



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**“IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS Y TIPIFICACIÓN DE
LINFOCITOS T EN CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS**

**ÁREA DE ESPECIALIZACIÓN:
BIOLOGÍA BUCAL**

P R E S E N T A:

C.D. CLAUDIA PATRICIA PEDRAZA ZAMORA

TUTOR:

DR. JUAN CARLOS C. HERNÁNDEZ GUERRERO

ASESORAS:

**DRA. LAILA GUTIÉRREZ KOBEH
DRA. DOLORES UTRERA BARILLAS
DRA. MARIA DOLORES JIMÉNEZ FARFÁN**

MÉXICO D. F.

OCTUBRE DEL 2010

Este estudio fue financiado por el Proyecto PAPIIT IN226809-2



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria:

A María Zamora González,

*Mi mejor maestra, mi gran amiga, mi fiel compañera
y sobre todo Mi excelente Madre,
quien falleció meses atrás y cuya pérdida
me ha dejado un vacío enorme en el alma.
Que Dios te tenga en su Gloria por todas las enseñanzas
y por el inmenso amor que nos has dejado a muchos
en tu paso por esta tierra.
¡Mil gracias!*

A mi padre,

*Luis Pedraza Higareda, gracias por tu apoyo
incondicional a lo largo de mi vida papá.*

*A Dios,
Porque a Ti te debo todo...*



INDICE

1. ÍNDICE DE ABREVIATURAS	3
2. RESUMEN	4
3. INTRODUCCIÓN	6
4. ANTECEDENTES	6
4.1 CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS	6
- Incidencia y Mortalidad	6
- Factores de Riesgo	8
- Signos y Síntomas	13
- Características Histológicas	13
4.2 CÁNCER Y LA RESPUESTA INMUNE	15
4.3 CÉLULAS DENDRÍTICAS	17
- Generalidades	17
- Tipos de Células Dendríticas	18
- Función	18
- Interacciones entre CDs y células mediadoras de respuestas inmunes específicas	19
4.4 CÉLULAS DENDRÍTICAS Y COCE	20
- Daño en la función de las CDs	21
4.5 LINFOCITOS T	22
- Generalidades	22
- Origen, Diferenciación y Maduración de Linfocitos T	23
- Clasificación	23
- Activación de Linfocitos T	26
- Interacción de Linfocitos T y CDs	27
4.6 LINFOCITOS T Y CÁNCER	28
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
6. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	31
7. HIPÓTESIS	32



8. OBJETIVOS.....	32
9. TIPO DE ESTUDIO.....	32
10. VARIABLES.....	32
11. UNIVERSO O POBLACIÓN DE ESTUDIO	32
12. RECURSOS	33
13. MATERIALES.....	33
14. METODOLOGÍA.....	35
15. RESULTADOS.....	44
16. DISCUSIÓN.....	54
17. CONCLUSIONES.....	60
18. REFERENCIAS.....	61



INDICE DE ABREVIATURAS

COCE	Carcinoma Oral de Células Escamosas.
CD	Célula Dendrítica (CDs- Células Dendríticas).
COCE BD	COCE Bien Diferenciado.
COCE MD	COCE Moderadamente Diferenciado.
COCE PD	COCE Pobremente Diferenciado.
CONADIC	Consejo Nacional contra las Adicciones (Mex).
CPA	Célula Presentadora de Antígenos.
FOXP3	(Forkhead box P3) Regulador maestro miembro de la familia de proteínas FOX.
HNSCC	(Head and Neck Squamous Cell Carcinoma) Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello)
H/E	Tinción de Hematoxilina Eosina.
IL- #	Interleucina.
INCaN	Instituto Nacional de Cancerología (Mex)
IntCDs	Células Dendríticas Intersticiales o Dérmicas
LCs	Células de Langerhans.
LTC	Linfocitos T Citotóxicos.
MHC	(Major Histocompatibility Complex) Complejo Principal o Mayor de Histocompatibilidad.
NK	(Natural Killer) Células asesinas naturales o Células NK.
NKT	Células T Asesinas.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
PGE2	Prostaglandina 2 (Dinoproston).
SSA	Secretaría de Salud.
TCR	(T Cell Receptor) Receptor de Linfocitos T.
TGF-beta1	(Transforming Growth Factor) Factor de Crecimiento Transformante beta 1.
TNF-beta	(Tumor Necrosis Factor – beta) Factor de Necrosis Tumoral beta.
Treg	Células T Regulatorias.
VEB	Virus de Epstein-Barr.
VEGF	(Vascular Endothelial Growth Factor) Factor de Crecimiento Vascular Endotelial.
VPH	Virus del Papiloma Humano.



IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS Y TIPIFICACIÓN DE LINFOCITOS T EN CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS

RESUMEN

El Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE) es una neoplasia maligna epitelial que presenta un crecimiento invasivo y produce metástasis. El cáncer, como causa de muerte representa una incidencia del 13% a nivel mundial. El cáncer bucal y orofaríngeo representa el octavo lugar dentro de esta incidencia y el COCE alrededor del 90% de todas las neoplasias orales. La distribución anatómica es lengua, piso de boca, mucosa oral, encías y paladar duro. De acuerdo a la OMS el COCE se clasifica en Bien Diferenciados (BD), Moderadamente Diferenciados (MD) y Pobremente Diferenciados (PD).

Diferentes factores como el sitio anatómico, el grado de diferenciación histológica así como del estado inmunológico influyen fuertemente en el desarrollo de esta neoplasia. En la respuesta antitumoral innata es importante el papel que desempeñan las células NK, los macrófagos y las Células Dendríticas (CDs), donde éstas últimas, son las Células Presentadoras de Antígenos (CPAs) más potentes, capaces de activar la respuesta linfoide a través de sus receptores de antígeno y jugar un papel primordial en la defensa antitumoral. La presencia de CDs y Linfocitos T CD4+ y CD8+ en el COCE se ha asociado a un mejor pronóstico y es posible que el grado de inmunidad antitumoral dependa críticamente de estos grupos celulares.

El objetivo principal de este estudio fue identificar CDs y Linfocitos T CD4+ y CD8+ y correlacionar su número con el grado de diferenciación histológica. Se analizaron 30 muestras de COCE primario procesadas mediante técnicas de inmunohistoquímica para su localización. La cuantificación celular se realizó dentro de un campo amplio y representativo del tumor en cada una de los tejidos obteniéndose el promedio en base al grado de diferenciación.

Los resultados mostraron que la densidad de CDs y Linfocitos T CD4+ y T CD8+ fue mayor en los COCE BD y MD que en los PD en relación al grupo control (Mucosa Sana), sugiriendo que el grado de diferenciación histológica es una



característica importante en el COCE, donde el número de CDs y Linfocitos T CD4+ y T CD8+ se ve incrementado significativamente conforme la diferenciación histológica es más conservada, lo que podría deberse al microambiente tumoral menos agresivo de los COCE BD respecto a los PD debido a que las células neoplásicas han sido capaces de acumular mutaciones necesarias para evadir la respuesta inmune e impide tanto la maduración como la presencia de células del sistema inmunológico en esas zonas del tumor.



INTRODUCCIÓN

Una Neoplasia maligna es definida como un incremento en la proliferación celular fuera del control biológico, cuyo crecimiento provoca invasión y destrucción tisular local y a distancia (metástasis). Un carcinoma es una neoplasia maligna de origen epitelial. La neoplasia maligna más frecuente en cavidad bucal y orofaringe corresponde al Carcinoma Oral de Células Escamosas y es una neoplasia que tiene un importante impacto a nivel mundial debido al comportamiento agresivo que puede mostrar esta neoplasia^{1,2}.

ANTECEDENTES

CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS

El Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE) es una neoplasia maligna epitelial que presenta diversos grados de diferenciación histológica, es de evolución rápida y metastatiza a ganglios linfáticos principalmente. El COCE es una neoplasia devastadora que año con año presenta un significativo aumento a nivel mundial.

Incidencia y Mortalidad.

En el 2003, la OMS mostró que la incidencia mundial del cáncer podría aumentar en un 50% y llegar a 15 millones de nuevos casos en el año 2020³. En el año 2000, un estudio realizado en 191 países miembros de la OMS, mostró que los tumores malignos fueron la causa del 12% de los casi 56 millones de muertes que se produjeron en el mundo por todas las causas; donde 6,2 millones de personas murieron por esa causa³. El cáncer bucal y orofaríngeo representó el octavo lugar dentro de esta incidencia y el COCE representó el 90% de todas las neoplasias orales (un aproximado de 389,650); de las cuales 266, 672 fueron para cavidad bucal y 122, 978 para orofaringe, representando de esta manera, el 5% de todos los cánceres en hombres y 2% para las mujeres. Sin embargo la incidencia por distribución geográfica es variable en todo el mundo. En algunos países de Asia e



INTRODUCCIÓN

Una Neoplasia maligna es definida como un incremento en la proliferación celular fuera del control biológico, cuyo crecimiento provoca invasión y destrucción tisular local y a distancia (metástasis). Un carcinoma es una neoplasia maligna de origen epitelial. La neoplasia maligna más frecuente en cavidad bucal y orofaringe corresponde al Carcinoma Oral de Células Escamosas y es una neoplasia que tiene un importante impacto a nivel mundial debido al comportamiento agresivo que puede mostrar esta neoplasia^{1,2}.

ANTECEDENTES

CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS

El Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE) es una neoplasia maligna epitelial que presenta diversos grados de diferenciación histológica, es de evolución rápida y metastatiza a ganglios linfáticos principalmente. El COCE es una neoplasia devastadora que año con año presenta un significativo aumento a nivel mundial.

Incidencia y Mortalidad.

En el 2003, la OMS mostró que la incidencia mundial del cáncer podría aumentar en un 50% y llegar a 15 millones de nuevos casos en el año 2020³. En el año 2000, un estudio realizado en 191 países miembros de la OMS, mostró que los tumores malignos fueron la causa del 12% de los casi 56 millones de muertes que se produjeron en el mundo por todas las causas; donde 6,2 millones de personas murieron por esa causa³. El cáncer bucal y orofaríngeo representó el octavo lugar dentro de esta incidencia y el COCE representó el 90% de todas las neoplasias orales (un aproximado de 389,650); de las cuales 266, 672 fueron para cavidad bucal y 122, 978 para orofaringe, representando de esta manera, el 5% de todos los cánceres en hombres y 2% para las mujeres. Sin embargo la incidencia por distribución geográfica es variable en todo el mundo. En algunos países de Asia e



India, el Cáncer Oral representa el 40% del total de las neoplasias malignas mientras que en países occidentales el COCE representa del 2 al 5% de todas las neoplasias malignas y el 10-20% de los situados en la cabeza y cuello, ubicándose dentro de los 10 tipos más comunes de neoplasias ².

Hablando específicamente de la situación en México, el cáncer como causa de muerte representó el segundo lugar en 1996 siendo el responsable del 11.4% del total de las muertes producidas en ese mismo año⁴.

Durante un periodo de 9 años (1985 a 1994), el Instituto Nacional de Cancerología (INCaN) reportó 28,581 pacientes con confirmación histológica de neoplasia maligna; la distribución en la incidencia de cavidad bucal fue de 415 casos para hombres, representando el quinto lugar (o el 4.6% del total de las neoplasias malignas) y 265 casos en mujeres, representando el décimo tercer lugar (1.3% del total de neoplasias malignas)⁵. De acuerdo al Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas (RHNM) ⁶ en el año 2000 se notificaron 1389 casos de neoplasias malignas localizadas en labio, cavidad bucal y faringe, representando el 1.51 % de los 91913 casos de neoplasias malignas registradas ese año⁷. Para cavidad bucal, la incidencia registrada por el RHNM ocupó el lugar 22 con respecto a la localización de cáncer en ambos sexos (1% del total de casos registrados) y el COCE el primer lugar entre los diversos tipos histológicos de neoplasias malignas bucales y orofaríngeas ^{7,8}.

En un estudio retrospectivo realizado en la UAM-X y en un servicio privado de Diagnóstico especializado en patología bucal durante un periodo de 5 años y de un total de 3586 exámenes histopatológicos de neoplasias malignas de la región bucal, el COCE fue la neoplasia más frecuente pero con una frecuencia de 41.6% ⁹. En otro estudio realizado por el Hospital Central Militar de 1987 a 1997, la frecuencia reportada fue aún más baja: 3.74 por 1000 del total de tumores malignos registrados en ese mismo hospital⁴. Por otro lado, el Hospital General de México reportó 508 casos de pacientes con confirmación histológica de COCE de 1992 al 2002, en el que después de la cara como localización anatómica predilecta, el labio se localiza en el cuarto lugar de las zonas preferidas para esta neoplasia¹⁰.



El subtipo histológico predominante registrado para el COCE corresponde a Bien Diferenciados (BD), seguido de Moderadamente Diferenciados (MD) y finalmente los Pobremente Diferenciados (PD) ^{4, 11}.

Dentro de cavidad oral, la distribución anatómica donde asientan estas neoplasias, de mayor a menor frecuencia son: lengua (55%), piso de boca (25%), mucosa oral (10%), encías (5-10%) y finalmente paladar duro (1%). El COCE se presenta fundamentalmente entre los 50 y 70 años, con una media de 60 años en México⁴, reportándose que el sexo masculino presenta mayor afección que el femenino (1.8 hombres por cada mujer)⁸.

Factores de Riesgo

Existen múltiples factores de riesgo conocidos para esta neoplasia. Entre ellos están la edad, el consumo de tabaco y alcohol, irritación crónica, mala higiene, estado nutricional, deficiencia de vitamina A y C, Virus de Epstein-Barr (VEB) ¹² y Virus del papiloma humano (VPH) (sobre todo el subtipo 16 y 18), compuestos químicos empleados en algunas profesiones (níquel, ácido sulfúrico, algunas fibras textiles), lesiones premalignas de la boca (leucoplasias, eritroplasias), y otras enfermedades menos frecuentes como liquen plano erosivo, la fibrosis oral submucosa o el Síndrome de Plummer- Vinson ^{13, 14, 15}.

Alcohol y Tabaco

El consumo de alcohol y tabaco ha sido relacionado como uno de los principales factores de riesgo para el cáncer oral. Al menos un 75% de los cánceres diagnosticados en Estados Unidos y Europa se atribuyen a la combinación de estos dos hábitos, ya que es difícil determinar hasta qué punto el consumo de alcohol o tabaco por separado, tiene más peso en el desarrollo de neoplasias en boca¹⁶.

El consumo del tabaco se considera como un factor importante de riesgo independiente del consumo del alcohol en cánceres de laringe e hipofaringe, sin embargo es importante la asociación con alcohol en el caso de cáncer de boca y orofaringe^{17,18}. Cualquier forma en el uso del tabaco ya sea cigarrillos o pipa, representa un alto nivel de riesgo para el desarrollo de cáncer y las diferencias entre



éstos como factores de riesgo se basa en las diferentes dosis de nicotina, alquitrán y monóxido de carbono que liberan cada uno de ellos así como el patrón de inhalación^{14,17,18}.

La situación del tabaquismo a nivel mundial es un problema preocupante. La OMS señala que del total de la población mundial, el 30% de los adultos son fumadores y de este grupo 3.5 millones fallecen cada año. Globalmente existen casi 1100 millones de fumadores, de los cuales 300 millones son de países desarrollados y los 800 millones restantes pertenecen a países en desarrollo¹⁹, donde México es parte importante de este tema, ya que con sus cerca de 15 millones de fumadores se localiza dentro de los 20 países con más población fumadora²⁰. La Encuesta Nacional de Adicciones del año 2002 refirió que el 23.5% de la población mexicana de 12 a 65 años fuma²¹. Encuestas Nacionales de Adicciones (ENA) hechas en 1988 y 1998 mostraron un discreto incremento de 4 millones de fumadores en 10 años (cifra que pasó de 9 millones de fumadores activos en 1988 a más de 13 millones en 1998). La tasa de mortalidad por las principales causas de muerte atribuibles al consumo de tabaco muestra un incremento de cáncer de pulmón de 1.8 por 100,000 habitantes en 1970 a 5.8 en 1990 y para otros cánceres la tasa por cada 100 000 fue de 3.4 en 1970, 4.8 en 1980 y 7.8 en 1990¹⁹. Informes del Consejo Nacional contra las Adicciones (CONADIC) y la Secretaría de Salud (SSA) señalan que la tasa de muerte por cáncer atribuible al tabaco ha aumentado en ambos sexos durante los últimos años siendo más elevada entre los hombres (proporción 2.5 hombres por 1 mujer). Además las estadísticas agregan que entre 1992 y 1998 la mortalidad por tumores malignos en labio, cavidad bucal y faringe tendió a incrementarse llegándose a registrar, en ese último año, 735 defunciones por dichas causas²².

Dentro del porcentaje total de personas fumadoras, 28.3% declaró consumir bebidas alcohólicas en el año 2000 con un incremento en el año 2006 del 38%²¹. Se han analizado en diferentes estudios casos pocos comunes de pacientes con cáncer de cabeza y cuello, donde se incluyen casos de pacientes con COCE, que presentaban el hábito de fumar o de beber alcohol sin haber nunca combinado ambos hábitos, mostrando que los pacientes fumadores tenían una probabilidad 2.13 mayor de desarrollar cáncer comparado con un grupo control no fumador. Entre los



nunca fumadores, el consumo de alcohol se encontraba asociado con un riesgo incrementado de padecer cáncer solamente cuando el alcohol era consumido en una alta frecuencia (más de tres copas diarias) y el riesgo de desarrollar la enfermedad fue de 2.04 veces mayor que en las personas que no lo hacían ^{16,23,24}.

Virus del Papiloma Humano (VPH) y Virus del Epstein-Barr (VEB)

La mucosa bucal, siendo el sitio con mayor exposición química, infecciones y traumas, es muy vulnerable a la carcinogénesis. Los VPHs han sido considerados como un importante factor etiológico debido a la asociación morfológica con el COCE y su capacidad para inmortalizar queratinocitos orales y potenciar su transformación maligna. Uno de los mecanismo de acción propuestos para el VPH en la tumorigénesis incluye el punto de ruptura en la secuencia de E1/E2, permitiendo la integración del VPH dentro del genoma del huésped e incrementándose significativamente la tumorigénesis a través de la sobrerregulación de E6 y E7 codificadas tempranamente en el marco de lectura abierta. La sobreexpresión de E6 y E7 del VPH desorganizan e interrumpen a genes supresores de tumor como p53 y pRb, así como a otras proteínas celulares involucradas en la carcinogénesis presentándose defectos en el control de apoptosis, reparación de DNA y ciclo celular favoreciendo la transformación celular maligna²⁵.

En base a su potencial oncogénico, los VPHs se dividen en dos grupos, el grupo de Bajo Riesgo (6 y 11, los más comunes y representativos) que pueden producir lesiones pero raramente evolucionan a una lesión premaligna y los de Alto Riesgo (16 y 18) los cuales están asociados en cánceres cervicales, anogenitales y orales²⁵.

