



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO DE CÉLULAS DE LANGERHANS EN

CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

NATHALIA RUA CARDONA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ANDRÉS ELIU CASTELL RODRÍGUEZ

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. LAILA GUTIERREZ KOBEH

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DRA. PATRICIA SOFIA GOROCICA ROSETE

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F. JUNIO, 2015



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO DE CÉLULAS DE LANGERHANS EN
CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

NATHALIA RUA CARDONA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ANDRÉS ELIU CASTELL RODRÍGUEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. LAILA GUTIERREZ KOBEH
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DRA. PATRICIA SOFIA GOROCICA ROSETE
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F. JUNIO, 2015

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 23 de febrero de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **RUA CARDONA NATHALIA** con número de cuenta **513452826**, con la tesis titulada **"ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO DE CÉLULAS DE LANGERHANS EN CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS"**, realizada bajo la dirección del **DR. ANDRÉS ELIU CASTELL RODRÍGUEZ**:

Presidente: DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ
Vocal: DR. JUAN CARLOS CUAUHTÉMOC HERNÁNDEZ GUERRERO
Secretario: DRA. LAILA GUTIÉRREZ KOBEH
Suplente: DR. JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ
Suplente: DRA. PATRICIA SOFÍA GOROCICA ROSETE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 21 de mayo de 2015


DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

- 1.** Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM
- 2.** Beca CONACYT, Apoyo Programa Colfuturo, Apoyo Programa Enlaza Mundos.
- 3.** Comité tutor: Dr. Andrés Eliu Castell Rodríguez, Dra. Laila Gutiérrez Kobeh, Dra. Patricia Sofía Gorocica Rosete.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS:

Para aquellas personas que contribuyeron enormemente con mi trabajo de tesis y/o con mi formación académica durante estos años:

C. D Esp ALEJANDRO MACARIO HERNÁNDEZ de la UNAM por su participación como Especialista en Patología y Medicina Bucal en esta tesis, por sus comentarios y correcciones al proyecto; por nuestras constantes discusiones y aprendizaje académico.

Dr. JUAN CARLOS CUAUHTEMOC HERNÁNDEZ GUERRERO y Dra. MARÍA DOLORES JIMÉNEZ FARFÁN de la UNAM por su apoyo, ayuda y contribución a mi formación profesional y a la tesis.

Dr. ADALBERTO MOSQUEDA TAYLOR de la UAM -X por facilitarme los bloques de COCE de su consulta privada para realizar este trabajo, por su apoyo, por sus valiosas ideas y comentarios al proyecto. Por su contribución continua a mi formación profesional.

Méd. Cir. y Candidato a M en C. OMAR PÉREZ ENRÍQUEZ de la UNAM por su aporte y orientación en el proceso estadístico de esta tesis.

Dra. LEONORA CHÁVEZ MERCADO del Hospital General de México por su enorme disposición y valiosa colaboración con los COCE para realizar este trabajo.

Médico Anatómo Patólogo VICTOR FELIPE ROJAS ÁVILA del INER – UNAM por su ayuda con los especímenes de lenguas sanas, por su apoyo y la buena disposición siempre.

Dr. ANDRÉS CASTELL RODRÍGUEZ, Dra. LAILA GUTIÉRREZ KOBEH, Dra. PATRICIA SOFÍA GOROCICA ROSETE de la UNAM por su orientación académica.

Biol. BEATRIZ HERNÁNDEZ TÉLLEZ y a la Méd. Cir SARA JUDITH ALVÁREZ PÉREZ de la UNAM por su asesoría con las técnicas y el trabajo en el laboratorio.

Biol. LAURA BUCIO LÓPEZ por su incondicional colaboración y por su aporte para realizar la tesis.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES:

Para todas las personas e instituciones que me ayudaron, que creyeron en mi, que me apoyaron a lo largo de este proyecto académico y de vida.

A: Omaira de J Cardona Ramírez, Roberto H. Rúa Paniagua, Gisela Rúa Cardona y Marco Wießinger.

A mis Familiares y amig@s.

Alejandro Macario Hernández y a toda la Familia Macario Hernández.

A Mis compañeros de la Maestría.

Dr. Juan Carlos Cuauhtemoc Hernández Guerrero y a la Dra. María Dolores Jiménez Farfán.

Dr. Adalberto Mosqueda Taylor.

Dr. Ivan David Bano Jaramillo.

A la Universidad CES, en especial al Dr. Julián Emilio Vélez Ríos.

DEDICATORIA

Para Dios
Para mi Familia Colombiana,
Para mi Familia Mexicana,
Para mi Familia Alemana.

Para Mi hermano de la vida Alejandro y para mi Fucken.

Para mis amig@s.

Para todos los que de alguna manera me orientaron, ayudaron y me dieron sus consejos.

A todos ustedes infinitas gracias,

Nathalia Rua Cardona

ÍNDICE

LISTA DE CUADROS, GRÁFICOS Y FOTOMICROGRAFÍAS	i
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	6
2.1 Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE)	6
2.1.1 Definición	6
2.1.2 Epidemiología	6
2.1.3 Etiología	6
2.1.4 Aspectos clínicos	7
2.1.5 Estadificación clínica	9
2.1.6 Aspectos histopatológicos	10
2.1.7 Tratamiento	11
2.2 El Sistema inmune en el cáncer	11
2.3 Las Células dendríticas	12
2.4 Las Células de Langerhans	13
2.4.1 Definición	13
2.4.2 Función	14
2.4.3 Fenotipo en humanos	14
2.4.4 Células de Langerhans en la mucosa oral	14
2.4.5 Marcadores inmunohistoquímicos de células de Langerhans	15
2.4.5.1 CD1a	15
2.4.5.2 Langerina (CD 207)	15
2.4.5.3 Moléculas clase II del CPH	15
2.4.5.4 CD 80	16
2.4.5.5 CD 86	16
2.4.5.6 CD 273	16
2.4.5.7 CD 274	16
2.5 Marcador de microambiente en carcinomas: receptor de adenosina A _{2a}	16
2.6 Reportes en la literatura de células de Langerhans en carcinoma oral de células escamosas	17
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
5. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN	18
6. OBJETIVOS	18
6.1 Objetivo general	18
6.2 Objetivos específicos	19
7. METODOLOGÍA	19
7.1 Tipo de estudio	19
7.2 Universo del estudio	19
7.3 Muestra	19
7.4 Criterios para el estudio	20
7.4.1 Grupo de estudio	20
7.4.1.1 Criterios de inclusión	20

7.4.1.2 Criterios de exclusión	20
7.4.1.3 Criterios de eliminación	20
7.4.2 Grupo control	20
7.4.2.1 Criterios de inclusión	20
7.4.2.2 Criterios de exclusión	20
7.4.2.3 Criterios de eliminación	21
7.5 Materiales y metodología general	21
7.6 Técnicas	22
7.7 Diseño del análisis estadístico	22
8. RESULTADOS	23
8.1 Histopatología	23
8.2 Inmunohistoquímica	23
8.3 Análisis estadístico	31
8.3.1 Conteo de células por marcador identificado con anticuerpos específicos	31
8.3.1.1 Conteo de células marcadas con el anticuerpo anti CD207 (Langerina)	31
8.3.1.2 Conteo de células marcadas con el anticuerpo anti CD1a	33
8.3.1.3 Conteo de células marcadas con el anticuerpo anti HLA-II	34
8.3.1.4 Conteo de células marcadas con el anticuerpo anti CD274	36
8.3.1.5 Conteo de células marcadas con el anticuerpo anti CD273	37
8.3.1.6 Conteo de células marcadas con el anticuerpo anti CD80	39
8.3.1.7 Conteo de células marcadas con el anticuerpo anti CD86	40
8.3.1.8 Conteo de células marcadas con el anticuerpo anti receptor de adenosina A _{2a}	42
8.3.2 Comparación de conteos de células de Langerhans por grupo	43
8.3.2.1 Conteo de células marcadas en el grupo control - Lenguas sanas	43
8.3.2.2 Conteo de células marcadas en el grupo de COCE bien diferenciado	45
8.3.2.3 Conteo de células marcadas en el grupo de COCE moderadamente diferenciado	47
8.3.2.4 Conteo de células en el grupo de COCE pobremente diferenciado	49
8.4 Datos de hábito tabáquico y alcohol	51
8.5 Datos clínicos de edad y género	52
9. DISCUSIÓN	52
10. CONCLUSIONES	55
11. LITERATURA CITADA	56
Anexo 1	61

LISTA DE CUADROS, GRÁFICOS Y FOTOMICROGRAFÍAS

CUADROS

Clasificación TNM de los carcinomas de labio y cavidad oral (OMS - 2005)	9
Tabla 1. Análisis estadístico del anticuerpo anti CD207	32
Tabla 2. Análisis estadístico del anticuerpo anti CD1a	33
Tabla 3 . Análisis estadístico del anticuerpo anti clase II del CPH	35
Tabla 4 . Análisis estadístico del anticuerpo anti CD274	36
Tabla 5 . Análisis estadístico del anticuerpo anti CD273	38
Tabla 6 . Análisis estadístico del anticuerpo anti CD80	39
Tabla 7 . Análisis estadístico del anticuerpo anti CD86	41
Tabla 8 . Análisis estadístico del anticuerpo anti receptor de adenosina A _{2a}	42
Tabla 9 . Análisis estadístico del grupo control – lenguas sanas	44
Tabla 10 . Análisis estadístico del COCE bien diferenciado	46
Tabla 11 . Análisis estadístico del COCE moderadamente diferenciado	48
Tabla 12 . Análisis estadístico del COCE pobremente diferenciado	50
Tabla 13. Rangos de edad	52
Tabla 14. Distribución por género	52

GRÁFICOS

Gráfica 1. Análisis estadístico del anticuerpo anti CD207	32
Gráfica 2. Análisis estadístico del anticuerpo anti CD1a	34
Gráfica 3 . Análisis estadístico del anticuerpo anti clase II del CPH	35
Gráfica 4 . Análisis estadístico del anticuerpo anti CD274	37
Gráfica 5 . Análisis estadístico del anticuerpo anti CD273	38
Gráfica 6 . Análisis estadístico del anticuerpo anti CD80	40
Gráfica 7 . Análisis estadístico del anticuerpo anti CD86	41
Gráfica 8 . Análisis estadístico del anticuerpo anti receptor de adenosina A _{2a}	43
Gráfica 9 . Análisis estadístico del grupo control – lenguas sanas	45
Gráfica10 . Análisis estadístico del COCE bien diferenciado	47
Gráfica11 . Análisis estadístico del COCE moderadamente diferenciado	49
Gráfica12 . Análisis estadístico del COCE pobremente diferenciado	51

FOTOMICROGRAFÍAS

Fotomicrografía de lenguas sanas	24
Fotomicrografía de lenguas sanas	25
Fotomicrografía de COCE bien diferenciados	26
Fotomicrografía de COCE bien diferenciados	27
Fotomicrografía de COCE moderadamente diferenciados	28
Fotomicrografía de COCE moderadamente diferenciados	29
Fotomicrografía de COCE pobremente diferenciados	30
Fotomicrografía de COCE pobremente diferenciados	31

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es la neoplasia maligna más frecuente de la cavidad oral. Es invasiva y tiende a hacer metástasis de manera temprana a ganglios linfáticos. Clínicamente puede tener varias presentaciones e histológicamente se clasifica en tres categorías; bien diferenciado, moderadamente diferenciado y pobremente diferenciado. Esta diferenciación histológica se relaciona con su comportamiento biológico.

Se ha reportado que existe una correlación entre la respuesta inmune, la diferenciación histológica del tumor y el pronóstico del paciente. El sistema inmune ejerce un mecanismo de vigilancia y destrucción sobre células anormales, de esta manera cumple un papel importante en la protección contra el cáncer. Sin embargo, hay una interacción dinámica entre el sistema inmune y las células atípicas y/o neoplásicas, dicha interacción incluye fases de eliminación, equilibrio y escape. Una de las células que forman parte del sistema inmune en los epitelios de las mucosas son las células de Langerhans (CL), que pertenecen al sistema de células dendríticas (CD), y que tienen la función de endocitar, procesar y presentar antígenos de manera eficiente a los linfocitos T en los ganglios linfáticos; estas células pueden regular respuestas inmunológicas adaptativas e innatas. Las células tumorales pueden ser destruidas por linfocitos T CD8⁺, sin embargo, necesitan ser estimuladas previamente por células de Langerhans u otras CD, por tal motivo, se considera que las CL juegan un papel importante en la inmunología del cáncer en mucosas.

Hasta el momento, no existen estudios que hayan determinado el grado de activación de las CL en COCE con diferentes grados de diferenciación, lo cual constituye el principal objetivo de este proyecto.

OBJETIVO: Cuantificar y evaluar el inmunofenotipo de las CL en muestras de COCE con diferentes grados de diferenciación histopatológica, obtenidas mediante biopsias de lengua en pacientes.

MATERIAL Y MÉTODO: De los especímenes de COCE obtenidos mediante biopsias se realizaron cortes estrictamente seriados con un grosor de 4µm, se corroboró el diagnóstico y grado histopatológico mediante una tinción con hematoxilina y eosina siguiendo los criterios de la OMS, además se obtuvieron datos clínicos de los expedientes de todos los individuos a los que pertenecían los especímenes incluidos en el estudio. Se realizó inmunohistoquímica para cada uno de los siguientes marcadores: CD207, CD80, CD86, CD273, CD274, CD1a, anti moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad y anti receptor de adenosina A_{2a}. Mediante análisis visual microscópico se cuantificaron las células marcadas.

RESULTADOS: Observamos que los COCE pobremente diferenciados mostraron un mayor número de células de Langerhans marcadas con moléculas clase II del CPH, CD1a, moléculas cohibidoras tipo CD274, moléculas coestimuladoras CD 80 y CD86.

CONCLUSIONES: Es importante la correlación entre el número de células de Langerhans y su inmunofenotipo en cada uno de los grados histopatológicos del COCE, pues ello permite saber si estas células se encuentran activas y funcionales contra la neoplasia, o por el contrario, tienen un tipo tolerogénico ante las células cancerosas.

El hecho de que haya un mayor número de células de Langerhans que expresan tolerancia en el COCE pobremente diferenciado puede favorecer la evasión ante el sistema inmune y el comportamiento más agresivo de esta neoplasia maligna .

ABSTRACT

INTRODUCTION: Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common malignant neoplasia of the oral cavity. It is invasive and tends to metastasize early on to lymph nodes. Clinically it may take several presentations and histologically it is classified into three categories: well differentiated, moderately differentiated and poorly differentiated. This histological differentiation is related to its biological behavior.

It is reported that there is a correlation between the immune response, the histological differentiation of the tumor and the patient prognosis. The immune system perform a mechanism of monitoring and destruction of abnormal cells, thus playing an important role in the protection against cancer. However there is a dynamic interaction between the immune system and atypical and / or neoplastic cells, such interaction includes elimination, balance and escape phases.

One of the cells that are part of the immune system in the epithelium in mucosas are the Langerhans cells (LC), that belongs to the system of dendritic cells (DC), and that have the function to endocytose, process and present antigens efficiently to T lymphocytes in the draining lymph nodes; these cells can regulate adaptive and innate immune responses.

Tumor cells can be destroyed by CD 8+ T lymphocytes, however, need to be previously stimulated by Langerhans cells and other DCs, for that reason it is considered that the Langerhans cells play an important role in the cancer immunology of the mucosas.

So far, no studies have determined the degree of activation of LCs in OSCC for the different degrees of differentiation, and that is what constitutes is the main objective of this Project.

OBJECTIVE: To quantify and evaluate the immunophenotype of Langerhans cells in samples of oral squamous cell carcinoma (OSCC) with different degrees of histopathological differentiation, obtained through tongue biopsies in patients.

MATERIAL AND METHODS: From OSCC specimens obtained by biopsy, strictly serial section of 4µm were made. Diagnosis and histopathological grade was confirmed by hematoxylin and eosin following the WHO criteria. Further clinical data were obtained from the records of all the individuals belonging to the specimens of this study. Immunohistochemistry was performed for each of the following markers: CD207, CD80, CD86, CD273, CD274, CD1a, anti-class II molecules of the major histocompatibility complex and anti A_{2a} adenosine receptor. By microscopic analysis stained cells were quantified.

RESULTS: we observed that poorly differentiated OSCCs showed a greater number of Langerhans cells labeled with class II molecules of the MHC, CD1a, coinhibitory molecules type CD274, coestimulatory molecules CD86 and CD80.

CONCLUSIONS: there is an important correlation between the number of Langerhans cells and its immunophenotype in each OSCC histopathological grades, because it shows whether these cells are active and functional against neoplasia, or otherwise if they have a tolerogenic type against cancer cells.

The fact that there are a greater number of Langerhans cells expressing tolerance in poorly differentiated OSCC, may favor its omission from the immune system and generates a more aggressive behavior of this malignant neoplasia.

1. INTRODUCCIÓN

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es una neoplasia maligna que se origina en el epitelio de la mucosa de la cavidad oral; es el cáncer más frecuente en esta región y en general, uno de los 10 más frecuentes en seres humanos.

Se ha observado que esta neoplasia se presenta clínicamente en diversas formas y en algunas ocasiones está precedida por lesiones premalignas (leucoplasia, eritroplasia) o condiciones premalignas, cuyo diagnóstico clínico requiere de gran destreza para realizar la exploración y la observación clínica de la región bucal, aún a pesar del fácil acceso visual a las estructuras anatómicas que la conforman. Debido a las deficiencias en la técnica de exploración clínica un gran porcentaje de los casos no se diagnostican de manera temprana durante las consultas de rutina y preventivas, sino por manifestaciones de la enfermedad en etapas avanzadas. Es por esto que la detección debe ser realizada de manera precoz ya que es un factor pronóstico importante; sin embargo, se siguen reportando diagnósticos tardíos de COCE en diferentes estadios histopatológicos, lo cual afecta el pronóstico del paciente y por lo tanto su sobrevivencia. El pronóstico es pobre para esta patología en general, ya que las tasas de mortalidad, morbilidad, recurrencia y recidivas son altas.

Se han estudiado diversos factores relacionados con la generación de COCE, algunos de los cuales son inherentes a la propia neoplasia y otros se relacionan con la respuesta del organismo del individuo afectado, entre estos últimos se ha considerado la respuesta inmunológica contra la neoplasia. Se ha observado que el sistema inmune de una persona inmunocompetente participa activamente en la evolución del proceso cancerígeno, eliminando las células más inmunogénicas, lo que en un principio puede ser beneficioso, pero que a la larga, solo deja las clonas de células neoplásicas con mayor capacidad de evasión del sistema inmune, lo cual es favorable para la proliferación, establecimiento y metástasis del cáncer.

El estudio de esta neoplasia y del sistema inmune, en este caso a las células de Langerhans que se encuentran en el epitelio de la mucosa oral, mismo lugar donde se origina este cáncer y que por tanto, son de las primeras en estar en contacto con los antígenos tumorales y de iniciar una respuesta inmune en contra de ellos, podría ayudar a comprender el comportamiento biológico de esta neoplasia que está directamente relacionado con los eventos de infiltración y metástasis que ocasionan mutilaciones extensas, morbilidades graves y la muerte de un gran número de estos pacientes.

2. ANTECEDENTES

2.1 CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS (COCE)

2.1.1 DEFINICIÓN

Es una neoplasia epitelial maligna invasiva, con varios grados de diferenciación escamosa y es propensa de manera temprana a extenderse y hacer metástasis a ganglios linfáticos ^{1,2}.

2.1.2 EPIDEMIOLOGÍA

Se estima que a nivel mundial el cáncer oral tiene una prevalencia de un 2% a un 4% de todos los casos de cáncer³ y de todas las neoplasias malignas de cavidad oral y orofaringe el COCE representa más del 90%, es más frecuente en hombres que en mujeres¹. El COCE es la octava malignidad más común en el mundo, con más de 300 000 nuevos casos anualmente⁴.

