



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL  
ÁREA DE PATOLOGÍA ESTOMATOLÓGICA**

**“ PRESENCIA DE CÉLULAS NATURAL KILLER EN LOS DISTINTOS GRADOS  
DE DIFERENCIACIÓN HISTOPATOLÓGICA DE CARCINOMA ORAL DE  
CÉLULAS ESCAMOSAS, CARCINOMA VERRUCOSO Y MUCOSA ORAL  
NORMAL”**

**Javier Ignacio Riquelme Torres**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Dra. Daniela Adorno Farías**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Prof. Dra. Marcela Farías Vergara**

**Prof.T.M. Montserrat Reyes Rojas**

**Adscrito a Proyecto FIOUCH:13-008**

**Santiago – Chile**

**2016**





**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL  
ÁREA DE PATOLOGÍA ESTOMATOLÓGICA**

**“ PRESENCIA DE CÉLULAS NATURAL KILLER EN LOS DISTINTOS GRADOS  
DE DIFERENCIACIÓN HISTOPATOLÓGICA DE CARCINOMA ORAL DE  
CÉLULAS ESCAMOSAS, CARCINOMA VERRUCOSO Y MUCOSA ORAL  
NORMAL”**

**Javier Ignacio Riquelme Torres**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Dra. Daniela Adorno Farías**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Prof. Dra. Marcela Farías Vergara**

**Prof.T.M. Montserrat Reyes Rojas**

**Adscrito a Proyecto FIOUCH:13-008**

**Santiago – Chile**

**2016**

## **AGRADECIMIENTOS**

A cada una de las personas que de alguna u otra forma fueron parte de la oportunidad y/o el proceso que tuve de recibir una formación profesional de calidad.

## ÍNDICE

<b>I INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II MARCO TEÓRICO</b>	2
II.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER ORAL	2
II.2 DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DEL CÁNCER ORAL	3
II.3 CARCINOMA VERRUCOSO	10
II.4 INMUNOLOGÍA Y CÁNCER	11
<b>III HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	15
III.1 HIPÓTESIS	15
III.2 OBJETIVOS	15
<b>IV MATERIALES Y MÉTODOS</b>	16
IV.1 TIPO DE ESTUDIO	16
IV.2 ASPÉCTOS ÉTICOS Y BIOSEGURIDAD	16
IV.3 FUENTE DE INFORMACIÓN	16
IV.4 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	16
IV.5 RECOLECCION DE DATOS	17
IV.6 TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) PARA LA DETECCIÓN DE CD 56	18
IV.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22
<b>V RESULTADOS</b>	23
V.1 DATOS CLÍNICOS DE LAS MUESTRAS	23
V.2 DATOS CLÍNICOS Y CUANTIFICACIÓN DE NK EN MUCOSA ORAL SANA (MS)	26
V.3 DATOS CLÍNICOS Y CUANTIFICACIÓN DE NK EN CARCINOMA VERRUCOSO (CV).	29
V.4 DATOS CLÍNICOS Y CUANTIFICACIÓN DE NK EN CARCINOMA ORAL ESPINOCELULAR BIEN DIFERENCIADO (COCE BD).	32
V.5 DATOS CLÍNICOS Y CUANTIFICACIÓN DE NK EN CARCINOMA ORAL ESPINOCELULAR MODERADAMENTE DIFERENCIADO (COCE MD).	35
V.6 DATOS CLÍNICOS Y CUANTIFICACIÓN DE NK EN CARCINOMA ORAL ESPINOCELULAR POBREMENTE DIFERENCIADO (COCE PD).	38
V.7 ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE LOS SUBTIPOS DE COCE, CV Y MS EN RELACIÓN A CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS NK.	41
<b>VI DISCUSIÓN</b>	45
<b>VII CONCLUSIONES</b>	51
<b>VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	52
<b>IX ANEXOS</b>	60

## Resumen

**Introducción:** Carcinoma oral de células escamosas (COCE) representa más del 90% de las neoplasias que afectan a la cavidad oral. En la respuesta inmune, a las células Natural Killers (NK), se les atribuye el rol de primera línea defensiva contra células tumorales. La relación entre la respuesta inmune local y el comportamiento biológico neoplásico es un proceso dinámico y controversial. Profundizar conocimientos entre la respuesta antitumoral y la etiopatogenia del COCE, en el ámbito celular y molecular, resulta fundamental para abordar de mejor manera el cáncer oral. El objetivo de este estudio es comparar la presencia de células NK en los distintos grados de diferenciación histopatológica del COCE, carcinoma verrucoso (CV) y mucosa oral sana (MS) con el fin de establecer una relación entre ellos.

**Materiales y Métodos:** Se analizaron 31 muestras de COCE, 11 muestras de CV y 6 muestras de MS desde el Servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, a las cuales se les realizó técnica inmunohistoquímica (IHQ) con el anticuerpo CD56 para detección de células NK. El análisis de inmunotinción se evaluó mediante microscopio óptico al 40X. Se tomaron 4 fotos continuas por muestra para realizar la cuantificación de células NK total. Se utilizó el test de Mann-Whitney para análisis comparativo de células NK entre los grupos y T-student para caracterizar la muestra. El análisis estadístico se realizó utilizando el software Stata 11.0.

**Resultados:** Los subtipos de neoplasias malignas analizadas presentaron mayor cantidad de células NK total al compararlos con MS, estas diferencias fueron estadísticamente significativas, excepto para CV. El COCE pobremente diferenciado presentó la mayor cantidad de células NK total al compararlo con los otros grupos de estudio, siendo estas diferencias estadísticamente significativas con MS y CV.

**Conclusiones:** Resultados muestran una asociación que a medida que el cáncer es más indiferenciado la cantidad de células NK total aumenta. Se necesitan más estudios con mayor número de muestras que respalden esta tendencia.

## I INTRODUCCIÓN

En el año 2012 se estimaron 14.1 millones de nuevos casos de cáncer y 8.1 millones de muertes por la misma enfermedad en el mundo. Para el año 2030 se espera un crecimiento de esta cifra, que alcanzaría los 21.7 millones de nuevos casos y 13 millones de muertes (American Cancer Society, 2015). El cáncer oral y faríngeo en conjunto, se encuentran como el sexto cáncer más común en el ámbito mundial (Warnakulasuriya, 2010; Rhodus y cols., 2014). En países con altas tasas de incidencia para cáncer oral (sur de Asia), éste contribuye con más del 25 % del total de nuevos casos en dichas regiones, representando además el cáncer más común en hombres (Warnakulasuriya, 2009). El carcinoma oral de células escamosas (COCE) representa más del 90% de los casos que afectan la cavidad oral (World Health Organization Classification of Tumours, 2005; Bagan y cols., 2010; Binmadi y cols., 2011; Rodrigues y cols., 2012).

En condiciones ideales y en etapas tempranas, el sistema inmune es capaz de reconocer y destruir clones de células transformadas antes de que se conviertan en tumores o provocar la lisis de estos, una vez formados (Jewett y cols., 2006; Abbas y cols., 2011). La relación existente entre el cáncer y el hospedero es un proceso dinámico y controversial. Por ende, mejorar los conocimientos actuales en relación al efecto real de la respuesta inflamatoria del sistema inmune ante la invasión neoplásica, resulta un objetivo lógico y teóricamente posible (Abbas y cols., 2011; Arriagada y cols., 2010).

Aclarar el rol supresor de los protagonistas de la respuesta antitumoral en la etiopatogenia del COCE tanto en el ámbito celular como molecular, resalta como alternativa para generar herramientas concretas que aporten en la búsqueda de nuevas terapias antitumorales, que complementen las existentes y contribuyan en la prevención del cáncer.

## **II MARCO TEÓRICO**

### **II.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER ORAL**

Las enfermedades no contagiosas en la actualidad han experimentado una gran alza en el mundo. Dentro de éstas encontramos el cáncer, que ha incrementado su incidencia de 12.7 millones el 2008 a 14.1 millones en 2012. Además se estima que en las próximas dos décadas, el número de afectados por esta enfermedad podría alcanzar 25 millones (Stewart y Wild, 2014). Según la Sociedad Americana del Cáncer, éste se define como: “Un grupo de enfermedades caracterizadas por un crecimiento descontrolado y una propagación de células anormales, dónde una proliferación no controlada, puede resultar en muerte. Causadas por factores externos, como tabaco, infecciones del organismo y una dieta no saludable, y por factores internos, como mutaciones genéticas heredadas, hormonas y condiciones inmunes. Estos factores pueden causar cáncer, actuando de manera simultánea o de forma secuencial” (American Cancer Society, 2015).

El Cáncer oral y faríngeo en conjunto, representan el sexto lugar de los cánceres más comunes en el mundo (Warnakulasuriya, 2010; Rhodus y cols., 2014). En el sur de Asia, se encuentran los países con las tasas de incidencia más altas de cáncer oral, dentro de los cuales destacan: India, Sri Lanka, Bangladesh y Pakistán; los cuales contribuyen con más del 25% del total de los nuevos casos de cáncer. También destacan países como Hungría, Eslovaquia, Eslovenia, Brasil, Uruguay, Puerto Rico, Papúa Nueva Guinea y Melanesia, por sus altas tasas de incidencias (Warnakulasuriya, 2010).

El cáncer oral es más frecuente en hombres que en mujeres (World Health Organization Classification of Tumours, 2005; Scully y Bagan, 2009; Warnakulasuriya, 2010), el riesgo de desarrollarlo incrementa con la edad y la mayoría de los casos ocurren en personas mayores a 50 años (Warnakulasuriya, 2010; Vargas-Ferreira y cols., 2012). En Chile, entre 1955 y 2002, la mortalidad por cáncer oral y faríngeo, representó alrededor del 1% de todos los cánceres

(Riera y Martínez, 2005).

Ramírez y cols. 2015 reportaron que entre los años 2002 y 2010, las tasas de mortalidad por cáncer oral y faríngeo en Chile, fluctuaron entre 1,11 a 1,25 por 100.000 habitantes, manteniéndose estables a lo largo del período. En relación al género, ellos reportaron una mayor tasa de mortalidad en la población masculina que en la femenina, de forma similar a Europa, Estados Unidos y México, con una relación hombre-mujer de 2,3:1, razón que disminuyó respecto a la observada antes del año 2002 (2,8:1) (Ramírez y cols., 2015).

Más del 90% de los cánceres que afectan a la cavidad oral son Carcinomas de células escamosas (CCE) (World Health Organization Classification of Tumours, 2005; Bagan y cols., 2010; Binmadi y cols., 2011; Rodrigues y cols., 2012). En nuestro país, el Instituto de Referencia de Patología Oral (IREPO) de la Universidad de Chile señala que 58,6% de las neoplasias malignas orales diagnosticadas corresponden a CCE (Rojas-Alcayaga y cols., 2010).

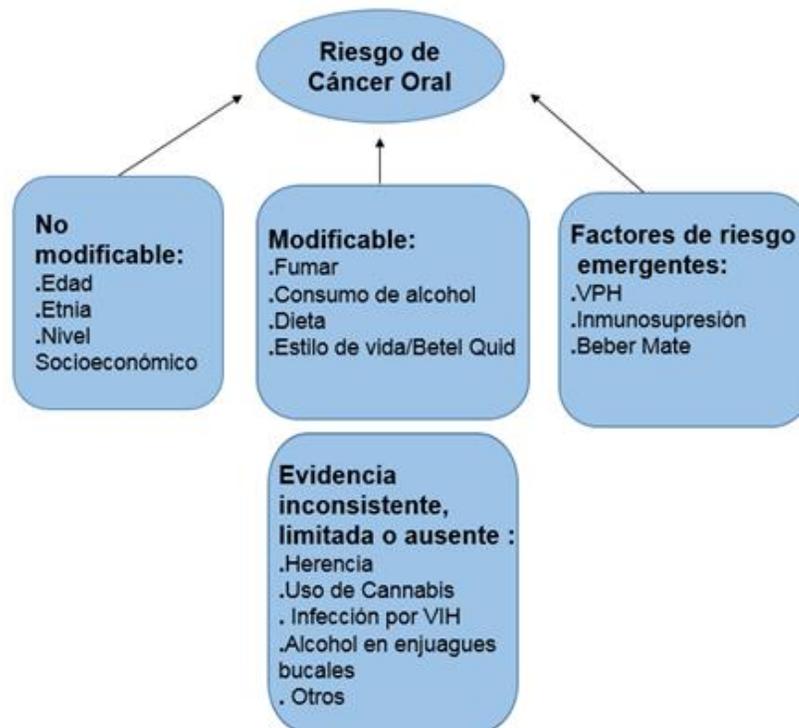
## ***II.2 DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DEL CÁNCER ORAL***

En la literatura el CCE es nombrado también como carcinoma espinocelular, epidermoide o escamoso. La organización mundial de la salud (OMS) define al carcinoma oral de células escamosas (COCE), como una “Neoplasia epitelial invasiva con variables grados de diferenciación escamosa, propensa a una temprana y extensa metástasis hacia linfonodos, produciéndose predominantemente en adultos entre la quinta y sexta década de vida, consumidores de alcohol y tabaco” (World Health Organization Classification of Tumours, 2005).

### **II.2A Etiología de Cáncer Oral**

La etiología del COCE no está definida, pero se le atribuyen múltiples factores (Neville y cols., 2009; Warnakulasuriya, 2010; Vargas-Ferreira y cols., 2012). Estos se pueden observar en la Figura 1, según su respectiva categoría

(Warnakulasuriya, 2009). Dentro de los principales factores de riesgo se encuentran: hábito de fumar/masticar tabaco y elevado consumo de alcohol (Neville y cols., 2009; Petti, 2009; Scully y Bagan, 2009; Vargas-Ferreira y cols., 2012; El-Mofty, 2014), los cuales, en asociación y/o en exceso por largos periodos de tiempo potencian el riesgo de aparición del COCE (Neville y cols., 2009; Petti, 2009). El “Betel Quid”, fruto envuelto en hojas que se mastica por sus efectos psicoactivos, es un hábito frecuente en islas del Pacífico y el sur de Asia, así como el bajo consumo de frutas y verduras son también considerados como factores de riesgo (Petti, 2009). En el mundo, 25% de los cánceres orales se asocian al uso del tabaco, 7%-19% al consumo de alcohol, 10%-15% a deficiencias nutricionales y 50% al masticar Betel Quid en países donde es común este hábito (Petti, 2009). La infección con Virus Papilloma Humano (VPH) es un factor de riesgo relacionado principalmente con cáncer orofaríngeo, el mecanismo por el cual este virus puede inocular en la cavidad oral resulta controversial, pero algunos autores han especulado como contribuidor las prácticas sexuales (Warnakulasuriya, 2009; El-Mofty, 2014).



**Figura 1:** Cáncer oral y factores de riesgo. Figura modificada de Warnakulasuriya, 2009.

## **II.2B Características Clínicas de Cáncer Oral**

El COCE puede comprometer cualquier sitio de la cavidad oral. Entre las localizaciones más frecuentes se encuentran: lengua (cara ventral y borde lateral) y piso de boca (Bagan y cols., 2010; Rhodus y cols., 2014). Paladar blando, encías, mucosa yugal, mucosa labial y palar duro son sitios donde es menos probable encontrar esta neoplasia (Neville y cols., 2009). Clínicamente el tamaño de las lesiones de COCE varía de unos pocos milímetros a varios centímetros en los casos más severos (Bagan y cols., 2010).

En etapas iniciales la presencia de lesiones orales aisladas con más de 3 semanas de evolución, sin causa aparente y usualmente asintomáticas, constituye un motivo de sospecha (Bagan y cols., 2010). Dentro de éstas, destacan las leucoplasias y eritoplasias (Bagan y cols., 2010), descritas como manchas blancas y rojas, respectivamente, o una mezcla de ambas; que no se desprenden al raspado y no presentan causa aparente (Rhodus y cols., 2014). En etapas más avanzadas es frecuente encontrar úlceras con bordes irregulares e indurados, masas exofíticas, adheridas a planos profundos, de superficies rugosas y muy firmes a la palpación, las cuales pueden estar asociadas a dolor, sangramiento, parestesia y metástasis en linfonodos regionales (Bagan y cols., 2010; Rhodus y cols., 2014). El diagnóstico precoz de esta patología es poco frecuente por la poca sintomatología que presenta, provocando generalmente que los pacientes consulten cuando las lesiones han alcanzado gran tamaño, lo que implica un peor pronóstico y tratamientos más invasivos (Bagan y cols., 2010; Rhodus y cols., 2014).

## **II.2C Histología del Cáncer Oral**

Se reconoce que una parte de los COCE puede tener origen a partir de lesiones presentes en mucosa oral con potencial de transformación maligna. Dentro de éstas, se encuentran principalmente leucoplasias y eritropias, las cuales muestran distintos grados de displasia en su conformación histológica (Huber y Tantiwongkosi, 2014).

