Figura 1: G, H, I) caracterizada por islas y cordones de células tumorales con menor diferenciación escamosa y tendencia a la queratinización, pleomorfismo nuclear y celular moderado.

COCE-PD, (Figura 1: J, K, L) caracterizada por proliferación de células tumorales con marcado pleomorfismo nuclear y celular, anaplasia, alta tasa de mitosis y diferenciación escamosa apenas distinguible con escasa presencia de puentes intercelulares. Se observa frecuentemente células gigantes multinucleadas.

Figura 1. Microfotografías: mucosa bucal (A, B, C), COCE-BD (D, E, F), COCE-MD (G, H, I) y COCE-PD (J, K, L) (Hematoxilina-Eosina. Aumento objetivos: 4x, 10x y 40x.



b) Distribución de las muestras por edad y sexo

De un total de 58 muestras con diagnóstico de COCE, 20 muestras (34,48%) correspondieron a COCE-BD, 24 muestras (41,37%) a COCE-MD y 14 muestras (24,13%) a COCE-PD, siendo la edad promedio para los COCE según grado de diferenciación histológica: 65 años ($\pm 10,73$ SD), 63 años ($\pm 12,49$ SD) y 58 ($18 \pm$ SD) años, respectivamente (Tabla 3). Además, se incluyeron 13 muestras de MO, siendo la edad promedio 40 años ($\pm 17,6$ SD).

Según la distribución de las lesiones de COCE por sexo del paciente: se obtuvieron 16 muestras obtenidas de pacientes de sexo masculino (80%) y 4 muestras de pacientes de sexo (20%) para COCE-BD; 19 de muestras de pacientes sexo masculino (79,16%) y 5 muestras de pacientes de sexo femenino (20,83%) para COCE-MD y 7 de muestras de pacientes de sexo masculino hombres (50%) y 7 muestras de pacientes de sexo femenino (50%) para COCE-PD. Se observó un mayor porcentaje de muestras de COCE en el sexo masculino ($n=42$; 72.41%). En tanto, para MO, se obtuvieron 6 muestras de pacientes de sexo masculino (46,15%) y 5 muestras de pacientes de sexo femenino (53.84) (Tabla 4).

La década con más frecuencia de lesiones fue la 6ta década ($n=16$; 27,58%). En la distribución por década y sexo para COCE, la mayoría de las lesiones para COCEse presentaron en la sexta y séptima década (31 casos), siendo el sexo masculino el más afectado (26 casos) (Tabla 5).

Tabla 4. Número y porcentaje de muestras de MO y COCE BD, COCE MD y COCE PD con promedio de edad, desviación estándar, mediana y distribución por sexo.

Muestras	n (%)	Promedio edad (años)	Desviación estándar (SD)	Mediana	Sexo	
					M n (%)	F n (%)
COCE-BD	20 (34,48)	65,15	10,73	66,5	16 (27,58)	4 (6,89)
COCE-MD	24 (41,37)	63,5	12,49	65	19 (32,75)	5 (8,62)
COCE-PD	14 (24,13)	58,21	18,19	61,5	7 (12,06)	7 (12,06)
TOTAL COCE	58 (100)	62,79	13,57	64	42 (72,41)	16 (27,58)
MO	13(100)	41	18	44	6 (46,15)	7 (53,84)

Tabla 5. Distribución de COCE según década y sexo

Década	31-40		41-50		51-60		61-70		71-80		81-90	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
COCE-BD	0	0	0	1	6	1	3	0	7	2	0	0
COCE-MD	2	0	2	0	6	1	7	1	2	1	0	2
COCE-PD	2	2	0	1	1	1	3	1	0	1	1	1
TOTAL	4	2	2	2	13	3	13	2	9	4	1	3
DECADA/SEXO n (%)	(6.89)	(3.44)	(3.44)	(3.44)	(22.41)	(5.17)	(22.41)	(3.44)	(15.51)	(6.89)	(1.72)	(5.17)
TOTAL DECADA (%)	10,34		6,89		27,58		25,86		22,41		6,89	

II. Distribución de las muestras por localización anatómica

Las localizaciones con mayor frecuencia en las muestras para COCE fueron lengua con 16 casos (27,58%), siendo el borde lateral lingual el sitio más afectado con 10 casos (17,24%), encía con 13 casos (22,41%) y piso de boca con 10 casos (17,24%) (Tabla 6).

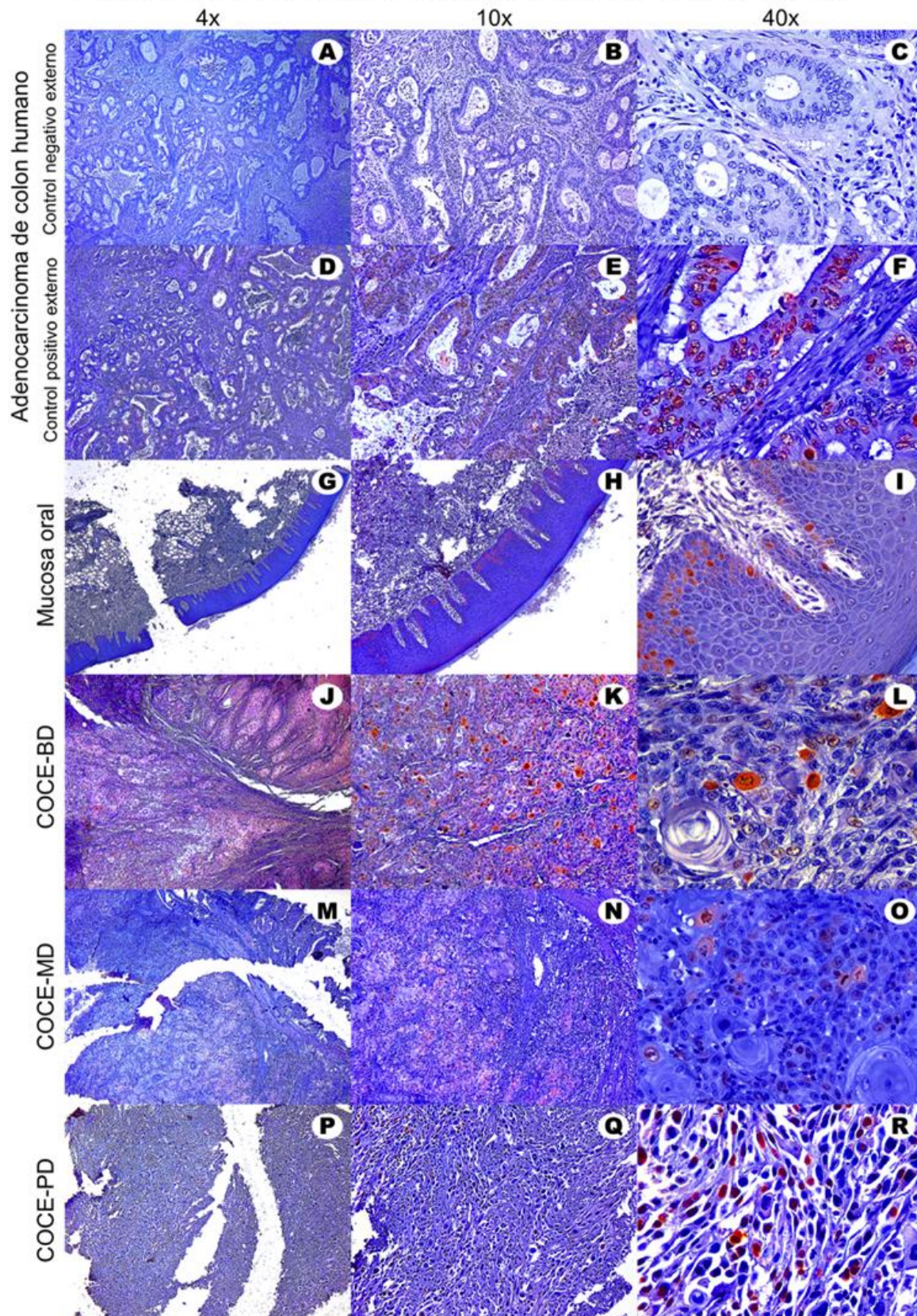
Tabla 6. Número y porcentaje de muestras de COCE-BD, COCE-MD y COCE-PD según localización anatómica					
Localización		COCE BD	COCE MD	COCE PD	Total, n, %
Paladar	Blando			2	2 (3,44)
	Duro	1			1 (1,72)
Encía	Maxilar	2	1	3	6 (10,34)
	Mandibular	3	2	2	7 (12,06)
Lengua	Cara dorsal	1	3		4 (6,89)
	Borde lateral	7	2	1	10 (17,24)
	Base		1	1	2 (3,44)
Labio	Superior	1		1	2 (3,44)
	Inferior	2	3		5 (8,62)
Mucosa	Superior		1		1 (1,72)
Adherida	Inferior				
Mucosa Yugal		1	2	1	4 (6,89)
Reborde alveolar		1	1	1	3 (5,17)
Trígono Retromolar		1			1 (1,72)
Piso de boca			8	2	10 (17,24)
n %		20 (34,48)	24 (41,37)	14 (24,13)	58 (100)

III. Inmunoexpresión de las proteínas Ki-67 en MO y COCE según grado de diferenciación

El control negativo externo (Figura 2: A, B, C) y positivo externo (Figura 2: D, E, F) de la técnica de inmunohistoquímica (sistema avidina-biotina -peroxidasa) para el antígeno Ki-67 correspondió a adenocarcinoma de colon humano.

La inmunotinción del antígeno Ki-67 se localizó a nivel nuclear de las células epiteliales normales y neoplásicas. En las muestras de MO la inmunolocalización para la proteína Ki-67 se detectó principalmente en el compartimiento basal (estrato basal y parabasal) del epitelio escamoso estratificado (Figura 2: G, H, I). En las muestras de COCE-BD (Figura 2: J, K, L) la inmunolocalización de la proteína Ki-67 se detectó principalmente en las células neoplásicas con ubicación periférica en relación a las áreas de queratinización. En las muestras de COCE-MD (figura 2: M, N, O), la inmunolocalización de la proteína Ki-67 se detectó de manera dispersa en las islas y cordones de células epiteliales tumorales, asimismo, se detectaron células positivas a inmunotinción para la proteína Ki-67 en relación periférica a las áreas de queratinización. En las muestras de COCE-PD (Figura 2: P, Q, R) la inmunolocalización de la proteína Ki-67 se presentó con un patrón disperso en conjunto a numerosas figuras mitóticas atípicas.

Figura 2. Inmunotinción antígeno Ki-67 (Sistema avidina-biotina-peroxidasa). Microfotografías: adenocarcinoma de colon humano: control negativo externo (A, B, C) y control positivo externo (D, E, F); mucosa oral (G, H, I); COCE-BD (J, K, L); COCE-MD (M, N, O) y COCE-PD (P, Q, R). Aumento objetivos: 4x, 10x, 40x.