Las manifestaciones clínicas dependen de la localización epitelial, tipo del VPH y el estado inmunológico del huésped ^{26,27,28}. La asociación del VPH es más estrecha en cánceres orofaríngeos, especialmente en tonsilas y seguido de piso de boca. El subtipo 16 del VPH, de alto riesgo, es el tipo más predominante. Su presencia incrementa de una mucosa normal a una displasia y finalmente de un cáncer. La prevalencia que ha sido reportada es de dos veces mayor en lesiones



pre malignas comparada con mucosas normales y es hasta cinco veces mayor en COCE ²⁵.

El papel que juega el VPH en el desarrollo de lesiones epiteliales es claro, sin embargo se ha sugerido que el sinergismo con otros virus otros factores pueden incrementar la progresión de infecciones benignas de VPH a malignas ²⁹. El sinergismo del VEB junto con el VPH se ha relacionado a cáncer cervicouterino donde se reporta la presencia del VEB en el tracto genital, lo que sugiere la infección por esa vía, además de la detección de DNA del VEB en especímenes cervicales confirmados histológicamente con displasias epiteliales y en lesiones pre malignas y malignas del cérvix ^{30,31,32} y hoy en día es un hecho de que al igual que el VPH, el VEB infecta epitelios escamosos de la piel y mucosas y por lo tanto, la interacción entre estos dos virus juega un papel importante para el desarrollo de una neoplasia en cavidad oral³⁰.

Inmunosupresión

El establecimiento de una eficiente respuesta inmune es importante para la eliminación tumoral, donde tienen que actuar mecanismos innatos y adaptativos del sistema inmune. Sin embargo existe evidencia que indica que la respuesta inmune en vez de eliminar células malignas, es suprimida por las mismas células neoplásicas debido a la capacidad que adquieren estas células para evadir la respuesta inmune. Esto se ha comprobado con diversas terapias inmunosupresivas utilizadas en trasplantes de órganos, donde al emplear ciertos agentes inmunosupresivos como azatioprina se facilita el desarrollo y progresión de cáncer³³.

Como ejemplo se ha reportado que pacientes sometidos a trasplante de riñón y bajo tratamiento de agentes inmunosupresivos han desarrollado cáncer de labio y lengua ^{33,34}, por otro lado, pacientes sometidos a inmunosupresión después de un trasplante de hígado y que presentaban leucoplasia evolucionaban rápidamente a carcinomas ³⁵. Otro caso es en pacientes con cáncer de hígado que fueron sometidos a trasplante de médula ósea y que desarrollaron cáncer oral secundario al primario^{14, 36}.



Existen numerosos ejemplos más y a pesar de que son conocidos diversos mecanismos por los cuales las células neoplásicas llevan a un escape de tumor, es un hecho que el microambiente tumoral y el sistema inmune tienen un rol muy importante para la progresión o resolución de la neoplasia³⁷.

Higiene Oral y Dentición

Existe evidencia de que una pobre higiene oral y una mala dentición (restauraciones incorrectas, dientes con filos cortantes y dentaduras mal ajustadas) han sido implicadas como factores de riesgo frente a neoplasias debido a la irritación crónica que producen. La irritación crónica puede producir una mayor exposición de los carcinógenos, actuando como cofactor en la carcinogénesis^{14,38}.

Dentro de una pobre dentición, se incluyen además de las restauraciones y dentaduras mal ajustadas, la falta de piezas dentarias como un importante factor de riesgo para desarrollar cáncer oral. En un estudio realizado en China, se valoró el riesgo de este factor con base al número de piezas faltantes y se encontró que una persona que hubiera perdido de 15 a 32 dientes, en comparación con aquellas que tenían todas sus piezas dentales, tenía de 5.3 hasta 7.3 mayor probabilidad de desarrollar cáncer oral³⁹.

Aquellos que reportaban no cepillarse sus dientes tuvieron igualmente un riesgo más elevado (6.9 veces mayor en hombres y 2.5 veces más para mujeres)³⁹. Esto se atribuye a la presencia de microorganismos orales, ya que estos junto con los biofilms podrían ser otro factor en consumidores de alcohol crónicos ya que algunos microorganismos facilitan el metabolismo de etanol a acetaldehído (que es un potente carcinógeno) en la cavidad oral⁴⁰.

Estos hallazgos indican que la higiene y diferentes condiciones orales juegan papeles importantes como factores de riesgo para el cáncer bucal⁴⁰.

Etnicidad y Raza

Se ha sugerido que la susceptibilidad a desarrollar cáncer oral a partir del tabaco y alcohol puede diferir entre raza y etnias. La incidencia de cáncer oral varía entre diferentes grupos raciales alrededor del mundo. Los asiáticos del sur presentan tasas



mayores de cáncer oral en comparación con la mayoría de otros países y hombres negros. Esto puede ser atribuido al estilo de vida como diferencias nutricionales, patrones de consumo de tabaco (en la India el consumo de éste va acompañado de betel) y alcohol, así como patrones genéticos de cada grupo étnico y racial ^{14,41}.

Signos y Síntomas

Algunos Carcinomas de Células Escamosas son a menudo asintomáticos o pueden presentar síntomas vagos, junto con hallazgos físicos mínimos (eritroplasias y/o leucoplasias). Las características clínicas comunes de los carcinomas son aumento de tamaño en mucosa o zona afectada, dolor, ulceraciones, halitosis, dificultad para abrir la boca, masticar, así como dolor a la deglución, pérdida de peso y sangrado en carcinomas orales y orofaríngeos en estados avanzados. Los carcinomas de mayor avance se presentan como crecimientos ulceroproliferativos con áreas de necrosis con extensiones a áreas y estructuras circundantes, como hueso, músculo y piel. En etapas terminales, los pacientes pueden presentar fístulas orocutáneas, hemorragias constantes, con anemias y caquexias severas^{42,43}.

Características Histológicas

Histológicamente, los cambios que ocurren de una mucosa sana a una neoplásica son progresivos y pueden observarse a través del estudio microscópico de una displasia. Una displasia es una lesión del epitelio donde ocurren cambios citológicos y alteraciones estructurales donde se tienen aumentada la probabilidad de progresión hacia el carcinoma de células escamosas^{44,45}. Consecuentemente, cuando las células displásicas evolucionan a un fenotipo maligno, invade la membrana basal y penetra el tejido conectivo; intravasan vasos linfáticos y/o sanguíneos favoreciendo su transporte y diseminación a órganos distantes.

En la descripción histológica de un carcinoma se incluyen cambios celulares, individuales o estructurales, donde los más característicos son:

Celulares:

- Hiperchromatismo: Aumento de la intensidad tincional de los núcleos



- Pleomorfismo nuclear: Formas nucleares diferentes a las típicas de cada región epitelial.
- Multinucleación: El núcleo celular presenta varios lóbulos
- Cambios en los índices: Núcleo/célula: El núcleo ocupa más espacio celular
- Aumento de mitosis: El índice de duplicación celular es mayor.
- Mitosis atípicas: Duplicación celular fuera de las capas germinativas.

Estructurales

- Alteraciones papilares: Sustitución de la morfología de las prolongaciones epiteliales digitiformes por formas redondeadas, aplanadas o bulbosas
- Hiperplasia basal: Originada por el aumento de mitosis en la capa germinal
- Hipercelularidad: Número exagerado de células en cualquier estrato epitelial.
- Diferenciado/No diferenciado: Alteraciones en la maduración, las células pueden sufrir alteración de los rasgos morfológicos característicos del estrato al que pertenecen, adquiriendo formas bizarras o atípicas⁴⁶.

Dependiendo del grado de semejanza con la célula epitelial, se definirá a su vez el grado de diferenciación. Entre menos diferenciado sea, la neoplasia tiende a ser más agresivo y el pronóstico es más pobre. De acuerdo a la OMS, el COCE es clasificado en Bien (BD), Moderada (MD) y Pobremente Diferenciado (PD). El COCE BD presenta similitud al tejido epitelial escamoso normal. En los Moderadamente Diferenciados se observa distinta actividad mitótica, incluyendo mitosis anormales o atípicas, así como pleomorfismo nuclear. Existe menor grado de queratinización. En los Pobremente Diferenciados, predominan las células inmaduras, con numerosas mitosis típicas y atípicas y un grado mínimo de queratinización⁴⁷. Las características histológicas detalladas basadas en el método original descrito por Broders⁴⁸, que toma en cuenta en grado de Queratinización, Pleomorfismo nuclear y celular y Actividad Mitótica se describen a continuación:

Grado 1: Bien Diferenciados; Las características histológicas y citológicas son semejantes a las del epitelio escamoso de la mucosa oral. Existen proporciones variables de células basales y escamosas con puentes intercelulares; la queratinización es un dato importante; se observan pocas



figuras mitóticas (0-2 mitosis por campo histológico a 400X) y pocas mitosis atípicas, son extremadamente raras la presencia de células epiteliales multinucleadas y el pleomorfismo nuclear y celular es mínimo.

Grado 2: Moderadamente Diferenciados; en esta categoría las neoplasias presentan características histológicas intermedias entre los bien y pobremente diferenciados. Presentan menor queratinización que el grado I y un mayor pleomorfismo nuclear y celular; existen mayor cantidad de figuras mitóticas y algunas son anormales en forma; las uniones intercelulares son menos conspicuas.

Grado 3: Pobremente Diferenciados: histológica y celularmente existe un pequeño parecido al tejido epitelial de la mucosa oral. La queratinización es rara o nula, uniones intercelulares escasas; se observa una actividad mitótica elevada (más de 5 mitosis por campo) y mitosis atípicas; existe un evidente pleomorfismo nuclear y celular así como células epiteliales multinucleadas.

De acuerdo a la OMS, los COCE de grado I y II o Bien y Moderadamente Diferenciados son los más predominantes⁴⁷. De acuerdo a otros autores, predominan los carcinomas bien diferenciados (casi el 50%) y algunos autores han sugerido que en general, las formas bien diferenciadas son más benignas, produciendo menos metástasis ganglionares y recidivas tumorales; al mismo tiempo, en la revisión de distintos trabajos, muchos de los autores no encuentran relación alguna, mientras que en otros reportes se ha establecido la existencia de correlación entre el bajo grado de diferenciación celular y un pronóstico pobre^{5,13,46,49}.

CÁNCER Y LA RESPUESTA INMUNE

El descubrimiento de la Inmunidad Antitumoral tiene sus raíces en el *Memorial Hospital* de Nueva York en el siglo XIX cuando Willian Coley⁵⁰ constató regresiones de tumor en sus enfermos que desarrollaban paralelamente episodios infecciosos y más tarde, se confirmó que la inyección de extractos de bacterias limitaba la gangrena de los tumores, llegando a la conclusión de que sus sustancias



estimulaban al sistema inmune limitando con eso la proliferación de células neoplásicas⁵⁰.

El sistema inmune tiene tres papeles principales en la prevención de tumores. Primero, puede proteger al huésped de tumores inducidos por virus al eliminar o suprimir la infección viral. Segundo, la pronta eliminación de patógenos y resolución de la inflamación puede prevenir el establecimiento de un ambiente inflamatorio que conduzca a tumorigénesis. Tercero, puede identificar específicamente y eliminar células tumorales con base a su expresión de antígenos específicos de superficie o moléculas inducidas por el estrés celular⁵¹.

En el desarrollo del cáncer, una compleja red de células y sus productos interactúan para inducir la generación, expresión y regulación de la inmunidad innata y adquirida a diferentes niveles. En la respuesta antitumoral innata se menciona, sobre todo, el papel que desempeñan los anticuerpos naturales, las células NK, los macrófagos y las CD. En la respuesta adaptativa intervienen los linfocitos T citotóxicos y en menor medida los anticuerpos^{5,13,52,53,54,55}.

Las CD son consideradas como las células Presentadoras de Antígenos (CPAs) especializadas, consideradas clave en el desarrollo de enfermedades autoinmunes, tumorales y en la defensa contra microorganismos⁵⁵. Están presentes en varios tejidos como piel y membranas; al encontrar antígenos extraños que se localizan sobre la membrana celular de la célula invasora, forman junto con moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) el complejo péptido/molécula. El cual es transportado por la CD que se traslada hasta los ganglios linfáticos o al bazo, donde interactúa con otras células del sistema inmunológico, como las células B y las células T y puede ser reconocido por un receptor de antígeno de los linfocitos T (TCR) dentro de los nódulos linfáticos a través de la linfa, activando a las células T específicas de antígeno⁵⁶.

Por otro lado “Escape de tumor” es un término conocido que se refiere a la habilidad que presenta el cáncer para evitar su destrucción por el sistema inmune del huésped. La regulación negativa que ocurre durante el crecimiento celular canceroso permite potencialmente la producción de proteínas específicas de tumor que pueden ser reconocidas como “extrañas” o ajenas al sistema inmune. La mayoría de los



tumores tienden a evitar un ataque mediado inmunológicamente a pesar de la presencia de células inmunes específicas. Algunas de las posibles explicaciones para este fenómeno incluyen: una pérdida de expresión de moléculas MHC; pérdida de generaciones de antígenos; y una posible disminución en la regulación del procesamiento de antígenos en las células tumorales. La respuesta inmune mediada por células juega un papel importante en la respuesta antitumoral. Sin embargo, la mayoría de los pacientes muestran un daño profundo generalizado de las respuestas inmunes celulares^{57,58}.

CÉLULAS DENDRÍTICAS

Generalidades

Las CDs, llamadas así por sus largos brazos, son un tipo de glóbulos blancos que se diferencian a partir de precursores que circulan en la sangre y luego, aún en forma inmadura, se depositan en la piel, las membranas mucosas y órganos como los pulmones y el bazo^{59,60}. Las CDs son consideradas como las células Presentadoras de Antígenos (CPAs) más potentes, con capacidad para activar la respuesta linfoide y dirigir el destino de la respuesta inmune^{55,61}. Atrapan agentes extraños, los reducen a fragmentos (péptidos antigénicos) y los exhiben sobre su superficie, se trasladan hasta los ganglios linfáticos o al bazo, donde interactúan con otras células del sistema inmune, como las células B donde se promueve la producción de anticuerpos, y la activación de linfocitos T (Cooperadores, Citotóxicos, NKT o asesinas y Reguladores)⁵⁶. Funcionalmente, las CDs inmaduras se encuentran en tejidos periféricos y se especializan en capturar antígenos por endocitosis mediada por receptor o macropinocitosis⁵⁹.

Las CDs son relativamente escasas, representan el 0.2% de los glóbulos blancos de la sangre y su presencia en tejidos es aún menor⁵⁶.



Tipos de Células Dendríticas

De acuerdo con la expresión de marcadores de superficie, las DCs han sido divididas en tres grupos:

- Las CDs Mieloides, que expresan el marcador CD11c+ y marcadores mieloides como CD13+ y CD33+ y requieren de Factor Estimulante de Colonias Granulomonocítico (GM-CSF) para sobrevivir.

Dentro de este grupo están las Células de Langerhans (LCs) y las CDs intersticiales. Las LCs son encontradas en piel y superficies mucosas y se caracterizan por la presencia de gránulos de Birbeck y la expresión de Langerina, E-caderina, CD1a y CD1c. Las CDs intersticiales o dérmicas (intCDs) que también se encuentran en piel y mucosas, expresan en su superficie CD1a, b y c y Factor XIIIa^{62,63,64}. Ambas inducen proliferación de células T vírgenes, mientras que las CDs intersticiales pueden inducir además la proliferación de células B vírgenes y muestran una capacidad fagocítica más potente y más duradera. La respuesta que inducen en células T es Th1⁶⁵.

- Las CDs Linfoides, también conocidas como células dendríticas plasmocitoides, son CD11c-, expresan el receptor de la cadena α de IL-3 (CD123) y BDCA-2 (CD303)⁶² y a diferencia de las CDs mieloides, requieren de IL-3 para sobrevivir pero no de GM-CSF. Este tipo celular es capaz de inducir polarización de la respuesta Th2^{65,66}.
- Las CDs tímicas, caracterizadas por la expresión del homodímero CD8 α , son al parecer de origen linfoide, generadas de precursores tímicos y se localizan en la médula del timo y en zonas de células T del bazo y nódulos linfoides⁶⁶.

Función

Las células dendríticas son muy eficientes para capturar y presentar antígenos. Las células inmaduras tienen un arsenal de mecanismos para capturar microorganismos invasores: los succionan con receptores tipo ventosa, ingieren fluido que los rodea por pinocitosis, o los fagocitan en vacuolas. Además ciertas células dendríticas inmaduras también son capaces de eliminar de inmediato a los virus mediante la secreción de interferón alfa^{57,61}.



Las CD usan moléculas del MHC para exhibir los antígenos en su superficie. Las moléculas del MHC son proteínas que tienen la capacidad de unirse a péptidos propios o extraños, derivados de proteínas que han sido previamente procesadas por complejas maquinarias enzimáticas en la CPA. Este complejo péptido/molécula es transportado y presentado en la superficie y allí puede ser reconocido por un receptor de antígeno de los linfocitos T o TCR^{55,57,61}.

En los ganglios linfáticos por medio de la linfa, las células terminan de madurar y muestran sus moléculas de MHC cargadas de antígeno a los linfocitos T cooperadores vírgenes. Las CD son capaces de inducir a los linfocitos T cooperadores para que puedan reconocer un antígeno como ajeno o peligroso debido a moléculas coestimuladoras ubicadas en sus superficies, las cuales pueden unirse a los receptores correspondientes de las células T⁵⁵. Estos Linfocitos T cooperadores inducen a los Linfocitos B a producir anticuerpos para que se unan al antígeno y lo desactiven. Las CD y los linfocitos T cooperadores también activan linfocitos T asesinos (NKT) y T Citotóxicos. Algunas de las células T instruidas se convierten en células de Memoria y pueden permanecer en el organismo durante años⁶¹.

Interacciones entre CD y células mediadoras de respuestas inmunes específicas

Las CD son moduladores clave de la respuesta inmune al inducir la diferenciación de células T cooperadoras hacia la respuesta Th (tipo 0, 1, 2 o 3)^{66,67}.

Las CD promueven la diferenciación de las células T hacia la respuesta Th1 o Th2 dependiendo de la proporción de CD/Linfocitos T así como la activación de linfocitos B. Además, el tipo de respuesta depende del grado de maduración, el microambiente, y la actividad funcional de las CD⁶⁸.