La displasia es un término histopatológico que se aplica cuando existen alteraciones arquitectónicas y celulares (variaciones en la forma y tamaño celular) en el epitelio, las cuales provocan que el riesgo de desarrollar un carcinoma sea mayor comparado con una mucosa normal (Warnakulasuriya y cols., 2008).

En la **Tabla 1** se describen las alteraciones epiteliales desde una hiperplasia hasta un carcinoma *in situ*, de acuerdo la clasificación de la OMS.

**Tabla 1:** Resumen de las alteraciones a nivel epitelial según OMS 2005. World Health Organization Classification of Tumours, 2005.

<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.

El COCE se origina por una alteración genética (mutaciones del genoma) del queratinocito oral (Scully y Bagan, 2009). Las mutaciones generadas para producir una displasia (presente en lesiones potencialmente malignas), no serían las mismas que ocurren al instaurarse un proceso tumoral. El mayor número de mutaciones aumenta el riesgo de aparición de la mutación puntual que genera una célula cancerígena. Esto no descarta el hecho de desarrollar un carcinoma en ausencia de displasia previa (Warnakulasuriya y cols., 2008).

Entre las principales características del CCE se describen una formación variable de perlas de queratina y un crecimiento epitelial invasivo, el cual se manifiesta con una ruptura de la membrana basal y una extensión de la invasión hacia el tejido subepitelial, alterando la arquitectura de las capas epiteliales basales, las cuales son reemplazadas por células irregulares más largas con procesos citoplasmáticos que se extienden hacia el tejido conectivo subepitelial. Para un diagnóstico histopatológico más asertivo el análisis en detalle entre la interface epitelio-tejido conectivo, es esencial, lo cual, muchas veces se dificulta por la presencia de un prominente infiltrado inflamatorio que acompaña al CCE (World Health Organization Classification of Tumours, 2005).

El método habitual para catalogar esta neoplasia, adoptado por la organización mundial de la salud (OMS), consiste en una evaluación microscópica subjetiva que clasifica al CCE en subtipos histológicos según su grado de diferenciación en: bien diferenciado, moderadamente diferenciado y pobremente diferenciado. En la **Tabla 2** se puede observar en detalle la clasificación, donde parámetros como grado de queratinización, actividad mitótica y pleomorfismo nuclear y celular son considerados (World Health Organization Classification of Tumours, 2005). El valor de esta clasificación histológica es controversial, y muchos autores reconocen que un análisis microscópico aislado se correlaciona pobremente con el resultado y la respuesta al tratamiento del CCE (Woolgar, 2006; Pereira y cols., 2007).

**Tabla 2:** Grado de diferenciación histológico. World Health Organization Classification of Tumours, 2005.

<b>Bien diferenciado</b>	Guarda estrecha relación morfológica con epitelio escamoso normal, presentando clara diferenciación escamosa.
<b>Moderadamente diferenciado</b>	Presenta actividad mitótica importante y pleomorfismo nuclear irregular, mitosis anormales y usualmente una menor queratinización.
<b>Pobremente diferenciado</b>	Células predominantemente inmaduras, numerosas mitosis típicas y atípicas, mínima queratinización.

## **II.2D Tratamiento de Cáncer Oral**

Dentro de las principales modalidades terapéuticas para el cáncer oral y faríngeo encontramos: intervención quirúrgica, radioterapia y quimioterapia (Glenny y cols., 2010; Huber y Tantiwongkosi, 2014). El uso por separado o en conjunto de las alternativas del tratamiento depende de factores como: tamaño, localización y estadiaje del tumor primario. Además, se debe considerar estado nutricional, capacidad para tolerar el tratamiento, las enfermedades presentes y las decisiones del paciente (Huber y Tantiwongkosi, 2014). El manejo de cada caso, se realiza de manera particular y con un equipo multidisciplinario para abordar de mejor manera el cuadro que presenta el paciente (Wolff y cols., 2012; Huber y Tantiwongkosi, 2014). Para planear el tratamiento, comparar los resultados de éste e incluso para el pronóstico, el estadío es muy útil, para lo cual, se utiliza el sistema de clasificación TNM (Huber y Tantiwongkosi, 2014), que 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 (Huber y Tantiwongkosi, 2014). Dentro de las limitaciones de esta clasificación se encuentra que no considera la edad del paciente, sitio anatómico de la lesión, ni factores de riesgo presentes en el individuo, que hayan podido perpetuar la lesión (Arriagada y cols., 2010). El seguimiento de los pacientes que sufren de cáncer oral 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 y cols., 2012).

## **II.2E Pronóstico de Cáncer Oral**

El pronóstico del COCE depende de factores relacionados con el tumor, el tratamiento y el paciente (Scully y Bagan, 2009). El tamaño del tumor y estado ganglionar destacan entre los factores pronósticos determinantes (World Health Organization Classification of Tumours, 2005; Kademani, 2007). Sin embargo, el compromiso de ganglios linfáticos se considera como el factor predictor más importante en la tasa de supervivencia de los pacientes, la cual disminuye cerca de un 50% cuando existe metástasis ganglionar (Grimm, 2012). El grosor del tumor y la invasión vascular son otras de las características que se asocian con un pobre

pronóstico (World Health Organization Classification of Tumours, 2005).

Uno de los principales métodos de evaluación pronóstica es el sistema de clasificación TNM, que clasifica según etapas (tempranas I –II o tardías III-IV), si los tumores se encuentran en fases incipientes o avanzadas de la enfermedad, contribuyendo a predecir el pronóstico y la planificación del tratamiento (Huber y Tantiwongkosi, 2014). En Chile, un estudio del Instituto Nacional del Cáncer reportó que la sobrevida del cáncer oral fue de 57% a los 5 años, disminuyendo a 46% a los 10 años. Al evaluar la sobrevida por estadios, pacientes diagnosticados en etapa I arrojaron un 85,7%, la que disminuyó a 50,6% para los pacientes diagnosticados en etapa IV (Bórquez y cols., 2011). Frecuentemente los tumores en etapas tempranas se relacionan con una mayor sobrevida, menores complicaciones en el tratamiento y un mejor pronóstico (Scully y Bagan, 2009). A pesar de lo anterior, se han reportado tumores con similares estadios con patrones de crecimiento y comportamientos clínicos distintos. Por lo tanto, resulta difícil pronosticar con exactitud utilizando solamente el estadio clínico (Sharma M. y cols., 2013).

Es así, como las características anatomopatológicas de los tumores han ido tomando importancia, ya que de estas se desprende información útil para el pronóstico. Tomando en cuenta que estas características pueden diferir ampliamente de un área a otra dentro del mismo tumor, el frente de invasión tumoral (FIT), la zona donde residen las células más profundas y presumiblemente más agresivas, es considerado como la región más representativa de la neoplasia (Arriagado y cols., 2010; Sharma y cols., 2013).

En general los carcinomas en etapas tempranas, bien diferenciados y que no han producido metástasis tienen un mejor pronóstico, pero desafortunadamente la mayoría de los COCE son detectados en etapas tardías (Scully y Bagan, 2009). Las investigaciones recientes buscan complementar los hallazgos clínicos y los estudios histopatológicos con eventos y/o biomarcadores moleculares que se relacionan con la etiopatogenia del COCE. Algunos genes

supresores de tumores, moléculas de adhesión, oncogenes, marcadores angiogénicos y de proliferación celular han sido estudiados como potenciales herramientas para contribuir al diagnóstico, pronóstico y tratamiento de los pacientes que sufren esta enfermedad. Sin embargo la relevancia de estas nuevas alternativas es debatible, requiere de una mayor estandarización y de futuras investigaciones (Oliveira y Ribeiro-Silva, 2011).

### **II.3 CARCINOMA VERRUCOSO**

El carcinoma verrucoso (CV) es una variante del carcinoma de células escamosas (CCE) bien diferenciado (World Health Organization Classification of Tumours, 2005; Adorno D. y cols., 2010; Tereda, 2011). La cavidad oral es el sitio más prevalente de esta patología en cabeza y cuello representando el 75% de los casos, seguido por la laringe con un 15%. Se encuentra principalmente en encía, mucosa alveolar y yugal. Presenta mayor predilección por el sexo masculino, entre la sexta y séptima década de vida (Rekha y Angadi, 2010). De etiología desconocida, el CV se ha asociado al consumo de tabaco y al Virus Papiloma Humano (VPH) (Tereda, 2011; Candau y cols., 2014).

Clínicamente se presenta como una masa exofítica con múltiples prominencias y profundas hendiduras. De crecimiento lento, agresivo localmente y bien delimitado, es considerado un carcinoma con capacidad limitada de dar metástasis (Adorno D. y cols., 2010). Histológicamente el CV se caracteriza por la presencia de un epitelio extremadamente engrosado, con papilas epiteliales-bulbosas que se invaginan hacia el estroma y una superficie con marcada hiperparaqueratinización. La lesión es diferenciada, habitualmente no presenta atipias, pudiendo encontrarse displasia leve. La membrana basal se encuentra íntegra y se observan cambios inflamatorios crónicos en el conectivo subyacente (World Health Organization Classification of Tumours, 2005; Rekha y Angadi, 2010). La escisión quirúrgica es el tratamiento de elección para el CV oral. Sin embargo, quimioterapia por si sola o en combinación con radioterapia han sido empleadas como tratamiento inicial (Rekha y Angadi, 2010).

## **II.4 INMUNOLOGÍA Y CÁNCER**

La letalidad de los tumores malignos está determinada en gran parte por la irregular actividad proliferativa, la resistencia a la muerte celular por apoptosis, la capacidad de invadir los tejidos del huésped y producir metástasis en localizaciones distantes por parte de las células tumorales (Abbas y cols., 2011). Macfarlane Burnet en los años cincuenta propuso el concepto de vigilancia inmunitaria, el cual señala que una función fisiológica del sistema inmune es reconocer y destruir los clones de células transformadas antes de que se conviertan en tumores o eliminarlos después de que se hayan formado (Jewett y cols., 2006; Abbas y cols., 2011). La existencia de la vigilancia inmunitaria se ha demostrado por el aumento de la incidencia de algunos tipos de tumores en animales de experimentación y seres humanos inmunocomprometidos, que padecen de inmunodeficiencias y/o inmunosupresiones (Jewett y cols., 2006; Abbas y cols., 2011; Schreiber y cols., 2011; Boland y cols., 2014; Casey y cols., 2014).

Aunque existe evidencia de la existencia de la inmunovigilancia contra los tumores, individuos inmunocompetentes desarrollan cáncer. Esta realidad clínica se puede explicar ya que, si bien el sistema inmune es capaz de controlar o eliminar algunos cánceres en etapas tempranas, con el tiempo, las células del tumor bajo la presión inmune, pueden tornarse selectivas y resistentes, regulando la respuesta inmune innata y adaptativa desde su activación hasta su fase efectora, proceso conocido como inmunoedición (Jewett y cols., 2006; Stagg y cols., 2007; Schreiber y cols., 2011).

El rol de la vigilancia inmunitaria en la formación de tumores ha sido controversial (Abbas y cols., 2011; Schreiber y cols., 2011), actualmente es evidente que la respuesta innata y adaptativa del sistema inmune se produce frente a diversas neoplasias (Abbas y cols., 2011). Aprovechar estas reacciones para destruir específicamente los tumores sigue siendo un objetivo importante para combatir este tipo de patologías (Stagg y cols., 2007; Abbas y cols., 2011; Schreiber y cols., 2011).

#### **II.4A Células Natural Killer**

Dentro de la respuesta inmune innata se encuentran las células citolíticas naturales o Natural Killer (NK) (Robertson y Ritz, 1990; Wallace y Smith, 2005), que pertenecen a una subpoblación de linfocitos altamente heterogénea, derivadas de la médula ósea y que comparten la línea filogenética con los linfocitos T (Robertson y Ritz, 1990). En la sangre periférica representan un 10-15%, morfológicamente presentan gránulos azurófilos en su citoplasma y son más grandes que los linfocitos T y B (Abbas y cols., 2011). Poseen la capacidad de lisar distintas células tumorales y células infectadas por virus sin la necesidad de sensibilización previa (Abbas y cols., 2011; Vivier y cols., 2008). Se les atribuye el rol de primera línea defensiva contra células neoplásicas o infectadas por virus (Abbas y cols., 2011; Vivier y cols., 2008).

Las células NK expresan proteínas en sus membranas que son específicas y son utilizadas como marcadores fenotípicos para distinguirlas entre distintas poblaciones de linfocitos. Las células NK se reconocen por la expresión en su membrana plasmática de la proteína CD56 (Wallace y Smith, 2005). Se distinguen 2 subtipos, las NK CD56 bright y las NK CD56 dim (Wallace y Smith, 2005; Vivier y cols., 2008). Las NK CD56 bright se caracterizan por una mayor capacidad de liberar citoquinas, tales como: interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), interleuquinas (IL-5, IL-10, IL-13, entre otras) y quimioquinas, adjudicándose un rol inmunoregulador importante. Las NK CD56 dim se caracterizan por presentar una mayor capacidad citotóxica, presentando abundantes cúmulos de perforinas y granzimas en su citoplasma (Wallace y Smith, 2005).

#### **II.4B Respuesta inmune, CCE y NK**

El crecimiento de la masa tumoral en el CCE, está frecuentemente acompañado de infiltrado inflamatorio denso (Pereira y cols., 2007), el cual representa la respuesta del estroma en presencia de neoplasias malignas y es considerado como una expresión de interacciones entre el sistema inmune del

huésped y el tumor (Arriagada y cols., 2010). El infiltrado inflamatorio se compone predominantemente de macrófagos, células Natural Killer, mastocitos, linfocitos, eosinófilos, células endoteliales y fibroblastos (Oliveira y Ribeiro- Silva, 2011). 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 quimiotácticos, por parte del hospedero y del propio tumor (Oliveira y Ribeiro-Silva, 2011). La infiltración de células inmunes y el patrón de inflamación en el microambiente del tumor podrían contribuir a la inhibición del crecimiento tumoral, sin embargo, algunos autores postulan que también ayudarían a la progresión y metástasis del cáncer (Oliveira y Ribeiro-Silva, 2011). Feller y cols. 2013 señalan que en cánceres establecidos, las células cancerígenas inducen el desarrollo de un estado inflamatorio exagerado en el estroma, promoviendo crecimiento, invasión y metástasis neoplásica, dónde factores de transcripción específicos actúan como nexo entre la inflamación y el cáncer. Estos factores una vez activados, tienen la capacidad de aumentar la expresión de genes que son comunes para la producción y regulación de mediadores inflamatorios, así como también para controlar la supervivencia y proliferación de las células cancerígenas (Feller y cols., 2013). Por su parte, otros autores asocian una mayor inflamación crónica del estroma con un mejor pronóstico de la enfermedad y con la ausencia de metástasis (Brandwein- Gensler y cols., 2005; Chatzistamou y cols., 2010). Matos y cols. 2012 apoyan esta sugerencia al encontrar que un bajo infiltrado linfocítico se asoció con metástasis ganglionar en COCE de lengua (Matos y cols., 2012). En la actualidad no se ha podido establecer con claridad el rol de las células que están involucradas en la promoción de la progresión del tumor o en su destrucción (Pereira y cols., 2007).

Existen estudios que demuestran vinculación entre las células NK y el CCE. Dentro de éstos, se ha demostrado que frente una mayor presencia de NK en sangre periférica en pacientes con CCE de cabeza y cuello, mejor pronóstico (Böttcher y cols., 2013). También se evidenció una mayor cantidad de NK en CCE de bermellón de labio, al ser comparado con CCE de mucosa oral (Zancope y cols., 2010). Por otro lado, Lee y cols. 2010 concluyen que la distribución y el

número de NK incrementan gradualmente en respuesta al crecimiento del tumor y a la metástasis durante la carcinogénesis oral, posiblemente vía una respuesta inmune adaptativa (Lee y cols., 2010).

Considerando los antecedentes expuestos anteriormente, se puede observar que el efecto real de la respuesta inflamatoria local frente la invasión neoplásica sigue siendo controversial. Por lo tanto, esclarecer el rol de los protagonistas en la progresión y/o inhibición del COCE se hace necesario para poder generar un mayor conocimiento de esta neoplasia. El presente trabajo busca determinar y comparar la presencia de células NK en COCE con distintos grados de diferenciación histopatológica, en carcinoma verrucoso y mucosa oral sana, con la finalidad de establecer alguna relación que permita aportar al conocimiento que se tiene sobre estas patologías y su vinculación con el sistema inmune del hospedero, contribuyendo con herramientas concretas en la búsqueda de nuevas terapias antitumorales.

### **III HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### ***III.1 HIPÓTESIS***

En Carcinoma oral de células escamosas pobremente diferenciado se observa mayor presencia de células Natural Killer en comparación a los otros subtipos histopatológicos, Carcinoma Verrucoso y mucosa oral sana.