2.1.3 ETIOLOGÍA

Con relación a la etiología del COCE se ha observado que los principales factores de riesgo son el hábito del tabaco y el hábito de consumir alcohol; a pesar de que estos factores de riesgo son independientes, su acción es sinérgica cuando se usan ambos^{1,3,5}. De manera similar, se ha reportado que los habituales bebedores de alcohol tienden a estar relacionados con deficiencia de nutrientes, lo cuál parece contribuir de manera independiente a la carcinogénesis oral^{5,6}. A pesar de que se ha observado el desarrollo de COCE en personas que nunca han fumado, y que estas difieren en cuanto a los mecanismos de carcinogénesis, esta malignidad se ha asociado típicamente a fumadores⁴.

Otros factores de riesgo son: la masticación de tabaco, la infección por virus del papiloma humano, con particularidad los genotipos 16 y 18¹, las enfermedades que cursan con inmunodeficiencias, las avitaminosis A, E y C y una capacidad deteriorada para reparar el ADN³; así como radiación solar, particularmente para el COCE en el bermellón de los labios⁷.

La reducción de estos factores de riesgo se ha utilizado como la herramienta más eficaz en un intento por disminuir la morbilidad y la mortalidad de COCE⁸. Cogliano VJ, et al. en el 2011 realizaron una revisión de la IARC (siglas en inglés de: Agencia internacional para la investigación del cáncer de la Organización mundial de la salud-OMS-) sobre carcinógenos para humanos y determinaron una lista de agentes físicos, químicos y biológicos, es de notar que en los últimos años se ha ido incrementando, lo cual evidencia que para todas las neoplasias los factores etiológicos pueden ser diversos y no todos conocidos, y este cáncer no es la excepción⁷.

2.1.4 ASPECTOS CLÍNICOS

El COCE puede tener varias presentaciones clínicas: exofítica (verruciforme, papilar o fungiforme), endofítica (invasiva, excavada o ulcerada), placa blanca (leucoplasia), placa roja (eritroplasia), placa roja con blanco (eritroleucoplasia o leucoeritroplasia)²(Fotos 1,2 ,3, 4, 5, 6).

Las lesiones pequeñas del COCE son asintomáticas o con síntomas vagos, en lesiones más avanzadas puede presentarse dolor, mal olor de boca, dificultad para hablar, abrir la boca y masticar, sangrado, linfadenopatías cervicales y pérdida de peso, entre otros, dependiendo de la localización anatómica en la cavidad bucal de la lesión¹. Los datos clínicos iniciales del COCE más frecuentes son una úlcera indolora que no cicatriza o la presencia de dolor en una región de la boca en ausencia de lesiones. Es de notar que el 50% de las personas interpreta sus síntomas como algo de menor importancia y no son conscientes del COCE⁸. De igual forma, el diagnóstico clínico que con mayor frecuencia se establece de manera errónea es el de infección micótica.

Esta neoplasia es más frecuente en hombres que en mujeres, aunque la incidencia en mujeres está aumentando en los últimos años. La edad de aparición suele ser de 50 a 70 años. La observación en pacientes menores de 30 años es excepcional^{9,10}. Sin embargo, recientemente se ha reportado un incremento en el número de personas no fumadoras y a edades más tempranas que desarrollan COCE, y que presentan mecanismos carcinogénicos diferentes (factores ambientales, biológicos y/o hereditarios) a los de las neoplasias malignas asociadas a fumadores y bebedores⁴.

Durr ML, et al observaron que la localización más común para el COCE en pacientes no fumadores fue lengua, lo que no difiere con los pacientes fumadores, tampoco hay diferencia en estos dos grupos en cuanto a la edad al momento del diagnóstico y esto a pesar de diferir en los dos grupos los agentes etiológicos y el proceso de carcinogénesis⁴.

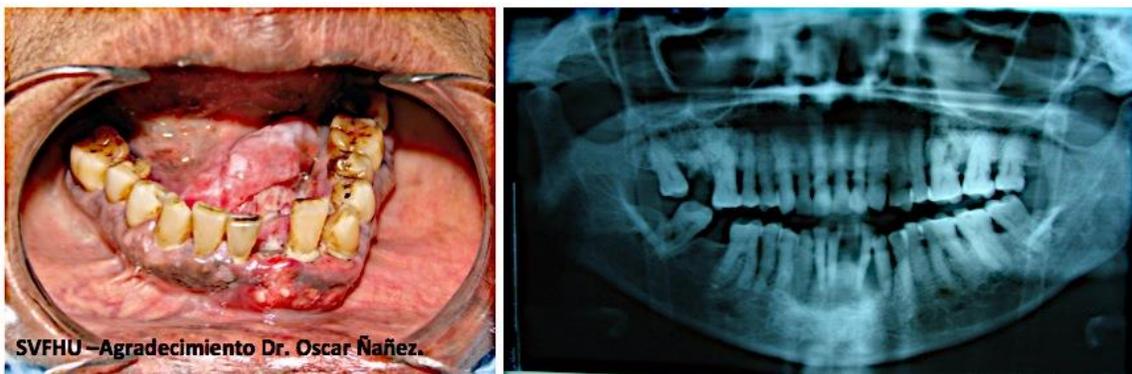


Foto 1. Paciente con COCE en mandíbula. Clínicamente se observa lesión nodular de bordes bien definidos e irregulares, color rojo y zonas blancas, superficie lisa, que compromete encía por vestibular y lingual desde 45 hasta 36 y piso de boca. En la radiografía panorámica se observa lesión radiolúcida de bordes mal definidos en región anteroinferior.

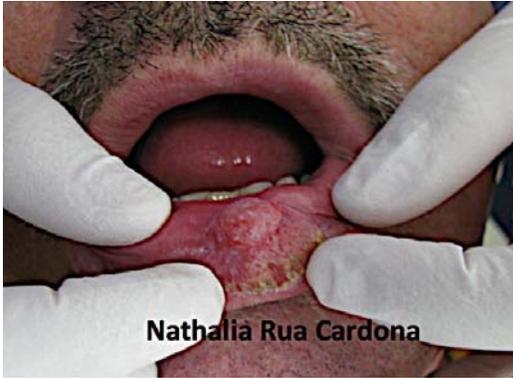


Foto 2 y 3. Pacientes masculinos. 2. Se observa lesión nodular en bermellón de labio inferior, de bordes bien definidos e irregulares con zonas de color rojo y áreas blancas, superficie irregular y costras amarillentas, firme a la palpación, antecedente de hábito de cigarrillo. 3. Placa blanca en reborde alveolar inferior del lado derecho, de bordes bien definidos, irregulares y sangrantes, superficie irregular y con zonas que tienen prolongaciones papilomatosas, antecedente de leucemia.

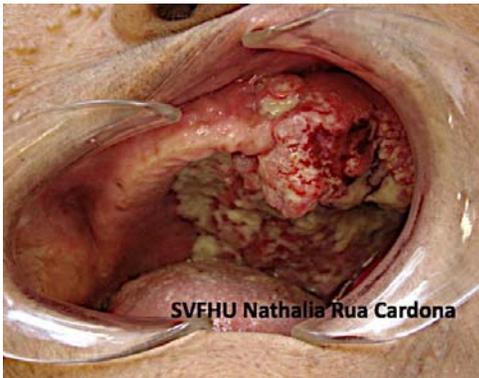


Foto 4 y 5. Pacientes femeninos. 4. Se observa tumoración en encía, paladar duro y blando, ulcerado, color rojo y blanco amarillento, bordes bien definidos e irregulares. 5. Lesión nodular en vientre de lengua, superficie lobular, base sésil y color rojiza y blanca.



Foto 6 y 7. Tumores ubicados en dorso, bordes y vientre de lengua, de color rosa, rojo y blanco amarillento, bordes mal definidos, con úlceras de bordes elevados.

2.1.5 ESTADIFICACIÓN CLÍNICA

Clínicamente todos los tumores se estadifican de acuerdo con la clasificación TNM (tumor – ganglios – metástasis). La clasificación toma en cuenta si es un tumor primario o no, la invasividad, si están involucrados ganglios linfáticos regionales y si hay metástasis o no. Así, el TNM para los carcinomas en cavidad oral es como sigue:

CLASIFICACIÓN TNM DE LOS CARCINOMAS DE LABIO Y CAVIDAD ORAL (OMS - 2005)	
T	TUMOR PRIMARIO
TX	El tumor primario no puede ser evaluado
T0	No hay evidencia del tumor primario
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor de 2 cm o menos en su dimensión mayor
T2	Tumor de más de 2 cm pero no más de 4 cm en su dimensión mayor
T3	Tumor de más de 4 cm en su dimensión mayor
T4a	(Labio) Tumor que invade a través de hueso cortical, nervio alveolar inferior, piso de boca (mentón y nariz)
T4a	(Cavidad oral) El tumor invade a través hueso cortical, dentro de músculo extrínseco/ profundo o lengua (geniogloso, hipogloso, palatogloso y estilogloso), seno maxilar, piel de la cara.
T4b	(Labio y cavidad oral) El tumor invade espacio masticatorio, platos pterigoideos, base de cráneo; o envolviendo la arteria carótida interna
	Nota: La erosión superficial sola del hueso / o una cavidad primaria del diente por gingival no es suficiente para clasificar un tumor como T4.
N	GANGLIO LINFÁTICOS REGIONALES
Nx	Ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados
N0	No hay metástasis a ganglios linfáticos regionales
N1	Metástasis a un solo ganglio linfático ipsilateral, 3 cm o menos en su mayor dimensión
N2	Metástasis como se especifica en N2a, 2b, 2c a continuación
N2a	Metástasis in un solo ganglio linfático ipsilateral, más de 3 cm pero no más de 6 cm en la mayor dimensión
N2b	Metástasis en múltiples ganglios linfáticos ipsolaterales, ninguno de más de 6 cm en su mayor dimensión
N2c	Metástasis en ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales, ninguno de más de 6 cm en su dimensión mayor.
N3	Metástasis en ganglios linfáticos de más de 6 cm en su mayor dimensión.
	Nota: Ganglios linfáticos ubicados a un solo lado de la línea media se consideran ipsolaterales
M	METÁSTASIS DISTANTES
Mx	Metástasis distantes no pueden ser evaluadas
M0	Sin metástasis distantes
M1	Metástasis distantes
ETAPAS AGRUPADAS	
Etapa 0	Tis N0 M0
Etapa I	T1 N0 M0
Etapa II	T2 N0 M0
Etapa III	T1, T2 N1 M0 T3 N0, N1 M0
Etapa IVA	T1, T2, T3 N2 M0

	T4a N0, N1, N2 M0
Etapa IVB	Cualquier T N3 M0 T4b cualquier N M0
Etapa IVC	Cualquier T cualquier N M1
	Los ganglios linfáticos regionales son los ganglios cervicales

El sistema TNM se ha utilizado como un estándar internacional para ayudar a establecer protocolos terapéuticos para los tumores malignos y estimar la supervivencia del paciente, sin embargo, este sistema no siempre es capaz de determinar el resultado clínico en pacientes con COCE. Es un hecho que ha animado a diseñar estudios para identificar los factores que puedan complementar el sistema TNM para determinar el pronóstico de los pacientes con estos tumores. Dentro de este contexto, la clasificación histopatológica ha sido de importancia histórica^{11,12}.

2.1.6 ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS

Los cambios observables en el microscopio hacia malignidad son reflejo de la atipia celular y consiguientemente al cambio en la arquitectura del epitelio; estas alteraciones son referidas como displasia y las características son: pérdida de la polaridad de las células basales, presencia de más de una capa de células de aspecto basaloide, estratificación celular irregular, pérdida de la relación núcleo – citoplasma, aumento del número de mitosis en los diferentes estratos, pleomorfismo celular, hiper cromatismo nuclear, agrandamiento nuclear, queratinización de células individuales o en grupos y reducción de la cohesión celular. Es raro que estas características se presenten todas en la misma lesión; por ello, el patólogo de acuerdo a la severidad, espesor y extensión de las alteraciones clasificará la displasia epitelial como leve, moderada o severa¹³. Cuando los cambios son marcados y es mayor la afectación, el diagnóstico cambia por: Carcinoma in situ (neoplasia intraepitelial): se define así, cuando los cambios atípicos son severos y de gran espesor en el epitelio, dejando la membrana basal intacta¹³. Carcinoma microinvasor: casos de invasión temprana focal en lámina propia. Estos tumores todavía tienen un mayor componente intraepitelial, asociado a nidos de células malignas debajo de la membrana basal¹³. Carcinoma Invasor: se caracteriza porque las células neoplásicas atraviesan la membrana basal e invaden el estroma subyacente, donde pueden penetrar vasos linfáticos y sanguíneos, para causar más tarde metástasis a distancia¹³.

Las clasificaciones histopatológicas para el COCE han sido desarrolladas en un intento de explicar las discrepancias biológicas de los tumores que aparentemente tienen características clínicas similares¹². En general, el grado histopatológico del tumor se ha relacionado con el comportamiento biológico del tumor (es decir, con todos aquellos fenómenos celulares, moleculares y tisulares que durante la evolución natural de una neoplasia determinan diferenciación histológica, ritmo de crecimiento, capacidad de invadir, de infiltrar y de hacer metástasis, lo cual conlleva a repercusiones directas sobre el aspecto clínico y el pronóstico de vida del individuo afectado).

En la actualidad una de las clasificaciones más usadas para el carcinoma escamocelular es la de la OMS, que lo clasifica en tres categorías: bien diferenciado si se parece al tejido original, crece a un ritmo más lento y produce metástasis tardías. En contraste, un tumor poco diferenciado posee pleomorfismo celular y nuclear, con una pequeña o nada de producción de queratina, lo que dificulta la identificación del tejido de origen; este tipo de tumores crece rápidamente y metastatizan tempranamente. Un tumor con características histopatológicas intermedias, entre los dos tumores, es designado como moderadamente diferenciado^{1,2}. Existen otros sistemas de clasificación histopatológicas para esta entidad patológica, por ejemplo el sistema de calificaciones multiparámetro de Anneroth et al, y la clasificación de márgenes de invasión profunda de Bryne et al; ambos evalúan las características asociadas a las poblaciones de células tumorales (grado de queratinización, polimorfismo nuclear, número de mitosis) y la relación tumor-huésped (patrón de invasión, la etapa de la invasión e infiltrado linfoplasmocítico)^{12,14}.

2.1.7 TRATAMIENTO

El tratamiento del COCE depende del estadio del sistema TNM en el que se encuentra. En estadios primarios (I y II) el tratamiento es quirúrgico o quirúrgico más radioterapia y en estadios más avanzados (III y IV) se trata con una combinación de cirugía, radioterapia y quimioterapia paliativa^{3,15}. Como la mayoría de los casos se diagnostican en etapas avanzadas; el tratamiento tiene como consecuencia deterioro de la calidad de vida^{5,16}, ya que es necesario realizar mutilaciones amplias buscando obtener márgenes quirúrgicos de seguridad libres de infiltraciones neoplásicas. Además, en los estadios avanzados las tasas de supervivencia a 5 años son bajas^{17,18}.

2.2 EL SISTEMA INMUNE EN EL CÁNCER

Una de las funciones del sistema inmune es ejercer un mecanismo de vigilancia y destrucción de células anormales. Por lo tanto, un defecto inmunológico puede permitir que alguna de estas células escape a su control y dé origen a la formación de una neoplasia^{19,20}. El sistema inmune cumple de esta manera un papel importante en la protección contra el cáncer. La inmunovigilancia que este sistema ejerce sobre células precursoras de cáncer es fundamental para destruirlas; sin embargo, un concepto introducido recientemente de inmuoedición del cáncer señala que hay una interacción dinámica entre el sistema inmune y las células displásicas y/o células tumorales²¹. La teoría de la inmuoedición del cáncer, presentada por Schreiber y sus colegas, integra los diferentes mecanismos de escape del tumor al sistema inmune, expuestos en la teoría de inmunovigilancia concebida originalmente a principios del siglo XX por Paul Ehrlich y postulada en la mitad del siglo XX por Sir Marcfarlane Burnet y Lewis Thomas²².

La teoría de la inmuoedición del cáncer sostiene que el sistema inmune no sólo protege el hospedero contra el desarrollo de tumores, sino que también puede promover el crecimiento del tumor mediante la selección de las diferentes clonas celulares que forman parte del tumor, dejando sólo aquellas células que presentan

baja inmunogenicidad y que por lo tanto, les permite escapar de la respuesta inmune^{22, 23}. De acuerdo con esta teoría, el proceso de inmunoección del cáncer tiene tres fases: la primera fase, la de eliminación, esencialmente se refiere a la inmunovigilancia del cáncer, en el que las células del sistema inmune innato y adaptativo reconocen y destruyen células tumorales, protegiendo así el anfitrión contra el cáncer; durante esta fase hay signos de inflamación. La segunda fase, la de equilibrio, es un periodo prolongado en el cual las variantes de células tumorales que han sobrevivido y el sistema inmune entran en un equilibrio dinámico. En la tercera fase, la de escape, persisten y proliferan variantes de células tumorales que han adquirido insensibilidad inmunogénica a la detección y/o eliminación por cambios genéticos y epigenéticos, como resultado del proceso de selección inmune, inducido en las anteriores fases; estas células cancerígenas son capaces de desarrollar tumores clínicamente aparentes que crecen descontroladamente en hospederos inmunocompetentes^{24,25}.

Es por esto que, pese a que en una persona inmunocompetente el sistema inmune puede cumplir con su funciones, cuando hay una neoplasia maligna en desarrollo, estas células neoplásicas a la larga y por medio de la interacción con este sistema, logran generar mecanismos de evasión que les permiten sobrevivir, multiplicarse y progresar. Los principales mecanismos de evasión son: a) escasa inmunogenicidad de los antígenos tumorales, b) un crecimiento tumoral que supere la velocidad de la respuesta inmune, c) el enmascaramiento de los antígenos clase I del complejo principal de histocompatibilidad (CPH), d) una expresión defectuosa de antígenos en la superficie de las células tumorales, e) una pérdida de la expresión de moléculas estimuladoras por las células tumorales, f) la producción de moléculas inmunosupresoras tales como el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), la prostaglandina E₂ (PGE₂) y la adenosina¹⁹, o de citocinas como la interleucina (IL) -6 e IL-10, g) la resistencia a la apoptosis por las células tumorales, h) la expresión del ligando de Fas (FasL), lo que conduce a la muerte apoptótica de los linfocitos²⁰, k) reclutamiento de células inflamatorias altamente inmunosupresoras tales como las células T reguladoras (Tregs) y células supresoras de origen mieloide (MDSCs)²⁶.

El sistema inmune por tanto, juega un papel importante en la formación, establecimiento y progresión de las neoplasias. Dentro del sistema inmune un grupo celular que participa activamente en este proceso son las células dendríticas.

2.3 LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las células dendríticas (CD) son células presentadoras de antígenos y comprenden una variedad de subpoblaciones distribuidas en todo el organismo ejerciendo una función de inmunovigilancia contra antígenos endógenos y exógenos. Es importante destacar que estas células pueden regular respuestas inmunológicas adaptativas e innatas. Debido al potencial que las CD poseen para provocar respuestas de células T específicas contra tumores, es generalmente aceptado que las CD tienen un papel clave contra el cáncer mediante su vigilancia inmune²⁷.

Los progenitores de las CD se localizan en la médula ósea y dan lugar a los precursores circulantes que se ubican en los diferentes tejidos y órganos, donde residen como células inmaduras con alta capacidad endocítica^{28, 29}.

Después de que se produce algún daño tisular, las CD inmaduras capturan los antígenos (Ag) y posteriormente, migran a los órganos linfoides, donde los presentan a células T antígeno - específicas, iniciando de este modo una respuesta inmunológica. Las CD presentan Ags a células T ayudadoras CD4+ o CD8+, a través de moléculas clase I y II del CPH y la coestimulación con moléculas CD80, CD86 y CD40^{28, 30}. La coestimulación se puede definir como un estímulo necesario para la activación óptima de las células T³¹.

