

*Departamento de  
Patología y Medicina Oral. Área de Patología Estomatológica.*

# **“Detección de linfocitos T reguladores en carcinoma oral de células escamosas.”**

**Gonzalo Ignacio Araos Marincovic.**

**Trabajo de Investigación**

Requisito Para Optar al Título de  
Cirujano - Dentista

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Dra. Marcela Farías Vergara**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Prof. Dra. Caroll Beltrán Muñoz**

**Prof. Dra. Daniela Adorno Farías**

## ***AGRADECIMIENTOS***

### ***A mis Padres.***

*Claudio y Elizabeth, por el apoyo incondicional brindado durante toda mi carrera Universitaria, y por sobre todo, por ser los pilares que me han sostenido en los momentos más difíciles de mi vida.*

### ***A mi Tata e Ita.***

*Cortas quedan las palabras por el cariño que siento por Uds. Mis mejores amigos, han estado ahí desde que recuerdo, acompañándome en alegrías y tristezas, agradezco la suerte que tuve de vivir con Uds. Y que puedan compartir una de mis grandes alegrías hasta ahora.*

### ***A Mis Tatas.***

*Drago y Silvia, por el apoyo otorgado los últimos años y por los consejos valiosos en torno a situaciones complejas.*

### ***A Paulina.***

*Aquella mujer que me ha entregado su corazón, aquella que comparte mis alegrías y tristezas, la que ha sido un pilar fundamental estando a mi lado durante todo este tiempo, la mujer que me ha motivado a ser mucho mejor cada día.*

### ***A mis hermanos.***

*Por ser lo que son, porque mi vida sin Uds. estaría vacía, porque con Uds. lleno mi corazón de energía, y espero que esta sensación nunca acabe.*

### ***A mis amigos.***

*Aquellos que siempre estuvieron ahí cuando más los necesite y que sin pedir nada a cambio me ayudaron en las situaciones más difíciles de afrontar. Aquellos con los que continuare este camino lleno de anhelos e incertidumbres, a Uds. Mis más grandes agradecimientos, son por lejos lo que mejor rescato de este hermoso proceso.*

### ***A mis tutoras.***

*Dra. Farías y Dra. Adorno, quienes estuvieron siempre ahí, para ayudarme y guiarme, quienes se desvelaron conmigo para estructurar esta tesis, quienes me han enseñado la importancia de la perseverancia y el trabajo en equipo.*

### ***A mis Profesores.***

*A los brillantes, que recuerdo con aprecio, pero con gratitud a los que tocaron mis sentimientos.*

### ***Al equipo de extensión.***

*Por darme la oportunidad de desenvolverme en un área en que puedo explotar mis valores, por darme la oportunidad de conocer diferentes culturas y realidades, y poder dirigir lo aprehendido a las comunidades que lo necesiten.*

***“El mundo está en las manos de aquellos que tienen el coraje de soñar y correr el riesgo de vivir sus sueños”.***

***- Paulo Coelho.***

**GRACIAS.**

## Índice

1.- RESUMEN.....	3
2.- MARCO TEÓRICO.....	5
2.1.- INTRODUCCIÓN .....	5
2.2.- EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER ORAL .....	6
2.3.- DEFINICIÓN DEL COCE .....	8
2.4.- ETIOPATOGENIA DEL COCE.....	9
2.5.- FACTORES DE RIESGO.....	11
2.6.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS .....	12
2.7.- CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA.....	13
2.8.- TRATAMIENTO.....	15
2.9.- PRONÓSTICO .....	16
2.10.- CARCINOMA VERRUCOSO .....	18
2.11.- INMUNOLOGÍA ANTITUMORAL Y COCE.....	21
2.12.- CÉLULAS T REGULADORAS .....	25
2.13.- MECANISMOS DE EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL MEDIADOS POR CÉLULAS T REGULADORAS.....	28
3. HIPÓTESIS.....	30
4. OBJETIVO GENERAL .....	31
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
6. METODOLOGÍA .....	33
6.1.- TIPO DE ESTUDIO .....	33
6.2.- FUENTE DE INFORMACIÓN.....	33
6.3.- DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA.....	33
6.4.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN: .....	34
6.5.- CRITERIOS DE EXCLUSIÓN: .....	34
6.6.- RECUENTO LINFOCITARIO .....	35
6.7.- RECOLECCIÓN DE DATOS.....	36
6.8.- TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA.....	37
6.9.- VARIABLES DE ESTUDIO.....	39
6.10.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	40
6.11.- ASPECTOS ÉTICOS Y BIOSEGURIDAD.....	40

7. RESULTADOS.....	41
7.1 DATOS CLÍNICOS DE LAS MUESTRAS.....	41
7.2.- DATOS CLÍNICOS DE MUCOSA SANA (MS).....	46
7.3.- CANTIDAD DE INFILTRADO INFLAMATORIO TOTAL EN MS.....	47
7.4.- DATOS CLÍNICOS EN CARCINOMA VERRUCOSO (CVO).....	49
7.5.- CANTIDAD DE INFILTRADO INFLAMATORIO TOTAL EN CVO.....	50
7.6.- DATOS CLÍNICOS EN COCE BIEN DIFERENCIADO.....	52
7.7.- CANTIDAD DE INFILTRADO INFLAMATORIO TOTAL EN COCE BIEN DIFERENCIADO.....	53
7.8.- DATOS CLÍNICOS EN COCE MODERADAMENTE DIFERENCIADO.....	55
7.9.- CANTIDAD DE INFILTRADO INFLAMATORIO TOTAL EN COCE MODERADAMENTE DIFERENCIADO.....	56
7.10.- DATOS CLÍNICOS EN COCE POBREMENTE DIFERENCIADO.....	58
7.11.- CANTIDAD DE INFILTRADO INFLAMATORIO TOTAL EN COCE POBREMENTE DIFERENCIADO.....	59
7.12.- DIFERENCIAS COMPARATIVAS ENTRE LOS SUBTIPOS DE CÁNCER: DATOS CLÍNICOS.....	61
7.13.- DIFERENCIAS COMPARATIVAS ENTRE LOS SUBTIPOS DE CÁNCER: CANTIDAD DE INFILTRADO INFLAMATORIO.....	63
7.14.- MONTAJE DE LA TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA.....	65
7.15.- DETECCIÓN DE LINFOCITOS T REGULADORES EN COCE.....	66
8. DISCUSIÓN.....	73
9. CONCLUSIONES.....	80
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
11. ANEXOS.....	95
11.1.- ANEXOS N°1.....	95
11.2.- ANEXO N°2.....	96
11.3.- ANEXO N°3.....	97

## **1.- RESUMEN**

**Introducción:** El cáncer oral ha sido reportado de importancia dentro de la salud pública mundial, no solo por causar un gran número de casos de muerte en la población, sino porque su tratamiento habitualmente conlleva a una disminución importante en la calidad de vida. El carcinoma de células escamosas representa el cáncer que más afecta a la cavidad oral y durante los últimos años ha aumentado su incidencia en Chile. Diversos protagonistas de la respuesta inmune están implicados en el desarrollo y pronóstico de los pacientes con cáncer, dentro de los cuales encontramos a los linfocitos. Durante el reclutamiento de células inflamatorias al sitio tumoral, encontramos poblaciones correspondientes a la respuesta inmune efectora, de la misma forma que podríamos encontrar linfocitos T reguladores, células implicadas en suprimir una potente e ideal respuesta anti tumor, que han sido descritas como fundamentales en la progresión tumoral. Sin embargo hay poca evidencia del rol que tendrían estas células en el cáncer oral por lo que se torna necesario generar mayor información sobre los diferentes protagonistas en la progresión del carcinoma oral, para lograr mejores herramientas que aporten en el pronóstico y principalmente nuevos enfoques terapéuticos.

**Materiales y Métodos:** Estudio observacional analítico de corte transversal. En donde se evaluará la presencia de linfocitos T reguladores en cáncer oral en el infiltrado linfocitario tumoral de Carcinoma de células escamosas. Para esto, analizaremos biopsias realizadas en el Servicio de Anatomía Patológica de FOUCH (SAP). Con el diagnóstico histopatológico de carcinoma de células escamosas bien, moderado y pobremente diferenciado, se basará en las características propuestas por Pindborg JJ et al., 1997, detectaremos las poblaciones T reguladoras mediante marcaje de Foxp3+ y observaremos con microscopia confocal y epifluorescencia.

**Resultados:** Se analizaron 48 muestras, la edad promedio de todos los grupos de carcinoma fue 62,67 años. La mayor cantidad de infiltrado inflamatorio total promedio correspondió a COCE pobremente diferenciado (310 células), siendo

esta diferencia estadísticamente significativa respecto a mucosa sana. Se tomaron 15 muestras aleatorias de carcinoma oral, se marcaron con Foxp3 con el marcaje Alexa Flúor 488, para posteriormente ser observadas en microscopia de epifluorescencia, donde detectamos que en la mayoría de los COCE evaluados se detectó células Foxp3. Este marcaje correspondió principalmente a una localización citoplasmática.

**Conclusiones:** La mayor cantidad de infiltrado inflamatorio total se observó en muestras de pacientes diagnosticados con carcinoma oral de células escamosas pobremente diferenciado. Todos los subtipos de carcinoma oral de células escamosas presentaron mayor cantidad de infiltrado inflamatorio que la mucosa sana. Se detectaron Linfocitos T reguladores (Treg) en carcinoma oral de células escamosas y carcinoma verrucoso mediante el marcaje con inmunofluorescencia.

## **2.- MARCO TEÓRICO.**

### **2.1.- INTRODUCCIÓN**

La palabra cáncer se emplea para referirse a un grupo de más de 100 enfermedades distintas con más de 1.000 variedades histopatológicas que comparten como característica común una proliferación anormal y descontrolada de células que invaden tejidos, órganos próximos y distantes que, si no son tratadas a tiempo, ocasionan la muerte de los individuos en cuyo seno se desarrollan. El primero en hablar de cáncer fue Hipócrates y probablemente dicho término deriva del latín *cancer* que significa cangrejo, ya que el tumor se adhiere a todo lo que agarra con la misma obstinación que un cangrejo. El término carcinoma hace referencia al cáncer derivado de las células epiteliales (90% de los casos de cánceres) (Muñoz A. 1997). Hablamos de neoplasia cuando se produce una proliferación incontrolada de células somáticas producto de un cambio irreversible en las mismas. El exceso de tejido persiste aunque cese el estímulo. Las neoplasias pueden ser benignas, si son localizadas y no invaden los tejidos adyacentes ni se diseminan por el resto del cuerpo, o malignas, si invaden y destruyen tejidos y son capaces de diseminarse (Bascones A, 2004).

El cáncer es un problema mundial, del cual sólo durante el año 2008 se reportaron un gran número de nuevos casos en el mundo (American Cancer Society 2008). El cáncer oral y faríngeo posee el sexto lugar de prevalencia en el mundo (Warburton G. y cols. 2007; Warnakulasuriya S. 2010) y el tercero en zonas de alta incidencia entre todos los cánceres (Warnakulasuriya S. 2010), de los cuales el carcinoma oral de células escamosas (COCE) es el más prevalente (World Health Organization Classification of Tumours 2005; Massano J. y cols. 2006; Carvalho A. y cols. 2009; Allama E. y cols. 2011; Barros S. y cols. 2011; Binmadi N. Basile J. 2011; Poeschl P. y cols. 2011; Rodrigues F. y cols. 2012).

La causa de las lesiones premalignas y malignas en la cavidad bucal es multifactorial y dentro de éstas se encuentran los efectos combinados de factores

predisponentes y causales exógenos; como el tabaco, el alcohol, las maloclusiones, la higiene oral defectuosa, infecciones localizadas, irritación por prótesis y la exposición a las toxinas, y factores endógenos, como la herencia, las enfermedades hepáticas, la malnutrición, los factores hormonales, algunas infecciones sistémicas como la sífilis y factores de riesgo de tipo profesional, como exposición a fibras textiles, refinamiento del níquel y trabajo con madera. (Armijo Rojas R, 1986)

Existe una estrecha relación entre el cáncer y la respuesta inflamatoria que se genera en su entorno. En condiciones ideales, en una etapa temprana las funciones fisiológicas del sistema inmunitario reconocen y destruyen clones de células transformadas antes de que se conviertan en masas sólidas y provocando la lisis de los que ya se hayan formado (Abbas K.A. y cols. 2008). Resulta un objetivo teóricamente plausible apuntar en esa línea los tratamientos a futuro, de manera complementaria a las terapias actuales (Dantas E. y cols. 2010; Lundqvist L. y cols. 2012).

## ***2.2.- EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER ORAL***

De acuerdo a las estimaciones de la International Agency for Research on Cancer (IARC), en 2012 existieron 14.1 millones de nuevos casos de cáncer en el mundo; de éstos casos 8 millones son de países en vías de desarrollo. Se reporta que en este mismo año 8.2 millones de personas fallecieron por cáncer en el mundo, de los cuales 2,9 millones sucedieron en países económicamente desarrollados y 5,3 millones en países en vías de desarrollo (American Cancer Society, 2012). La sociedad americana de cáncer espera que para el año 2015, aproximadamente 1.658.370 nuevos casos con diagnóstico de cáncer, y que 589.430 americanos fallezcan por esta enfermedad (American Cancer Society, 2015). Para el año 2030 se esperan aproximadamente 21.7 millones de nuevos casos con diagnóstico de cáncer y que 13 millones fallecerán por esta enfermedad. (American Cancer Society, 2012)

El cáncer oral ha sido reconocido como una gran amenaza para la salud pública (Wang y cols, 2012). En Estados Unidos, en 2013, el cáncer oral y de faringe representaron aproximadamente el 2,5% de los nuevos casos de cáncer, y más de 7 mil americanos fallecieron por esta enfermedad (American Cancer Society 2015). De acuerdo a un estudio realizado en Chile, se reportó que la morbilidad por cáncer oral y faríngeo en Chile entre 1969 y 2002 correspondió aproximadamente al 1,6% del total de cánceres y que la tasa de mortalidad fue de 1% en Chile, que es inferior a EE.UU. (2-3%) y China (20%), afectando principalmente a hombres (2,3:1 respecto a mujeres). El 84,4% de los casos en Chile se produjo sobre los 45 años, en ambos sexos, aumentando la morbilidad progresivamente con la edad hasta los 75 años. En cuanto a mortalidad, el 74% de los casos corresponden a hombres y el 26% a mujeres (Riera P. Martínez B. 2005).

El cáncer oral y faríngeo juntos, poseen el sexto lugar a nivel mundial entre todos los cánceres (Warnakulasuriya S 2010, Warburton G y cols. 2007), y el tercero en zonas de alta incidencia (Warnakulasuriya S 2010). En relación al cáncer oral, algunos ejemplos de países con alta incidencia son: Sri Lanka, India, Pakistán, Taiwán, Hungría, Eslovaquia, Eslovenia, Cuba, Papua Nueva Guinea y otras islas del pacífico en Melanesia y en América, Brasil, Uruguay y Puerto Rico presentan una alta incidencia. (Warnakulasuriya S. 2010).

El Carcinoma de Células Escamosas (CCE), representa más del 90% de los casos de cáncer oral y orofaríngeo (Carvalho A. y cols 2009; Massano J. y cols. 2006; Rodrigues F. y cols. 2012; Allama E. y cols 2011; Binmadi N. Basile J. 2011; Lobaño S. y cols. 2011; WHO, 2005; Poeschl P. y cols. 2011). Muchos estudios reportan que el mayor número de casos de esta patología se produce después de los 45 años (Riera y Martínez, 2005). Globalmente unos 389.650 casos de CCE ocurrieron durante el año 2000; 266.672 en la cavidad oral y 122.978 en orofaringe, representando al 5% del total de cánceres en hombres y al 2% en mujeres (WHO, 2005). En nuestro país, existen pocos estudios que se refieran a la prevalencia de esta patología, pero en general se ha reportado una alta frecuencia de esta neoplasia por sobre otras en cavidad oral. El Instituto de Referencia de Patología Oral (IREPO) de la Universidad de Chile señala que el 58,6% de 728 casos de neoplasias malignas orales diagnosticadas corresponde a COCE (Rojas-

Alcayaga GG. y cols. 2010), mientras que el Instituto Nacional del Cáncer de Chile señala un 84,7% de 137 pacientes estudiados. (Bórquez M. y cols. 2011).

En la mayoría de los países de todo el mundo, el cáncer oral es más prevalente en hombres que en mujeres. Las diferencias sexuales reportadas son atribuibles a la constante indulgencia en los hábitos de riesgo por los hombres. La proporción de hombres y mujeres con diagnóstico de cáncer oral, sin embargo, ha disminuido a lo largo de las décadas y ahora está alrededor de 1,5: 1 para la boca y alrededor de 2,8: 1 para el cáncer orofaríngeo, lo que sugiere que algunas características masculinas pueden predisponer preferentemente al cáncer faríngeo. El riesgo de desarrollar cáncer oral aumenta con la edad y la mayoría de los casos ocurren en personas de 50 años o más (Warnakulasuriya S. 2009) En 2008 se observó que este tipo de cáncer representó el décimo tipo más frecuente en hombres en el mundo. (Itriago I. y cols, 2013)

### **2.3.- DEFINICIÓN DEL COCE**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define al carcinoma oral de células escamosas (COCE), también nombrado carcinoma escamoso, epidermoide o espinocelular, como una neoplasia epitelial invasiva con diferentes grados de diferenciación escamosa y una tendencia a metástasis de linfonodos temprana y extensiva, produciéndose principalmente en adultos fumadores y bebedores entre la 5<sup>ta</sup> y 6<sup>ta</sup> década de vida (World Health Organization Classification of Tumours 2005).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) el año 2005 clasificó los tumores de la cavidad oral y orofaringe, de los cuales los tumores epiteliales malignos se dividen en carcinoma linfoepitelial y carcinoma de células escamosas y este último en subtipos, tal como: Carcinoma Verrucoso, Carcinoma Adenoescamoso, Carcinoma de células escamosas Basaloide, etc. (World Health Organization (WHO), 2005).

## 2.4.- ETIOPATOGENIA DEL COCE

El COCE se origina a partir de una alteración genética a nivel de una célula llamada queratinocito oral (Scully C. Bagan J. 2009), donde se observará histológicamente, como requisito básico y fundamental, diferenciación escamosa, lo que a menudo es visto como la queratinización con formación variable de “perlas” de queratina y crecimiento invasor, este último manifestado por la ruptura de la membrana basal extendiéndose al tejido subyacente, acompañándose a menudo por una reacción del estroma. La invasión angiolinfática y perineural se consideran signos adicionales de malignidad (World Health Organization Classification of Tumours 2005).

Los cambios epiteliales que preceden al COCE son descritos como displasia epitelial, que corresponden a una definición histopatológica en la que encontramos alteraciones celulares y arquitectónicas del epitelio que tiene mayor riesgo de evolucionar a cáncer (Wenig BM. 2002; World Health Organization Classification of Tumours 2005). La **Tabla I** resume los cambios y alteraciones epiteliales desde una hiperplasia hasta un carcinoma *In situ* de acuerdo a la información entregada por la OMS (World Health Organization Classification of Tumours 2005). Para la clasificación, las características arquitectónicas, citología y atipia celular, es decir, el grado de des diferenciación, son más relevantes que el grado de queratinización en superficie. (World Health Organization Classification of Tumours 2005; Warnakulasuriya S. y cols. 2008).

<b>HIPERPLASIA</b>	Aumento del número de células ya sea en su capa espinosa (acantosis) y/o basal. Estratificación regular sin atipia celular.
<b>DISPLASIA LEVE</b>	Cambio arquitectónico limitado al tercio inferior del epitelio acompañado de atipia citológica, cumpliendo los requisitos mínimos para ser considerada displasia.
<b>DISPLASIA MODERADA</b>	El cambio en la arquitectura normal del epitelio se extiende hasta el tercio medio, acompañado de atipia citológica.
<b>DISPLASIA SEVERA</b>	Cambio arquitectónico del epitelio comprometiendo más de dos tercios del mismo con atipia celular.
<b>CARCINOMA IN SITU</b>	Células poseen características malignas pero sin invasión subepitelial. No es posible reconocer esta entidad morfológicamente, por lo que se recomienda para el diagnóstico observar lo siguiente: anomalías arquitectónicas de espesor total o casi completo, acompañadas de atipia celular pronunciada, figuras mitóticas atípicas y mitosis superficiales anormales.

---

**Tabla I:** Resumen de las alteraciones a nivel epitelial según OMS 2005. World Health Organization Classification of Tumours 2005

Las mutaciones que se generan para producir una displasia no serían las mismas que ocurren al instaurarse un proceso con características malignas. El mayor riesgo estaría dado porque al haber más mutaciones sería más probable que se desencadene la mutación puntual que lleve a malignidad a la célula. De esta manera podemos explicar cómo se puede desarrollar un carcinoma en ausencia de displasia previa (World Health Organization Classification of Tumours 2005; Warnakulasuriya S. y cols. 2008).

## **2.5.- FACTORES DE RIESGO.**

Los principales factores de riesgo para cáncer oral y orofaríngeo son consumo de tabaco y alcohol, encontrándose asociación en el 75% de los casos en EE.UU (Silverman S. 2001). Se ha reportado un mayor aumento del riesgo del desarrollo del CCE en pacientes con elevado consumo de alcohol (Wang et al. 2012; Riera P, et al, 2005; Barnes L, et al, 2005). El cáncer oral y orofaríngeo también ha sido asociado al consumo de marihuana, baja ingesta de frutas y verduras y tener sobre 45 años de edad. Referente a la edad, aunque menos frecuente, se ha observado un aumento en la frecuencia de este tipo de cáncer en adultos entre 20 y 30 años. (Silverman S. 2001). En zonas de alta incidencia (China y sur de Asia) se han reportado como factores de riesgo el consumo excesivo de pescado salado y el virus Epstein Barr. Otros factores de riesgo descritos son: radiación electromagnética, deficiencias de hierro y vitamina A, sífilis, infecciones micóticas y virales, inmunosupresión, alteraciones genéticas, variables demográficas y socioeconómicas, mala higiene oral, pero actualmente se considera el tabaco, el consumo de alcohol y el consumo de betel como los factores de riesgo más importantes (Warnakulasuriya S. 2009, Vargas-Ferreira F. y cols 2012, Neville B y cols 2002).

## **2.6.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS**

El COCE puede presentarse en cualquier lugar de la cavidad oral y los principales sitios de ubicación del tumor varían de acuerdo a factores geográficos, lo que refleja distintos factores de riesgo (Barnes y cols, 2005). Globalmente la lengua y piso de boca son los sitios más afectados y un examen detallado de la cavidad bucal resulta crucial para un diagnóstico temprano. En etapas iniciales, el COCE suele presentarse como placas blanquecinas y/o eritematosas. También Podemos encontrar pequeñas úlceras y/o tumores que dependiendo del tamaño podrían asociarse a: dolor, ulceración, dolor referido, halitosis, entre otros síntomas (World Health Organization Classification of Tumours 2005). El aspecto clínico característico es una úlcera con bordes indurados, sollevantados, con crecimiento exofítico y/o verrucoso. En lengua podemos apreciar un área roja, con nódulos o úlceras profusamente infiltrantes, lo que genera disminución en su motilidad (World Health Organization Classification of Tumours 2005). Otra característica importante a destacar del COCE en lengua es que corresponde al sitio en el cual se presenta con mayor agresividad y en el cual existe el mayor infiltrado inflamatorio, siendo aproximadamente 1.3 veces más que en otros sitios (Massano J. y cols. 2006; Lundqvist L. y cols. 2012).

Como características comunes dentro de los carcinomas orales es que pueden presentar una etapa pre invasiva, con la presencia de lesiones en cavidad oral que tienen un potencial aumentado de sufrir transformación maligna y además pueden representar un mayor riesgo del desarrollo del cáncer en cualquier lugar de la cavidad oral. (Warnakulasuriya S. y cols, 2007). Estas se pueden encontrar así durante años, pudiendo ser precursoras de un carcinoma (Mehrotra R. 2006). Estas lesiones no se asocian a una etiología identificable y corresponden principalmente a leucoplasias homogéneas, no homogéneas y eritroplasias. Las leucoplasias homogéneas usualmente se asocian con hiperplasia y solo en un 10% a 12% con displasia. El término displasia corresponde a una definición histopatológica en la que encontramos alteraciones celulares y arquitectónicas del epitelio que tiene mayor riesgo de evolucionar a cáncer. Estas lesiones no se asocian a una etiología identificable y corresponde principalmente a leucoplasias y

eritropasias. Las eritropasias y leucoplasias no homogéneas se asocian con mayor frecuencia a displasia (Wenig BM. 2002; WHO, 2005). La identificación clínica e histopatológica es subjetiva, lo que indica que la biología básica de iniciación y progresión neoplásica aún no es bien conocida (Mehrotra R., 2006).