#### ***III.2 OBJETIVOS***

##### **OBJETIVO GENERAL**

Cuantificar y comparar la presencia de células Natural Killer en los distintos grados de diferenciación histopatológica de Carcinomas oral de células escamosas, Carcinoma Verrucoso y mucosa oral sana.

##### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar y cuantificar la presencia de células Natural Killer en mucosa oral sana.
- Determinar y cuantificar la presencia de células Natural Killer en Carcinoma Verrucoso.
- Determinar y cuantificar la presencia de células Natural Killer en Carcinoma oral de células escamosas bien diferenciado.
- Determinar y cuantificar la presencia de células Natural Killer en Carcinoma oral de células escamosas moderadamente diferenciado.
- Determinar y cuantificar la presencia de células Natural Killer en Carcinoma oral de células escamosas pobremente diferenciado.
- Comparar las cuantificaciones de células Natural Killer en los diferentes grados de diferenciación histopatológica de Carcinoma oral de células escamosas, Carcinoma Verrucoso y mucosa oral sana.

## **IV MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***IV.1 TIPO DE ESTUDIO***

El diseño de este estudio fue de tipo observacional descriptivo de corte transversal.

### ***IV.2 ASPÉCTOS ÉTICOS Y BIOSEGURIDAD***

Este estudio se enmarca en el proyecto FIOUCH 13-008: “Presencia de Células Natural Killer en los distintos grados de diferenciación histopatológica de Carcinoma oral de células escamosas, Carcinoma Verrucoso y mucosa oral normal”, aprobado por el Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Anexo nº 1 y 2) y por el Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) de la Universidad de Chile, administración conjunta Campus Norte (Anexo nº 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.

### ***IV.3 FUENTE DE INFORMACIÓN***

Desde la base de datos del Servicio de Anatomía Patológica (SAP), Departamento de Patología y Medicina Oral, 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.

### ***IV.4 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA***

El estudio contempló un muestreo de tipo no probabilístico, por conveniencia, en que se seleccionaron un total de 48 muestras de biopsias incisionales del SAP de la FOUCH, entre los años 1985 y 2013. Del total de las muestras, 11 tenían diagnóstico histopatológico de carcinoma oral de células

escamosas (COCE) bien diferenciado, 10 correspondían a COCE moderadamente diferenciado, 10 a COCE pobremente diferenciado, 11 a carcinoma verrucoso (CV) y 6 a mucosa oral sana. Éstas últimas correspondieron a muestras de distintos sectores anatómicos de la cavidad oral, donde el clínico realizó biopsias, pero que bajo el análisis histológico correspondió a mucosa oral sana. Las muestras seleccionadas fueron reevaluadas por un Patólogo Oral y los diagnósticos fueron confirmados según criterios de clasificación de la Organización Mundial de la Salud año 2005 (WHO Classification of Tumours, 2005).

#### **IV.4A 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.

#### **IV.4B Criterios De Exclusión**

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

### ***IV.5 RECOLECCION DE DATOS***

#### **IV.5A Procesamiento Y Análisis Histopatológico De Las Muestras**

Luego de seleccionar los casos, se confirmó el diagnóstico y el cumplimiento de los criterios de inclusión y exclusión por un Patólogo Oral del Departamento de Patología y Medicina Oral de la FOUCH.

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.

El análisis histopatológico de confirmación diagnóstica fue realizado mediante un microscopio óptico Olympus CX21, 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. Las cuales fueron previamente cortadas con micrótopo de rotación para obtener muestras 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.

Una vez confirmada la inclusión de la muestra en el estudio, se realizaron fotografías de cada una de las placas histológicas (muestras teñidas con hematoxilina-eosina), mediante microscopio óptico con aumentos de 10X y 40X, para registro de confirmación diagnóstica.

La información básica completa de los pacientes (edad, sexo y localización de la lesión) fue obtenida de las fichas clínicas seleccionadas y fue recopilada en una planilla del programa computacional Microsoft Excel®.

#### ***IV.6 TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) PARA LA DETECCIÓN DE CD 56***

A cada molde seleccionado, se le realizó 1 corte de 4 µm para cada anticuerpo, con navajas de corte para tejidos blandos marca Feather®, en un micrótopo marca E. Leitz Wetzlar. Posteriormente los cortes fueron colocados en baño de estirado marca Labline® a 38°C; cada corte fue recogido en portaobjetos con carga positiva (Laboratorio Cellpath, Inglaterra) y secados a 60°C por 30 min en estufa marca Memmert®.

Una vez completado el tiempo de secado, las muestras en cada portaobjeto fueron desparafinadas en xilol y rehidratadas en alcoholes descendentes hasta agua destilada. Las secciones se colocaron en buffer citrato de sodio (pH 6) durante 45 min vaporera para la recuperación antigénica, luego fueron lavadas en agua destilada en 5 cambios sucesivos y posteriormente lavadas con buffer fosfato salino (PBS) durante 2x2 min. La actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada incubando las secciones en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en metanol a temperatura ambiente durante 20 min. Las secciones fueron pre-incubadas con suero de caballo durante 20 min a temperatura ambiente y después se incubaron durante 30 min. en cámara húmeda a 37°C con un anticuerpo monoclonal para CD56, ampliamente utilizado para detección de células NK y que se ajustaba a los fines del estudio (**Tabla 3**):

Anticuerpos Primarios	Tipo de Anticuerpo	Dilución	Laboratorio Comercial	Código del Producto	Patrón de marcación
Anti-CD 56	Ac Monoclonal	1:100	Dako	M7304	Citoplasmática y/o Membrana

**Tabla 3.** Detalles del anticuerpo utilizado en técnica IHQ.

Posteriormente, las secciones se lavaron con PBS durante 5 min y fueron incubadas con el anticuerpo secundario biotinilado durante 20 min a 37°C y posteriormente con peroxidasa-estreptavidina conjugada (Sistema Detección Universal Vectastain Elite Kit amplio espectro ABC-HRP, RTU, Vector-USA, EE.UU.) durante 20 min a 37°C; la reacción se visualizó finalmente con diaminobencidina (DAB) (3 a 5 min) y fue contrarrestada con hematoxilina de Harris 1min (Shuyama y cols., 2007; Kumar y cols., 2008). En el procedimiento se incluyeron controles negativos obtenidos mediante la sustitución del anticuerpo específico con PBS y controles positivos necesarios para validar la técnica IHQ, los cuales fueron los recomendados por el fabricante de dicho anticuerpo y se les aplicó los mismos procedimientos que al tejido en estudio.

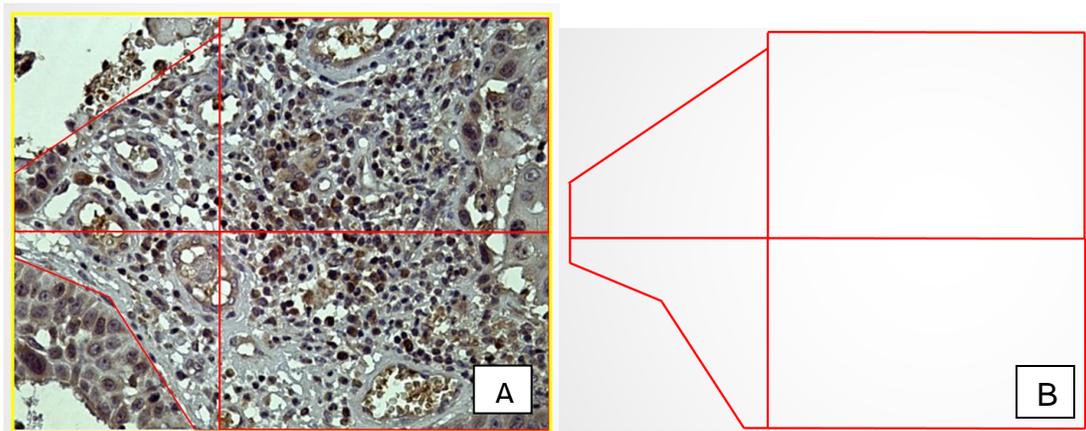
Un corte de amígdala humana y un linfoma CD56 positivo fueron los controles positivos para el Anticuerpo CD56.

#### **IV.6A Observación Microscópica, Identificación Y Recuento De Células Inmunopositivas.**

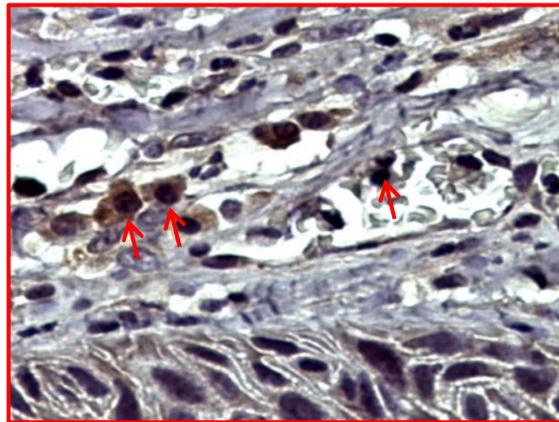
El análisis de la inmunotinción CD56 se evaluó mediante microscopio óptico (Olympus BX 41, trinocular, serie 8M09891, modelo BX41TF) con aumentos de 10x y 40x. Primero se hizo un recorrido de la placa para identificar el área con mayor cantidad de tejido conjuntivo, y se tomó una fotografía del sector seleccionado con aumento 10x, acoplado a cámara para microfotografía digital (Arquimed® 2,5 megapíxeles) con el programa de captura de imagen (Micrometrics SE Premium). Las fotografías fueron guardadas en formato JPG.

Luego, se utilizó aumento a 40x y se tomaron 4 fotografías continuas sin repetición de campo (Woo y cols., 2008 modificado). Este procedimiento se repitió en cada una de las 48 muestras, lo que llevó a un total de 192 fotografías con aumento de 40x, las que fueron analizadas a través del programa computacional Paint de Windows®, utilizado para la visualización digital de las fotografías y que asignaba de manera automática a cada imagen un área de 4.490.000 píxeles (área total por imagen). También permitió trazar líneas, para dividir en cuadrantes y delimitar áreas de trabajo (**Figura 2**). Lo cual se realizó considerando que el área representativa de análisis en el estudio, es el tejido conjuntivo. Además en cada fotografía existían áreas de tejido epitelial o sin muestra que fueron descartadas del área total de cada imagen (4.490.000 píxeles) por no representar sectores de interés a evaluar (**Figura 2**).

La sumatoria de cada área delimitada por cuadrante, determinó el área de trabajo útil por imagen (**Figura 2**). El procedimiento descrito se realizó para facilitar la cuantificación manual de las células NK inmunopositivas para CD56, las que presentaban morfología específica y marcación de color pardo en su membrana y/o citoplasma celular (**Figura 3**).



**Figura 2.** Correspondiente a muestra n° 7 de COCE MD al (40x). **A:** Líneas en rojo representando cuadrantes y delimitación de áreas de trabajo. En amarillo área total por imagen (4.490.000 píxeles). **B:** la sumatoria de las áreas delimitadas en rojo, representa el área de trabajo útil de la fotografía A. Además se logran apreciar las áreas sin muestras y con tejido epitelial que no fueron consideradas para el conteo celular.



**Figura 3.** Fotografía representativa de muestra n°4 de COCE CV al (40x) con acercamiento digital. Flechas en rojo ejemplificando células inmunopositivas para anticuerpo CD56, con núcleos redondeados y prominentes, rodeados de citoplasma teñido de color pardo.

En cada área de trabajo útil se realizó el conteo manual de células NK inmunopositivas. Posteriormente se realizó la sumatoria de estas cuantificaciones para cada una de las 4 fotografías analizadas por muestra al 40x. Lo que determinó el número de células NK total (n° de NK total) por muestra. La sumatoria de las 4 áreas de trabajo útil por muestra se dividió por el área total de cada imagen (4.490.000 píxeles), lo que determinó un cociente único para cada

muestra, el cual se utilizó como factor divisor del n° de NK total, determinando el valor representativo de células NK por muestra (células NK por muestra), que se utilizó para comparar de manera equitativa el promedio de células NK de cada grupo (MS, CV, COCE BD, COCE MD y COCE PD). En la **figura 4** se puede observar el detalle del cómo se obtuvo el valor numérico de las células NK por muestra.

$$\frac{\text{Sumatoria de áreas de trabajo útil por muestra}}{\text{Área total por imagen (4.490.000 pixeles)}} = \text{Cociente}$$

$$\frac{\text{n° de NK Total}}{\text{Cociente}} = \text{células NK por muestra}$$

**Figura 4.** Representando la obtención del cociente (específico por muestra) para determinar el número de células NK por muestra, utilizado para comparar cada grupo de estudio

Dos operadores expertos, en tiempos diferentes, realizaron la observación de cada una de las fotografías, siendo realizada una previa calibración intra-observador. Para aquellas fotografías en que el conteo final no coincidía, se volvió a cuantificar hasta llegar a un valor similar. Los resultados fueron recopilados en una planilla del programa computacional Microsoft Excel®.

#### **IV.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se realizó un análisis exploratorio de la distribución de los datos mediante la prueba Shapiro Wilk. La comparación del número de células NK entre los diferentes grupos en estudio se realizó usando el test no paramétrico de Mann-Whitney U-Test debido a la distribución no paramétrica de los datos. Las variables sexo y localización de la muestra fueron analizados mediante estadística descriptiva. Y la comparación de la edad mediante T-student. El análisis estadístico se realizó utilizando el software Stata 11.0 considerando significativas las diferencias con los valores  $p < 0.05$ .

## V RESULTADOS

### V.1 DATOS CLÍNICOS DE LAS MUESTRAS

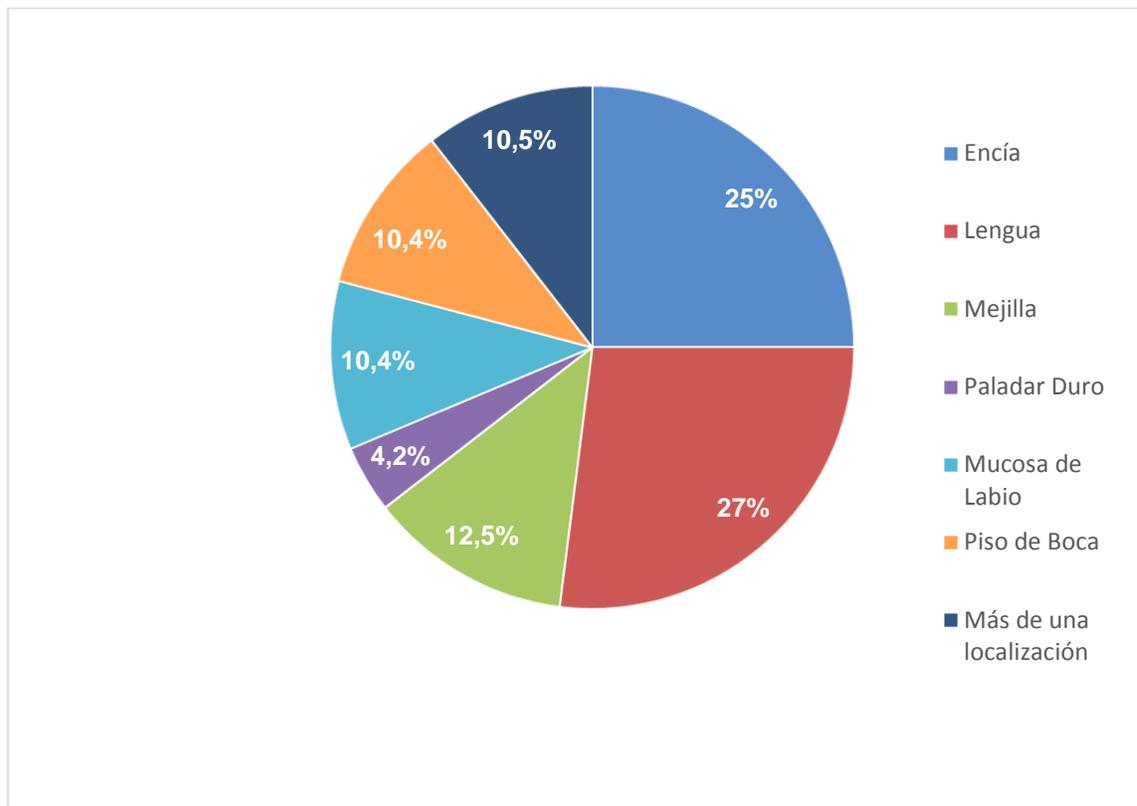
De las 48 muestras del estudio, 52,1% (n=25) correspondieron al género femenino y 47,9% (n=23) al género masculino. Para COCE pobremente diferenciado se observó que el género más afectado fue el masculino con un 80%, siendo 4 veces mayor que el femenino (20%). Para COCE bien diferenciado y el CV se observó que el género más afectado fue el femenino con 63,6% y 72,7% respectivamente; para COCE moderadamente diferenciado no existió diferencia en el número de casos por género (**Tabla 4**).