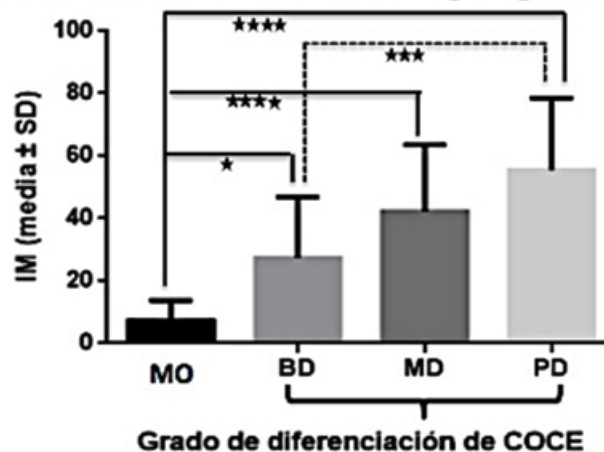


Los porcentajes de medias para IM nuclear para la proteína Ki-67 para COCE según grado de diferenciación fueron en COCE-BD: 27,38% ($\pm 0,19$ SD), en COCE-MD: 42,25% ($\pm 0,21$ SD) y en COCE-PD: 55,55% ($\pm 0,22$ SD). En MO se encontró una media para IM nuclear para la proteína Ki-67 de 7,28% ($\pm 0,06$ SD).

El análisis de distribución de datos arrojó distribución normal para todos los grupos de la muestra COCE-BD, COCE-MD, COCE-PD y MO. Al analizar la inmunoexpresión nuclear de la proteína Ki-67 entre mucosa normal y los COCE según grado de diferenciación, se encontró diferencia estadísticamente significativa entre MO y COCE-BD ($p < 0,05$), MO y COCE-MD ($p < 0,0001$), MO y COCE-PD ($p < 0,0001$). Asimismo, entre los grupos de COCE existe diferencia significativa entre COCE-BD y COCE-PD ($p < 0,001$) (Gráfico 1).

Gráfico 1. Media de Índice de Marcación (IM) para Ki-67 en COCE según grado de diferenciación: bien diferenciado (BD), moderadamente diferenciado (MD) y pobremente diferenciado (PD) y MO. \pm Desviación estándar (\pm SD). ($p^* < 0,05$, $p^{**} < 0,001$, $****p < 0,0001$)

Inmunoexpresión de Ki-67 en COCE según grado de diferenciación

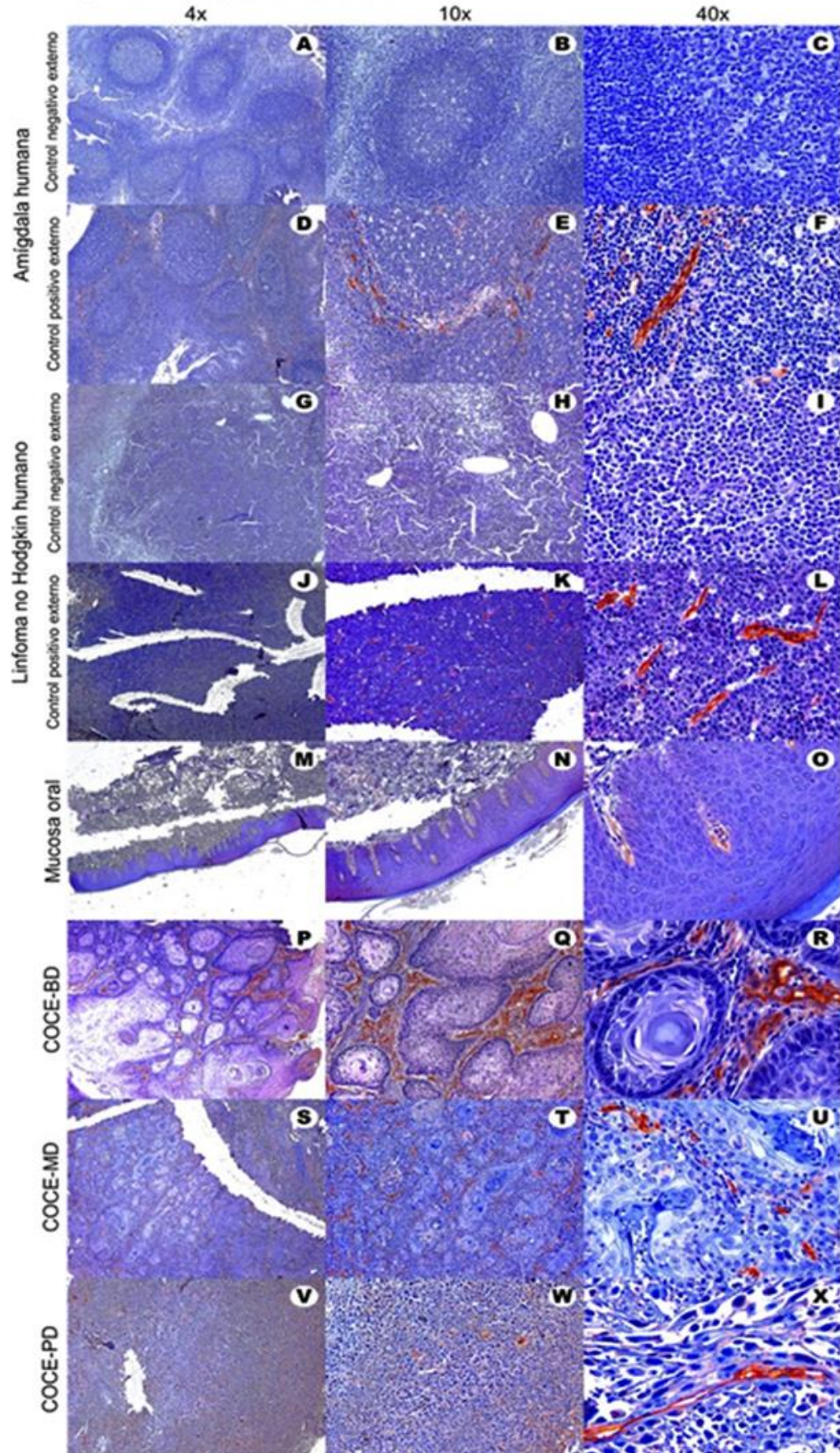


IV. MDV detectada mediante la inmunexpresión de la proteína CD105 en MO y COCE según grado de diferenciación

Los controles externos para la técnica de inmunohistoquímica (avidina-biotina-peroxidasa) para la inmunotinción del antígeno CD105 correspondieron: amígdala humana: control negativo externo (Figura 3: A, B, C) y control positivo externo (Figura 3: D, E, F) y linfoma no Hodgkin humano: control negativo externo (Figura 3: G, H, I) y control positivo externo (Figura 3: J, K, L).

La inmunotinción del antígeno CD105 se localizó a nivel citoplasmático en células endoteliales vasculares. En las muestras de MO, la inmunolocalización para la proteína CD105 se detectó en relación a las asas capilares presentes en las papilas del corion de la lámina propia de la MO. En las muestras de COCE-BD (Figura 3: P, Q, R) y COCE-MD (Figura 3: S, T, U), la inmunolocalización de la proteína CD105 se detectó principalmente en los vasos sanguíneos con ubicación preferentemente en el estroma tumoral entre las islas de células epiteliales neoplásicas. En las muestras de COCE-PD (Figura 3: V, W, X), la inmunolocalización de la proteína CD105 se detectó en vasos sanguíneos de diversos calibres principalmente en ubicación intratumoral.

Figura 3. Microdensidad vascular detectada mediante inmunotinción antígeno CD105 (Sistema avidina-biotina-peroxidasa). Microfotografías: Amígdala humana: control negativo externo (A, B, C) y control positivo externo (D, E, F); Linfoma no Hodgkin: control negativo externo (G, H, I) y control positivo externo (J, K, L); Mucosa oral (M, N, O); COCE-BD (P, Q, R); COCE-MD (S, T, U) y COCE-PD (V, W, X). Aumento objetivos: 4x, 10x, 40x.



Los porcentajes de medias para MDV detectada por la proteína CD105 en COCE según grado de diferenciación fueron en COCE-BD: 27,15 (\pm 0,14 SD), en COCE-MD: 30,13 (\pm 0,10 SD) y en COCE-PD: 57,36 (\pm 0,15 SD). En MO se detectó una media para MDV de 5,92 (\pm 0,04 SD).

El análisis de distribución de datos arrojó distribución normal para los grupos COCE-MD, COCE-PD y MO y distribución no normal para el grupo COCE-BD (Tabla 6).

Al analizar MDV para MO y COCE según grado de diferenciación, se encontró diferencia estadísticamente significativa entre MO versus COCE-BD ($p < 0,001$), MO versus COCE-MD ($p < 0,0001$), MO versus COCE-PD ($p < 0,0001$), COCE-BD versus PD ($p < 0,001$) y COCE-MD versus COCE-PD ($p < 0,0001$) (Gráfico 2).

Gráfico 2. Microdensidad vascular (MDV) para CD105 en COCE según grado de diferenciación: bien diferenciado (BD), moderadamente diferenciado (MD) y pobremente diferenciado (PD) y MO. \pm Desviación estándar (\pm SD). ($p^* < 0,05$, $p^{***} < 0,001$, $p < 0,0001$)

Microdensidad vascular en COCE según grado de diferenciación

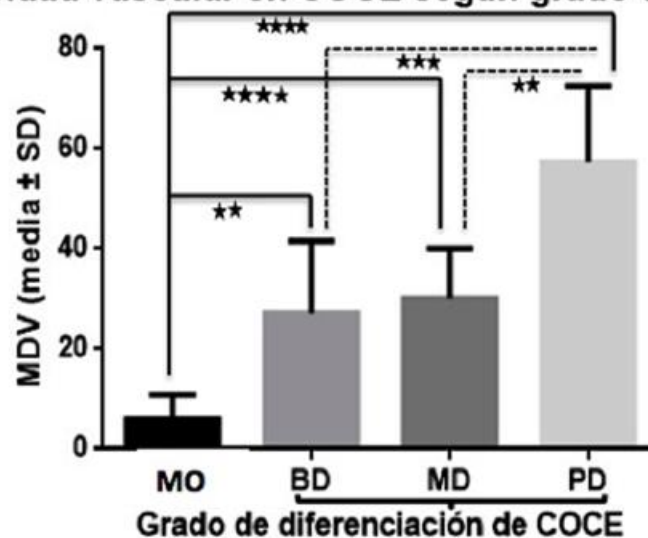


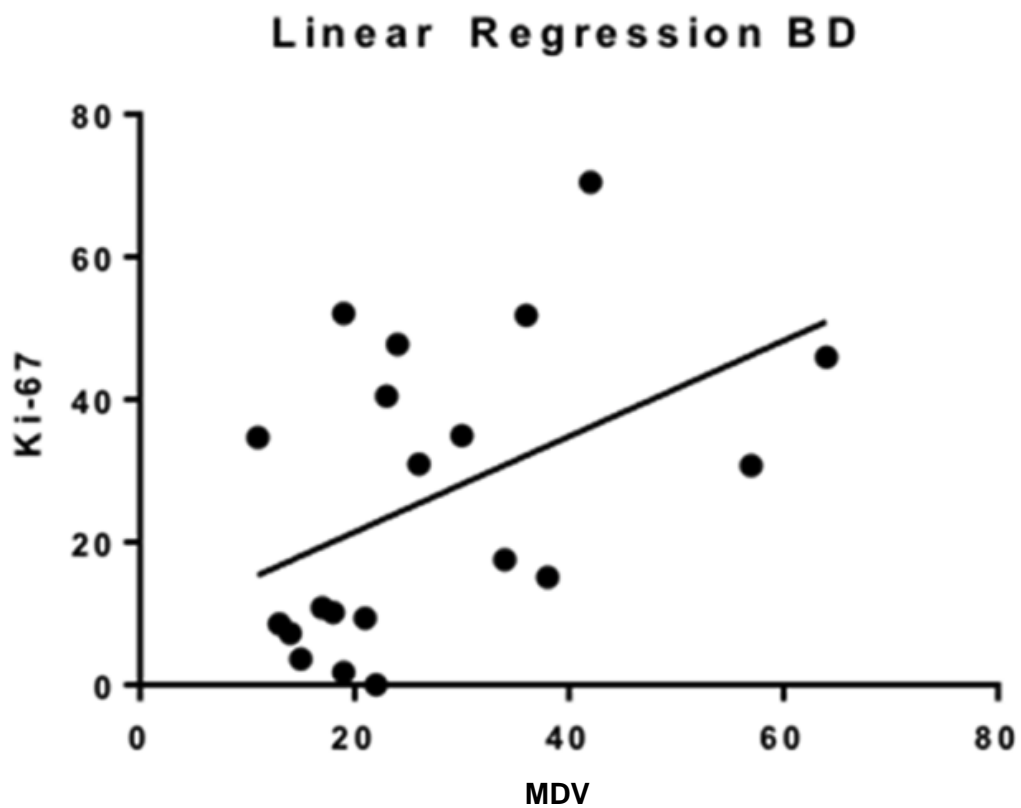
Tabla 6. Prueba de D'Agostino-Pearson. Distribución de datos en muestras de COCE y MO para MDV(CD105) y Ki-67								
Estudio de distribución de datos. Prueba de D'Agostino-Pearson								
Tipo de Distribución	MDV (CD105)				Ki-67			
	MO	BD	MD	PD	MO	BD	MD	PD
Normal	X		XX		X	XXX		
No normal		X						

V. Correlación entre la inmunexpresión de la proteína Ki-67 y MDV (CD105) entre COCE según grado de diferenciación histológica

En COCE-MD y COCE-PD no se encontró correlación en la inmunexpresión nuclear para la proteína Ki-67 y MDV (CD105): $p=0,11$ y $p=0.54$, respectivamente.