## **2.7.- CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA.**

Desde la publicación del sistema de clasificación de Broders A. (1920) a principios del siglo XX, varios estudios han propuesto sistemas para la clasificación histológica de malignidad en CCE de cabeza y cuello. El CCE generalmente exhibe una población celular heterogénea con diferentes subpoblaciones que difieren en su potencial invasivo y metastásico. Además, pueden existir clones altamente metastásicos dentro de un tumor primario (Matos F. y cols. 2012).

El CCE se cataloga microscópicamente por un método de evaluación subjetiva que lo clasifica en: bien diferenciado, moderadamente diferenciado y pobremente diferenciado, tal como se puede observar detalladamente en la **Tabla II** (World Health Organization Classification of Tumours 2005).

El valor de esta clasificación histológica es controversial y muchos autores reconocen que este análisis aislado se correlaciona pobremente con el resultado y la respuesta al tratamiento.

Bien diferenciado	Presenta una clara diferenciación escamosa e invasión, y guarda estrecha relación con epitelio escamoso normal.
Moderadamente diferenciado	Presenta pleomorfismo y actividad mitótica importante, mitosis anormales y pérdida frecuente de queratinización
Pobrementemente diferenciado	Células predominantemente inmaduras, numerosas mitosis típicas y atípicas, mínima queratinización.

**Tabla II:** Grado de diferenciación histológico. World Health Organization Classification of Tumours 2005.

Se ha postulado que las células más agresivas residen en el frente invasivo tumoral (FIT), y muchas interacciones moleculares cruciales que aumentan o inhiben la progresión del tumor se producen en esta interfase tumor/huésped, como por ejemplo, alteraciones en la expresión de moléculas de adhesión. En este caso, se espera una mayor expresión de moléculas de adhesión en COCE bien diferenciado, donde estas células mantienen su cohesión celular y son menos invasivos que COCE pobremente diferenciado (Matos F. y cols. 2012).

## **2.8.- TRATAMIENTO**

El tratamiento del COCE es multidisciplinario, en el que participan diferentes especialistas formando comités clínicos, los cuales planifican de forma protocolizada el tratamiento de esta neoplasia. Aunque la cirugía y la radioterapia son los dos métodos más empleados, en algunos casos, sobre todo avanzados, se emplea la quimioterapia, sola o asociada a la radioterapia, la cual está dando resultados satisfactorios con las nuevas pautas de actuación (Keski-Santti H, y cols. 2006).

Actualmente, el tratamiento para el COCE se divide en intervenciones quirúrgicas con criterio oncológico, y/o no quirúrgicas (Mesa G. y cols. 2009; Sher D. y cols. 2011; Panghal M. y cols. 2012). El tratamiento quirúrgico debe ser decidido de forma individualizada, basado en un abordaje multidisciplinario, tomándose en cuenta resecciones con márgenes de seguridad y morbilidad posterior a ésta. El manejo no quirúrgico incluye radioterapia, especialmente de manera postquirúrgica, y quimioterapia, principalmente como paliativo e indicándose en neoplasias no resecables acompañado de radioterapia (Mesa G. y cols. 2009; Sher D. y cols. 2011). El seguimiento debe realizarse al menos por 5 años y con frecuencia de controles no menor a 3 meses durante los primeros 2 años y 6 meses los 3 años siguientes (Wolff K. y cols. 2012).

## **2.9.- PRONÓSTICO**

El pronóstico del COCE depende de factores relacionados con el tumor, el tratamiento y el paciente. Está generalmente aceptado que el pronóstico es mejor en carcinomas detectados tempranamente y sin metástasis. Los pacientes con COCE detectados en estadios avanzados tienen una alta tasa de mortalidad. El tratamiento tiene una gran relevancia en el pronóstico, dependiendo de si se ha logrado una resección completa del tumor en los bordes y realizado el vaciamiento ganglios. La presencia de metástasis ganglionares es uno de los factores pronósticos más importantes para el pronóstico del paciente, reduciendo la supervivencia hasta el 50% (Montoro JR y cols. 2008).

Los factores pronósticos clínicos más importantes son el tamaño del tumor, el estado ganglionar y la presencia o no de metástasis. En cuanto al grado de diferenciación histológico, un alto grado de dediferenciación (pobremente diferenciado) se relaciona con un mal pronóstico. El valor de la clasificación mejora cuando se evalúan sólo los márgenes profundamente invasivos del tumor. Los tumores invasores con bordes continuos y penetrantes son menos agresivos que aquellos que muestran un frente que se muestra no cohesivo, con propagación difusa y con pequeñas hebras o células individuales (World Health Organization Classification of Tumours 2005). Las características histológicas pueden diferir ampliamente de un área a otra dentro del mismo tumor, siendo el FIT la zona con la información pronóstica más útil y considerándose la región más representativa de la neoplasia (Arriagada O. y cols. 2010).

Los principales factores de riesgo que afectan adversamente el pronóstico son: dos o más ganglios regionales positivos, extensión extracapsular de la adenopatía o márgenes de la resección positivos. Al presentarse estos factores tendremos una mayor tasa de recurrencia, metástasis a distancia y menor tasa de supervivencia (Massano J. y cols. 2006). Otras características histológicas asociadas con mal pronóstico son: el grosor del tumor y la invasión vascular (World Health Organization Classification of Tumours 2005). Arriagada y cols. (2010) señalan que la localización de la lesión es relevante como factor

pronóstico, razón por la cual condiciones como las características del epitelio, la vascularización y el drenaje subyacente pueden estar implicadas en un mejor pronóstico en la supervivencia de los pacientes que padecen COCE (Arriagada O. y cols. 2010). No se han identificado marcadores moleculares que permitan elaborar un pronóstico inequívoco y/o de importancia predictiva (World Health Organization Classification of Tumours 2005).

Una forma de determinar el pronóstico de neoplasias malignas es utilizando la clasificación TNM. Esta evalúa: tamaño del tumor primario (T), número y ubicación de linfonodos afectados (N) y la presencia de metástasis a distancia (M), clasificándose posteriormente en etapas del I al IV (Greene F. Sobin L. 2008). Dentro de las limitaciones de esta clasificación encontramos que no considera la edad del paciente, el sitio anatómico de la lesión ni factores de riesgo presentes en el individuo que hayan podido perpetuar la lesión (Arriagada O. y cols. 2010).

Bryne y cols. (1989) publicaron el sistema de graduación del FIT que evalúa un pequeño número de variables histológicas en la zona de interfase entre el tumor y el huésped, demostrando ser útil en el pronóstico específicamente del COCE. El sistema de graduación del FIT evalúa cuatro parámetros morfológicos, otorgándole a estos parámetros valores que aumentan de manera progresiva de 1 a 4 cuanto más intenso se presente el parámetro, determinando el grado de malignidad para cada tumor. Los parámetros son: grado de queratinización, polimorfismo nuclear, patrón de invasión y respuesta inflamatoria, en la cual el patrón de invasión muestra la forma en que la neoplasia se infiltra y desarrolla hacia los tejidos adyacentes, y la respuesta inflamatoria refleja la reacción inmunológica del individuo contra la neoplasia (Arriagada O. y cols. 2010).

La disminución de la tasa de supervivencia en los tumores orofaríngeos localizados más posteriormente es conocida desde hace años, sin embargo, en la cavidad oral, la localización del tumor no es tan influyente en el pronóstico. El tamaño del tumor afecta tanto a la elección del tratamiento como al éxito. Histológicamente, la afectación de los bordes de resección es un fuerte valor predictivo (Scully C y cols. 2009; Scully C y Bagan JV. 2008; Montoro Jr y cols. 2008). En cuanto a los subtipos histológicos, el carcinoma verrucoso y el

carcinoma cuniculatum tiene mejor pronóstico que el carcinoma adenoescamoso y que el carcinoma escamoso basaloide (Pereira y cols. 2007).

El estadiaje clínico basado en TNM sería un mejor indicador pronóstico que el grado histológico (Neville B. y cols. 2002), sin embargo es menos asertivo en etapas tempranas de COCE (T1, T2). Algunos autores sugieren incluir el grosor del tumor en la evaluación, guiando el posterior tratamiento (Hubert L. y cols. 2013; Piazza C. y cols. 2014).

## **2.10.- CARCINOMA VERRUCOSO**

Dentro de los posibles tipos de CCE se encuentra el carcinoma verrucoso, que se caracteriza por ser una variante poco frecuente, bien diferenciado que fue descrito por primera vez por Lauren Ackerman en 1947, quien notó que esta lesión presentaba una apariencia morfológica característica y un comportamiento clínico específico y debería ser separada de los otros subtipos histológicos de CCE, porque aún con lesiones extensas, esta lesión tiene un excelente pronóstico con el tratamiento apropiado. (Ackerman, L., 1948)

Considerado como un carcinoma con capacidad limitada de invadir y dar metástasis, en cavidad oral, el CV representa solamente el 2% al 12% de todas las neoplasias epiteliales. Este tumor es de crecimiento lento, agresivo localmente, pero bien delimitado. Linfonodos cervicales son palpables en algunos casos y metástasis son muy poco frecuentes. (Rekha KP, et al, 2010).

El Carcinoma Verrucoso (CV) corresponde a una variante del CCE bien diferenciado con crecimiento lento, exofítico y verrucoso. El 75% de todos los casos de CV se producen en la cavidad oral (World Health Organization Classification of Tumours 2005; Cisternas A. Torrente M. 2008).

Clínicamente se puede observar una lesión exofítica, de crecimiento lento, de forma verrucosa y con etiología desconocida. El CV ha sido asociado al consumo de tabaco crónico en todas sus variedades y al virus papiloma humano, genotipos

16, 18 y, raramente, 6 y 11, que han sido asociado en aproximadamente un 40% de los casos de carcinoma verrucoso oral (CVO) (WHO, 2005). El CVO comienza como una placa blanca, bien delimitada, la cual rápidamente aumenta de espesor y se desarrollan proyecciones superficiales papilares o verruciforme. Las lesiones ocasionalmente se presentan como masas papulares eritematosas o rosadas. El color depende de la cantidad de queratina producida y el grado de respuesta inflamatoria del huésped al tumor. Esta patología casi siempre permanece con una base amplia o sésil y puede llegar a tener un crecimiento lateral bastante extenso dependiendo del momento del diagnóstico. La sobre infección por hongos es rara, sin embargo pueden ocurrir, siendo algo pedunculados. La queratosis se pueden observar en las superficies mucosas adyacentes de pacientes que mastiquen tabaco. A menos que el tumor se infecte o esté invadiendo el tejido nervioso, el CVO es una lesión asintomática. La ulceración en superficie y hemorragia no son usuales, al menos que en el tumor exista un foco de CCE (World Health Organization Classification of Tumours 2005; Cisternas A. Torrente M. 2008).

Histológicamente el CVO se presenta con invaginaciones del estroma en forma de agrupaciones papilares engrosadas y romas de epitelio escamoso bien diferenciado y con marcada queratinización. El epitelio escamoso carece de los criterios citológicos habituales de malignidad, y por morfometría las células son más grandes que las observadas en CCE. Las mitosis son raras, y se observan en las capas basales. La síntesis de ADN (fase S), también está limitada principalmente a las capas basales. CVO invade el estroma desplazando la membrana basal, en lugar de infiltrarse hacia el conjuntivo subyacente. Es posible observar microabscesos intraepiteliales, y la abundante queratina puede provocar una reacción a cuerpo extraño. En cuanto al sistema inmune, la respuesta linfocítica del hospedero ante el CVO es intensa (World Health Organization Classification of Tumours 2005; Adorno D. y cols. 2010).

Microscópicamente esta lesión está compuesta por células escamosas muy bien diferenciadas que conforman un tejido epitelial exageradamente engrosado, con una amplia base tumoral localmente invasiva y largas entrantes y salientes hacia el tejido conjuntivo subyacente con una membrana basal intacta. El epitelio muestra una alta diferenciación con poca actividad mitótica, pleomorfismo e

hipercromatismo. De cualquier manera, algunos tipos más agresivos del tumor, que son raros pueden presentar con atipias de núcleo y más frecuentemente, áreas de carcinoma en proceso de invasión, lo cual sugieren un diagnóstico menos favorable de CCE. En el estroma, frecuentemente se aprecia una reacción inflamatoria compuesta por linfocitos y células plasmáticas. (Gimenez- Conti, I et al, 1996)

La mucosa que rodea al CVO muestra una transición progresiva desde la hiperplasia hasta el CVO. Una depresión en forma de taza que a menudo rodea al tumor es el sitio ideal para realizar la biopsia. La supervivencia a 5 años con extirpación quirúrgica extensa, y sin disección de cuello, es del 80-90%, pero el 8% de los pacientes requieren al menos un procedimiento quirúrgico adicional durante ese tiempo. Los fracasos del tratamiento por lo general ocurren en los pacientes con un compromiso muy amplio de la lesión o en aquellos que no pueden tolerar la cirugía extensa, debido a enfermedades sistémicas no relacionadas con la patología cancerígena. No hay marcadores moleculares u otros que hayan demostrado importancia en el pronóstico para CV. Sin embargo, una quinta parte de estos tumores contienen un CCE coexistente que no puede ser identificado sin un extenso seccionamiento histológico. Tales tumores híbridos tienen una mayor tendencia a recidiva local y una ligera tendencia a hacer metástasis ipsilateral en el cuello (World Health Organization Classification of Tumours 2005, Candau-Alvarez, et al. 2014).

## **2.11.- INMUNOLOGÍA ANTITUMORAL Y COCE**

La relación inmunológica funcional entre respuesta inflamatoria y desarrollo del cáncer no es nueva. En 1863 Virchow planteó que el origen del cáncer estaba en las zonas de reacción inflamatoria crónica, donde la conjunción de irritantes, daño tisular e inflamación desencadenaban una respuesta proliferativa celular. Por tanto, el comportamiento neoplásico sería producto de interrelaciones huésped/tumor, relacionando la presencia de células inflamatorias con el crecimiento neoplásico. Diversos estudios han demostrado que células inflamatorias contribuirían al proceso de invasión y metástasis, sin embargo, el efecto real de la respuesta inflamatoria local ante la invasión neoplásica aún es controversial (Arriagada O. y cols. 2010).

La característica distintiva del sistema inmune es la capacidad de discriminar entre antígenos propios y antígenos ajenos. El sistema inmune debe ser capaz de mantener la tolerancia a antígenos propios y, sin embargo, ser capaz de efectuar una respuesta inmune contra patógenos y células malignas. La relación entre la tolerancia y la inmunidad es dinámica y se puede describir como los dos extremos de una escala, que deberían estar delicadamente balanceadas. La mínima predisposición hacia uno de los extremos puede conducir a las manifestaciones patológicas tales como infecciones, tumores malignos o autoinmunidad. La actividad tímica constituye el principal proceso de la tolerancia central en el que la mayoría de los linfocitos T con fuerte auto-reactividad se suprimen durante el proceso de desarrollo (105). Después de la salida del timo, las células T maduras son objeto de la selección secundaria (la tolerancia periférica) por el que la mayoría de las células T autoreactivas son eliminadas o convertidas en anérgicas (falta de reactividad) (106). Sin embargo, incluso bajo la estricta regulación de la tolerancia central y periférica, existe una evidencia que en la periferia de los individuos normales están presentes los linfocitos potenciales con el riesgo de autoreacción. (107). Las células T autorreactivas residuales pueden permanecer en estado latente, debido a la falta de coestimulación de las células presentadoras de antígenos o al aislamiento de los antígenos propios. Además de estos mecanismos pasivos, la evidencia acumulada en los últimos 15 años, indica que las células CD4+ CD25+, o linfocitos T reguladores (Treg) desempeñan un papel

importante en el mantenimiento de la auto-tolerancia periférica así como en la regulación de descenso de las diversas respuestas inmunes (108, 109). Aunque la tolerancia periférica es esencial para el adecuado funcionamiento del sistema inmunológico, una inadecuada funcionalidad de los Treg puede convertirse en un mecanismo de evasión por el cual las células tumorales evitan el reconocimiento y la destrucción por el sistema inmunológico (110). Además de los Treg, otras células con capacidad inmunosupresora presentes en los tumores se han descrito, entre ellas las células supresoras derivadas de células mieloides (MDSCs), los macrófagos asociados al tumor (TAM), las células T natural killers (NKT) y varias subpoblaciones de células dendríticas (DC) (111).

El factor más importante que influye en el pronóstico del COCE es la etapa clínica de la enfermedad al momento de confirmarse el diagnóstico (Dantas E. y cols. 2010). El crecimiento de los tumores malignos está determinado en gran parte por la capacidad proliferativa de las células tumorales y de la capacidad de invadir los tejidos del huésped y producir metástasis. La posibilidad de poder generar respuestas antitumorales comandadas por el sistema inmune ha impulsado muchos trabajos en el campo de la inmunología antitumoral (Abbas K. y cols. 2008).

La vigilancia inmunitaria es un concepto acuñado por Macfarlane Burnet en los años cincuenta y señala que una función fisiológica del sistema inmunitario es reconocer y destruir clones de células transformadas antes de que se conviertan en tumores, provocando la lisis de los que ya se hayan formado (Burnet M. 1970; Abbas K. y cols. 2008). Sin embargo, el concepto de vigilancia inmunitaria fue dejado de lado durante muchos años teniendo un renacer debido, entre otras cosas, al análisis de múltiples modelos de tumores en ratones, los cuales ya sea que presentaron o bien se les indujo una variedad de células y moléculas inmunológicamente alteradas, incluyendo subpoblaciones de linfocitos T y B, IFN- $\gamma$ , STAT1 y perforina, lograron responder frente a esta alteración, gracias al sistema inmune, quien protegió efectivamente contra el desarrollo del cáncer. Este resultado, sin embargo, plantea el cuestionamiento de por qué los organismos con sistemas inmunológicos intactos desarrollan enfermedad neoplásica (Dunn G. y cols. 2004; Uppaluri R. y cols. 2008). Como se puede observar esta relación inmunológica entre respuesta linfocitaria ante desarrollo del cáncer no es nueva y actualmente se ha retomado el concepto de

vigilancia inmunitaria a la luz de los nuevos conocimientos. Por otro lado y ahora estableciendo la relación inversa, es decir, desarrollo de cáncer ante inflamación, algunos autores señalan que el comportamiento neoplásico sería producto de interrelaciones huésped/tumor, relacionando la presencia de células inflamatorias con el crecimiento neoplásico (Abbas K. y cols. 2008). Diversos estudios han demostrado que células inflamatorias contribuirían al proceso de invasión y metástasis, sin embargo, el efecto real de la respuesta inflamatoria local ante la invasión neoplásica aún es controversial (Arriagada O. y cols. 2010). Mejorando los conocimientos respecto del efecto real de la respuesta inflamatoria ante la invasión neoplásica, un objetivo lógico y teóricamente posible, sería apuntar a la modulación del sistema inmune como línea terapéutica para destruir tumores (Burnet M. 1970; Abbas K. y cols. 2008; Arriagada O. y cols. 2010).

Tanto la infiltración de células inmunes como el patrón de inflamación en el microambiente del tumor podría contribuir a la inhibición del crecimiento tumoral, sin embargo algunos autores postulan que también podrían contribuir a la progresión y metástasis del cáncer. El infiltrado mononuclear, es decir, macrófagos, natural killer, mastocitos y linfocitos, además de eosinófilos, células endoteliales y fibroblastos corresponden al componente inflamatorio predominante en el estroma que rodea al cáncer. El número y tipo de célula que compone este infiltrado mononuclear en tumores sólidos, está relacionado con la producción local de citoquinas y otros factores quimotácticos tanto por parte del hospedero como del propio tumor (Oliveira H. y cols. 2007; Lee J. y cols. 2010).

Los recientes avances en inmunología tumoral han revelado que los “cánceres clínicos”, es decir que se encuentran ya de manera visible clínicamente, se presentan como tales después de evadir la inmunovigilancia del hospedero. Por esta razón un cáncer clínicamente visible presentará baja inmunogenicidad o bien tendrá la capacidad de atenuar la inmunidad antitumoral del hospedero. El establecimiento de este “cáncer clínico” presenta diversos grados de infiltrado linfocitario tumoral (ILT), sugiriéndose que este fenómeno correspondería a una manifestación de la respuesta inmune del huésped contra las células cancerígenas, sin embargo, el resultado clínico no parece ser dependiente del número total de ILT,

sino más bien de los variados tipos de ILT (por ejemplo, con células CD8+, linfocitos T citotóxicos (LTc), CD4+ células T helper, células NK, CD56+ células T reguladoras inmunosupresoras Foxp3). EL efecto regulador de la inmunidad de Foxp3 se basa en ser un factor regulador de la transcripción de mRNA para ciertas células reguladoras (CD4+, CD25+), favoreciendo la expresión de ellas en ausencia de Foxp3, o disminuyendo la expresión de estas células reguladoras en caso de aumentar la concentración de Foxp3 (González J. y cols. 2010). Actualmente se ha demostrado que la infiltración del tumor por células TCD8+ (que teóricamente incluye LTc) se asocia con un mejor pronóstico en varios tipos de cánceres. Estos resultados apoyan la idea de que una vez establecido el cáncer, éste se asocia con la inmunidad antitumoral teniendo este último cierta eficacia. Sin embargo, el ILT antitumoral puede llegar a afectarse una vez que se encuentra presente dentro del microambiente del tumor, incluso el ILT podría llegar a favorecer el crecimiento del tumor. Por otro lado, se ha demostrado que células T reguladoras (Treg) inmunosupresoras infiltrantes de tumor Foxp3+ se han asociado con una menor sobrevivencia, apoyando su rol en la supresión de la inmunidad antitumoral del hospedero. Estos resultados sugieren fuertemente que el equilibrio entre células efectoras y células reguladoras en el microambiente tumoral es crítico para la sobrevivencia de los pacientes (Watanabe Y. y cols. 2010).

Siendo así, se destaca la importancia de estudiar los diversos participantes inmunológicos que actúan en la respuesta anti-tumoral e inflamatoria, y uno de ellos son los Linfocitos T Reguladores que desde que fueron caracterizados existe abundante evidencia que apoya la influencia de estas subpoblaciones en las respuestas antitumorales. La modulación de la respuesta inmune reguladora se relaciona con una mayor sobrevida. En un paciente con melanoma, tratados con vacunas de células dendríticas mostraron una relación estadísticamente significativa, entre mayor sobrevida y niveles menores de linfocitos T productores de TGF-B. (López M, et al, 2009).

## 2.12.- CÉLULAS T REGULADORAS

Los linfocitos T reguladores (Treg) constituyen un grupo particular de linfocitos TCD4+, que desempeñan un rol fundamental en la mantención de la tolerancia a antígenos propios, evitan la aparición de enfermedades autoinmunes, controlan el desarrollo de una respuesta inmune exagerada o aberrante frente a agentes patógenos o frente a distintos alérgenos, ayudan a disminuir el masivo estímulo proinflamatorio de la microbiota comensal del tracto digestivo y favorecen el escape de las células tumorales al control inmunológico (Sakaguchi y col., 2006, Yamaguchi y col., 2006, Sakaguchi y col., 2008, Belkaid y Tarbell 2009). Las poblaciones celulares que son suprimidas por estos linfocitos Tregs, incluyen linfocitos TCD4+, linfocitos TCD8+, linfocitos NKT, células dendríticas (CDs), monocitos/macrófagos, linfocitos B y células natural killer (células NK) (Kim 2006, Ziegler 2006).

Los Treg desempeñan un papel importante en el control de la reactividad inmunitaria contra los antígenos propios y tienen la capacidad de inhibir las respuestas inflamatorias crónicas y mantener la tolerancia inmune en el tumor de los huéspedes portadores (Sakaguchi S. 2000). Las células Treg fueron por primera vez descubiertos por Sakaguchi (Sakaguchi S, y cols. 2000) hace más de una década y se describieron como una población menor de células T CD4+ que coexpresaron CD25. Aunque con los Treg no se puede asociar ningún marcador de superficie específico, el factor de transcripción FoxP3 (forkhead box P3) ha sido identificado como una proteína clave para el desarrollo y la función de células Treg (Hori S, y cols. 2003). Las células Treg se generan, *in vitro e in vivo*, a partir de células CD4+ T maduras bajo condiciones específicas de la estimulación del antígeno o la exposición a citoquinas (Kretschmer K, y cols. 2005). Las células Treg se pueden clasificar además sobre la base de su perfil de citoquinas sintetizado. Así, la activación crónica de los linfocitos Treg CD4+ humanos y de ratón en presencia de interleuquina (IL)-10 da lugar a las células Tr1 (T reguladoras tipo 1) con baja capacidad proliferativa que producen altos niveles de IL-10, bajos niveles de IL-2 y no produce IL-4 (Levings MK, y cols. 2001). Las células Th3 (tipo T helper 3), una población que produce un alto nivel de TGF-β,

son preferentemente inducidas por las células dendríticas en el intestino y su inducción es mayor en presencia de IL-4, el TGF- $\beta$ , IL-10, y anti-IL-12 (Carrier Y, y cols. 2007; Seder RA, y cols. 1998). Además, las células T reguladoras pueden ser derivadas de células T CD8+. También se ha identificado que el subconjunto de células CD8+ CD25+ T reguladoras comparte el fenotipo, las características funcionales y el mecanismo de acción con las células CD4+ CD25+ T reguladoras naturales (Bienvenu B, y cols. 2005).