Las CDs inmaduras son muy eficientes en la captura de Ag y lo realizan mediante a) macropinocitosis, b) endocitosis mediada por receptor a través de lectinas tipo C tipo II tales como CD207 y CD205 o mediante receptores Fc I (CD64) y II (CD32); y c) la fagocitosis de partículas apoptóticas, necróticas y fragmentos celulares²⁸.

Varias moléculas, incluyendo el CD40, el TNF-R, y el IL-1R han mostrado que activan CD y que inducen su transición de células inmaduras que capturan Ags a CD maduras presentadoras de Ags. La maduración de CDs es un proceso continuo iniciado por la endocitosis del Ag y por citocinas inflamatorias, y posteriormente completado por la interacción de las CD con los linfocitos T. Hay numerosos factores que inducen y / o regulan la maduración de DC, incluyendo: a) moléculas relacionadas con patógenos, ADN bacteriano, y ARN de doble cadena, b) el equilibrio entre señales proinflamatorias y antiinflamatorias del microambiente local que incluyen a TNF α , IL-1, IL-6, IL-10, TGF β y las prostaglandinas y c) señales derivadas de las células T. El proceso de maduración está asociado a varios eventos coordinados, tales como a) la disminución de endocitosis por la pérdida de receptores como CD207 y CD205; b) la regulación positiva de moléculas coestimuladoras CD40, CD58, CD80 y CD86; c) cambio en la morfología, d) cambio en compartimentos lisosomales con la regulación a la baja de CD68 y la regulación al alza de la proteína de membrana asociada a lisosoma de CD (DC-LAMP) y e) una gran expresión de moléculas clase II del CPH. Los cambios morfológicos que acompañan a la maduración de las CD incluyen una disminución de la expresión de E-cadherina, la reorganización del citoesqueleto, y la adquisición de alta movilidad celular²⁸.

2.4 LAS CÉLULAS DE LANGERHANS

2.4.1 DEFINICIÓN

Las células de Langerhans son un subpoblación de CD responsables de la inmunovigilancia en la piel y las mucosas^{32,33}.

En la epidermis están localizadas suprabasalmente y constituyen del 2 % al 8% del total de células epiteliales³⁴; en la actualidad se sabe que estas células derivan de un precursor originado en la médula ósea^{20,35}. Estas células contienen unos gránulos

únicos conocidos como gránulos de Birbeck³³ que es un orgánulo único de las CL y que tiene la forma de una raqueta de tenis. Durante muchos años, no se conoció la función de este orgánulo, hasta que Jenny Valladeaum y Sem Saeland identificaron la molécula Langerina/CD207 (un receptor de lectina tipo C, tipo II) como uno de los inductores de su formación, lo cual se relaciona con una función de captación de antígenos. Sin embargo, más recientemente, otro estudio realizado por el grupo de Daniel Hanau, sugiere que los gránulos de Birbeck son parte de una red de reciclaje endosomal y pueden no estar involucrados en la endocitosis³⁶.

2.4.2 FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS DE LANGERHANS

Las células de Langerhans endocitan, procesan y transportan antígenos a los ganglios linfáticos donde presentan antígenos a los linfocitos T. El paradigma de las CL ha cambiado y ahora se reconoce que las CL son capaces de inducir respuestas inmunológicas activadoras o de tolerancia, así como sólo transportar antígenos a los ganglios linfáticos sin presentarlos^{20,32}. Se considera que estas células de juegan un papel importante en la inmunología del cáncer, ejerciendo inmunovigilancia contra neoantígenos. Las células tumorales pueden ser destruidas por linfocitos T CD 8⁺. Sin embargo, las células T necesitan ser estimuladas por las células de Langerhans³². Dentro de las moléculas que se usan como marcadores inmunohistoquímicos de CL, se ha visto que se caracterizan por la expresión de CD1a y Langerina (CD207)³³; otra proteína que expresan las CL es la molécula S100²⁰.

2.4.3 FENOTIPO EN HUMANOS

Es de notar que la piel contiene diferentes subpoblaciones de células dendríticas: 1) células de Langerhans, localizadas en el epidermis con un fenotipo CD207+, CD1a+ y CD103+; 2) CD dérmicas mieloides con un fenotipo CD207+, CD103+, y 3) CD plasmocitoides con un fenotipo CD207+, CD103-. En la mucosa oral no se ha observado con precisión a estas subpoblaciones, pero se sabe con certeza que las CL son CD1a+ y CD207+, además de estar confinadas al epitelio³⁷.

2.4.4 CÉLULAS DE LANGERHANS EN LA MUCOSA ORAL:

En los estudios que se han hecho sobre las células de Langerhans en la mucosa oral normal se ha observado que el número de estas pueden variar; Cruchley A.T et al encontraron que la densidad de CL positivas a CD1a en la mucosa bucal sana de humanos variaba de una localización anatómica a otra, siendo mayor en la mucosa bucal y en segundo lugar en labios y este comportamiento fue similar en hombres y en mujeres³⁸.

En otros estudios, se ha observado que la mucosa sin estrato córneo de la boca tienen más CL que zonas que tienen una mucosa con estrato córneo^{39,40}. Por lo anterior, al analizar en cavidad oral CL es importante tener cuenta que la localización y por ende, si hay presencia o no de queratina en la mucosa, puede variar el número normal de estas células en mucosas sanas, y que por lo tanto, las comparaciones con patologías

se deben hacerse teniendo en cuenta los criterios anteriormente mencionados.

2.4.5 MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS DE LAS CÉLULAS DE LANGERHANS

2.4.5.1 CD1a:

Los CD1 son moléculas que presentan antígenos de tipo lipídico tales como glucolípidos y lipopéptidos, de modo que sean reconocidos por las células T. Las moléculas CD1 son una familia con 5 miembros (CD1a-e) que se localizan en un subcompartimento distintos a los endosomas. Las moléculas CD1 son funcionalmente no polimórficas y se ha demostrado que pueden presentar tanto antígenos exógenos microbianos como ligandos endógenos lipídicos. Por otro lado, de manera similar a moléculas clase I del CPH, las moléculas CD1 se asocian covalentemente con la β 2-microglobulina⁴¹. La isoforma CD1a se expresa casi exclusivamente en APC profesionales, incluyendo las células de Langerhans (CL) y otras células dendríticas mieloides (CDm)⁴¹; se considera por lo tanto, que CD1a es fiable para la identificación de las CL en epitelios humanos, por la alta densidad de expresión tanto en superficie como en citoplasma⁴⁰. CD1a es distinta a las otras isoformas de CD1, ya que no contiene un motivo citoplasmático basado en tirosina⁴¹.

2.4.5.2 Langerina (CD 207):

Es una lectina tipo C tipo II dependiente de Ca^{2+} que presenta especificidad de unión a manosa y que se expresa en células de Langerhans en estado inmaduro en la epidermis y otros epitelios⁴². La Langerina es un potente inductor de la superimposición y cierre de la membrana que lleva a la formación de los gránulos de Birbeck proveyendo acceso a la vía de presentación de antígenos no clásica⁴³, siendo el principal constituyente de los gránulos de Birbeck³³.

2.4.5.3 Moléculas clase II del CPH:

Las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (CPH-II) permiten al sistema inmune detectar la presencia de antígenos exógenos en el espacio extracelular. En humanos, el locus MHC-II codifica para una subunidad α y las proteínas de la subunidad β . Ya que los genes que codifican para los HLA son altamente polimórficos pueden generar más de 4,000 combinaciones de subunidades⁴⁴. Las moléculas HLA-II, a diferencia de las HLA I, se expresan solamente de manera constitutiva en células de Langerhans, células dendríticas, macrófagos y linfocitos B¹⁹. Los antígenos exógenos entran por vía endocítica a las células presentadoras de antígenos, los procesan y son presentados por las moléculas clase II del CPH a las células T ayudadoras, los cuales, cuando se activan, tienen efectos inmunoregulatorios⁴⁵. Cuando una CL se activa expresa una mayor cantidad de estos antígenos.

2.4.5.3 CD 80:

Es la molécula B7 – 1, cuyo principal ligando es CD28^{46,31}, estimula la respuesta de las células T⁴⁷.

2.4.5.4 CD 86:

Es la molécula B7 – 2, cuyo principal ligando es CD28^{46,31}, estimula la respuesta de las células T⁴⁷.

2.4.5.5 CD 273:

Es el ligando 2 de muerte celular programada (PD – L2)(B7 – DC), cuyo principal ligando es CD279⁴⁶. PD – L2 se expresa exclusivamente en células dendríticas y monocitos. Participa en la vía de señalización de PD -1, que es esencial para el mantenimiento de la anergia de células T y previenen la autoinmunidad⁴⁷.

2.4.5.6 CD 274:

Es el ligando 1 de muerte celular programada (PD – L1)(B7 – H1), cuyo principal ligando es CD279⁴⁶. Se encuentra ampliamente distribuidos en los leucocitos y las células no hematopoyéticas, en los tejidos linfoides y no linfoides, incluyendo los islotes pancreáticos⁴⁷.

2.5 Marcador de microambiente en carcinomas: receptor de adenosina A_{2a}

La adenosina es un nucleósido de purina, que se produce bajo estrés metabólico como en la hipoxia. Las condiciones inflamatorias agudas o crónicas conducen a la liberación del precursor de los nucleótidos de adenina (adenosina trifosfato (ATP), difosfato adenosina (ADP) y monofosfato de adenosina (AMP) de las células, que se cataboliza extracelularmente en adenosina⁴⁸. Ante condiciones de estrés metabólico y en ausencia de activación de TLR, la adenosina actúa como un factor quimiotáctico para promover la quimiotaxis de los iCDs humanos a través de los receptores A1 y A3. Esto conduce a un aumento en la concentración de calcio intracelular y la reorganización de la actina. Sin embargo, en CD maduras, la adenosina suprime fuertemente la inducción de TLR por medio de IL-12, a través de la unión a los receptores A2A y suprime la respuesta inmune antitumoral. Este efecto inhibitor en la liberación de IL-12 por la adenosina, promueve el crecimiento tumoral; la IL-12 es una citocina antitumoral potente⁴⁸.

Por otro lado, se sabe que la adenosina es secretada por los carcinomas, así como por las células inmunes durante la patogénesis del tumor, al estar bajo estrés metabólico o hipóxico. Una vez que la adenosina se libera en el medio extracelular, ejerce varios efectos inmunomodulatorios a través de receptores de adenosina (A1, A2A, A2B y A3) que expresa en diversas células inmunes (macrófagos, células supresoras de origen

mieloide, natural killer, células dendríticas (CD), células T, células T reguladoras), que desempeñan un papel muy importante en la patogénesis del cáncer⁴⁸. En las células que actúan contra el cáncer (macrófagos, natural killer, CD, células T) para que no ejerzan su función, y en las otras (células mieloides supresoras, células dendríticas, células T reguladoras), para formar un microambiente de tolerancia e inmunosupresión en el tumor.

2.6 REPORTES EN LA LITERATURA DE CÉLULAS DE LANGERHANS EN COCE

Existen en la literatura reportes de estudios de CL en COCE, uno de ellos es el de Öhman J et al (2012) quienes estudiaron la presencia y distribución de células de Langerhans y de linfocitos T por medio de inmunohistoquímica con los marcadores CD1a, CD207, CD3, CD4, CD8 y Ki67 en lesiones de leucoplasia oral con una n = 23 y en carcinoma oral de células escamosas con una n = 12 de biopsias tomadas de diferentes localizaciones anatómicas, contaron las células marcadas tanto en epitelio como en tejido conectivo, y reportaron que las CL marcadas con anticuerpo anti CD1a+ no presentaban diferencia significativa entre las leucoplasias y los COCE en el epitelio pero si tenían diferencia significativa las células marcadas en el tejido conectivo; mientras que las células marcadas con anticuerpo anti langerina no presentaban diferencia significativa entre las leucoplasias y los COCE²¹.

Otro estudio es el de Lasisi TJ et al (2013), quienes compararon la distribución de CL en COCE con una n=48 y en epitelio oral normal con una n= 30, por medio de inmunohistoquímica con el marcador CD1a. Las biopsias fueron obtenidas de diferentes localizaciones anatómicas y los especímenes de mucosa normal fueron tomados de necropsias; los COCE los clasificaron histológicamente en alto y bajo grado de malignidad. Reportan que hay diferencia significativa entre las CL de epitelio oral normal y los COCE siendo más alto el número de células en los COCE bien diferenciados que en los pobremente diferenciados⁴⁹. Se debe tener en cuenta dos aspectos importantes en su metodología, la primera es que ellos equiparan grado de malignidad a grado de diferenciación histológica. de esta manera bajo grado de malignidad con pobremente diferenciados y alto grado de malignidad con bien diferenciados, la segunda es que no determinan si contaron células positivas del parénquima y del estroma del tumor o sólo de una de estas localizaciones.

Con respecto al grado de diferenciación tumoral y el número de CL, se ha reportado que existe una correlación directa entre la diferenciación tumoral y la cantidad de CL. Arany et al (1998) estudiaron COCE de diferentes localizaciones anatómicas con un n= 10, por medio de aislamiento de ARN y PCR – TR semicuantitativo y marcándolas con CD1a. Reportan que en COCE moderadamente diferenciados y bien diferenciados el número de CL es cercano al de mucosa normal, mientras que en los COCE poco diferenciados el número está disminuido⁵⁰. Sin embargo, en los resultados de este estudio no aparecen correlacionados de manera directa los tres grados de diferenciación del COCE con el número de CL. Por otro lado, tampoco se ha analizado la funcionalidad de las CL de acuerdo a la diferenciación del COCE.

3. JUSTIFICACIÓN

Existen reportes en la literatura del número de CL en COCE sin embargo, estos no incluyen en el análisis la diferenciación histológica de estas neoplasias malignas ni la funcionalidad de las CL.

Esta investigación busca cuantificar y evaluar el inmunofenotipo de las células de Langerhans en los tres grados de histodiferenciación del COCE. Para lo cuál se usara marcadores de inmunohistoquímica en cuatro grupos de especímenes de lenguas en humanos; un grupo control sano y tres grupos de casos con COCE.

Es importante conocer la capacidad funcional de las CL con relación al grado de diferenciación del COCE porque ayuda a conocer aspectos de los mecanismos de la evasión inmunológica de esta neoplasia.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

El surgimiento, la invasión y la metástasis del COCE depende de varios factores, algunos son propios del tumor como la habilidad de las células neoplásicas para desarrollar mecanismos de escape ante el sistema inmunológico y otros son propios del individuo como la capacidad del sistema inmunológico de reaccionar contra las células neoplásicas. Las CL representan la primera línea de defensa de la mucosa bucal ante la presencia de antígenos generados por células neoplásicas; sin embargo, no se ha explorado la capacidad funcional de las CL con relación al grado de diferenciación del COCE. ¿Existirá variación en número y en inmunofenotipo de las CL en los diferentes grados histopatológicos de COCE?

5. HIPOTESIS DE INVESTIGACIÓN:

Al analizar tejidos de lenguas sanas y de COCE en sus diferentes grados de histodiferenciación, por medio de marcadores de inmunohistoquímica, en el COCE pobremente diferenciado el número de CL será menor y el fenotipo inmunológico será tolerogénico.

6. OBJETIVOS:

6.1 OBJETIVO GENERAL: Cuantificar y analizar el inmunofenotipo de células de Langerhans (CL) presentes en muestras de Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE) con diferentes grados de diferenciación histopatológica, obtenidas mediante biopsias de lengua en humanos.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

6.2.1 Analizar el fenotipo inmunológico, de activación o de tolerancia, de las CL en COCE con distintos grados de diferenciación histopatológica, mediante inmunohistoquímica.

6.2.2 Cuantificar el número de CL presentes en COCE con diferentes grados de diferenciación histopatológica, mediante análisis microscópico.

7. METODOLOGÍA

7.1 TIPO DE ESTUDIO:

Estudio de casos y controles, observacional y transversal.

7.2 UNIVERSO DEL ESTUDIO:

Especímenes de biopsias de COCE obtenidas de lenguas de humanos y especímenes de lengua sana obtenidas de necropsias en instituciones de salud de México D.F (México).

7.3 MUESTRA:

La muestra se calculó con base en la formula para estudios de casos y controles⁵¹.

$$n = \frac{[Z\alpha \cdot \sqrt{\hat{p}\hat{q}} + Z\beta \cdot \sqrt{p_1 q_1 + p_0 q_0}]^2}{(p_1 - p_0)^2}$$

n: muestra $n = 54.6 \Rightarrow 55$

Donde:

Po: 0.3 Exposición a Tabaco y alcohol. Frecuencia relativa esperada (o proporción esperada) de la exposición de interés en los controles.

R: 3 Riesgo (consumo mínimo), razón de momios esperada de la asociación.

α : 1.96 (error α 0.05) Probabilidad de error tipo alfa de 5%. Alfa es la probabilidad de rechazar la hipótesis verdadera. Esta debe ser menor.

β : 0.20 (error β 0.20) Probabilidad de error tipo beta de 20%. Beta es la probabilidad de aceptar la hipótesis nula negativa. Esta debe ser menor.

p_1 : 0.5625 es $p_0 R \div [1 + p_0 (R-1)]$.

\hat{p} : 0.43125 es $1/2 (p_1 + p_0)$

\hat{q} : 0.56875 es $1 - \hat{p}$

q_1 : 0.4375 es $1 - p_1$

q_0 : 0.7 es $1 - p_0$

Análisis de poder de dos colas

Resultado numérico

Hipótesis Nula: $P_1 = P_2$ Hipótesis Alternativa: $P_1 <> P_2$

P_1 es el valor de ambas proporciones bajo la hipótesis nula.

P_2 es la proporción en dos grupos bajo la hipótesis alternativa.

Resumen de Afirmación:

El tamaño de la muestra es de 55, para detectar la diferencia entre la hipótesis nula y la hipótesis alternativa se usa una prueba chi cuadrada de dos colas con un nivel de significancia de 1.96

7.4 CRITERIOS PARA EL ESTUDIO

7.4.1 GRUPO DE ESTUDIO

7.4.1.1 Criterios de inclusión:

- a. Especímenes de biopsias con diagnostico histopatológico confirmado de carcinoma oral de células escamosas (COCE) tomadas de lengua de humanos.
- b. Acceso a los expedientes clínicos de los pacientes de los cuales se tomaron las biopsias de lengua con diagnostico histopatológico de COCE.

7.4.1.2 Criterios de exclusión:

- a. Especímenes de biopsias sin diagnostico histopatológico de Carcinoma oral de células escamosas (COCE).
- b. Biopsias que no hayan sido tomadas de lengua de pacientes con COCE.
- c. Expedientes clínicos a los cuáles no se tenga acceso correspondiente a los pacientes de los cuales se tomaron las biopsias de lengua con diagnostico histopatológico de COCE.

7.4.1.3 Criterios de eliminación:

- a. Bloques de biopsias de COCE de lengua con tejido insuficiente.

7.4.2 GRUPO CONTROL

7.4.2.1 Criterios de inclusión:

- a. Especímenes de lengua de humanos sin patologías neoplásicas ni inflamatorias.
- b. Acceso a los expedientes clínicos de los pacientes a los cuales se les tomo el tejido de lengua de humanos durante las necropsias.
- c. Especímenes provenientes de adultos.

7.4.2.2 Criterios de exclusión:

- a. Especímenes de lengua de humanos con diagnostico histopatológico de alguna patología bucal.
- b. Especímenes que no hayan sido tomadas de lenguas humanas.

c. Expedientes clínicos a los cuáles no se tenga acceso correspondiente a los pacientes de los cuales se tomaron el tejido de lengua.

7.4.2.3 Criterios de eliminación:

a. Bloques con tejido insuficiente de lengua.