La edad promedio de las muestras analizadas fue  $61,7 \pm 16,9$  años (Min.17, Max.99 años). El promedio de edad para el género femenino fue de  $62,5 \pm 18,4$  años (Min.17, Max. 89 años) y para el género masculino fue de  $61,7 \pm 15,3$  años (Min.24 años, Max.99 años). No se encontró diferencia significativa entre los promedios de edades por sexo ( $p=0,7387$ ). En la **Tabla 4** se describen los promedios de edad y cantidad de pacientes según sexo para las muestras de MS, CV, COCE BD, COCE MD y COCE PD.

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

**Tabla 4.** Características del total de la muestra según género y edad promedio.

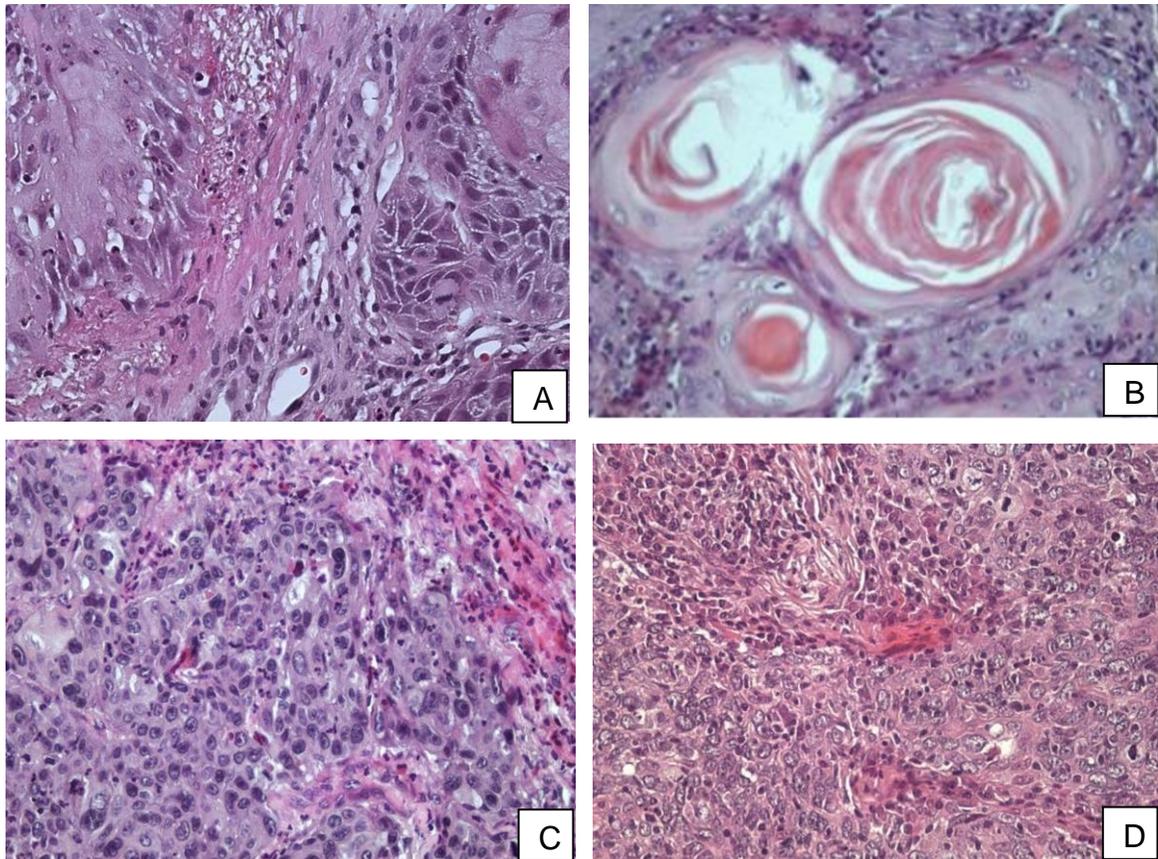
	MS		CV		COCE BD		COCE MD		COCE PD		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>Género</b>												
Masculino	3	50	3	27,3	4	36,4	5	50	8	80	23	47,9
Femenino	3	50	8	72,7	7	63,6	5	50	2	20	25	52,1
<b>Promedio de edad en años</b>												
Mujeres	41,6 ± 2,211 (min30, max61)		72,5 ± 67,404 (min67, max79)		67 ± 54,420 (min54, max89)		62,6 ± 30,417 (min17, max82)		37,5 ± 45,090 (min31, max44)		62,5 ± 18,489 (min17,max89)	
Hombres	53 ± 1,667 (min36, max76)		67 ± 40,827 (min56, max77)		54,5 ± 52,445 (min53, max56)		62 ± 49,216 (min47, max73)		63,9 ± 46,188 (min24, max99)		60,8 ± 15,340 (min24,max99)	
Total	42,5 ± 11,43 (min30, max76)		71 ± 7,403 (min56, max79)		62,5 ± 12,3 (min53, max89)		62,3 ± 18,6 (min17, max82)		58,6 ± 21,9 (min24, max99)		61,7 ± 16,9 (min17,max99)	

**Gráfico 1.** Localizaciones del total de la muestra.

**Tabla 5.** Localización del total de muestras según su diagnóstico.

	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 / 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

En la **Figura 5** se observan fotografías histológicas representativas de las muestras que fueron incluidas para análisis en este estudio.



**Figura 5:** Microfotografías de muestras representativas de las muestras de cáncer, teñidas con H&E obtenidas bajo microscopio óptico al 40X. **A:** muestra n°4 de Carcinoma verrucoso; **B:** muestra n°7 de COCE bien diferenciado; **C:** muestra n°1 de COCE moderadamente diferenciado; **D:** muestra n°1 COCE pobremente diferenciado.

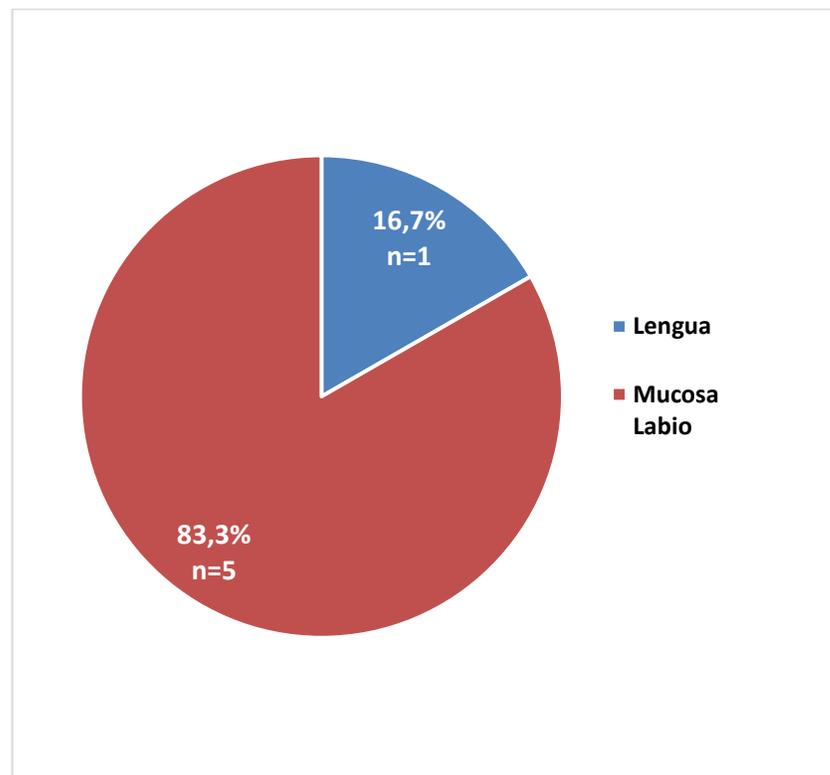
## ***V.2 DATOS CLÍNICOS Y CUANTIFICACIÓN DE NK EN MUCOSA ORAL SANA (MS)***

Se revisaron 6 muestras de mucosa oral sana, de las cuales 50% (n=3) eran de hombres y 50% (n=3) de mujeres. La edad promedio total fue de  $42,5 \pm 11,43$  años (Min.30, Max.76 años). El promedio de edad de las mujeres fue de  $41,6 \pm 2,2$  años (Min.30, Max.61 años) y el de los hombres fue de  $53 \pm 1,6$  años (Min.36, Max.76 años), la diferencia de edad por sexo no fue significativa ( $p=0,5026$ ) (**Tabla 6**). La localización más frecuente fue mucosa de labio, con el 83,3% (n=5) (**Gráfico2**).

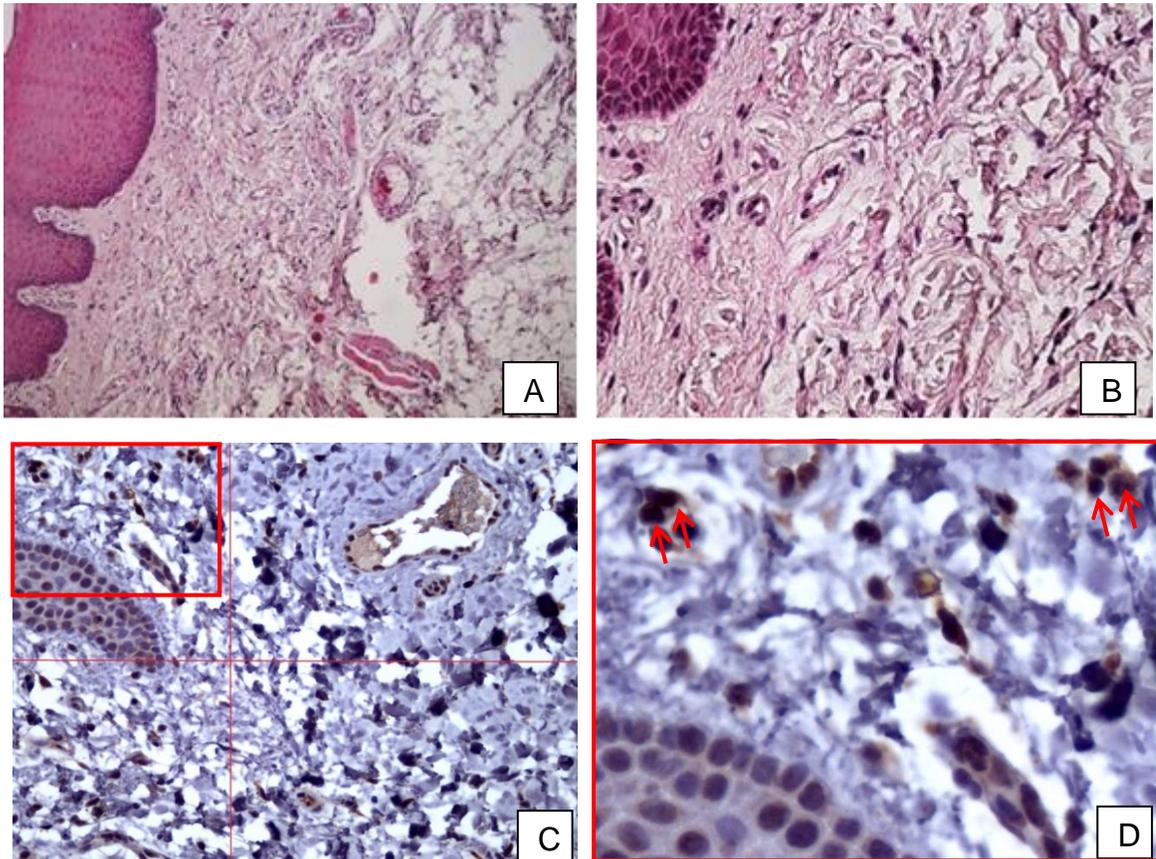
**Tabla 6.** Características de la muestras mucosa sana según género y edad promedio.

	MS	
	n=6	
	n	%
<b>Género</b>		
Masculino (M)	3	50
Femenino (F)	3	50
(M+F)	6	100
<b>Promedio de edad (años)</b>		
Mujeres	41,6	± 2,2
Hombres	53	±1,6
Total	42,5	±11,4

**Gráfico 2.** Localizaciones de mucosa oral sana.



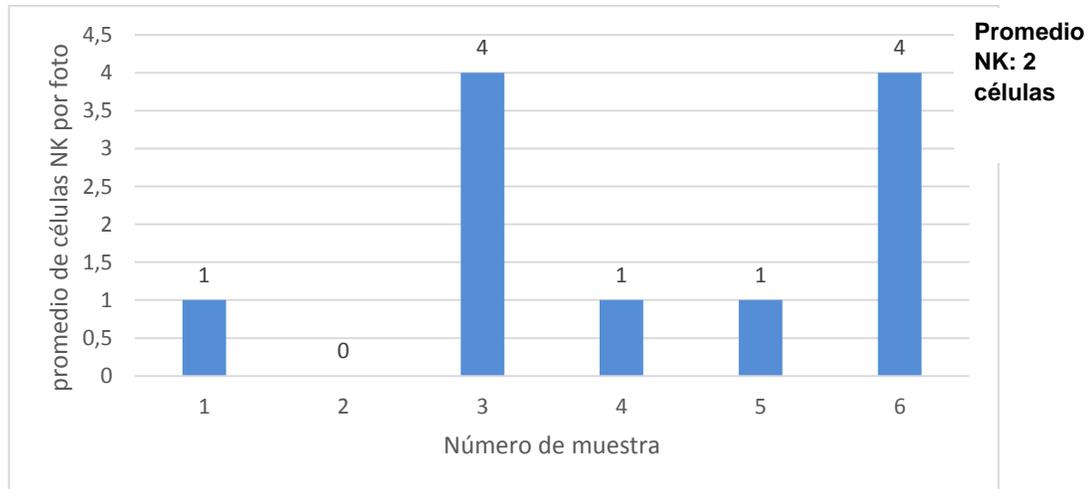
Todas las muestras de MS, fueron observadas bajo microscopía óptica, para confirmación de diagnóstico, cómo se ejemplifica en la **Figura 6**. Posteriormente se realizó la cuantificación de las células NK total como fue descrito en la sección de materiales y métodos.



**Figura 6:** Microfotografías obtenidas bajo microscopio óptico de muestras representativas de mucosa oral sana teñidas con H&E. **A:** Muestra n°3 al 10x. Se observa tejido conjuntivo con características morfológicas conservadas; **B:** Muestra n°3 al 40x tejido conjuntivo normal, presencia de vasos sanguíneos de menor calibre. **C:** Muestra representativa n°3, con técnica de inmunohistoquímica para detección de CD56, en que se cuantificaron 4 células NK; **D:** Amplificación de cuadro destacado en rojo en C con células NK (flechas en rojo).

En el **Gráfico 3** se observan los promedios de NK encontrados para cada una de las 6 muestras de MS. La cuantificación de las células NK total para MS arrojó un promedio de  $2 \pm 1,7$  células por fotografía (Min.0, Max.4 células).

**Gráfico 3.** Promedio de células NK por muestra de mucosa oral sana (1 al 6).



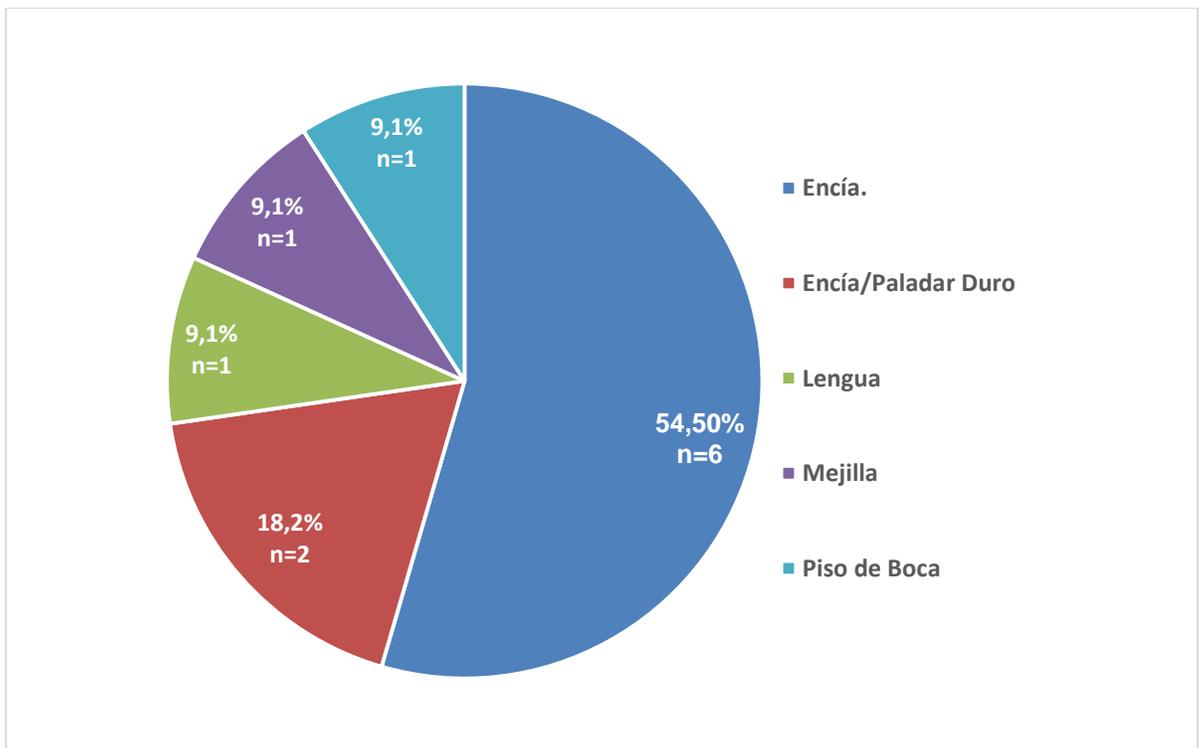
### V.3 DATOS CLÍNICOS Y CUANTIFICACIÓN DE NK EN CARCINOMA VERRUCOSO (CV).

