

Utilidad de Tinción de Tricrómico de Masson en la Cuantificación de Densidad Media Vascular en Mucosa Oral Normal, Displasia Epitelial y Carcinoma Oral de Células Escamosas

Utility of Masson's Trichrome Stain in the Quantification of Mean Vascular Density in Normal Oral Mucosa, Epithelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma

Felipe Cáceres¹; Gilberto Herrera¹; Alejandra Fernández^{1,3}; Javier Fernández⁴;
René Martínez¹; Daniela Carvajal⁴ & Ziyad S. Haidar^{2,3,5,6}

CÁCERES, F.; HERRERA, G.; FERNÁNDEZ, A.; FERNÁNDEZ, J.; MARTÍNEZ, R.; CARVAJAL, D. & HAIDAR, Z. S. Utilidad de tinción de tricrómico de masson en la cuantificación de densidad media vascular en mucosa oral normal, displasia epitelial y carcinoma oral de células escamosas. *Int. J. Morphol.*, 35(4):1576-1581, 2017.

RESUMEN: El objetivo de este estudio fue valorar la utilidad del uso de la tinción de Tricrómico de Masson (TM) en la cuantificación de la densidad media vascular (DMV) en Mucosa Oral Normal (MON), Displasia Epitelial Oral (DEO) y Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE). Estudio descriptivo de serie de casos. Se analizaron 17 muestras de MON, 15 muestras de DEO y 16 de COCE, teñidas con TM. Para determinar su utilidad, se compararon con las mismas muestras analizadas con técnica de inmunohistoquímica contra CD31. La cuantificación de la DMV se realizó en las 3 áreas de mayor vascularización de cada muestra. Se determinó la DMV según diagnóstico mediante la tinción TM e inmunohistoquímica contra CD31, y se calculó la correlación entre ambos. La DMV cuantificada con TM y contra CD31 difiere según el diagnóstico, observándose un aumento de la DMV al malignizarse el diagnóstico. No se encontraron diferencias al comparar la DMV cuantificada con TM y contra CD31. La correlación de la DMV analizado por TM y contra CD31 es significativa y moderada. La cuantificación de vasos sanguíneos es posible mediante la tinción de TM en muestras de MON, DEO y COCE, con una correlación moderada con la inmunohistoquímica contra CD31.

PALABRAS CLAVE: Células epiteliales; Neoplasias de la boca; Neovascularización patológicas.

INTRODUCCIÓN

La neoplasia maligna más frecuente de la cavidad oral es el carcinoma oral de células escamosas (COCE) que deriva del epitelio escamoso estratificado de la mucosa oral (Rivera & Venegas, 2014; Gupta *et al.*, 2016). El COCE se desarrolla a partir de la transformación maligna de la mucosa oral normal (MON) o displasia epitelial oral (DEO) (Menakuru *et al.*, 2008; Ho *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014; Scully *et al.*, 2014). El COCE corresponde al 95 % de las neoplasias orales y su tasa de supervivencia es de un 50 % a los 5 años (Fernández *et al.*, 2015).

En la década de 1970 surgió el concepto de que el crecimiento de los carcinomas está asociado a la angiogénesis (Sathyakumar *et al.*, 2012). Actualmente es conocido que en las neoplasias malignas se pierde la regulación de la angiogénesis, resultando un aumento de los factores proangiogénicos y/o la pérdida de los factores angiogénicos inhibidores (Ryan *et al.*, 2011), en consecuencia cambiando el balance a favor de la angiogénesis tumoral (Bruno *et al.*, 2014).

¹ Departamento de Cirugía y Patología, Facultad de Odontología, Universidad Andrés Bello, Santiago, Chile.

² Programa de Doctorado en BioMedicina, Facultad de Medicina, Universidad de los Andes, Santiago, Chile.

³ BioMAT'X, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de los Andes, Santiago, Chile.

⁴ Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

⁵ Plan de Mejoramiento Institucional (PMI) en Innovación I+D+i, Universidad de los Andes, Santiago, Chile.

⁶ Facultad de Odontología, Universidad de los Andes, Santiago, Chile.