7.5 MATERIALES Y METODOLOGÍA GENERAL:

De los especímenes de lenguas sanas obtenidas de necropsias realizadas de las 2 – 8h postmortem (Hospital INER, n=12), y de COCE obtenidos de los archivos de instituciones médico – odontológicas (Consultorio del Dr. Adalberto Mosqueda Taylor, n= 32; Hospital General de México n=10) que habían sido tomadas previamente para diagnóstico de pacientes mediante biopsias, fijadas en formol al 10% e incluidas en parafina; se realizaron 10 cortes estrictamente seriados a 4µm de grosor para cada uno de los especímenes de las biopsias. Y se obtuvieron algunos datos clínicos de los expedientes de los individuos a los que pertenecían los especímenes incluidos en el estudio

Todas las muestras del grupo control y del grupo de estudio fueron procesadas, los primeros cortes de la serie de cada paciente fueron teñidas con hematoxilina/eosina para realizar análisis histopatológico, corroborando la ausencia de procesos patológicos en las lenguas sanas y en las lenguas con COCE para corroborar el diagnóstico y hacer la clasificación de diferenciación según los criterios de la OMS.

El análisis fue realizado por dos especialistas en patología bucal en tiempos diferentes, uno de los cuales no conocía los diagnósticos dados por otros patólogos previos a este estudio. Se realizó el diagnóstico histopatológico y cada muestra se clasificó en grupos para el presente estudio.

Se estandarizó la técnica de inmunohistoquímica para cada anticuerpo según lo reportado por cada fabricante, en los tejidos control reportados para cada uno como positivos y en mucosa lingual, se hicieron ensayos con diferentes concentraciones de los anticuerpos respetando los rangos de uso sugeridos por el fabricante, lo anterior para observar la calidad y grado de tinción; se realizó la técnica sin anticuerpo primario para comprobar que los anticuerpos secundarios no producían fondo.

Posteriormente se realizó inmunohistoquímica indirecta en los cortes seriados en blanco, para cada uno de los siguientes marcadores: CD207, CD1a, CD80, CD86, CD273, CD274, anti CPH II y anti receptor de adenosina A_{2a} (ver anexo 1). Utilizando un fotomicroscopio de campo claro (Nikon Eclipse 80i) se seleccionaron 10 campos al azar por corte, es decir para cada anticuerpo, con el objetivo de 20X y se fueron guardando cada una de las fotomicrografías en un computador. Las células positivas a cada anticuerpo (CD207, CD1a, CD80, CD86, CD273, CD274, anti HLA II y anti receptor de adenosina A_{2a}), fueron cuantificadas visualmente en campos que midieron 600 µm X 450µm.

Los criterios para cuantificar las células fueron: las que estuvieran marcadas con aspecto dendrítico, núcleo visible y ubicadas en el epitelio. Aquellas células en las que sólo se identificaban las dendritas y no poseían núcleo visible se descartaron.

Se registraron los conteos y se obtuvo un promedio de células positivas observadas en los diez campos de cada corte, a su vez cada corte correspondía a un marcador. Este procedimiento se realizó para cada anticuerpo por separado y para cada espécimen de tejido de cada uno de los individuos a los que se les había tomado previamente las muestras de tejido en lengua tanto para los casos como para los controles.

En total se trabajó con una $n = 49$ obtenida por conveniencia, cumpliendo los criterios del estudio; esta número se repartió en 10 especímenes sanos, 15 COCE bien diferenciados, 15 COCE moderadamente diferenciados, 9 pobremente diferenciados. Para realizar el análisis estadístico se trabajó con 10 especímenes de sanos, 9 de pobremente diferenciados y 10 al azar de los bien y de los moderadamente diferenciado.

Se recolectó y procesó la información en una base de datos para la obtención de los resultados, la estadística se realizó en el programa GraphPad Prism 5.

7.6 TÉCNICAS

- a. Estudio histopatológicos por medio de microscopia óptica.
- b. Estudio inmunohistoquímico por medio de microscopia óptica.
- c. Conteo celular por medio de microscopia óptica.
- d. Recolección y procesamiento de datos por medio computacional.
- e. Interpretación de datos por medio de software computacional.

7.7 DISEÑO DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se plantea vaciar y analizar los datos obtenidos mediante el programa GraphPad Prism 5, para las variables cuantitativas trabajar medidas de tendencia central y medidas de dispersión; mientras que para las variables nominales describir las proporciones y construir las distribuciones de frecuencia e histograma correspondiente.

Efectuar el análisis comparando la frecuencia de las diferentes variables de estudio entre el grupo de muestras con diagnóstico histopatológico de COCE y el grupo de muestras histológicas correspondientes a lengua normal. Estudiar la posible asociación entre el número de células de Langerhans (CL) y la presencia de COCE así como el grado histológico de este y explorar la relación con el hábito tabáquico y de alcohol.

Las asociaciones entre las variables nominales estimarlas a través de Razones de Momios y sus intervalos de confianza al 95%, así mismo se efectuara pruebas de X^2

para detectar las asociaciones significativas a un nivel de $\alpha=0.05$. Para las variables continuas utilizar Análisis de Varianza, y las pruebas realizarlas al mismo nivel de significancia.

8. RESULTADOS

1.1 HISTOLOGÍA

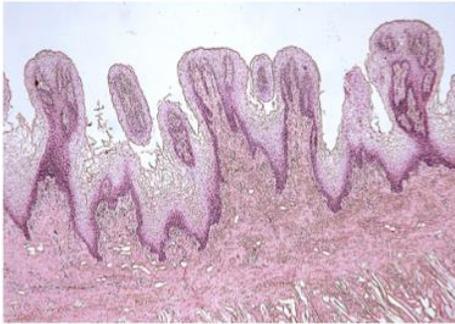
Los dos especialistas en patología y medicina oral diagnosticaron en dos momentos diferentes y según los criterios de la OMS las 53 muestras que correspondían al grupo control de lenguas sanas y al grupo control de casos de COCE teñidas con hematoxilina y eosina, mediante este análisis se descartó una muestra que correspondía a una patología de otro tejido y una con proceso inflamatorio, ambas del grupo control, y del grupo de estudio se descartaron dos de COCE pobremente diferenciado, una porque correspondía a una mucosa de otra localización de la cavidad oral y otra porque los especialistas en patología de este estudio consideraron que tenía una clasificación histopatológica diferente en cuanto al grado de diferenciación; por lo que la muestra definitiva fue de 49.

1.2 INMUNOHISTOQUÍMICA

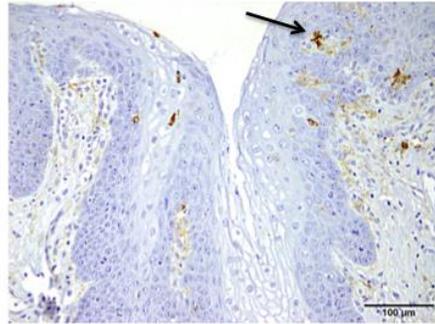
En el fotomicroscopio de campo claro se observaron 392 laminillas correspondientes a los 8 marcadores de inmunohistoquímica de los 49 especímenes (CD207, CD1a, CD80, CD86, CD273, CD274, anti HLA II y anti receptor de adenosina A_{2a}); en cada una de esas 392 laminillas se registraron por fotomicrografías 10 campos al azar para un total de 3920 campos a 20X, en los que además se contaron visualmente todas las células de aspecto dendrítico con núcleo visible, marcadas y localizadas en el epitelio. Se registraron los conteos celulares de los 3920 campos para posteriormente realizar por análisis estadístico la media y la desviación estándar.

A continuación se muestran algunas fotomicrografías representativas de los marcadores de inmunohistoquímica y de la tinciones de H -E en cada uno de los grupos de estudio.

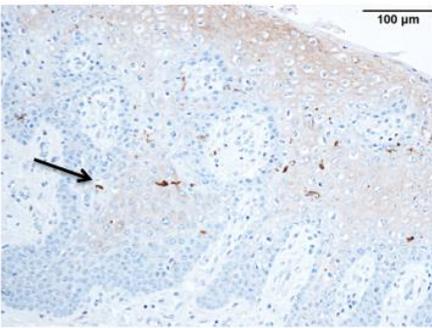
1. Fotomicrografías -Lenguas Sanas



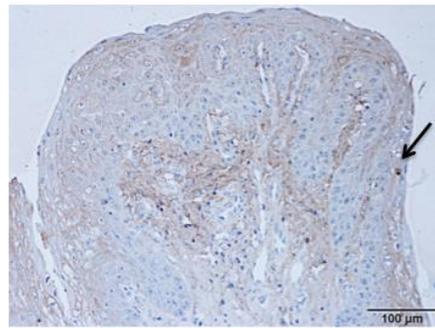
A.



B.



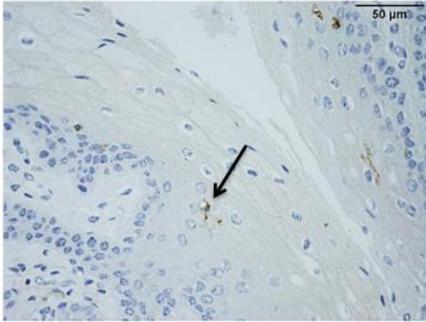
C.



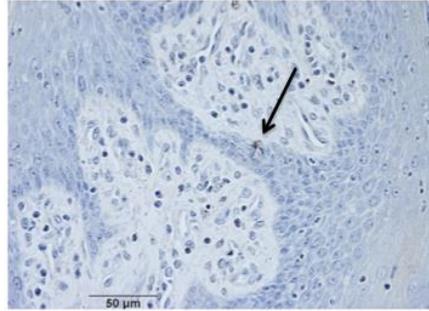
D.

Fotomicrografía 1 de cortes de lenguas sanas: A) Tinción de H- E a 5X, B) IHQ a 20X con anti HLA - II, C) IHQ a 20X con anti CD1a, D) IHQ a 20X con anti CD273.

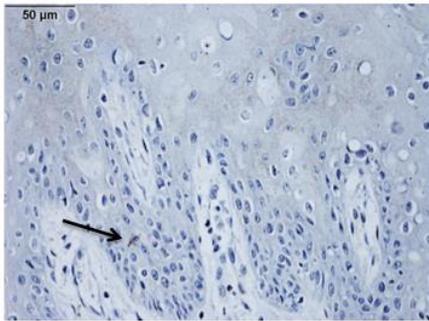
2. Fotomicrografías - Lenguas Sanas



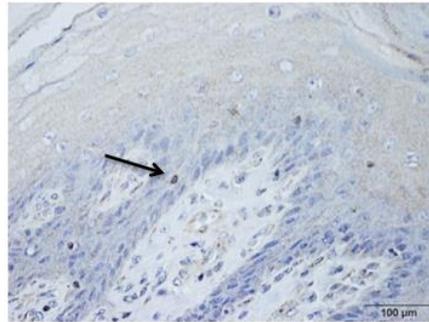
E.



F.



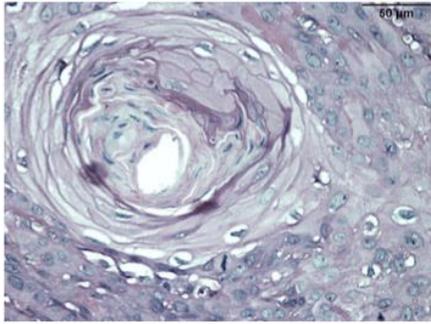
G.



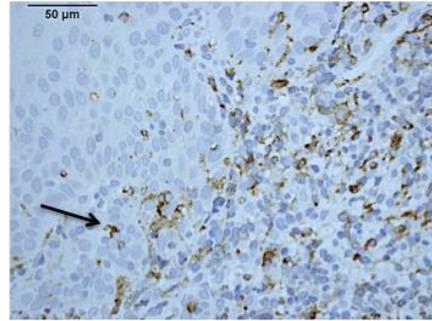
G.

Fotomicrografía 2 de cortes de lenguas sanas: E) IHQ a 40X con anti CD207, F) IHQ a 40X con anti CD80, G) IHQ a 40X con anti CD86, H) IHQ a 40X con anti receptor de adenosina.

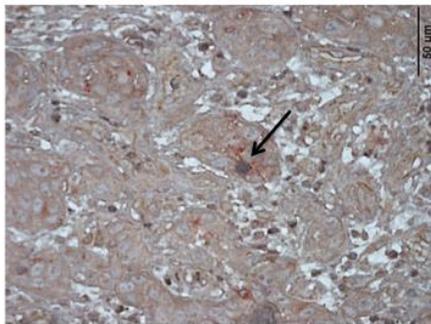
3. Fotomicrografías COCE bien diferenciados



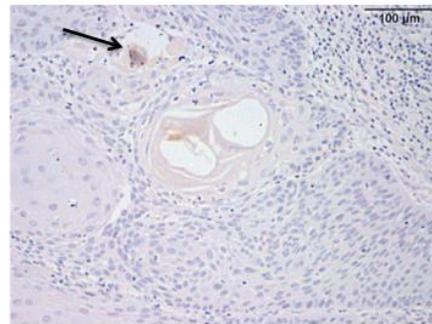
A.



B.



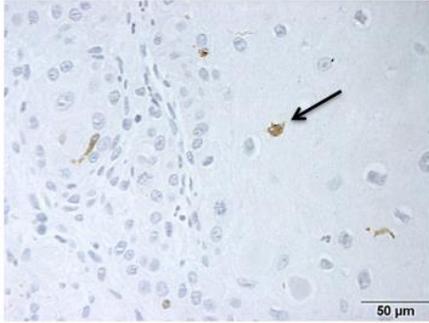
C.



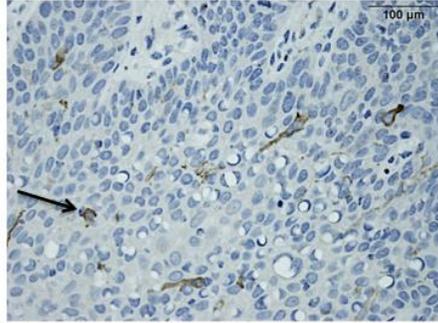
D.

Fotomicrografía 3 de cortes de COCE bien diferenciados: A) Tinción de H- E a 40X, B) IHQ a 40X con anti HLA - II, C) IHQ a 40X con anti CD1a y anti CD273, D) IHQ a 40X con anti CD274.

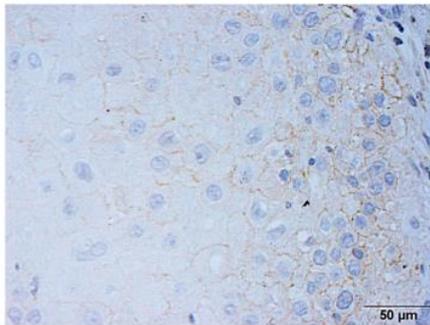
4. Fotomicrografías COCE bien diferenciados



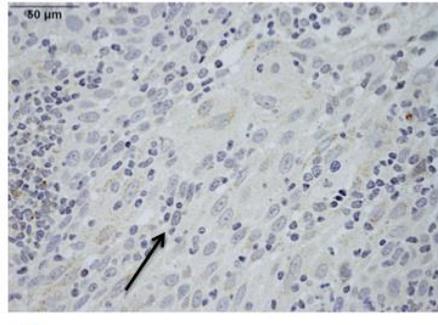
E.



F.



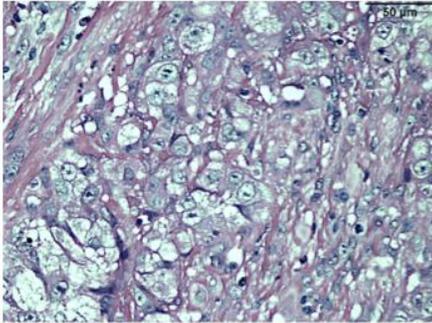
G.



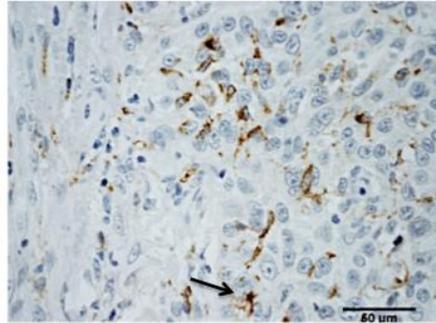
H.

Fotomicrografía 4 de cortes de COCE bien diferenciados: E) IHQ a 40X con anti CD207, F) IHQ a 40X con anti CD80, G) IHQ a 40X con anti CD86, H) IHQ a 40X con anti receptor de adenosina.

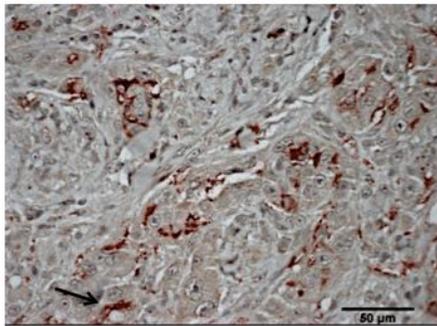
5. Fotomicrografías COCE moderadamente diferenciados



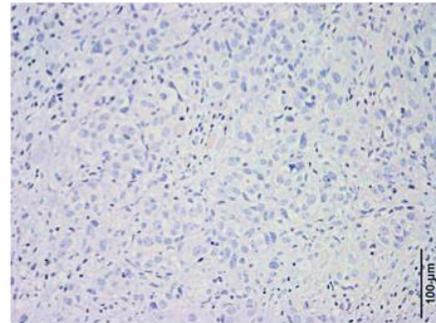
A.



B.



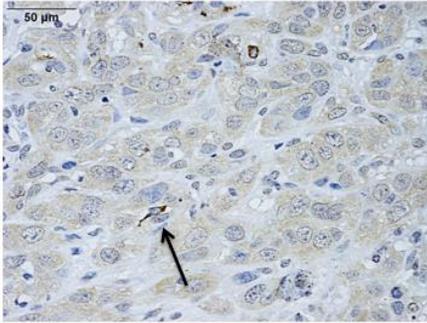
C.



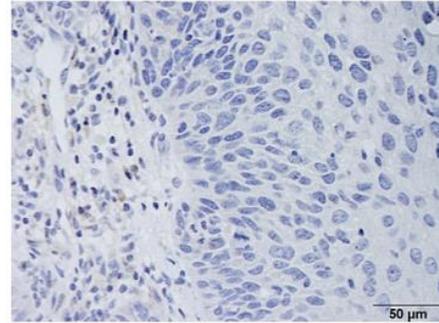
D.

Fotomicrografía 5 de cortes de COCE moderadamente diferenciados: A) Tinción de H- E a 40X, B) IHQ a 40X con anti HLA - II, C) IHQ a 40X con anti CD1a y anti CD273, D) IHQ a 40X con anti CD274.

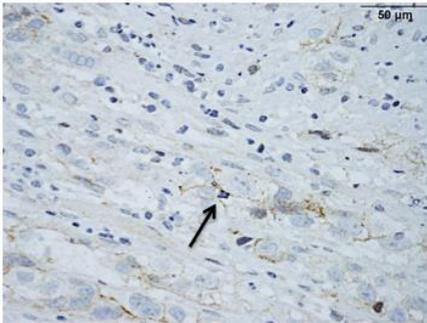
6. Fotomicrografías COCE moderadamente diferenciados



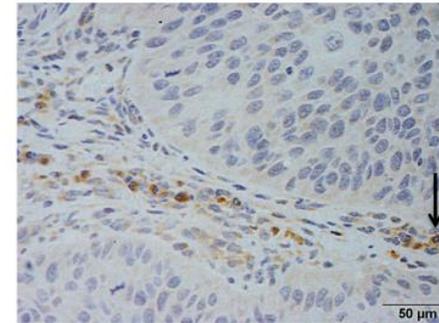
E.



F.



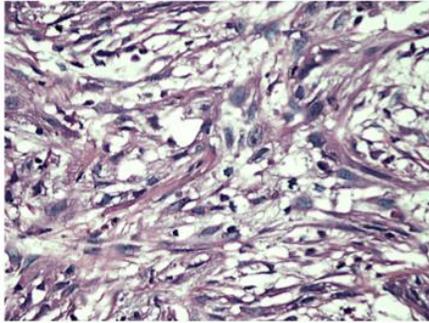
G.