Se evaluó un total de 11 muestras de carcinoma verrucoso, de las cuales el 27,3% (n=3) eran de hombres y 72,7% (n=8) de mujeres, con una edad promedio total de  $71 \pm 7,4$  años (Min.56, Max.79 años). El promedio de edad de las mujeres fue de  $72,5 \pm 67,4$  años (Min.67, Max.79 años) y la de los hombres fue de  $67 \pm 40,8$  años (Min.56, Max.77 años), sin diferencia significativa en el promedio por sexo ( $p=0,2957$ ) (**Tabla 7**). La localización más frecuente fue encía con el 54,5% (n=6) (**Gráfico 4**).

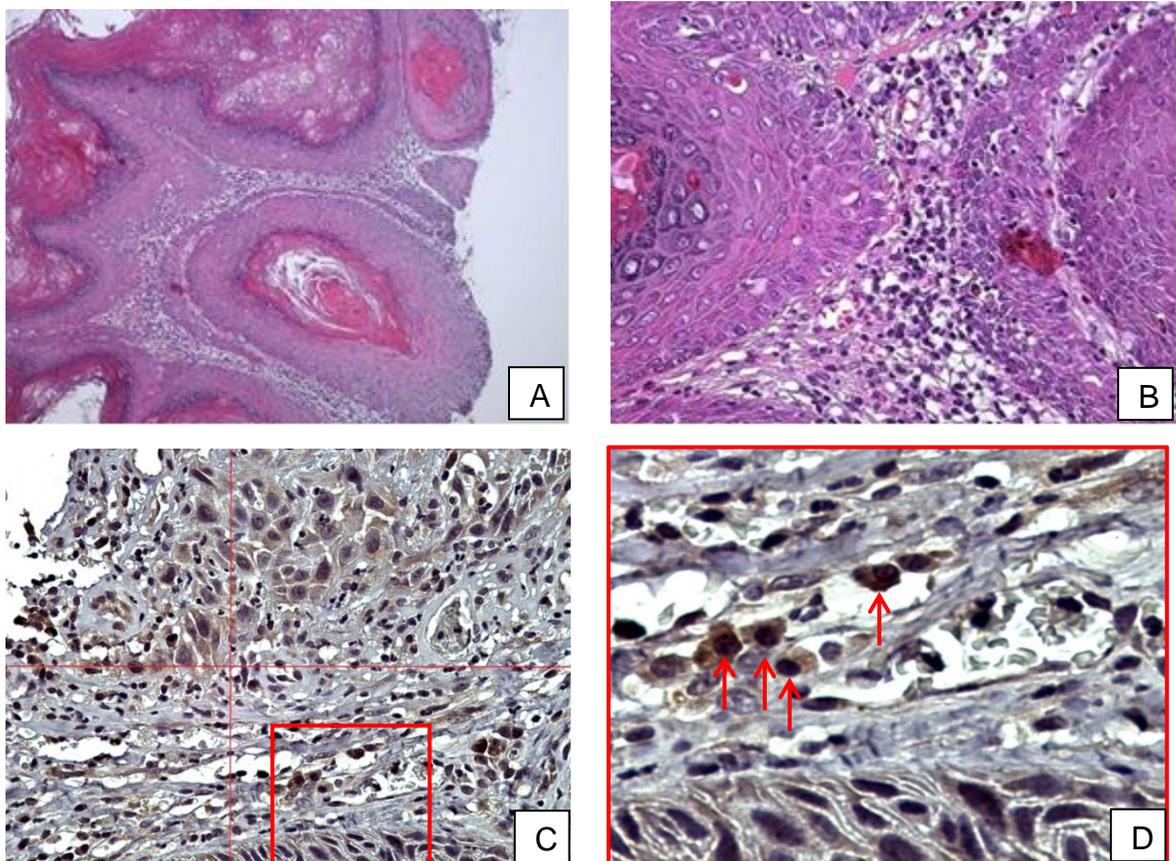
**Tabla 7.** Características de la muestra Carcinoma Verrucoso según género y edad promedio.

	CV	
	n=11	
	n	%
<b>Género</b>		
Masculino (M)	3	27,3
Femenino (F)	8	72,7
(M+F)	11	100
<b>Promedio de edad (años)</b>		
Mujeres	72,5 ±	67,4
Hombres	67 ±	40,8
Total	71 ±	7,40

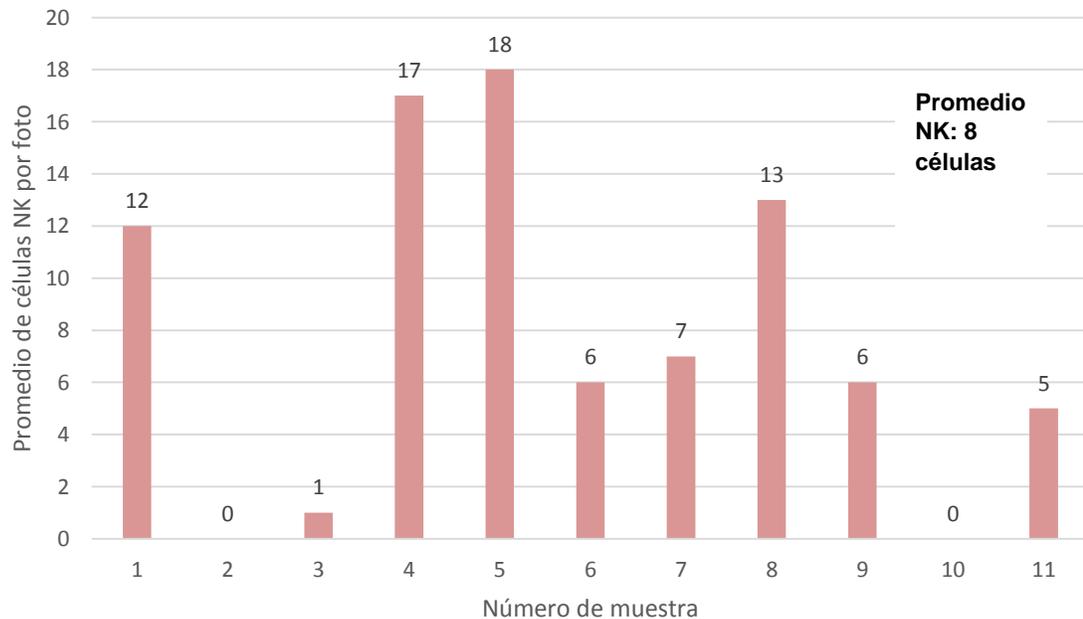
**Gráfico 4.** Localizaciones de Carcinoma Verrucoso.



Las muestras de CV, fueron observadas bajo microscopía óptica como se ejemplifica en la **Figura 7**. En el **Gráfico 5** se observan los promedios de NK encontrados para cada una de las 11 muestras de CV. La cuantificación de las células NK total para CV arrojó un promedio de  $8 \pm 6,4$  células por fotografía (Min.0, Max18 células).



**Figura 7:** Microfotografías obtenidas bajo microscopio óptico de muestras representativas de carcinoma verrucoso teñidas con H&E. **A:** Muestra n°9 al 10X. 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 pequeños grupos de infiltrado inflamatorio; **B:** Muestra n°9 al 40X con escasas células inflamatorias, además se puede observar tejido neoplásico y vasos sanguíneos de diverso calibre. **C:** foto representativa de muestra n°4, con técnica de inmunohistoquímica para detección de CD56, en que se cuantificaron 16 células NK; **D:** Amplificación de cuadro destacado en rojo en C con células NK (flechas en rojo).

**Gráfico 5.** Promedio de células NK por muestra de Carcinoma Verrucoso (1 al 11).

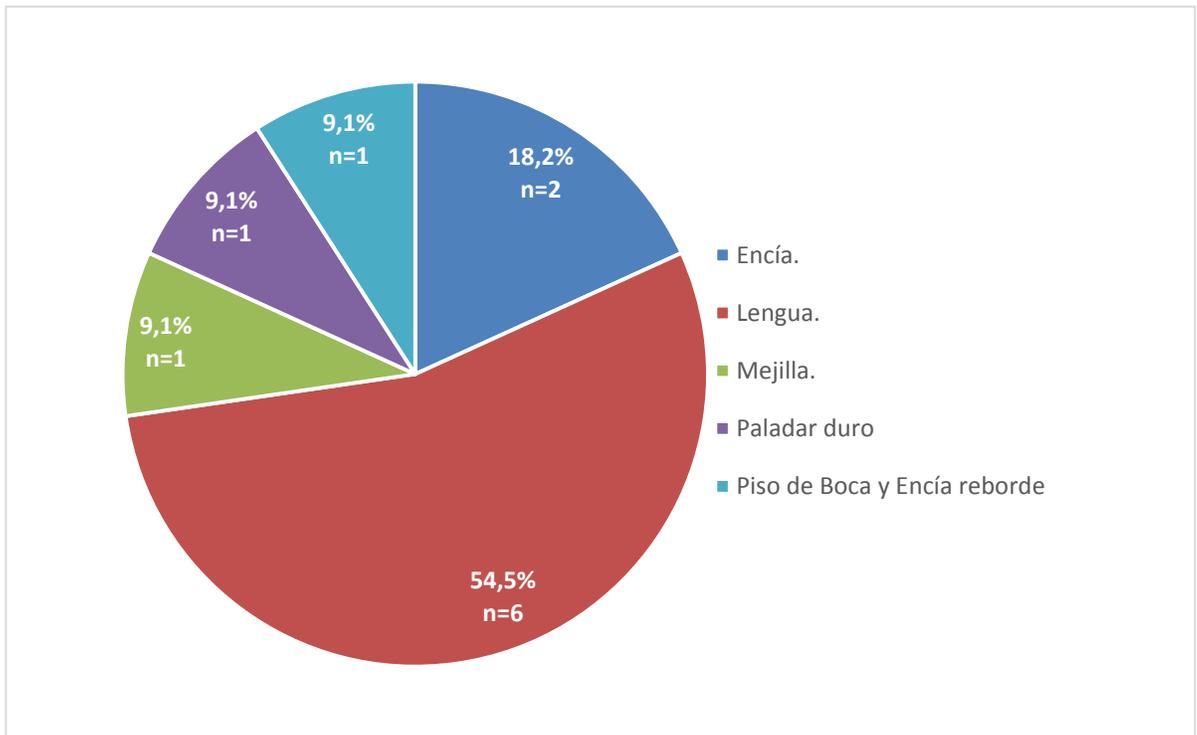
### ***DATOS CLÍNICOS Y CUANTIFICACIÓN DE NK EN CARCINOMA ORAL ESPINOCELULAR BIEN DIFERENCIADO (COCE BD).***

Se evaluó un total de 11 muestras de COCE BD, de las cuales el 36,4% (n= 4) eran de hombres y 63,6% (n=7) fueron de mujeres, con una edad promedio total de  $62,5 \pm 12,3$  años (Min.53, Max.89 años). El promedio de edad de las mujeres fue de  $67 \pm 54,4$  años (Min.54, Max.89 años) y la de los hombres fue de  $54,5 \pm 52,4$  años (Min.53, Max.56 años), sin diferencia significativa en el promedio de edad por sexo ( $p=0,1068$ ) (**Tabla 8**). La localización más frecuente fue lengua con el 54,5% (n=6), seguido de encía con el 18,2% (n=2) (**Gráfico 6**).

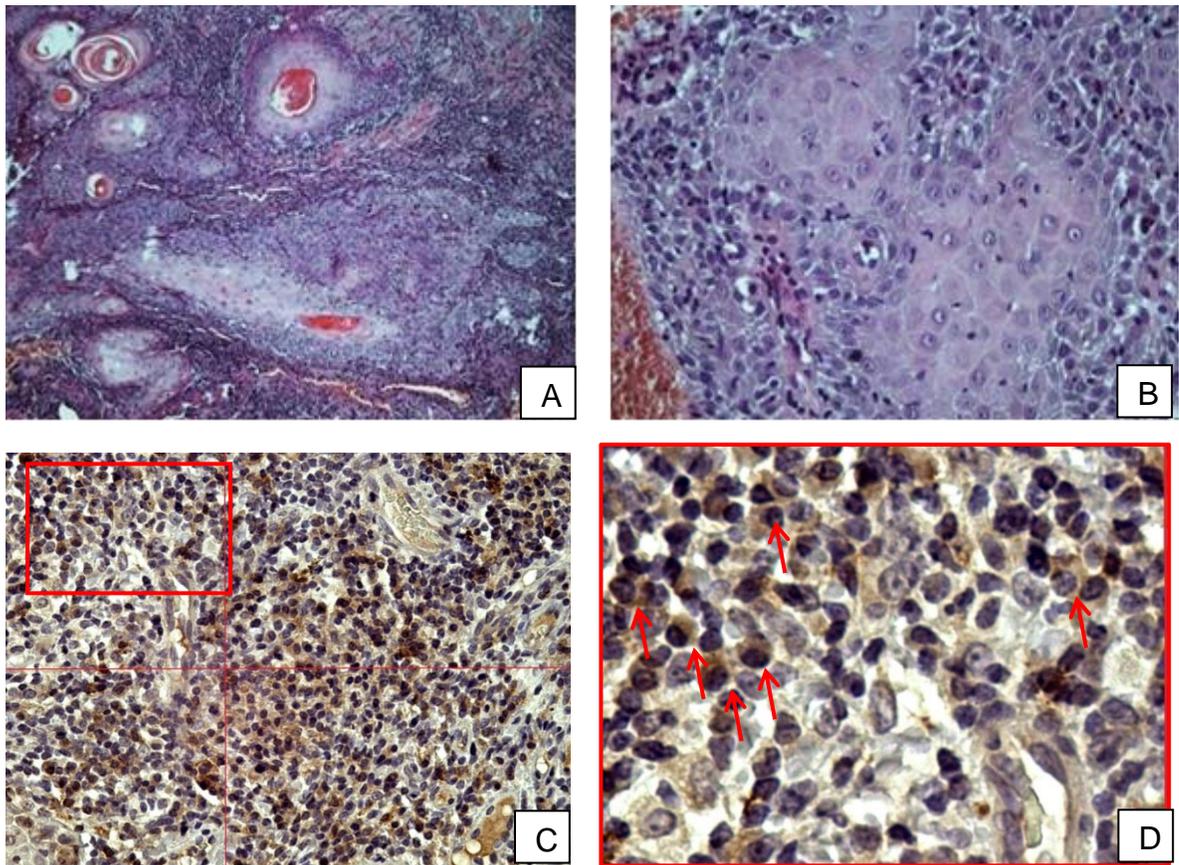
**Tabla 8.** Características de la muestra COCE bien diferenciado según género y edad promedio.