En COCE-BD se encontró correlación positiva para la inmunexpresión nuclear de la proteína Ki-67 con MDV (CD105) con un coeficiente de correlación de 0,52 ($p=0.018$) (Gráfico 3).

Gráfico 3. Regresión lineal de medias para expresión de proteínas Ki-67 y MDV detectada por la inmunexpresión de la proteína CD105 en COCE-BD



9. DISCUSIÓN

I. COCE: datos epidemiológicos

El cáncer de cabeza y cuello es el sexto cáncer más común en todo el mundo. Se estima que el 30% de estos corresponden a neoplasias malignas con localización en cavidad oral, entre los cuales el 95% son COCE (Huang y cols. 2019). El COCE afecta más frecuentemente a la lengua en su porción lateral, posterior y ventral, con el 50% de los casos aproximadamente (Khalili y cols, 2015). Esta localización anatómica intraoral fue la más descrita en las muestras recopiladas en este estudio con 27,58 % del total de los casos.

Según datos procedente de Globocan 2018, dentro de todos los tipos de cáncer (excluyendo el melanoma de piel), el cáncer de cavidad bucal ocupa el lugar 16 en mortalidad con 177.384 fallecimientos al año y una incidencia estimada de más de 380.000 nuevos casos reportados anualmente a nivel mundial (Ferlay y cols., 2018). El grupo etario más afectado se presenta en la sexta década de vida y la mayor prevalencia se registra en el sexo masculino (Lopes y cols. 2017; Chi y cols. 2015; Khalili y cols. 2015). Estos mismos datos demográficos son similares a los registrados en las muestras de este estudio, con el 72.41% de las muestras pertenecientes al sexo masculino y el 27,58% de las muestras en total pertenecientes a la sexta década.

El pronóstico está asociado principalmente a características clínicas: tamaño de la lesión, compromiso ganglionar locoregional y presencia de metástasis (Monteiro y cols., 2018). En el estadio clínico inicial para COCE, la clasificación TNM es ampliamente usada, pero parece ser insuficiente para predecir de manera precisa la agresividad del tumor o para seleccionar la modalidad del tratamiento basado en características individuales. Pacientes con el mismo estadio TNM puede presentar distintos comportamientos clínicos, diferentes respuestas a tratamientos e incluso múltiples resultados al tratamiento (Blatt y cols, 2017).

La tasa de supervivencia a los 5 años no ha presentado modificación sustancial en las últimas décadas y se mantiene en aproximadamente el 50% (Diniz y cols., 2015). Esta cifra nos da cuenta de una necesidad importante de encontrar nuevas y eficientes estrategias orientadas principalmente en el diagnóstico precoz para COCE, así como también de acceso a nuevas y mejores terapias contra el cáncer.

II. Marcadores biológicos

Un biomarcador del cáncer puede ser una molécula secretada por una célula tumoral o una respuesta específica del cuerpo a la presencia de cáncer. Los biomarcadores se pueden utilizar para la evaluación del paciente en múltiples entornos clínicos, incluida la estimación del riesgo de enfermedad y la distinción entre los tejidos benignos y los malignos. Los biomarcadores de cáncer se pueden clasificar según el estado de la enfermedad, incluidos los biomarcadores predictivos, de diagnóstico y de pronóstico. Un biomarcador pronóstico informa sobre un posible resultado de cáncer, como la supervivencia general, la supervivencia sin enfermedad y la supervivencia por causa específica, independiente del tratamiento recibido (Rivera y cols. 2017).

La principal ventaja de la identificación de biomarcadores pronósticos para COCE mediante técnica de Inmunohistoquímica (IHQ) es el establecimiento de una asociación directa entre la morfología y la expresión de estos biomarcadores, lo cual determina su relevancia funcional (Oliveira y Ribeiro-Silva., 2011).

La carcinogénesis se caracteriza por una desregulación de varios pasos de la maquinaria del ciclo celular (Oliveira y Ribeiro-Silva., 2011). Los biomarcadores moleculares que alteran la tasa de proliferación del ciclo celular han sido ampliamente explorados en lesiones premalignas de la cavidad oral, sin embargo, su valor clínico como factor pronóstico para COCE aún es tema de debate (Myoung y cols., 2006). Por otro lado, el proceso angiogénico desempeña un papel clave en la creación de una red neocapilar y se requiere para el crecimiento, la progresión y la metástasis del cáncer (Oliveira y Ribeiro-Silva., 2011). Tanto los biomarcadores de proliferación como de angiogénesis son candidatos potenciales

para mejorar la evaluación del pronóstico de lesión premaligna en MO y COCE, sin embargo, en la actualidad no se describen paneles definitivos para la caracterización inmunofenotípica pronóstica para COCE (Takkem y cols., 2019).

III. Proliferación celular y carcinogénesis

La proliferación celular representa uno de los pilares principales en la carcinogénesis, progresión y crecimiento tumoral, lo cual determina, en parte, el comportamiento biológico de una neoplasia. Dentro de las moléculas que afectan el ciclo celular y moléculas de proliferación encontramos: receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), ciclina D1, antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), quinasa serina/treonina 1 (Akt1) y Ki-67, entre otros (Oliveira y Ribeiro-Silva., 2011).

La proteína Ki-67 codificada por el gen ki-67, se describió por primera vez en 1984 y es esencial para la proliferación de células tumorales (Zheng y cols., 2005). La actividad de proliferación se refleja en los anticuerpos anti-Ki-67 que reconocen un antígeno localizado en el núcleo celular, el cual se expresa al máximo en las fases G2 y M y está ausente en las células no proliferantes (fase G0) (Oliveira y Ribeiro-Silva., 2011).

Dada su utilidad al proporcionar una estimación precisa de la tasa de crecimiento del tumor de una manera relativamente sencilla, se ha estudiado su rol en diversas neoplasias (Myoung y cols., 2006).

Alta expresión de la proteína Ki-67 ha sido detectada en carcinomas de pulmón (Martin y cols., 2004), mama (Petrelli y cols., 2015; Yang y cols., 2011; De Azambuja y cols., 2007) y próstata (Zhao y cols., 2014; Aaltomaa y cols., 2006). Asimismo, en un estudio de meta-análisis realizado por Xie y cols, se detectó correlación entre la alta expresión de la proteína Ki-67 con peor tasa de supervivencia (Xie y cols., 2016). Estos resultados, corroboran la confiabilidad para la indicación del anticuerpo anti-Ki-67 como marcador pronóstico para carcinomas, por lo tanto, la alta expresión de la proteína Ki-67 en el ciclo celular desde la fase

G1 a la M lo convierte en un biomarcador potencial para neoplasias epiteliales malignas y útil en el diseño de las estrategias terapéuticas no quirúrgicas.

En este estudio, se detectó diferencia estadística significativa entre las muestras de MO y COCE según grado de diferenciación: MO versus COCE-BD ($p < 0,05$), MO versus COCE-MD ($p < 0,0001$) y MO versus COCE-PD ($p < 0,0001$). Resultados similares se obtuvieron en los estudios de: Jing y cols, Takkem y cols y Dwivedi y cols. Jing y cols, observaron que la inmunexpresión de la proteína Ki-67 fue menor comparado con COCE en su distintos grados de diferenciación, en tanto, Takkem y cols, observaron diferencia estadística significativa entre epitelio oral normal versus COCE-BD ($p = 0.000$); epitelio oral normal versus COCE-MD ($p = 0.000$) y epitelio oral normal versus COCE-PD ($p = 0.000$), siendo el índice de marcación para la proteína Ki-67 de: 10,6% en epitelio oral normal, 23,3% en COCE-BD, 41,2% en COCE-MD y 64,1% COCE-PD. Dwivedi y cols., detectaron un índice de marcación para MO de 13,65% y para COCE de 39,45%, encontrando diferencia estadística significativa entre ambos grupos ($p < 0.05$) (Jing y cols., 2019; Takkem y cols., 2018; Dwivedi y cols., 2013). Estos resultados sugieren que el aumento de la proteína Ki-67 sería indicador de la transición y progresión de la transformación carcinomatosa desde epitelios orales normales a COCE, por lo tanto, el aumento de la tasa de proliferación de células anormales en el epitelio de la MO cumple un rol relevante como predictor y precursor de la carcinogénesis en COCE.

La inmunexpresión de la proteína Ki-67 en epitelio de la MO se ha detectado principalmente en el estrato basal con inmunolocalización nuclear. Este hallazgo ha sido reportado en estudios previos (Saito y cols., 1999; Birajdar y cols., 2014; Kumar y cols., 2015). En nuestro estudio, la inmunexpresión de la proteína Ki-67 se detectó tanto a nivel basal y parabasal del epitelio, resultados similares a los obtenidos por Takeda y cols y Dwivedi y cols. La inmunexpresión de la proteína Ki-67 tanto a nivel basal y parabasal en los epitelios de revestimiento sugiere que las células amplificadoras transitorias derivadas de células madre podrían estar presentes en la capa parabasal del epitelio normal. La proliferación epitelial es una propiedad de las células madre de las capas basales de los epitelios escamosos estratificados y de su progenie inmediata, las células amplificadoras transitorias.

La división celular asimétrica en células madres epiteliales ubicadas en la capa basal puede generar células amplificadoras transitorias ubicadas en la capa parabasal en el epitelio oral. Este patrón de localización, basal y parabasal, es distinto a lo observado en muestras de MO con displasia epitelial, en el cual, la inmunoexpresión de la proteína Ki-67 se detecta también en los estratos suprabasales. Esta expresión suprabasal de la proteína Ki-67 podría proveer un criterio objetivo para determinar el diagnóstico histomorfológico y grado de severidad en lesiones con displasia epitelial oral (Takeda y cols., 2006; Dwivedi y cols., 2013).