Para el análisis de los vasos sanguíneos en muestras histológicas se ha recomendado su cuantificación mediante la identificación de CD31 por técnica de inmunohistoquímica. Sullivan *et al.* (2015) indicaron que este marcador presenta una alta sensibilidad en la tinción de vasos (100 %). CD-31 es una proteína transmembrana o molécula de adhesión ubicada en las células endoteliales (Moriyama *et al.*, 1997; Pujari *et al.*, 2013; Sullivan *et al.*). Sin embargo, la detección contra CD31 mediante inmunohistoquímica necesita un procedimiento riguroso y altos costos. Por tal motivo, el objetivo del presente estudio es evaluar la cuantificación de vasos sanguíneos en muestras de MOD, DEO y COCE mediante tinción TM e inmunohistoquímica contra CD31 y evaluar su correlación.

MATERIALES Y MÉTODO

Se diseñó un estudio descriptivo, serie de casos. El estudio fue aprobado por el comité de bioética de la Facultad de Odontología, Universidad Andrés Bello. (Nº de proyecto: PROPRGFO_002016.006_2016).

Muestra. La muestra del estudio consistió en tacos embebidos en parafina, de los cuales correspondieron a 16 casos de MON, 17 de DEO y 15 de COCE. Las muestras fueron obtenidas del registro del Servicio de Histopatología, Facultad de Odontología, Universidad Andrés Bello, entre los años 2004 y 2012. Para corroborar los diagnósticos de MON, DEO y COCE, las muestras fueron evaluadas y diagnosticadas por un patólogo oral experto, con tinción de hematoxilina eosina, considerando los criterios diagnósticos propuestos por la OMS (Barnes *et al.*, 2005).

Criterios de inclusión y exclusión para la selección de las muestras. Los criterios de inclusión correspondieron a las muestras que contaron con diagnóstico de MON o DEO o COCE. Se excluyeron los casos con diagnóstico de DEO o COCE secundario o de metástasis.

Técnica de inmunohistoquímica para CD31. De las muestras se obtuvieron cortes de 4 micrones los que fueron montados en portaobjetos xilanizados, desparafinados e hidratados con agua destilada. Una vez hidratados, se realizó una recuperación antigénica en una vaporera utilizando buffer de citrato a pH 6. Luego se bloqueó la enzima peroxidasa endógena mediante la aplicación de peróxido de hidrógeno al 3 %. De cada bloque embebido en parafina se obtuvo un corte de tejido de 4 micrómetros de espesor, el que fue llevado a un portaobjeto cubierto con el adhesivo poli-L-Lisina (BioSB, Santa Bárbara,

USA). Estas secciones fueron sometidas a reaccionar con el anticuerpo monoclonal CD-31 (DAKO) de ratones [CD-31, anticuerpo monoclonal de ratones, Clon QBend/10, Isotipo Inmunoglobulina tipo G-1 (IgG1)], diluido 1:40, de localización membranosa, BioSB, Santa Bárbara USA, usando método del complejo avidina-biotina-peroxidasa, a una temperatura de 37 °C durante 32 minutos. La recuperación antigénica se realizó a una temperatura 95-100 °C durante 60 minutos. Cada muestra se comparó con un control positivo y negativo inserto en cada una de las placas histológicas. El control inmunopositivo correspondió a un segmento de angiosarcoma sometido a la técnica de inmunohistoquímica contra CD31. El control inmunonegativo se obtuvo mediante la omisión del anticuerpo primario.

Técnica de tinción tricrómica de Masson. De las muestras se obtuvieron cortes de 4 micrones los cuales se desparafinaron e hidrataron en agua destilada. Primero se fijó en solución de formaldehído y luego se realizó un montaje con líquido de Bouin durante 1 hora a 56-60 °C, se enfrió y lavó en agua destilada para quitar el color amarillo. Se realizó un teñido con hematoxilina férrica durante 10 minutos y se lavó en agua destilada durante 10 minutos. Luego se realizó teñido con la solución de escarlata-fucsina ácida durante 2-5 minutos y se lavó con agua destilada. A continuación, se trató con la solución de ácido fosfomolibdico-fosfotungstico durante 10-15 minutos y luego se realizó el teñido con solución de azul de anilina 15 minutos. Se lavó en agua destilada, deshidrató, aclaró y montó en un portaobjeto.