Se ha demostrado que las células Treg son capaces de inhibir una gran variedad de respuestas inmune, tanto *in vitro* como *in vivo* (Kingsley CI y cols. 2002). A pesar de que las células Treg requieren la activación por la exposición al antígeno para iniciar las funciones supresoras, la fase efectora (de supresión) es independiente de la especificidad antigénica. Se han descrito múltiples mecanismos de represión por las células Treg, con diferencias observadas entre la supresión *in vitro* e *in vivo* y los resultados entre los distintos subconjuntos de células Treg. Las citoquinas solubles, los mecanismos dependientes del contacto célula-célula, o ambos, han demostrado que contribuyen a las actividades de supresión mediada por las células Treg. En muchos sistemas experimentales las Treg funcionan *in vivo* produciendo las citocinas inmunosupresoras IL-10 (Annacker O, y cols. 2000) y el TGF- $\beta$  (Levings MK, y cols. 2002) y por un mecanismo dependiente del contacto celular (Takahashi T, y cols. 1998). Estas células expresan un alto nivel de GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor) y las moléculas FoxP3 y median la supresión inmune a través de un mecanismo de contacto célula-célula (Hori S, y cols. 2005; Sakaguchi S, y cols. 2001).

En la actualidad, el marcador más confiable para definir y aislar linfocitos Tregs es el factor de transcripción Foxp3 (Fontenot y col., 2003, Hori y col., 2003, Khattri y col., 2003). La expresión de Foxp3 se encuentra altamente restringida a linfocitos T $\alpha\beta$ , siendo casi indetectable en linfocitos T $\gamma\delta$ , linfocitos B, células NK, macrófagos y células dendríticas. Aún, cuando la expresión de Foxp3 parece restringida a linfocitos T CD4+, existen linfocitos T CD8+ que también pueden expresar este factor de transcripción (Vergara, U. 2009).

En CCE se observó que pacientes con cáncer escamoso de cabeza y cuello tuvieron aumentados los niveles de células Treg con respecto a individuos controles. (Bouceck J. et al, 2009) Recientemente se ha publicado un artículo en que la cantidad de linfocitos T y células de Langerhans está aumentada en leucoplasias con diagnóstico histopatológico de displasia intraepitelial en comparación a tejidos sanos y este aumento es drásticamente mayor en CCE. (Ohman J. et al, 2012) Por otra parte, se han observado diferencias en la cantidad de linfocitos Tregs Foxp3+, entre los grados histológicos del CCE, donde carcinomas bien diferenciados mostraron una baja expresión significativa de células Treg FoxP3+ en comparación con los tumores moderadamente y pobremente diferenciados, existiendo una correlación lineal significativa entre el grado del tumor y la cantidad de linfocitos infiltrantes de tumor. (Dalal Al-Qahtani et al, 2011, Biron C A. et al, 1999, Imanquli M M. et al, 2014).

Por lo tanto, comprender la etiopatogenia del COCE a nivel celular y molecular, su relación tanto cuantitativa como cualitativa con el sistema inmune y de qué manera estas células se relacionan entre sí resulta crucial para llevar a cabo estas nuevas líneas de tratamiento.

### **2.13.- MECANISMOS DE EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL MEDIADOS POR CÉLULAS T REGULADORAS.**

Según North y col. (North RJ, y cols. 1990.) las células Treg pueden desempeñar un papel significativo en la supresión de la inmunidad antitumoral. Aunque el origen de las células Treg tumorales sigue siendo poco estudiado, parece que pueden surgir a partir de la activación por antígenos de las células T CD4+CD25- en el medio de la supresión inmune derivada de la acción de las citoquinas en el sitio de localización de tumor (Dieckmann D, y cols. 2002). El papel de las células Treg en la inmunidad antitumoral ha sido evaluado en un modelo murino de tumor poco inmunogénico, donde se encontraron pruebas de que las células Treg impiden una eficaz inmunovigilancia tumoral, inhiben las respuestas inmunes antitumorales inducidas y promueven la progresión tumoral (Turk MJ. 2004). La existencia de la supresión inmunitaria mediada por las células T CD4+ también se ha demostrado en los cánceres humanos (Chakraborty NG, y cols. 1990). Así, la eliminación de células T CD4+CD25 + por un anticuerpo anti-CD25 en modelos animales provoca una mayor respuesta antitumoral (Tanaka H, y cols. 2002, Casey S. y cols. 2014). Recientemente, el aumento de las proporciones de células Treg se han detectado en varios pacientes con diferentes tipos de cánceres, incluidos los de pulmón, de mama y los tumores de ovario (Seder RA, y cols. 1998), demostrando que las células Treg suprimen la proliferación de las células T CD4+ e inhiben la secreción de IL-2 por las células CD4+ efectoras bajo la activación específica del tumor. (Casey S. y cols. 2014.)

Varios linajes celulares han sido objeto de investigación con el fin de determinar la mejor forma de suprimir la tolerancia inmune inducida por el tumor. Uno de los linajes más importantes, son los Treg. Por lo tanto, una estrategia para modular los efectos de la tolerancia inmune puede ser la reducción de células Treg en pacientes con cáncer.

En estudios previos por el SAP de la FOUCH se encontró un aumento significativo de infiltrado inflamatorio en los diferentes grados de diferenciación celular del carcinoma oral de células escamosas, carcinoma verrucoso y los

diferentes subtipos de carcinoma, lo que indica un aumento de la respuesta inflamatoria ante este tipo de enfermedades.

Diversos protagonistas de la respuesta inmune están implicados en el desarrollo y pronóstico de los pacientes con cáncer, una de ellas son los linfocitos T reguladores, células implicadas en suprimir una potente e ideal respuesta anti-tumor y han sido descritas como fundamentales en la progresión tumoral. Sin embargo, hay poca evidencia del rol que tendrían estas células en el cáncer oral por lo que se torna necesario generar mayor información sobre los diferentes protagonistas en la progresión del carcinoma, para lograr mayor precisión en el pronóstico y mayores herramientas en la búsqueda de terapias anti tumor.

### **3. HIPÓTESIS**

Estudios en nuestro grupo, han encontrado un significativo aumento del infiltrado inflamatorio en respuesta a la agresión tumoral, en biopsias de pacientes con COCE. Considerando estos antecedentes postulamos que:

**Detectaremos la presencia de linfocitos T reguladores dentro del infiltrado celular inflamatorio presente en el carcinoma oral de células escamosas.**

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

**Detectar la presencia de linfocitos T reguladores en carcinoma oral de células escamosas, carcinoma verrucoso y mucosa oral sana.**

## **5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar la cantidad de infiltrado inflamatorio en carcinoma oral de células escamosas
- Determinar la cantidad de infiltrado inflamatorio en carcinoma verrucoso oral
- Determinar la cantidad de infiltrado inflamatorio en tejido sano
- Comparar la cantidad de infiltrado inflamatorio en los diferentes subtipos de carcinoma con mucosa normal.
- Montaje de la técnica de inmunofluorescencia, y estandarización del protocolo para muestras incluidas en parafina.
- Detectar la presencia de linfocitos T reguladores en carcinoma oral de células escamosas, mediante marcaje con inmunofluorescencia para FoxP3
- Detectar la presencia de linfocitos T reguladores en carcinoma verrucoso, mediante marcaje con inmunofluorescencia para Foxp3
- Detectar la presencia de linfocitos T reguladores en mucosa sana, mediante marcaje con inmunofluorescencia para Foxp3

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1.- TIPO DE ESTUDIO**

El diseño de este estudio será de tipo observacional analítico de corte transversal.

### **6.2.- FUENTE DE INFORMACIÓN**

Desde la base de datos del Servicio de Anatomía Patológica (SAP), del departamento de Patología y Medicina Oral, de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (FOUCH), se seleccionaron muestras con diagnóstico histopatológico a partir de las palabras claves: “carcinoma oral de células escamosas”; “carcinoma espinocelular”; “carcinoma de células escamosas”; “carcinoma epidermoide”; “carcinoma verrucoso”; “mucosa sana”, entre los años 1985 y 2013.

### **6.3.- DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA**

Se seleccionaron un total de 48 muestras de biopsias incisionales. De las cuales, 11 muestras tuvieron diagnóstico histopatológico de carcinoma oral de células escamosas (COCE) bien diferenciado, 10 muestras de COCE moderadamente diferenciado, 10 muestras de COCE pobremente diferenciado, 11 muestras de carcinoma verrucoso (CV) y 6 muestras de mucosa oral sana. Estas últimas correspondientes a muestras con características clínicas de una lesión sospechosa que ameritaba una biopsia, pero que bajo el análisis histopatológico correspondió a mucosa oral sana. Estos diagnósticos fueron reconfirmados antes de comenzar su procesamiento y analizados según la Clasificación de la Organización Mundial de la Salud del 2005 por un Patólogo Oral (WHO Classification of tumours 2005).

#### **6.4.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN:**

- Muestras de mucosa oral con diagnóstico de COCE bien, moderadamente y pobremente diferenciado.
- Muestras de mucosa oral con diagnóstico de carcinoma verrucoso.
- Muestras de mucosa oral sana.

#### **6.5.- CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:**

- Muestras con localización anatómica de paladar blando y labio.
- Muestras con tejido insuficiente para ser procesado.
- Muestras sin fichas clínicas o con información insuficiente en ellas.
- Muestras que en el proceso de confirmación diagnóstico histopatológico, éste no coincidió con el diagnóstico inicial.

## **6.6.- RECUENTO LINFOCITARIO**

El procesamiento y análisis histopatológico de las muestras se llevó a cabo en el Servicio de Anatomía Patológica del Departamento de Patología y Medicina Oral de la FOUCH (SAP).

El análisis histopatológico de confirmación diagnóstica se realizó bajo microscopía óptica en cada una de las 48 piezas histológicas seleccionadas, todas ellas fijadas en formalina e incluidas en parafina, presentes y registradas en el SAP de la FOUCH. Cada una de las piezas fue cortada con micrótomo de rotación para obtener una muestra de 4µm. Posteriormente se realizó el desparafinado (xileno 2x10 min), hidratación (etanol 100° 2x10 min, etanol 95° 2x5 min, etanol 70° 10 min, agua corriente 10 min), tinción (Hematoxilina de Harris 2 min, agua corriente 15 min, eosina 1 min, agua corriente 10 min), deshidratación (etanol 70° 1 min, etanol 95° 2x1min, etanol 100° 2x2 min) xileno 2x5 min y el montaje final. El análisis histológico fue realizado por un Patólogo Oral.

Todas las muestras fueron observadas a través de microscopía óptica. Se realizaron fotos de las muestras en HE de 10X y 40X para confirmar el diagnóstico.

Para el recuento linfocitario cada muestra fue recorrida para seleccionar la zona próxima al tumor que representara mayor infiltrado inflamatorio.

Para cada una de estas zonas se tomó 2 fotos al 40X, por cada foto se tomó un área que representara la mayor cantidad de infiltrado inflamatorio, por medio del programa "Paint". Posteriormente, se realizó manualmente, el conteo de cada célula del infiltrado inflamatorio marcada en el área seleccionada. Para esto se consideró como área total de trabajo solamente la zona de tejido conjuntivo, la cual se descontó del área total de la foto (4.940.000 pixeles), que contemplaba zonas de tejido neoplásico y zonas con poca muestra. Lo anterior se hizo para comparar de manera más equitativa, sólo el tejido conjuntivo.

Para simplificar las comparaciones entre grupos y muestras, se dividió la sumatoria del área total de trabajo (por foto), por el área total por foto (4.940.000 pixeles), lo que nos permitió obtener el área final de trabajo por muestra.

Al dividir la cantidad total de células del infiltrado inflamatorio por el área final de trabajo, obtuvimos la cantidad de células del infiltrado inflamatorio por foto, lo que permitió realizar las comparaciones correspondientes.

### ***6.7.- RECOLECCIÓN DE DATOS.***

El procesamiento y análisis histopatológico de las muestras se llevó a cabo en el laboratorio de anatomía patológica del Departamento de Patología y Medicina Oral de la FOUCH.

El análisis histopatológico de confirmación diagnóstica se realizó bajo microscopía óptica en cada una de las 50 piezas histológicas seleccionadas, todas ellas fijadas en formalina e incluidas en parafina, presentes y registradas en el SAP de la FOUCH. Cada una de las piezas fue cortada con micrótopo de rotación para obtener una muestra de 4µm. Posteriormente se realizó el desparafinado (xileno 2x10 min), hidratación (etanol 100° 2x10 min, etanol 96° 10 min, etanol 80° 10 min, agua corriente 10 min), tinción (Hematoxilina 3 min, agua corriente 15 min, eosina 30 seg, agua corriente 10 min), deshidratación (etanol 80° 10 min, etanol 96° 10 min, etanol 100° 2x10 min) xileno 2x10 min y el montaje final. El análisis histológico fue realizado por un observador que es patólogo oral.

## **6.8.- TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA**

Se seleccionaron muestras en linfonodo y tejido sano para estandarizar la técnica. Para la detección en cáncer propiamente tal se seleccionaron 15 muestras de pacientes con carcinoma oral, y de esta forma detectar al factor transcripcional Foxp3 en el infiltrado linfocitario.

Las muestras de pacientes seleccionadas corresponden a: diez carcinomas orales de células escamosas, cinco de carcinoma verrucoso. Los controles fueron cinco correspondientes a linfonodos y cinco de mucosa oral control sano.

Las biopsias inmersas en los bloques de parafina fueron cortadas en secciones de 3  $\mu\text{m}$  de espesor con un micrótopo de rotación Reichert-Jung. Luego, se montaron sobre portaobjetos silanizados (3-aminopropiltrieoxisilano, Polysciences, Inc., USA). Posteriormente, los portaobjetos con las muestras se llevaron a la estufa de secado por una hora a 60° C y toda la noche a 37°C.

Para la desparafinización de las muestras se incubaron en una estufa a 60°C por 90 minutos y luego se sometieron a un tren de alcoholes. La batería de deshidratación y rehidratación estaba compuesto por dos baños de xilol por cinco minutos cada uno. A continuación, las muestras se dejaron por dos minutos cada paso en un tren de alcoholes 100%, 96%, 70%, 50%, 25% y agua destilada por diez minutos.

Una vez desparafinadas las muestras, se dejaron en un copler con 50 ml de buffer EDTA 1mM a pH 8 por 20 minutos a 96°C en una vaporera precalentada. Luego, las muestras se retiraron del calor húmedo y se incubaron por cinco minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se realizaron dos lavados con agua bidestilada, dos lavados con PBS 1X y un lavado con PBS – Tritón al 0,3% durante cinco minutos cada uno.

Luego de la recuperación antigénica, se delimitaron los cortes con lápiz hidrófobo (EmmEdge™ Pen, Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, Cat. No H-4000) y se incubaron con una gota de glicina 100 mM por diez minutos. Posteriormente, se agregó una gota de solución de bloqueo (Protein Block Serum-Free Ready-To-Use, Dako) por corte y se dejó incubar a temperatura ambiente por diez minutos.

A los cortes se les adicionaron 50 µl de solución de anticuerpo primario a concentración 1:40 de FoxP3 (Anti-hFoxP3, hFoxp3 Affinity purified Goat IgG, Catalog Number AF3240, R&D Systems) y se incubaron en cámara húmeda a 4°C durante la noche.

Al día siguiente, los cortes se lavaron tres veces con PBS- Tritón al 0,3% por cinco minutos cada lavado. Luego, las muestras se incubaron con 50 µl de anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, USA) a 4°C durante una hora.

A continuación, se realizaron tres lavados con PBS – Tritón al 0,3% por cinco minutos cada vez. Luego, se agregaron 50 µl del marcador nuclear DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) a concentración 1:50.000 diluido en PBS – Tritón y se incubaron durante un minuto a temperatura ambiente.

Luego se realizaron dos lavados con PBS – Tritón al 0,3% por cinco minutos cada uno, dos lavados con PBS 1X por cinco minutos cada uno y por último dos lavados con agua bidestilada.

Se secaron los portaobjetos sin dañar la muestra y se agregó el medio de montaje (Fluorescent Mounting Medium Dako), para dejar a 4°C y se visualizaron al día siguiente.

La observación de muestras fue realizada en un microscopio de epifluorescencia y la documentación fotográfica se realizó con el software Nis Elements. Se utilizó un microscopio invertido motorizado en eje Z modelo Eclipse Ti – E (Nikon).

La cuantificación de la marca se realizó con la obtención de tres campos visuales por sección observada. Para cada campo, se utilizó una imagen con cada filtro de longitud de onda, una correspondiente al filtro azul para DAPI y otra correspondiente al filtro verde para Alexa Flúor 488.

El procesamiento y cuantificación de la intensidad de la fluorescencia de las imágenes se llevó a cabo con el software Image J (función analyse/ measure).

Cada determinación se normalizó con respecto al control negativo de la técnica, a través del uso de anticuerpos control de Isotipo. La cantidad relativa de la fluorescencia de cada paciente y sujetos controles analizados fueron graficados y se realizó un análisis de la relación entre los valores promedios o la medianas (según la distribución paramétrica o no paramétrica de los datos) del grupo de pacientes analizados versus el grupo control a través del programa GraphPadPrism 5 y el análisis estadístico t-Test or Mann Whitney Test según corresponda. Se consideraron diferencias significativa para un  $p \leq 0,05$ .

#### **6.9.- VARIABLES DE ESTUDIO**

- Carcinoma oral de células escamosas
- Carcinoma verrucoso oral.
- Mucosa sana

### **6.10.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se realizó un análisis exploratorio de los datos mediante análisis de normalidad de la curva a través de la prueba Shapiro Wilk. Una vez que las muestras no tenían distribución normal se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney U-Test para comparar la cantidad de células inflamatorias entre los grupos. Además, los datos recolectados de edad, sexo y localización de la muestra fueron analizados mediante estadística descriptiva y T-student para caracterizar la muestra. El análisis estadístico se realizó utilizando el software Stata 11.0. Se consideraron significativas las diferencias con los valores  $p < 0.05$ .

### **6.11.- ASPECTOS ÉTICOS Y BIOSEGURIDAD**

Este estudio adscrito al proyecto FIOUCH 13-008: “Relación entre linfocitos T reguladores y natural killer en el infiltrado linfocitario de carcinoma de células escamosas”, el cual fue aprobado por el Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Anexo n° 3) y por el Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) de la Universidad de Chile, administración conjunta Campus Norte (Anexo n°3). Toda información respecto a los pacientes de este estudio se mantuvo en absoluta confidencialidad y respeta los principios de la declaración de Helsinki para la investigación con seres humanos.

## **7. RESULTADOS**

### **7.1 DATOS CLÍNICOS DE LAS MUESTRAS**

Un total de 48 muestras del SAP de la FOUCH cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión, correspondientes a los diagnósticos histopatológicos confirmados de mucosa sana (MS), carcinoma verrucoso (CV), carcinoma oral de células escamosas bien diferenciado (COCE BD), carcinoma oral de células escamosas moderadamente diferenciado (COCE MD) y carcinoma oral de células escamosas pobremente diferenciado (COCE PD).

De las 48 muestras del estudio, 52,1% (n=25) correspondieron al género femenino y 47,9% (n=23) al género masculino. La edad promedio de las muestras analizadas fue 61,7 años. El promedio de edad para el género femenino fue de 63 años aproximadamente, mayor que la del género masculino que fue de 61 años aproximadamente, pero sin diferencia significativa ( $p=0,7387$ ).

El promedio de edad de los subtipos de cáncer fue 63.5 años. Para COCE pobremente diferenciado se observó que el género más afectado fue el masculino con un 80%, siendo 4 veces mayor que el femenino (20%). Para COCE bien diferenciado y el CVO se observó que el género más afectado fue el femenino con 63,6% y 72,7% respectivamente; en tanto que para COCE moderadamente diferenciado no existió diferencia en el número de casos por género. En la **Tabla 1** podemos observar los promedios de edad y cantidad de pacientes según sexo para las muestras de MS, CV, COCE BD, COCE MD y COCE PD. (**Tabla 1**).

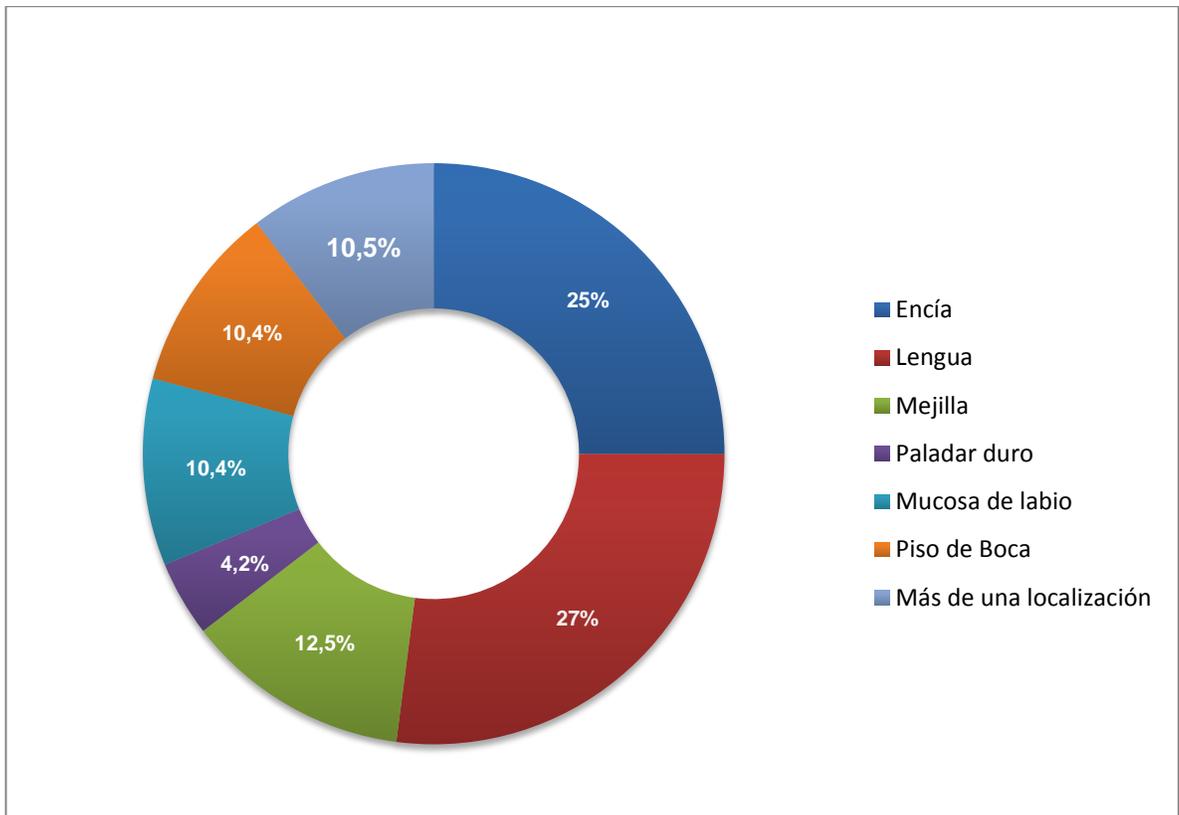
	<b>MS</b>		<b>CV</b>		<b>COCE BD</b>		<b>COCE MD</b>		<b>COCE PD</b>		<b>Total</b>	
	<b>n=6</b>		<b>n=11</b>		<b>n=11</b>		<b>n=10</b>		<b>n=10</b>		<b>n=48</b>	
	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Género</b>												
Masculino	3	50	3	27,3	4	36,4	5	50	8	80	23	47,9
Femenino	3	50	8	72,7	7	63,6	5	50	2	20	25	52,1
<b>Promedio de edad</b>												
Mujeres												
Hombres	41,6 años		72,5 años		67 años		62,6 años		37,5 años		62,5 años	
	53 años		67 años		54,5 años		62 años		63,8 años		60,8 años	

**Tabla 1.** Características del total de la muestra según género y edad promedio.

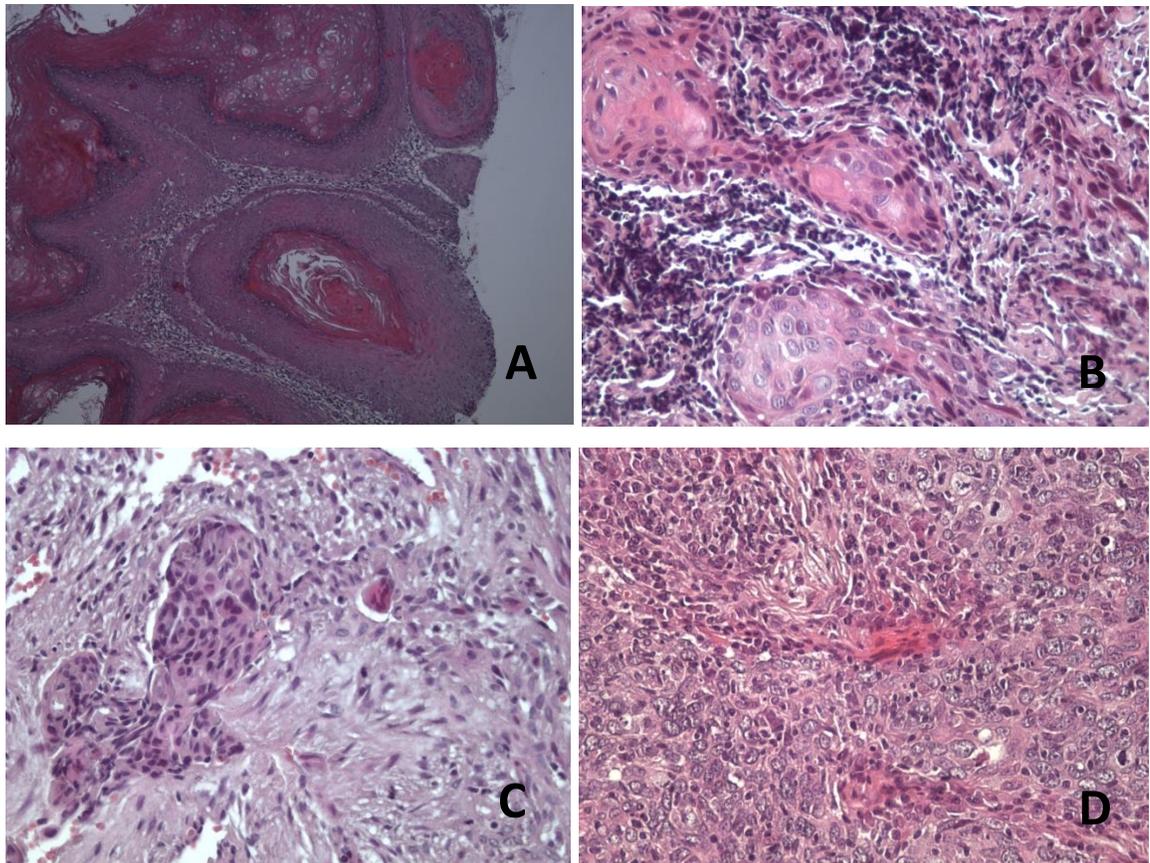
Dentro de las localizaciones del total de la muestra (**Tabla 2**), la lengua con el 27% (n=13) destaca como el sitio más frecuente, seguido de encía con el 25% (n=12). El 10,5% (n=5) de las muestras presentan más de un sitio afectado (**Gráfico 1**).