Los agrupamientos formados entre las CD y células T en órganos linfoides secundarios incluyen el reconocimiento del complejo péptido/MHC sobre las CD por los TCRs antígenos-específicos. El agrupamiento se lleva a cabo a través de quimiocinas derivadas de CD maduras que atraen a las células T expresando los receptores cognados CCR7 y CCR4 y por moléculas de adhesión y por el receptor



de lectinas ICAM-3, DC-SIGN expresada en las CDs⁶⁹; en las células T las moléculas involucradas para este agrupamiento son CD2, CD11a y CD49d expresada en la superficie de células T. Finalmente la activación de células T se lleva a cabo a través de las moléculas coestimuladoras CD40L/CD40⁶⁹.

Por otro lado, las CDs pueden modular directamente el crecimiento y diferenciación de células B. Por ejemplo, las CDs CD40 activadas producen un miembro de la familia TNF (BAFF/BLys-L) el cual se une a los receptores de las células B e induce proliferación y secreción de Ig por las células B⁶⁶.

CÉLULAS DENDRÍTICAS Y COCE

La supervivencia de pacientes que padecen COCE no ha variado significativamente en los últimos años a pesar del progreso de las técnicas quirúrgicas, de la radioterapia y quimioterapia

La regulación negativa ocurrida durante el desarrollo neoplásico permite la expresión de proteínas específicas de tumor en las células malignas lo que permite su reconocimiento. Sin embargo, con el “escape de tumor”, la respuesta inmune mediada por células se ve afectada directamente a pesar de la presencia de células inmunes específicas de tumor, ya que la mayoría de los pacientes muestran un daño profundo generalizado de ese tipo de respuesta. Específicamente, dentro del COCE los linfocitos y macrófagos encontrados dentro del estroma del tumor exhiben una falta marcada de habilidad citotóxica^{57,58}.

Sin embargo, la presencia de CDs en carcinomas de cabeza y cuello, así como en COCE se ha asociado a un mejor pronóstico y es posible que el grado de protección de inmunidad tumoral dependa críticamente del nivel y naturaleza de las CDs. La función de las CDs, sin embargo, se ve comprometida en varios pacientes con COCE y es muy probable que esto sea un método de escape del tumor. Los niveles de CDs en tumores afecta positivamente el pronóstico y pruebas clínicas humanas han demostrado que las CDs, usadas como vacunas pueden mejorar las respuestas de células T⁵⁸.



De acuerdo a diversos estudios, se ha observado que las CD's son de gran importancia en el monitoreo inmunológico y el control del Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello (HNSCC). La presencia de CD's activas o maduras parece estar relacionada con un mejor pronóstico y supervivencia, mientras que niveles altos de CD's inmaduras, con habilidades inmunológicas suprimidas, se asocian a un pronóstico más pobre ⁷⁰.

Daño en la función de las CD's.

Además del número reducido de CD's conforme avanza el estadio del tumor, causa que por sí sola reduciría la respuesta inmune anti-tumoral, también existe evidencia considerable de que la función de CD's se encuentra dañada. Existen varias teorías para este hecho:

El daño que ocurren en las CD's es causado por clustering (agrupamiento) defectuoso y una estimulación reducida de las células T. Tales disfunciones pueden resultar de una reducción de las moléculas MHC clase II y/o expresión de moléculas coestimuladoras, una ausencia que puede llevar a ignorar o a una apoptosis de las células T específicas de tumor. Además, las CD's en pacientes con COCE han mostrado tener una producción reducida de interferon- α ⁷¹.

Existe controversia en cómo un tumor impone exactamente sus efectos sobre las CD's. Algunos trabajos han mostrado que el contacto directo con las células tumorales inducen apoptosis de las CD's, pero también existe evidencia de la participación sistémica. Se ha observado que la función celular de las LC's es inhibida al mismo grado tanto en el tumor como en sitios distantes. De forma similar se encontró en otro estudio que si se drenan nódulos linfáticos tumorales y se compara con sangre periférica, la estimulación de células T, en términos de presentación de antígenos, se encontraba igualmente dañada ⁷².

In vitro, la interleucina-10 (IL-10) tiene la habilidad de bloquear la diferenciación monocítica en CD's, además de una maduración dañana así como inhibir células de Langerhans epidérmicas a partir de una respuesta alogénica de células T. El Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (Vascular Endothelial Growth Factor- VEGF) ha mostrado también reducción en la producción de CD's. Altos



niveles de VEGF plasmático se relaciona con niveles incrementados de CDs inmaduras⁷³.

El factor clave final en términos de actividad inmunosupresiva son las células inmaduras por sí mismas. La producción de este subtipo de CDs, es en parte, dependiente de los factores derivados de tumor. Dichas células han mostrado una inhibición directamente relacionada a las respuestas específicas de antígeno de las células T y un daño en el desarrollo de las CDs. Como ejemplo podemos citar el trabajo de Ito y cols. (2006) donde el TGF-beta1, PGE2, VEGF e IL-10 son factores inmunosupresores derivado del tumor y que afectan directamente a las CDs y linfocitos T⁷¹.

Sin embargo, un aspecto prometedor de estas células, es que retienen la capacidad de diferenciación a CDs estimuladas inmunológicamente, por lo tanto, estas puede ser restablecidas como parte de la respuesta antitumoral si son estimuladas correctamente^{72,73}.

LINFOCITOS T

Generalidades

Las células T o linfocitos T son los componentes principales del sistema inmunológico adaptativo. Son las únicas células del organismo capaces de reconocer y distinguir específicamente diferentes determinantes antigénicos, por lo que son las responsables de las dos características que definen al sistema inmune adaptativo: especificidad y memoria⁷⁴.

Los linfocitos T son los responsables de coordinar la respuesta inmune celular constituyendo el 70% del total de los linfocitos segregando proteínas o citocinas. El número de leucocitos en sangre periférica en un humano promedio es de 4000 a 11000 por microlitro, del cual, normalmente, un de un 20 a 40% son linfocitos⁷⁵.



Origen, Diferenciación y Maduración de Linfocitos T

Los linfocitos T provienen de una célula progenitora hematopoyética. Se originan a partir de los precursores del hígado fetal y la médula ósea del adulto, desde donde colonizan el timo. La decisión de producir un linaje de linfocitos T se toma influenciado por una serie de mensajes intracelulares, tanto en la médula ósea como en el timo, diferenciando células con TCR y CD4 o CD8 ⁷⁴.

Los mecanismos por los que estos progenitores linfocíticos formados en la médula ósea se diferencian en linfocitos maduros que residen en los tejidos linfáticos periféricos se conoce como Maduración Linfocítica y ocurre en varias etapas :

- Linfocito Pro-T. Reordenación de genes que darán producción a la cadena β del TCR, aún no expresado en la superficie del pro-T. Tampoco se expresan las moléculas accesorias CD4 ni CD8 (células pro-T CD4⁻/CD8⁻ o *doble negativo*).
- Linfocito Pre-T. La expresión de la cadena β marca el estadio pre-T y al mismo tiempo comienza el reordenamiento de la cadena α . Aún siguen sin expresarse las moléculas accesorias CD4 y CD8.
- Linfocito doble-positivo. Expresión tanto la cadena α como β , es decir un TCR completo, CD3 y tanto al CD4 como al CD8 (células CD4⁺/CD8⁺ o *doble positivo*), lo que da paso a los mecanismos de selección positiva y negativa.
- Linfocito T inmaduro o Simple Positivo. Las células además de presentar un TRC completo y un CD3 adquieren uno de los dos marcadores de superficie (CD4⁺CD8⁻ o CD4⁻CD8⁺) y permanecen inmaduros hasta que son activados por algún estímulo específico ^{74,76}.

Clasificación

Se han descrito varios subtipos de células T, cada uno de ellos con una función distintiva.

- Linfocitos T Cooperadores (CD4⁺): Regulan y amplifican los diferentes componentes del sistema inmune, inician la cascada de la respuesta inmune



coordinada mediante la interacción con un MHC de clase II. Se subdividen a su vez en linfocitos de subpoblación TH1 y TH2.

- Linfocitos T Citotóxicos (CD8+): Encargados de las funciones efectoras de la inmunidad celular, interaccionan con moléculas MHC I.
- Linfocitos T de memoria. Esta población celular es la responsable de que la respuesta inmunitaria sea más eficiente y rápida tras exposiciones repetidas. Pueden presentar el marcador CD4+ o CD8+ ⁷⁴.
- Linfocitos T Reguladores (Treg): (CD4+ -CD4+CD25+ y CD4Tr1-; ó CD8+) Suprimen la respuesta inmunológica global ya que son los responsables de identificar si un antígeno es nocivo o no ⁷⁷.
- Células T Natural Killers (NKT): Corresponden a un linaje de linfocitos T que co-expresan marcadores de ambas células (CD1d, cadenas $\alpha\beta$ del TCR y NK1). Dentro de sus funciones principales está atacar y destruir los antígenos o las células que los portan ⁷⁸.

Linfocitos T CD4

Los linfocitos T CD4+ se dividen en Linfocitos o Células T Reguladoras (Treg) y Linfocitos T cooperadores (Th). Los linfocitos T cooperadores controlan la respuesta inmune adaptativa contra patógenos y cáncer al activar otras células efectoras del sistema inmune ⁷⁷.

Los linfocitos T cooperadores (Th) tienen la capacidad de activar células efectoras como Linfocitos T Citotóxicos CD8+, Linfocitos B y Macrófagos. Los linfocitos T CD4+ cooperadores controlan prácticamente todas las respuestas inmunitarias frente a los antígenos proteícos. Son células efectoras de la inmunidad celular y suministran estímulos que son importantes para la proliferación y diferenciación de linfocitos B y LTC (Linfocitos T Citotóxicos)⁷⁴.

Dentro de los linfocitos T CD4+ existen cuatro subpoblaciones (Th0, Th1, Th2 y Th3) en base al patrón de citocinas que secretan, sin embargo dos subpoblaciones son las mayoritarias y tienen un papel cooperador: Th1 y Th2.

Las Th1 juegan un papel importante en la inmunidad celular, secretan IL-2, IFN- γ , IL-12 y TNF- β y estimulan a los macrófagos; las Th2 son importantes para la inmunidad



humoral y secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13^{67,79} y cooperan con los linfocitos B; mientras que las Th3 ejercen un papel regulador de la respuesta inmune. Hay datos que sugieren que las Th0 son las precursoras de las Th1 y Th2 debido a que exhiben un patrón mixto de citocinas tipo 1 y 2 (IL-2, IL-4 e IFN-gamma)^{76,79,80}.

Las funciones de las células T Reguladoras (Treg) incluyen: prevención de enfermedades autoinmunes al mantener la autotolerancia inmunológica; supresión de alergias y asma; tolerancia materno-fetal y tolerancia oral; supresión de activación de Linfocitos T desencadenados por estímulos débiles así como protección de bacterias comensales para no ser eliminadas por el sistema inmune^{81,82}.

La identificación de los linfocitos Treg es problemática debido a que la evidencia existente sugiere que todos los marcadores utilizados actualmente para la identificación de éstas células (CD25, CTLA-4, GITR, LAG-3, CD-127 y Foxp3) representan marcadores de activación generales para las células T debido a que la activación que se lleva a cabo es antígeno-específica o lo que implica que las actividades supresoras de las Treg son dependientes de antígenos⁷⁷.

Linfocitos T CD8

Los linfocitos T CD8⁺ (CTLs) son esenciales para la protección contra virus, bacterias intracelulares y células neoplásicas⁸³. Los linfocitos T CD8⁺αβ reconocen antígenos en el contexto de moléculas MHC tipo I, que son expresadas en la mayoría de células somáticas. Después de la activación, las células CD8⁺ se desarrollan a CTLs listos para eliminar células infectadas por patógenos intracelulares o virus, así como la erradicación de células tumorales⁸⁴.

Las células que expresan la molécula CD8 en su superficie son seleccionadas en el timo para reconocer y responder antígenos peptídicos extraños que se encuentren en una MHC tipo I de una CPA. Una vez que se sacan de su estado de quiescencia se transforman en potentes asesinos antígeno-específicos capaces de penetrar a cualquier tejido para destruir sus blancos⁸⁵.

En respuesta a infecciones agudas y cáncer, estas células tienen una alta tasa de proliferación pudiendo diferenciarse rápidamente a CTLs a partir de linfocitos T “vírgenes”^{86, 87}.



Una vez que han sido activados por un antígeno se pueden llevar a cabo inmediatamente hasta 15 divisiones para que en una semana de estimulación antigénica existan más de 20×10^6 progenies de linfocitos T CD8+ y aproximadamente el 5% de éstas células sobreviven para pasar a ser Linfocitos T CD8+ de Memoria⁸⁶. De igual forma se ha reportado un aumento en el número de Linfocitos T citotóxicos CD8+ en pacientes con cáncer y es un número que no se ve afectado en pacientes que fueron sometidos a radioterapia y/o quimioterapia.

La activación de los linfocitos T CD8+ generalmente es dependiente de linfocitos T CD4+ cooperadores activados por una CPA. Sin embargo, los linfocitos CD8+ pueden ser activados directamente por una Célula Dendrítica que presente una molécula MHC tipo I cargada con un péptido antigénico, esto es debido a que el antígeno podría por sí mismo proveer una señal de peligro y así la respuesta inmune primaria de linfocitos T CD8+ es totalmente independiente de la vía de activación a través de linfocitos T CD4+. Sin embargo, es importante recalcar que la función de las células CD4 cooperadoras sigue siendo fundamental para el mantenimiento de la respuesta citotóxica por parte de los linfocitos T CD8+, ya que de lo contrario la respuesta inmunológica montada tanto por los LTC como por los linfocitos T CD8+ de Memoria no es capaz de mantenerse por sí sola sin la ayuda de linfocitos T cooperadores⁸⁵.

Activación de linfocitos T

Cuando los linfocitos inmaduros reconocen un antígeno comienza su activación y la fase efectora de la respuesta inmune adaptativa mediada por estas células. El reconocimiento se da a través de fragmentos peptídicos derivados de antígenos proteicos que se presentan unidos a moléculas MHC.

Los linfocitos T vírgenes necesitan ser activados por CDs, mientras que los linfocitos T efectores pueden ser activados por una mayor variedad de células presentadoras de antígeno (CPAs) como Macrófagos y Linfocitos B⁷⁴.

La activación de linfocitos T puede ocurrir en el ganglio linfático o en tejidos periféricos. En el ganglio linfático, la activación conduce a la activación de células



efectoras inmunes. En los tejidos periféricos, la activación de linfocitos T conduce a la erradicación del microorganismo del foco infeccioso ⁷⁸.

Una de las primeras respuestas detectables de los linfocitos T a la presentación y reconocimiento antigénico por CPAs es la secreción de citocinas, en especial la Interleucina-2 (IL-2), la cual actúa como factor de crecimiento sobre el mismo linfocito T que lo secreta, por tener ésta receptores para la IL-2. Bajo el efecto de la IL-2, la célula T sufre una proliferación numérica exponencial, denominada expansión clonal, la cual es el fundamento de la memoria inmunológica. La expansión clonal es seguida por una diferenciación celular, produciendo linfocitos CD4+ (encargados de la activación de macrófagos, linfocitos B y otras células) y linfocitos CD8+ (las cuales eliminan ciertas células diana infectadas y activan macrófagos en los tejidos afectados) ^{74,88,89}.

Interacción de Linfocitos T y CDs

Los encuentros “casuales” llevados por la motilidad de las células T y la “carga” de las CDs juegan un rol vital en el escaneo para detectar la presencia de antígenos. Se estima que la frecuencia de contactos CD-célula T llevados a cabo en el nódulo linfático es de 500 por CDs/hora para las células T CD8+ y 5000 contactos por hora para las células CD4+, lo cual es suficiente para permitir que los antígenos extraños sean detectados por el pool de células T en un tiempo razonable. A este ritmo, las probabilidades de que pocas CDs encuentren la célula T específica es de aproximadamente 100-1000 para cualquier antígeno dado, lo que en un día es excelente ^{90,91}.

La maduración es una característica importante de las CDs ya que los cambios fenotípicos y por consiguiente funcionales que ocurren son requeridos para la correcta activación de la respuesta linfoide a través de las moléculas coestimuladoras, sin embargo Höpken y cols (2005), refieren que proporción de CDs-Linfocitos T determinará si la respuesta será proliferación o destrucción para las células T. En su estudio utilizando diferentes proporciones de CDs parcialmente maduras-Linfocitos T transgénicos mostró que la proporción CDs/células T 1:10 inducía proliferación de células T, mientras que la proporción 1:2 inducía arresto de



la proliferación de linfocitos T CD4+, mostrando que la proporción de ambos tipos de células es importante para determinar si se dará Proliferación de células T vírgenes o se inducirá Tolerancia Inmunológica ⁹².

LINFOCITOS T Y CÁNCER.

En diversos tipos de cáncer se ha reportado que la presencia de un infiltrado linfocitario (células T CD4+ y CD8+) es muy importante para que exista una mejor respuesta antitumoral, ya que la presencia de células T con reactividad contra antígenos tumorales representa una parte básica de la Inmunidad tumoral dirigida por las células T ^{79,93,94}. La infiltración de células T en el área tumoral ha sido identificada como un importante factor pronóstico. Se ha observado en diferentes tipos de neoplasias malignas, como en melanoma o cáncer colorectal en estado avanzado donde linfocitos T CD8+ infiltrantes de tumor pueden proporcionar una ventaja en la supervivencia⁷⁹.

Las células Treg podrían modular la respuesta antitumoral en pacientes con cáncer colorectal. FOXP3 ha sido establecido como un marcador para las células Treg, sin embargo, estudios recientes indican que la expresión de FOXP3 no se encuentra necesariamente vinculado a un fenotipo regulatorio o supresor en las células T, ya que ésta molécula ha sido identificada en células T CD8+ activadas, sin embargo Michel y cols⁹⁵, reportaron que al realizar inmunohistoquímica de doble marca sobre tejido correspondiente a cáncer colorectal, las células FOXP3+ no expresaban doble marcaje con el anticuerpo CD8, sino con el anti-CD4. Lo que mostraba que éste subgrupo correspondía a células con una función regulatoria, indicando que el número de linfocitos T infiltrantes de tumor FOXP3+ es representativo en todos los tumores estudiados y éstos números de células T FOXP3+ fueron más alto en el estroma tumoral que en el epitelio sano subyacente ⁹⁵. En otro estudio de cáncer colorectal, la proporción de células T CD8+/FOXP3+ es un marcador predictivo para la supervivencia del paciente ⁹⁶, contrario a lo que refiere Suzuki donde refiere que el pronóstico no se encuentra relacionado al número de células Foxp3 T CD4+o CD8+ en Carcinoma de Células Escamosas de orofaringe ⁹⁷.



En cáncer de vesícula biliar se reporta un número de linfocitos T CD4+ y CD8+ significativamente mayor en el tejido neoplásico que en el circundante sano pero la proporción de CD4 con CD8 en este tipo de cáncer fue significativamente menor en el tejido afectado que en tejido sano ⁹⁸.