A pesar del aumento de la inmunoexpresión de la proteína Ki-67 desde epitelio MO hasta COCE descrito en distintos estudios (Jing y cols., 2019; Takkem y cols., 2018 y Dwivedi y cols., 2013), Birajdar y cols, no observaron diferencia estadística significativa entre grupos de muestras para epitelio oral normal (n=20) y COCE (n=20) ($p=0.865$), sin embargo, observaron diferencia estadística significativa entre los grupos: epitelio oral normal versus displasia epitelial oral (n=60) ($P=0,005$) y displasia epitelial oral versus COCE ($p=0,032$) (Birajdar y cols., 2014). Este hallazgo revela que las alteraciones en la maduración y diferenciación celular en el contexto de la displasia epitelial oral se relacionan a un incremento de la actividad proliferativa, así como, la inmunolocalización de la proteína Ki-67 en estratos suprabasales, a diferencia de lo observado en epitelios orales normales. Asimismo, el aumento de la expresión de la proteína Ki-67 en relación a la severidad de la displasia epitelial se correlaciona con la tumorigénesis del COCE.

La inmunoexpresión del antígeno Ki-67 en muestras de COCE según grados de diferenciación, demostró diferencia estadística significativa en la expresión de Ki-67 en COCE-BD versus COCE-PD ($p < 0,001$). Resultados similares se obtuvieron por Khalili y cols., en el cual se observó diferencias estadísticas significativas entre el grupo de COCE-MD y COCE-PD en comparación a COCE-BD ($p < 0,047$). Resultados similares se describen en estudios previos (Takkem y cols., 2018; Dwivedi y cols., 2013 Tumuluri y cols., 2002), al describir un incremento en la proliferación celular junto con la disminución de la diferenciación celular en COCE y cáncer de células escamosas de esófago. En otros estudios recientes, si bien, COCE-PD presento mayor inmunoexpresión de la proteína Ki-67, esta no fue

significativa con respecto a COCE-MD y COCE-BD (Takkem y cols., 2018; Birajdar y cols., 2014). Estos resultados avalan que la sobreexpresión de la proteína Ki-67 es un marcador biológico confiable para proliferación celular que se pueda indicar para el diagnóstico y evolución de COCE. La información obtenida sobre la fracción de crecimiento de los tumores se puede utilizar en la evaluación del grado de diferenciación tumoral, ya que varios estudios indican correlación significativa entre una alta inmunoexpresión para Ki-67 y el grado de diferenciación para COCE.

Según la literatura, el anticuerpo anti- Ki-67 podría ser indicado para predecir el pronóstico en COCE (Kim y cols., 2007). Wangsa y cols., describieron que una alta tasa de proliferación celular detectada mediante la proteína Ki-67 se relaciona con un riesgo elevado de recurrencia en carcinomas (Wangsa y cols., 2008). Otro estudio, también confirma que la expresión de la proteína Ki-67 sería un factor pronóstico para estas lesiones (Montebugnoli y cols., 2011). Lopes y cols, sugieren que el antígeno Ki-67 representa una proteína predictiva de supervivencia en COCE (Lopes y cols., 2017), en tanto, González-Moles y cols, encontraron resultados similares en su evaluación de 79 muestras de COCE (González-Moles y cols., 2010). Gontarz M. y cols., sugieren que una tasa de proliferación celular detectada por la expresión de la proteína Ki-67 se presenta en lesiones de pacientes con recurrencia y, a los cuales se les indica radioterapia postquirúrgica (Gontarzy cols., 2014). Esta conclusión es similar a lo propuesto por Sittel y cols., cuyo estudio menciona que los tumores con alta expresión para la proteína Ki-67 presentan mejor respuesta a la radioterapia, debido a que las células altamente proliferativas son más sensibles a la radiación (Sittel y cols., 1999).

IV. Angiogénesis, microdensidad vascular y crecimiento y progresión celular

La angiogénesis, la neoformación de los vasos sanguíneos a partir de microvasos preexistentes, es esencial para numerosos procesos fisiológicos y patológicos, como la nutrición celular y el cáncer. Este complejo proceso implica la remodelación de la matriz extracelular y la proliferación y migración de las células endoteliales. La vascularización es necesaria para el crecimiento tumoral y la metástasis, por lo tanto, un suministro insuficiente de sangre, las células tumorales sufrirán apoptosis sin embargo, se ha descritos ciertos mecanismos de adaptación tumoral a microambientes hipóxicos(Nassiri y cols., 2011).

La MDV ha sido evaluada por distintas moléculas tales como CD34, CD31 y factor de Von Willebrand, los cuales constituyen marcadores biológicos pan-endoteliales que se expresan tanto en las células endoteliales activadas como en el endotelio de los vasos sanguíneos normales y pueden generar un elevado valor para MDV (Khalili y cols., 2015).

CD105 no solo es un marcador que tiene un papel importante en la angiogénesis, sino que también es esencial para la proliferación de células endoteliales y estimula la fase activa de la angiogénesis. CD105 se expresa en vasos sanguíneos recién formados y mínimamente en los preexistentes. La expresión de este marcador también se puede observar en tejido no neoplásico con actividad angiogénica incrementada, como en el desarrollo embrionario y la cicatrización de heridas(Tadbir y cols., 2013). Se ha estudiado la expresión de CD105 en diversas neoplasias, incluyendo cáncer colorrectal (Saad y cols., 2004), carcinomas de mama (Dales y cols., 2004), carcinoma de endometrio (Erdem y cols., 2006), adenocarcinoma de esófago(Saad y cols., 2005), carcinoma de células escamosas de laringe (Zvrko y cols., 2009), cáncer de ovario epitelial avanzado (Rubatt y cols., 2009), entre otros. El año 2002, Schimming y Marmé analizaron 51 muestras de COCE, en las cuales detectaron que la MDV mediada por CD105 en el tejido tumoral fue significativamente más alta que en la lámina propia de MO(p <,001) (Schimming y Marmé., 2002).

En las revisiones de Nassiri y cols (2011) y Dallas y cols (2008) sugieren que la MDV intratumoral detectada por endogлина (CD105) es un marcador biológico más confiable para el pronóstico de cáncer en comparación con la MDV intratumoral medida por marcadores tradicionales como CD34, CD31 y factor Von Willebrand. (Nassiri y cols., 2011; Dallas y cols., 2008).

En relación con CD105, se observó diferencia estadísticamente significativa en la microdensidad vascular entre MO y COCE en sus distintos grados de diferenciación histológicos: MO versus COCE-BD ($p < 0,001$), MO versus COCE-MD ($p < 0,0001$) y MO versus COCE-PD ($p < 0,0001$), lo cual sugiere que la neovascularización tumoral mediada por las células endoteliales neoplásicas son más prolíficas que las células endoteliales del tejido normal y, por lo tanto, expresan altos niveles de endogлина (Nassiri y cols., 2011). Estos resultados se asemejan a los encontrados por Kargahi y cols., en el cual se determinó la MDV en COCE para evaluación cuantitativa de angiogénesis mediante CD105, detectándose diferencia estadísticamente significativa entre COCE y MO ($p < 0,05$) (Kargahi y cols., 2017).

Respecto a la MDV para COCE según grado de diferenciación, se detectó diferencia estadística significativa entre COCE-BD y COCE-PD ($p < 0,001$) y entre COCE-MD y COCE-PD ($p < 0,0001$), estos resultados son similares a los resultados obtenidos por Chuang y cols., que observó aumento de la MDV (CD105), correlacionándose significativamente con los parámetros desfavorables para COCE localizados en lengua: mayor volumentumoral, invasión perineural, presencia de necrosis tumoral y estadio tumoral avanzado (Chuang y cols. 2006). Sin embargo, en el estudio de Khalili y cols, el cual se tipificaron los COCE en: bajo grado (bien diferenciado) y COCE de alto grado (moderada y pobremente diferenciado) en muestras de lengua, se encontró mayor MDV en COCE de bajo grado que COCE de alto grado ($p = 0,045$) (Khalili y cols., 2015). La falta de correlación entre MVDy proliferación de células epiteliales tumorales indica que estos procesos pueden ser regulados por mecanismos separados. Los distintos resultados en la literatura sobre MDV en COCE según grado de diferenciación podrían deberse a diferencias en los métodos de cuantificación para la

inmunotinción del endotelio y al anticuerpo primario indicado como marcador de angiogénesis.

La MDV es un parámetro para la evaluación de nuevos patrones angiogénicos, ha demostrado ser un factor pronóstico para varias lesiones malignas, incluido COCE (Thiem y cols., 2017). Los resultados preliminares actuales sugieren que la evaluación de MDV detectada por el anticuerpo anti-CD105 en COCE y orofaríngeos primarios puede identificar lesiones malignas en pacientes con riesgo de recurrencia de la enfermedad o un resultado oncológico deficiente después del tratamiento, encontrando mayor expresión de CD105 en los pacientes con peores características clínicas (Marioni y cols., 2006). Los resultados de estudios previos demuestran que la sobreexpresión de CD105 en cáncer oral invasivo está asociado con peores características clínicas y metástasis a linfonodos (Kargahi y cols., 2018).

V. Correlación entre proliferación celular y MDV (CD105) en COCE

La activación de las células endoteliales a menudo se asocia con la proliferación celular *in vitro* (Cimpean y cols., 2009). Está bien establecido que la angiogénesis y la actividad proliferativa juegan un rol clave en el crecimiento del tumor, pero la correlación de ambos factores aún se mantiene poco claro (Khalili y cols., 2015).

Estudios previos sobre la asociación de Ki-67 y CD105 ha demostrado resultados controversiales. En el estudio de Behrem y cols, en el cual realizó inmunohistoquímica para la detección de los marcadores CD105, CD31, factor de crecimiento vascular (VEGF) y Ki-67 en 46 muestras de glioblastoma, encontró correlación entre CD105 y Ki-67 ($r=0.323$, $p=0.028$), no así con CD31 ($r=0.219$, $P=0.142$) (Behrem y cols., 2005). Sin embargo, Pizarro y cols, en su estudio de inmunoexpresión para CD105 en 77 muestras de adenoma hipofisario, no observó correlación con los valores de para la proteína Ki-67 (Pizarro y cols., 2009). Cimpean y cols, realizaron inmunotinción doble para CD105/Ki-67 en lesiones benignas y malignas del cuello uterino y observaron que estos dos marcadores biológicos presentan expresión divergente en las células endoteliales

de los vasos sanguíneos tumorales que dependen del tipo de lesión y el estado de proliferación de las células tumorales, los autores sugieren que la activación de las células endoteliales es un evento temprano que predomina en condiciones benignas y premalignas del cuello uterino, mientras que la proliferación de células endoteliales se observa en células endoteliales de vasos tumorales de carcinoma invasivo del cuello uterino, lo que podría explicar la ausencia de coexpresión simultánea de CD105/Ki-67 (Cimpean y cols., 2009). Asimismo, Tadbir y cols, en una caracterización de la inmunopresión de las proteínas CD105 y Ki-67 en 59 muestras de tumores de glándulas salivales, no observaron correlación entre MDV y proliferación celular ($p=0,07$), lo que indica que los niveles de expresión de CD105 no están afectados por la tasa de proliferación celular (Tadbir y cols., 2013), sin embargo, Ravi y cols. el año 1998 y Macluskey y cols. el año 2000 sugirieron que la progresión del tumor en la cavidad oral depende de la coocurrencia de angiogénesis y la proliferación celular (Ravi y cols., 1998; Macluskey y cols., 2000).