Determinación la densidad media vascular (DMV). Para el análisis de todas las muestras obtenidas, dos patólogos orales determinaron las áreas de mayor vascularización en cada una de las muestras de estudio, utilizando un microscopio óptico (Olympus® CX-31) con un aumento de 4x. Luego se cambió el objetivo a un aumento de 40x y se registraron fotográficamente 3 imágenes de manera consecutivas, utilizando una cámara digital Micrometrics® modelo 518 CU de 5,1 megapíxeles incorporada al microscopio óptico. Se contaron los vasos sanguíneos identificados con tinción TM y con inmunotinción contra CD-31 mediante el programa Image J® versión. 1.6.24. Se consideraron como vasos sanguíneos a las estructuras tubulillares revestida por células endoteliales, con o sin presencia de células rojas intralobulillares. Los vasos sanguíneos con tinción TM se identificaron de color rojo y la inmunotinción contra CD31 se identificó de color café. La densidad media vascular de cada placa teñida se determinó mediante el promedio de la cantidad de vasos de 3 hot spots (HS) como indica la siguiente fórmula: $DMV = (N^{\circ} \text{ vasos HS } 1 + N^{\circ} \text{ vasos HS } 2 + N^{\circ} \text{ vasos HS } 3) / 3$.

Análisis estadístico. La variable DMV se representó mediante mediana y rango intercuartílico. El análisis de la DMV según diagnóstico se realizó mediante el test Kruskal-Wallis y con el test post hoc de Dunn's Pairwise. La comparación de la DMV según tinción CD31 y TM se realizó mediante el test Wilcoxon signed-rank, y la correlación entre ambas según el test Spearman. Se utilizó un nivel de significancia de un 0,05 y se realizó el análisis estadístico con el programa STATA 12® (STATA CORP LP, Texas, USA).

RESULTADOS

La muestra del estudio consistió en un total de 48 cortes histológicos, sus distribuciones según diagnóstico se muestran en la Tabla I. Se obtuvo una DMV mediante inmunohistoquímica CD31 en los pacientes con diagnóstico de MON de: 10 vasos con un rango intercuartílico de 3,67 vasos, en los pacientes con diagnóstico de DEO de 13,33 vasos con un rango intercuartílico de 7,3 vasos y en los pacientes con diagnóstico de COCE de 15,16 vasos con un rango intercuartílico de 18 vasos - Tabla II.

Al analizar la DMV según diagnóstico mediante inmunohistoquímica CD31, se encontraron diferencias entre los grupos ($r=0,002$). La DMV de los pacientes con diagnóstico de MON difirió de los pacientes con COCE ($r<0,001$), al igual que entre los pacientes con diagnóstico de DEO y COCE ($r=0,032$), sin existir diferencias entre el grupo MON y DEO ($r=0,067$). (Fig.1. B, D, F, H)

De igual forma, se obtuvo la DMV mediante la tinción TM. Los pacientes con diagnóstico de MON presentaron una DMV de 5,66 vasos con un rango intercuartílico de 4,66 vasos, los pacientes con diagnóstico de DEO presentaron una DMV de 14 vasos con un rango intercuartílico de 7,34 vasos y los pacientes con diagnóstico de COCE presentaron una DMV de 19,16 vasos con un rango intercuartílico de 12,67 vasos (Tabla II). (Fig.1. A, C, E, G)

Al analizar la DMV según diagnóstico mediante tinción TM, se encontraron diferencias entre los 3 grupos diagnósticos ($r<0,001$). Se evidenciaron diferencias de la DMV entre el grupo MON y DEO ($r<0,001$) y entre MON y COCE ($r<0,001$). No se encontraron diferencias entre el grupo DEO y COCE ($r=0,101$).

Tabla I. Características de los pacientes según diagnóstico histopatológico.

Variable	Diagnostico			Total	P
	Mucosa oral Normal	Displasia Epitelial	COCE		
Genero					0,367
Masculino	4 (23,53%)	7 (46,67%)	7 (43,75%)	18	
Femenino	13 (76,47%)	8 (53,33%)	9 (56,25%)	30	
Localización					0,458
Bajo riesgo	17 (100%)	9 (60%)	12 (75%)	38	
Alto riesgo	0 (0%)	6 (40%)	4 (25%)	10	
Edad					0,001
<40	17 (100%)	1 (6,66%)	0 (0%)	18	
40-60	0 (0%)	7 (16,67%)	1 (6,25%)	8	
>60	0 (0%)	7 (16,67%)	15 (93,75%)	22	
TOTAL	17 (100%)	15 (100%)	16 (100%)	48	

Tabla II. DMV según tinción TM e inmunohistoquímica contra CD31.