Los pacientes con tumores malignos muestran fallas en la función inmunológica, especialmente en la inmunidad celular, lo que deriva en el desarrollo tumoral. Es sabido que las lesiones tumorales se caracterizan histológicamente por un infiltrado inflamatorio donde predominan linfocitos T CD4 , T CD8 y células NK en el tejido afectado y en sangre periférica. La inmunidad celular frente a una neoplasia es mediada importantemente por las células T ⁹³.

El desarrollo tumoral lleva a una baja actividad de los linfocitos T CD4 y CD8 dentro de los tumores y a una acumulación de linfocitos T alrededor del tejido neoplásico, razón por la cual el número y la distribución de estas células juegan un papel importante en la respuesta antitumoral ^{93,98}.



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El COCE representa un problema de salud global, cuya incidencia y mortalidad ha ido en aumento en las últimas décadas. Los factores que influyen en la presentación y en el desarrollo de la neoplasia son entre otros, el sitio anatómico y el grado de diferenciación histológico.

Desde el punto de vista histológico los COCEs cuentan con similitudes generales, sin embargo, la clasificación de la OMS para estos carcinomas los divide en Bien Diferenciados (BD), Moderadamente Diferenciados (MD) y Pobremente Diferenciados (PD), en el que se toman en cuenta tres características principales para realizar esta clasificación (Grado de Queratinización, Pleomorfismo y Número de Mitosis). Se ha observado que el curso clínico y el pronóstico de la enfermedad no está siempre relacionado con su grado de diferenciación histológica, sino que además influyen factores propios del tumor, como localización, tamaño, tiempo de evolución, etc., así como la respuesta del mismo huésped, en el que el estado general de salud es un factor importantísimo dado básicamente por el estado en que se encuentre el sistema inmunológico.



JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

El COCE al representar un problema de salud mundial que a pesar de los múltiples esfuerzos que han sido realizados alrededor del mundo para entender la patogenia y comportamiento de esta enfermedad, no se puede dar aún una explicación clara y precisa sobre esta neoplasia debido a la gran complejidad que se presenta. En el desarrollo de la enfermedad, la variabilidad en la forma que se presenta la neoplasia es muy amplia y el grado de diferenciación histológica es una característica importante que influye fuertemente en la presentación y desarrollo de la neoplasia. Las características histológicas consideradas para la clasificación de la OMS nos muestra claramente el grado de maduración en que se encuentran las células neoplásicas y por lo tanto las posibilidades de que exista una red más amplia y eficiente de células del sistema inmune entre mejor diferenciada sea la neoplasia. De tal manera que el rol que juega el sistema inmune, específicamente la respuesta celular, es de gran importancia para la regresión del tumor y/o para la progresión y desarrollo del mismo.

La forma en que el sistema inmunológico deja de ser eficiente no es aún claro, pero se ha observado que el número y el grado de diferenciación de las células del sistema inmune presentes en carcinomas, se ha relacionado a una mejor o peor respuesta por parte del huésped, con relación al pronóstico. Y de esa forma se puede considerar que el pronóstico está relacionado con el grado de diferenciación histológica, al mismo tiempo que el grado de diferenciación histológica se encuentra relacionado con la cantidad y grado de diferenciación de las células de la respuesta innata, como las Células Dendríticas que activan a su vez la respuesta adaptativa, dada por los linfocitos T.



HIPOTESIS

El número de Células Dendríticas y Linfocitos T CD4+ y T CD8+ está relacionado con el grado de diferenciación histológica del Carcinoma Oral de Células Escamosas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la relación existente entre el número presente de CDs y Linfocitos T en los diversos grados de diferenciación histológica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la localización más común de las CDs y Linfocitos T CD4+ y CD8+ en las muestras de COCE.
- Obtener la proporción correspondiente de cada uno de los grupos celulares de estudio en cada uno de los grados de diferenciación del COCE.

TIPO DE ESTUDIO

Este estudio fue de tipo Descriptivo y Analítico.

VARIABLES

INDEPENDIENTES:

- Grado de Diferenciación Histológica Tumoral.

DEPENDIENTES:

- Presencia de Células Dendríticas DC-SIGN+/CD1a+.
- Presencia de Linfocitos T CD4+.
- Presencia de Linfocitos T CD8+.

UNIVERSO O POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población correspondiente a este estudio fueron 30 muestras experimentales provenientes de biopsias de pacientes con Carcinoma Oral de Células Escamosas



primario que se presentaron en el Instituto Nacional de Cancerología (INCaN) y del Hospital General de México (HG) durante un periodo de año y medio. Las muestras control corresponden a Mucosa Sana que fueron obtenidas del Departamento de Cirugía Oral de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Odontología, UNAM. La toma de muestras se realizó con Consentimiento Informado para cada uno de los pacientes.

RECURSOS

Físicos:

- Laboratorio de Inmunología, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM.
- Laboratorio del UMAEO, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional SXXI, IMSS.
- Departamento Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas, Unidad de Investigación, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Secretaría de Salud.
- Hospital General de México.
- Instituto Nacional de Cancerología.

MATERIALES

- Micropipetas ajustables Eppendorf .
- Puntas para micropipetas Cole Parmer.
- Portaobjetos silanizados..
- Vasos de precipitados de diferentes volúmenes.
- Matrices Elenmeyer
- Vasos Koplik
- Probetas
- Anticuerpos Primarios:



primario que se presentaron en el Instituto Nacional de Cancerología (INCaN) y del Hospital General de México (HG) durante un periodo de año y medio. Las muestras control corresponden a Mucosa Sana que fueron obtenidas del Departamento de Cirugía Oral de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Odontología, UNAM. La toma de muestras se realizó con Consentimiento Informado para cada uno de los pacientes.

RECURSOS

Físicos:

- Laboratorio de Inmunología, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM.
- Laboratorio del UMAEO, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional SXXI, IMSS.
- Departamento Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas, Unidad de Investigación, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Secretaría de Salud.
- Hospital General de México.
- Instituto Nacional de Cancerología.

MATERIALES

- Micropipetas ajustables Eppendorf .
- Puntas para micropipetas Cole Parmer.
- Portaobjetos silanizados..
- Vasos de precipitados de diferentes volúmenes.
- Matrices Elenmeyer
- Vasos Koplik
- Probetas
- Anticuerpos Primarios:



- DC-SIGN (CD209) (H200): sc-20081, Santa Cruz Biotechnology, Rabbit Polyclonal.
- CD1A (HI149): sc-19636, Santa Cruz Biotechnology, Mouse Monoclonal.
- CD4 (SP35), Bio SB, Rabbit Antibody. Clone: SP35. Ref: BSB 5148, 3 mL Prediluted. Lot 71128.
- CD8 (DK25), Code C7227, Monoclonal Mouse anti Human, Dako Denmark.
- Anticuerpos Secundarios:
 - Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure GoatAnti-Rabbit IgG (H+L), Cat. 111-095-045, Lot 66725, Jackson ImmunoResearch, Laboratories Inc, USA.
 - Rhodamine (TRITC)-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L), Cat. 115-025-146, Lot 67235, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, USA.
- Dako, Link Biotinylated Anti-Mouse Immunoglobulins, Biotinylated Anti-Rabbit Immunoglobulins. Code: K0676, 15 mL. Lot: 021-4.
- Polímero marcado con peroxidasa. Dako EnVision+ System-HRP. Labelled Polymer Anti-Rabbit. Ref. K4003 110 mL.
- DAPI, Vectashield Mounting Media for Fluorescence with DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole). Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA. Ref: 94010, Lot 50620, H-1200.
- DAB, Dako Cytomation. DAB + Substrate Buffer, Ref: K3468 11 mL. Lot: 10010448. Dako Cytomation Liquid DAB + Substrate Chromogen System for Autostainer.
- Fuscina: Dako Cytomation. DAKO ® Fuchsin Substrate-Chromogen System 110 mL. Lot: 045156. Code No. K0624. Dako Corporation, Carpinteria, CA.
- Albúmina. SIGMA. Albumin, Bovine Essentially IgG Free. [9048-46-8] No.232-936-2 Lyophilized Powder, Dessicate. Ref: A-9085 25g. Lot: 50K09151.
- Bloqueador de peroxidasa Dako, Dako Cytomation, Peroxidase Blocking Reagent, Ready to use. Ref. 52001, 110 mL. Lot. 026066.
- Bloqueador doble tinción Dako, Dako Cytomation, EnVision + Dual Link System Peroxidase. Ref. 4063, 15 mL. Lot 00008970.



- Proteína Bloqueadora Dako, Dako Cytomation Protein Block, Serum Free, Ready to use. Ref. X0909, 110 mL. Lot. 125048.
- Tritón. SIGMA®. Triton X-100 (t-Octylphenoxyethoxyethanol) Sigma Ultra. Ref: T-9284 500 mL. Lot: 81K0225.
- Resina Entellan
- Microscopio Olympus BX 40 (Japón)
- Microscopio Confocal de Fluorescencia Leica DM LS, Tipo DFC 300 FX.
- AxioVision Leica IM 1000 Software (la adquisición de las microfotografías fueron obtenidas con el Software AxioVision).

METODOLOGÍA

OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Muestras Experimentales (COCE)

Las muestras de COCE se obtuvieron del Departamento de Tumores de Cabeza y Cuello del Hospital General y del Instituto Nacional de Cancerología. Cada muestra cuenta con un Consentimiento Informado firmado por los pacientes en el que se les explica el motivo de la toma de muestra.

Muestras Control

Las 10 muestras control corresponden a Mucosa Sana obtenidas del Departamento de Cirugía Oral y Maxilofacial del División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPEI), de la Facultad de Odontología. Estas muestras fueron obtenidas de pacientes con indicación quirúrgica o extracción de terceros molares con motivos ortodónticos, protésicos u otros, con un previo Consentimiento Informado firmado por los paciente



- Proteína Bloqueadora Dako, Dako Cytomation Protein Block, Serum Free, Ready to use. Ref. X0909, 110 mL. Lot. 125048.
- Tritón. SIGMA®. Triton X-100 (t-Octylphenoxyethoxyethanol) Sigma Ultra. Ref: T-9284 500 mL. Lot: 81K0225.
- Resina Entellan
- Microscopio Olympus BX 40 (Japón)
- Microscopio Confocal de Fluorescencia Leica DM LS, Tipo DFC 300 FX.
- AxioVision Leica IM 1000 Software (la adquisición de las microfotografías fueron obtenidas con el Software AxioVision).

METODOLOGÍA

OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Muestras Experimentales (COCE)

Las muestras de COCE se obtuvieron del Departamento de Tumores de Cabeza y Cuello del Hospital General y del Instituto Nacional de Cancerología. Cada muestra cuenta con un Consentimiento Informado firmado por los pacientes en el que se les explica el motivo de la toma de muestra.

Muestras Control

Las 10 muestras control corresponden a Mucosa Sana obtenidas del Departamento de Cirugía Oral y Maxilofacial del División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPEI), de la Facultad de Odontología. Estas muestras fueron obtenidas de pacientes con indicación quirúrgica o extracción de terceros molares con motivos ortodónticos, protésicos u otros, con un previo Consentimiento Informado firmado por los paciente



CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Inclusión:

- Biopsias diagnosticadas histológicamente como Carcinoma Oral de Células Escamosas primario.
- Biopsias de Mucosa Sana tomada de cualquier zona de cavidad bucal.

Exclusión:

- Biopsias de pacientes con radioterapia y/o quimioterapia previa.
- Biopsias de pacientes con COCE recurrentes o COCE secundario.
- Muestras no representativas del tumor.
- Biopsias pequeñas menores a 5 mm.

DIAGNÓSTICO

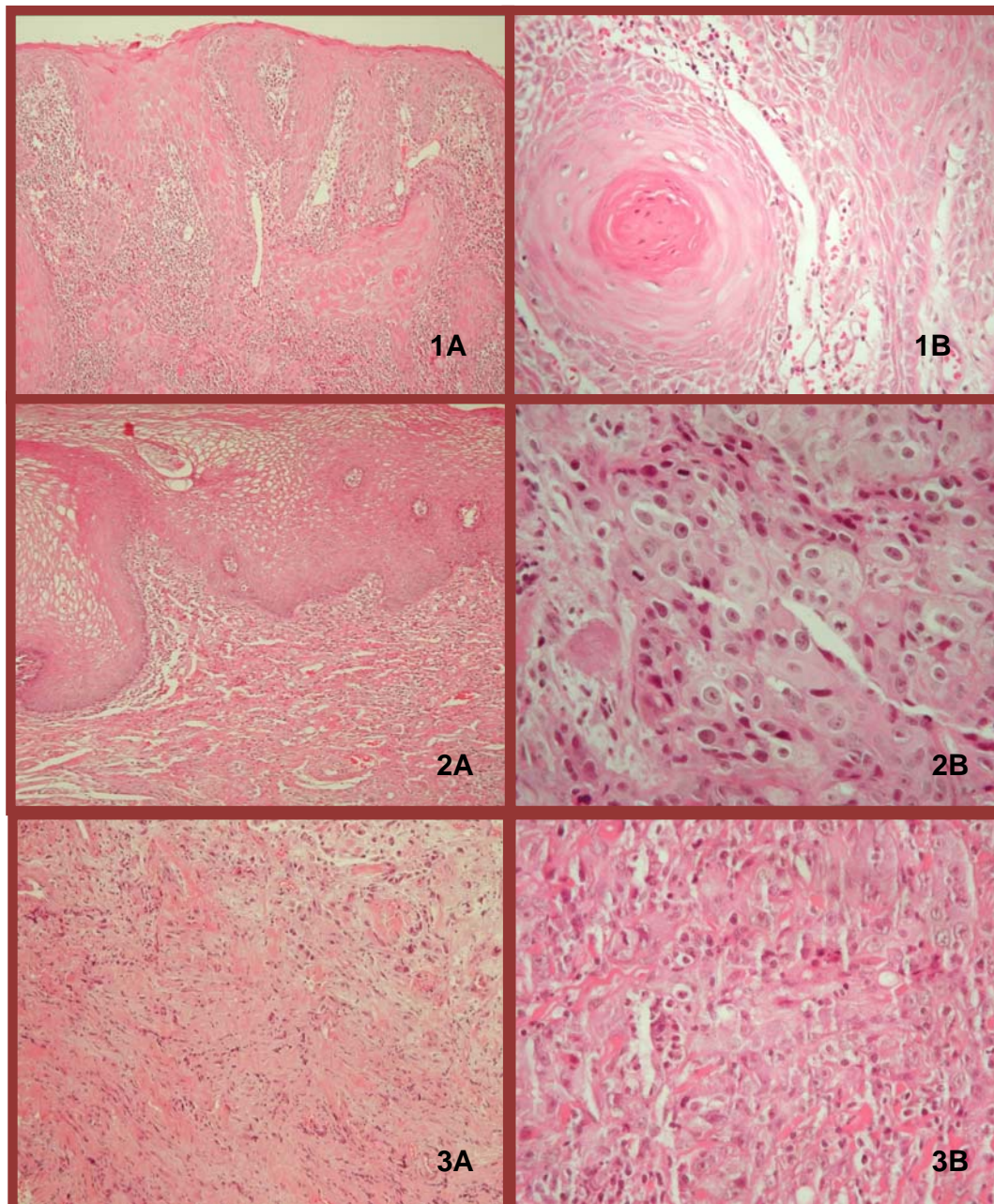
Con ayuda de un patólogo bucal se realizó el diagnóstico histopatológico en base a los tres parámetros establecidos por la OMS: Grado de Queratinización, Pleomorfismo y Número de Mitosis. En la siguiente tabla se describen las características histopatológicas para su diagnóstico:

Clasificación	Patrón Estructural	Pleomorfismo	Queratinización	Mitosis	Infiltrado Linfocitario
BD (Figuras 1a y 1b)	Similar al epitelio plano estratificado. Las células se disponen en nidos, cordones o masas sólidas con límites bien definidos	Patrones celulares diferenciados.	Importante cantidad de queratina agrupada en perlas.	Poco abundantes y escasas mitosis atípicas.	Crónico e Intenso.
MD (Figuras 2a y 2b)	Variación en el patrón pero el epitelio es reconocible como plano estratificado.	Menor semejanza a las células epiteliales (encontrándose menos diferenciadas)	Escasa o nula producción y en ocasiones ocurre queratinización individual de una célula.	Mayor número de mitosis.	Crónico en menor cantidad.
PD (Figuras 3a y 3b)	Pérdida significativa con una arquitectura dispersa. Pérdida de cohesión celular.	Escaso parecido con las células epiteliales, un gran polimorfismo celular y pobre grado de maduración.	Producción nula.	Número elevado de mitosis y gran cantidad de mitosis atípicas.	Muy escaso.

Tabla 1. Características histológicas del COCE en sus tres grados de diferenciación.



Finalmente se procedió a clasificarlos y agruparlos de acuerdo a su grado de diferenciación (BD, MD Y PD).



Imágenes 1, 2 y 3 correspondientes a COCE con tinción de Hematoxilina/Eosina a 10X (A) y 40X (B), De arriba abajo se observa un COCE BD (1A y 1B), un COCE MD (1A y 1B) y un COCE PD (1A y 1B). Las características histológicas se describen en la tabla 1.



PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Fijación

Las muestras se fijaron con Paraformaldehído al 4% inmediatamente después de su obtención.

Deshidratación

Las muestras se deshidrataron en el histoquinete con un tren de Formol en el primer recipiente, Formol en el segundo y Alcoholes en los siguientes (OH al 70%, 80%, 90%, 96%, 100%, 100% y 100%) con el objetivo de que el agua salga gradualmente y se evite la deformación del tejido.

Aclaramiento o Diafanización

Esto es una continuación del procesamiento que se lleva a cabo en el histoquinete, donde después de haber sido colocadas las muestras en Alcohol al 100% se pasan a Xilol (que puede ser puro o mezclado con alcohol en las mismas proporciones 1:1), después a Xilol puro y finalmente al último recipiente que también contiene Xilol puro. Las muestras se dejan durante una hora en cada recipiente.

Inclusión o Impregnación

Los tejidos se incluyeron en Parafina fundida a 60°C.

Corte y Montaje de la muestra.

Se realizaron cortes de 4 micras.

Tinción y montaje del cubreobjetos

Para llevar a cabo la tinción con Hematoxilina y Eosina para su diagnóstico es necesario eliminar la parafina de los portaobjetos con el tejido, rehidratarse, teñirse, deshidratar, aclarar y montar. Esto es:

1. Xilol, 10 minutos.
2. Xilol, 10 minutos.
3. Xilol/OH, 5 minutos.
4. OH 100%, 5 minutos.
5. OH 100%, 5 minutos.
6. OH 96%, 5 minutos.
7. OH 96%, 5 minutos.
8. Solución Scott, 2 a 3 minutos.