<b>COCE BD</b>		
<b>n=11</b>		
	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Género</b>		
Masculino (M)	4	36,4
Femenino (F)	7	63,6
(M+F)	11	100
<b>Promedio de edad (años)</b>		
Mujeres	67	± 54,4
Hombres	54,5	± 52,4
Total	62,5	± 12,3

**Gráfico 6.** Localizaciones de COCE bien diferenciado.

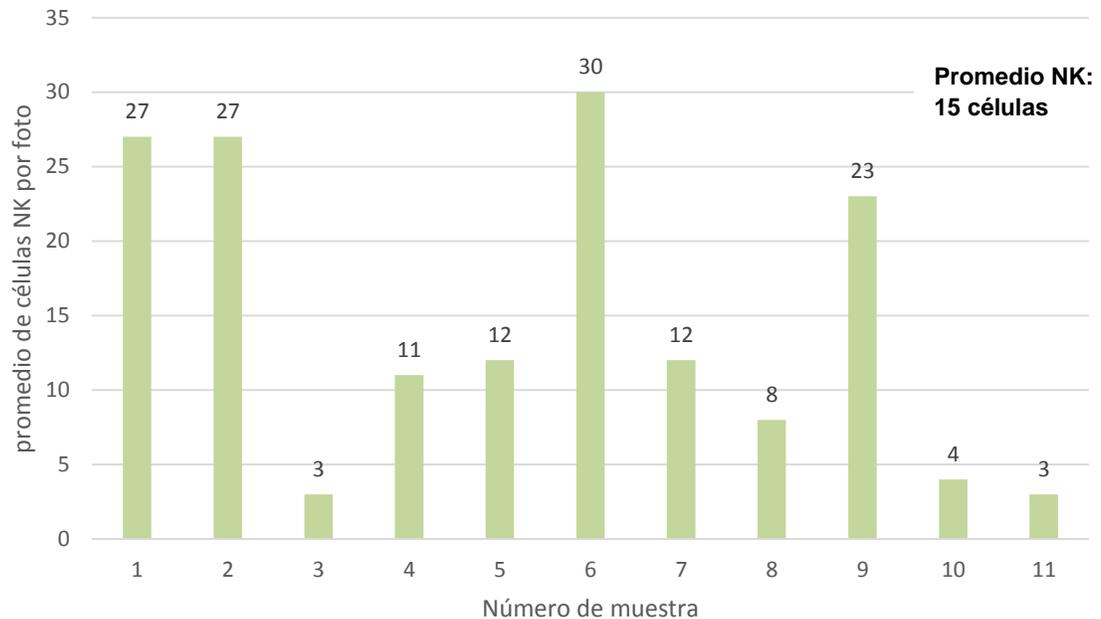


Las muestras de COCE BD, fueron observadas bajo microscopía óptica como se ejemplifica en la **Figura 8**. En el **Gráfico 7** se muestran los promedios de NK encontrados para cada una de las 11 muestras de COCE BD. La cuantificación de las células NK total para COCE BD arrojó un promedio de  $15 \pm 10,3$  células por fotografía (Min.3, Max.30 células).



**Figura 8:** Microfotografías obtenidas bajo microscopio óptico de muestras representativas de COCE BD teñidas con H&E. **A:** Muestra n°7 al 10X es posible observar una gran cantidad de infiltrado inflamatorio rodeando al tumor; **B:** Muestra n°7 al 40X es posible apreciar la infiltración linfocítica tumoral (ILT) acompañada de masas tumorales. **C:** fotografía representativa de muestra n°9, con técnica de inmunohistoquímica para detección de CD56, en que se cuantificaron 47 células NK; **D:** Amplificación de cuadro destacado en rojo en C con células NK (flechas en rojo).

**Gráfico 7.** Promedio de células NK en COCE bien diferenciado para cada una de las muestras evaluadas de COCE BD (1 al 11).



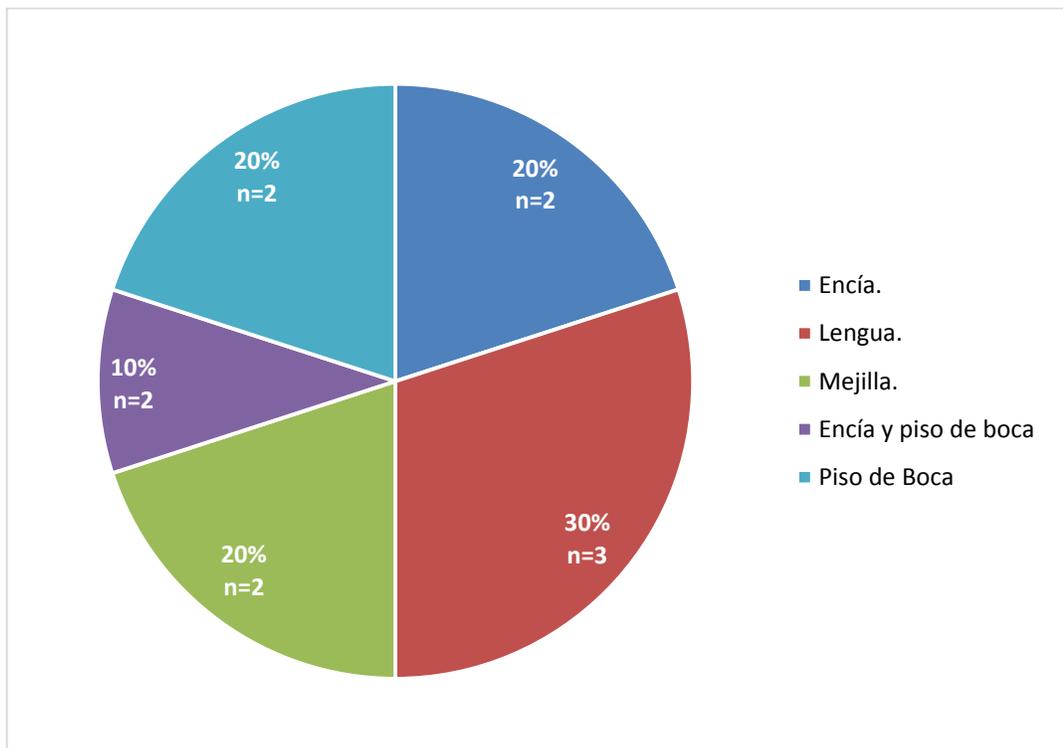
#### **V.4 DATOS CLÍNICOS Y CUANTIFICACIÓN DE NK EN CARCINOMA ORAL ESPINOCELULAR MODERADAMENTE DIFERENCIADO (COCE MD).**

Se evaluó un total de 10 muestras de COCE MD, de las cuales el 50% (n=5) eran de hombres y 50% (n=5) fueron de mujeres, con una edad promedio total de  $62,3 \pm 18,6$  años (Min.17, Max.82 años). El promedio de edad de las mujeres fue de  $62,6 \pm 30,4$  años (Min.17, Max.82 años) y la de los hombres fue de  $62 \pm 49,2$  años (Min. 47, Max.73 años), sin diferencias significativas del promedio por sexo ( $p=0,9628$ ) (**Tabla 9**). La localización más frecuente fue lengua con 30% (n=3), seguido de encía 20% (n=2) y mejilla 20% (n=2) (**Gráfico 8**).

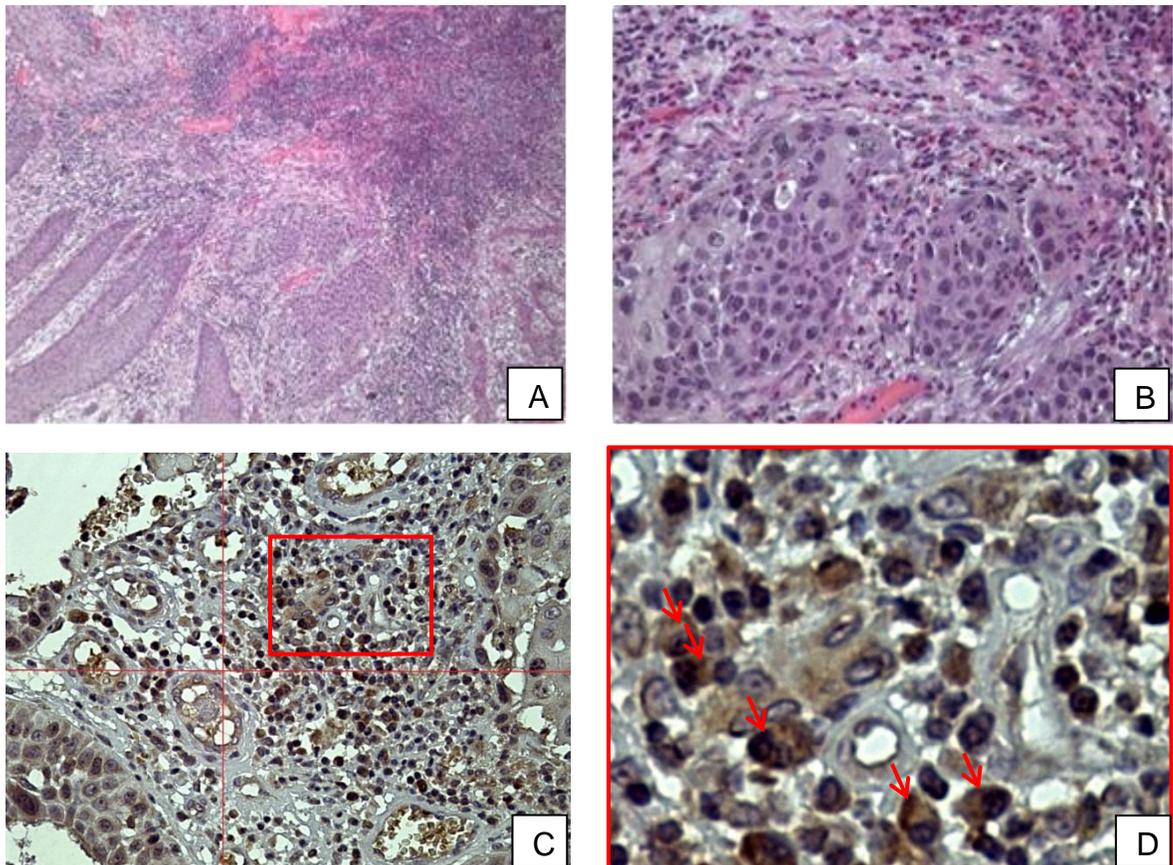
**Tabla 8.** Características de la muestra COCE moderadamente diferenciado según género y edad promedio.

	COCE MD	
	n=10	
	n	%
<b>Género</b>		
Masculino (M)	5	50
Femenino (F)	5	50
(M+F)	10	100
<b>Promedio de edad (años)</b>		
Mujeres	62,6 ± 30,4	
Hombres	62 ± 49,2	
Total	62,3 ± 18,6	

**Gráfico 8.** Localizaciones de COCE moderadamente diferenciado.

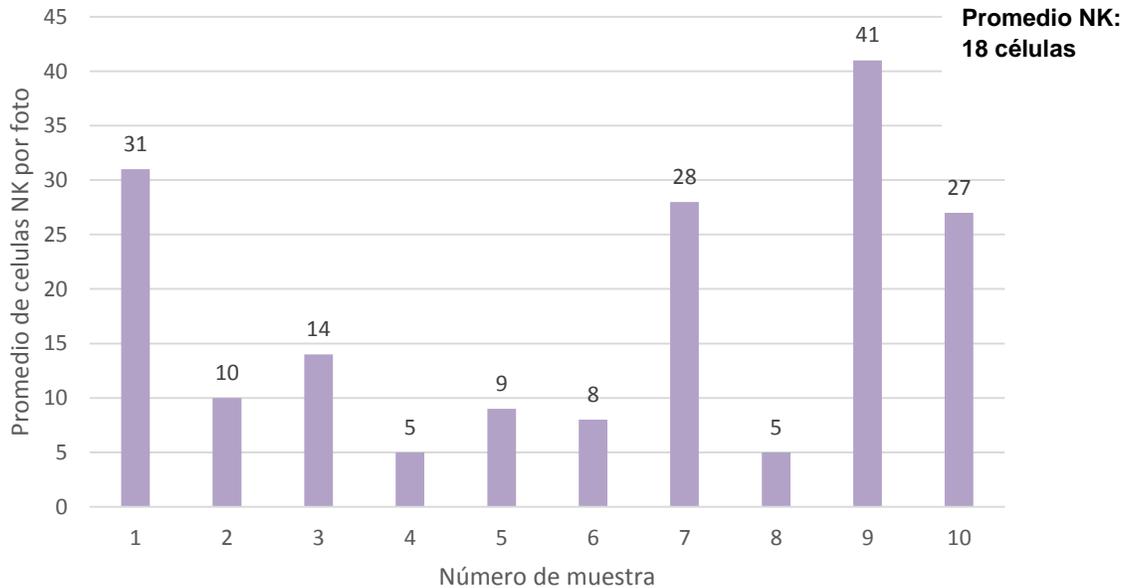


Las muestras de COCE MD fueron observadas bajo microscopía óptica como se ejemplifica en la **Figura 9**. En el **Gráfico 9** se observan los promedios de NK encontrados para cada una de las 10 muestras de COCE MD. La cuantificación de las células NK total para COCE MD arrojó un promedio de  $18 \pm 12,8$  células por fotografía (Min.5, Max.41 células).



**Figura 9:** Microfotografías obtenidas bajo microscopio óptico de muestras representativas de COCE MD teñidas con H&E. **A:** Muestra n°1 al 10X se observa mezcla entre tejido tumoral e infiltrado inflamatorio; **B:** Muestra n°1 al 40X se observan células neoplásicas malignas rodeadas de infiltrado linfocitario tumoral. **C:** fotografía representativa de muestra n°7, fotografía A, con técnica de inmunohistoquímica para detección de CD56, en que se cuantificaron 20 células NK; **D:** Amplificación de cuadro destacado en rojo en C con células NK (flechas en rojo).

**Gráfico 9.** Promedio de células NK para cada una de las muestras evaluadas de COCE BD (1 al 10).



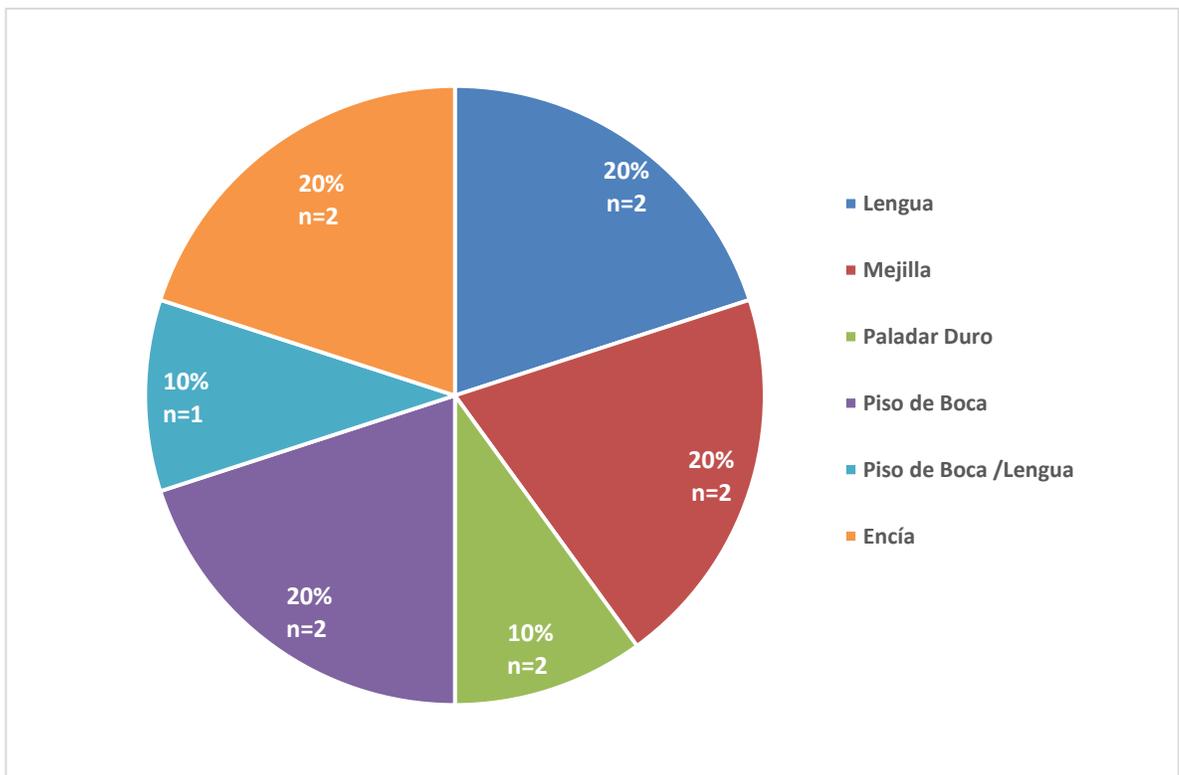
#### **V.5 DATOS CLÍNICOS Y CUANTIFICACIÓN DE NK EN CARCINOMA ORAL ESPINOCELULAR POBREMENTE DIFERENCIADO (COCE PD).**

Se evaluó un total de 10 muestras de COCE PD, de las cuales el 80% (n=8) eran de hombres y 20% (n=2) fueron de mujeres, con una edad promedio total de  $58,6 \pm 21,9$  (Min.24, Max.99 años). El promedio de edad de las mujeres fue de  $37,5 \pm 45$  (Min.31, Max.44 años) y la de los hombres fue de  $63,9 \pm 46,1$  (Min.24 años, Max.99 años), sin diferencias significativas en el promedio de edad por sexo ( $p=0,1348$ ) (**Tabla 10**). Las localizaciones con mayor frecuencia fueron encía, lengua, mejilla y piso de boca con 20% (n=2) para cada una (**Gráfico 10**).