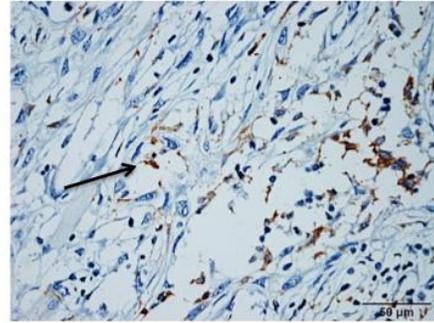
H.

Fotomicrografía 6 de cortes de COCE moderadamente diferenciados: E) IHQ a 40X con anti CD207, F) IHQ a 40X con anti CD80, G) IHQ a 40X con anti CD86, H) IHQ a 40X con anti receptor de adenosina.

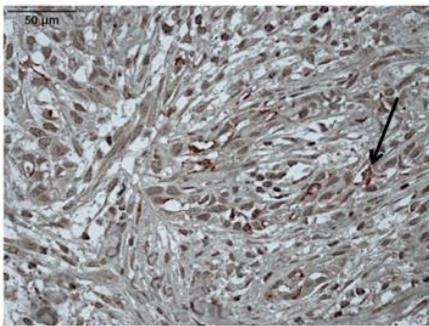
7. Fotomicrografías COCE pobremente diferenciados



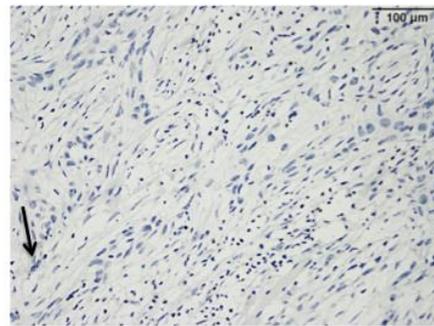
A.



B.



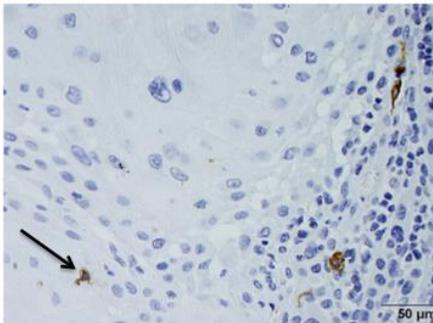
C.



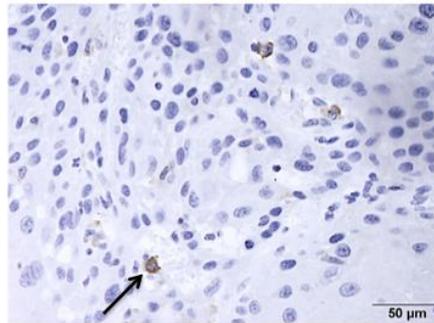
D.

Fotomicrografía 7 de cortes de COCE pobremente diferenciados: A) Tinción de H- E a 40X, B) IHQ a 40X con anti HLA - II, C) IHQ a 40X con anti CD1a y anti CD273, D) IHQ a 40X con anti CD274.

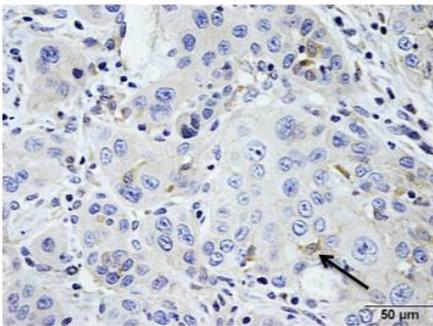
8. Fotomicrografías COCE pobremente diferenciados



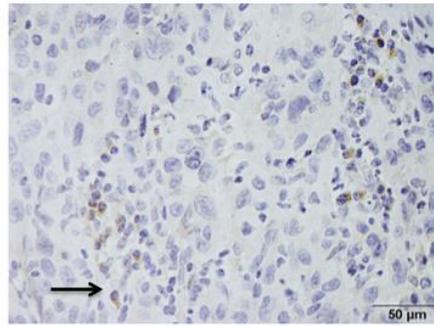
E.



F.



G.



H.

Fotomicrografía 8 de cortes de COCE pobremente diferenciados: E) IHQ a 40X con anti CD207, F) IHQ a 40X con anti CD80, G) IHQ a 40X con anti CD86, H) IHQ a 40X con anti receptor de adenosina.

8.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Las variables cuantitativas se trabajaron con medias y desviación estándar; se realizó el análisis de varianza y el test de comparación múltiple de Turkey.

Siglas Utilizadas: BD(COCE Bien Diferenciado), MD(COCE Moderadamente diferenciado), PD (COCE Pobremente diferenciado).

8.3.1 CONTEO DE CÉLULAS POR MARCADOR IDENTIFICADO CON ANTICUERPOS ESPECÍFICOS

8.3.1.1 CONTEO DE CÉLULAS MARCADAS CON EL ANTICUERPO ANTI CD207 (LANGERINA):

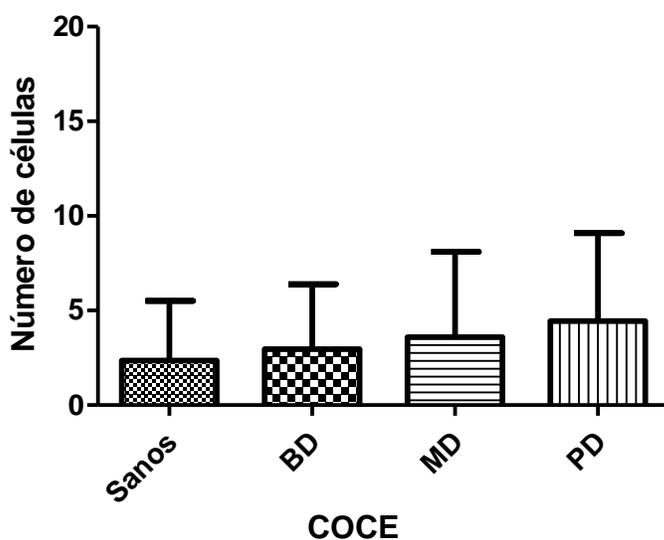
TABLA 1. Análisis estadístico del anticuerpo anti CD207: El promedio de células de Langerhans marcadas con el anticuerpo anti CD207 tanto para el grupo de lenguas sanas como para los grupo de especímenes con COCE en sus tres grados de

histodiferenciación, no tuvo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en ninguno de estos cuatro grupos analizados.

TABLA 1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ANTICUERPO ANTI CD207					
Tabla Analizada	CD207				
Análisis de Varianza de una vía					
Valor de P	0,7171				
Resumen del Valor de P	ns				
Tienen las medias diferencia significativa? ($P < 0.05$)	No				
Número de grupos	4				
F	0,4526				
Cuadrado R	0,03840				
Test de Bartlett para varianzas iguales					
Estadística de Bartlett (corregida)	1,795				
Valor de P	0,6160				
Resumen del valor de P	ns				
Las varianzas difieren significativamente? ($P < 0.05$)	No				
Tabla de ANOVA	SS	df	MS		
Tratamiento (entre columnas)	21,23	3	7,077		
Residual (entre columnas)	531,6	34	15,64		
Total	552,8	37			
Test de comparación múltiple de Tukey	Diferencia Media	q	Significativa? $P < 0.05?$	Resumen	95% CI of diff
Sanos vs BD	-0,5900	0,4718	No	ns	-5.371 to 4.191
Sanos vs MD	-1,230	0,9837	No	ns	-6.011 to 3.551
Sanos vs PD	-2,078	1,566	No	ns	-7.148 to 2.993
BD vs MD	-0,6400	0,5118	No	ns	-5.421 to 4.141
BD vs PD	-1,488	1,122	No	ns	-6.558 to 3.583
MD vs PD	-0,8475	0,6390	No	ns	-5.918 to 4.223

Gráfica 1. Promedio del número de células con Ac CD207: En las muestras analizadas y marcadas con anticuerpo anti CD207 se observó un rango entre 2,3 a 4,4 de células de Langerhans positivas a la marca en promedio.

Gráfica 1. Promedio del número de células con Ac CD207



	Sanos	BD	MD	PD
Promedio de células Ac CD207	2,36	2,95	3,59	4,4375
Desviación Estándar	3,150026455	3,445850967	4,516746617	4,657386606
Valor de P	0.7171			

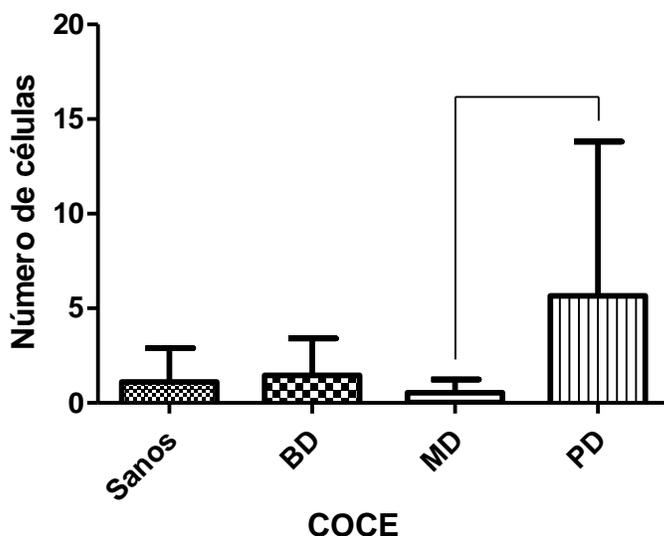
8.3.1.2 CONTEO DE CÉLULAS MARCADAS CON EL ANTICUERPO ANTI CD1A:

TABLA 2. Análisis estadístico del anticuerpo anti CD1a: Se observó una diferencia estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en el promedio de células de Langerhans marcadas con el anticuerpo anti CD1a entre el grupo de los COCE moderadamente diferenciados con respecto al de los COCE pobremente diferenciados; entre los otros grupos analizados no se encontraron diferencias estadísticas.

TABLA 2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ANTICUERPO ANTI CD1a					
Tabla Analizada	CD1a				
Análisis de Varianza de una vía					
Valor de P	0,0462				
Resumen del valor de P	*				
Tienen las medias diferencia significativa? ($P < 0.05$)	Yes				
Número de grupos	4				
F	2,956				
Cuadrado R	0,2069				
Test de Bartlett para varianzas iguales					
Estadística de Bartlett (corregido)	46,05				
Valor de P	< 0.0001				
Resumen del valor de P	***				
Las varianzas difieren significativa. ($P < 0.05$)	Yes				
Tabla de ANOVA					
Tratamiento (entre columnas)	138,7	3	46,24		
Residual (entre columnas)	531,9	34	15,64		
Total	670,6	37			
Test de comparación múltiple de Tukey					
	Diferencia media	q	Significativa? $P < 0.05?$	Resumen	95% CI of diff
Sanos vs BD	-0,3500	0,2798	No	ns	-5.132 to 4.432
Sanos vs MD	0,5700	0,4557	No	ns	-4.212 to 5.352
Sanos vs PD	-4,540	3,422	No	ns	-9.612 to 0.5323
BD vs MD	0,9200	0,7355	No	ns	-3.862 to 5.702
BD vs PD	-4,190	3,158	No	ns	-9.262 to 0.8823
MD vs PD	-5,110	3,852	Yes	*	-10.18 to -0.03766

Gráfica 2. Promedio del número de células con Ac anti CD1a: En las muestras analizadas y marcadas con anticuerpo anti CD1a se observó un rango entre 0,5 a 5,6 de células de Langerhans positivas a la marca en promedio.

Gráfica 2. Promedio del número de células con Ac CD1a



	Sanos	BD	MD	PD
Promedio de células Ac CD1a	1,11	1,46	0,54	5,65
Desviación Estándar	1,782289414	1,942621368	0,694742158	8,150547747
Valor de P	0.0462			

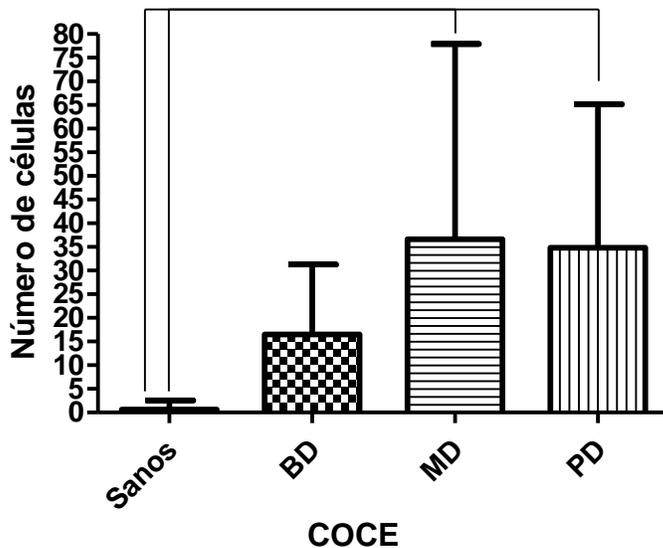
8.3.1.3 CONTEO DE CÉLULAS MARCADAS CON EL ANTICUERPO ANTI HLA – II

TABLA 3. Análisis estadístico del anticuerpo anti HLA - II: Para el promedio de células de Langerhans marcadas con el anticuerpo anti HLA-II se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), entre el grupo de los especímenes de lenguas sanas con respecto al grupo de los COCE moderadamente diferenciados; de igual manera, entre el grupo de las lenguas sanas con respecto al grupo de los COCE pobremente diferenciados. En los otros grupos analizados para este anticuerpo no se encontraron diferencias estadísticas.

TABLA 3 . ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ANTICUERPO ANTI HLA - II					
Tabla Analizada	HLA-DR - DP -DQ				
Análisis de Varianza de una vía					
Valor de P	0,0160				
Resumen del valor de P	*				
Tienen las medias diferencia significativa? (P < 0.05)	Yes				
Número de grupos	4				
F	3,958				
Cuadrado R	0,2588				
Test de Bartlett para varianzas iguales					
Estadística de Bartlett (corregido)	45,44				
Valor de P	< 0.0001				
Resumen del valor de P	***				
Las varianzas difieren significativamente?. (P < 0.05)	Yes				
Tabla ANOVA					
	SS	df	MS		
Tratamiento (entre columnas)	8315	3	2772		
Residual (entre columnas)	23810	34	700,3		
Total	32120	37			
Test de comparación múltiple de Tukey					
	Diferencia Media	q	Significativa? P < 0.05?	Resumen	95% CI of diff
Sanos vs BD	-15,92	1,902	No	ns	-47.92 to 16.08
Sanos vs MD	-36,01	4,303	Yes	*	-68.01 to -4.015
Sanos vs PD	-34,20	3,853	Yes	*	-68.14 to -0.2662
BD vs MD	-20,09	2,401	No	ns	-52.09 to 11.91
BD vs PD	-18,28	2,060	No	ns	-52.22 to 15.65
MD vs PD	1,807	0,2036	No	ns	-32.13 to 35.74

Gráfica 3. Promedio del número de células con Ac anti HLA – II: En las muestras analizadas y marcadas con anticuerpo anti HLA – II se observó un rango entre 0,6 a 34,8 de células de Langerhans positivas a la marca en promedio.

Gráfica 3. Promedio del número de células con Ac HLA- II



	Sanos	BD	MD	PD
Promedio de células Ac HLA-II	0,61	16,53	36,62	34,8125
Desviación Estándar	1,928989373	14,7699432	41,31114458	30,36329728
Valor de P	0,0160			

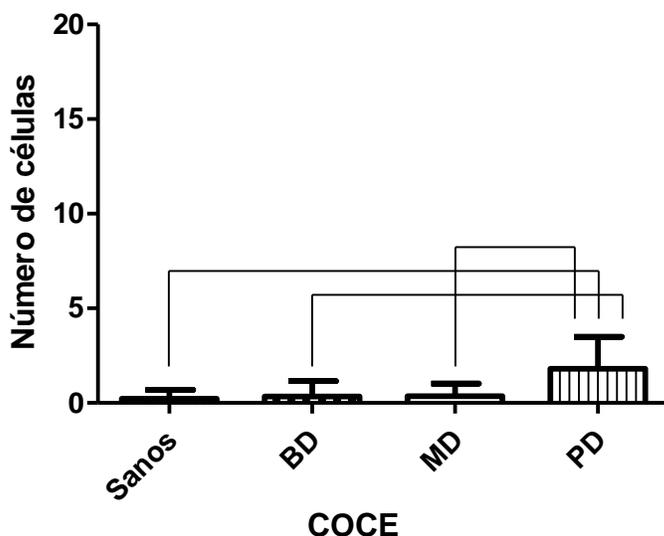
8.3.1.4 CONTEO DE CÉLULAS MARCADAS CON EL ANTICUERPO ANTI CD274:

TABLA 4. Análisis estadístico del anticuerpo anti CD274: Referente al promedio de células de Langerhans marcadas con el anticuerpo anti CD274 se observó que hubo diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), entre el grupo de lenguas sanas comparado con los COCE pobremente diferenciadas; entre el grupo de COCE bien diferenciados comparado con el grupo de los COCE pobremente diferenciados; y el grupo de COCE moderadamente diferenciado comparado con el grupo de los COCE pobremente diferenciado. En los demás grupos no se encontraron diferencias estadísticas.

TABLA 4 . ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ANTICUERPO ANTI CD274					
Tabla Analizada	CD274				
Análisis de Varianza de una vía					
Valor de P	0,0049				
Resumen del Valor de P	**				
Tienen las medias diferencia significativa? (P < 0.05)	Yes				
Número de grupos	4				
F	5,126				
Cuadrado R	0,3115				
Test de Bartlett para varianzas iguales					
Estadística de Bartlett (corregido)	14,53				
Valor de P	0,0023				
Resumen del valor de P	**				
Las varianzas difieren significativamente? (P < 0.05)	Yes				
Tabla ANOVA	SS	Df	MS		
Tratamiento (entre columnas)	14,36	3	4,785		
Residual (entre columnas)	31,74	34	0,9335		
Total	46,09	37			
Test de comparación múltiple de Tukey	Diferencia Media	Q	Significativa? P < 0.05?	Resumen	95% CI of diff
Sanos vs BD	-0,1100	0,3600	No	ns	-1.278 to 1.058
Sanos vs MD	-0,1300	0,4255	No	ns	-1.298 to 1.038
Sanos vs PD	-1,583	4,883	Yes	**	-2.822 to -0.3435
BD vs MD	-0,02000	0,06546	No	ns	-1.188 to 1.148
BD vs PD	-1,473	4,544	Yes	*	-2.712 to -0.2335
MD vs PD	-1,453	4,482	Yes	*	-2.692 to -0.2135

Gráfica 4. Promedio del número de células con Ac anti CD274: En las muestras analizadas y marcadas con anticuerpo anti CD274 se observó un rango entre 0,2 a 1,8 de células de Langerhans positivas a la marca en promedio.

Gráfica 4. Promedio del número de células con Ac CD274



	Sanos	BD	MD	PD
Promedio de células Ac CD274	0,23	0,34	0,36	1,8125
Desviación Estándar	0,462000481	0,823542484	0,660302961	1,68135787
Valor de P	0,0049			

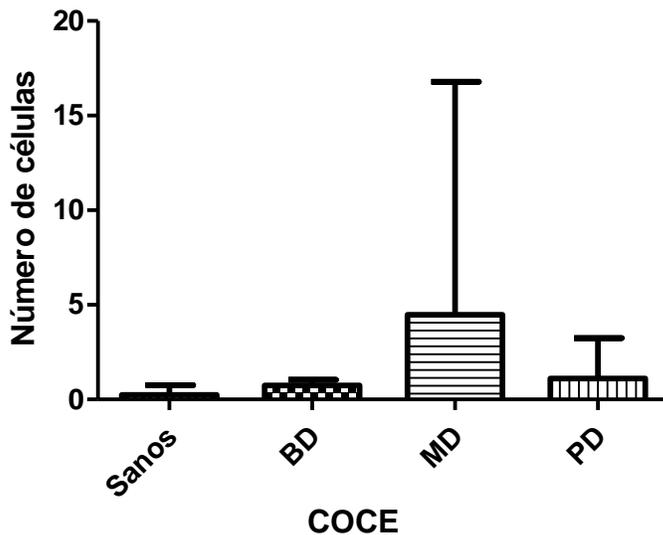
8.3.1.5 CONTEO DE CÉLULAS MARCADAS CON EL ANTICUERPO ANTI CD273:

TABLA 5. Análisis estadístico del anticuerpo anti CD273: En el análisis estadístico para el anticuerpo anti CD273 no se observó que los promedios de las células de Langerhans marcadas con este anticuerpo tuvieran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tres grupos de histodiferenciación del COCE y el grupo de lenguas sanas analizados.