9. Agua, 5 minutos.
10. Eosina, 2 minutos.
11. OH 96%, 5 minutos.
12. OH 96%, 5 minutos.
13. OH 100%, 5 minutos.
14. OH 100%, 5 minutos.
15. OH/Xilol, 5 minutos.
16. Xilol, 5 minutos.
17. Xilol, 5 minutos.

Finalmente se coloca una gota de resina Entellan sobre el tejido y se coloca sobre ésta un cubreobjetos.

INMUNOHISTOQUIMICA

Una vez diagnosticadas y clasificadas cada una de las muestras se procedió a realizar Inmunohistoquímica mediante dos técnicas:

1. Inmunohistoquímica por Fluorescencia (Inmunofluorescencia).
Para la detección de Células Dendríticas.
2. Inmunohistoquímica por Técnica de Peroxidasa y Fosfatasa alcalina.
Para la detección de Linfocitos CD4+ y Linfocitos CD8+ respectivamente.

Se emplearon los siguiente anticuerpos:

Identificación de CDs:

- DC-SIGN
- CD1A
- En doble marca

Identificación de Linfocitos T:

- CD4
- CD8



INMUNOFLUORESCENCIA

1. Desparafinado:
 - 1.1. Precautado en la parrilla a 55-60°C (20 minutos aproximadamente) hasta que la cera sobre las laminillas se observe brillante.
 - 1.2. Colocar las laminillas en vasos koplík con Xilol y Alcohol en el siguiente orden: Xilol (7 minutos), Xilol (7 minutos), Xilol/Alcohol (7 minutos), Alcohol 100% (5 minutos), Alcohol 100% (5 minutos), Alcohol 96% (5 minutos), Alcohol 96% (5 minutos), Agua Bidestilada (5 minutos), Agua Bidestilada (3 minutos).
2. Recuperación Antigénica en Buffer de Citratos. Pasar las muestras a un vaso koplík con 50 ml de buffer de citratos, el vaso koplík se coloca a baño maría en un recipiente con agua previamente caliente y se introduce en el horno de microondas durante 5 minutos verificando que el buffer hierva solamente durante 1.15 minutos.
3. Retirar del horno de microondas y dejar enfriar durante 20 minutos a temperatura ambiente y cambiar el agua caliente del recipiente por agua fría.
4. Realizar 3 lavados en PBS 1X (5 minutos en cada enjuague).
5. Inmersión en Solución de Albúmina al 10% durante 20 minutos a temperatura ambiente.
6. Secar laminillas.
7. Marcar con plumón hidrofóbico alrededor del tejido (opcional).
8. Inmersión en Proteína Bloqueadora durante 20 minutos a temperatura ambiente. Colocar la cantidad necesaria de solución a cada una de las laminillas.
9. Realizar 3 lavados con PBS 1x durante 5 minutos en cada uno.
10. Inmersión en Tritón al 0.2% en un vaso koplík de 50 ml durante 20 minutos.
11. Realizar 3 enjuagues de PBS 1x durante 5 minutos en cada uno.
12. Incubación con los Anticuerpos Primarios durante una hora (en incubadora a 37°C, a 5% CO₂). Las concentraciones son las siguientes:

DC-SIGN (Rabbit Polyclonal) (1:100)

CD1A (Mouse Monoclonal) (1:100)



13. Realizar 3 lavados con PBS 1x durante 5 minutos en cada uno.

A PARTIR DE ESTE PASO CONTINUAR CON EL PROCEDIMIENTO EN EL CUARTO OSCURO.

14. Incubación con los Anticuerpos Secundarios durante 30 minutos (en incubadora a 37°C, 5% de CO₂).

FITC (Goat anti Rabbit) (1:200)

TRITC (Goat anti Mouse) (1:200)

15. Realizar 2 lavados con PBS 1x durante 5 minutos en cada uno.

16. Realizar 1 lavado con agua desionizada durante 5 minutos.

17. Montaje con Vectashield con DAPI.

18. Sellado del cubreobjetos alrededor de toda la periferia del mismo, con un barniz de uñas para evitar la deshidratación y ayudar a mantener por mayor tiempo la fluorescencia.

19. Proteger las laminillas de la luz y almacenarlos a 4°C o en congelación.

INMUNOHISTOQUÍMICA POR TÉCNICA DE PEROXIDASA Y FOSFATASA ALCALINA

1. Desparafinado durante 20-30 minutos a 55°C.
2. Colocar las muestras en Xilol durante 24 horas.
3. Pasar las muestras a Xilol-OH (1:1), Etanol al 100%, Etanol al 90%, Etanol al 80%, Etanol al 70% y Etanol al 30%. Diez minutos en Xilol y cinco minutos en los Alcoholes.
4. Desenmascaramiento de antígeno: Colocar las laminillas en un vaso koplík con Amortiguador TRIS-HCl(Dako).
 - 4.1. En Olla Express: Se trabaja de igual forma con un vaso koplík con PBS. Cuando llegue a 20 libras, apagar, dejar que la presión llegue a 0. Aproximadamente 25 minutos después se pasan los vasos koplík a 4°C por 20 minutos para poder cambiar las laminillas al vaso koplík con el PBS.



- 4.2. En el horno de microondas: las muestras se colocan en un recipiente con agua previamente caliente (baño maría) y se verifica que el líquido contenido en los vasos koplík hierva durante 80 segundos. Las muestras se colocan en agua fría y posteriormente se pasan a 4°C. las laminillas se cambian al koplík que contiene el PBS.
5. Bloquear la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno (previamente diluida por DaKo) durante 15 minutos. Lavar con agua desionizada.
6. Bloquear la muestra con bloqueador de Dako o albúmina al 8% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Eliminar únicamente el exceso.
7. Incubar con el anticuerpo primario anti-CD4 (Marca Bio-SB prediluido) durante 24 horas a 4°C y lavar con agua desionizada durante 10 segundos.
8. Incubar con el polímero marcado con Peroxidasa durante 30 minutos a temperatura ambiente. Lavar con agua desionizada durante 10 segundos.
9. Revelar con DAB y monitorear en el microscopio hasta que aparezca la señal. Se utiliza 1µl de DAB por cada 50 µl de Amortiguador del mismo. Enjuagar con PBS para estabilizar el pH.
10. Procesar con Bloqueador de doble tinción e incubar con agitación durante 12 minutos exactos. Lavar con agua y posteriormente con PBS.
11. Bloquear la muestra con Bloqueador DaKo durante 20 minutos. Se puede utilizar albúmina al 8% en lugar del bloqueador DaKo. Eliminar únicamente el exceso.
12. Agregar el segundo anticuerpo primario anti-CD8 (DaKo, prediluido). Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.
Lavar con agua desionizada y posteriormente con PBS.
13. Agregar anti-ratón biotilnado (DaKo, prediluido). Incubar durante 1.5 horas a temperatura ambiente. Terminada la incubación las muestras se deben lavar muy bien con agua desionizada durante 10 segundos.
14. Agregar el complejo Streptavidina/Fosfatasa alcalina (Str/AP) a una dilución 1:100 en bloqueador. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de incubación se debe lavar muy bien la muestra con agua desionizada durante 10 segundos.



15.Revelar con Fucsina. Incubar con la mezcla de revelado durante 3-15 minutos monitoreando la señal. La mezcla de revelado se prepara en base al número de muestras:

Número de muestras	Cromógeno (μ l)	Agente Activador(μ l)	Mezclar durante 1 minuto	Buffer (μ)	Levamisol (μ l)
1-2	3	3		44	1.25
10-14	24	24		352	20

16.Lavar la muestra con agua desionizada durante 10 segundos.

17.Contrastar con Hematoxilina durante 1 minuto, enjuagar con agua desionizada, virar el pH con agua amoniacal y lavar con agua.

18.Dejar secar la laminilla durante 24 horas.

19.Montar en Entellan.

MÉTODOS PARA PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS:

OBSERVACION AL MICROSCOPIO Y CONTEO.

Se realizaron las observaciones con los objetivos a 40X. En casos necesarios para confirmar la doble marca en sus membranas celulares (en CDs) o el tono de la marca (color café para CD4+ o rosa para CD8+) se utilizó el objetivo 100X

El conteo de CDs y Linfocitos T fue realizado tomando como base una zona amplia y representativa del tumor. Se tomaron 10 campos al azar dentro de esta zona en cada una de las muestras y se cuantificaron el número de células positivas (DC-SIGN+/CD1a+ para CDs, CD4+ para Linfocitos T Cooperadores y CD8+ para Linfocitos T Citóxicos).



ANÁLISIS DE DATOS

Los datos obtenidos se analizaron con el programa SPSS 15.0, empleando Medidas de Tendencia Central para obtener la Media, Error Estándar de la Media y Rango en cada uno de los grupos (COCE BD, COCE MD, COCE PD Y Mucosa sana).

Se utilizó la Pruebas de Kruskal-Wallis para encontrar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos celulares y la de Mann-Whitney para encontrar en dónde se encontraban estas diferencias en base al grado de diferenciación y saber cuáles eran los más representativos.

La correlación empleada fue la Rho de Spearman, debido a que nuestros datos no presentaban una distribución normal al ser un conteo celular.

El análisis de los datos estadísticos y gráficas se realizaron utilizando:

- SPSS 15.0.
- Microsoft Office Excel 2007.

RESULTADOS

Se recolectaron un total de 30 muestras y se distribuyeron de la siguiente manera:

13 Muestras correspondieron a BD, con un rango de edad de 24 a 80 años y una prevalencia mayor en el género femenino.

13 Muestras correspondieron a MD, con un rango de edad de 24 a 83 años y una prevalencia mayor en el género masculino.

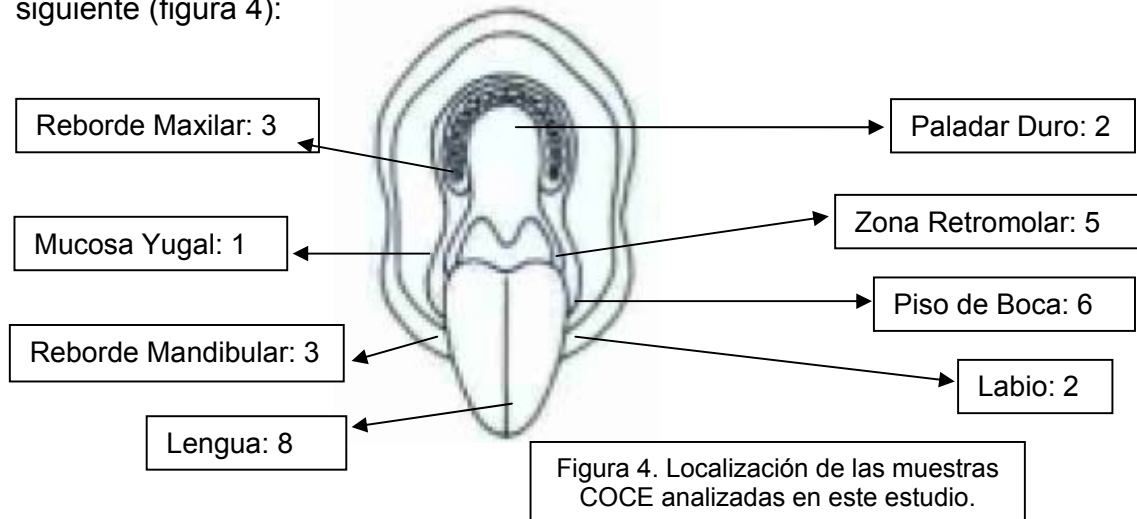
4 Muestras correspondieron a PD, con un rango de edad de 53 a 82 años y misma prevalencia en el género masculino que en el femenino.

Cantidad	G. Diferenciación	Edad	Género
13	BD	24-80	6M/7F
13	MD	24-83	7M/6F
4	PD	53-82	2M/2F
Total: 30			15M/15F

Tabla 2

Localización Anatómica

La Localización Anatómica correspondiente a cada una de las muestras es la siguiente (figura 4):



Células Dendríticas y Linfocitos T en Carcinoma Oral de Células Escamosas.

Mediante la identificación de CDs y Linfocitos T mediante técnicas de inmunohistoquímica se observó que existe una mayor densidad de estos tipos de células conforme el grado de diferenciación histológica del COCE se encontraba mejor diferenciado.

Por medio del conteo se obtuvo la Media, el Error Estándar de la Media (EEM) y el Rango de cada grupo celular en cada uno de los grupos experimentales y control (Tabla 3)

	Bien diferenciado			Moderadamente diferenciado			Pobrementemente diferenciado			Mucosa sana		
	Media	EEM	Rango	Media	EEM	Rango	Media	EEM	Rango	Media	EEM	Rango
CD4	30.9 ± 4.0	14.4-64.6	31.1 ± 3.4	17.8-63.9	15.9 ± 3.1	9-22.7	4.2 ± 0.9	1.4-7.8				
CD8	28.9 ± 3.9	9.9-56.3	29.7 ± 2.8	20.8-46.1	8.8 ± 1.2	6-11.5	3.5 ± 0.7	1.2-6.3				
CDs	3.4 ± 0.3	1.8-5.8	3.2 ± 0.4	1.2-6.6	1.7 ± 0.4	0.8-2.6	1.0 ± 0.2	0.4-1.4				

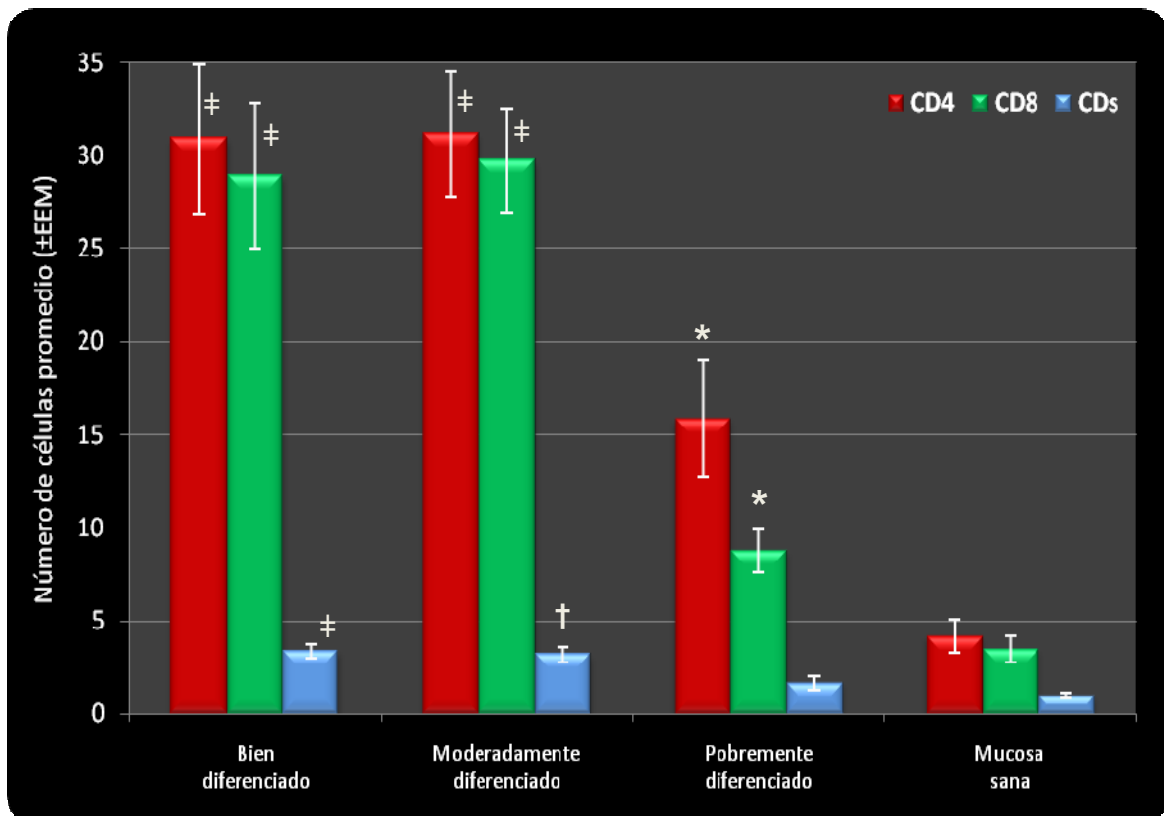
Tabla 3. Medidas de Tendencia Central: Media, Error Estándar de la Media (EEM) y Rango de cada grupo celular en estudio en los tres diferentes grados de diferenciación del COCE y en mucosa sana. Se observan en recuadros el promedio de CDs y Linfocitos T (CD4+ y CD8+).



Cabe resaltar que el número de cada grupo celular se ve más reducido en el COCE PD. En los COCE PD el número se reduce casi un 50% en los linfocitos T CD4+ y más del 50% en los linfocitos T CD8+ en comparación con los COCE BD y MD.

Estos datos se representan en la gráfica 1, mostrándose las medias \pm EEM de los tres tipos celulares de estudio (CDs, Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+) en cada uno de los grupos experimentales y controles; El promedio de todas las células fue similar en los COCE BD y MD, mientras que en los PDs el promedio se vio disminuido importantemente en comparación con los otros dos grados de diferenciación del COCE. Todos los resultados de las muestras experimentales muestran números más altos si se comparan con el grupo control correspondiente a mucosa sana (Gráfica 1).

En la siguiente figura están graficados los valores de la tabla 3:



Gráfica 1. Gráfica representando las Medias de cada grupo celular con su respectivo Error Estándar de la Media (\pm EEM) en cada caso de COCE (BD, MD y PD). $p < 0.001$ (†), $p < 0.01$ (†), $p < 0.05$ (*).



Los resultados fueron estadísticamente significativos en todos los grupos celulares comparados con el grupo control (mucosa sana). Utilizando la Prueba de Mann-Whitney se observaron diferencias estadísticamente significativas para las CDs ($p < 0.001$ en BD, $p < 0.01$ en MD), Linfocitos T CD4 ($p < 0.001$) y Linfocitos T C8 ($p < 0.001$) en los COCEs BD y MD contra el grupo control (mucosa sana), mientras que en los COCE PD se observaron diferencias significativas solamente en los linfocitos T CD4 ($p < 0.05$) y T CD8 ($p < 0.05$) contra la mucosa sana (Tabla 4).

Estos datos indican que cada grupo celular es distinto en todos los grupos experimentales y control, sugiriendo que la densidad de cada grupo celular es variable de acuerdo a las características histológicas del tejido donde se encuentren (Figura 5).