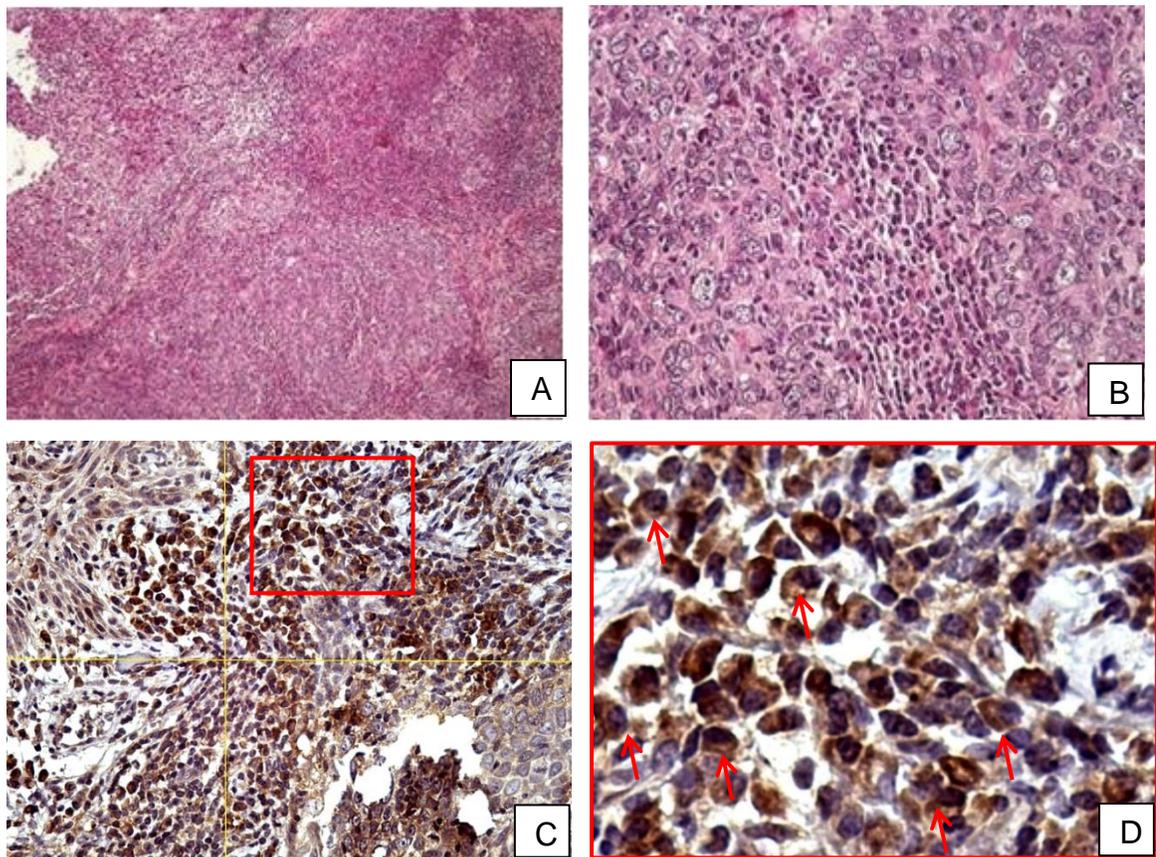
**Tabla 9.** Características de la muestra COCE pobremente diferenciado según género y edad promedio.

	COCE PD	
	n=10	
	n	%
<b>Género</b>		
Masculino (M)	8	80
Femenino (F)	2	20
(M+F)	10	100
<b>Promedio de edad (años)</b>		
Mujeres	37,5	± 45,0
Hombres	63,9	± 46,1
Total	58,6	± 21,9

**Gráfico 10.** Localizaciones de COCE pobremente diferenciado.

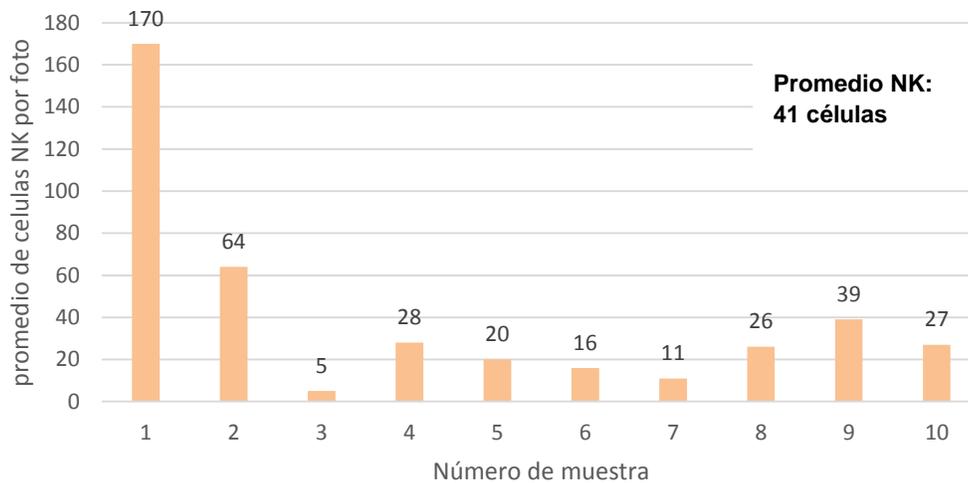


Las muestras de COCE PD, fueron observadas bajo microscopía óptica como se ejemplifica en la **Figura 10**. En el Gráfico 11 se muestran los promedios de NK encontrados para cada una de las 10 muestras de COCE PD. La cuantificación del infiltrado inflamatorio total para COCE PD arrojó un promedio de  $41 \pm 48,3$  células por fotografía (Min.5, Max. 170 células).



**Figura 10:** Microfotografías obtenidas bajo microscopio óptico de muestras representativas de COCE PD teñidas con H&E. **A:** Muestra n°1 al 10X en que se observa tejido conjuntivo con pérdida de características morfológicas, y abundante infiltrado inflamatorio; **B:** Muestra n°1 al 40X se observan queratinocitos poco diferenciados con alto porcentaje de infiltrado linfocitario tumoral. **C:** foto representativa de muestra n°1, fotografía A con técnica de inmunohistoquímica para detección de CD56, en que se cuantificaron 138 células NK; **D:** Amplificación de cuadro destacado en rojo en imagen C, se destacan células NK representativas con flechas en rojo.

**Gráfico 11.** Promedio de células NK para cada una de las muestras evaluadas de COCE PD (1 al 10).



#### **V.6 ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE LOS SUBTIPOS DE COCE, CV Y MS EN RELACIÓN A CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS NK.**

Al analizar las 48 muestras del presente trabajo, se observaron diferentes cantidades de células NK total (positivas para el anticuerpo CD56) según el grupo de estudio (MS, CV, COCE BD, COCE MD y COCE PD).

El grupo MS obtuvo un promedio de  $2 \pm 1,7$  células NK total, el cual representó la menor cantidad de células NK al ser comparado con los demás grupos de estudio (**Gráfico 12**). Estas diferencias, las cuales pueden ser observadas en la **Tabla 11**, fueron estadísticamente significativas cuando se comparó el grupo MS con COCE BD ( $p=0.00578$ ), COCE MD ( $p= 0.00138$ ) y COCE PD ( $p=0.00138$ ), no así para CV donde la diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p=0,0703$ ).

El grupo de CV obtuvo un promedio de  $8 \pm 6,4$  células NK total, el cual fue mayor al compararlo con MS y menor al compararlo con COCE BD, COCE MD y

COCE PD (**Gráfico 12**). Solo la diferencia observada respecto al grupo COCE PD fue estadísticamente significativa ( $p=0,00386$ ) (**Tabla 11**).

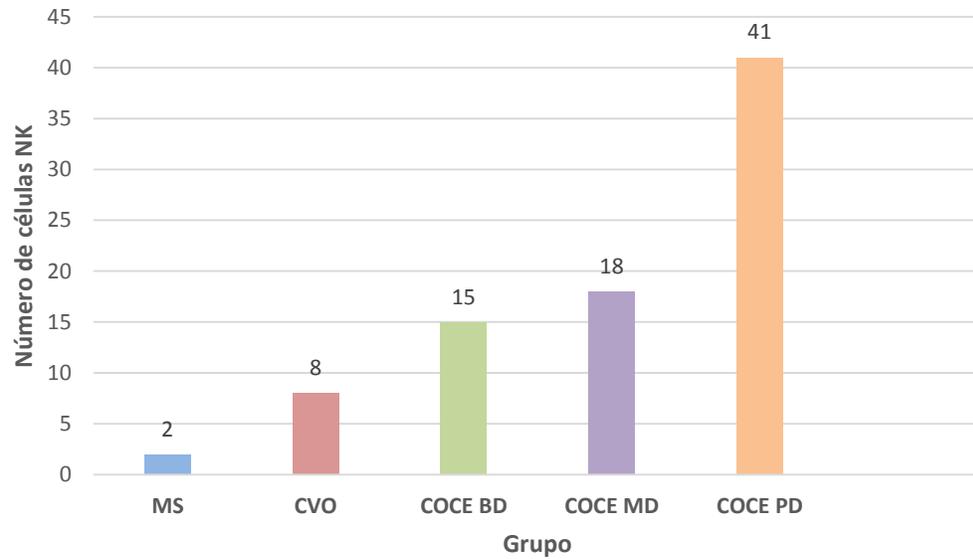
El grupo de COCE BD obtuvo un promedio de  $15 \pm 10,3$  células NK total, el cual fue mayor al compararlo con MS y CV y menor al compararlo con COCE MD y COCE PD (**Gráfico 12**), sin embargo ninguna de las diferencias fue estadísticamente significativa (**Tabla 11**).

El grupo de COCE MD obtuvo un promedio de  $18 \pm 12,8$  células NK total, el cual fue menor al compararlo con COCE PD y mayor al compararlo con MS, CV y COCE BD (**Gráfico 12**), pero ninguna de estas diferencias fueron estadísticamente significativas (**Tabla 11**).

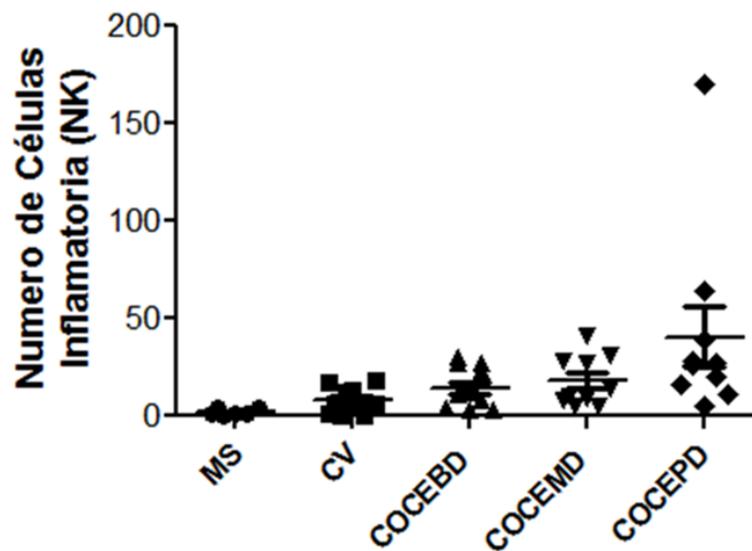
El grupo de COCE PD obtuvo un promedio de  $41 \pm 48,3$  células NK total, el cual representó la mayor cantidad de células NK al ser comparado con los demás grupos de estudio (**Gráfico 12**). Las diferencias respecto a los grupos MS ( $p=0.00138$ ) y CV ( $p=0.00386$ ) fueron estadísticamente significativas, no así para COCE BD y COCE MD (**Tabla 11**).

En el **Gráfico 13** se puede observar la relación entre la cantidad de células NK presentes en cada muestra analizada según el grupo de estudio.

**Gráfico 12:** Promedio de células NK total en mucosa oral sana, carcinoma verrucoso y COCE bien, moderadamente y pobremente diferenciado.



**Gráfico 13.** Relación entre la cantidad de células NK presentes en cada muestra estudiada respecto del grupo analizado mucosa oral sana (MS), carcinoma verrucoso (CV), carcinoma bien, (COCE BD), moderadamente (COCE MD) y pobremente diferenciado (COCE PB).



**Tabla 11.** Diferencias estadísticas entre los grupos de estudio (prueba Mann-Whitney U-Test).

	<b>p-value</b>
MS < CV	0.0703.
MS < COCE BD	<b>0.00578</b>
MS < COCE MD	<b>0.00138</b>
MS < COCE PD	<b>0.00138</b>
CV < COCE BD	0.16758
CV < COCE MD	0.07186
CV < COCE PD	<b>0.00386</b>
COCE BD < COCE MD	0.48392
COCE BD < COCE PD	0.06724
COCE MD < COCE PD	0.2113

## VI DISCUSIÓN

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 a las neoplasias, las cuales en la actualidad son una de las principales causas de muerte afectando a millones de seres humanos al año (Stewart y Wild, 2014). Resulta necesario aportar con conocimientos nuevos que permitan desarrollar nuevas herramientas para generar alternativas complementarias a los tratamientos que existen actualmente, mejorar los pronósticos, así como contribuir con la prevención del cáncer.

De acuerdo a la información obtenida a partir de un total de 48 muestras analizadas en este estudio, 42 fueron diagnosticadas histológicamente como carcinomas de células escamosas. Los pacientes con cáncer, de los cuales fueron tomadas estas muestras, tuvieron una edad promedio de  $63,7 \pm 15,9$  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, 2010; Vargas-Ferreira y cols., 2012).

En el presente estudio, se observó que el género más afectado en las muestras correspondientes a COCE BD y CV 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. Considerando que se reporta en la literatura al género masculino como el más afectado por este tipo de carcinomas (Neville y cols., 2009; World Health Organization Classification of Tumours, 2005; Walvekar y cols., 2009; Rekha y cols., 2010), esta discrepancia se puede explicar por el hecho de que las mujeres generan más consultas espontáneas y demandas en servicios de atención de salud que los varones y el carcinoma puede ser biopsiado y diagnosticado en estas lesiones muchas veces desapercibidas o poco pesquisadas por los pacientes (Vega y cols., 2003; Rosa-Jiménez y col., 2005). Por el contrario en las muestras de COCE PD el género masculino se presentó en

el 80% de los casos, donde la razón entre género masculino y el femenino fue de 4:1. Aunque esta relación coincide con lo descrito en la literatura, la proporción es muy superior (Riera y Martinez, 2005; World Health Organization Classification of Tumours, 2005; Ling y cols., 2013).

El sitio anatómico más frecuente del total de muestras de CV fue encía con un 54,5%, similar a lo reportado en la literatura (Rekha y cols., 2010; Adorno y cols., 2010). Para COCE BD, MD y PD, fue la lengua el sitio afectado de forma más frecuente, concordando con lo descrito por otros autores (Bagan y cols., 2010; Rhodus y cols., 2014).

Las células NK, en la inmunidad innata, tienen el rol de primera línea de defensa pues se ha demostrado su capacidad para lisar las células neoplásicas o infectadas por virus sin la necesidad de una previa sensibilización (Vivier y cols., 2008; Lee y cols., 2010; Abbas y cols., 2011) y han sido motivo de estudios en patologías como el cáncer. En carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, Molling y cols. 2007 reportan en estudio prospectivo, que pacientes que padecían de esta neoplasia y presentaban bajos niveles de NK circulantes, se asociaban a un pronóstico más pobre de la enfermedad, por presentar asociaciones significativas con una mayor recurrencia local regional y tasas de supervivencia más bajas. Lee y cols. 2010 analizaron la distribución de fenotipos de linfocitos en sangre periférica en pacientes con cáncer y leucoplasias orales, encontrando una mayor cantidad de células NK en pacientes con COCE avanzado y recurrente comparado con los pacientes sanos o que tenían leucoplasias orales.

Las células del sistema inmune que componen el infiltrado linfocitario tumoral contribuirían a la inhibición de la progresión del tumor (Zancope y cols., 2010). Sin embargo, algunos autores postulan que también contribuirían a la progresión y metástasis del cáncer (Oliveira y cols., 2007). En el presente estudio se observó que el promedio de células NK total del grupo control (mucosa sana) fue menor que el promedio de células NK total de los subtipos histológicos de cáncer analizados (CV, COCE BD, COCE MD y COCE PD), siendo esta diferencia

estadísticamente significativa en todos los subtipos de cánceres al compararlos con mucosa sana, excepto para el CV. Aunque la mayoría de las muestras de mucosa sana analizadas provenían de mucosa labial, y el mayor número de COCE analizados se presentó en mucosa lingual y en encía, no se descarta la probabilidad de que el significativo número de células inflamatorias de las muestras COCE pueda ser influenciado por la presencia de un mayor número de células inflamatorias de manera basal en la encía normal, o que exista alguna variabilidad en el número de linfocitos móviles en los conectivos de los diferentes tipos de mucosa oral. Si bien este es el primer reporte del recuento de NK realizado en el contexto del Proyecto, sería útil para reportes futuros incorporar muestras de encía sana y aumentar el de lengua sana, para verificar la significancia de estas diferencias respecto a los controles.