En nuestro estudio, al evaluar correlación entre la inmunopresión de Ki-67 y MDV, detectada mediante la proteína CD105, se encontró correlación positiva en COCE-BD con un coeficiente de correlación de 0,52 ($p=0.018$). Sin embargo, en el estudio de Khalili y cols, no se encontró una relación significativa entre el índice de inmunopresión de la proteína Ki-67 y microdensidad vascular CD105 ($p=0,86$) (Khalili y cols., 2015). Estos resultados nos podrían sugerir que la proliferación celular y la neovascularización tumoral son regulados por distintos factores y procesos biológicos en COCE indiferenciados y anaplásicos, por lo tanto, la correlación sinérgica entre Ki-67 y MDV sería un evento asociado a lesiones con mayor grado de diferenciación celular y morfológica.

VI. Aplicabilidad y terapias antiproliferativas

Los tratamientos comunes de COCE incluyen cirugía, radioterapia y quimioterapia, actualmente se están realizando trabajos experimentales e investigaciones clínicas sobre terapias dirigidas a moléculas específicas de la carcinogénesis. Las terapias antiproliferativas tienen como propósito disminuir o detener la tasa de proliferación de las células neoplásicas. Dentro de estos tenemos: anti-factor de crecimiento epidérmico (anti-EGFR), moléculas pequeñas inhibidoras de la tirosina quinasa, entre otras.

En nuestros resultados, la inmunoexpresión de la proteína Ki-67 aumenta en cuanto COCE sea más indiferenciado, observándose una alta inmunoexpresión en COCE-PD, lo que indica que utilizar una terapia antiproliferativa para COCE sería de gran utilidad. La inhibición de la proteína Ki-67 podría considerarse al diseñar estrategias terapéuticas para COCE. El antígeno nuclear Ki-67 se propone como un objetivo terapéutico atractivo para el cáncer porque está altamente expresado en la mayoría de las células malignas, pero rara vez se detecta en las células normales (Yang y cols., 2018), evento molecular y morfológico demostrado en este estudio.

En la literatura se han realizado diversos trabajos que incluyen: terapia antisentido dirigidos a Ki-67, ácidos nucleicos peptídicos anti-Ki-67, ARN de interferencia (ARNi) dirigida a Ki-67, adenovirus oncolíticos dirigidos a Ki-67, combinación de terapia Adenovirus condicionalmente replicativo con quimioterapia o radioterapia, entre otros (Yang y cols., 2018).

Schlüter y cols, encontraron que los oligonucleótidos antisentido específicos de Ki-67 inhibían la proliferación de células de mieloma humano (Yang y cols., 2018). Zheng y cols, en su estudio trataron células humanas de cáncer renal in vitro y les aplicaron ácidos nucleicos peptídicos (ANP), demostrando que la inhibición de la expresión de Ki-67 mediada por ANP condujo a una inhibición significativa de la proliferación de células de carcinoma renal ya la inducción de apoptosis en células malignas (Zheng y cols., 2005). Yang y cols, realizaron un modelo en el cual se

utilizó un adenovirus oncolítico armado ZD55-Ki67 y se obtuvo inhibición de Ki-67, lo cual indujo apoptosis en células de cáncer renal in vitro e inhibió el crecimiento de cáncer renal en ratones desnudos. Este estudio demostró que este vector se replicó de manera eficiente únicamente en las células cancerosas renales, de tal manera, se presenta inhibición de la proliferación y asimismo, se induce la apoptosis de las células cancerosas renales(Yang y cols., 2018).

VII. Aplicabilidad y terapias antiangiogénicas

En la actualidad, hay gran interés en la investigación de terapias antiangiogénicas en células malignas. Existe evidencia experimental convincente que sugiere que los anticuerpos monoclonales anti-CD105 son eficaces para inhibir la angiogénesis, el crecimiento y la metástasis del tumor en modelos animales, apuntando al antígeno vascular CD105 como un objetivo adecuado para un enfoque basado en anticuerpos para el tratamiento del cáncer (Marioni y cols., 2013).

El desarrollo de tratamientos antiangiogénicos para el cáncer ha presentado un gran avance en los últimos años. El primer inhibidor selectivo de la angiogénesis utilizado en ensayos clínicos fue el TNP-470. Actualmente se han descubierto más de 300 inhibidores de la angiogénesis, muchos de ellos en ensayos clínicos en diferentes fases y otros ya aprobados para su utilización clínica(Mauriz y cols., 2005).

En nuestro estudio, se observó alta MDV en COCE-PD, lo que sugiere la utilidad de la terapia antiangiogénica en COCE indiferenciados o anaplásicos, lo cual sería de gran beneficio terapéutico para el paciente. En la actualidad, se conocen distintos anticuerpos con propiedades biológicas antiangiogénicas, como por ejemplo, aquellos que inhiben la acción del VEGF, tales como: Bevacizumab, Ziv-Aflibercept y Ramucirumab. Existe la necesidad de que se desarrollen más anticuerpos que estén altamente expresados en el endotelio tumoral. La expresión de endogлина en el endotelio tumoral tiene un potencial terapéutico si puede

demostrase su utilidad in vivo (Nassiri y cols., 2011; Scartozzi y cols., 2016; Ivanova y cols., 2017).

Las estrategias antiangiogénicas son superiores a los agentes quimioterapéuticos tradicionales: I) pueden administrarse de manera expedita a las células tumorales a través del torrente sanguíneo, II) los tumores sólidos requieren de un alto suministro de aporte sanguíneo para su crecimiento y progresión y III) la destrucción de un solo vaso causaría la muerte de numerosas células tumorales, sin embargo, es importante tener en cuenta que las estrategias antiangiogénicas pueden interferir potencialmente en los procesos fisiológicos angiogénicos, como la reparación después de una lesión o enfermedad. Por último, no todas las células tumorales resultar afectadas después del tratamiento antiangiogénico, lo que significa en la práctica clínica que los pacientes pueden requerir la indicación y aplicación a largo plazo de estos medicamentos (Dallas y cols., 2008).

Un enfoque terapéutico único consiste en sensibilizar de manera profiláctica a las células inmunitarias del huésped a la proteína endoglina (CD105) para que los nuevos vasos angiogénicos se presenten como antigénicos y constituyan dianas para el propio sistema inmunitario del huésped. Este enfoque ha sido utilizado por investigadores empleando una vacuna oral a base de *Salmonella* que contiene un plásmido que expresa endoglina murino. Posterior a la vacunación, los ratones fueron inoculados con carcinoma mamario de ratón D2F2 y se evaluó la progresión del tumor. Los ratones no vacunados tuvieron significativamente más metástasis pulmonar. Los tumores en ratones vacunados fueron menos angiogénicos, y los ratones vacunados presentaron una tasa de supervivencia más prolongada. Dados los hallazgos anteriores, la endoglina (C105) debería representar ser un objetivo óptimo para las terapias antitumorales (Dallas y cols., 2008).

10. CONCLUSIONES

Existe una alta inmunoexpresión (sobreexpresión) de la proteína Ki-67 en COCE en todos sus grados de diferenciación en comparación con muestras de MO. De igual manera, se obtuvo alta MDV detectada mediante endoglina CD105 en COCE en todos sus grados de diferenciación en comparación con muestras de MO.

El aumento de la expresión de la proteína Ki-67 de MO a COCE, podría explicar que la sobreexpresión de esta proteína nuclear interviene en los mecanismos que se involucran con promoción del cáncer. Al igual que el aumento de la MDV detectada mediante CD105 se relacionaría con el crecimiento y progresión tumoral.

Se observó correlación en COCE-BD entre la inmunoexpresión de la proteína Ki-67 y MDV, lo que sugiere que la correlación entre ambas proteínas se relaciona a fenómenos o procesos biológicos sinérgicos que participan dinámicamente promoviendo proliferación de células epiteliales anormales y neovascularización tumoral en carcinoma orales bien diferenciados. En tanto, que estos procesos biológicos sean modulados por vías diferentes en COCE-MD y COCE-PD.

La expresión de ambas proteínas como marcadores biológicos podría considerarse un parámetro confiable como predictor de carcinogénesis en epitelios escamosos estratificados y angiogénesis tumoral, asimismo, la indicación de los anticuerpos anti-Ki-67 y anti-CD105 como marcadores pronósticos en el crecimiento, progresión y diseminación del COCE. En tanto, el uso terapéutico de inhibidores de Ki-67 y CD105 podría ser utilizado como apoyo al tratamiento quirúrgico de COCE por sus efectos antiproliferativos, proapoptóticos e inhibidor de la angiogénesis, ayudando a disminuir el volumen de la masa tumoral, la diseminación a distancia y mejorando el pronóstico y la tasa de supervivencia de los pacientes.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aaltomaa S, Kärjä V, Lipponen P, Isotalo T, Kankkunen JP, Talja M, Mokka R. 2006. Expression of Ki-67, cyclin D1 and apoptosis markers correlated with survival in prostate cancer patients treated by radical prostatectomy. *Anticancer Res.* 26(6 C):4873–4878.

Almangush A, Heikkinen I, Mäkitie AA, Coletta RD, Läärä E, Leivo I, Salo T. 2017. Prognostic biomarkers for oral tongue squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer.* 117(6):856–866. doi:10.1038/bjc.2017.244.

Basnaker M. 2014. Expression of Endoglin (CD-105) and Microvessel Density in Oral Dysplasia and Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Diagnostic Res.* 8(9):91–94. doi:10.7860/JCDR/2014/9429.4904.

Behrem S, Zarkovic K, Eskinja N, Jonjic N. 2005. Endoglin is a better marker than CD31 in evaluation of angiogenesis in glioblastoma. *Croat Med J.* 46(3):417–22.

Birajdar S, Radhika M, Paremala K, Gadivan M, Sudhakara M, Soumya M. 2014. Expression of Ki-67 in normal oral epithelium, leukoplakic oral epithelium and oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Pathol.* 18(2):169. doi:10.4103/0973-029x.140729.

Boza Y V, Dds O, Rica UDC, Rica C. 2017. Oral Carcinoma of Squamous Cells with Early Diagnosis : Case Report and Literature Review. *J Dent Sc.* 1(19):43–50.

Boza Y V, Dds O. 2016. Carcinoma oral de células escamosas: Reporte de caso y revisión de literatura Oral Squamous Cell Carcinoma: A Case Report and Review of Literature. *ODOVTOS-Int J Dent Sc | No18 Spec Clin Issue.*(18):53–60. doi:10.15517/ijds.v0i0.26303.

Bertram JS. 2000. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med.* 21:167–223. doi:10.1016/S0098-2997(00)00007-8.

Blatt S, Krüger M, Ziebart T, Sagheb K, Schiegnitz E, Goetze E, Al-Nawas B, Pabst AM. 2017. Biomarkers in diagnosis and therapy of oral squamous cell carcinoma: A review of the literature. *J Cranio-Maxillofacial Surg.* 45(5):722–730. doi:10.1016/j.jcms.2017.01.033.

Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathol* 2002; 40: 2-11.

Campo-Trapero J, Cano-Sánchez J, Palacios-Sánchez B, Sánchez-Gutierrez J, González-Moles MA, Bascones-Martínez A. 2008. Update on molecular pathology in oral cancer and precancer. *Anticancer Res.* 28(2 B):1197–1205.

Candia J, Fernández A, Somarriva C, Horna-Campos O. 2018. Mortalidad por cáncer oral en Chile, 2002-2012. *Rev Med Chil.* 146(4):487–493. doi:10.4067/s0034-98872018000400487.

Campuzano Maya G. 2010. Utilidad clínica de los marcadores tumorales. *Med Lab.* 16(09-10):411–445.