Comparaciones entre grupos	Control vs. BD	Control vs. MD	Control vs. PD	BD vs. MD	BD vs. PD	MD vs. PD
	K-W ($p=$)	M-W ($p=$)	M-W ($p=$)	M-W ($p=$)	M-W ($p=$)	M-W ($p=$)
CD4	0.0003	0.0006	0.0006	0.0105	0.8777	0.0415
CD8	0.0001	0.0006	0.0006	0.0187	0.5903	0.0046
CDs	0.0007	0.0006	0.0016	0.1260	0.6254	0.0147

$p < 0.05$	*
$p < 0.01$	†
$p < 0.001$	‡

Tabla 4. Tabla de resultados de la prueba de Kruskal Wallis (K-W) y Mann-Whitney (M-W) para definir la significancia estadística entre grupos.



Figura 5

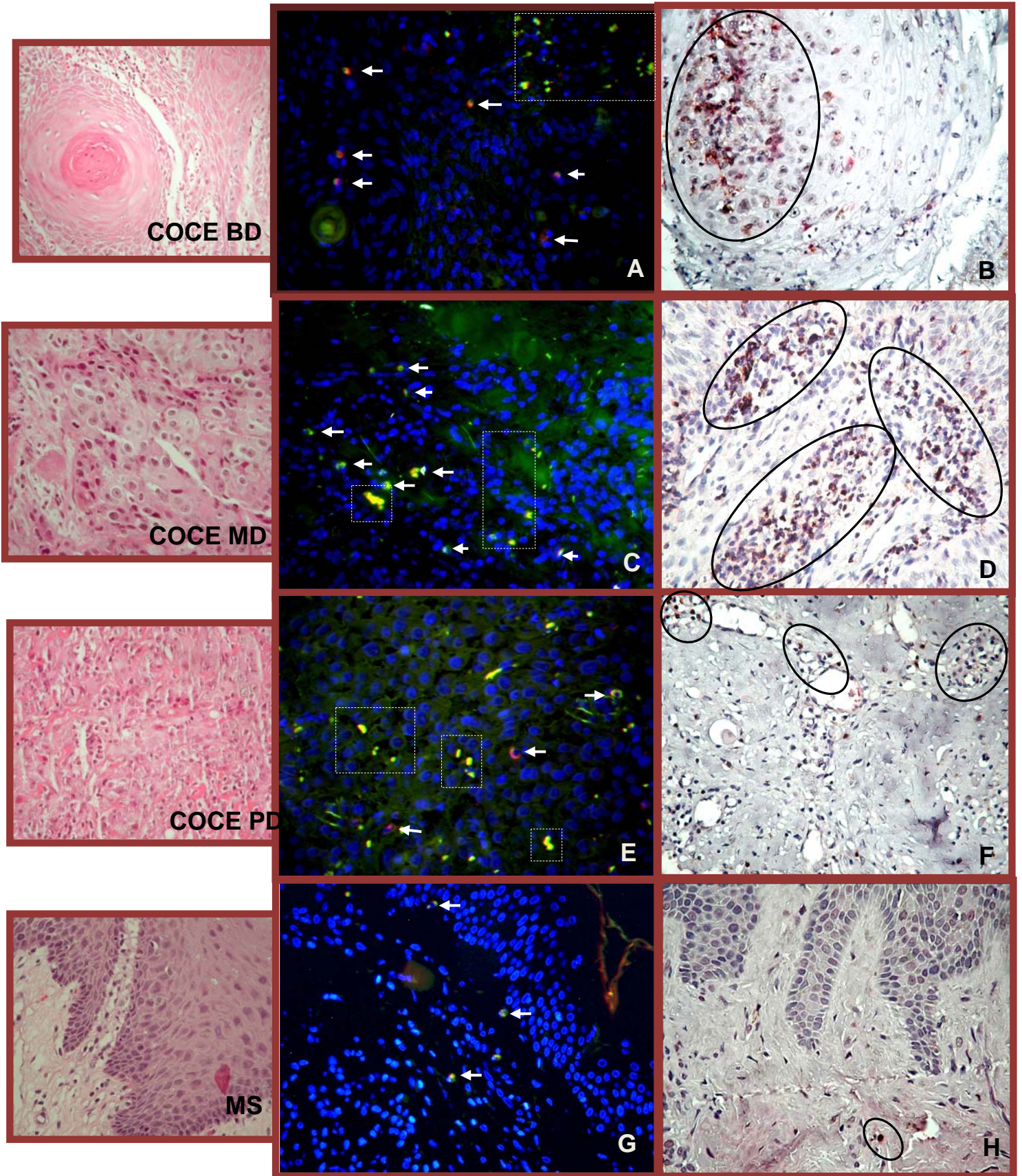




Figura 5. Micrografías observadas a 40x mostrando las diferentes densidades celulares encontradas en COCE y mucosa sana. Las imágenes pequeñas de la izquierda muestran el tejido con tinción de H/E correspondiente a las imágenes respectivas de la derecha. Las flechas muestran la presencia de CDs DC-SIGN+ (A, C, E y G) y los óvalos el infiltrado linfocitario de células T CD4+ y T CD8+ (B, D, F y H).

Los recuadros punteados blancos muestran células que captaron tanto el FITC como el TRITC pero son reconocidas fácilmente como eritrocitos debido a la ausencia de núcleo.

A, C, E y G. COCE BD, COCE MD, COCE PD y MS respectivamente, mostrando la presencia de Células Dendríticas doble positivas (flechas blancas) DC-SIGN+/CD1a+ con FITC y TRITC como anticuerpos secundarios respectivamente y los núcleos celulares marcados con DAPI. Nótese la disminución en la densidad de éstas células en el tejido correspondiente a COCE PD respecto a los BD y MD.

B, D, F y H. Infiltrado linfocitario de células T CD4+ y TCD8+ en COCE BD, MD, PD y MS respectivamente. Las células generalmente se encuentran agrupadas entre las células neoplásicas. Su densidad es mayor en los COCE BD y MD respecto al COCE PD, donde la presencia de linfocitos T CD4+ y T CD8+ es menor en número. En mucosa sana (H) se aprecia una sola célula T CD4+ debido a la ausencia de inflamación.

Finalmente se utilizó una prueba de correlación, la Rho de Spearman, controlando la variable diagnóstico (Dx) (COCE BD, MD, PD y Control) para los tres grupos celulares. Los resultados arrojados muestran una alta significancia estadística en los grupos CD4 y CD8 ($p < 0.001$). El coeficiente de correlación fue de 0.8934 mostrando una importante asociación con la variable Dx (Tabla 5).

Correlaciones (controlando para la variable Dx)						
	CD4		CD8		CDs	
	CC	p=	CC	p=	CC	p=
CD4	NA	NA	0.8934	0.0000	0.2815	0.1014
CD8	0.8934	0.0000	NA	NA	0.2915	0.0893
CDs	0.2815	0.1014	0.2915	0.0893	NA	NA

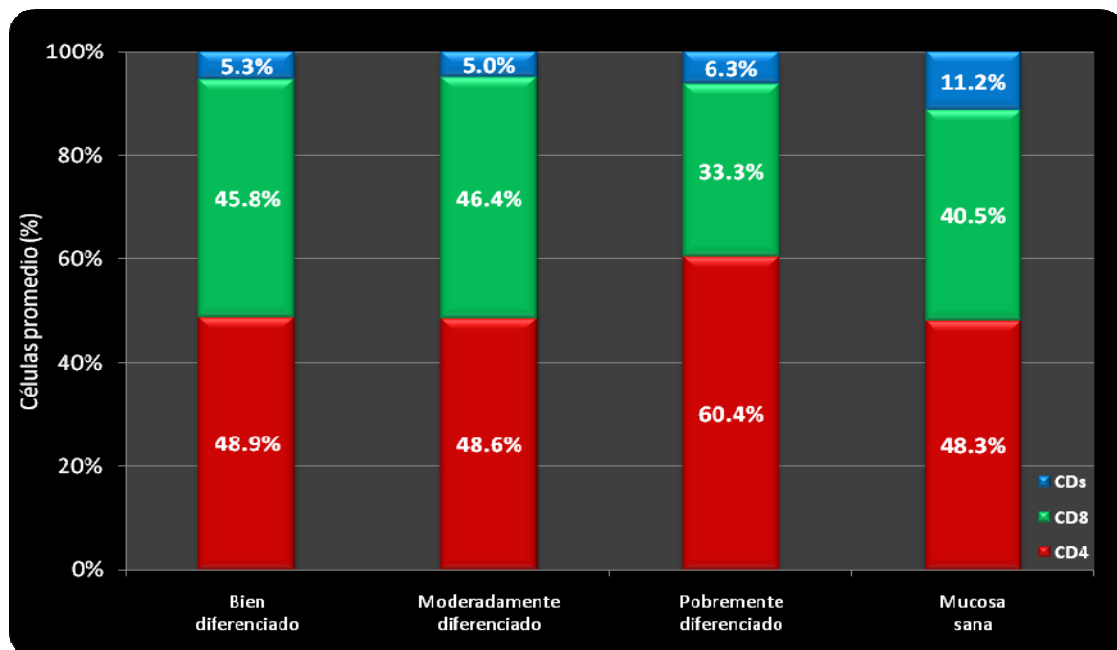
Tabla 5 mostrando los valores correspondientes al coeficiente de correlación de Spearman de los tres tipos de células evaluadas en este estudio.



Proporción de CDs, Linfocitos T CD4 y Linfocitos T CD8 en cada uno de los diferentes grados de diferenciación histológica.

Del total de las células cuantificadas en cada uno de los grupos experimentales y controles, se obtuvo el porcentaje correspondiente a su parte proporcional de cada tipo celular (CDs, Linfocitos T CD4 y T CD8) (Gráfica 2).

A pesar de la reducción en la densidad celular observada en los COCE a medida que su diferenciación histológica era menor, la proporción se mantuvo similar para las los linfocitos T CD4+ y T CD8+ y las CDs DC-SIGN+/CD1a+ en los COCE BD y MD respecto al grupo control, habiendo variación en éste último grupo celular (CDs) en el control, lo cual puede deberse a la normalidad del tejido y por lo tanto la ausencia de infiltrado linfocitario en el mismo. Para el caso de los COCE PD se observó un incremento en la proporción de linfocitos T CD4+ y una reducción de los linfocitos T CD8+ y lo cual podría ser otro de los muchos mecanismo de escape de tumor para los COCE PD.



Gráfica 2. Porcentaje correspondiente de cada grupo celular de estudio en las muestras experimentales y control. En el caso de los BD y MD el porcentaje fue similar para las CDs, linfocitos T CD4 y T CD8. Del 100% en los PD, el porcentaje incrementó para los linfocitos T CD4 y disminuyó para los CD8.



Localización de las CDs y Linfocitos T CD4+ y CD8+ en las muestras de COCE.

La localización más común de las CDs y Linfocitos T fue entre las células neoplásicas; otras localizaciones fueron cercanas a las perlas de queratina y cerca y dentro de los vasos sanguíneos, sin embargo la localización de estas células fue variable dependiendo del tipo histológico del tejido donde se encontraban.

La siguiente tabla muestra las zonas donde fueron localizadas las CDs y Linfocitos T:

	COCE BD	COCE MD	COCE PD
CDs	Perlas de queratina (dentro y alrededor) Dentro de los nidos de células neoplásicas. Cercanas a vasos sanguíneos.	Entre las células neoplásicas. Cercanas a vasos sanguíneos.	Entre las células neoplásicas*. Cercanas a vasos sanguíneos.
L T CD4 L T CD8	Entre las células neoplásicas Cercanas y dentro de vasos sanguíneos		Entre las células neoplásicas* Cercanas y dentro de vasos sanguíneos.

Tabla.6. Localización de CDs y Linfocitos T en los diferentes grados de diferenciación del COCE.

*En números muy escasos cuando estaban presentes pero generalmente su presencia fue nula.

Las siguientes imágenes representan las distintas localizaciones de las CDs y Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+ resumidas previamente en la tabla 6 (figura 6 y 7):

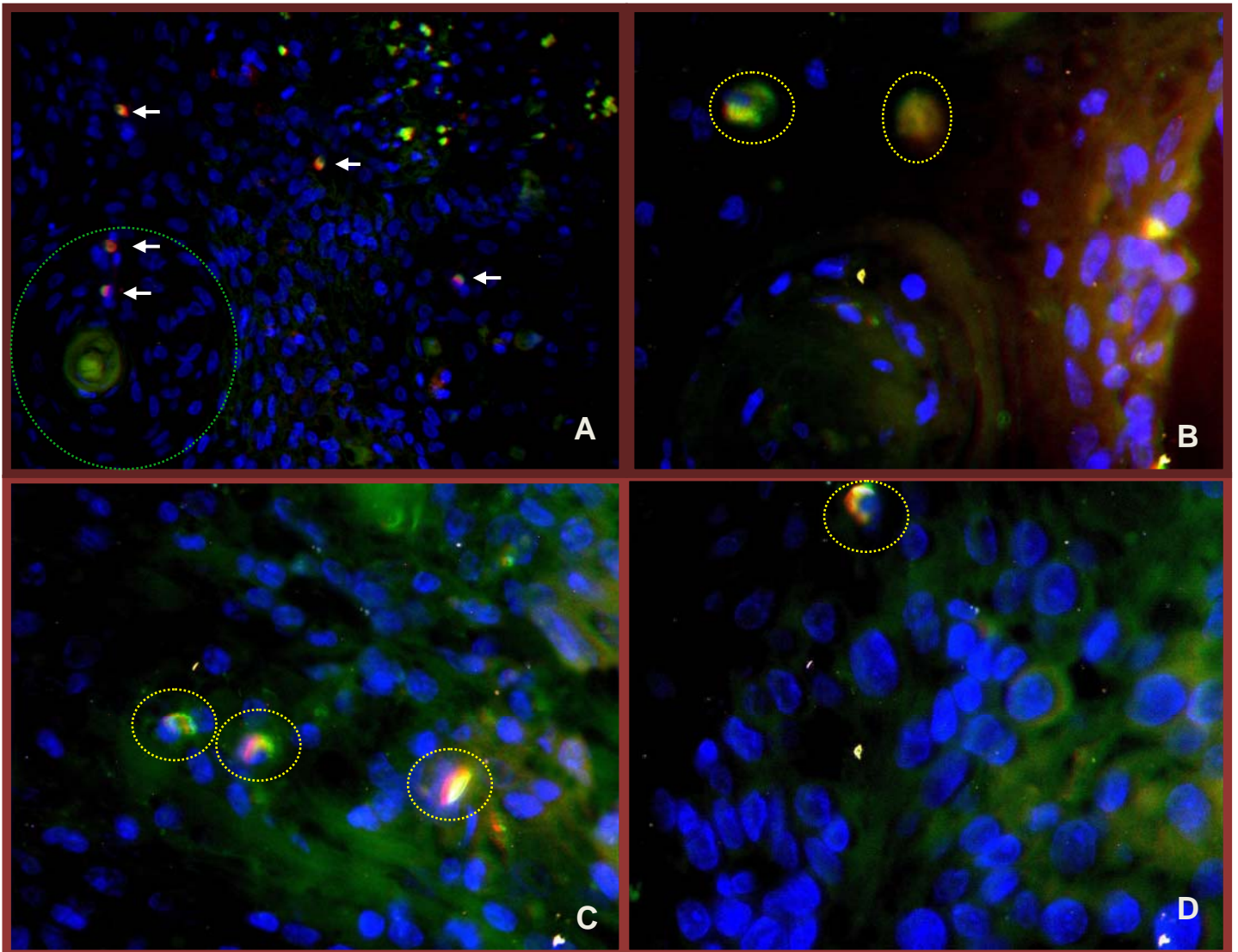


Figura 6. Micrografías correspondientes a COCEs procesados mediante Inmunofluorescencia.

- A. Micrografía de un COCE BD tomado a 40X donde se observan CDs doble positivas (DC-SIGN+/CD1a+) (flechas blancas) ubicadas dentro y cercanas a la perla de queratina (círculo punteado verde)..
- B. Inmunofluorescencia de un COCE BD tomado a 100X mostrando la presencia de CDs DC-SIGN+/CD1a+ con FITC (marca en color verde) y TRITC (en color rojo) como anticuerpos secundarios respectivamente. Se aprecian dos CDs (círculo amarillo) localizadas en la periferia de una perla de queratina.
- C. Micrografía de un COCE MD observada a 100X mostrando la presencia de tres CDs doble positivas (círculos amarillos) localizadas entre las células neoplásicas.
- D. Imagen tomada a 100X de un COCE PD donde se aprecia una CD marcada en verde y rojo (círculo amarillo) entre las células neoplásicas. También puede observarse el gran pleomorfismo nuclear de las células neoplásicas (marcadas con DAPI en color azul) característico de este subtipo histológico.

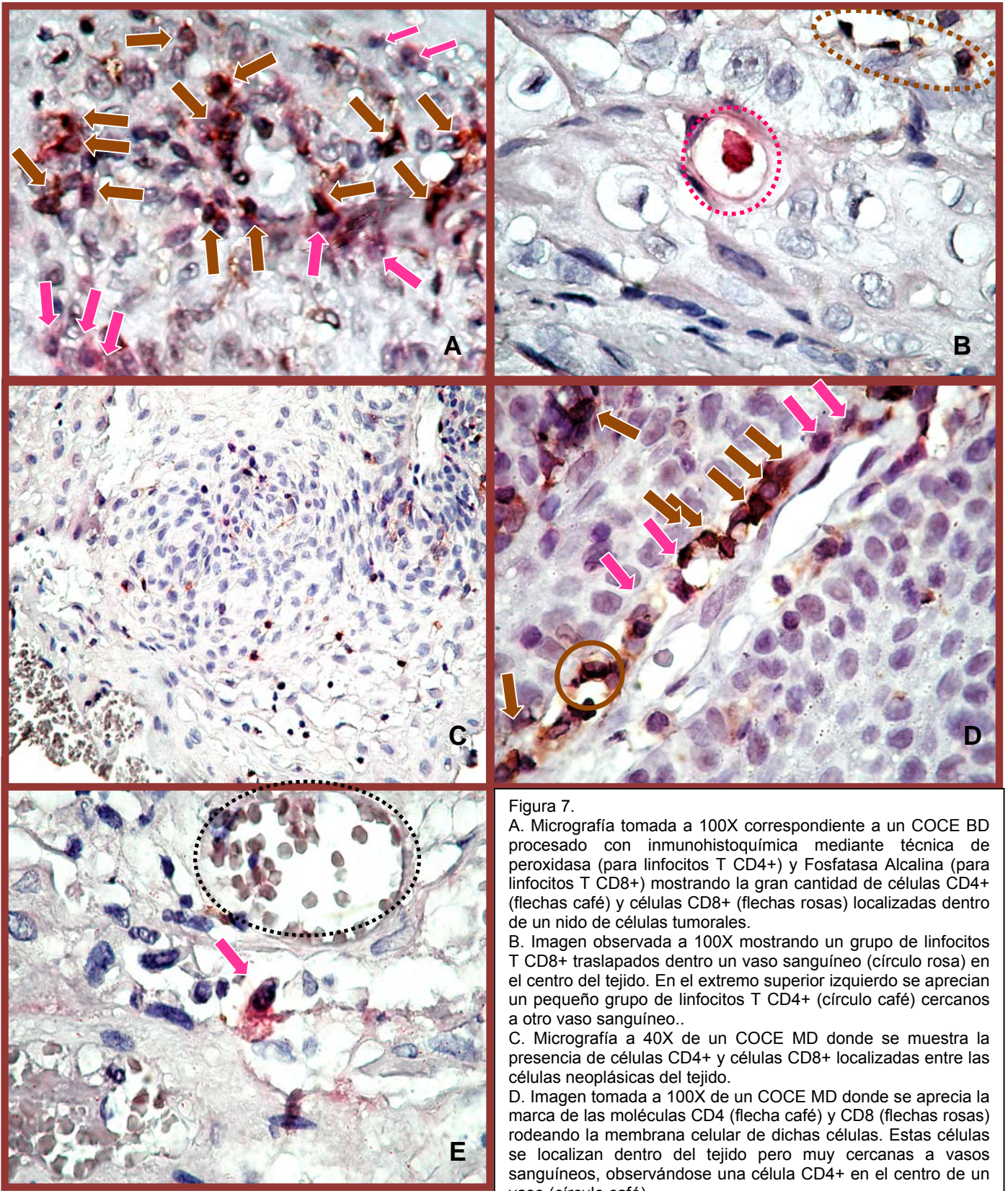


Figura 7.