	MS n=6		CV n=11		COCE BD n=11		COC MD n=10		COCE PD n=10		Total n=48	
	N	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>Localización</b>												
Encía	0	-	6	54,5	2	18,2	2	20	2	20	12	25
Lengua	1	16,7	1	9,1	6	54,5	3	30	2	20	13	27
Mejilla	0	-	1	9,1	1	9,1	2	20	2	20	6	12,5
Mucosa labio	5	83,3	0	-	0	-	0	-	0	-	5	10,4
Paladar duro	0	-	0	-	1	9,1	0	-	1	10	2	4,2
Piso de boca	0	-	1	9,1	0	-	2	20	2	20	5	10,4
Piso de boca / Lengua	0	-	0	-	0	-	0	-	1	10	1	2,1
Encía y Piso de boca	0	-	0	-	1	9,1	1	10	0	-	2	4,2
Encía / Paladar duro	0	-	2	18,2	0	-	0	-	0	-	2	4,2

**Tabla 2.** Localización del total de muestras según su diagnóstico.



**Gráfico 1.** Localización del total de la muestra de carcinoma oral de células escamosas, carcinoma verrucoso y mucosa sana.



**Figura 1. CONFIRMACIÓN HISTOPATOLÓGICAS DE LAS MUESTRAS**  
Microfotografías de muestras teñidas con H&E obtenidas bajo microscopio óptico. A: Muestra de 10X de Carcinoma verrucoso; B: Muestra de 40X de COCE bien diferenciado; C: Muestra de 40X de COCE moderadamente diferenciado; D: Muestra de 40x de COCE pobremente diferenciado.

## 7.2.- DATOS CLÍNICOS DE MUCOSA SANA (MS)

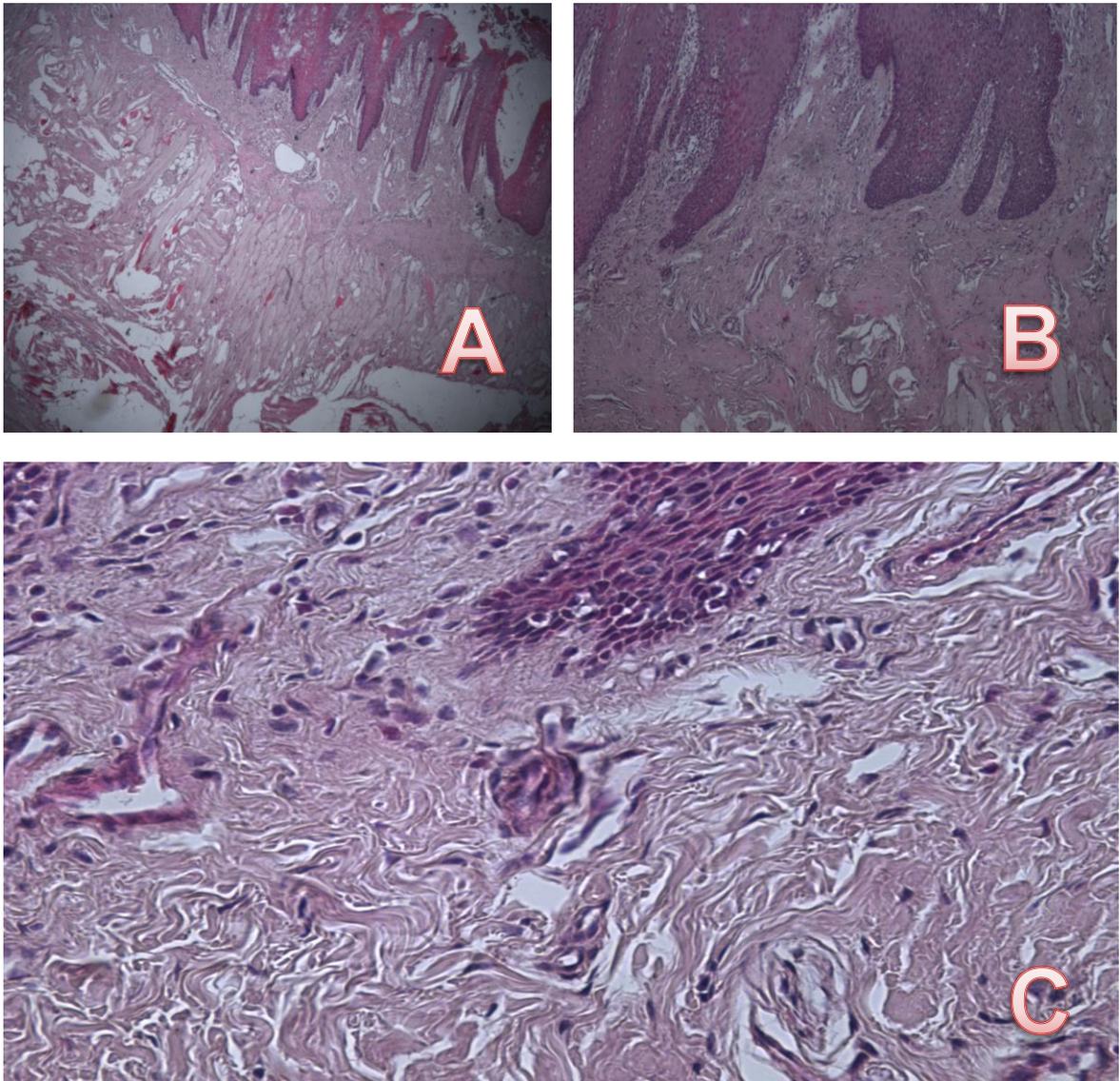
Las 6 muestras analizadas de MS arrojaron una razón entre el género masculino y el femenino de 1:1, una edad promedio de 47,3 años y una mayor localización en Mucosa de labio. (Tabla 3)

NÚMERO DE MUESTRA	GÉNERO	EDAD	LOCALIZACIÓN
1	M	76	MUCOSA LABIO
2	F	61	MUCOSA LABIO
3	F	34	LENGUA
4	M	36	MUCOSA LABIO
5	M	47	MUCOSA LABIO
6	F	30	MUCOSA LABIO

**Tabla 3:** Resumen de datos clínicos de 6 pacientes con MS obtenidos en la base de datos del SAP entre los años 1985 y 2014.

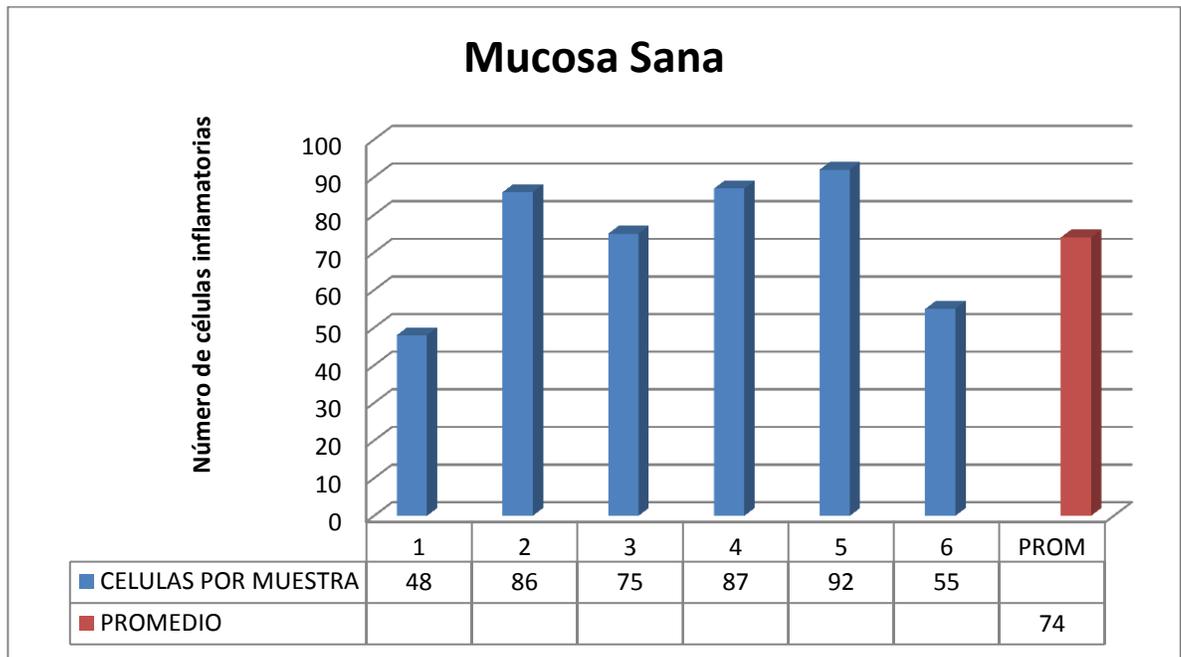
### 7.3.- CANTIDAD DE INFILTRADO INFLAMATORIO TOTAL EN MS

Las muestras de MS, fueron observadas bajo microscopía óptica como se ejemplifica en la Figura 2, realizando posteriormente la cuantificación del infiltrado inflamatorio total como fue descrito en la sección materiales y métodos.



**Figura 1:** Microfotografías obtenidas bajo microscopio óptico de muestras de tejido sano oral teñidas con H&E. A: 4X Se observa tejido conjuntivo con características morfológicas conservadas y una pequeña zona de tejido epitelial en la zona superior derecha de la microfotografía.; B: 10X Tejido conjuntivo normal, presencia de vasos sanguíneos de menor calibre; C: 40X Bajo inmersión se aprecian células endoteliales, fibroblastos y presencia de células inflamatorias.

La cuantificación del infiltrado inflamatorio total para MS arrojó un promedio de 74 células a 40X por muestra (Gráfico 2).



**Gráfico 2:** Cantidad de infiltrado inflamatorio total en muestras de MS. Los números 1 al 6 corresponden a diferentes muestras de pacientes con este diagnóstico histopatológico.

#### 7.4.- DATOS CLÍNICOS EN CARCINOMA VERRUCOSO (CVO)

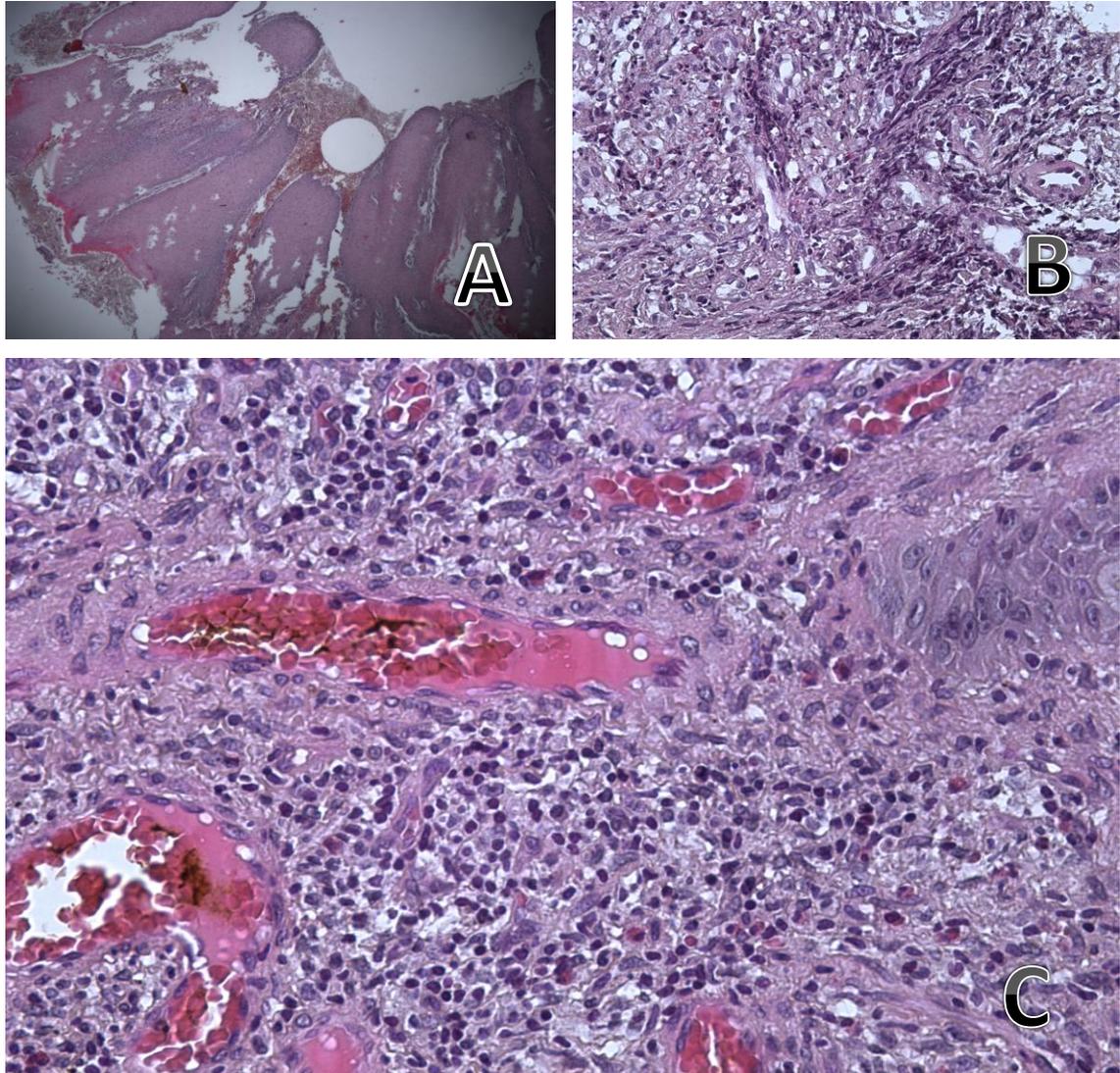
Las 11 muestras analizadas de CVO arrojaron una razón entre el género masculino y el femenino de 3:8, una edad promedio de 71 años y una mayor encía (Tabla 4).

NÚMERO DE MUESTRA	GÉNERO	EDAD	LOCALIZACIÓN
1	M	56	ENCIA
2	F	68	ENCÍA
3	M	68	ENCÍA/PALADAR DURO
4	F	73	ENCIA
5	M	77	PALADAR DURO/ENCÍA
6	F	75	ENCÍA
7	F	79	ENCÍA
8	F	68	LENGUA
9	F	67	PISO DE BOCA
10	F	83	ENCIA
11	F	67	MEJILLA

**Tabla 4:** Resumen de datos clínicos de 11 pacientes con CVO obtenidos en la base de datos del SAP entre los años 1985 y 2014.

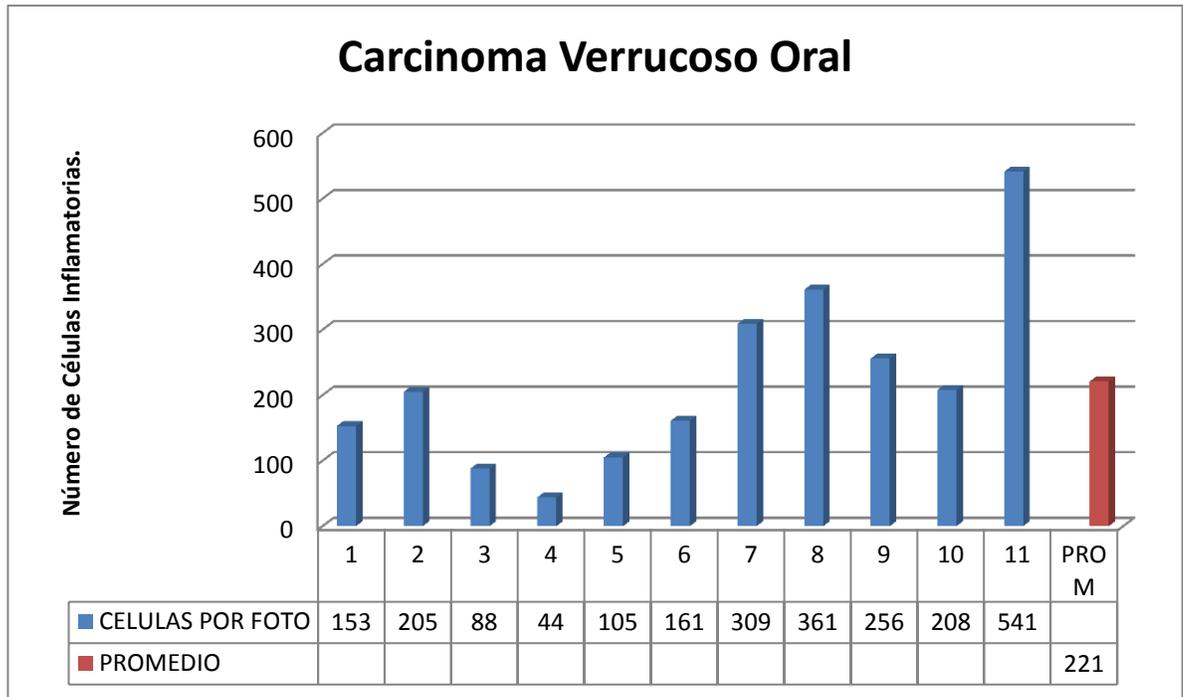
### 7.5.- CANTIDAD DE INFILTRADO INFLAMATORIO TOTAL EN CVO

Las muestras de CVO, fueron observadas bajo microscopía óptica como se ejemplifica en la Figura 3, realizando posteriormente la cuantificación del infiltrado inflamatorio total como fue descrito en la sección materiales y métodos.



**Figura 3:** Microfotografías obtenidas bajo microscopio óptico de muestras de Carcinoma verrucoso oral teñidas con H&E.; A: 4X Se observan proyecciones típicas de este tipo de cáncer, sin invasión directa sobre el conjuntivo subyacente ya que la membrana basal se observa intacta, bajo ésta se observan vasos sanguíneos pequeños grupos de infiltrado inflamatorio. B: 10X células de defensa, se puede observar tejido neoplásico y vasos sanguíneos de diverso calibre C: 40X bajo inmersión se aprecian células tumorales con aumento de infiltrado inflamatorio.

La cuantificación del infiltrado inflamatorio total para CVO arrojó un promedio de 221 células a 40X por muestra. Se observan muestras que escapan fuertemente del promedio con valores sobre 500 células y bajo 100 células. (Gráfico 3).



**Gráfico 3:** Cantidad de infiltrado inflamatorio total en muestras de CVO. Del número 1 al 11 corresponden a diferentes muestras de pacientes con este diagnóstico histopatológico.

## 7.6.- DATOS CLÍNICOS EN COCE BIEN DIFERENCIADO

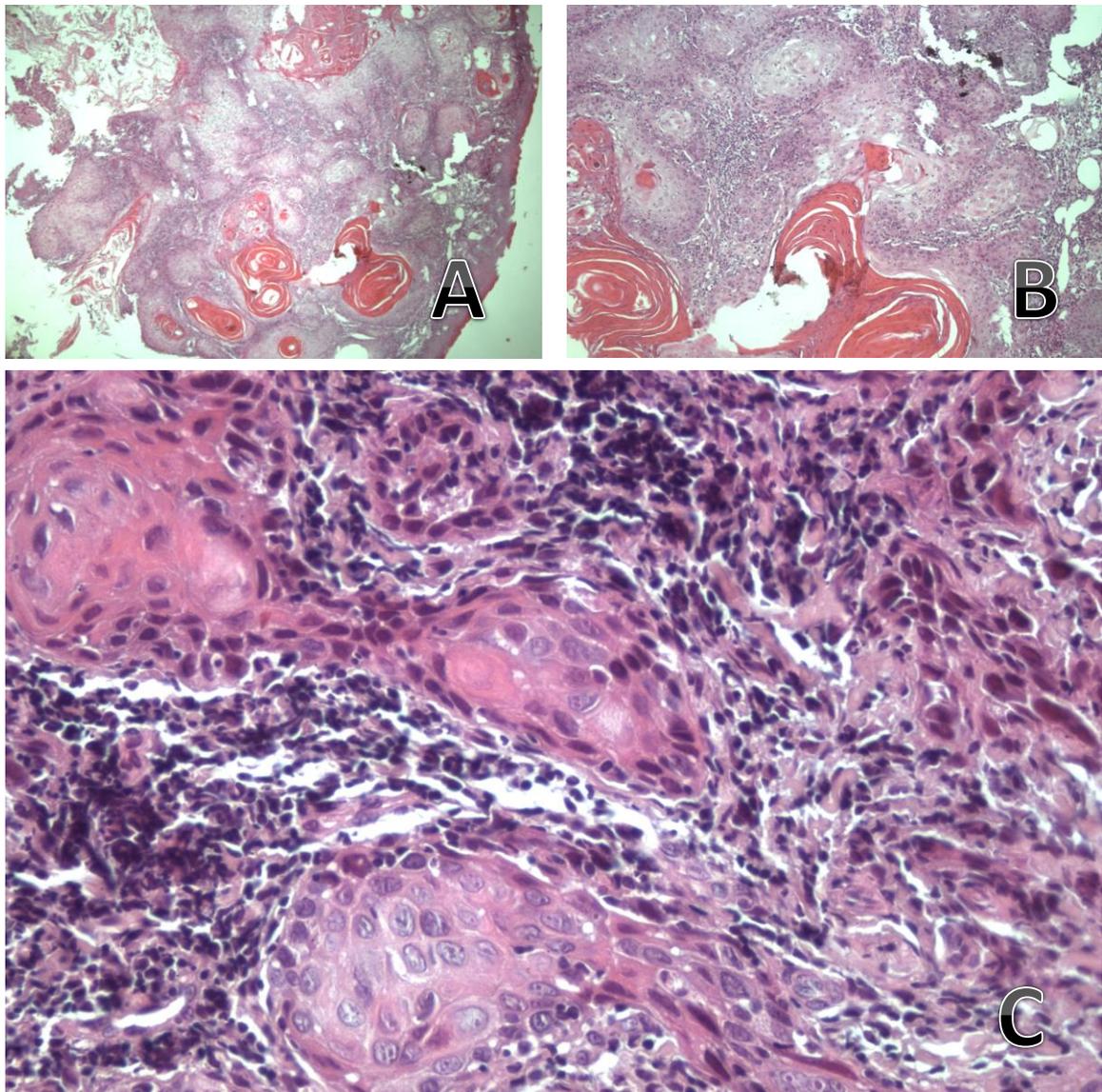
Para COCE bien diferenciado se observaron 11 muestras cuyos datos clínicos fueron resumidos en la Tabla VIII obteniéndose una razón entre el género masculino y el femenino de 4:7, una edad promedio de 56,8 años y una mayor localización en lengua con el 55% de los casos. (Tabla 5)

NÚMERO DE MUESTRA	GÉNERO	EDAD	LOCALIZACIÓN
1	F	83	LENGUA
2	F	66	LENGUA
3	M	53	ENCÍA
4	F	89	MEJILLA
5	M	54	LENGUA
6	F	54	LENGUA
7	M	55	LENGUA
8	M	56	PALADAR DURO
9	F	57	LENGUA
10	F	59	ENCÍAREBORDE Y PISO DE BOCA
11	F	61	ENCIA

**Tabla 5:** Resumen de datos clínicos de 11 pacientes con COCE bien diferenciado obtenidos en la base de datos del SAP entre los años 1985 y 2014.