Cimpean AM, Saptefrati L, Ceausu R, Raica M. 2009. Characterization of endoglin and Ki-67 expression in endothelial cells from benign and malignant lesions of the uterine cervix: Rapid Communication. *Pathol Int.* 59(10):695–700. doi:10.1111/j.1440-1827.2009.02431.x.

Cheng S-H, Liu J-M, Liu Q-Y, Luo D-Y, Liao B-H, Li H, Wang K-J. 2014. Prognostic role of microvessel density in patients with renal cell carcinoma: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Pathol.* 7(9):5855–63.

Chi AC, Day TA, Neville BW. 2015. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma-an update. *CA Cancer J Clin.* 65(5):401–421. doi:10.3322/caac.21293.

Chuang HC, Su CY, Huang HY, Chien CY, Chen CM, Huang CC. 2006. High expression of CD105 as a prognostic predictor of early tongue cancer. *Laryngoscope.* 116(7):1175–1179. doi:10.1097/01.mlg.0000224338.56902.28.

Clark P, Marker P, Bastian HL, Kroghdahl A. Expression of p53, Ki-67, and EGFR in odontogenic keratocysts before and after decompression. *J Oral Pathol Med.* 2006;35(9):568-72.

Dallas NA, Samuel S, Xia L, Fan F, Gray MJ, Lim SJ, Ellis LM. 2008. Endoglin (CD105): A marker of tumor vasculature and potential target for therapy. *Clin Cancer Res.* 14(7):1931–1937. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4478.

Dales JP, Garcia S, Carpentier S, Andrac L, Ramuz O, Lavaut MN, Allasia C, Bonnier P, Charpin C. 2004. Long-Term Prognostic Significance of Neoangiogenesis in Breast Carcinomas: Comparison of Tie-2/Tek, CD105, and CD31 Immunocytochemical Expression. *Hum Pathol.* 35(2):176–183. doi:10.1016/j.humpath.2003.10.008.

De Azambuja E, Cardoso F, De Castro G, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart-Gebhart MJ, Paesmans M. 2007. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: A meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. *Br J Cancer.* 96(10):1504–1513. doi:10.1038/sj.bjc.6603756.

De la Fuente Ávila M, Díaz Jara M, Martínez Rondanelli B. 2016. Carcinoma espinocelular de lengua: estudio de sobrevida a 5 años. *Rev Clínica Periodoncia, Implantol y Rehab Oral.* 9(1):74–78. doi:10.1016/j.piro.2016.01.001.

De la Fuente J, Hernández F, Ángeles MDL, Trujillo R. 2014. Aumento de la incidencia de carcinoma oral de células escamosas Increased incidence of oral squamous cell carcinoma. *Adicciones.* 20(i):636–642.

Diniz MG, de Fatima Correia Silva J, de Souza FTA, Pereira NB, Gomes CC, Gomez RS. 2015. Association between cell cycle gene transcription and tumor size in oral squamous cell carcinoma. *Tumor Biol.* 36(12):9717–9722. doi:10.1007/s13277-015-3735-1.

- Dirven R, Ebrahimi A, Moeckelmann N, Palme CE, Gupta R, Clark J. 2017. Tumor thickness versus depth of invasion – Analysis of the 8th edition American Joint Committee on Cancer Staging for oral cancer. *Oral Oncol.* 74(September):30–33. doi:10.1016/j.oraloncology.2017.09.007.
- Dragomir LP, Simionescu C, Mărgăritescu CL, Stepan A, Dragomir IM, Popescu MR. 2012. P53, p16 and Ki67 immunoexpression in oral squamous carcinomas. *Rom J Morphol Embryol.* 53(1):89–93.
- Dwivedi N, Chandra S, Kashyap B, Raj V, Agarwal A. 2013. Suprabasal expression of Ki-67 as a marker for the severity of oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Contemp Clin Dent.* 4(1):7. doi:10.4103/0976-237x.111586.
- Erdem O, Taskiran C, Onan MA, Erdem M, Guner H, Ataoglu O. 2006. CD105 expression is an independent predictor of survival in patients with endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 103(3):1007–1011. doi:10.1016/j.ygyno.2006.06.010.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. 2014. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 136(5):E359–E386. doi:10.1002/ijc.29210.
- Ferlay J, Colombet M y Bray F. Incidencia de cáncer en cinco continentes, CI5 más : IARC CancerBase No. 9 [Internet]. Lyon, Francia: Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer; 2018. Disponible en: <http://ci5.iarc.fr>
- García Kass AI, Domínguez Gordillo AA, García Núñez JA, Cancela Rivas G, Torres Salcines J, Esparza Gómez GC. 2013. Revisión y puesta al día en cáncer de lengua. *Av Odontoestomatol.* 29(5):255–269. doi:10.4321/S0213-12852013000500005.
- García-Pozo L, Miquilena-Colina M.E, Lozano-Rodríguez T, García-Monzó C. *Rev. Esp. Enferm.* 2008;100(6):355-360.

Gontarz M, Wyszyńska-Pawelec G, Zapała J, Czopek J, Lazar A, Tomaszewska R. 2014. Proliferative index activity in oral squamous cell carcinoma: Indication for postoperative radiotherapy? *Int J Oral Maxillofac Surg.* 43(10):1189–1194. doi:10.1016/j.ijom.2014.03.013.

Gonzalez-Moles MA, Ruiz-Avila I, Gil-Montoya JA, Esteban F, Bravo M. 2010. Analysis of Ki-67 expression in oral squamous cell carcinoma: Why Ki-67 is not a prognostic indicator. *Oral Oncol.* 46(7):525–530. doi:10.1016/j.oraloncology.2010.03.020.

Hasina R, Lingen MW. 2001. Angiogenesis in oral cancer. *J Dent Educ.* 65(11):1282–1290.

Huang TH, Li KY, Choi WS. 2019. Lymph node ratio as prognostic variable in oral squamous cell carcinomas: Systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol.* 89(October 2018):133–143. doi:10.1016/j.oraloncology.2018.12.032.

Iamaroon A, Khemaleelakul U, Pongsiriwet S, Pintong J. 2004. Co-expression of p53 and Ki67 and lack of EBV expression in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 33(1):30–6.

Ivanova JI, Saverno KR, Sung J, Duh MS, Zhao C, Cai S, Vekeman F, Peevyhouse A, Dhawan R, Fuchs CS. 2017. Real-world treatment patterns and effectiveness among patients with metastatic colorectal cancer treated with ziv-aflibercept in community oncology practices in the USA. *Med Oncol.* 34(12):2–11. doi:10.1007/s12032-017-1049-4.

Jing Y, Zhou Q, Zhu H, Zhang Y, Song Y, Zhang X, Huang X, Yang Y, Ni Y, Hu Q. 2019. Ki-67 is an independent prognostic marker for the recurrence and relapse of oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 17(1):974–980. doi:10.3892/ol.2018.9647.

Kabiraj A, Jaiswal R, Singh A, Gupta J, Singh A, M.Samadi F. 2018. Immunohistochemical evaluation of mast cells and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Indian J Dent Res.* 21(2):260. doi:10.4103/0970-9290.66655.

Kapila SN. 2017. A Comparison of Clinicopathological Differences in Oral Squamous Cell Carcinoma in Patients Below and Above 40 Years of Age. *J Clin Diagnostic Res.* 11(9):46–50. doi:10.7860/JCDR/2017/27828.10600.

Kargahi N, Torabinia N, Razavi SM, Tahririan D, Kamani H, Nazari M. 2018. Immunohistochemically Detection of Angiogenesis in Oral Pre-Cancerous Lesions Compared with Oral Invasive Carcinomas. 19:1805–1808. doi:10.22034/APJCP.2018.19.7.1805.

Khalili M, Mahdavi N, Beheshti R, Baghai F, 3□ N, Naini FB. 2015. Immunohistochemical Evaluation of Angiogenesis and Cell Proliferation in Tongue Squamous Cell Carcinoma. *www.jdt.tums.ac.ir* Novemb. 12(11).

Kim SJ, Shin HJ, Jung KY, Baek SK, Shin BK, Choi J, Kim BS, Shin SW, Kim YH, Kim JS, et al. 2007. Prognostic value of carbonic anhydrase IX and Ki-67 expression in squamous cell carcinoma of the tongue. *Jpn J Clin Oncol.* 37(11):812–819. doi:10.1093/jjco/hym121.

Kumar KV, Chaithanya K, Punde P, et al (2015). Comparative Evaluation of Immunohistochemical Expression of Ki-67 in Oral Lichen Planus , Oral Leukoplakia and Normal Mucosa Cases. 2015. 7(August):82–87

L. Barnes, J.W. Eveson, P. Reichart, D. Sidransky World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics, head and neck tumours IARC Press, Lyon (2005), pp. 164-176

Liu R, Peng J, Wang H, Li L, Wen X, Tan Y, Zhang L, Wan H, Chen F, Nie X. 2018. Oxysophocarpine Retards the Growth and Metastasis of Oral Squamous Cell Carcinoma by Targeting the Nrf2/HO-1 Axis. *Cell Physiol Biochem.* 49(5):1717–1733. doi:10.1159/000493615.

Lopes VKM, Jesus AS de, Souza LL, Miyahara LAN, Guimarães, Douglas Magno Pontes HAR, Pontes FSC, Carvalho PL de. 2017. Ki-67 protein predicts survival in oral squamous carcinoma cells: an immunohistochemical study. *Braz Oral Res.* 31(0):1–9. doi:10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0066.

Macluskey M, Chandrachud LM, Pazouki S, Green M, Chisholm DM, Ogden GR, Schor SL, Schor E AM. 2000. Apoptosis, proliferation, angiogenesis in oral tissues. Possible relevance to tumour progression. *J Pathol.* 191(4):368–375. doi:10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::AID-PATH652>3.0.CO;2-Y.

Maraboli S. 2014. Características sociodemográficas y clínicas en pacientes con carcinoma oral de células escamosas diagnosticados en la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, 2000-2012. :74.

Marioni G, Marino F, Giacomelli L, Staffieri C, Livia Mariuzzi M, Violino E, De Filippis C. 2006. Endoglin expression is associated with poor oncologic outcome in oral and oropharyngeal carcinoma. *Acta Otolaryngol.* 126(6):633–639. doi:10.1080/00016480500452558.

Marioni G, Staffieri A, Fasanaro E, Stramare R, Giacomelli L, Bernardi E, Val M, Stellini E, de Filippis C, Blandamura S. 2013. The role of angiogenin in pT1-T2 tongue carcinoma neo-angiogenesis and cell proliferation: An exploratory study. *J Oral Pathol Med.* 42(8):606–611. doi:10.1111/jop.12053.

Marioni G, D'Alessandro E, Giacomelli L, Staffieri A. 2010. CD105 is a marker of tumour vasculature and a potential target for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 39(5):361–7. doi:10.1111/j.1600-0714.2010.00888.x.

Marioni G, Ottaviano G, Marchese-Ragona R, Fasanaro E, Tealdo G, Zanotti C, Randon B, Giacomelli L, Stellini E, Blandamura S. 2017. Nuclear survivin expression correlates with endoglin-assessed microvascularisation in laryngeal carcinoma. *J Clin Pathol.* 70(12):1033–1037. doi:10.1136/jclinpath-2016-204230.

Marioni G, Staffieri A, Fasanaro E, Stramare R, Giacomelli L, Bernardi E, Val M, Stellini E, de Filippis C, Blandamura S. 2013. The role of angiogenin in pT1-T2 tongue carcinoma neo-angiogenesis and cell proliferation: An exploratory study. *J Oral Pathol Med.* 42(8):606–611. doi:10.1111/jop.12053.