TABLA 5 . ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ANTICUERPO ANTI CD273					
Tabla Analizada	CD273				
Análisis de Varianza de una vía					
Valor de P	0,4558				
Resumen del Valor de P	ns				
Tienen las medias diferencia significativa? (P < 0.05)	No				
Número de grupos	4				
F	0,8907				
Cuadrado R	0,07286				
Test de Bartlett para varianzas iguales					
Estadística de Bartlett (corregido)	99,14				
Valor de P	< 0.0001				
Resumen del valor de P	***				
Las varianzas difieren significativamente? (P < 0.05)	Yes				
Tabla ANOVA	SS	Df	MS		
Tratamiento (entre columnas)	110,1	3	36,70		
Residual (entre columnas)	1401	34	41,20		
Total	1511	37			
Test de comparación múltiple de Tukey	Diferencia Media	Q	Significativa? P < 0.05?	Resumen	95% CI of diff
Sanos vs BD	-0,5000	0,2463	No	ns	-8.261 to 7.261
Sanos vs MD	-4,230	2,084	No	ns	-11.99 to 3.531
Sanos vs PD	-0,8600	0,3994	No	ns	-9.092 to 7.372
BD vs MD	-3,730	1,838	No	ns	-11.49 to 4.031
BD vs PD	-0,3600	0,1672	No	ns	-8.592 to 7.872
MD vs PD	3,370	1,565	No	ns	-4.862 to 11.60

Gráfica 5. Promedio del número de células con Ac anti HLA – II: En las muestras analizadas y marcadas con anticuerpo anti CD273 se observó un rango entre 0,2 a 4,4 de células positivas a la marca en promedio.

Gráfica 5. Promedio del número de células con Ac CD273



	Sanos	BD	MD	PD
Promedio de células Ac CD273	0,24	0,74	4,47	1,1
Desviación Estándar	0,737864787	0,984227718	12,40260204	2,470115672
Valor de P	0,4558			

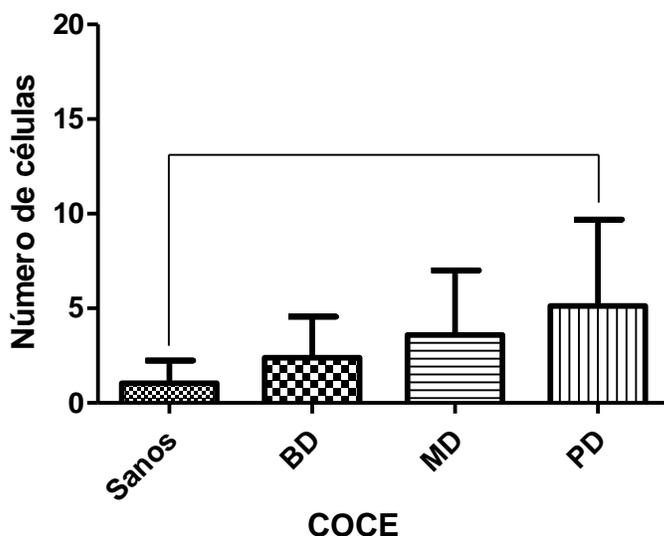
8.3.1.6 CONTEO DE CÉLULAS MARCADAS CON EL ANTICUERPO ANTI CD80:

TABLA 6. Análisis estadístico del anticuerpo anti CD80: Se observó diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) para el promedio de células de Langerhans marcadas con el anticuerpo anti CD80 entre los grupos de lenguas sanas con el grupo de COCE pobremente diferenciado. En los demás grupos estudiados no hubo diferencias estadísticas.

TABLA 6 . ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ANTICUERPO ANTI CD80					
Tabla Analizada	CD80				
Análisis de Varianza de una vía					
Valor de P	0,0429				
Resumen del Valor de P	*				
Tienen las medias diferencia significativa? ($P < 0.05$)	Yes				
Número de grupos	4				
F	3,024				
Cuadrado R	0,2106				
Test de Bartlett para varianzas iguales					
Estadística de Bartlett (corregido)	13,43				
Valor de P	0,0038				
Resumen del valor de P	**				
Las varianzas difieren significativamente? ($P < 0.05$)	Yes				
Tabla ANOVA	SS	Df	MS		
Tratamiento (entre columnas)	81,67	3	27,22		
Residual (entre columnas)	306,1	34	9,003		
Total	387,8	37			
Test de comparación múltiple de Tukey	Diferencia Media	Q	Significativa? $P < 0.05?$	Resumen	95% CI of diff
Sanos vs BD	-1,350	1,423	No	ns	-4.978 to 2.278
Sanos vs MD	-2,560	2,698	No	ns	-6.188 to 1.068
Sanos vs PD	-4,085	4,059	Yes	*	-7.933 to -0.2371
BD vs MD	-1,210	1,275	No	ns	-4.838 to 2.418
BD vs PD	-2,735	2,718	No	ns	-6.583 to 1.113
MD vs PD	-1,525	1,515	No	ns	-5.373 to 2.323

Gráfica 6. Promedio del número de células con Ac anti CD80: En las muestras analizadas y marcadas con anticuerpo anti CD80 se observó un rango entre 1,0 a 5,1 de células positivas a la marca en promedio.

Gráfica 6. Promedio del número de células con Ac CD80



	Sanos	BD	MD	PD
Promedio de células AC CD80	1,04	2,39	3,6	5,125
Desviación Estándar	1,201110597	2,174319817	3,408486142	4,567196702
Valor de P	0,0429			

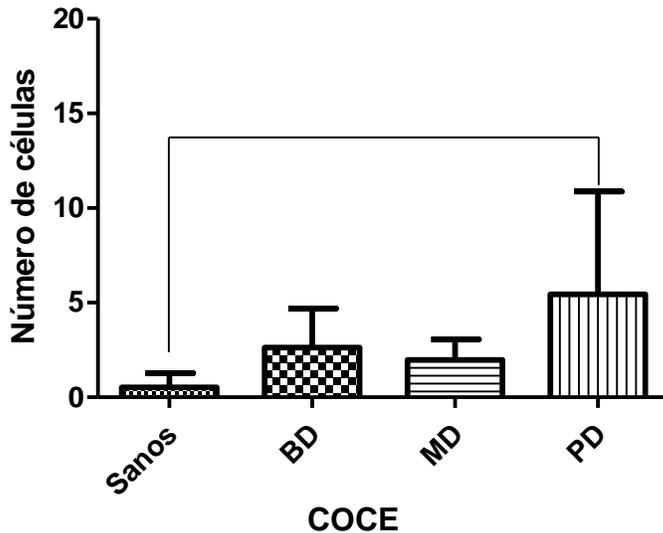
8.3.1.7 CONTEO DE CÉLULAS MARCADAS CON EL ANTICUERPO ANTI CD86

TABLA 7. Análisis estadístico del anticuerpo anti CD86: Para el promedio de células de Langerhans marcadas con el anticuerpo anti CD86 se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el grupo de lenguas sanas comparado con el grupo de COCE pobremente diferenciados. En los demás grupos estudiados no existe diferencias estadísticas.

TABLA 7 . ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ANTICUERPO ANTI CD86					
Tabla Analizada	CD86				
Análisis de Varianza de una vía					
Valor de P	0,0066				
Resumen del Valor de P	**				
Tienen las medias diferencia significativa? (P < 0.05)	Yes				
Número de grupos	4				
F	4,826				
Cuadrado R	0,2986				
Test de Bartlett para varianzas iguales					
Estadística de Bartlett (corregido)	34,61				
Valor de P	< 0,0001				
Resumen del valor de P	***				
Las varianzas difieren significativamente? (P < 0.05)	Yes				
Tabla ANOVA	SS	Df	MS		
Tratamiento (entre columnas)	111,1	3	37,03		
Residual (entre columnas)	260,9	34	7,673		
Total	372,0	37			
Test de comparación múltiple de Tukey	Diferencia Media	Q	Significativa? < 0.05?	P	Resumen
Sanos vs BD	-2,100	2,397	No	ns	-5.449 to 1.249
Sanos vs MD	-1,460	1,667	No	ns	-4.809 to 1.889
Sanos vs PD	-4,918	5,293	Yes	**	-8.470 to -1.365
BD vs MD	0,6400	0,7306	No	ns	-2.709 to 3.989
BD vs PD	-2,818	3,033	No	ns	-6.370 to 0.7348
MD vs PD	-3,458	3,721	No	ns	-7.010 to 0.09482

Gráfica 7. Promedio del número de células con Ac anti CD86: En las muestras analizadas y marcadas con anticuerpo anti CD86 se observó un rango entre 0,5 a 5,4 de células de Langerhans positivas a la marca en promedio.

Gráfica 7. Promedio del número de células con Ac CD86



	Sanos	BD	MD	PD
Promedios de células Ac CD86	0,52	2,62	1,98	5,4375
Desviación Estándar	0,749518364	2,06494552	1,079917692	5,43741995
Valor de P	0,0066			

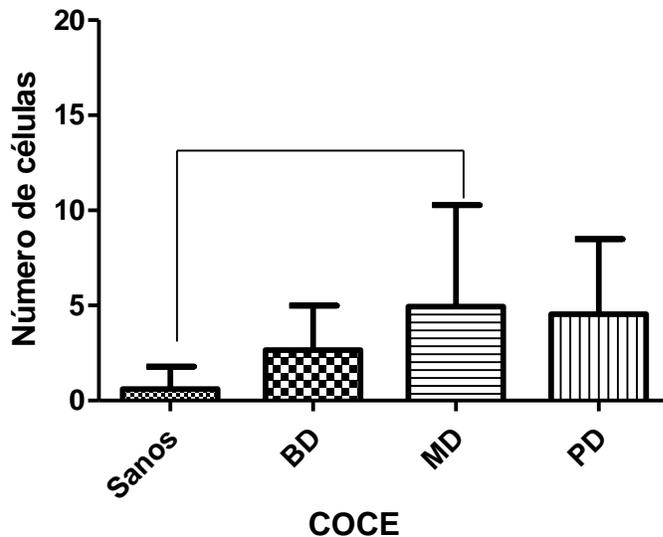
8.3.1.8 CONTEO DE CÉLULAS MARCADAS CON EL ANTICUERPO ANTI RECEPTOR DE ADENOSINA A_{2A}:

TABLA 8. Análisis estadístico del anticuerpo anti receptor de adenosina A_{2A}: El promedio de células de Langerhans marcadas con el anticuerpo anti receptor de adenosina A_{2A} presentó diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) entre el grupo de lenguas sanas comparado con el grupo de COCE moderadamente diferenciados. En los otros grupos analizados no se observó diferencia estadística.

TABLA 8 . ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ANTICUERPO ANTI RECEPTOR DE ADENOSINA A _{2A}					
Tabla Analizada	Rc de Adenosina A _{2A}				
Análisis de Varianza de una vía					
Valor de P	0,0427				
Resumen del Valor de P	*				
Tienen las medias diferencia significativa? (P < 0.05)	Yes				
Número de grupos	4				
F	3,027				
Cuadrado R	0,2108				
Test de Bartlett para varianzas iguales					
Estadística de Bartlett (corregido)	17,50				
Valor de P	0,0006				
Resumen del valor de P	***				
Las varianzas difieren significativamente? (P < 0.05)	Yes				
Tabla ANOVA	SS	Df	MS		
Tratamiento (entre columnas)	114,3	3	38,10		
Residual (entre columnas)	428,0	34	12,59		
Total	542,3	37			
Test de comparación múltiple de Tukey	Diferencia Media	Q	Significativa? P < 0.05?	Resumen	95% CI of diff
Sanos vs BD	-2,050	1,827	No	Ns	-6.340 to 2.240
Sanos vs MD	-4,330	3,859	Yes	*	-8.620 to -0.04037
Sanos vs PD	-3,928	3,300	No	Ns	-8.477 to 0.6223
BD vs MD	-2,280	2,032	No	ns	-6.570 to 2.010
BD vs PD	-1,878	1,578	No	ns	-6.427 to 2.672
MD vs PD	0,4025	0,3382	No	ns	-4.147 to 4.952

Gráfica 8. Promedio del número de células con Ac anti receptor de adenosina A_{2A}: En las muestras analizadas y marcadas con anticuerpo receptor de adenosina A_{2A} se observó un rango entre 0,6 a 4,9 de células positivas a la marca en promedio.

Gráfica 8. Promedio del número de células con Ac anti receptor de adenosina A_{2A}



	Sanos	BD	MD	PD
Promedio de células Ac Rc adenosina	0,61	2,66	4,94	4,5375
Desviación Estándar	1,185514422	2,335332477	5,337331834	3,96157887
Valor de P	0,0427			

8.3.2. COMPARACIÓN DE CONTEOS DE CÉLULAS POR GRUPO

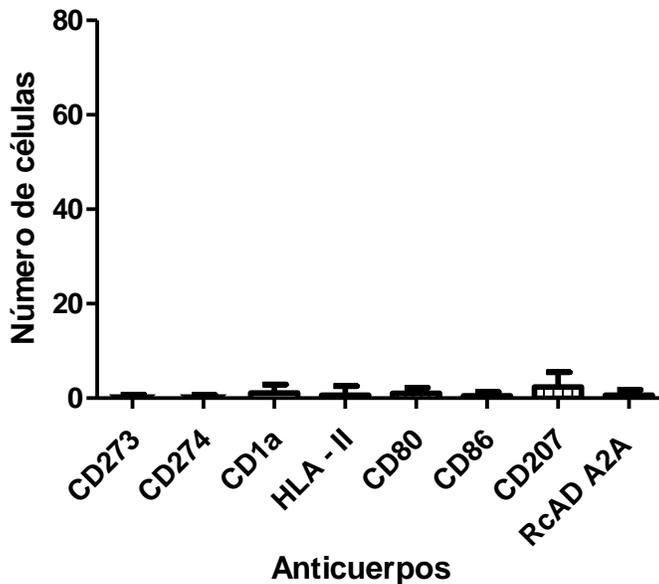
8.3.2.1 CONTEO DE CÉLULAS MARCADAS EN EL GRUPO CONTROL - LENGUAS SANAS:

TABLA 9. Análisis estadístico del grupo control – lenguas sanas: En el análisis estadístico hecho para el grupo control de lenguas sanas, se observó que no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes promedio de células de Langerhans marcadas con los siguientes anticuerpos: anti CD207, anti CD1a, anti CD80, anti CD86, anti CD273, anti CD274, anti HLA – II y anti receptor de adenosina.

TABLA 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL GRUPO CONTROL – LENGUAS SANAS						
Tabla Analizada	LENGUAS SANAS					
Análisis de Varianza de una vía						
Valor de P	0,0897					
Resumen del Valor de P	ns					
Tienen las medias diferencia significativa? (P < 0.05)	No					
Número de grupos	8					
F	1,856					
Cuadrado R	0,1528					
Test de Bartlett para varianzas iguales						
Estadística de Bartlett (corregido)	48,08					
Valor de P	< 0.0001					
Resumen del valor de P	***					
Las varianzas difieren significativamente? (P < 0.05)	Yes					
Tabla ANOVA						
Tratamiento (entre columnas)	33,64	7	4,805			
Residual (entre columnas)	186,4	72	2,589			
Total	220,1	79				
Test de comparación múltiple de Tukey						
	Diferencia Media.	Ql	Significativa? < 0.01?	P	Resumen	99% CI of diff4
CD273 vs CD274	0,01000	0,01965	No	ns		-2.649 to 2.669
CD273 vs CD1A	-0,8700	1,710	No	ns		-3.529 to 1.789
CD273 vs HLA-II	-0,3700	0,7271	No	ns		-3.029 to 2.289
CD273 vs CD80	-0,8000	1,572	No	ns		-3.459 to 1.859
CD273 vs CD86	-0,2800	0,5502	No	ns		-2.939 to 2.379
CD273 vs CD207	-2,120	4,166	No	ns		-4.779 to 0.5393
CD273 vs Rc Aden.	-0,3700	0,7271	No	ns		-3.029 to 2.289
CD274 vs CD1A	-0,8800	1,729	No	ns		-3.539 to 1.779
CD274 vs HLA-II	-0,3800	0,7468	No	ns		-3.039 to 2.279
CD274 vs CD80	-0,8100	1,592	No	ns		-3.469 to 1.849
CD274 vs CD86	-0,2900	0,5699	No	ns		-2.949 to 2.369
CD274 vs CD207	-2,130	4,186	No	ns		-4.789 to 0.5293
CD274 vs Rc Aden.	-0,3800	0,7468	No	ns		-3.039 to 2.279
CD1A vs HLA-II	0,5000	0,9826	No	ns		-2.159 to 3.159
CD1A vs CD80	0,07000	0,1376	No	ns		-2.589 to 2.729
CD1A vs CD86	0,5900	1,159	No	ns		-2.069 to 3.249
CD1A vs CD207	-1,250	2,456	No	ns		-3.909 to 1.409
CD1A vs Rc Aden.	0,5000	0,9826	No	ns		-2.159 to 3.159
HLA-II vs CD80	-0,4300	0,8450	No	ns		-3.089 to 2.229
HLA-II vs CD86	0,09000	0,1769	No	ns		-2.569 to 2.749
HLA-II vs CD207	-1,750	3,439	No	ns		-4.409 to 0.9093
HLA-II vs Rc Aden.	0,0000	0,0000	No	ns		-2.659 to 2.659
CD80 vs CD86	0,5200	1,022	No	ns		-2.139 to 3.179
CD80 vs CD207	-1,320	2,594	No	ns		-3.979 to 1.339
CD80 vs Rc Aden.	0,4300	0,8450	No	ns		-2.229 to 3.089
CD86 vs CD207	-1,840	3,616	No	ns		-4.499 to 0.8193
CD86 vs Rc Aden.	-0,09000	0,1769	No	ns		-2.749 to 2.569
CD207 vs Rc Aden.	1,750	3,439	No	ns		-0.9093 to 4.409

Gráfica 9. Promedio de células en lenguas sanas: En las muestras analizadas del grupo control de lenguas sanas, se observó que en promedio las células de Langerhans positivas a la marca CD207 es de 2,3; seguido por el CD1a con 1,1.

Gráfica 9. Promedio de células en lenguas sanas



	Ac CD273	Ac CD274	Ac CD1a	Ac HLA-DR	Ac CD80	Ac CD86	Ac CD207	Ac RcAD
Promedio de células en especímenes Sanos	0,24	0,23	1,11	0,61	1,04	0,52	2,36	0,61
Desviación Estándar	0,737864787	0,462000481	1,782289414	1,928989373	1,201110597	0,749518364	3,150026455	1,185514422
Valor de P	0,0897							

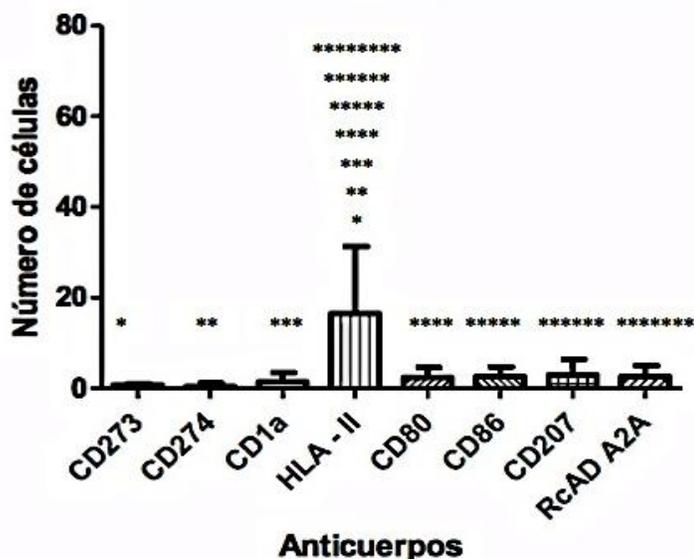
8.3.2.2 CONTEO DE CÉLULAS MARCADAS EN LOS COCE BIEN DIFERENCIADOS:

TABLA 10. Análisis estadístico del COCE bien diferenciado: Se encontró en el análisis estadístico realizado para el grupo de COCE bien diferenciados que había diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) entre los siguientes anticuerpos: anti CD273 comparado con anti HLA-II, anti CD274 comparado con anti HLA-II, anti CD1a comparado con anti HLA-II, anti HLA-II comparado con anti CD80, anti HLA-II comparado con anti CD86, anti HLA-II comparado con anti CD207, anti HLA - II comparado con anti receptor de adenosina A_{2a}.