A. Micrografía tomada a 100X correspondiente a un COCE BD procesado con inmunohistoquímica mediante técnica de peroxidasa (para linfocitos T CD4+) y Fosfatasa Alcalina (para linfocitos T CD8+) mostrando la gran cantidad de células CD4+ (flechas café) y células CD8+ (flechas rosas) localizadas dentro de un nido de células tumorales.

B. Imagen observada a 100X mostrando un grupo de linfocitos T CD8+ traslapados dentro un vaso sanguíneo (círculo rosa) en el centro del tejido. En el extremo superior izquierdo se aprecian un pequeño grupo de linfocitos T CD4+ (círculo café) cercanos a otro vaso sanguíneo..

C. Micrografía a 40X de un COCE MD donde se muestra la presencia de células CD4+ y células CD8+ localizadas entre las células neoplásicas del tejido.

D. Imagen tomada a 100X de un COCE MD donde se aprecia la marca de las moléculas CD4 (flecha café) y CD8 (flechas rosas) rodeando la membrana celular de dichas células. Estas células se localizan dentro del tejido pero muy cercanas a vasos sanguíneos, observándose una célula CD4+ en el centro de un vaso (círculo café)

E. COCE PD observado a 100X donde se aprecia la presencia de una célula CD8+ (flecha rosa) alrededor de un vaso sanguíneo (círculo punteado). Junto a la célula CD8+, de lado izquierdo se aprecian otras células con una morfología similar a linfocitos pero al no presentar ninguna marca en sus membranas se podría sugerir que se trata de otro tipo de linfocitos.



DISCUSIÓN

La presencia de CDs y linfocitos T ha sido reportada en numerosos tipos de tumores, incluyendo el COCE. Los resultados de este estudio mostraron que el número de CDs y Linfocitos T CD4 y CD8 se vio relacionado positivamente al grado de diferenciación histológica del COCE. Los COCE BD y MD presentaron un número elevado de linfocitos T CD4 y CD8 en comparación con los PD, y aún mayor que en la mucosa sana, con una significancia estadística muy alta. Para el caso de CDs, la significancia estadística fue menor pero igualmente significativa, sobre todo comparada con el grupo control, al igual que lo refiere Preynant-Seauve⁹⁹, en carcinoma de mama, donde el número de CDs CD1a+ encontradas fue de 1 a 48 células con un promedio de 12 y en su grupo control (tejido de mama sano) fue raro encontrar más de 3 células CD1a+ e incluso en algunos casos la expresión fue nula⁶⁵; resultado similar al nuestro, donde el número se vio reducido hasta tres veces menos en mucosa sana respecto al tejido neoplásico. Esta reducción en el número de CDs puede justificarse con el hecho de que un tejido sano no requiere mayor presencia de CDs y cuando se compara este tejido con los experimentales, la significancia estadística radica en la diferencia que puede marcar la presencia de una célula menos o más dentro del tejido debido a la gran capacidad de presentación antigénica de las CDs; donde la frecuencia de contacto CD-Linfocitos T CD4 o CD8 reportada dentro de los nódulos linfáticos es de 5000 y 500 respectivamente por hora^{90, 91}, lo que podría definir una mejor respuesta inmunológica frente a la neoplasia entre un COCE BD y uno PD.

La infiltración de CDs dentro de los nidos tumorales es considerada como un reflejo de la respuesta de los linfocitos T, cuya asociación está correlacionada positivamente a un pronóstico más favorable, una mejor tasa de supervivencia y una reducción en la incidencia de metástasis^{62,100,101}, reportada en diferentes tipos de tumores como melanoma, carcinoma de colon, cáncer gástrico, cáncer de mama, colorectal, esofágico, pulmonar, oral y epitelomas espontáneos^{65,99,100,101,102}. Una investigación de Ishigami y cols. mostró relación entre la infiltración intratumoral de CDs y las características clínicas en carcinoma de esófago, donde los pacientes cuyo



grado de infiltración de CDs fue alto mostraban una profundidad de invasión más superficial en comparación con los pacientes con un grado de infiltración bajo y cuya invasión fue más profunda, refiriendo que el pronóstico de este tipo de cáncer podría ser estimado en base al monitoreo de DCs infiltrantes intratumoralmente ¹⁰³. Por el contrario, Treilleux y cols. demostraron que existe una correlación positiva entre la infiltración tumoral de CDs CD208+ , la agresividad del tumor y la mala resolución en cáncer de mama^{100,102} y esto con base en que no solo el número sino también el grado de maduración es un factor clave que puede ayudar a determinar el pronóstico de la neoplasia. Las CDs inmaduras detectadas en nódulos linfáticos en melanomas pueden tener un papel inmunosupresivo debido a su falta de maduración¹⁰⁴. En estudios clínicopatológico la densidad de CDs maduras en los nódulos linfáticos se encuentra asociada con una tasa de supervivencia más larga y la densidad de CDs inmaduras en el area tumoral se asocia a un mejor pronóstico. Además, los pacientes que presentaron la combinación de una alta densidad de células CD1a+ o DC-LAMP+ junto con un número alto de linfocitos CD25+ tuvieron una supervivencia más larga y mucho más favorable que pacientes con un número bajo de éstas células, sugiriendo que estos parámetros pueden ser considerados como una señal de una respuesta inmune funcional y por lo tanto con un mejor resolución de la enfermedad ⁶².

La función de las CDs es altamente dependiente del grado de maduración ^{104,105}. La importancia de la maduración de debe a la presencia de moléculas coestimuladoras (CD40, CD80, CD83 y CD86) y moléculas MHC tipo I y II en las CDs, lo que es crucial para la generación de linfocitos T Citotóxicos (CTLs) ^{101,104}. Las CDs inmaduras, caracterizadas por la ausencia de moléculas accesorias, tienen un papel inmunosupresivo y se encuentran involucradas en la inducción de tolerancia inmunológica. Así lo refirió Polak (2005), en un estudio de muestras de melanoma donde la mayoría de CDs FXIII+ no expresaban marcadores de maduración (CD83, CD40) pero si expresaban altos niveles de HLA-DR, sugiriendo que la capacidad de presentación antigénica continúa activa pero no se lleva a cabo una adecuada sinapsis inmunológica y por consiguiente una correcta activación de una respuesta inmune antitumoral¹⁰⁴.



Por otro lado, el nivel de infiltración de CDs depende del tipo de tumor del que se esté hablando. Nuestros resultados mostraron que el porcentaje para CDs obtenido del total de células cuantificadas fue de 5.3%, 5% y 6.3% para los COCE BD, MD y PD respectivamente, Preynaunt-Seauve (2006) reportó un porcentaje de 4.2% del total de una suspensión celular en el caso de un melanoma lo cual representa un nivel alto de CDs si se compara con epitelomas, donde el porcentaje fue de 0.02%, dato que nos indica que la presencia de CDs depende del tipo tumoral⁹⁸ y por ende, de sus características histológicas. Entre mejor diferenciado se encuentre una neoplasia, el pronóstico es más favorable debido a que el microambiente generado es menos agresivo para las células del sistema inmune. En una neoplasia pobremente diferenciada los elementos celulares del tejido han acumulado un mayor número de mutaciones por lo que tienden a generar un ambiente agresivo para las células inmunológicas y que de esta forma se lleve a cabo el escape de tumor, necesario para el crecimiento y diseminación de las células tumorales¹⁰⁶. Las células neoplásicas producen moléculas que inhiben la maduración de las CDs: IL-6, IL-10, VEGF, PGE₂ y TGF- β ^{62,65,99}. El TGF- β actúa en la gran mayoría de las células regulando su maduración y proliferación, donde al interactuar con sus receptores se puede inhibir la proliferación e incluso inducir apoptosis de esas células¹⁰⁷; sin embargo las células tumorales pueden desarrollar una pérdida de sensibilidad al TGF β debido a una expresión reducida o inactivación de sus receptores con la finalidad de promover tumorigénesis e incrementar metástasis^{107,108}. De esta manera, entre más agresivo sea el microambiente tumoral, las CDs infiltrantes de tumor muestran falta o reducción de sus moléculas coestimuladoras y poseen una pobre capacidad estimuladora de las células T e incluso pueden inducir anergia⁶².

La localización más común de las CDs en nuestro trabajo fue principalmente entre las células neoplásicas, cercanas a las perlas de queratina y cerca y dentro de los vasos sanguíneos, sin embargo la localización de estas células fue variable dependiendo del tipo histológico del tejido donde se encontraban. De acuerdo a Banchereau⁶⁸, la localización de las CDs es distinta de acuerdo al grado de maduración. Si son células inmaduras tienden a encontrarse dentro de las áreas



tumorales, en cambio si son maduras se encuentran confinadas a las áreas peritumorales sin penetrar las zonas de células neoplásicas⁶⁵. En melanoma se encontraron CDs CD1a+ infiltrando los nidos de células neoplásicas y en el estroma circundante, mientras que CDs DC-LAMP+ se encontraron confinados a las áreas peritumorales asociadas con infiltrado linfocitario^{62,63}. O'Donnell y cols (2007), observaron que las CDs CD-SIGN+ presentan defectos en la captura de antígenos con base en que estas células no se encontraron infiltrando las áreas primarias del tumor¹⁰⁹, resultado que es muy parecido al nuestro exclusivamente en COCE PD.

La mayoría de los tumores sólidos se caracterizan por un infiltrado linfocitario, el cual consiste básicamente de células T CD4+ y CD8+⁷⁹. En el caso de linfocitos T analizados en este trabajo, su densidad fue mayor en los COCE BD y MD con una alta significancia estadística. La proporción de Linfocitos T CD4+ y T CD8+ a partir del conteo celular total en los diferentes grados de diferenciación histológica fue similar en los COCE BD y MD (48% para CD4+ en COCE BD y MD; y 46% para los linfocitos T CD8+ en COCE BD y MD) sin embargo, en el caso de los COCE PD el porcentaje de los Linfocitos T CD4+ incrementó de 48% a 60.4% y para el caso de linfocitos T CD8+ el porcentaje se redujo de 46% a 33.3%. Estos resultados aunados a que el porcentaje para CDs se vio levemente incrementado de un 5% en los COCE BD y MD a un 6.3% en los COCE PD muestran que la función citotóxica de los linfocitos T se ve reducida en los PD con base a la disminución en el número presente de dichas células. El aumento en la proporción de CDs en los PD tiene como objetivo probable el de contrarrestar esta reducción en la respuesta citotóxica por parte de los linfocitos T CD8+ y activar por consiguiente una mayor respuesta por parte de los linfocitos T CD4+, cuya respuesta se ve de por sí ya afectada por el microambiente tumoral más agresivo que poseen los tipos histológicos menos diferenciados. Además la variación en la proporción pudiera referir que existen defectos en la presentación antigénica por parte de las CDs, lo que resulta en una pobre activación de linfocitos T CD4+ y llevaría a una reducción en la respuesta citotóxica de los linfocitos T CD8+.



La localización de los linfocitos T CD4+ y T CD8+ en nuestro estudio fue entre las células neoplásicas y cercanas a vasos sanguíneos en COCEs BD y PD, pero en los COCE PD fue raro encontrar el infiltrado linfocitario dentro de las áreas de células tumorales.

De acuerdo a diferentes autores la infiltración de células T dentro del área tumoral es importante para que exista una mejor respuesta inmunológica, ya que la presencia de células T con reactividad contra antígenos tumorales representa una parte básica de la Inmunidad tumoral dirigida por las células T, razón por la cual un infiltrado linfocitario es considerado como un importante factor pronóstico ^{79,93,94}.

El papel de los linfocitos T CD4+ cooperadores en la activación de linfocitos T CD8+ es la de prevenir tolerancia inmunológica y promover la supervivencia de linfocitos T CD8+ efectores y de memoria. Otra de las funciones de los Linfocitos T CD4+ específicos de tumor es la de promover el reclutamiento y mejorar las funciones citolíticas de los linfocitos T CD8+. Dicho reclutamiento es acelerado por IFN-gamma dependiente de la producción de citocinas por parte de los linfocitos T CD4+ y la proliferación es intensificada por la producción de IL-2 lo que igualmente ayuda a sobregular la expresión de granzima B de los linfocitos T CD8+ ¹¹⁰.

Se ha observado en diferentes tipos de neoplasias malignas, como en melanoma o cáncer colorectal en estado avanzado que los linfocitos T CD8+ infiltrantes de tumor pueden proporcionar una ventaja en la supervivencia mientras que los linfocitos T CD8+ circulantes no lo hacen ⁷⁹.

Como se mencionó en párrafos anteriores, las células neoplásicas desarrollan distintos mecanismos de escape de tumor ³⁷ para evadir la respuesta inmune y en el caso de linfocitos T, éstos no se ven excluidos del ataque directo por parte del microambiente tumoral. Estudios realizados en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, demostraron que la frecuencia de linfocitos T CD8+ p53+ específicos fue mayor en pacientes cuyos tumores no acumulaban p53, mientras que en pacientes cuyos tumores acumulaban p53 fueron encontradas frecuencias más bajas de linfocitos T vírgenes. Esto podría explicarse debido a que los tumores que acumulan p53 inducen apoptosis de células T efectoras p53-específicas ¹¹¹.



Gran mayoría de los estudios enfatizan el papel de los linfocitos T CD8+, sin embargo los linfocitos T CD4+ juegan un papel crucial en la inducción y activación de Linfocitos T CD8+ ⁹⁴. Para la activación de dicha respuesta es importante recalcar la interacción que se da por parte de las CDs en la activación linfocitaria. Se ha reportado en pacientes con melanoma que un número elevado de CDs Mieloides son esenciales para una correcta respuesta antitumoral. Al aplicar GM-CSF alrededor del sitio de excisión del tumor en pacientes con melanoma, se observó un incremento significativo en el número y estado de activación de las CDs Mieloides en las áreas paracorticales del nódulo linfático centinela, lo cual se vio reflejado en un alto número de linfocitos T CD8+ específicos de tumor. Cuando los pacientes fueron clasificados de acuerdo al porcentaje de CDs CD1a+CD83+, hubo una asociación positiva con el porcentaje de células T CD8+ antígeno específico ⁹³. El melanoma es considerado un tumor muy inmunogénico y la presencia de células T con reactividad contra antígenos tumorales ha sido reportada por varios autores, lo cual representa una parte de la Inmunidad tumoral dirigida por las células T.

La participación de linfocitos T CD4+ antígeno específico es requerida para una eficiente respuesta antitumoral y juegan un papel crucial en la inducción y activación de Linfocitos T CD8+ de memoria asociados a antígenos tumorales a linfocitos T Citotóxicos Efectores, además de generar y mantener la respuesta inmune antitumoral a través de sus interacciones con linfocitos B, Macrófagos y células NK ^{94.111}.



CONCLUSIONES

- Las CDs y Linfocitos T CD4+ y T CD8+ se encontraron infiltrando todas las muestras correspondientes a COCE utilizadas en este estudio, mostrando que el grado de diferenciación histológica del COCE es una característica clave que puede ayudar a determinar la densidad de CDs y Linfocitos T CD4+ y T CD8+.
- Respecto al promedio de los tres diferentes grupos celulares de estudio (CDs, Linfocitos T CD4+ y Linfocitos T CD8+) todas las muestras experimentales mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control, sin embargo las diferencias observadas entre los grados de diferenciación BD y MD no fueron tan altas como cuando se comparaban con los PD, donde éste último subtipo histológico fue el que mostró mayor variación en la densidad y patrón de localización de las células de estudio.
- La asociación entre el promedio de CDs y el grado de diferenciación histológica mostró diferencias significativas solamente entre los COCE BD y MD comparados con el grupo control correspondiente a mucosa sana.
- La localización de CDs en los COCE BD fue principalmente en los nidos tumorales y cercanas a las perlas de queratina. La localización para los Linfocitos T CD4+ y T CD8+ en los COCE BD y MD fue dentro de las áreas tumorales. Para los COCE PD la localización fue principalmente alejada de estas áreas y cercanas a vasos sanguíneos grandes.