Variable	Mediana	Rango Intercuartilico
CD31		
MON	10	3,67
DEO	13,33	7,3
COCE	15,16	18
TM		
MON	5,66	4,66
DEO	14	7,34
COCE	19,16	12,67

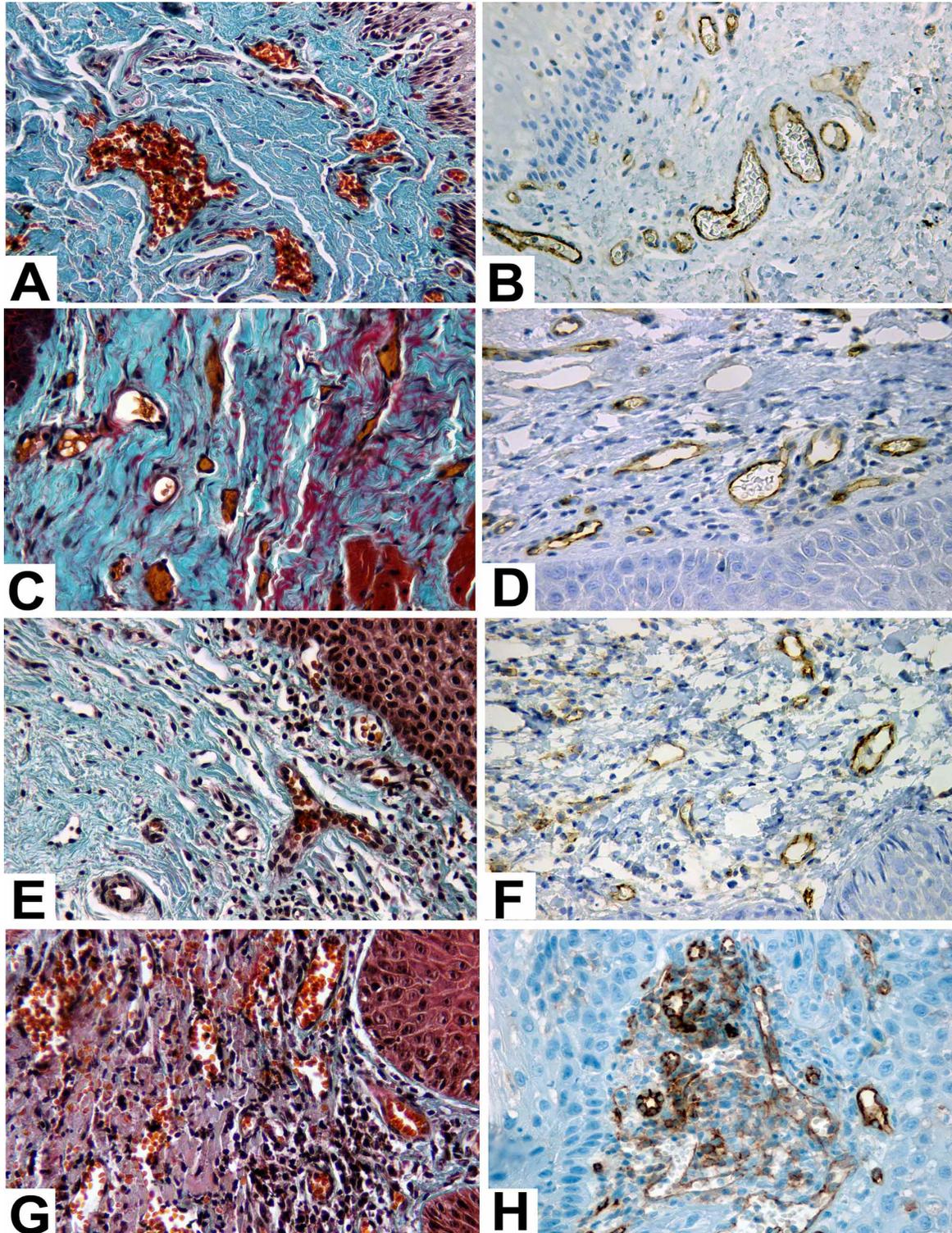


Fig. 1. A. Se observa muestra de mucosa oral normal con aumento de 40x, tinción de Tricrómico de Masson. B. Se observa muestra de mucosa oral normal con aumento de 40x, inmunotinción contra CD31. C. Se observa muestra de Displasia epitelial Oral leve con aumento de 40x, tinción de Tricrómico de Masson. D. Se observa muestra de Displasia Epitelial Oral leve con aumento de 40x, inmunotinción contra CD31. E. Se observa muestra de Displasia Epitelial Oral severa con aumento de 40x, tinción de Tricrómico de Masson. F. Se observa muestra de Displasia Epitelial Oral severa con aumento de 40x, inmunotinción contra CD31. G. Se observa muestra de Carcinoma Oral de Células Escamosas moderadamente diferenciado con aumento de 40x, tinción Tricrómico de Masson. H. Se observa muestra de Carcinoma Oral de Células Escamosas moderadamente diferenciado con aumento de 40x, inmunotinción contra CD31.

Al comparar la DMV de todos los pacientes mediante la inmunohistoquímica CD31 y la tinción TM, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($r=0,719$). Al evaluar el grado de correlación entre ambas, se obtuvo que esta fue significativa ($r=0,001$), con un grado de correlación moderado (ρ de Spearman= $0,46$).

DISCUSIÓN

La angiogénesis se ha asociado a la transformación maligna del epitelio oral y a la agresividad de COCE (Michailidou *et al.*, 2012). Es por esto que diversos investigadores han cuantificado vasos sanguíneos mediante técnica de inmunohistoquímica contra CD31, CD34, y CD105 (Cheng *et al.*, 2014; Andisheh-Tadbir *et al.*, 2016; Fernández *et al.*, 2017). Es conocido que la técnica de inmunohistoquímica requiere equipamiento específico y experticia en la técnica, sumado a altos costos. Por esos motivos, el objetivo de este estudio fue encontrar una alternativa asequible que permita estudiar la angiogénesis de las lesiones potencialmente malignas y malignas, que se encuentre disponible en los diferentes centros de salud, por lo que comparamos el uso de la tinción de TM respecto a la inmunohistoquímica contra CD31, la que es considerada de elección para el estudio de vasos sanguíneos. La tinción de TM es una técnica corriente que distingue 3 colores y permite visualizar claramente las fibras de colágeno tipo I y IV, lo que facilita distinguir vasos sanguíneos con respecto a muestras analizadas por hematoxilina eosina (Pujari *et al.*).