TABLA 10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL COCE BIEN DIFERENCIADO						
Tabla Analizada	COCE BIEN DIFERENCIADOS					
Valor de P	< 0.0001					
Resumen del Valor de P	***					
Tienen las medias diferencia significativa? (P < 0.05)	Yes					
Número de grupos	8					
F	8,913					
Cuadrado R	0,4643					
Test de Bartlett para varianzas iguales						
Estadística de Bartlett (corregido)	141,9					
Valor de P	< 0.0001					
Resumen del valor de P	***					
Las varianzas difieren significativamente? (P < 0.05)	Yes					
Tabla ANOVA	SS	df	MS			
Tratamiento (entre columnas)	1942	7	277,4			
Residual (entre columnas)	2241	72	31,13			
Total	4183	79				
Test de comparación múltiple de Tukey	Diferencia Media	q	Significativa? P < 0.01?	Resumen	99% CI of diff4	
CD273 vs CD274	0,4000	0,2267	No	ns	-8.820 to 9.620	
CD273 vs CD1a	-0,7200	0,4081	No	ns	-9.940 to 8.500	
CD273 vs HLA-II	-15,79	8,950	Yes	***	-25.01 to -6.570	
CD273 vs CD80	-1,650	0,9352	No	ns	-10.87 to 7.570	
CD273 vs CD86	-1,880	1,066	No	ns	-11.10 to 7.340	
CD273 vs CD207	-2,210	1,253	No	ns	-11.43 to 7.010	
CD273 vs Rc Aden.	-1,920	1,088	No	ns	-11.14 to 7.300	
CD274 vs CD1a	-1,120	0,6348	No	ns	-10.34 to 8.100	
CD274 vs HLA-II	-16,19	9,177	Yes	***	-25.41 to -6.970	
CD274 vs CD80	-2,050	1,162	No	ns	-11.27 to 7.170	
CD274 vs CD86	-2,280	1,292	No	ns	-11.50 to 6.940	
CD274 vs CD207	-2,610	1,479	No	ns	-11.83 to 6.610	
CD274 vs Rc Aden.	-2,320	1,315	No	ns	-11.54 to 6.900	
CD1a vs HLA-II	-15,07	8,542	Yes	***	-24.29 to -5.850	
CD1a vs CD80	-0,9300	0,5271	No	ns	-10.15 to 8.290	
CD1a vs CD86	-1,160	0,6575	No	ns	-10.38 to 8.060	
CD1a vs CD207	-1,490	0,8445	No	ns	-10.71 to 7.730	
CD1a vs Rc Aden.	-1,200	0,6802	No	ns	-10.42 to 8.020	
HLA-II vs CD80	14,14	8,015	Yes	***	4.920 to 23.36	
HLA-II vs CD86	13,91	7,884	Yes	***	4.690 to 23.13	
HLA-II vs CD207	13,58	7,697	Yes	***	4.360 to 22.80	
HLA-II vs Rc Aden.	13,87	7,862	Yes	***	4.650 to 23.09	
CD80 vs CD86	-0,2300	0,1304	No	ns	-9.450 to 8.990	
CD80 vs CD207	-0,5600	0,3174	No	ns	-9.780 to 8.660	
CD80 vs Rc Aden.	-0,2700	0,1530	No	ns	-9.490 to 8.950	
CD86 vs CD207	-0,3300	0,1870	No	ns	-9.550 to 8.890	
CD86 vs Rc Aden.	-0,04000	0,02267	No	ns	-9.260 to 9.180	
CD207 vs Rc Aden.	0,2900	0,1644	No	ns	-8.930 to 9.510	

Gráfica 10. Promedio de células en COCE bien diferenciado: En las muestras analizadas del grupo con COCE bien diferenciados, se observó que en promedio las células de Langerhans positivas a la marca del Ac HLA – II es 16,5 mayor que con los otros anticuerpos, pues esta seguido por el CD207 con un promedio de 2,9.

Gráfica 10. Promedio de células en COCE bien diferenciado



	Ac CD273	Ac CD274	Ac CD1a	Ac HLA-DR	Ac CD80	Ac CD86	Ac CD207	Ac RcAD
Promedio de células en COCE BD	0,74	0,34	1,46	16,53	2,39	2,62	2,95	2,66
Desviación Estándar	0,98422 7718	0,82354 2484	1,94262 1368	14,769 9432	2,17431 9817	2,0649 4552	3,44585 0967	2,33533 2477
Valor de P	0.0001							

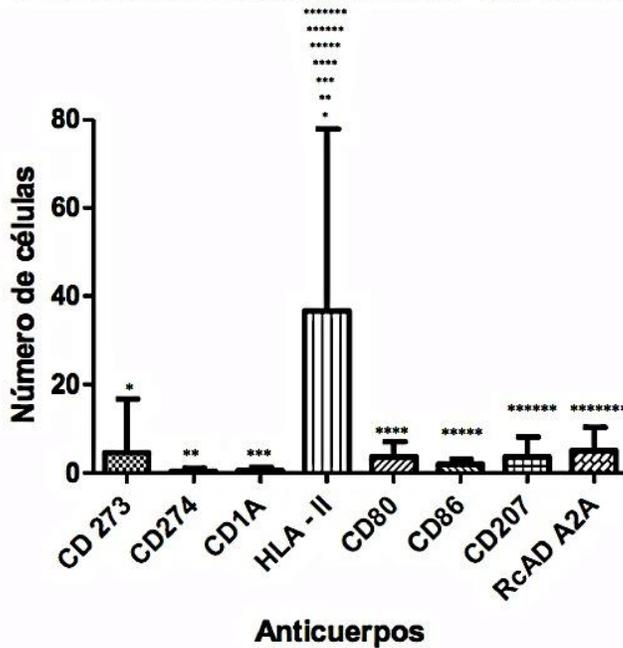
8.3.2.3 CONTEO DE CÉLULAS MARCADAS EN LOS COCE MODERADAMENTE DIFERENCIADO

TABLA 11. Análisis estadístico del COCE moderadamente diferenciado: Para el grupo de COCE moderadamente diferenciado en el análisis estadístico se observó que existían diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) entre los siguientes anticuerpos: anti CD273 comparado con anti HLA-II, anti CD274 comparado con anti HLA-II, anti CD1a comparado con anti HLA-II, HLA-II comparado con anti CD80, anti HLA-II comparado con anti CD86, anti HLA-II comparado con anti CD207 y HLA-II comparado con anti receptor de adenosina.

TABLA 11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL COCE MODERADAMENTE DIFERENCIADO					
Tabla Analizada	COCE MODERADAMENTE DIFERENCIADO				
Análisis de Varianza de una vía					
Valor de P	< 0.0001				
Resumen del Valor de P	***				
Tienen las medias diferencia significativa? (P < 0.05)	Yes				
Número de grupos	8				
F	6,082				
Cuadrado R	0,3716				
Test de Bartlett para varianzas iguales					
Estadística de Bartlett (corregido)	207,1				
Valor de P	< 0.0001				
Resumen del valor de P	***				
Las varianzas difieren significativamente? (P < 0.05)	Yes				
Tabla ANOVA					
	SS	df	MS		
Tratamiento (entre columnas)	10220	7	1460		
Residual (entre columnas)	17290	72	240,1		
Total	27510	79			
Test de comparación múltiple de Tukey					
	Diferencia Media	q	Significativa? P < 0.017	Resumen	99% CI of diff
CD273 vs CD274	4,110	0,8387	No	ns	-21.50 to 29.72
CD273 vs CD1a	3,930	0,8020	No	ns	-21.68 to 29.54
CD273 vs HLA-II	-32,15	6,561	Yes	***	-57.76 to -6.542
CD273 vs CD80	0,8700	0,1775	No	ns	-24.74 to 26.48
CD273 vs CD86	2,490	0,5081	No	ns	-23.12 to 28.10
CD273 vs CD207	0,8800	0,1796	No	ns	-24.73 to 26.49
CD273 vs Rc Aden.	-0,4700	0,09591	No	ns	-26.08 to 25.14
CD274 vs CD1a	-0,1800	0,03673	No	ns	-25.79 to 25.43
CD274 vs HLA-II	-36,26	7,400	Yes	***	-61.87 to -10.65
CD274 vs CD80	-3,240	0,6612	No	ns	-28.85 to 22.37
CD274 vs CD86	-1,620	0,3306	No	ns	-27.23 to 23.99
CD274 vs CD207	-3,230	0,6592	No	ns	-28.84 to 22.38
CD274 vs Rc Aden.	-4,580	0,9347	No	ns	-30.19 to 21.03
CD1a vs HLA-II	-36,08	7,363	Yes	***	-61.69 to -10.47
CD1a vs CD80	-3,060	0,6245	No	ns	-28.67 to 22.55
CD1a vs CD86	-1,440	0,2939	No	ns	-27.05 to 24.17
CD1a vs CD207	-3,050	0,6224	No	ns	-28.66 to 22.56
CD1a vs Rc Aden.	-4,400	0,8979	No	ns	-30.01 to 21.21
HLA-II vs CD80	33,02	6,739	Yes	***	7.412 to 58.63
HLA-II vs CD86	34,64	7,069	Yes	***	9.032 to 60.25
HLA-II vs CD207	33,03	6,741	Yes	***	7.422 to 58.64
HLA-II vs Rc Aden.	31,68	6,465	Yes	***	6.072 to 57.29
CD80 vs CD86	1,620	0,3306	No	ns	-23.99 to 27.23
CD80 vs CD207	0,01000	0,002041	No	ns	-25.60 to 25.62
CD80 vs Rc Aden.	-1,340	0,2735	No	ns	-26.95 to 24.27
CD86 vs CD207	-1,610	0,3286	No	ns	-27.22 to 24.00
CD86 vs Rc Aden.	-2,960	0,6041	No	ns	-28.57 to 22.65
CD207 vs Rc Aden.	-1,350	0,2755	No	ns	-26.96 to 24.26

Gráfica 11. Promedio de células en COCE moderadamente diferenciado: En las muestras analizadas del grupo con COCE moderadamente diferenciados, se observó que en promedio las células de Langerhans positivas a la marca Ac HLA – II es de 36,6, siendo mayor que con los anticuerpos y esta seguido por el Ac Receptor de adenosina con un promedio de 4,9.

Gráfica 11. Promedio de células en COCE moderadamente diferenciado



	Ac CD273	Ac CD274	Ac CD CD1a	Ac HLA-DR	Ac CD80	Ac CD86	Ac CD207	Ac RcAD
Promedio de células en COCE MD	4,47	0,36	0,54	36,62	3,6	1,98	3,59	4,94
Desviación Estándar	12,4026 0204	0,66030 2961	0,69474 2158	41,3111 4458	3,40848 6142	1,07991 7692	4,51674 6617	5,33733 1834
Valor de P	0,0001							

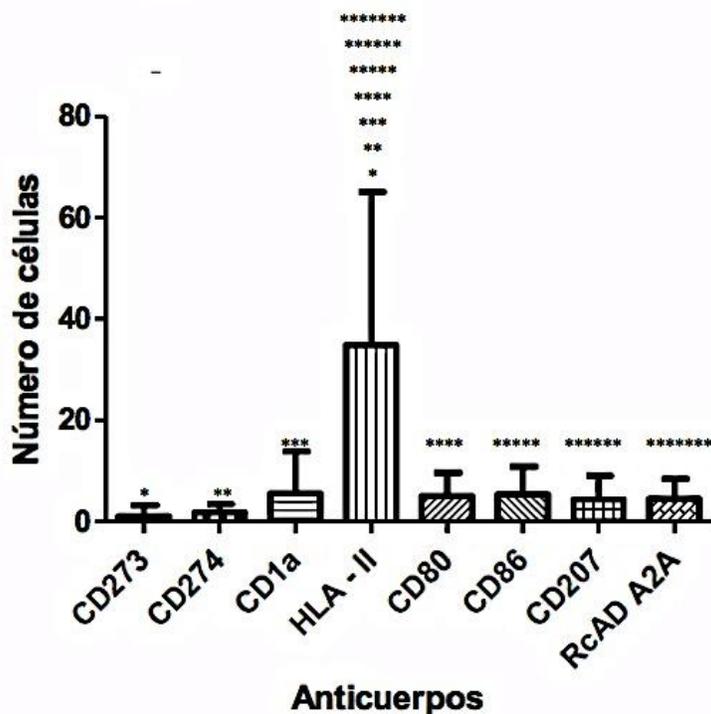
8.3.2.4 CONTEO DE CÉLULAS MARCADAS EN LOS COCE POBREMENTE DIFERENCIADOS

TABLA 12. Análisis estadístico del COCE pobremente diferenciado: En el análisis realizado para el grupo de COCE pobremente diferenciado se observó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$), entre los siguientes anticuerpos: anti CD273 comparado con anti HLA-II, anti CD274 comparado con anti HLA-II, anti CD1a comparado con anti HLA-II, anti HLA-II comparado con anti CD80, anti HLA-II comparado con anti CD86, anti HLA-II comparado con anti CD207, anti HLA-II comparado con anti receptor de adenosina A_{2a}.

TABLA 12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL COCE POBREMENTE DIFERENCIADO						
Tabla Analizada	COCE POBREMENTE DIFERENCIADOS					
Análisis de Varianza de una vía						
Valor de P	< 0.0001					
Resumen del Valor de P	***					
Tienen las medias diferencia significativa? (P < 0.05)	Yes					
Número de grupos	8					
F	7,169					
Cuadrado R	0,4726					
Test de Bartlett para varianzas iguales						
Estadística de Bartlett (corregido)	89,25					
Valor de P	< 0.0001					
Resumen del valor de P	***					
Las varianzas difieren significativamente? (P < 0.05)	Yes					
Tabla ANOVA	SS	df	MS			
Tratamiento (entre columnas)	6798	7	971,1			
Residual (entre columnas)	7585	56	135,4			
Total	14380	63				
Test de comparación múltiple de Tukey	Diferencia Media	q	Significativa? P < 0.01?	Resumen	99% CI of diff	
CD273 vs CD274	-0,7125	0,1732	No	ns	-22.44 to 21.02	
CD273 vs CD1a	-4,550	1,106	No	ns	-26.28 to 17.18	
CD273 vs HLA-DR	-33,71	8,193	Yes	***	-55.44 to -11.98	
CD273 vs CD80	-4,025	0,9782	No	ns	-25.75 to 17.70	
CD273 vs CD86	-4,338	1,054	No	ns	-26.07 to 17.39	
CD273 vs CD207	-3,338	0,8111	No	ns	-25.07 to 18.39	
CD273 vs Rc Aden.	-3,438	0,8354	No	ns	-25.17 to 18.29	
CD274 vs CD1a	-3,838	0,9326	No	ns	-25.57 to 17.89	
CD274 vs HLA-DR	-33,00	8,020	Yes	***	-54.73 to -11.27	
CD274 vs CD80	-3,313	0,8050	No	ns	-25.04 to 18.42	
CD274 vs CD86	-3,625	0,8810	No	ns	-25.35 to 18.10	
CD274 vs CD207	-2,625	0,6380	No	ns	-24.35 to 19.10	
CD274 vs Rc Aden.	-2,725	0,6623	No	ns	-24.45 to 19.00	
CD1a vs HLA-DR	-29,16	7,087	Yes	***	-50.89 to -7.434	
CD1a vs CD80	0,5250	0,1276	No	ns	-21.20 to 22.25	
CD1a vs CD86	0,2125	0,05164	No	ns	-21.52 to 21.94	
CD1a vs CD207	1,213	0,2947	No	ns	-20.52 to 22.94	
CD1a vs Rc Aden.	1,113	0,2704	No	ns	-20.62 to 22.84	
HLA-DR vs CD80	29,69	7,215	Yes	***	7.959 to 51.42	
HLA-DR vs CD86	29,38	7,139	Yes	***	7.646 to 51.10	
HLA-DR vs CD207	30,38	7,382	Yes	***	8.646 to 52.10	
HLA-DR vs Rc Aden.	30,28	7,358	Yes	***	8.546 to 52.00	
CD80 vs CD86	-0,3125	0,07595	No	ns	-22.04 to 21.42	
CD80 vs CD207	0,6875	0,1671	No	ns	-21.04 to 22.42	
CD80 vs Rc Aden.	0,5875	0,1428	No	ns	-21.14 to 22.32	
CD86 vs CD207	1,000	0,2430	No	ns	-20.73 to 22.73	
CD86 vs Rc Aden.	0,9000	0,2187	No	ns	-20.83 to 22.63	
Rf0 vs Rc Aden.	-0,1000	0,02430	No	ns	-21.83 to 21.63	

Gráfica 12. Promedio de células en COCE pobremente diferenciado: En las muestras analizadas del grupo con COCE pobremente diferenciado, se observó que en promedio las células de Langerhans positivas a la marca anti HLA – II es de 34,8, siendo mayor que con los anticuerpos; y esta seguido por el Ac anti CD1a con un promedio de 5,6.

Gráfica 12. Promedio de células en COCE pobremente diferenciado



	Ac CD273	Ac CD274	Ac CD1a	Ac HLA-DR	Ac CD80	Ac CD86	Ac CD207	Ac RcAD
Promedio de células con COCE PD	1,1	1,8125	5,65	34,8125	5,125	5,4375	4,4375	4,5375
Desviación Estándar	2,47011 5672	1,6813 5787	8,15054 7747	30,3632 9728	4,56719 6702	5,4374 1995	4,65738 6606	3,9615 7887
Valor de P	0,0001							

8.4 DATOS DE HÁBITO TABAQUICO Y ALCOHOL:

Se recolectaron datos de las historias clínicas correspondientes a los especímenes con los que se trabajó tanto para el grupo control de lenguas sanas, como para los COCE en lengua; para hacer correlación de hábito tabáquico y alcohol con la presencia y ausencia de enfermedad, pero se encontró una limitación en el estudio, ya que los datos previamente tomados en las instituciones que facilitaron los especímenes de estudio, no tenían en todos los casos el registro de dichos datos; por lo que se optó por no realizar el análisis estadístico para estos hábitos en los grupos de estudio para evitar sesgos.

8.5 DATOS CLÍNICOS DE EDAD Y GÉNERO:

De las historias clínicas correspondientes a cada espécimen se recolectaron los siguientes datos:

TABLA 13. RANGOS DE EDAD

Especímenes	Lenguas Sanas	COCE bien diferenciado	COCE moderadamente diferenciado	COCE pobremente diferenciado
Rango de Edad	22- 81 años	46 – 93 años	37- 80 años	44 – 89 años

TABLA 14. DISTRIBUCIÓN POR GÉNERO

Especímenes	Lenguas Sanas	COCE bien diferenciado	COCE moderadamente diferenciado	COCE pobremente diferenciado
Femenino	3(30%)	6(60%)	3(30%)	8(88,8)
Masculino	6(60%)	4(40%)	7(70%)	1(11,1)
No Especificado	1(10%)			

9. DISCUSIÓN

El presente estudio se realizó para conocer acerca de la capacidad funcional de las CL con relación al grado de diferenciación del COCE ya que ayuda a comprender aspectos de los mecanismos de la evasión inmunológica de esta neoplasia maligna.