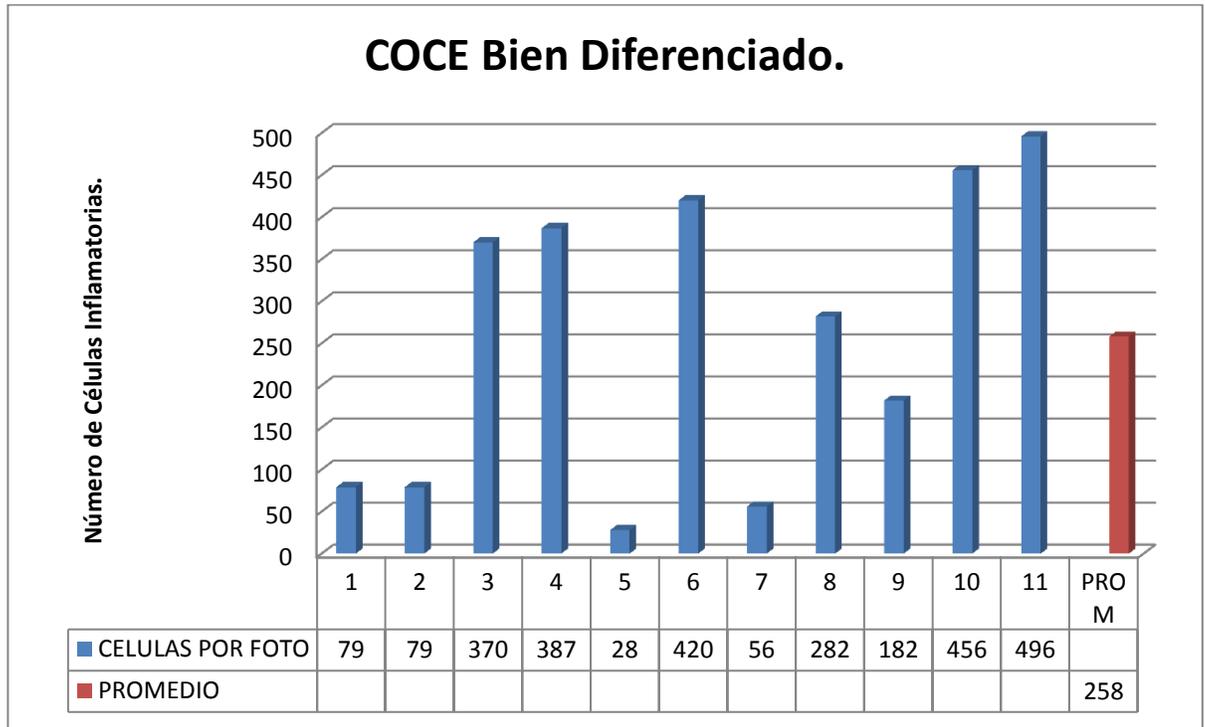
### **7.7.- CANTIDAD DE INFILTRADO INFLAMATORIO TOTAL EN COCE BIEN DIFERENCIADO**

Las muestras de COCE bien diferenciado, fueron observadas bajo microscopía óptica como se ejemplifica en la figura 4, cuantificando la cantidad de infiltrado inflamatorio total como fue descrito en la sección materiales y métodos.



**Figura 4:** Microfotografías obtenidas bajo microscopio óptico de muestras de COCE bien diferenciado teñidas con H&E. A: 4X es posible observar masas tumorales infiltrándose en el tejido; B: 10X es posible apreciar la infiltración linfocítica tumoral (ILT) acompañada de masas tumorales; C: 40X bajo inmersión se observan células inflamatorias en los sectores de interfase tumor/tejido conectivo con gran cantidad de infiltrado inflamatorio.

La cuantificación del infiltrado inflamatorio total para COCE bien diferenciado arrojó un promedio de 258 células a 40X por muestra (Gráfico 4).



**Gráfico 4:** Cantidad de infiltrado inflamatorio en muestras de COCE bien diferenciado. Del número 1 al 11 corresponden a diferentes muestras de pacientes con este diagnóstico histopatológico.

### 7.8.- DATOS CLÍNICOS EN COCE MODERADAMENTE DIFERENCIADO

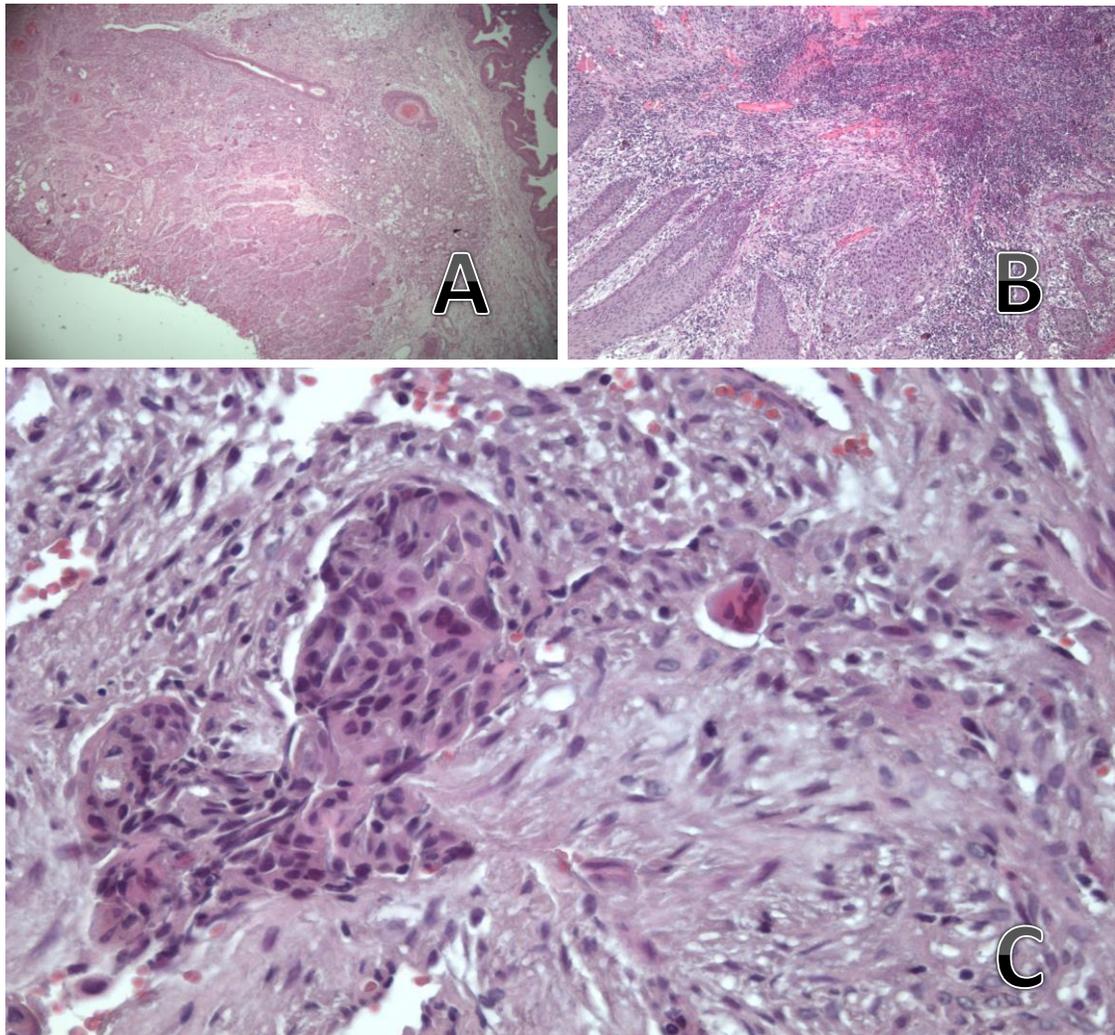
Las 10 muestras analizadas arrojaron una razón entre el género masculino y el femenino de 1:1, una edad promedio de 62,3 años, con una mayor localización en lengua (33,3%) (Tabla 6).

NÚMERO DE MUESTRA	GÉNERO	EDAD	LOCALIZACIÓN
1	F	70	ENCÍA
2	M	64	ENCÍA
3	M	47	PISO DE BOCA
4	F	72	MEJILLA
5	F	72	LENGUA
6	M	73	LENGUA
7	M	57	PISO DE BOCA
8	M	69	LENGUA
9	F	17	MEJILLA
10	F	82	ENCIA Y PISO DE BOCA

**Tabla 6:** Resumen de datos clínicos de 8 pacientes con COCE moderadamente diferenciado obtenidos en la base de datos del SAP entre los años 1985 y 2014.

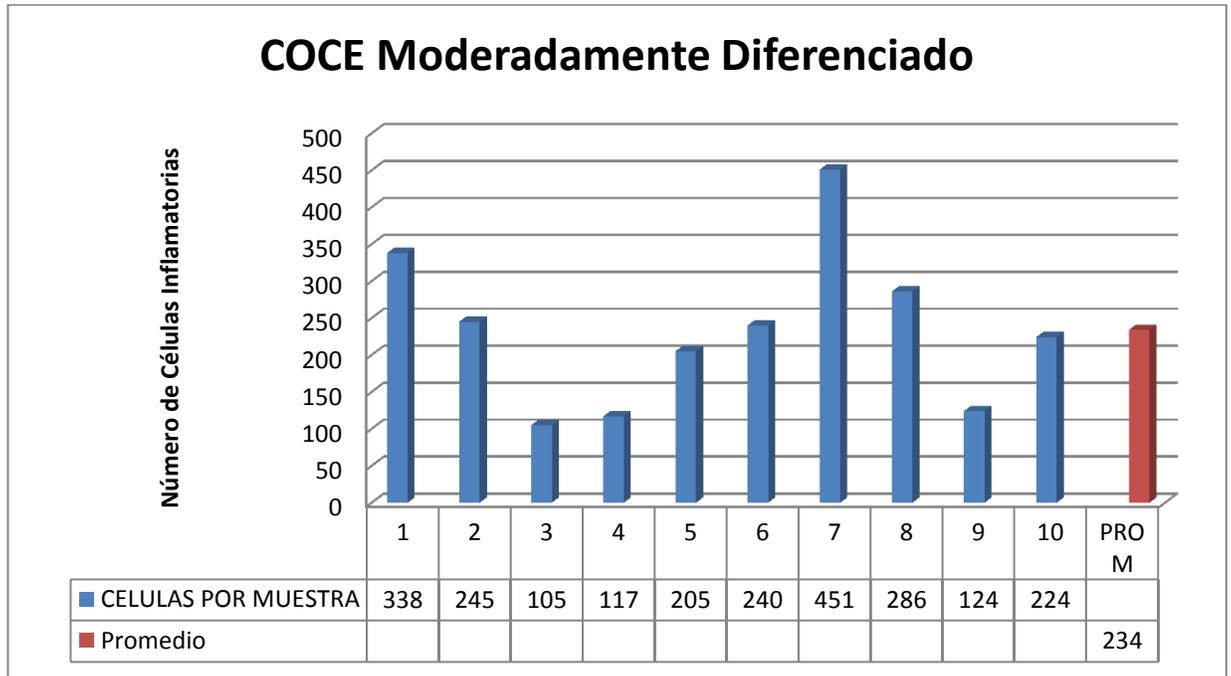
### **7.9.- CANTIDAD DE INFILTRADO INFLAMATORIO TOTAL EN COCE MODERADAMENTE DIFERENCIADO**

Las muestras de COCE moderadamente diferenciado, fueron observadas bajo microscopía óptica como se ejemplifica en la figura 5, realizando la cuantificación del infiltrado inflamatorio total ya descrito en la sección material y métodos.



**Figura 5:** Microfotografías obtenidas bajo microscopio óptico de muestras de COCE moderadamente diferenciado, tinción H&E. A: 4X se observa una mezcla entre tejido tumoral e infiltrado inflamatorio; B: 10X se observan, al costado inferior izquierdo de la foto el ILT y al costado superior derecho células neoplásicas malignas; C: 40X bajo inmersión se observa infiltrado inflamatorio (núcleos fuertemente violetas) acompañados de núcleos de queratinocitos malignos.

La cuantificación del infiltrado inflamatorio total para COCE moderadamente diferenciado arrojó un promedio de 234 células a 40X por muestras. (Gráfico 5).



**Gráfico 5:** Cantidad de infiltrado inflamatorio total en muestras de COCE moderadamente diferenciado. Los números 1 al 10 corresponden a diferentes muestras de pacientes con este diagnóstico histopatológico.

### **7.10.- DATOS CLÍNICOS EN COCE POBREMENTE DIFERENCIADO**

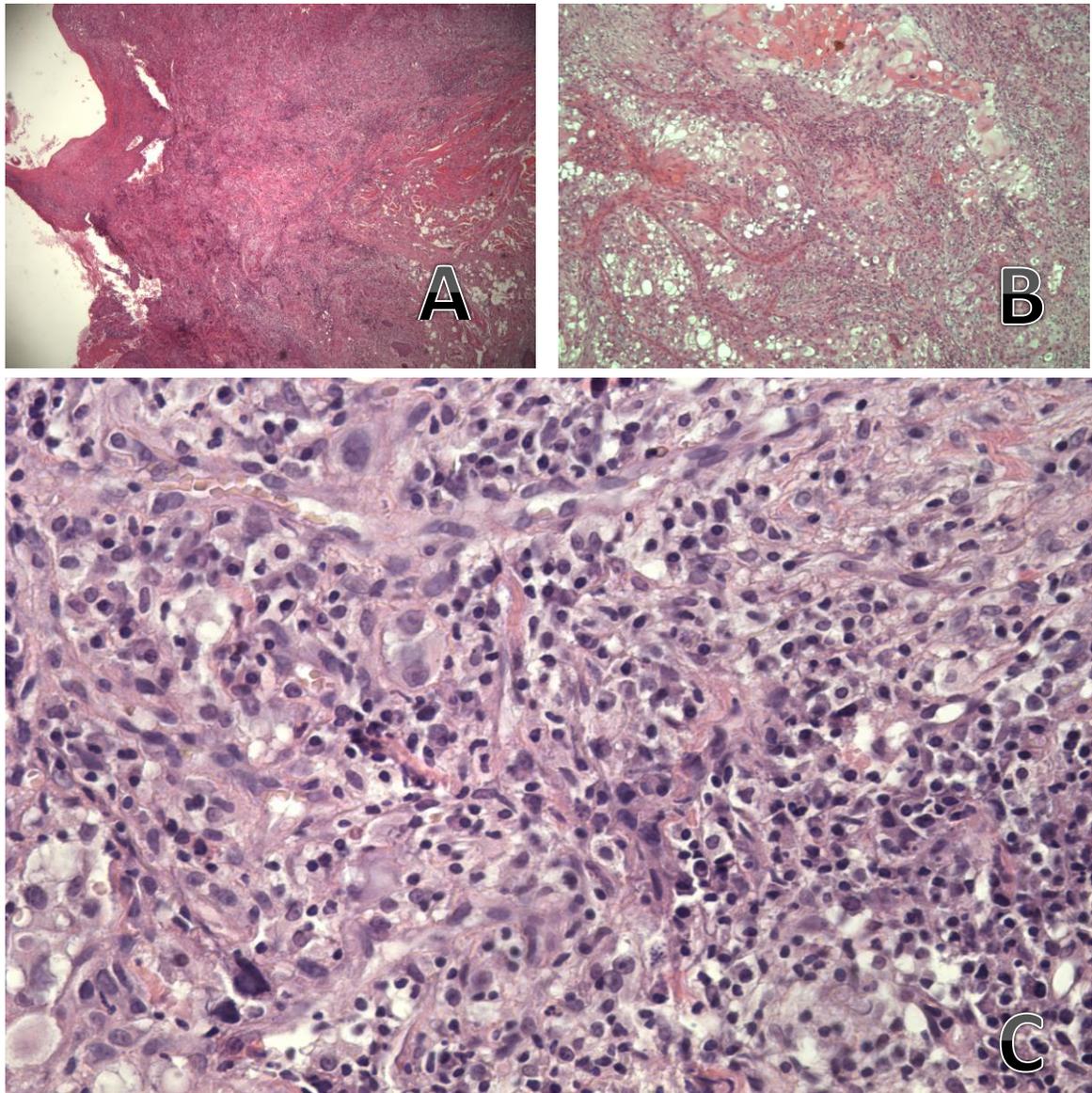
Las 10 muestras analizadas arrojaron una razón entre el género masculino y el femenino de 4:1, una edad promedio de 58,6 años con igual localización en lengua (20%), piso de boca (20%), encía (20%) y mejilla (20%) (Tabla 7).

<b>NÚMERO DE MUESTRA</b>	<b>GÉNERO</b>	<b>EDAD</b>	<b>LOCALIZACIÓN</b>
1	M	24	ENCÍA
2	M	63	PISO DE BOCA
3	M	63	LENGUA
4	M	99	MEJILLA
5	M	55	PISO DE BOCA
6	M	64	MEJILLA
7	M	64	ENCÍA
8	F	44	PISO DE BOCA/LENGUA
9	M	79	PALADAR DURO
10	F	31	LENGUA

**Tabla 7:** Resumen de datos clínicos de 9 pacientes con COCE pobremente diferenciado obtenidos en la base de datos del SAP entre los años 1985 y 2014.

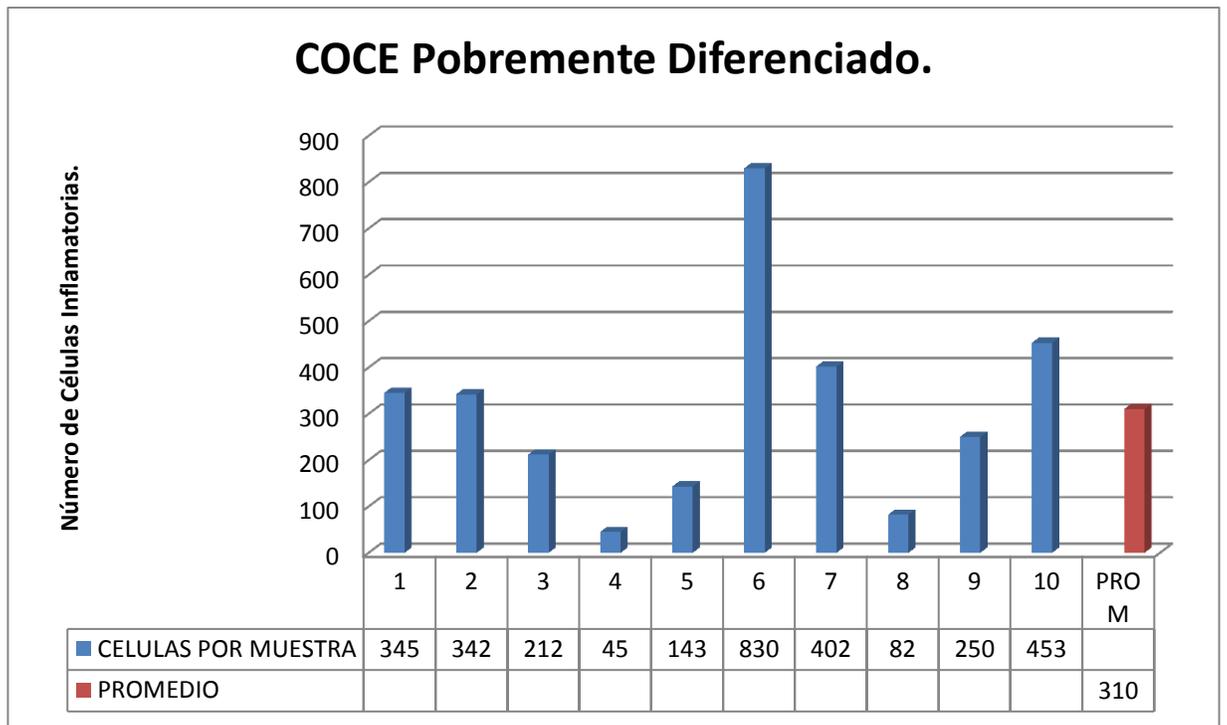
### **7.11.- CANTIDAD DE INFILTRADO INFLAMATORIO TOTAL EN COCE POBREMENTE DIFERENCIADO**

Las muestras de COCE pobremente diferenciado, fueron observadas bajo microscopía óptica como se ejemplifica en la figura 6, cuantificando la cantidad de infiltrado inflamatorio total como fue descrito en la sección materiales y métodos.



**Figura 6:** Microfotografías COCE pobremente diferenciado obtenidas bajo microscopio óptico, tinción H&E. A: 4X Se observan grupos de ILT alrededor de la masa tumoral; B: 10X Se observa el ILT y vasos sanguíneos; C: 40X bajo inmersión se aprecia un alto porcentaje de células inflamatorias en la zona y queratinocitos poco diferenciados.

La cuantificación del infiltrado inflamatorio total para COCE pobremente diferenciado arrojó un promedio de 310 células a 40X por muestra. Muestra 6 obtiene más del doble de células respecto del promedio, mientras que muestra 4 y 8 obtienen menos de la mitad del promedio de células (Gráfico 6).

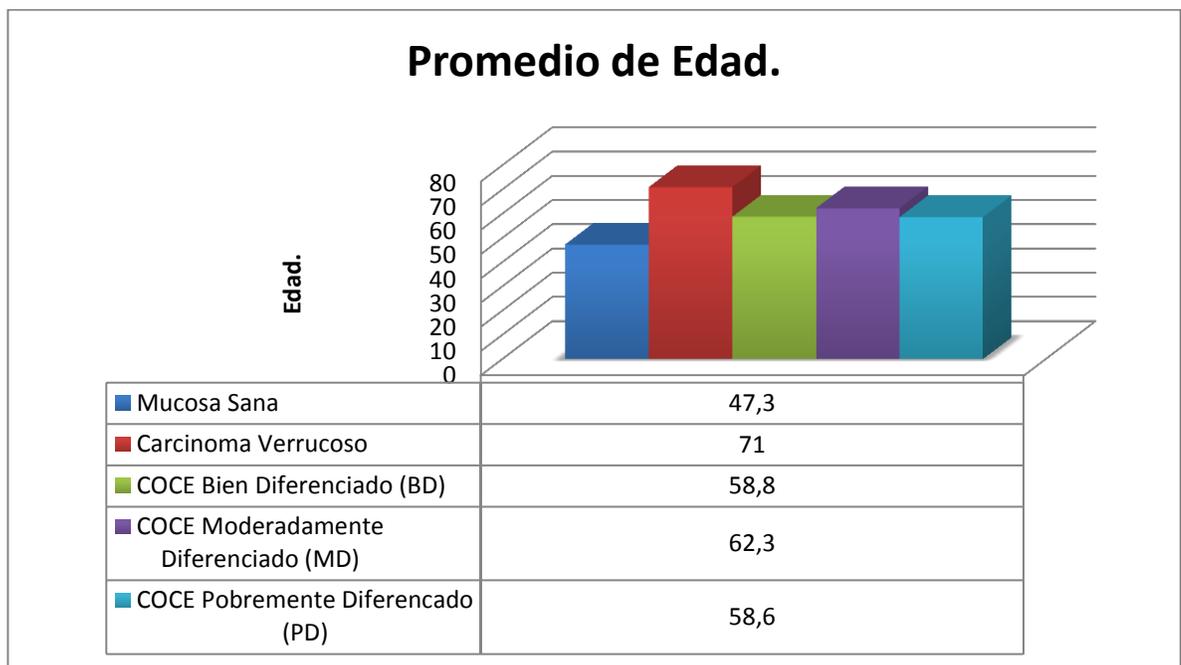


**Gráfico 6:** Cantidad de infiltrado inflamatorio total en muestras de COCE pobremente diferenciado. Del número 1 al 10 corresponden a diferentes muestras de pacientes con este diagnóstico histopatológico.