Martin B, Paesmans M, Mascaux C, Berghmans T, Lothaire P, Meert AP, Lafitte JJ, Sculier JP. 2004. Ki-67 expression and patients survival in lung cancer: Systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer*. 91(12):2018–2025. doi:10.1038/sj.bjc.6602233.

Martínez-Cortez IA, Martínez-Mejía VJ, Amezcua-Rosas G, Gonzalez-Gonzalez R, Carreon-Burciaga G, Palacio-Gastelum MG, Bologna-Molina R. 2011. Diagnóstico Tardío de Carcinoma Escamo Celular en Boca: Reporte de Caso. *Int J Odontostomatol*. 5(3):240–244. doi:10.4067/S0718-381X2011000300006.

Mauriz JL, Linares P, González P, Culebras JM. 2005. Tratamiento antiangiogénico del cáncer. 78(1):3–11.

Min A, Zhu C, Peng S, Rajthala S, Costea DE, Sapkota D. 2015. MicroRNAs as important players and biomarkers in oral carcinogenesis. *Biomed Res Int*. 2015. doi:10.1155/2015/186904.

Ministerio de Salud. 2016. Estrategia Nacional de Cáncer, Chile. Doc para Consult pública.:72.

Momares BD, Contreras GC, Martínez BR, Ávalos nicolás J, Carmona LR. 2014. SOBREVIDA EN CARCINOMA ESPINOCELULAR DE MUCOSA Oral: análisis de 161 Pacientes*. 66:568–576. doi:10.4067/S0718-402620140006000010.

Monteiro, L., Diniz- Freitas, M., Warnakulasuriya, S., Garcia- Caballero, T., Forteza , J., Fraga, M. (2018). An immunohistochemical score to predict the outcome for oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & Medicine*, 47 (4), 375-381. doi: 10.1111 / jop.12682.

Moran M, García Marin F, Ignacio Salmerón J, Forteza González G, Navarro Vila C. 2006. Carcinoma de células escamosas en cavidad oral. *Protoc Clin la Soc Española Cir Oral y Maxilofac.*:433–448.

Montebugnoli L, Gissi DB, Badiali G, Marchetti C, Cervellati F, Farnedi A, Foschini MP. 2011. Ki-67 from clinically and histologically “normal” distant mucosa as prognostic marker in early-stage (T1-T2N0) oral squamous cell carcinoma: A prospective study. *J Oral Maxillofac Surg.* 69(10):2579–2584. doi:10.1016/j.joms.2010.10.041.

Myoung H, Kim MJ, Lee JH, Ok YJ, Paeng JY, Yun PY. 2006. Correlation of proliferative markers (Ki-67 and PCNA) with survival and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: a clinical and histopathological analysis of 113 patients. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 35(11):1005–1010. doi:10.1016/j.ijom.2006.07.016.

N CS. 2016. Conociendo Y Comprendiendo La Célula Cancerosa : Fisiopatología Knowing and Understanding the Cancer Cell: Physiopathology of Cancer. doi:10.1016/S0716-8640(13)70659-X.

Nassiri F, Cusimano MD, Scheithauer BW, Rotondo F, Fazio A, Yousef GM, Syro L V., Kovacs K, Lloyd R V. 2011. Endoglin (CD105): A review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer Res.* 31(6):2283–2290.

Oliveira LR, Ribeiro-Silva A. 2011. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 40(3):298–307. doi:10.1016/j.ijom.2010.12.003.

Petrelli F, Viale G, Cabiddu M, Barni S. 2015. Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients. *Breast Cancer Res Treat.* 153(3):477–491. doi:10.1007/s10549-015-3559-0.

Pizarro CB, Oliveira MC, Pereira-Lima JFS, Leães CGS, Kramer CK, Schuch T, Barbosa-Coutinho LM, Ferreira NP. 2009. Evaluation of angiogenesis in 77 pituitary adenomas using endoglin as a marker. *Neuropathology.* 29(1):40–44. doi:10.1111/j.1440-1789.2008.00937.x.

Rajendran R, Sivapathasundaram B. Shafer's text book of oral pathology. Vol. 5. Rajendran R. New Delhi: Elsevier; 2006. pp. 143–4.

Ravi D, Ramadas K, Mathew BS, Nalinakumari KR, Nair MK, Pillai MR. 1998. Angiogenesis during tumor progression in the oral cavity is related to reduced apoptosis and high tumor cell proliferation. *Oral Oncol.* 34(6):543–548. doi:10.1016/S1368-8375(98)00054-2.

Riera P, Martínez B. 2005. Morbilidad y mortalidad por cáncer oral y faríngeo en Chile Morbidity and mortality for oral and pharyngeal cancer in Chile. *Rev Méd Chile.* 133:555–563. doi:10.4067/S0034-98872005000500007.

Rivera C, Oliveira AK, Costa RAP, De Rossi T, Paes Leme AF. 2017. Prognostic biomarkers in oral squamous cell carcinoma: A systematic review. *Oral Oncol.* 72:38–47. doi:10.1016/j.oraloncology.2017.07.003.

Rojas-Alcayaga G, Brignardello R, Espinoza I, Franco ME, Lobos N, Ortega-Pinto A V. 2010. Oral malignant tumours: a report on 728 cases in Chile. *Acta Odontol Latinoam.* 23(2):136–42.

Rubatt JM, Darcy KM, Hutson A, Bean SM, Havrilesky LJ, Grace LA, Berchuck A, Secord AA. 2009. Independent prognostic relevance of microvessel density in advanced epithelial ovarian cancer and associations between CD31, CD105, p53 status, and angiogenic marker expression: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol.* 112(3):469–474. doi:10.1016/j.ygyno.2008.11.030.

De Salud M. 2012. Unidad De Vigilancia De Enfermedades No Transmisibles Y Estudios Departamento De Epidemiología División Planificación Sanitaria Subsecretaría De Salud Pública. :1–178.

Saad RS, El-Gohary Y, Memari E, Liu YL, Silverman JF. 2005. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in esophageal adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 36(9):955–961. doi:10.1016/j.humpath.2005.06.019.

Saad RS, Liu YL, Nathan G, Celebrezze J, Medich D, Silverman JF. 2004. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. *Mod Pathol.* 17(2):197–203. doi:10.1038/modpathol.3800034.

Saito T., Nakajima T., Mogi K. 1999. Immunohistochemical analysis of cell cycle-associated proteins p16, pRb, p53, p27 and Ki-67 oral cancer and precancer with special reference to verrucous carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 28(5):226–232.

Sánchez C. 2016. Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología Knowing and Understanding the Cancer Cell: Physiopathology of Cancer. doi:10.1016/S0716-8640(13)70659-X.

Sánchez J Sicilia M, Capitán L, Labrot I Martínez-Villalobos S, Valencia E. 2005. Profundidad tumoral y variables histopatológicas en el carcinoma epidermoide lingual . Estudio retrospectivo sobre 60 pacientes. :241–249.

Sapkota D, Bruland O, Parajuli H, Osman TA, Teh MT, Johannessen AC, Costea DE. 2015. S100A16 promotes differentiation and contributes to a less aggressive tumor phenotype in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 15(1):1–14. doi:10.1186/s12885-015-1622-1.

Sawair F, Hassona Y, Irwin C, Stephenson M, Hamilton P, Maxwell P, Gordon D, Leonard A, Napier S. 2016. p53, cyclin D1, p21 (WAF1) and Ki-67 (MIB1) expression at invasive tumour fronts of oral squamous cell carcinomas and development of local recurrence.

Sittel C, Ruiz S, Volling P, Kvasnicka HM, Jungehülsing M, Eckel HE. 1999. Prognostic significance of Ki-67 (MIB1), PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. *Oral Oncol.* 35(6):583–589. doi:10.1016/S1368-8375(99)00041-X.

Scartozzi M, Vincent L, Chiron M, Cascinu S. 2016. Aflibercept, a New Way to Target Angiogenesis in the Second Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer (mCRC). *Target Oncol.* 11(4):489–500. doi:10.1007/s11523-016-0447-4.

Schalch TD, Fernandes MH, Fernanda M, Destro S, Guimarães DM, Nunes FD, Rodrigues JC, Garcia MP, Agnelli R, Ferrari M, et al. 2018. Photobiomodulation is associated with a decrease in Asian Pacific J Cancer Prev. 17(3):1243–1249. doi:10.7314/APJCP.2016.17.3.1243.cell viability and migration in oral squamous cell carcinoma.

Schimming R, Marmé D. 2002. Endoglin (CD105) expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. Head Neck. 24(2):151–156. doi:10.1002/hed.10040.

Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MHG, Key G, Flad - HD, Gerdes J. 1993. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: A very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. J Cell Biol. 123(3):513–522. doi:10.1083/jcb.123.3.513.

Shah N, Trivedi T, Tankshall R, Goswami J, Jetly D, Shukla S, Shah P, Verma R. 2014. Prognostic significance of molecular markers in oral squamous cell carcinoma: A multivariate analysis. Head Neck. 36(10):1391. doi:10.1002/HED.

Shear M. “a” (2002). The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: is it a benign cystic neoplasm? Part 1. Clinical and early experimental evidence of aggressive behaviour. Oral Oncol; 38: 219-26.

Shear M. ” b” (2002). The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: is it a benign cystic neoplasm? Part 3. Immunocytochemistry of cytokeratin and other epithelial cell markers. Oral Oncol; 38:407-15.

Sloan P, Gale N, Hunter K, Lingen M, Nylander K, Reibel J, Salo T, Zain R.B. Squamous cell carcinoma. In: El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, editors. WHO classification of head and neck tumours. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2017. p. 109–4.

Stoll C, Baretton G, Ahrens C, Löhrs U. 2000. Prognostic significance of apoptosis and associated factors in oral squamous cell carcinoma. Virchows Arch. 436(2):102–108. doi:10.1007/PL00008207.

Tadbir AA, Pardis S, Ashkavandi ZJ, Najvani AD, Ashraf MJ, Taheri A, Zadeh MA, Sardari Y. 2013. Expression of Ki67 and CD105 as Proliferation and Angiogenesis Markers in Salivary Gland Tumors. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 13(10):5155–5159. doi:10.7314/apjcp.2012.13.10.5155.

Takeda T, Sugihara K, Hirayama Y, Hirano M, Tanuma J-I, Semba I. 2006. PDFlib PLOP: PDF Linearization, Optimization, Protection Immunohistological evaluation of Ki-67, p63, CK19 and p53 expression in oral epithelial dysplasias. *J Oral Pathol Med.* 35:369–75.

Takkem A, Barakat C, Zakaraia S, Zaid K, Najmeh J, Ayoub M, Seirawan MY. 2018. Ki-67 prognostic value in different histological grades of oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 19(11):3279–3286. doi:10.31557/APJCP.2018.19.11.3279.

Tamayo-Cabeza G, Madera-Anaya M, González-Martínez F. 2017. El cáncer bucal y su relación con la proteína translocadora mitocondrial de 18kda. *Ces Odontol.* 30(1).

Tanaka T, Ishigamori R. 2011. Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer. *J Oncol.* 2011. doi:10.1155/2011/603740.

Thiem D, Schneider S, Venkatraman NT, et al (2017). Semiquantifiable angiogenesis parameters in association with the malignant transformation of oral leukoplakia. *J Oral Pathol Med,* 46, 710-6.

Tumuluri V, Thomas GA, Fraser IS. 2002. Analysis of the Ki-67 antigen at the invasive tumour front of human oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 31(10):598–604. doi:10.1034/j.1600-0714.2002.00042.x.