En este estudio se observó que la la DMV de pacientes muestras histológicas de MON, DEO y COCE teñidas con TM, fue aumentando a medida que aumentaba el grado de malignidad de las muestras, lo que coincidió con el análisis de las mismas muestras que identificó los vasos sanguíneos mediante inmunohistoquímica contra CD31. Esto coincide con lo reportado por Mohtasham *et al.* (2010), Astekar *et al.* (2012), Michailidou *et al.* y Pyziak *et al.* (2013).

Al comparar la DMV de la totalidad de las muestras entre TM y la identificación de CD31, no se encontraron diferencias entre ambas. Además, se obtuvo una correlación significativa, siendo esta última moderada. Estos hallazgos nos permiten proponer que la cuantificación de vasos sanguíneos en muestras de MON, DEO y COCE es posible mediante tinción de TM, considerándose una alternativa útil y comparable a la realizada mediante inmunohistoquímica contra CD31.

La principal limitación de nuestro estudio es el tamaño muestral reducido, siendo menor en comparación a otros estudios donde se evaluó la inmunohistoquímica contra CD31 (Li *et al.*, 2005; Rössle *et al.*, 2013; Gröbe *et al.*, 2014), debido a la baja prevalencia de estas patologías en la población general.

A futuro, planteamos evaluar otras tinciones como el rojo carmín para la cuantificación de los vasos sanguíneos, permitiendo tener otras opciones de menores costos y mayor disponibilidad en pacientes con MON, DEO y COCE.

CONCLUSIÓN

El COCE es la neoplasia maligna más frecuente de la cavidad oral, cuyo grado de agresividad se correlaciona con un aumento en la DMV, medido tanto por tinción TM como por inmunohistoquímica contra CD31. No se encontraron diferencias en la DMV medidas por ambas técnicas y se observó una correlación moderada entre ambas. La tinción con TM podría representar hoy en día una alternativa viable y accesible para la evaluación de la DMV, siendo comparable a la inmunohistoquímica contra CD31.