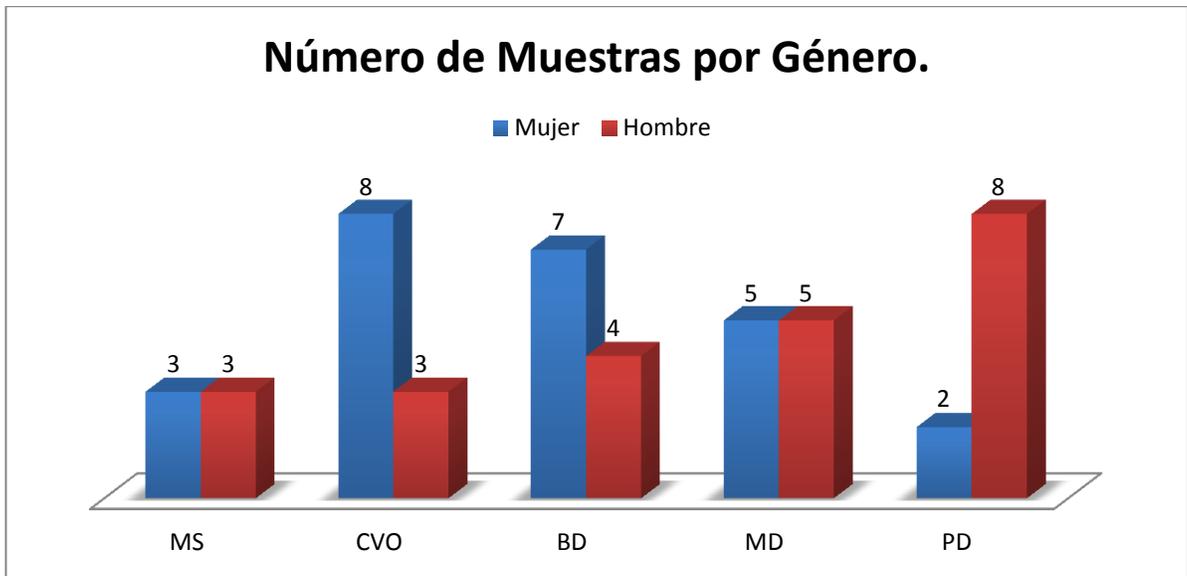
## 7.12.- DIFERENCIAS COMPARATIVAS ENTRE LOS SUBTIPOS DE CÁNCER: DATOS CLÍNICOS

El promedio de edad de los 42 subtipos de cáncer fue 62,67 años. (Gráfico 7).

Para CVO se observó que el género más afectado fue el femenino con un 72,7% siendo más de 3 veces superior al género masculino (27,3%). Para COCE bien diferenciado se observó que el género más afectado fue el femenino con 63,3%; para COCE pobremente diferenciado se observó que el género más afectado fue el masculino con un 80%; en tanto que para COCE moderadamente diferenciado no existió diferencia en el número de casos por género (Gráfico 8).



**Gráfico 7:** Promedio de edad para tejido sano, carcinoma verrucoso oral (CVO) y COCE bien, COCE moderadamente diferenciado y COCE pobremente diferenciado.



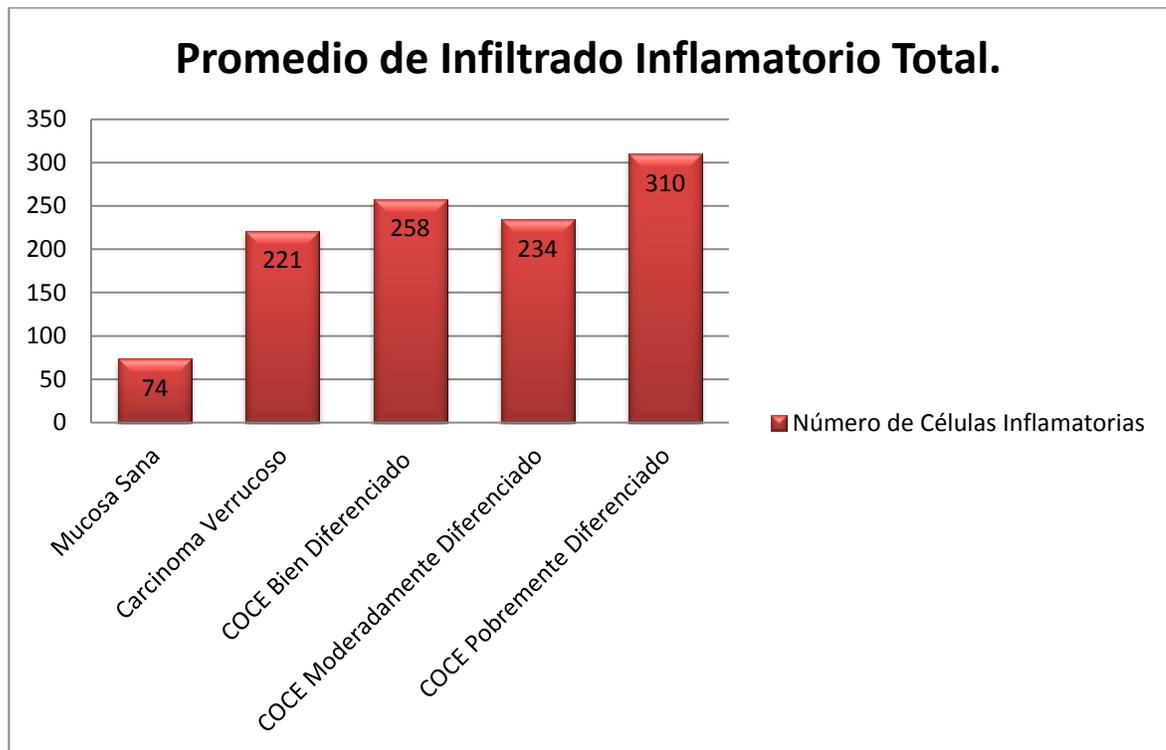
**Gráfico 8:** Número de muestras por género clasificado para tejido sano (TS), carcinoma verrucoso oral (CVO) y COCE bien (COCE BD), moderadamente (COCE MD) y pobremente diferenciado (COCE PD).

### 7.13.- DIFERENCIAS COMPARATIVAS ENTRE LOS SUBTIPOS DE CÁNCER: CANTIDAD DE INFILTRADO INFLAMATORIO

Analizando las muestras del presente estudio, observamos diferentes cantidades de infiltrado inflamatorio total en los subtipos tejidos sano, CVO, COCE bien, moderadamente y pobremente diferenciado, observándose que en todos los subtipos histológicos de cáncer existió una mayor cantidad de infiltrado inflamatorio total en comparación con tejido sano (Gráficos 9), siendo esta diferencia estadísticamente representativa (Tabla 8).

El CVO entregó el promedio de células inflamatorias más bajo dentro de los grupos de carcinoma estudiados con 221 células.

El subtipo que presentó mayor cantidad de infiltrado inflamatorio total fue COCE pobremente diferenciado con un promedio de 310 células.



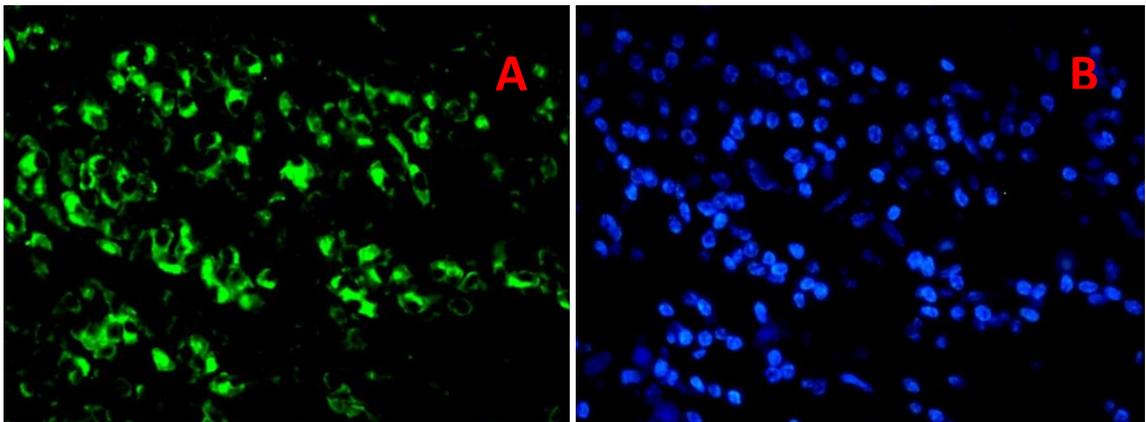
**Gráfico 9:** Promedio de infiltrado inflamatorio total en tejido sano, carcinoma verrucoso oral y COCE bien, moderadamente y pobremente diferenciado.

	P-VALUE	DIFERENCIA
MUC NORMAL < CV	0.01046	SIGNIFICATIVA
MUC NORMAL <COCEBD	0.04846	SIGNIFICATIVA
MUC NORMAL<COCEMD	0.00138	SIGNIFICATIVA
MUC NORMAL<COCEPD	0.02642	SIGNIFICATIVA
CV<COCEBD	0.7414	NO SIGNIFICATIVA
CV<COCEMD	0.64552	NO SIGNIFICATIVA
CV<COCEPD	0.37886	NO SIGNIFICATIVA
COCEBD>COCEMD	0.9124	NO SIGNIFICATIVA
COCEBD<COCEPD	0.80258	NO SIGNIFICATIVA
COCEMD<COCEPD	0.42952	NO SIGNIFICATIVA

**Tabla 8:** Análisis comparativo n° de células del infiltrado inflamatorio entre grupos por Stata (mann – whitney u-test).

#### **7.14.- MONTAJE DE LA TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA**

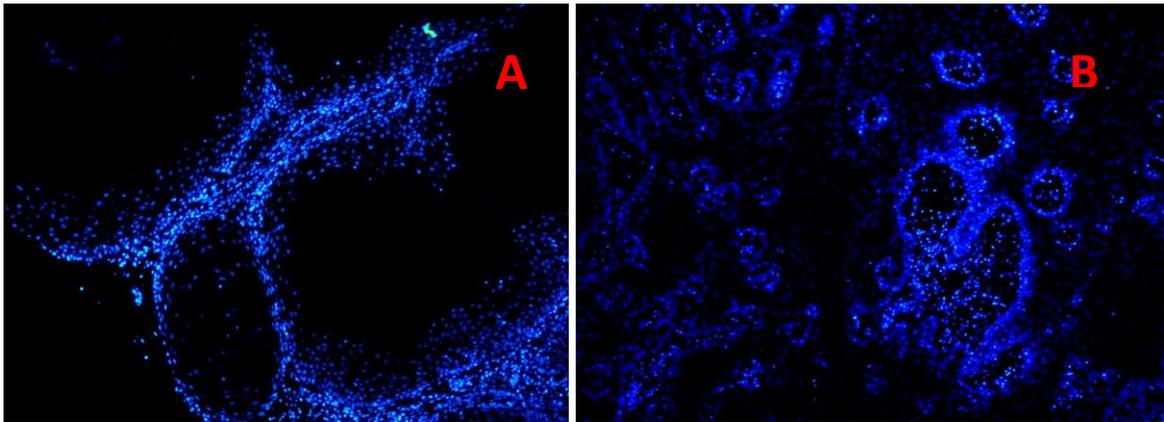
Para el montaje de la técnica de marcaje por inmunofluorescencia indirecta en muestras incluidas en parafina. Se seleccionaron muestras de COCE, linfonodo y mucosa normal. Para elaborar un protocolo que nos permita detectar al factor transcripcional Foxp3 en el infiltrado linfocitario (Ver material y métodos). Se detectaron células Foxp3+ en linfonodo, (figura 7). Y no encontrándose el marcador Foxp3 en mucosa sana.



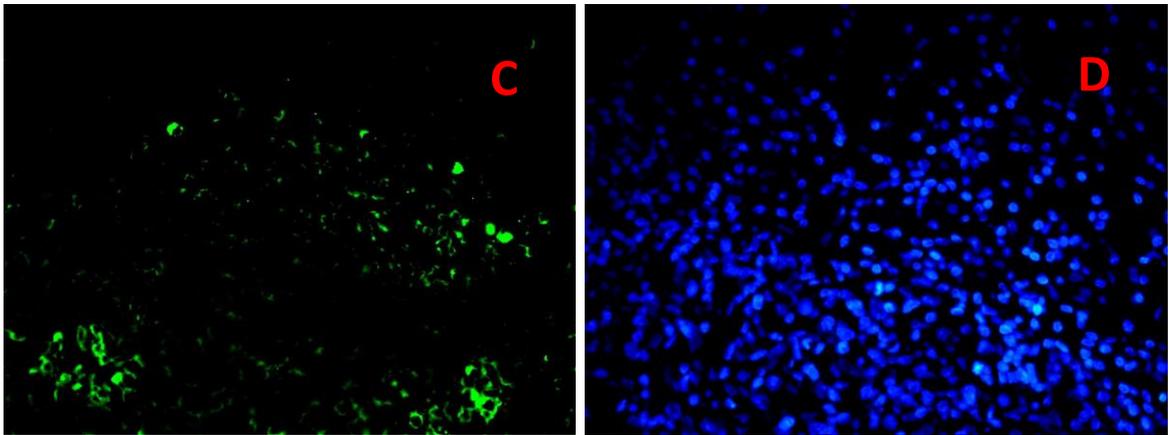
**Figura 7.** Microfotografía de microscopio de epifluorescencia. A: 100X, Imagen representativa, Linfonodo: Inmunofluorescencia con Alexa Flúor 488, para Foxp3. B: 100X, Tinción nuclear, DAPI.

### **7.15.- DETECCIÓN DE LINFOCITOS T REGULADORES EN COCE**

Para poder detectar al factor transcripcional Foxp3 en el infiltrado linfocitario de carcinoma oral, se tomaron aleatoriamente 15 muestras, como se describe en material y método. Las muestras fueron primeramente observadas bajo el microscopio de epifluorescencia, donde detectamos muestras de carcinomas orales negativos para Foxp3, Figura 8 y muestras con marcaje Foxp3+, figura 9.



**Figura 8:** Microfotografía de microscopio de epifluorescencia, Inmunofluorescencia con Alexa Flúor 488, para Foxp3 y tinción nuclear DAPI para visualizar los núcleos. A: 100X, Inmunofluorescencia representativa de carcinoma verrucoso negativo, solo se ve tinción nuclear; B: 100X, inmunofluorescencia representativa de COCE negativo, solo se ve tinción nuclear.

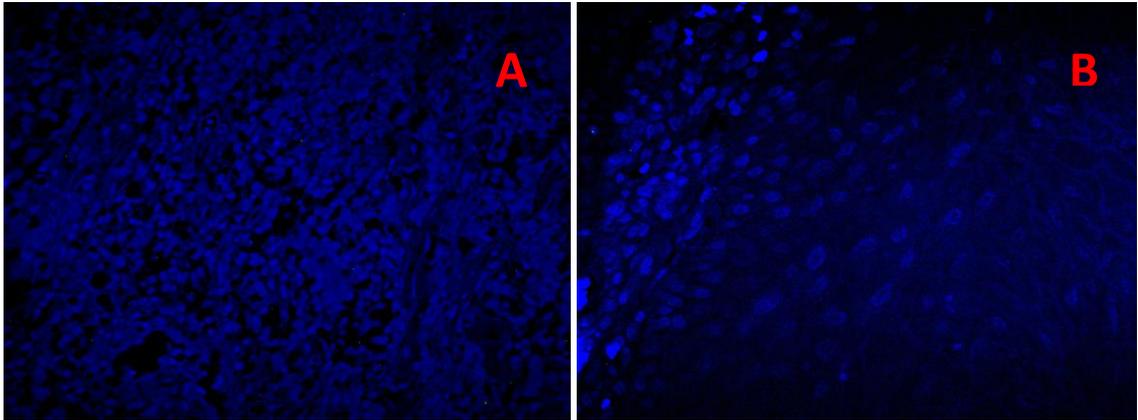


**Figura 9:** Microfotografía de microscopio de epifluorescencia. A: 100X, Inmunofluorescencia con Alexa Flúor 488, para Foxp3, COCE; B: 100X, Tinción Nuclear DAPI. COCE.

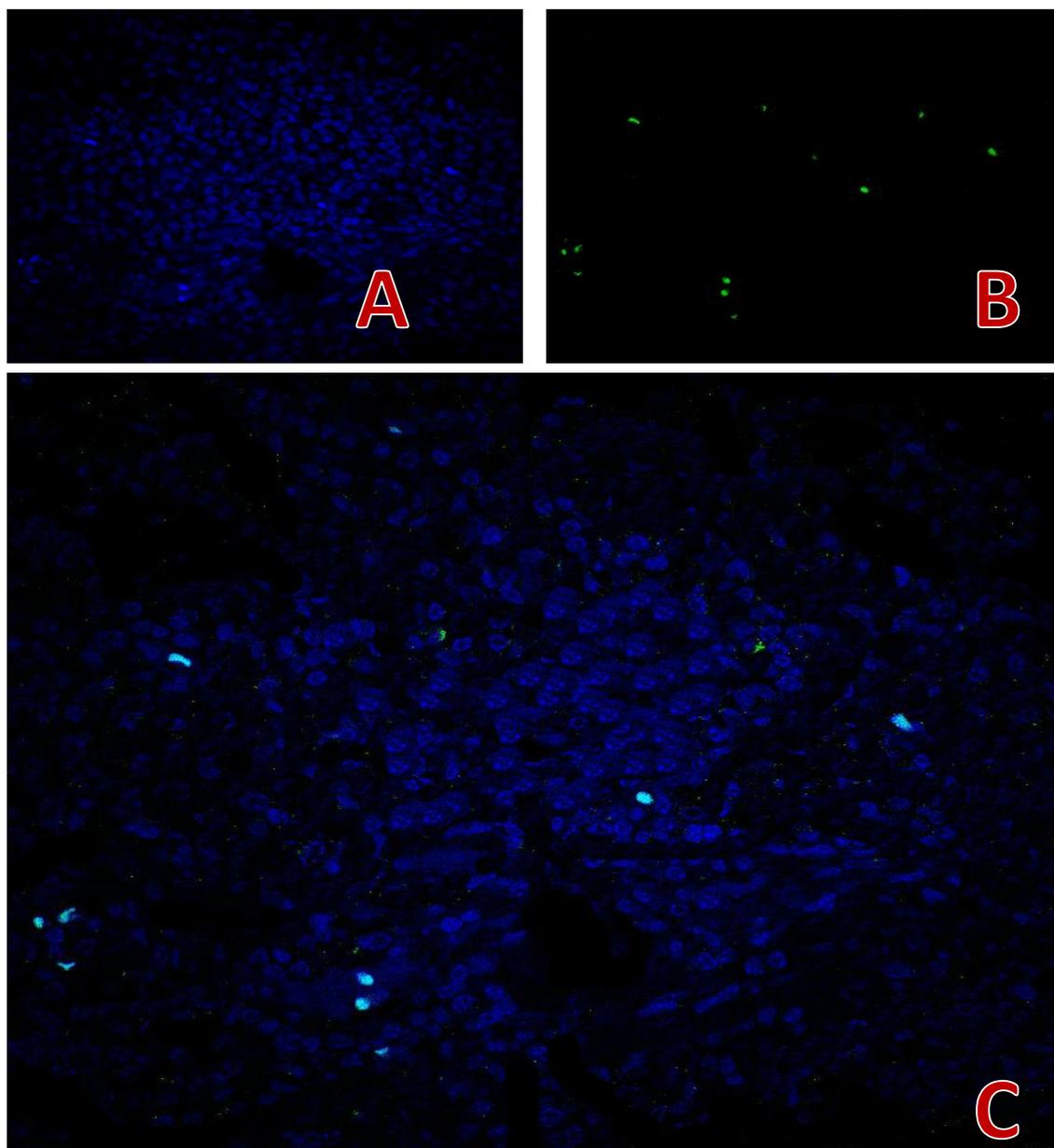
Luego las muestras fueron observadas bajo el microscopía confocal. El marcaje Foxp3 positivo se observó en una localización intracelular, la tinción nuclear con DAPI permite observar los núcleos para poder identificar las zonas ricas en células. Si bien en algunas muestras de carcinoma oral no se detectaron células T reguladoras (Figura 10). Detectamos células Foxp3+, con un marcaje citoplasmático en la mayoría de las muestras seleccionadas. (Figura 11, 12, 13 y 14).

La tabla 9, desglosa los tipos histopatológicos observados, y si fueron positivos o negativos para Foxp3 (estos datos que durante el marcaje se mantuvieron codificados).

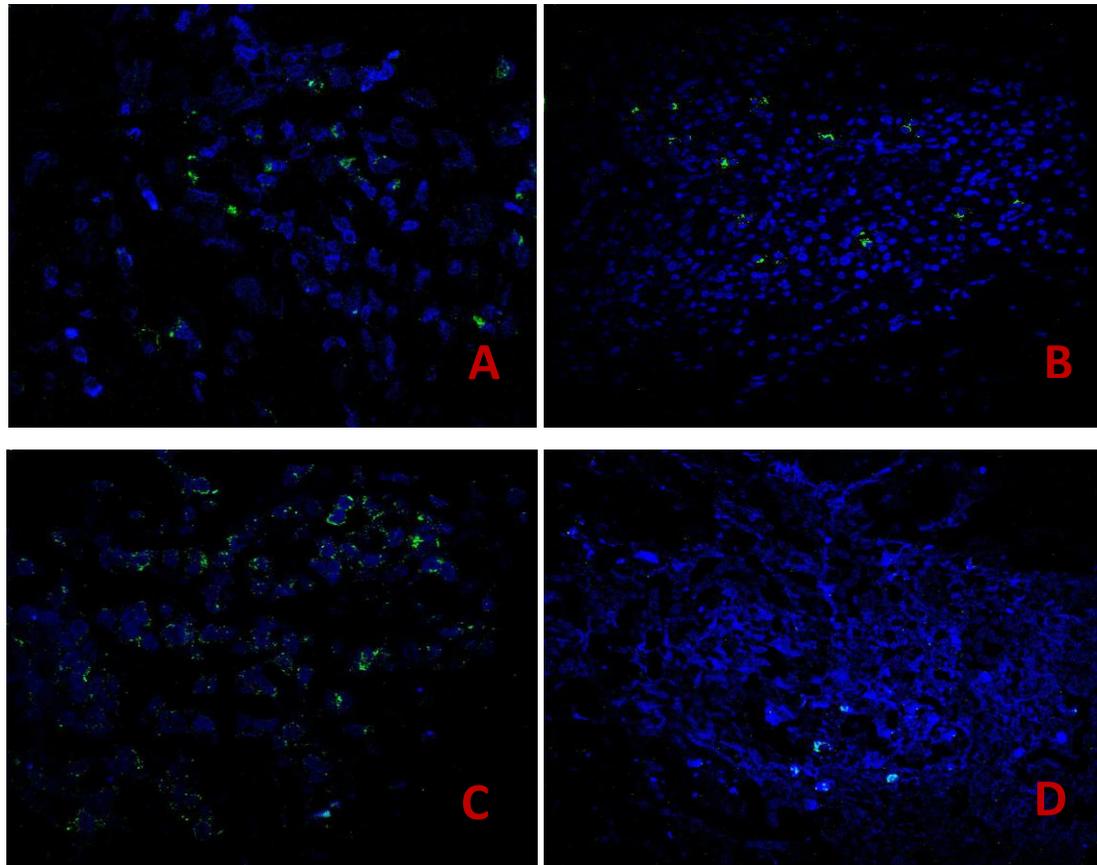
En la mayoría de los COCE se presentaron Linfocitos T reguladores, siendo la razón más probable, la que estén relacionados a una inhibición de las respuestas efectoras del organismo y a la progresión tumoral.