Vargas-Ferreira F, Nedel F, Etges A, Gomes APN, Furuse C, Tarquinio SBC. 2012. Etiologic factors associated with oral squamous cell carcinoma in non-smokers and non-alcoholic drinkers: A brief approach. *Braz Dent J.* 23(5):586–590. doi:10.1590/S0103-64402012000500020.

Wangsa D, Ryott M, Åvall-Lundqvist E, Petersson F, Elmberger G, Luo J, Ried T, Auer G, Munck-Wikland E. 2008. Ki-67 expression predicts locoregional recurrence in stage I oral tongue carcinoma. *Br J Cancer*. 99(7):1121–1128. doi:10.1038/sj.bjc.6604633.

Weidner N., Carroll P.R., Flax J., Blumenfeld W., Folkman J., Tumor angiogenesis correlates with metastasis Therapy Oncology Group 9501/ in invasive prostate carcinoma, *Am J Pathol*, 143(2):401–409.

Wild CP. 2012. The role of cancer research in noncommunicable disease control. *J Natl Cancer Inst*. 104(14):1051–1058. doi:10.1093/jnci/djs262.

Wild CP, Stewart BW, Wild C. 2014. *World Cancer Report 2014*. :630. doi:9283204298.

Whitman D, Agrawal A. 2009. What is Phenotypic Plasticity and Why is it Important? *Phenotypic Plast Insects*. doi:10.1201/b10201-2.

Xie S, Liu Y, Qiao X, Hua R-X, Wang K, Shan X-F, Cai Z-G. 2016. What is the Prognostic Significance of Ki-67 Positivity in Oral Squamous Cell Carcinoma? *J Cancer*. 7(7):758–767. doi:10.7150/jca.14214.

Xu QS, Wang C, Li B, Li JZ, Mao MH, Qin LZ, Li H, Huang X, Han Z, Feng Z. 2018. Prognostic value of pathologic grade for patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis*. 24(3):335–346. doi:10.1111/odi.12727.

Yang C, Zhang J, Ding M, Xu K, Li L, Mao L, Zheng J. 2018. Ki67 targeted strategies for cancer therapy. *Clin Transl Oncol*. 20(5):570–575. doi:10.1007/s12094-017-1774-3.

Yang X-Q, Wang F-B, Chen C, Peng C-W, Zhang J-F, Li Y. 2011. High Ki-67 expression is a poor prognostic indicator of 5-year recurrence free survival in patients with invasive breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 12(11):3101–5.

Zhao L, Yu N, Guo T, Hou Y, Zeng Z, Yang X, Hu P, Tang X, Wang J, Liu M. 2014. Tissue biomarkers for prognosis of prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 23(6):1047–1054. doi:10.1158/1055-9965.EPI-13-0696.

Zheng JN, Sun YF, Pei DS, Liu JJ, Sun XQ, Chen JC, Cai WQ, Li W, Cao JY. 2005. Anti-Ki-67 peptide nucleic acid affects the proliferation and apoptosis of human renal carcinoma cells in vitro. *Life Sci.* 76(16):1873–1881. doi:10.1016/j.lfs.2004.10.034.

Zhong L, Liu Y, Wang K, He Z, Gong Z, Zhao Z, Yang Y, Gao X, Li F, Wu H, et al. 2018. Biomarkers: paving stones on the road towards the personalized precision medicine for oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.*:1–20. doi:10.1186/s12885-018-4806-7.

Zvrko E, Mikic A, Vuckovic L, Djukic V, Knezevic M. 2009. Prognostic relevance of CD105-assessed microvessel density in laryngeal carcinoma. *Otolaryngol - Head Neck Surg.* 141(4):478–483. doi:10.1016/j.otohns.2009.07.001.

12. ANEXOS

Anexo 1: Comité Ético Científico: Acta de Aprobación de Protocolo de Investigación



Ed-04-09-2017

ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

INFORME N°:2017/10

1. Acta de Aprobación de Proyecto FIOUCH titulado "Correlación y caracterización entre inflamación (cox-2), apoptosis vía mitocondrial (familia bcl-2), densidad microvascular (cd105) y angiogénesis (vegf) en carcinomas espinocelulares de mucosa bucal según grado de diferenciación. Estudio inmunohistoquímico"
2. Miembros del Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile participantes en la aprobación del Proyecto:

Dr. Eduardo Fernández Presidente CEC	Dr. Marco Cornejo Vicepresidente CEC	Dra. Weronika Weil Miembro permanente CEC
Dr. Mauricio Baeza Miembro permanente CEC	Dr. Alfredo Molina Miembro permanente CEC	Sra. Rebeca Galarce Miembro permanente CEC
Dr. Juan Estay Miembro permanente CEC	Dr. José Suazo Miembro Alterno CEC	Dr. Ignacio Araya Miembro Alterno CEC

3. Fecha de Aprobación: 21/07/2017
Título completo del proyecto: "Correlación y caracterización entre inflamación (cox-2), apoptosis vía mitocondrial (familia bcl-2), densidad microvascular (cd105) y angiogénesis (vegf) en carcinomas espinocelulares de mucosa bucal según grado de diferenciación. Estudio inmunohistoquímico"
4. Investigador responsable: Dr. Enrico Escobar
5. Institución Patrocinante: Facultad de Odontología – Universidad de Chile
6. Documentación Revisada:
 - Proyecto
 - Carta aprobación FIOUCH por DIFO

Ed-04-09-2017

- Acreditación de la Evaluación del Comité de Bioseguridad
- Currículo del investigador responsable y co-investigadores
- Carta de Compromiso de IP
- Carta de Intención del IP
- Consentimiento Informado
- Declaración de conflictos de interés
- Resumen ejecutivo
- Carta de aprobación del responsable unidad

7. Fundamentación de la aprobación

Este proyecto es aprobado luego que se realizaran las modificaciones en relación a los siguientes aspectos :

RESPECTO A ASPECTOS METODOLÓGICOS:

Explicar por qué la hipótesis excluye la proteína BAX

Precisar cómo se obtendrán las muestras.

Explicitar el grupo control.

RESPECTO A ASPECTOS ÉTICOS:

Evaluar la posibilidad de obtener consentimientos informados de aquellas personas cuyas muestras serán incorporadas en el estudio. De lo contrario, justificar por qué no se solicitará dicho Consentimiento.

RESPECTO A ASPECTO JURÍDICOS:

Enviar Carta de Autorización emitida por superior jerárquico del TM Prof. Cristián Peñafiel, ya que este es parte del equipo investigador.

Ed-04-09-2017

En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, ha aprobado el Protocolo del estudio titulado "Correlación y caracterización entre inflamación (cox-2), apoptosis vía mitocondrial (familia bcl-2), densidad microvascular (cd105) y angiogénesis (vegf) en carcinomas espinocelulares de mucosa bucal según grado de diferenciación. Estudio inmunohistoquímico"



Dr. Eduardo Fernández G.
Presidente CEC



c/c.: Investigador Principal y Secretaria C.E.C.

Anexo 2: Comité Institucional de Bioseguridad: Certificado



Comité Institucional de Bioseguridad
Administración Conjunta Campus Norte
FDO N°101

Santiago, 08 de Mayo de 2017.

C E R T I F I C A D O

El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha analizado el Proyecto de Investigación FIOUCH 2016 titulado "Correlación y Caracterización entre Inflamación (COX-2), Apoptosis Vía Mitocondrial (Familia BCL-2), Densidad Microvascular (CD105) y Angiogénesis (VEGF) en Carcinomas Espinocelulares de Mucosa Bucal Según Grado de Diferenciación. Estudio Inmunohistoquímico". El Investigador Responsable de este proyecto es el Sr. Enrico Escobar López, Profesor Asistente del Departamento Patología y Medicina Oral.

En el proyecto se utilizarán muestras de carcinoma espino celular de mucosa bucal y mucosa oral normal, en las cuales se detectarán algunos marcadores mediante inmunohistoquímica. Estos ensayos se realizarán en el Laboratorio de Histología y Morfología Oral perteneciente a la Facultad de Odontología. El personal que manipulará las muestras biológicas se encuentra debidamente entrenado en esta área. Además, técnicos y/o estudiantes que trabajarán con ellos estarán bajo la supervisión de los Prof. Escobar y Peñafiel, este último Co-Investigador del presente Proyecto.

El CIB certifica que la Facultad de Odontología cuenta con las facilidades para el manejo y desecho del material biológico y químico a utilizar en el proyecto de acuerdo al Manual de Bioseguridad, Conicyt 2008. Además, el investigador se compromete a velar por el cumplimiento de las normas de bioseguridad, durante el desarrollo del proyecto.

Se extiende el presente certificado a solicitud del Prof. Escobar para ser presentado en la Dirección de Investigación de la Facultad de Odontología.

Dr. Mario Chiong
Secretario

Dra. Carla Lozano M.
Presidenta

Anexo 3: Tabla de datos: IM para Ki-67 y MDV (CD105) en COCE y MO

IM-Ki-67							
BD		MD		PD		MO	
Muestra	IM%	Muestra	IM%	Muestra	IM%	Muestra	IM%
1	34,98	1	75,07	1	46,68	1	4,18
2	15,09	2	49,65	2	28,73	2	12,76
3	70,48	3	50,22	3	32,16	3	4,81
4	52,12	4	53,36	4	32,36	4	0,28
5	8,59	5	43,22	5	48,04	5	13,37
6	1,78	6	61,82	6	34,34	6	10,52
7	23,09	7	23,60	7	69,80	7	4,92
8	7,21	8	17,39	8	87,98	8	16,88
9	47,77	9	41,81	9	47,53	9	0,00
10	40,52	10	17,46	10	42,13	10	19,30
11	10,86	11	80,84	11	100,00	11	3,29
12	10,20	12	61,87	12	72,63	12	2,01
13	51,86	13	60,36	13	82,14	13	2,38
14	30,78	14	71,77	14	53,12		
15	45,99	15	31,69				
16	34,72	16	16,49				
17	30,94	17	29,48				
18	3,63	18	64,30				
19	17,57	19	56,58				
20	9,38	20	33,33				
		21	20,33				
		22	11,08				
		23	11,21				
		24	31,19				
Distribución	Normal		Normal		Normal		Normal
Media%	27,38		42,25		55,55		7,28

}

MDV (CD105)							
BD		MD		PD		MO	
Muestra	MDV	Muestra	MDV	Muestra	MDV	Muestra	MDV
1	30,00	1	17,00	1	43,00	1	13,00
2	38,00	2	40,00	2	73,00	2	7,00
3	42,00	3	49,00	3	72,00	3	5,00
4	19,00	4	39,00	4	44,00	4	0,00
5	13,00	5	42,00	5	67,00	5	2,00
6	19,00	6	21,00	6	57,00	6	4,00
7	22,00	7	24,00	7	76,00	7	3,00
8	14,00	8	20,00	8	62,00	8	5,00
9	24,00	9	29,00	9	78,00	9	1,00
10	23,00	10	26,00	10	55,00	10	11,00
11	17,00	11	33,00	11	63,00	11	10,00
12	18,00	12	42,00	12	36,00	12	1,00
13	36,00	13	15,00	13	34,00	13	15,00
14	57,00	14	14,00	14	43,00		
15	64,00	15	21,00				
16	11,00	16	33,00				
17	26,00	17	31,00				
18	15	18	20,00				
19	34	19	37,00				
20	21	20	42,00				
		21	35				
		22	28				
		23	23				
		24	42				
Distribución	No normal		Normal		Normal		Normal
Media	27,15		30,13		57,36		5,92