AGRADECIMIENTOS. Los autores desean agradecer a Maureen Marshall su valiosa ayuda en la recolección de las muestras histológicas.

CÁCERES, F.; HERRERA, G.; FERNÁNDEZ, A.; FERNÁNDEZ, J.; MARTÍNEZ, R.; CARVAJAL, D. & HAIDAR, Z. S. Utility of masson's trichrome stain in the quantification of mean vascular density in normal oral mucosa, epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Morphol.*, 35(4):1576-1581, 2017.

SUMMARY. The objective of this study was to evaluate the utility of Masson's Trichrome (TM) staining in the quantification of the mean vascular density (DMV) in samples of normal oral mucosa (MON), oral epithelial dysplasia (ODE) and oral squamous cell carcinoma (COCE). The design - a descriptive study of case series. We analyzed 17 samples of MON, 15 samples of DEO and 16 samples of COCE, stained with TM. To determine usefulness, we compared and analyzed the same samples, either stained with TM or with immunohistochemical technique against CD31. Quantification of the DMV was performed in the 3 areas of greatest vascularization in each sample. DMV was determined according to diagnosis by TM staining and immunohistochemistry against CD31, and the correlation between the two was then calculated. DMV quantified with TM and against CD31 differs according to the diagnosis, with an increase in DMV upon malignant diagnosis.

No differences were found when comparing DMV quantified with TM and against CD31. The correlation of the DMV analyzed by TM and against CD31 is significant and moderate. Quantification of blood vessels is possible by TM staining in samples of MON, DEO and COCE. TM staining is moderately correlated with immunohistochemistry against CD31.