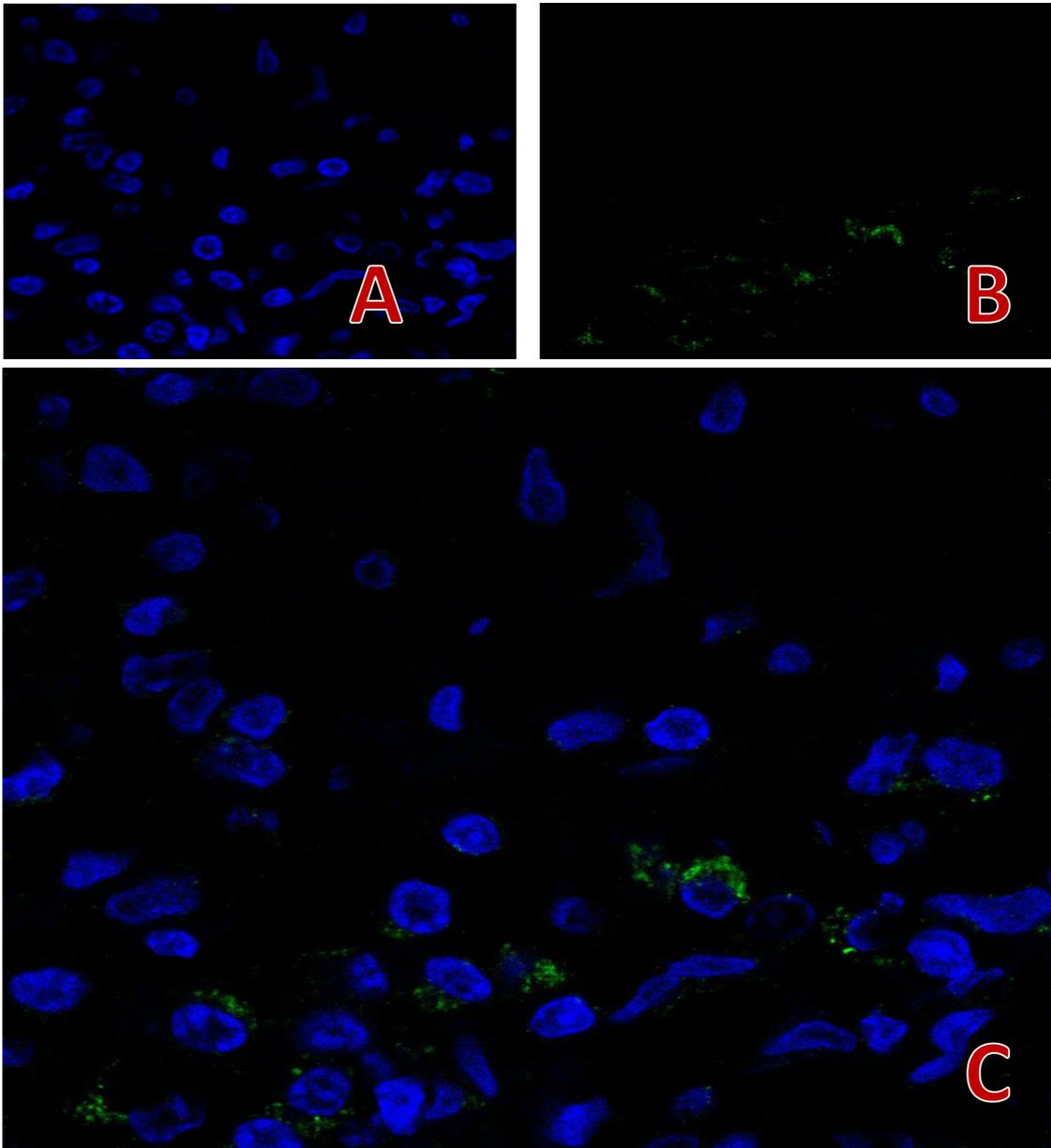
**Figura 10:** Microfotografía de microscopio confocal, Inmunofluorescencia con Alexa Flúor 488, para Fcpx3 y tinción nuclear DAPI para visualizar los núcleos. A: 40X, Imagen representativa COCE con ausencia de Linfocitos Treg; B: 100X Imagen representativa de carcinoma Verrucoso con ausencia de Linfocitos Treg.



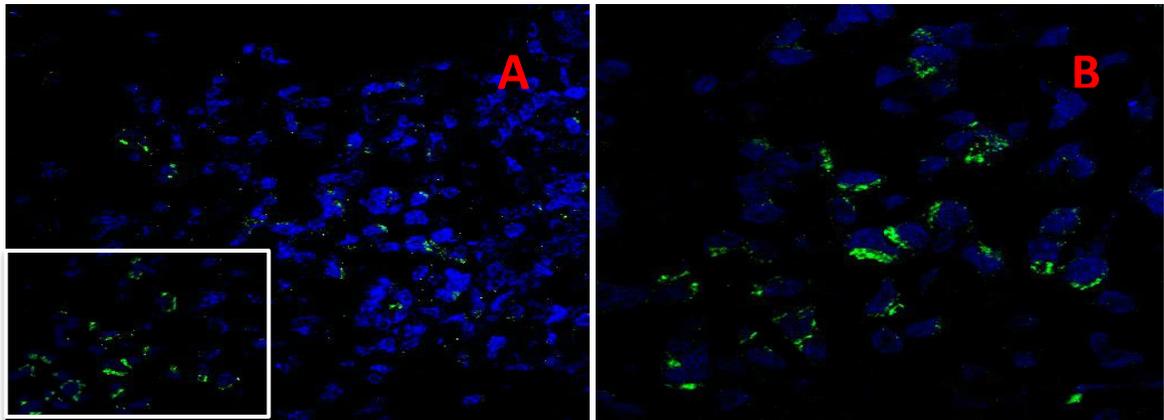
**Figura 11:** Microfotografía de microscopio confocal, COCE, 100X; A: Tinción nuclear DAPI de núcleos celulares; B: Marcaje de Foxp3 con Alexa flúor 488 en células de estudio; C: Tinción nuclear DAPI + Marcaje Foxp3, en donde se muestra el marcaje intracelular de Foxp3 en los Treg.



**Figura 12:** Microfotografía de microscopio confocal con doble marcaje, COCE. A: 100X, Tinción Nuclear DAPI + marcaje Foxp3 Tinción Nuclear DAPI + marcaje Foxp3, se identifican linfocitos Treg en citoplasma; B: 40X, Tinción Nuclear DAPI + marcaje Foxp3 Tinción Nuclear DAPI + marcaje Foxp3, se identifican linfocitos Treg en intracelular; C: 100X, Tinción Nuclear DAPI + marcaje Foxp3 Tinción Nuclear DAPI + marcaje Foxp3, se identifican linfocitos Treg en citoplasma; D: B: 100X, Tinción Nuclear DAPI + marcaje Foxp3 Tinción Nuclear DAPI + marcaje Foxp3, se identifican linfocitos Treg en intracelular.



**Figura 13:** Microfotografía de microscopio confocal, COCE; A: Tinción nuclear DAPI de núcleos celulares; B: Marcaje de Fcpx3 con Alexa Flúor 488; C: Tinción nuclear DAPI + Marcaje Fcpx3, en donde se muestra el marcaje citoplasmático de Fcpx3.



**Figura 14:** Microfotografía de microscopio confocal, Tinción nuclear DAPI + Marcaje Foxp3; A: 100X, Marcaje Foxp3 localizado en citoplasma celular, de núcleo celulares teñidos con DAPI, COCE, B: Ampliación rectángulo enmarcado en imagen A, Tinción Nuclear DAPI. COCE.

CARCINOMA ORAL	n	FOXP3+	FOXP3-
CV	3	1	2
COCE BD	3	2	1
COCE MD	3	2	1
COCE PD	2	2	0
<b>TOTAL COCE</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>2</b>
<b>CONTROL</b>			
LN	5	5	0
MS	3	0	3

**Tabla 9:** Detección de células FOXP3+ en COCE, CV y MS; se describe la presencia de linfocitos T reguladores por el marcaje positivo de Foxp3+ en todos los COCE y CV evaluados.

## **8. DISCUSIÓN**

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) corresponde a una patología de gran importancia en el territorio de cabeza y cuello, con una incidencia anual que alcanza a los 170.000 casos nuevos en todo el mundo (Goldenberg D. 2009). En Chile se informa que el COCE tiene una prevalencia, dentro de las neoplasias malignas orales, de alrededor de un 60% a un 85% (Rojas-Alcayaga G. y cols. 2010; Bórquez M. y cols. 2011, Ramirez V. y cols. 2015).

Conocer las interacciones y relaciones que se producen entre el cáncer y la respuesta inmune del hospedero, son fundamentales para poder enfrentar de mejor manera las neoplasias, las cuales en la actualidad son una de las principales causas de muerte afectando a millones de seres humanos al año (Stewart BW y Wild CP. 2014). Por esto, aportar con conocimientos nuevos que nos permitan conocer todos los elementos que interaccionan en las respuestas anti tumor, facilitará el desarrollo de nuevas herramientas para generar alternativas complementarias a los tratamientos que existen actualmente, mejorar los pronósticos, así como contribuir con la prevención y tratamiento contra el cáncer, enfoque primordial.

Nosotros analizamos un total de 48 muestras, 42 correspondieron al diagnóstico histopatológico de carcinomas de células escamosas, el promedio de edad correspondiente a estos pacientes fue de 63,5 años. Siendo similar a la información presente en la literatura que señala que el cáncer oral en la mayoría de los casos ocurre en personas mayores a los 50 años y donde el riesgo de padecerlo incrementa a medida que aumenta la edad (Warnakulasuriya S. 2010; Vargas-Ferreira F. y cols. 2012).

En el presente estudio, se observó en las muestras correspondientes a COCE BD y CV, que el género más afectado fue el femenino con 63,7% y 72,7% respectivamente, mientras que para las muestras de COCE MD no existieron diferencias en el número de casos por género. Los cuales no concuerdan con lo reportado en la literatura que señala que el género más afectado es el masculino

(Neville B. y cols. 2009; World Health Organization Classification of Tumours 2005; Walvekar R. y cols. 2009; Rekha K. y cols. 2010). En las muestras de COCE PD el género masculino fue el más afectado con un 80%, donde la razón entre género masculino y el femenino fue de 4:1, encontrándose más alto que lo descrito en la literatura, donde la diferencia entre géneros no es tan marcada (Riera P. y Martinez B. 2005; World Health Organization Classification of Tumours 2005; Ling W. y cols. 2013, Ramirez V, et al. 2015).

El sitio anatómico que más afecto el CV fue la encía con un 54,5%, similar a lo reportado por Rekha K. y cols. 2010 y Adorno D. y cols. 2010. Mientras que para COCE BD, MD y PD la lengua como sitio afectado destacó como el más frecuente concordando con lo descrito por otros autores (Bagan J. y cols. 2010; Rhodus NL. y cols. 2014, Ramírez V. y cols. 2015). Considerando la cantidad de muestras evaluadas y que el presente trabajo no está orientado hacia un estudio epidemiológico, sería interesante poder realizar estudios futuros con una mayor muestra que contemplen este tipo de aspectos que complementen de mejor manera el contraste que se pueda realizar con estudios previos.

En este estudio observamos que el promedio de infiltrado inflamatorio total de los subtipos histológicos de cáncer analizados (CVO, COCE bien, moderadamente y pobremente diferenciado), fue mayor que el promedio de infiltrado inflamatorio total del grupo control (mucosa sana), siendo esta diferencia estadísticamente significativa en todos los cánceres comparados con tejido sano.

Para el carcinoma verrucoso se describe una densa respuesta inmune por parte del hospedero (Neville B. y cols. 2002; World Health Organization Classification of Tumours 2005; Adorno D. y cols. 2010, Candau A. y cols. 2014), lo cual es concordante con lo observado en este estudio, donde el CVO concentró un promedio de infiltrado inflamatorio total mayor al compararlo con el tejido sano, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

Se observó que el promedio de infiltrado inflamatorio total en COCE moderadamente diferenciado fue menor que el de COCE pobremente diferenciado siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Al comparar el promedio de

infiltrado inflamatorio total en COCE moderadamente diferenciado con COCE bien diferenciado, se observó una tendencia a un menor promedio de infiltrado inflamatorio total en COCE moderadamente diferenciado no llegando a ser estadísticamente significativa esta diferencia. El mayor promedio de infiltrado inflamatorio fue en COCE pobremente diferenciado, y al haber infiltrado inflamatorio se encontró linfocitos Treg. Este aumento del infiltrado inflamatorio en los COCE observados demuestra que el organismo debe responder de mayor manera mientras más nocivo sea el estímulo, en este caso el cáncer (Dunn G. y cols. 2004; Abbas K. y cols. 2008; Uppaluri R. y cols. 2008; Cho Y. y cols. 2011; Matos F. y cols. 2012).

Nosotros observamos una menor cantidad de infiltrado inflamatorio total en lengua comparado con las otras localizaciones en todos los subtipos de carcinoma analizados, esto a diferencia de lo reportado en la literatura (Massano J. y cols. 2006). Sin embargo, los datos de localización de este estudio no son comparables debido al pequeño número de casos analizados. Sería interesante realizar esta comparación, realizándose un estudio con mayor cantidad de muestras y observándose si esta tendencia se repite, en caso contrario buscar factores que expliquen este comportamiento biológico.

Los resultados obtenidos en este estudio, respecto de la mayor cantidad de infiltrado inflamatorio total en COCE pobremente diferenciado respecto de los otros subtipos de cáncer analizados, nos hacen pensar que el COCE pobremente diferenciado promueve una potente respuesta del sistema inmune en la cual podría existir una gran cantidad de antígenos tumorales generando la activación de diferentes moléculas y células antitumorales. Estos antígenos tumorales presentes en gran cantidad en cánceres muy anaplásicos, sería uno de los responsables de la mayor cantidad de células inflamatorias en el COCE pobremente diferenciado comparado con los otros subtipos de cáncer. La respuesta antitumoral que se lleva a cabo, tiene que ser capaz de reconocer estos antígenos y destruir clones de células transformadas provocando la lisis de ellas (Burnet M. 1970; Dunn G. y cols. 2004; Abbas K. y cols. 2008; Uppaluri R. y cols. 2008). Por otro lado, no sólo la cantidad de infiltrado implica una respuesta

inmune más efectiva, sino que más importante aún es el subtipo de células de defensa presentes en el infiltrado inflamatorio (González J. y cols. 2010). En torno al cáncer se van a generar múltiples respuestas inmunes, algunas generarán células efectoras capaces de eliminar masas tumorales, mientras que otras respuestas inmunes buscarán suprimir el propio efecto del sistema inmune, esto último al reconocer antígenos propios y de manera errónea, para el caso del cáncer, buscar proteger los tejidos del hospedero (Cho Y. y cols. 2011).

El control inmunológico del tumor está mediado por diferentes subtipos de células T reguladoras. Estudios previos han detectado el aumento de las proporciones de células Treg en pacientes con diferentes tipos de cánceres, incluidos los de pulmón, mama, páncreas, ovario y colorrectal (Liyanage UK, y cols. 2002; Curiel TJ, y cols. 2004.), dificultando la inmunovigilancia contra las células tumorales e impidiendo la respuesta inmune efectiva. Estos niveles elevados se han detectado tanto en sangre periférica como en tejido tumoral. Resultados similares se han observado también en el cáncer de cabeza y cuello (Strauss L, y cols. 2007).

La importancia de montar técnicas que permitan estudiar el comportamiento de la respuesta inmune en cáncer, radica en conocer, detectar y cuantificar el subtipo de células de defensa presentes en el infiltrado linfocitario, ya que se ha demostrado que células como las Treg son capaces de inhibir una gran variedad de respuestas inmune (Kingsley CI y cols. 2002). Actualmente se considera al factor de transcripción Foxp3 como el marcador más confiable para definir y aislar los linfocitos Treg (Fontenot y col., 2003, Hori y col., 2003, Khattry y col., 2003), ya que su expresión se encuentra altamente restringida a los Linfocitos T CD4+, aunque existen linfocitos T CD8+ que también pueden expresar este factor de transcripción (Vergara, U. 2009).

Es un hecho que la células T reguladoras (Tregs) son actores claves en el mantenimiento de la homeostasis y la tolerancia inmune y que el factor transcripcional Foxp3 es esencial para la diferenciación y activación de células T reguladoras (Marson A, y cols. 2007), considerándose como la transcripción específica. (Gavin MA, y cols. 2007; Sakaguchi S. 2010; Yu-Jie Liang, y cols. 2015).

En los Tregs, el factor transcripcional Foxp3 se localiza principalmente en el citoplasma o adyacente al núcleo cuando las células son estimuladas. (Yu-Jie Liang, y cols. 2015). Siendo este factor la proteína responsable de la regulación de la función y el desarrollo de las células Treg (akaguchi S. 2004; de Boer OJ, y cols. 2007). Se ha considerado como el mejor marcador para la detección de las células Treg. (Hori S, y cols. 2003; Rabello M, y cols. 2013).

El Factor Transcripcional Foxp3 puede ser expresado por las células T ya sean activadas o reguladoras (Sakaguchi S, y cols. 2010). Por otra parte, recientemente se ha discutido que si bien en las células Treg la expresión de Foxp3 es confinado principalmente en el núcleo, en las células activadas se localiza prioritariamente en el citoplasma (Magg T, y cols. 2012). De acuerdo a esta observación la evaluación cualitativa de la inmunofluorescencia podrían sugerir que tanto las células T activadas y las Treg que infiltran en el tumor puedan expresar Foxp3 (Weed DT, y cols 2013).

Las células Treg juegan un papel vital en el mantenimiento inmunológico de la homeostasis, la prevención de las enfermedades autoinmunes y la disminución de la respuesta inmune antitumoral (Whiteside TL. 2012). La evidencia actual muestra que la frecuencia y la actividad de las células CD4+ CD25 + Foxp3 + Treg proliferan en la circulación y en el microambiente provocado por el tumor, en pacientes con diversos tipos de cáncer, incluyendo el COCE. Sabiendo que el aumento de las células Treg se correlaciona negativamente con la progresión y pronóstico del tumor (Betts G, y cols. 2012; Chen KJ, y cols. 2011; Zhou X, y cols. 2016), habría una directa relación en la detección de estas células y la presencia del cáncer. (Zhao J, y cols. 2014; Schipmann S, y cols. 2014).

En este estudio se utilizó la técnica de la inmunofluorescencia para detectar el factor transcripcional Foxp3 en las muestras seleccionadas, mediante la observación por microscopía de epifluorescencia, se observaron las muestras previamente preparadas con el marcaje correspondiente al filtro azul DAPI para el núcleo y al filtro verde Alexa Flúor 488 para la detección de Foxp3.

Se detectó la presencia de Linfocitos Treg en muestras de Carcinoma oral de células escamosas y muestras de linfonodos con control positivo, en la mayoría de las cuales se observó un marcaje principalmente citoplasmático para Foxp3. Se trabajó con muestras del biobanco, que son enviadas para la confirmación del diagnóstico histopatológico, lo que dificulta la observación ya que no depende de nuestra elección seleccionar la interfase respuesta del hospedero tumor, que es el sitio de mayor interés para este estudio, lo ideal sería la toma de biopsias en pos de encontrar una relación entre las diferentes grados de diferenciación histológica del carcinoma oral de células escamosas. A pesar de que este estudio no está enfocado en el análisis comparativo, es clave para poder estandarizar la forma en que se evaluarán, estratificarán y compararán las muestras.

No se detectaron Treg en mucosa sana, lo que confirma, que no existe una liberación de infiltrado inflamatorio ante la ausencia de injuria, por lo tanto, el organismo no tiene que liberar los Treg si no existe un proceso inflamatorio en curso.

En el presente estudio no se analizaron condiciones sistémicas ni locales, tales como úlceras, sobre infección por cándida, trauma local u otras que pudieran influir en la respuesta inflamatoria, esto debido a la poca información presente en las fichas. Por otro lado, el número limitado de muestras del estudio y la distribución variada de las localizaciones, sugieren la realización de nuevos estudios que permitan determinar de qué manera podrían afectar estas variables en la cantidad de inflamatorio total que permanece adyacente al tumor.

Esta tesis determinó la cantidad de infiltrado inflamatorio total en CVO, COCE bien diferenciado, moderadamente diferenciado y pobremente diferenciado, y la presencia de linfocitos T reguladores en COCE, lo que evidentemente está relacionado con la disminución del bloqueo de la respuesta efectora anti tumoral que el hospedero establece contra las neoplasias, con el objetivo de que en un paso siguiente de esta investigación, se cuantifiquen los Treg con un número mayor de muestras y comparar de forma individual los subtipos histopatológicos con su infiltrado inflamatorio tumoral propiamente tal con su interfase, así lograr una mejor cuantificación del número de Linfocitos T reguladores en los subtipos celulares que conforman el infiltrado inflamatorio total, determinando si existe una relación entre el número de Linfocitos T reguladores y los subtipos de cáncer analizados.

## **9. CONCLUSIONES**

Entre todos los subtipos de carcinoma, la mayor cantidad de infiltrado inflamatorio total se observó en muestras de pacientes diagnosticados con carcinoma oral de células escamosas pobremente diferenciado.

El carcinoma oral de células escamosas pobremente diferenciado presentó una mayor cantidad de infiltrado inflamatorio total respecto del tejido sano, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. **(P-value: 0.02642)**

El carcinoma oral de células escamosas medianamente diferenciado presentó una mayor cantidad de infiltrado inflamatorio total respecto del tejido sano, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. **(P-value: 0.00138)**

El carcinoma oral de células escamosas bien diferenciado, presentó una mayor cantidad de infiltrado inflamatorio total respecto del tejido sano, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. **(P-value: 0.04846)**

El Carcinoma verrucoso presentó una mayor cantidad de infiltrado inflamatorio total respecto del tejido sano, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. **(P-value: 0.01046)**

La mayoría de las muestras de COCE presentaron linfocitos T reguladores, detectados mediante marcaje con inmunofluorescencia de Foxp3 y analizados bajo microscopia confocal, mostrando un marcaje citoplasmático. Esto implicaría una importante participación de estas células en la supresión de las respuestas efectoras antitumorales durante la patogenia de esta enfermedad.

## **10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.**

- Abbas K.A. Lichtman A.H. Pillai S. (2008). Inmunología Celular y Molecular. 6ta edición. Elsevier Saunders.
- ACKERMAN, L.: (1948) Verrucous Carcinoma of the Oral Cavity. Surgery, 23:670-678.
- Adorno D. Maturana A. Farías M. Fanco M. Iriarte M. Sáez R. y cols. (2010). Carcinoma Verrucoso Oral: Reporte de un Caso Clínico y Revisión de 20 Casos del Instituto de Referencia en Patología Oral (IREPO), Chile. Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral Vol. 3(3); 132-135.
- Allama E. Zhang W. Al-Shibani N. Sun J. Labban N. Song F. et al. (2011). Effects of cigarette smoke condensate on oral squamous cell carcinoma cells. Archives of Oral Biology: 56: 1154-1161.
- Allama E. Zhang W. Al-Shibani N. Sun J. Labban N. Song F. et al. (2011). Effects of cigarette smoke condensate on oral squamous cell carcinoma cells. Archives of Oral Biology: 56: 1154-1161.
- American Cancer Society. Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition. 2012.
- American Cancer Society. Global Cancer Facts & Figures 2015. Atlanta: American Cancer Society; 2015.
- Annacker O, Burlen-Defranoux O, Pimenta-Araujo R, Cumano A, Bandeira A. (2000). Regulatory CD4 T cells control the size of the peripheral activated/memory CD4 T cell compartment. J Immunol; 164:3573-80.
- Armijo Rojas R. Epidemiología del cáncer. Buenos Aires: Editorial Inter Médica, 1986:44-9.