REFERENCIAS

1. NCI, National Cancer Institute [sede Web]. Cancer Topics: What Is Cancer? [acceso 2010]. Defining Cancer. Disponible en: <http://www.cancer.gov/cancertopics/what-is-cancer>
2. Lopes-Costa A, Pereira J, Ferreira-Nunes, da Silva-Arruda M. Correlation between TNM classification, histological grading and anatomical location in oral squamous cell carcinoma. *Pesqui Odontol Bras.* 2002; 16 (3): 216-20.
3. Organización Mundial de la Salud [sede Web]. Programas y Proyectos: Centro de Prensa. Ginebra, Suiza: 3 de Abril de 2003 [acceso abril de 2010]. La Incidencia Mundial de Cáncer podría aumentar en un 50% y llegar a 15 millones de nuevos casos en el año 2020. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr27/es/index.html>
4. Díaz-Villanueva D, Sánchez-Maya MP, Aparicio-Carrasco G. Frecuencia de carcinoma epidermoide en cavidad bucal en el Hospital Central Militar de 1987 a 1997. *Rev Sanid Milit Mex.* 2001; 55 (5): 196-199.
5. Mohar A, Frias-Mendivil M, Suchil-Bernal L, Mora-Macias T, De la Garza JG. Epidemiología descriptiva de cancer en el Instituto Nacional de Cancerlogia de Mexico. *Salud Publica Mex.* 1997; 39 (4): 1-6.
6. Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas, Secretaría de Salud [Sede Web]. México: 2000 [acceso 2010]. Compendio del Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas. Información Nacional. Disponible en: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/online/infonal-RHNM-y2k.htm>
7. Secretaría de Salud. Compendio del Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas en México (1993-1997). México: SSA; 1999.
8. Sánchez-García S, et al. Egresos hospitalarios por cáncer bucal en el IMSS (1991-2000). *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2008; 46 (1): 101-8.
9. Mosqueda A, Ibañez N, Díaz MA, Irigoyen ME, Sida E. Frecuencia de neoplasias malignas de la región bucal y maxilofacial en dos servicios de patología bucal de la Ciudad de México. *Rev Inv Clin.* 2000; 1: 31-5.
10. Barrón TT, et a. Carcinoma epidermoide de piel en la población mexicana. Estudio epidemiológico y clínico de 508 tumores; *Rev Med Hosp Gen (Mex).* Junio 2004; 67(2); 71-7.
11. Meza-García G, Muñoz-Ibarra JJ, Páez-Valencia C, Cruz-Legorreta B, Aldape-Barrios B. Carcinoma de células escamosas de cavidad bucal en un censo de tercer nivel de atención social en la ciudad de México. Experiencia de cinco años. *Avances de Estomatología (Mex).* 2009; 25 (1); 19-28.
12. Higa, M et al. Epstein-Barr virus (EBV) subtype in EBV related oral squamous cell carcinoma in Okinawa, a subtropical island in southern Japan, compared with Kitakyushu and Kumamoto in mainland Japan. *J Clin Pathol.* 2002 Jun; 55 (6): 414-23.
13. Herrera A, et al. Supervivencia en el Carcinoma Epidermoide de Cavidad Oral. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2001; 52: 381-86.



14. Warnakulasuriya S. Causes of oral cancer– an appraisal of controversies. *Br Dent J.* 2009; 207(10): 471-5.
15. Frías M, Zeichner I, Súchil L, Ochoa F. Epidemiología descriptiva del cáncer de cavidad bucal en el Instituto Nacional de Cancerología (1985-1992). *Rev Inst Cancerol Mex.* 1997; 43 (2): 80-85.
16. Hashibe M, et al. Alcohol Drinking in Never Users of Tobacco, Cigarette Smoking in Never Drinkers, and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst.* 2007; 99: 777-89.
17. Amy Lee Y, et al. Active and Involuntary Tobacco Smoking and Upper Aerodigestive Tract Cancer Risks in a Multicenter Case-Control Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18 (12): 3353-61.
18. Fant RB, Henningfield JE. Cigars: health effects and trends (Smoking and Tobacco Control Monograph); Pharmacology and abuse potential of cigars; Bethesda (MD): National Cancer Institute; 1998.
19. Tapia-Conyer R, Kuri-Morales P, Hoy-Gutiérrez MJ; Panorama epidemiológico del tabaquismo en México. *Salud Publica Mex.* 2001; 43 (5): 478-84.
20. The Tobacco Atlas [Sede Web]. USA: 2010 [acceso 2010]. The American Cancer Society and World Lung Foundation Present the Tobacco Atlas, Third Edition in Spanish: Data shows some progress in tobacco control, but Mexico still among top 20 countries with largest numbers of smokers. Disponible en: http://www.tobaccoatlas.org/tobaccoatlas/press_4-14-10.html
21. Villalobos A, Rojas R. Consumo de tabaco en México. Resultados de las Encuestas Nacionales de Salud 2000 y 2006. *Salud Publica Mex.* 2007; 49 (2): S147-S154.
22. Moreno-García D, Cantú-Martínez PC. Perspectiva sobre el Tabaquismo en México. *RESPYN Rev Salud Publ y Nutr.* 2002; 3(2).
23. Francesch S, et al. Cessation of Alcohol Drinking and Risk of Cancer of the Oral Cavity and Pharynx. *Int J Cancer.* 2000; 85: 187-190.
24. Dal Maso L, et al. Alcohol Drinking Outside Meals and Cancers of the Upper Aerodigestive Tract. *Int J Cancer.* 2002; 102, 435–7.
25. Chocolatelawa N, Chaturvedi P. Role of Human Papilloma Virus in the oral carcinogenesis: An Indian perspective. *J Cancer Res Ther.* 2009; 5: 71-7.
26. Frisch M. On the etiology of anal squamous carcinoma. *Dan Med Bull.* 2002; 49 (3): 194-209.
27. Rosenquist K. Risk factors in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. *Swed Dent J Suppl.* 2005; 179.
28. Scully C. Oral Cancer; the evidence for sexual transmission. *Brit Dent J.* 2005; 199; 203-7.
29. Chichareon S, et al. Risk factors for cervical cancer in Thailand: a case control study. *J Natl Cancer Instit.* 1998; 90: 50–7.
30. Ammatuna P, et al. Presence of Human Papillomavirus and Epstein-Barr Virus in the Cervix of Women Infected With the Human Immunodeficiency Virus. *J Med Virol.* 2000; 62: 410–15.



31. Sixbey JW, Lemon SM, Pagano JS. A second site for Epstein-Barr virus shedding: the uterine cervix. *The Lancet* ii: 1986; 1122–1124.
32. Heck JE, et al. Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. *Int J Epidemiol*. 2009.
33. Jewett A, Head C, Cacalano NA. Emerging Mechanisms of Immunosuppression in Oral Cancers. *J Dental Res*. 2006; 85 (12): 1061-73.
34. Van Leeuwen MT, Grulich AE, McDonald SP et al. Immunosuppression and other risk factors for lip cancer after kidney transplantation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009; 18: 561-69.
35. Hernández G, Arriba L, Jiménez C, Bagan JV, Rivera B, Lucas M, et al. Rapid Progression from Oral Leucoplakia to carcinoma in an immunosuppressed liver transplant recipient. *Oral Oncol*. 2003; 39: 87-90.
36. Bhatia S, Louie AD, Bhatia R, O'Donnell MR, Fung H, Kashyap A, et al. Solid cancers after bone marrow transplantation. *J Clin Oncol*. 2001; 19: 464-71.
37. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LI, Scheiber R. Cancer Immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002; 3: 991-8.
38. Marshall J R, et al. Smoking, alcohol, dentition and diet in the epidemiology of oral cancer. *Eur J cancer B Oral Oncol*. 1992.
39. Zheng T Z, et al. Dentition, oral hygiene and risk of oral cancer: a case-control study in Beijing, People Republic of China. *Cancer Causes Control*. 1990; 1: 235-41.
40. Warnakulasuriya S, et al. Demonstration of ethanol-induced protein adducts in oral leukoplakia (pre-cancer) and cancer. *J Oral Pathol Med*. 2008; 37: 157-65.
41. Warnakulasuriya S, Johnson N W, Linklater K , Bell J. Cancer of mouth, pharynx and nasopharynx in Asians and Chinese immigrants resident in Thames regions. *Eur J Cancer Oral Oncol*; 1999; 35: 471-5.
42. Jogaib JC, Silveira TJ, Cantini AMR, Gasparini Netto A, Tong ChK. Caso Clínico-Carcinoma de Células Escamosas Oral. *Cadernos UniFOA, Volta Redonda* 2006: 1 (2).
43. Jager-Wittenaar H. Pre- and post-treatment malnutrition in head and neck cancer patients [dissertation]. Netherlands: Universitair Medisch Centrum Groningen; 2010.
44. Ereño ZC. The updated WHO Head and Neck Tumours Classification (2005). Epithelial precursor lesions and tumours of the larynx, hypopharynx and trachea. *Rev Esp Patol*. 2007; 40(1): 3-10.
45. Warnakulasuriya S. Histological Grading of oral epithelial dysplasia: revisited. *J Pathol*. 2001; 194: 294-7.
46. Batsakis J, Shah J, Johnson N. Oral Cancer; *The Histology of Oral Cancer*: 131-162.
47. Pereira MC, Oliveira DT, Landman G, Kowalski LP. Histological Subtypes of Oral Squamous Cell Carcinoma: Prognostic Relevance. *J Can Den Asoc*. 2007; 73(4): 339-44.
48. Pindborg JJ, Reichart P, Smith C, van der Waal I. Histological Typing of Cancer and Precancer of the Oral Mucosa. WHO (1997); Second Edition; 11-26.



49. Lo WL, Kao SY, Chi LY, Wong YK, Chang RCS. Outcomes of oral squamous cell carcinoma in Taiwan after surgical therapy: factors affecting survival. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003; 61: 751-8.
50. Catros-Quemener V, Bouet F, Genetet N. Immunité anti-tumoral et thérapies cellulaires du cancer. *Med Sci (Paris).* 2003; 1(19): 43-53.
51. Swaan J, Smyth M. Immune Surveillance of tumors. *J Clin Invest.* 2007; 117 (5): 1137-46.
52. Ramos DM, But M, Regezi J, Schmidt BL, Atakilit A, Dang D, et al. Expression of integrin $\beta 6$ enhances invasive behavior in oral squamous cell carcinoma; *Matrix Biol.*
53. Nguyen TV, Yueh B. Weight loss predicts mortality after recurrent oral cavity and oropharyngeal carcinomas. *Cancer.* 2002; 95: 553-62.
54. Kikuchi K et al. Dendritic Cells in human squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Anticancer Res.* 2002 Mar-Apr; 22: 545-57.
55. Cuéllar AA, Cifuentes RC, Gómez GA, González EJM. Biología de las Células Dendríticas Humanas. *Universitas Scientiarum (Rev Fac Ciencias).* 2004; 9(1): 5-12.
56. Wan H, Dupasquier M. Dendritic Cells in vivo and in vitro. *Cell & Mol Biol.* 2005; 2: 28-35.
57. Lipscomb, M, Masten B. Dendritic Cells: Immune Regulators in Health and Disease. *Physiol Rev.* 2001; 82: 97-130.
58. Dunn G, Oliver K, Loke D, Stafford ND, Greenman J. Dendritic Cells and HNSCC: A potential treatment option? (Review). *Oncol Rep.* 2005; 13: 3-10.
59. Ardavin C, et al. Origin and Differentiation of Dendritic cells. *Trends Immunol.* 2001; 22: 691-700.
60. Cutler C, Jotwani R. Dendritic Cells at the Oral Mucosal Interface. *J Dent Res.* 2006; 85(8): 678-89.
61. Banchereau J. Sistema Inmune. *Sci Ame (Mexico).* 2008; 18: 56-63.
62. Ladányi A, et al. Density of DC-LAMP+ mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a strong independent prognosis factor. *Cancer Immunol Immunother.* 2007; 56: 1459-69.
63. Movassagh M, et al. Selective Accumulation of Mature DC-Lamp+ Dendritic Cells in Tumor Sites is Associated with Efficient T-Cell Mediated Antitumor Response and Control of Metastatic Dissemination in Melanoma. *Cancer Res.* 2004; 64:2192-8.
64. Barret A, Cruchley A, Williams D. Oral Mucosal Langerhans' Cells. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1996; 7(1); 36-58.
65. Bell D, et al. In Breast Carcinoma Tissue, Immature Dendritic Cells Reside within the Tumor, whereas Mature Dendritic Cells Are Located in Peritumoral Areas. *J Exp Med:* 1999; 190(10): 1417-25.
66. Keller R. Dendritic Cells: their significance in health and disease. *Immunol Lett.* 2001; 78: 113-22.
67. Lucey DR; Evolution of the type-1 (Th1)–Type-2 (Th2) Cytokine Paradigm. *Infect Dis Clin North Am.* 1999; 13(1); 1-9.
68. Banchereau J, Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998; 392: 245-252.



69. Geijtenbeek T, et al. Identification of DC-SIGN, a Novel Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Receptor that Supports Primary Immune Responses. *Cell*. 2000; 100: 575-85.
70. Whiteside TL. Anti-tumor vaccines in head and neck cancer: targeting immune responses to the tumor. *Curr Cancer Drug Targets*. 2007; 7 (7): 633-42.
71. Ito M, et al. Tumor-Derived TGF- β 1 Induces Dendritic Cell Apoptosis in the Sentinel Lymph Node. *J Immunol*. 2006; 176: 5637-43.
72. Palucka K, Ueno H, Fay J, Banchereau J. Harnessing dendritic cells to generate cancer vaccines. *Ann N Y Acad Sci*. 2009; 1174: 88-98.
73. Kusama K, et al. Dendritic Cells and Oral Cancer. *J Oral Biosci*. 2005; 47(1): 42-51.
74. Abbas A; *Inmunología Celular y Molecular*; 18-33, 81-90, 163-183 pp.
75. Ganong WF. *Fisiología Médica*. 17a edición. Ed. El Manual Moderno. 2000. Cap 27; p. 574.
76. Rojas- Espinosa O; *Inmunología (de memoria)*; 3^a Ed; Editorial Médica Panamericana; 2006; 76-80 pp.
77. Corthay A. How do Regulatory T Cells Work?. *Scand Journal Immunol*. 2009; 70: 326-36.
78. Tefit JN, Davies G, Serra V. NKT Cell responses to glycolipid activation. *Methods Mol Biol*. 2010; 626: 149-76.
79. Goedegebuure PS, Eberlein TJ. The role of CD4+ tumor- infiltrating lymphocytes in human solid tumors. *Immunol Res*. 1995; 14: 119-319.
80. Mosman TR, Coffman RL. TH1 AND TH2 CELLS: Different patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Ann Rev Immunol*. 1989; 7: 145-73
81. Kullberg MC, Jankovic D, Gorelick PL et al. Bacteria-triggered CD4(+) T regulatory cells suppress Helicobacter hepaticus-induced colitis. *J Exp Med*. 2002; 196: 505-15.
82. Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA. Inhibition of human CD4(+)CD25(+high) regulatory T cell function. *J Immunol*. 2002;169:6210-7.
83. Zhang Sh, Zhang H, Zhao J. The role of CD4 T cell help for CD8 CTL activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 384: 405-8.
84. Ergmann J, Chung ChD, Fathman GC. Scratching the (T cell) surface; *Genome Biol*. 2003; 5: 202.
85. Bevan M. Helping the CD8+ T-Cell Response. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4: 595-602.
86. Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, Sourdive DJ, Zajac AJ, et al. Counting Antigen-Specific CD8 T Cells: A Reevaluation of Bystander Activation during Viral Infection. *Immunity*. 1998; 8: 177-87.
87. Vaios K, Zamanakou M, Soukou F, Kerenidi T, Gourgoulis K, Germeis A. Naturally occurring tumor-specific CD8 [+] T-cell precursors in individuals with and without cancer. *Immunol Cell Biol*. 2010.
88. Alemseged T, Albert F, Golstein P, Schmitt-Vershulst AM. Early steps of lymphocyte activation bypassed by synergy between calcium ionophores and phorbol ester. *Nature*. 1985; 313: 318-20.



89. Beadling C, Smith KA. DNA array analysis of interleukin-2-regulated immediate/early genes. *Med Immunol.* 2001; 1: 2
90. Calahan M, Parker I. Imaging the choreography of lymphocyte trafficking and the immune response. *Curr Opin Immun.* 2006; 18: 476-482.
91. Weinberg R. *The Biology of Cancer.* USA. Garland Science. 2007; Chap 15.
92. Höpken U, et al. The ratio between dendritic cells and T cells determines the outcome of their encounter: Proliferation versus deletion. *Eur J Immunol.* 2005; 35: 2851-63.
93. Vuylsteke R, et al. Tumor-Specific CD8+ T Cell Reactivity in the Sentinel Lymph Node of GM-CSF-Treated Stage I Melanoma Patients is Associated with High Myeloid Dendritic Cell Content. *Clin Cancer Res.* 2006; 12 (9): 2826-33.
94. Nagorsen D, Scheibenbogen C, Marincola F, Letsch A, Keilholz U. Natural T Cell Immunity against Cancer. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 4296-4303.
95. Michel A, et al. High density of FOXP3-positive T cells infiltrating colorectal cancers with microsatellite instability. *Br J Cancer.* 2008; 99: 1867-73.
96. Suzuki H, et al. Intratumoral CD8(+) T/FOXP3 (+) cell ratio is a predictive marker for survival in patients with colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2010; 59 (5): 653-661.
97. Yoshioka T, et al. Infiltrating regulatory T cell numbers is not a factor to predict patient's survival in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2008; 98: 1258-63.
98. Liu G, Ren H, Sun X, Shi JS. Distribution of natural killer cells and T-lymphocyte subsets in peripheral blood, gallbladder cancer and surrounding tissue. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2007; 6 (1): 81-6.
99. Preynant-Seauve O, Schuler P, Contassot E, Beermann F, Huard B, French E. Tumor-Infiltrating Dendritic Cells Are Potent Antigen-Presenting Cells Able to Activate T Cells and Mediate Tumor Rejection. *J Immunol.* 2006; 176: 61-7.
100. Ishigami S, et al. Prognosis value of CD208-positive cell infiltration in gastric cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2010; 59(3): 389-95.
101. Reichert TE, Scheuer C, Day R, Wagner W, Whiteside T. The Number of Intratumoral Dendritic Cells and Zeta-Chain Expression in T Cells as Prognostic and Survival Biomarkers in Patients with Oral Carcinoma. *Cancer.* 2001; 9: 2136-47.
102. Treilleux I, et al. Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 7466-74.
103. Ishigami S, et al. Clinical implications of intratumoral dendritic cell infiltration in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2003; 10(5): 1237-40.
104. Polak M, et al. Presence and maturity of dendritic cells in melanoma lymph node metastases. *J Pathol.* 2005; 207: 83-90.
105. Steinman R. The control of immunity and tolerance by Dendritic Cells. *Pathol Biol* 2003; 51.
106. Mesquita R, Araújo V, Paes A, Nunes F, Sousa S. Immunohistochemical Analysis for CD21, CD35, Caldesmon and S100 Protein on Dendritic Cells Types in Oral Lymphomas. *J Appl Oral Sci.* 2009; 17 (3): 248-53.
107. Caestecker M, Piek E, Roberts A. Role of Transforming Growth Factor-beta Signaling in Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92 (17): 1388-1402



108. Bierie B, Moses HL. TGF-B and Cancer. Cytokine Growth Factor Rev. 2006; 17: (1-2); 29-40.
109. O'Donnell R, et al. Distribution of dendritic cell subtypes in primary oral squamous cell carcinoma is inconsistent with a functional response. Cancer Lett. 2007; 255: 145-52.
110. Bos R, Sherman LA. CD4+ T-Cell Help in the Tumor Milieu Is Required for Recruitment and Cytolytic Function of CD8+ T Lymphocytes. Cancer Res. 2010; 70 (20) . [Epub ahead of print].
111. Chikamatsu K, et al. p53110–124-specific Human CD4+T-helper Cells Enhance *in Vitro* Generation and Antitumor Function of Tumor-reactive CD8+T Cells1. Cancer Res. 2003; 63: 3675-81.