KEY WORDS: Epithelial cells; Mouth neoplasms; Pathological neovascularization.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andisheh-Tadbir, A.; Mardani, M.; Pourshahidi, S.; Nezarati, K. & Bahadori, P. Prognostic value of matrix metalloproteinase-9 expression in oral squamous cell carcinoma and its association with angiogenesis. *J. Clin. Exp. Dent.*, 8(2):e130-5, 2016.
- Astekar, M.; Joshi, A.; Ramesh, G. & Metgud, R. Expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density in oral tumorigenesis. *J. Oral Maxillofac. Pathol.*, 16(1):22-6, 2012.
- Barnes, L.; Eveson, J. W.; Reichart, P. & Sidransky, D. *The World Health Organization (WHO) "Blue Book" on the Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors (IARC WHO Classification of Tumours)*. Lyon, IARC Press, 2005.
- Bruno, A.; Pagani, A.; Pulze, L.; Albini, A.; Dallaglio, K.; Noonan, D. M. & Mortara, L. Orchestration of angiogenesis by immune cells. *Front. Oncol.*, 4:131, 2014.
- Cheng, S. H.; Liu, J. M.; Liu, Q. Y.; Luo, D. Y.; Liao, B. H.; Li, H. & Wang, K. J. Prognostic role of microvessel density in patients with renal cell carcinoma: a meta-analysis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 7(9):5855-63, 2014.
- Fernández, A.; Córdova, P.; Badenier, O. & Esguep, A. Epidemiological characterization of oral cancer. Literature review. *J. Oral Res.*, 4(2):137-45, 2015.
- Fernández, A.; Fernández, J.; Marshall, M.; Martínez, R.; Niklander, S. & Haidar, Z. S. Difference in EGFR expression and mean vascular density in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Res.*, 6(2):39-45, 2017.
- Gröbe, A.; Eichhorn, W.; Fraederich, M.; Kluwe, L.; Vashist, Y.; Wikner, J.; Smeets, R.; Simon, R.; Sauter, G.; Heiland, M. & Blessmann, M. Immunohistochemical and FISH analysis of EGFR and its prognostic value in patients with oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.*, 43(3):205-10, 2014.
- Gupta, B.; Johnson, N. W. & Kumar, N. Global epidemiology of head and neck cancers: A continuing challenge. *Oncology*, 91(1):13-23, 2016.
- Ho, M. W.; Risk, J. M.; Woolgar, J. A.; Field, E. A.; Field, J. K.; Steele, J. C.; Rajlawat, B. P.; Triantafyllou, A.; Rogers, S. N.; Lowe, D. & Shaw, R. J. The clinical determinants of malignant transformation in oral epithelial dysplasia. *Oral Oncol.*, 48(10):969-76, 2012.
- Li, C.; Shintani, S.; Terakado, N.; Klosek, S. K.; Ishikawa, T.; Nakashiro, K. & Hamakawa, H. Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and platelet-derived endothelial growth factor in oral squamous cell carcinomas. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 34(5):559-65, 2005.
- Menakuru, S. R.; Brown, N. J.; Staton, C. A. & Reed, M. W. Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Br. J. Cancer*, 99(12):1961-6, 2008.
- Michailidou, E. Z.; Markopoulos, A. K. & Antoniadou, D. Z. VEGF expression from human dysplastic or malignant oral epithelium may be related to mast cell density and the subsequent angiogenetic phenomena. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 41(12):1467-73, 2012.
- Mohtasham, N.; Babakoochi, S.; Salehinejad, J.; Montaser-Kouhsari, L.; Shakeri, M. T.; Shojaei, S.; Sistani, N. S. & Firooz, A. Mast cell density and angiogenesis in oral dysplastic epithelium and low- and high-grade oral squamous cell carcinoma. *Acta Odontol. Scand.*, 68(5):300-4, 2010.
- Moriyama, M.; Kumagai, S.; Kawashiri, S.; Kojima, K.; Kakiyama, K. & Yamamoto, E. Immunohistochemical study of tumour angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.*, 33(5):369-74, 1997.
- Pujari, R. K.; Vanaki, S. S.; Puranik, R. S.; Desai, R. S.; Motupalli, N. & Halawar, S. Histomorphometric analysis of vascularity in normal buccal mucosa, leukoplakia, and squamous cell carcinoma of buccal mucosa. *J. Oral Maxillofac. Pathol.*, 17(3):334-9, 2013.
- Pyziak, L.; Stasikowska-Kanicka, O.; Danilewicz, M. & Wa, growska-Danilewicz, M. Immunohistochemical analysis of mast cell infiltrates and microvessel density in oral squamous cell carcinoma. *Pol. J. Pathol.*, 64(4):276-80, 2013.
- Rivera, C. & Venegas, B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). *Oncol. Lett.*, 8(1):7-11, 2014.
- Rössle, M.; Weber, C. S.; Züllig, L.; Graf, N.; Jochum, W.; Stöckli, S. J.; Moch, H. & Huber, G. F. EGFR expression and copy number changes in low T-stage oral squamous cell carcinomas. *Histopathology*, 63(2):271-8, 2013.
- Ryan, J. T.; El-Naggar, A. K.; Huh, W.; Hanna, E. Y.; Weber, R. S. & Kupferman, M. E. Primacy of surgery in the management of mucoepidermoid carcinoma in children. *Head Neck*, 33(12):1769-73, 2011.
- Sathyakumar, M.; Sriram, G.; Saraswathi, T. & Sivapathasundharam, B. Immunohistochemical evaluation of mast cells and vascular endothelial proliferation in oral precancerous lesion-leukoplakia. *J. Oral Maxillofac. Pathol.*, 16(3):343-8, 2012.
- Scully, C. Challenges in predicting which oral mucosal potentially malignant disease will progress to neoplasia. *Oral Dis.*, 20(1):1-5, 2014.
- Sullivan, H. C.; Edgar, M. A.; Cohen, C.; Kovach, C. K.; HooKim, K. & Reid, M. D. The utility of ERG, CD31 and CD34 in the cytological diagnosis of angiosarcoma: an analysis of 25 cases. *J. Clin. Pathol.*, 68(1):44-50, 2015.
- Wang, Y. Y.; Tail, Y. H.; Wang, W. C.; Chen, C. Y.; Kao, Y. H.; Chen, Y. K. & Chen, C. H. Malignant transformation in 5071 southern Taiwanese patients with potentially malignant oral mucosal disorders. *B. M. C. Oral Health*, 14:99, 2014.

Dirección para correspondencia
Prof. Dr. Ziyad S. Haidar, DDS,
Cert Implantol., MSc OMFS, FRCS(Canada), FACS, MBA
PhD. Professor and Scientific Director
Faculty of Dentistry
Universidad de Los Andes
Santiago
CHILE

E-mail: zhaidar@uandes.cl

Recibido : 15-05-2017
Aceptado : 06-09-2017