Es importante señalar que el enfoque del estudio, se centra en la comparación de la respuesta inmune entre los subtipos de cáncer y el mayor promedio de células NK total fue observado en el COCE-PD, lo que corrobora nuestra hipótesis

Los resultados de este estudio, a pesar de sus limitaciones, confirman la tendencia de que existe una mayor cantidad de células NK a medida que el cáncer se hace más anaplásico. Sugiriendo una respuesta antitumoral reaccional, que a medida que el estímulo es más nocivo, el organismo responde con mayor intensidad, en términos cuantitativos. Tal como se observó en COCE PD, el cual destacó como el grupo con mayor promedio de células NK (Dunn y cols., 2004; Uppaluri y cols., 2008; Abbas y cols., 2011; Cho y cols., 2011; Matos y cols., 2012). Lee y cols. 2010 apoyan esta teoría, concluyendo que la distribución y el número de NK incrementan gradualmente en respuesta al crecimiento del tumor y a la metástasis durante la carcinogénesis oral, posiblemente vía una respuesta inmune adaptativa. Zancope y cols. 2010 por su parte, encontraron mayor número de NK en pacientes con carcinoma de células escamosas oral y de labio al compararlos con los pacientes control y con los que presentaban lesiones pre malignas.

En un trabajo realizado previamente por el mismo equipo de trabajo del presente estudio, se buscó comparar la cantidad de infiltrado inflamatorio en los distintos grados de diferenciación histológica de carcinoma oral de células escamosas, carcinoma verrucoso oral y tejido sano. El cual concluyó que en todos los subtipos de cánceres se evidenció una mayor cantidad de infiltrado inflamatorio total al ser comparados con el tejido sano, presentado diferencias estadísticamente significativas. Además, el grupo de muestras de pacientes con diagnóstico de carcinoma oral de células escamosas pobremente diferenciado (COCE PD) presentó una mayor cantidad de infiltrado inflamatorio total entre todos los subtipos de carcinoma estudiados, con diferencias estadísticamente significativas. Lo que ayuda a respaldar una tendencia de una respuesta mayor ante estímulos más nocivos o de una respuesta inmune no del todo efectiva.

El CV, el cual presenta un mejor pronóstico al tener una limitada capacidad de dar metástasis (Adorno y cols. 2010), arrojó en el estudio la menor cantidad de células NK al ser comparado con los demás subtipos de cáncer, sin embargo solo fue estadísticamente significativa la diferencia al compararlo con COCE PD, que presentó la mayor cantidad de células NK. Estudios posteriores con mayor número de muestras y de localizaciones similares son necesarios para poder establecer, si existiesen, diferencias estadísticamente significativas con los demás grupos de estudio. Lo que respaldaría, la premisa de una respuesta inmune poco efectiva ante cánceres más nocivos.

Sin duda el proceso de supresión de tumores es dinámico y es por esto que existen controversias al respecto. Considerando que las células NK poseen una potente actividad citotóxica, su eficacia en contra de las masas tumorales permanece cuestionable, ya que estaría siendo eludida por lo que genera el microambiente del tumor. Este en un principio se asocia a una respuesta inflamatoria crónica supresora capaz de controlar, contener o incluso eliminar el proceso neoplásico, pero que se vuelve inefectiva y aberrante una vez que es evadida. Caracterizándose por provocar activación anormal de factores de transcripción que conducen a la expresión de genes involucrados en perpetuar las

condiciones favorables para el crecimiento y progresión de la neoplasia (Vitale y cols., 2014). Lo anterior implicaría una alteración en las vías de activación o en complejos de receptores que regulan la actividad antitumoral de las células NK, afectando negativamente la disponibilidad de un completo y competente reclutamiento de estas células en el sitio del tumor. Además la persistencia del tumor, la cual resulta en parte por una respuesta inmune defectuosa, puede favorecer la selección de células tumorales, capaces de evadir el control mediado por las células NK (Vitale y cols., 2014). También se ha propuesto que estas células, como parte de la inmunidad innata, estarían orientadas para responder en contra de alteraciones iniciales y que se volverían tolerantes frente a exposiciones “continuas”, lo que les provocaría auto modificaciones que repercutirían en sus funciones (Vitale y cols., 2014). Antecedentes que al ser contrastados con los resultados del presente estudio, respaldan la adaptación poco efectiva del organismo frente al cáncer.

En este estudio no se analizaron condiciones sistémicas ni locales, tales como úlceras, sobre infección por *Candida*, trauma local u otras que pudieran influir en la respuesta inflamatoria, esto debido a la poca información presente en las fichas clínicas. De esta manera, se sugiere a futuro seguir incluyendo más muestras con la finalidad de homogeneizarlas en relación a sus localizaciones topográficas, y además conociendo más datos de las condiciones bucales de los pacientes estudiados, tratando así de minimizar posibles sesgos que podrían afectar la cantidad de células NK que permanece adyacente al tumor.

Este trabajo buscó comparar la presencia de células NK total en los distintos grados de diferenciación histopatológica del carcinoma oral de células escamosas, carcinoma verrucoso y mucosa oral sana (COCE BD, COCE MD, COCE PD, CV y MS) con el fin de establecer una relación entre los subtipos de cáncer analizados y las células NK. Se encontró una tendencia que a medida que el cáncer se hacía más indiferenciado, la cantidad de células NK total aumentaba. Sería interesante contrastar estos resultados con estudios que involucren otras células que participan de la inmunidad antitumoral y que están presentes en el

infiltrado linfocitario adyacente a los distintos subtipos de cáncer analizados, como los linfocitos T reguladores. Así como también, con estudios que contemplen idealmente, variables moleculares, necesarias para aclarar el rol supresor que presentan los protagonistas de la respuesta inmune frente a las neoplasias durante el establecimiento y la progresión del cáncer.

## VII CONCLUSIONES

- El Carcinoma oral de células escamosas pobremente diferenciado (COCE PD), presentó una mayor cantidad de células NK total al compararlo con todos los grupos en estudio (MS, CV, COCE BD y COCE MD), siendo esta diferencia estadísticamente significativa con MS ( $p=0.00138$ ) y CV ( $p=0.00386$ ).
- El Carcinoma oral de células escamosas moderadamente diferenciado (COCE MD), presentó una mayor cantidad de células NK total al compararlo con MS, CV y COCE BD, siendo esta diferencia estadísticamente significativa solamente con MS ( $p=0.00138$ ).
- El Carcinoma oral de células escamosas bien diferenciado (COCE BD), presentó una mayor cantidad de células NK total al compararlo con MS y CV, siendo esta diferencia estadísticamente significativa con MS ( $p=0.00578$ ).

## VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S (2011). Inmunología Celular y Molecular. 7ª. Edición. Elsevier Saunders.

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* 3 (3): 132-135.

American Cancer Society (2015). Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition.

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* 62 (5): 441-448.

Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y (2010). Oral cancer: Clinical features. *Oral Oncology* 46:414–417.

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.

Binmadi N and Basile J (2011). Perineural invasion in oral squamous cell carcinoma: A discussion of significance and review of the literatura. *Oral Oncology* 47: 1005-1010.

Boland JW, Mc Williams K, Ahmedzai SH and Pockley AG (2014). Effects of opioids on immunologic parameters that are relevant to anti-tumour immune potential in patients with cancer: a systematic literature review. *British Journal of Cancer* 111, 866–873.

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.

Böttcher A, Ostwald J, Guder E, Pau HW, Kramp B and Dommerich S (2013). Distribution of circulating natural killer cells and T lymphocytes in head and neck squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx* 40: 216–221.

Brandwein-Gensler M, Teixeira MS, Lewis CM, et al. (2005). Oral squamous cell carcinoma: Histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am J Surg Pathol* 29:167.

Candau A, Dean A, Alamillos FJ, Heredero S, García B, Ruiz JJ. et al. (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* 19(5) e506-11.

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* 58:2-3, 282-91.

Chatzistamou I, Rodriguez J, Jouffroy T, Girod A, Point D, Sklavounou A, et al. (2010). Prognostic significance of tumor shape and stromal chronic inflammatory infiltration in squamous cell carcinomas of the oral tongue. *J Oral Pathol Med* 39:667.

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.

Dunn G, Old L, Schreiber R (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21(2):137-48.

EI-Mofty SK (2014) Histopathologic risk factors in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma variants: An update with special reference to HPV-related carcinomas. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 19 (4):e377-85.

Feller L, Altini M and Lemmer J (2013). Inflammation in the context of oral cancer. *Oral Oncology* 49 887-892.

Gannot G, Gannot I, Vered H, Buchner A, Keisari Y (2002). Increase in immune cell infiltration with progression of oral epithelium from hyperkeratosis to dysplasia and carcinoma. *Br J Cancer* 86(9):1444-8.

Glenny AM, Furness S, Worthington HV, Conway DI, Oliver R, Clarkson JE, et al. (2010). The CSROC Expert Panel. Interventions for the treatment of oral cavity and oropharyngeal cancer: radiotherapy. *Cochrane Database Syst Rev* (12):CD006387

Grimm M (2012). Prognostic value of clinicopathological parameters and outcome in 484 patients with oral squamous cell carcinoma: Microvascular invasion (v+) is an independent prognostic factor for oscc. *Clin Transl Oncol* 14 (11):870-880.

Huber MA, Tantiwongkosi B (2014). Oral and Oropharyngeal Cancer. *Med Clin N Am* 98:1299–1321.

Jewett A, Head C and Cacalano NA (2006). Emerging Mechanisms of Immunosuppression in Oral Cancers. *J Dent Res* 85(12):1061-1073.

Kademani D (2007). Oral Cancer. *Mayo Clin Proc* 82 (7):878-887.

Lee J, Lin C, Chen T, Kok S, Chang M and Jeng J (2010). Changes in peripheral blood lymphocyte phenotypes distribution in patients with oral cancer/oral leukoplakia in Taiwan. *Int J Oral Maxillofac Surg* 39: 806-814.

Ling W, Mijiti A, Moming A (2013). Survival pattern and prognostic factors of patients with squamous cell carcinoma of the tongue: a retrospective analysis of 210 cases. *J. Oral Maxillofac. Surg* 71(4): 775-85.

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.

Molling J, Langius J, Langendijk J, Leemans C, Bontkes H, van der Vliet H, y cols. (2007). Low Levels of Circulating Invariant Natural Killer T Cells Predict Poor Clinical Outcome in Patients With Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* 25:862-868.

Neville, BW, Damm, DD, Allen, CM, Bouquot, JE (2009). Oral and maxillofacial pathology. Third Edition, Saunders Elsevier.

Oliveira H, Leite A, Costa N, Alencar R, Lara V, Silva T et al. (2007). Decrease in mast cells in oral squamous cell carcinoma: possible failure in the migration of these cells. *Oral Oncology* 43, 484– 490.

Oliveira LR and Ribeiro-Silva A (2011). Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg* 40:298–307.

Pereira MC, Oliveira DT, Landman G, Kowalski LP (2007). Histologic subtypes of oral squamous cell carcinoma: prognostic relevance. *J Can Dent Assoc* 73(4):339-44.

Petti S (2009). Lifestyle risk factors for oral cancer. *Oral Oncology* 45: 340–350.

Ramirez V, Vásquez-Rosas P, Ramírez- Eyraud P (2015). Mortalidad por cáncero oral y faríngeo en Chile, años 2002-2010. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral* 8(2)

Rekha KP y Angadi PV (2010). Verrucous carcinoma of the oral cavity: a clinico-pathologic appraisal of 133 cases in Indians. *Oral Maxillofac Surg* 14(4): 211-218.

Rhodus NL, Kerr AR and Patel K (2014). Oral Cancer Leukoplakia, Premalignancy, and Squamous Cell Carcinoma. *Dent Clin N Am* 58: 315–340.

Riera, P and Martínez, B (2005). Morbilidad y mortalidad por cáncer oral y faríngeo en Chile. *Rev Méd Chile* 133: 555-563.

Robertson MJ and Ritz J (1990). Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 76:2421–38.

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.

Rosa-Jiménez F, Montijano A, Herráiz I, Zambrana J (2005). ¿Solicitan las mujeres más consultas al área médica que los hombres?. *An. Med. Interna* 22(11).

Scully C and Bagan JV (2009). Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncology* 45:301–308.

Sharma M, Sah P, Sharma SS, Radhakrishnan R (2013). Molecular changes in invasive front of oral cancer. *J Oral Maxillofac Pathol* 17:240-7.

Schreiber R, Old LL and Smyth M (2011). Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* 331(6024):1565-70

Stagg J, Johnstone R, Smyth M (2007). From cancer immunosurveillance to cancer immunotherapy. *Immunological Reviews* 220: 82–101.

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)].

Tereda T (2011). Verrucous Carcinoma of the Oral Cavity: A Histopathologic Study of 10 Japanese Cases. *J. Maxillofac. Oral Surg* 10(2):148–151.

Uppaluri R, Dunn G and Lewis JS Jr (2008). Focus on tils: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in head and neck cancers. *Cancer Immun* 8:16

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.

Vega J, Bedregal P, Jadue L, Delgado I (2003). Equidad de género en el acceso a la atención de salud en Chile. *Rev. méd. Chile* 131(6).

Vitale M, Cantoni C, Pietra G, Mingari MC, Moretta L (2014). Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *Eur. J. Immunol* 44:1582–1592.

Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S (2008). Functions of natural killer cells. *Nature Immunology* 9(5).

Wallace E and Smith MJ (2005). The role of Natural Killer cells in Tumor control-effectors and regulators of adaptive immunity. *Springer Semin Immun* 27:49-64.

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.

Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E (2008). Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J. Oral Pathol. Med* 37: 127–133.

Warnakulasuriya S (2009). Causes of oral cancer—an appraisal of controversies. *British Dental Journal* 207: 471–475.

Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E (2008). Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J. Oral Pathol Med.*37: 127–133.

Warnakulasuriya S (2009). Causes of oral cancer—an appraisal of controversies. *British Dental Journal* 207: 471–475.

Warnakulasuriya S (2009). Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology* 45:309–316.

Warnakulasuriya S (2010). Living with oral cancer: epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. *Oral Oncology* 46:407-410.

Woo YL, Sterling J, Damay I, Coleman N, Crawford R, van der Burg SH y cols. (2008). Characterising the local immune responses in cervical intraepithelial neoplasia: a cross-sectional and longitudinal analysis. *BJOG* 115(13):1616-21

Wolff K-D, Follmann M, Nast A (2012). Clinical practice guideline: The diagnosis and treatment of oral cavity cancer. *Dtsch Arztebl Int* 109(48): 829–35.

Woolgar J (2006). Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 42: 229–239.

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.

Zancoppe E, Costa NL, Junqueira-Kipnis AP, Valadares MC, Silva TA, Leles CR, et al. (2010). Differential infiltration of CD8+ and NK cells in lip and oral cavity squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 39:162-167.

## IX ANEXOS

## ANEXO N° 1



Santiago, diciembre 10 de 2013  
 DIFO N° 0155 / 2013  
 Mat.: Aprobación y asignación código FIOUCH

Señorita  
 Dra. Daniela Adorno Farias  
 Departamento de Patología y Medicina Oral  
 Facultad de Odontología  
Presente

Estimada doctora Adorno:

Me permito informar a usted que su proyecto "Relación entre linfocitos T Reguladores y Natural Killer en el infiltrado linfocitario de Carcinoma 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 13-008. La fecha de inicio es diciembre de 2013 y cuenta con una duración máxima de un año (fecha de término: diciembre de 2014).

Recuerdo 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 NO recibirá solicitudes de compras 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), cotizaciones 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.

Sin otro particular, se despide cordialmente de usted,



GONZALO RODRÍGUEZ MARTÍNEZ  
 Profesor Asistente  
 Director de Investigación

## ANEXO N° 2



28/08/2013

**ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN**

---

ACTA N°: 2013/12

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:
 

<b>Dra. María Angélica Torres</b> Presidente del CEC	<b>Dra. Claudia Lefimil Puente</b> Secretaria del CEC
<b>Dr. Eduardo Rodríguez</b> Miembro permanente del CEC	<b>Srta. Karin Lagos</b> Miembro permanente del CEC
<b>Dra. Blanca Urzúa</b> Miembro permanente del CEC	<b>Dra. Ximena Lee</b> 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, Aproba el estudio "Relación entre linfocitos T Reguladores y Natural Killer en el infiltrado linfocitario de Carcinoma de Células Escamosas". Proyecto Fipouch. 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.

Dra. María Angélica Torres V.  
 Presidente C.E.C.

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



## ANEXO N° 3



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 Farías, 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**