- Arriagada O, Venegas B, Cantín M, Zavando D, Manterola C, Suazo I. (2010). Rol de las características clínicas e histológicas como factores pronósticos para la sobrevida en pacientes con carcinoma de células escamosas de la cavidad oral. *Rev. Chilena de Cirugía*. Vol 62 - Nº 5: 441-448.
- Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. (2005). *World Health Organization Classification of Tumors, Pathology and Genetic of Head and Neck Tumors*. IARC Press, Lyon, Francia; 179-183.
- Bascones A, ed. *Medicina bucal*. Editorial Avances-ariel. 3ª edición. (2004).
- BELKAID Y, TARBELL K. 2009. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. *Annu. Rev Immunol* 27: 551-589.
- Betts G, Jones E, Junaid S, El-Shanawany T, Scurr M, Mizen P, Kumar M, Jones S, Rees B, Williams G, Gallimore A, Godkin A (2012) Suppression of tumour-specific CD4+T cells by regulatory T cells is associated with progression of human colorectal cancer. *Gut* 61:1163–1171.
- Bienvenu B, Martin B, Auffray C, Cordier C, Bécourt C, Lucas B. (2005). Peripheral CD8+CD25+ T lymphocytes from MHC class II-deficient mice exhibit regulatory activity. *J Immunol*;175: 246-53.
- Binmadi N, Basile J. (2011). Perineural invasion in oral squamous cell carcinoma: A discussion of significance and review of the literatura. *Oral Oncology* 47: 1005–1010.
- Biron C A. et al. (1999). Natural Killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines *Annu. Rev. Immunol*: 17: 189.

- Bórquez M. Capdeville F. Madrid M. Veloso O. Cárcamo P. (2011). Sobrevida global y por estadios de 137 pacientes con cáncer intraoral: experiencia del instituto nacional del cáncer. *Revista chilena de cirugía* 63(4):351-5.
- Boucek J. et al. (2009). Regulatory T cells and their prognostic value for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cell Mol Med*.
- Burnet FM. (1970). The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res*. 13:1-27.
- Candau A, dean A, Alamillos F, Heredero S, Garcia B, Ruiz J, Arévalo R, Zafra F, Valenzuela B. (2014). Verrucous carcinoma of the oral mucosa: An epidemiological and follow-up study of patients treated with surgery in 5 last years. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. Sep 1;19 (5):e506-11.
- Carrier Y, Yuan J, Kuchroo VK, Weiner HL. (2007). Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T celltransgenic mice. *J Immunol*;178:179-85.
- Carvalho A. Lago N. Ferreira A. Mendoça E. Gonçalves R. Silva T. (2009). Distinctive clinical and microscopic features of squamous cell carcinoma of oral cavity and lip. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*. Volume 109, Number3: e74-e79.
- Casey S, Li Y and Felsher D. (2014). An essential role for the immune system in the mechanism of tumor regression following targeted oncogene inactivation. *Immunol Res Vol.58:2-3; 282-91\**.
- Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*; 10:942-9.

- Chakraborty NG, Twardzik DR, Sivanandham M, Ergin MT, Hellstrom KE, Mukherji B. (1990). Autologous melanoma-induced activation of regulatory T cells that suppress cytotoxic response. *J Immunol*; 52: 213-28.
- Chen KJ, Lin SZ, Zhou L, Xie HY, Zhou WH, Taki-Eldin A, Zheng SS (2011) Selective recruitment of regulatory T cell through CCR6- CCL20 in hepatocellular carcinoma fosters tumor progression and predicts poor prognosis. *PLoS One* 6:e24671. doi: 10.1371/0024671.
- Cho Y, Yoon H, Lee J, Hong S, Hong S. (2011). Relationship between the expressions of PD-L1 and tumor-infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 47: 1148–1153.
- Dalal Al-Qahtani et al. (2011). Tumor Infiltrating CD25+ FoxP3+ regulatory T cells (Tregs) relate to tumour grade and stromal inflammation in oral squamous cell carcinoma, *J Oral Pathol Med.* 40: 636-642.
- Dantas E. da Costa M. Costa K. Almeida R. Silva M. Guedes L. (2010). Analysis of local immunity in squamous cell carcinoma of the tongue and lower lip. *Experimental and Molecular Pathology* 88: 171–175.
- De Boer OJ, van der Loos CM, Teeling P, van der Wal AC and Teunissen MB. (2007). Immunohistochemical analysis of regulatory T cell markers FOXP3 and GITR on CD4+CD25+ T cells in normal skin and inflammatory dermatoses. *J Histochem Cytochem* 55: 891-898, 2007.
- Dieckmann D, Bruett CH, Ploettner H, Lutz MB, Schuler G. (2002). Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J Exp Med*;196:247-53.

- Dunn G, Old L, Schreiber R. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 21(2):137-48.
- Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA and Rudensky AY. (2007). Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 445: 771-775.
- GIMENEZ-CONTI,I; COLLET,A; LANFRANCHI,H; ITOIZ,M; LUNA,M;HONG-JI,X; SHI-XUE,H; BENEDICT,W. & CONTI,C.: (1996) p53, and cyclin D1 expression in human oral verrucous carcinomas. *Cancer*. Jul 1; 78(1): 17-23.
- Goldenberg D, Brooksby C, Hollenbeak C. (2009). Age as a determinant of outcomes for patients with oral cancer. *Oral Oncol*. 45: e57-61.
- González J, Duque V, Velásquez M. (2010). FOXP3: Controlador maestro de la generación y función de las células reguladoras naturales. *Inmunología Vol. 29, Núm 2: 74-84*.
- FONTENOT JD, GAVIN MA, RUDENSKY AY. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4: 330- 336.
- HORI S, NOMURA T, SAKAGUCHI S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299: 1057-1061.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*; 299:1057-61.
- Hubert Low TH, Gao K, Elliott M, Clark JR. (2013). Tumor classification for early oral cancer: Re-evaluate the current TNM classification. *Head Neck*.

- Itriago L, Silva N, Cortes G. (2013). Cáncer en Chile y en el mundo: Una mirada epidemiologica, presente y futuro. *Rev. Med. Clin. Condes*; 24(4) 531-552].
- Imanguli MM, Cowen EW, Rose J, Dhamala S, Swaim W, Lafond S, Yagi B, Gress RE, Pavletic SZ, Hakim FT. (2014). Comparative analysis of FoxP3(+) regulatory T cells in the target tissues and blood in chronic graft versus host disease, *Oct;28(10):2016-27*.
- Jiang H, Chess L. (2004). An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest*; 114:1198-208.
- Keski-Säntti H, Atula T, Törnwall J, Koivunen P, Mäkitie A. (2006). Elective neck treatment versus observation in patients with T1/T2 N0 squamous cell carcinoma of oral tongue. *Oral Oncol*. 2006;42:96-101.
- KHATTRI R, COX T, YASAYKO SA, RAMSDELL F. (2003). An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4: 337-342.
- KIM CH. (2006). Migration and function of FoxP3+ regulatory T cells in the hematolymphoid system. *ExpHematol* 34: 1033-1040.
- Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. (2002). CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol*; 168:1080-6.
- Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H. (2005). Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol*; 6:1219-27.
- Levings MK, Sangregorio R, Sartirana C, Moschin AL, Battaglia M, Orban PC, et al. (2002). Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce

transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J Exp Med*; 196:1335-46.

- Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG. (2001). Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med*; 193:1295-302.
- Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, et al. (2002). Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol*; 169:2756-61.
- Lobaño S, Gomes A, Alves K, Costa A, Cavalcanti H, Almeida R. (2011). Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinoma of the tongue and lower lip. *Archives of oral biology* 56 752–760.
- Lopez M. et al. (2009). Prolonged Survival of Dendritic Cell-Vaccinates Melanoma Patients Correlates With tumor-specific Delayed Type IV Hypersensitivity Response and Reduction of tumor Growth Factor – Expressing T Cells. *Journal of clinical oncology*; 27 (6): 945-52.
- Magg T, Mannert J, Ellwart JW, Schmid I, Albert MH (2012) Subcellular localization of FOXP3 in human regulatory and nonregulatory T cells. *Eur J Immunol* 42: 1627–1638.
- Marson A, Kretschmer K, Frampton GM, Jacobsen ES, Polansky JK, Maclsaac KD, Levine SS, Fraenkel E, von Boehmer H and Young RA. (2007). Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature* 445: 931-935.

- Massano J, Regateiro F, Januario G, Ferreira A. (2006). Oral squamous cell carcinoma: Review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 102:67-76.
- Matos F, Araujo E, Guedes L, and Dantas E. (2012). Analysis of inflammatory infiltrate, perineural invasion, and risk score can indicate concurrent metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue. *J Oral Maxillofac Surg*; 70:1703-1710.
- Mehrotra R, Yadav S. (2006). Oral squamous cell carcinoma: Etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. *Indian J Cancer*. 43(2):60-6.
- Montoro JR, Hicz HA, Souza L, Livingstone D, Melo DH, Tiveron RC, et al. (2008). Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Braz J Otorhinolaryngol*; 74:861-6.
- Muñoz A. (1997). *Cáncer. Genes y nuevas terapias*. Madrid: Hélice.
- Neville B, Damm D, Allen C, Bouquout J. (2002). *Oral & Maxillofacial Pathology*. 2nd edition. W.B. Saunders Company: Philadelphia. Pennsylvania.
- Neville, B.W.; Damm, D.D.; Allen, C.M.; Bouquot, J.E. (2009). *Oral and maxillofacial pathology*. Third Edition, Saunders Elsevier.
- North RJ, Awwad M. (1990). Elimination of cycling CD4+ suppressor T cells with an anti-mitotic drug releases non-cycling CD8+ T cells to cause regression of an advanced lymphoma. *Immunology*; 71:90-5.

- Ohman J. et al. (2012). Langerhans Cells and T cells Sense Cell Dysplasia in Oral Leukoplakias and Oral Squamous Cell Carcinomas – Evidence of Immunoregulation, *Clinical Immunology*; 136:307-315.
- Pereira MC, Oliveira DT, Landman G, Kowalski LP. (2007). Histologic subtypes of oral squamous cell carcinoma: prognosis relevance. *J Can dent Assoc*; 73:339-44.
- Rabello Piva M, Batista de Souza L, Saquete Martins-Filho P, Weege Nonoka C, De Santanas Santos T, De Souza Andrade E and Piva D. (2013). Role of inflammation in oral carcinogenesis (Part II): CD8, FOXP3, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  and NF- $\kappa$ B expression. *ONCOLOGY LETTERS* 5: 1909-1914.
- Ramirez V, Vásquez-Rosas P, Ramírez- Eyraud P. (2015). Mortalidad por cáncer oral y faríngeo en Chile, años 2002-2010. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral*.
- Rekha KP, Angadi PV. (2010). Verrucous carcinoma of the oral cavity: a clinic - pathologic appraisal of 133 cases in Indians. *Oral Maxillofac Surg*; 14(4): 211-218.
- Riera, P and Martinez. (2005). Morbilidad y mortalidad por cáncer oral y faríngeo en Chile. *Rev Méd Chile*; 133: 555-563.
- Rodrigues F. de Araújo E. Guedes L. Dantas E. (2012). Analysis of inflammatory infiltrate, perineural invasion, and risk score can indicate concurrent metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue. *J Oral Maxillofac Surg* 70:1703-1710.
- Rojas-Alcayaga GG, Brignardello RR, Espinoza II, Franco MEM, Lobos NN, Ortega-Pinto AVA (2010). Oral malignant tumours: a report on 728 cases in Chile. *Acta Odontol Latinoam*. 23(2):136-42.

- Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA (2010) FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 10: 490–500.
- Sakaguchi S. (2010). *Immunology: Conditional stability of T cells.* *Nature* 468: 41-42.
- Sakaguchi S. (2000). *Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance.* *Cell*; 101:455-8.
- Sakaguchi S. (2004). *Naturally arising CD4+ regulatory cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses.* *Annu Rev Immunol* 22: 531-562.
- SAKAGUCHI S, ONO M, SETOGUCHI R, YAGI H, HORI S, FEHERVARI Z, SHIMIZU J, TAKAHASHI K, NOMBRA T. (2006). *Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease* *Immunol. Revs* 212: 8-27.
- SAKAGUCHI S, YAMAGUCHI T, NOMURA T, ONO M. (2008). *Regulatory T cells and immune tolerance.* *Cell* 133: 775-787.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, et al. (2001). *Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance.* *Immunol Rev*; 182:18-32.
- Sarantopoulos S, Lu L, Cantor H. (2004). *Qa-1 restriction of CD8+ suppressor T cells.* *J Clin Invest*; 114:1218-21.

- Schipmann S, Wermker K, Schulze HJ, Kleinheinz J and Brunner G. (2014). Cutaneous and oral squamous cell carcinoma-dual immunosuppression via recruitment of FOXP3+ regulatory T cells and endogenous tumour FOXP3 expression? J Craniomaxillofac Surg. Dec; 42(8):1827-33.
- Seder RA, Marth T, Sieve MC, Strober W, Letterio JJ, Roberts AB, et al. (1998). Factors involved in the differentiation of TGF-beta-producing cells from naive CD4+ T cells: IL-4 and IFN- 187 gamma have opposing effects, while TGF-beta positively regulates its own production. J Immunol; 160:5719-28.
- Silverman S. (2001). Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancer—the outcomes, the trends, the challenge. JADA, Vol. 132.
- Scully C, Bagan JV. Recent advances in Oral Oncology. (2009). Squamous cell carcinoma imaging, treatment prognostication and treatment outcomes. Oral Oncol; 45:e25-30.
- Scully C, Bagan J. (2009). Oral squamous cell carcinoma overview. Oral Oncol; 45:301-8. 26.
- Stewart BW y Wild CP. (2014). World Cancer Report 2014. International Agency for Research on Cancer, 2014. [(Disponible en: <http://www.iarc.fr/>) Consultado: (29 de marzo, 2015)].
- Strauss L, Bergmann C. (2007). Whiteside TL. Functional and phenotypic characteristics of CD4+CD25highFoxp3+ Treg clones obtained from peripheral blood of patients with cancer. Int J Cancer; 121:2473-83.
- Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, et al. (1998). Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally

anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol*; 10: 1969- 80.

- Tanaka H, Tanaka J, Kjaergaard J, Shu S. (2002). Depletion of CD4+ CD25+ regulatory cells augments the generation of specific immune T cells in tumor-draining lymph nodes. *J Immunother*; 25:207-17.
- Turk MJ, Guevara-Patino JA, Rizzuto GA, Engelhorn ME, Houghton AN. (2004). Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. *J Exp Med*; 200:771-82.
- Uppaluri R, Dunn G, Lewis J. Jr. (2008). Focus on tils: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in head and neck cancers. *Cancer Immunity Vol. 8*, p. 16.
- Vergara, U. (2009). Linfocitos T reguladores y respuesta inmune. *Av. Cs. Vet. 24*: 72-79
- Vargas-Ferreira F, Nedel F, Etges A, Gomes AP, Furuse C, Tarquinio SB. (2012). Etiologic factors associated with oral squamous cell carcinoma in non-smokers and non-alcoholic drinkers: a brief approach. *Braz Dent J.*;23(5):586-90.
- Von Boehmer H. (2005). Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol*; 6:338-44.
- Walvekar R. Chaukar D. Deshpande M. Prathamesh S. Chaturvedi P. Kakade A. y cols. (2009). Verrucous carcinoma of the oral cavity: a clinical and pathological study of 101 cases. *Oral Oncology*; 45: 47-51.
- Wang et al. (2012). A Study of Epidemiologic and Recurrence Factors of Oral Cancer. *J Oral Maxillofac Surg* 70:2205-2210.

- Warburton G., Nikitakis N., Roberson P., Marinos N., Wu T., Sauk J. et al. J Oral Maxillofac Surg 65:475-484.
- Warnakulasuriya S (2010). Living with oral cancer: epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. Oral Oncol; 46:407-10.
- Warnakulasuriya S, Johnson NW, Van der Waal I. (2007). Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. J Oral Pathol Med. 36(10):575-80.
- Warnakulasuriya S.( 2009). Global epidemiology of oral and orofaryngeal cancer. Oral Oncology; 45: 309 – 3016.
- Weed DT, Walker G, De La Fuente AC, Nazarian R, Vella JL, et al. (2013) FOXP3 Subcellular Localization Predicts Recurrence in Oral Squamous Cell Carcinoma. PLoS ONE 8(8): e71908. doi:10.1371/journal.pone.0071908.
- Wenig BM (2002). Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: precursors and problematic variants. Mod Pathol 15: 229-254.
- Whiteside TL (2012) What are regulatory T cells (Treg) regulating in cancer and why? Semin Cancer Biol 22:327–334.
- World Health Organization Classification of Tumours (2005). Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Barnes L. Eveson J. Reichart P. Sidransky D. IARC Press Lyon.
- YAMAGUCHI T, SAKAGUCHI S. (2006). Regulatory T cells in immune surveillance and treatment of cancer. Semin. Cancer Biol 16: 115-123.

- Yu-jie Liang, Xiao-mei Lao, Li-zhong Liang and Gui-qing Liao. (2015). Genome-wide analysis of cancer cell-derived Foxp3 target genes in human tongue squamous cell carcinoma cells. *International Journal of Oncology* 46: 1935-1943.
- Zhao J, Wang Z, Han J, Qiu X, Pan J and Chen J. (2014). Increased frequency of CD4+ CD25+ FOXP3+ cells correlates with the progression of 4-nitroquinoline1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. *Clin Oral Invest* (18:1725–1730).
- Zhou X, Su YX, Lao XM, Liang YJ and Liao GQ. (2016). CD19 (+)IL-10(+) regulatory B cells affect survival of tongue **squamous cell carcinoma** patients and induce resting CD4(+) T cells to CD4(+) **Foxp3**(+) regulatory T cells. **Oral Oncol**. Feb; 53:27-35.
- ZIEGLER SF. (2006). FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol* 24: 209-226.

## 11. ANEXOS

### 11.1.- ANEXOS N°1



Santiago, diciembre 10 de 2013  
DEFO N° 0156 / 2013  
Mat.: Aprobación y asignación código FIOUCH

Baños  
Dra. Daniela Adorno Fariás  
Departamento de Patología y Medicina Oral  
Facultad de Odontología  
Preesms

Estimada doctora Adorno:

Me permite informar a usted que su proyecto "Relación entre linfocitos T Reguladores y Natural Killer en el Infiltrado Infeccioso de Cariesomas de Células Escamosas" fue aprobado en el Concurso de Proyectos de Investigación en Odontología FIOUCH 2013.

Dicho proyecto ha recibido el siguiente código de inscripción en la Dirección de Investigación: FIOUCH 13-006. La fecha de inicio es diciembre de 2013 y cuenta con una duración máxima de un año (fecha de término: diciembre de 2014).

Recuerde a usted que, según información entregada el 30 de agosto, todas las compras serán realizadas con el centro de costo de la Dirección de Investigación y las solicitudes de adquisiciones y de salida de bodega, deberán ser firmadas por el Director de Investigación; la Dirección Económica y Administrativa (DEA) recibirá solicitudes de compra para proyectos FIOUCH que no provengan de la Dirección de Investigación.

Por lo señalado anteriormente, solicito a usted hacer llegar a esta Dirección el Formulario de Adquisición completo (se adjunta), con copias en caso de ser necesario e indicar la fecha en que requiere los productos se encuentren en la Facultad.

Para formalizar el inicio del proyecto, solicitamos a usted firmar la carta de compromiso adjunta.

En otro particular, se despide cordialmente de usted,



GONZALO RODRÍGUEZ MARTÍNEZ  
Profesor Asistente  
Director de Investigación

Dirección de Investigación, Sergio Livingstone Pohlhammer, N° 043 3er Piso, Independencia  
Fono: 2278 1845 / E-mail: [investigacion@odontologia.uchile.cl](mailto:investigacion@odontologia.uchile.cl) / <http://odontologia.uchile.cl>

## 11.2.- ANEXO N°2



Comité Institucional de Bioseguridad  
Administración Conjunta Campus Norte  
FDO N°21

Santiago, 02 de Diciembre de 2013.

### C E R T I F I C A D O

El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha analizado el Proyecto de Investigación presentado al Concurso FIOUCH 2013, titulado "**Relación entre linfocitos T reguladores y natural killer en el infiltrado linfocitario de carcinoma de células escamosas**". El Investigador Responsable de este proyecto es la Dra. Daniela Adorno Farias, Académica del Departamento de Patología y Medicina Oral.

Los procedimientos experimentales, que involucran el uso de agentes químicos de riesgo con características irritantes, tóxicas y/o inflamables, se realizarán en el laboratorio de Anatomía Patológica dirigido por la T.M. Montserrat Reyes en la Facultad de Odontología.

El CIB certifica que el laboratorio y la Facultad mencionada anteriormente, cuenta con las facilidades para el manejo y desecho del material 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 de la Dra. Adorno para ser presentado a la Dirección de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

**Dr. Mario Chiong**  
**Secretario**

**Dra. Carla Lozano M.**  
**Presidenta**

Facultad de Odontología. Sergio Livingstone P. 943, Independencia, Fono 9781793-9781832, Fax: 9781748, Santiago.  
<http://odontologia.uchile.cl>  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Sergio Livingstone P. 1007, Independencia, Fono 9781792 Fax: 9781748, Santiago.  
<http://www.quimica.uchile.cl/>

## 11.3.- ANEXO N°3



1. Acta de Aprobación de Protocolo de Estudio N° 2013/23.
2. Miembros del Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile participantes en la aprobación del Proyecto:

**Dra. María Angélica Torres**  
Presidente del CEC

**Dra. Claudia Lefimil Puente**  
Secretaria del CEC

**Dr. Eduardo Rodríguez**  
Miembro permanente del CEC

**Srta. Karin Lagos**  
Miembro permanente del CEC

**Dra. Blanca Urzúa**  
Miembro permanente del CEC

**Dra. Ximena Lee**  
Miembro permanente del CEC

3. Fecha de Aprobación: 28/08/2013
4. Título completo del proyecto: "Relación entre linfocitos T Reguladores y Natural Killer en el infiltrado linfocitario de Carcinoma de Células Escamosas". Proyecto Fiouch. Versión 21/08/2013.
5. Investigador responsable: Dra. Daniela Adorno.
6. Institución: Departamento de Patología y Medicina Oral, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.
7. Documentación Revisada:
  - CV del Investigador principal y del Investigador Alterno.
  - Autorización del Director del Departamento de Patología y Medicina Oral para el uso de material biológico almacenado en el Biobanco del Departamento.

#### 8. Fundamentación de la aprobación:

El cáncer oral representa uno de los diez cánceres más prevalentes en el mundo, siendo el carcinoma de células escamosas el que más afecta la cavidad oral. Diversos protagonistas de la respuesta inmune están implicados en el desarrollo y pronóstico de cáncer. Las Natural Killer son células de la respuesta inmune innata encargadas de la vigilancia y lisis antitumoral. Por otro lado, los linfocitos T reguladores, implicados en suprimir una potente e ideal respuesta antitumor, han sido descritos como fundamentales en la progresión tumoral. Existe poca evidencia del papel que tendrían estas células en el cáncer oral por lo que se torna necesario generar mayor información al respecto. El objetivo de este trabajo es identificar la relación entre la presencia de linfocitos T reguladores y células Natural Killer en el infiltrado linfocitario de carcinoma de células escamosas oral, así como su relación con la progresión de este cáncer. Esto podría permitir mayor precisión en el pronóstico de los pacientes, y por otro lado, nuevas herramientas en la búsqueda de terapias complementarias anti tumor.

Las muestras a utilizar corresponden a biopsias mantenidas en el Biobanco del Departamento de Patología y Medicina Oral. El estudio tiene validez científica, es de interés y los investigadores tienen experiencia en el tema.

Este comité ha emitido una evaluación de este proyecto basado en la capacidad de los comités éticos científicos de decidir la legitimidad ética de una investigación que usa muestras y datos de ficha clínica anonimizados sin consentimiento informado, cuando la investigación no es de riesgo. De otro modo, sería impracticable y no se podría responder a una pregunta importante de investigación de acuerdo a pautas éticas internacionales (Pautas CIOMS 2008 de Estudios Epidemiológicos) en y dada la ausencia de legislación específica en Chile, ya que el artículo 13 de la ley 20.584 no hace referencia a investigación retrospectiva en fichas clínicas y bases de datos y se refiere más bien a temas de salud poblacional y ensayos clínicos.

En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, Aprueba el estudio "Relación entre linfocitos T Reguladores y Natural Killer en el infiltrado linfocitario de Carcinoma de Células Escamosas". Proyecto Fiouch. Versión 21/08/2013, bajo la conducción de la Dra. Daniela Adorno, del Departamento de Patología y Medicina Oral, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

Este Comité se reserva el derecho de monitorear este proyecto si lo considera necesario y el investigador deberá, bajo mutuo acuerdo, presentar los antecedentes solicitados.

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



*[Handwritten signature]*  
Dra. María Angélica Torres V.

Presidente C.E.C.