En este estudio se tuvo en cuenta que la localización anatómica a estudiar más importante en cavidad oral es la lengua, pues es la región reportada con más alta incidencia de COCE, dato que permanece sin cambio, sin importar las variaciones que ya se conocen para este cáncer y que permiten hacer diferentes agrupaciones de acuerdo a sus diferentes patogenias, mecanismos carcinogénicos y comportamiento biológico.

Se sabe también que el numero de células de Langerhans en el epitelio bucal está determinado por la presencia o ausencia de estrato córneo superficial; por lo que se consideró pertinente obtener datos de número e inmunofenotipo de las CL del mismo sitio anatómico tanto para los casos de COCE como para los controles.

Además se trató de que los resultados de la observación realizada en este estudio tuvieran la mayor validez y confiabilidad al trabajar con un tamaño muestral de 49 y al usar 7 marcadores para determinar la presencia y funcionalidad de las CL y un marcador de ambiente tumoral.

En el presente estudio el número de CL positivas al marcador CD207 (Langerina) entre el grupo control y el grupo de casos no presentó diferencias significativas (gráfica 1); un poco diferente a lo observado con el anticuerpo CD1a, en el que hay diferencias entre el grupo de COCE moderadamente diferenciado con el de COCE

pobrementemente diferenciado (gráfica 2), fenómeno que se explica por la posible migración de células hacia el epitelio para reforzar la función inmune en los carcinomas pobrementemente diferenciados, ante la presencia de un mayor número de antígenos tumorales de naturaleza lipídica, glucolipídica o lipoproteica. Los resultados de este estudio difieren con el de Lasisi TJ et al, quienes contaron el número de células de Langerhans en COCE marcadas sólo con CD1a, usando la clasificación histopatológica de Bryne (alto y bajo grado de malignidad), de muestras obtenidas de diversos sitios anatómicos de la cavidad oral. Ellos encontraron en su estudio que el número de células de Langerhans estaba reducido significativamente en el COCE con alto grado de malignidad con respecto al grupo control, lo cuál ellos lo atribuyen a una supresión del sistema inmune⁴⁹. Otro estudio en cambio apoya nuestros resultados; Öhman J et al reportan un incremento de CL y células T en COCE en comparación con los epitelios con diagnósticos clínicos de leucoplasia (lesión premaligna); este estudio se realizó por medio de inmunohistoquímica con los marcadores CD1a y CD207, en tejidos de diversos sitios anatómicos de cavidad oral²¹.

En los resultados del presente estudio las moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (HLA -II) se vieron aumentadas significativamente en los COCE tanto en los moderadamente como en los pobrementemente diferenciados con respecto al grupo control (gráfica 3); esto apoya la idea que ante antígenos tumorales, en este caso de tipo peptídicos, hay una gran respuesta del sistema inmune, en los carcinomas; este panorama se representa mejor al ver la expresión de todos los marcadores estudiados en los grupos de histodiferenciación (gráficas 9, 10, 11, 12), ya que en los COCE hay una diferencia altamente significativa de este marcador con respecto a los demás. Aspecto que puede indicar que las células de Langerhans son predominante maduras, expresan CPH de clase II en la superficie para presentar los antígenos y activar a los linfocitos T vírgenes, lo que se conoce como la primera señal; pero para que se de totalmente tanto la presentación como la estimulación a los linfocitos para que éstos se diferencien y actúen, debe darse una segunda señal de coestimulación y posteriormente una tercera señal que es la producción de citocinas.

Por otro lado, se observó que las moléculas coestimuladoras CD80 (gráfica 6) y CD86 (gráfica 7) está aumentada su expresión de manera significativa en CL en los COCE pobrementemente diferenciados a comparación de los especímenes de lengua sana; pero al ver el comportamiento de todos los marcadores en los diferentes grupos de estudio (gráfica 12), el promedio de células CD 80+ y CD86+, es relativamente bajo con respecto a la expresión de HLA - II. Así, hay moléculas para la primera señal, y se dan las moléculas de la segunda señal pero no en la misma cantidad. Es decir, predomina en los COCE pobrementemente diferenciados la tolerancia inmunológica por parte de las CL.

Jonuleit H et al, en el año 2000, reportaron que la presentación de antígenos por células dendríticas inmaduras (iCDs) (que son CD sin o con poca expresión de moléculas coestimuladoras en su superficie y sin o con poca producción de IL 12), tiene un papel en el establecimiento y mantenimiento de la tolerancia de las células T. A pesar de expresar niveles moderados de CPH y moléculas coestimuladoras, la presentación por iCDs estimula el desarrollo de las poblaciones de células T

reguladoras. Lo cual, favorecería el tumor pues es un mecanismo de evasión inmunológica la presencia de células T reguladoras en este ambiente^{52,53}. Además, las iCDs son capaces de inducir respuestas inmunes antitumorales porque pueden inducir tolerancia de las células T. Si las células presentadoras de antígenos fallan en proporcionar una apropiada señal coestimuladora a las células T, se desarrolla tolerancia o anergia²⁴.

En relación con las moléculas coinhibitorias, específicamente el CD274 (gráfica 4) es de notar que hay un aumento significativo en el COCE pobremente diferenciado con respecto a los demás grupos. Al observar todos los marcadores en los COCE pobremente diferenciados, estas moléculas en realidad se presentan en un promedio muy bajo con respecto a las otras estudiadas. Sin embargo, un grupo de CL en esto COCE pobremente diferenciados suprime la activación de las células T.

La presencia en los COCE pobremente diferenciados de moléculas coestimuladoras y coinhibitorias y de forma simultánea de HLA- II en gran proporción y con una marcada diferencia significativa con respecto a los otros marcadores que se usaron para identificar CL en el presente estudio; se deba, entre otras causas, a que se ha observado que las neoplasias epiteliales con pobre diferenciación histológica, tienden a invadir y hacer metástasis más rápidamente, lo cual lleva a pensar que se desarrollan más aceleradamente, y por tanto, la interacción con el sistema inmune planteado en las tres fases de la inmunoección: eliminación, equilibrio y escape, no estén bien delimitadas, lo cual lleva a que al mismo tiempo se observen características de las tres fases en estos tumores. De ser así, estas neoplasias tienen clonas inmunogénicas y no inmunogénicas, incluso en estados donde ya se están invadiendo otros tejidos. Sin embargo, debe predominar un estado de evasión del sistema inmune, apoyados en que son los COCE donde se observó más tolerancia inmunológica junto con los moderadamente diferenciados que tuvo un comportamiento similar de presentar CL con fenotipo tolerogénico en gran proporción. Este es un dato no reportado en ningún otro estudio y que es un aporte importante de esta investigación.

El promedio de CL en las muestras del grupo control con todos los marcadores estudiados (gráfica 9), en general fue bajo y no presentó diferencias significativas. El estudio de Feng P et al (2009), realizado en lengua de humanos sanos adultos muestra un promedio de 5.49 CL positivas a CPH II y de 4.42 para CD1a, ambos utilizando inmunohistoquímica⁵⁴; estos datos contrastan ligeramente con lo hallado en este estudio, en el que se obtuvo 0.61 en promedio para HLA- II (gráfica 3) y para CD1a fue de 1,11 (gráfica 2); estas diferencias probablemente se deban a las variaciones metodológicas ya que Feng P y cols utilizaron tejido fijado por congelación para realizar la inmunohistoquímica, mientras que en el presente estudio los tejidos empleados se fijaron con formol y se incluyeron en parafina; igualando las condiciones de las muestras de COCE, que habían tenido este mismo procesamiento, esto nos ayudó a disminuir los sesgos entre los grupos estudiados.

Respecto al marcador receptor de adenosina A2a (gráfica 8), se observa en este

estudio que hay una tendencia a estar presente en mayor cantidad en los COCE con menor grado de diferenciación; específicamente entre los COCE moderadamente diferenciados, ya que se observa una diferencias estadísticamente significativa con respecto al grupo control. Este marcador no ha sido muy estudiado, y los reportes encontrados no son de carcinomas orales, es un campo aun por explorar. Un estudio realizado por Wei Q et al (2013) sobre el receptor de adenosina A_{2B} en líneas celulares de cáncer de próstata, realizado con análisis de Western Blot mostró que hay una alta expresión de los receptores de adenosina A_{2A} y A_{2B}. Asimismo, se estudió el papel del receptor de adenosina A_{2B} en la muerte y la proliferación celular de las células de cáncer de colón, y se observó que la activación del receptor de adenosina A_{2B} promueve el crecimiento de las células de cáncer de próstata⁵⁵. Un estudio realizado por Panther E et al (2001), sobre la expresión y la función de los receptores de adenosina en CD humanas demuestra que la adenosina induce la polimerización de actina y la migración de CDs inmaduras humanas involucrando el receptor de adenosina A₁ y A₃ y que la activación del receptor de adenosina A_{2a} resulta en una inhibición en la producción de la IL -12, lo que conduciría a que las CD no sean capaces de inducir respuestas Th1⁵⁶. Aunque el presente estudio no ahonda en las implicaciones funcionales del aumento de este receptor en el COCE, si abre el panorama para realizar estudios en un futuro acerca de esto, pues se aprecia un cambio en los niveles promedio de este marcador en los diferentes grados histopatológicos.

10. CONCLUSIONES

En las muestras de COCE pobremente diferenciado se encontró que a pesar de contar con células de Langerhans que expresan moléculas CPH de clase II en una cantidad considerable, a su vez estas células expresan moléculas coinhibitorias y moléculas coestimuladoras, lo que les confiere un carácter tolerogénico ante las células neoplásicas, permitiendo que éstas evadan el sistema inmune, favoreciendo la proliferación de esta neoplasia maligna , su desarrollo y comportamiento agresivo, lo que a su vez, deteriora el pronóstico del individuo afectado.

Es importante hacer la correlación entre el número de células de Langerhans y su inmunofenotipo en cada uno de los grados histopatológicos del COCE, pues ello permite saber si estas células se encuentran activas y funcionales contra la neoplasia, o por el contrario, tienen un tipo tolerogénico ante las células cancerosas.

En este estudio, se aprecia que hay un cambio en la presencia del marcador receptor de adenosina A_{2A}; lo cual deja un campo abierto a la investigación con respecto al receptor de adenosina en COCE, pues se ha observado que la adenosina tiene efectos en células cancerosas, dándole ganancias funcionales; además de actuar sobre las células del sistema inmune disminuyendo su respuesta y favoreciendo un microambiente propicio para que el cáncer se desarrolle.

11. LITERATURA CITADA

1. Barnes L, Eveson J.W, Reichart P, Sidransky D. The World Health Organization. Pathology and genetics of head and neck tumours. IARCPress. Lyon. 163 – 175. 2005.
2. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Oral and Maxillofacial Pathology. Saunders. 2 ed. 356 – 369. 2002.
3. Markopoulos AK. Current aspects on oral squamous cell carcinoma. The Open Dentistry Journal. 6: 126 – 130. 2012.
4. Durr ML, Li D, Wang SJ. Oral cavity squamous cell carcinoma in never smokers: analysis of clinopathologic characteristics and survival. American journal of otolaryngology – head and neck medicine and surgery 34: 288 – 393. 2013.
5. Tirado L, Granados M. Epidemiología y etiología del cáncer de la cabeza y el cuello. Cancerología 2: 9 – 17. 2007.
6. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston MS, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni, Jr. JF. Smoking and drinking in relation to oral pharyngeal cáncer. Cancer Research 48: 3282 – 3287. 1988.
7. Cogliano VJ, Baan R, Straif K, Grosse Y, Lauby SB, El Ghissassi F, Bouvard V, Bebrahim TL, Guha N, Freeman C, Galichet L, Wild CP. Preventable exposures associated with human cáncer. J Natl Cancer Inst 103: 1 – 13. 2011.
8. Van der Waal I, Are we able to reduce the mortality and morbidity of oral cancer; some considerations. Med Oral Patol Cir Bucal. 1; 18 (1): e 33 – e 37. 2013.
9. Bagan JV, Scully C. Medicina y patología oral. Editorial Medicina oral S.L. España. 101 – 133. 2006.
10. Bodner L, Manor E, Friger MD, Van der Waal I. Oral squamous cell carcinoma in patients twenty years of age of younger – review and analysis of 186 reported cases. Oral Oncology. 50: 84 – 89. 2014.
11. Santos HB de P, do O´ Silva AL, Cavalcante LH de A, Alves PM, Godoy GP, Nonaka CFW. Histopathological grading systems and their relationship with clinical parameters in lower lip squamous cell carcinoma. Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 43: 539–545. 2014.
12. Ribeiro L R de C, Lago MG, Silva LE, Silvestre FP, Resende CD, Chaves L S de Q.

- Oral squamous cell carcinoma grading systems analysis of the best survival predictor. *J Oral Pathol Med.* 41: 34 – 9. 2012.
13. Meneses GA, Mosqueda TA, Ruíz –Godoy RLM. Patología quirúrgica de cabeza y cuello lesiones tumorales y pseudotumorales. Ed Trillas. 13 – 79. 2006.
 14. Bhargava A, Saigal S, Chalishazar M. Histopathological grading systems in oral squamous cell carcinoma: A review. *J Int Oral Health.* 2 (4): 1 - 10. 2010.
 15. Bell R.B, Kademani D, Homer L, Dierks EJ, Potter BE. Tongue cancer: is there a difference in survival compared with other subsites in the oral cavity?. *J Oral Maxillofac Surg .* 65: 229 – 236. 2007.
 16. Rivera C, Venegas B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (review). *Oncology Letters* 8: 7 – 11, 2014.
 17. Seoane – Romero JM, Vázquez – Mahía I, Seoane J, Varela – Centelles P, Tomás I, López – Cedrún JL. Factors related to late stage diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 17 (1): e 35 – e 40. 2012.
 18. Van der Waal I, Bree R, Brakenhoff R, Coebergh JW. Early diagnosis in primary oral cancer: is it possible?. *Med Oral Patol Cir Bucal.* 1; 16 (3): e 300 – e 305. 2011.
 19. Rojas W, Anaya JM, Aristizábal B, Cano LE, Gómez LM, Lopera D. Inmunología de Rojas. Corporación para investigaciones biológicas, Colombia. 15 ed. 2010.
 20. Duray A, Demoulin S, Hubert P, Delvenne P, Saussez S. Immune suppression in head and neck cancers: a review. *Clinical and Developmental Immunology.* 2010: 1 – 15. 2010.
 21. Öhman J, Magnusson B, Telemos E, Jontell M, Hasséus B. Langerhans cell and T cells sense cell dysplasia in oral leukoplakias and oral squamous cell carcinomas- evidence for immunosurveillance. *Scand J Immunol.* 76 (1): 39 – 48. 2012.
 22. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* 22: 329–60. 2004.
 23. Pinzon-Charry A, Maxwell T, Lopez JA. Dendritic cell dysfunction in cancer: a mechanism for immunosuppression. *Immunol Cell Biol.* 83: 451–61. 2005.
 24. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu. Rev. Immunol.* 25: 267- 296. 2007.
 25. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting from

- immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology*. 3(11): 991 – 998. 2002.
26. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646 – 674. 2011.
 27. Fujita H, Suárez – Fariñas M, Mitsui H, Gonzalez J, Bluth MJ, Zhang S, Felsen D, Krueger JG, Carucci JA. Langerhans cells from human cutaneous squamous cell carcinoma induce strong type 1 immunity. *Journal of Investigative Dermatology*. 132: 1645 – 1655. 2012.
 28. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 767 – 811. 2000.
 29. Fricke I, Gabrilovich DI. Dendritic cells and tumor microenvironment: a dangerous liaison. *Immunol Invest* 35:459–83. 2006.
 30. Driessens G, Kline J, Gajewski TF. Coestimulatory and coinhibitory receptors in anti – tumor immunity. *Immunol Rev.* 229(1): 126 – 144. 2009.
 31. Chambers CA, Allison JP. Costimulation in T cell responses. *Current Opinion in Immunology*. 9: 396 – 404. 1997.
 32. Pereira KMA, Soares RC, Oliveira MC, Pinto LP, Costa ALL. Immunohistochemical staining of langerhans cells in HPV – positive and HPV – negative cases of oral squamous cells carcinoma. *J Appl Oral Sci.* 19(4): 378 - 383. 2011.
 33. Koch S, Kohl K, Klein E, Von Bubnoff D, Bieber T. Skin homing of Langerhans cell precursors: adhesión, chemotaxis, and migration. *J Allergy Clin Immunol.* 117(1): 163 – 168. 2006.
 34. Barret AW, Cruchley AT, Williams DM. Oral mucosal langerhans'cells. *Crit Rev Oral Biol Med.* 7 (1): 36 – 58. 1996.
 35. Herrera – Enríquez M, Barba- Ruiz M, Hernández –Téllez B, Perusquia – Ojeda AM, Álvarez – Pérez J, Sampedro – Carrillo EA, Castell – Rodríguez AE. Cuantificación de células de Langerhans en pacientes con carcinoma epidermoide y queratosis actínica. *LAB- Acta.* 17: 77- 82. 2005.
 36. Romani N, Clausen B, Stoitzner P. Langerhans cells and more: langerin – expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunol Rev.* 234 (1): 120 – 141. 2010.

37. Fries P.N, Griebel P.J. Mucosal dendritic cell diversity in the gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res.* 343: 33 – 41. 2011.
38. Cruchley A.T, Williams D.M, Farthing P.M, Speight P.M, Lesch C.A, Squier C.A. Langerhans cell density in normal human oral mucosa and skin relationship: to age, smoking and alcohol consumption. *J Oral Pathol Med.* 23:55-59. 1994.
39. Daniels TE, Chou L, Greenspan JS, Grady DG, Hauck WW, Greene JC, Ernster VL. Reduction of Langerhans cells in smokeless tobacco-associated oral mucosal lesions. *J Oral Pathol Med.* 21: 100-4. 1992.
40. Upadhyay J, Upadhyay RB, Agrawal P, Jaitley S, Shekhar R. Langerhans cells and their role in oral mucosal diseases. *N Am Med Sci.* 5(9):505 – 514. 2013.
41. Cernadas M, Cavallarri M, Watts G, Mori L, De Libero G, Brenner MB. Early recycling compartment trafficking of CD1a is essential for its intersection and presentation of lipid antigens. *J Immunol.* 184: 1235 – 1241. 2010.
42. Poulin LF, Henri S, De Bovis B, Devilard E, Kissenpfenning A, Malissen B. The dermis contains langerin+ dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. *JEM.* 204 (13): 3119 – 3131. 2007.
43. Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmeer M, Liu Y, Duvert-Frances V, Vincent C, Schmitt D, Davoust, J, Caux C, Lebecque S, Saeland. Langerin, a novel C-type lectin specific to langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of birbeck granules. *Immunity.* 12: 71-81. 2000.
44. Nielsen M, Lund O, Buus S, Lundegaard C. MHC class II epitope predictive algorithms. *Immunology.* 130 (3): 319-328. 2010.
45. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392: 245 - 252. 1998.
46. Greaves P, Gribben JG. The role of B7 family molecules in hematologic malignancy. *Blood.* 121 (5): 734 – 744. 2013.
47. Fife BT, Pauken KF, Eagar TN, Obu T, Wu J, Tang Q, Azuma M, Krummel MF, Bluestone JA. Interaction between PD – 1 and PD L1 promote tolerance by blocking the TCR induced stop signal. *Nature immunology.* 10 (11):1185 – 1192. 2009.
48. Kumar V. Adenosine as an endogenous immunoregulator in cancer pathogenesis: where to go?. *Purinergic Signalling.* 9: 145 – 165. 2013.

49. Lasisi TJ, Oluwasola AO, Lasisi OA, Akang EE. Association between Langerhans cells population and histological grade of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Pathol.* 17(3): 329–333. 2013.
50. Arany I, Adler-Storthz K, Chen Z, Tying SK, Brysk MM. Tumor differentiation dependent local immunity in human head and neck cancers. *Cancer Lett.* 123 (2): 173 – 6. 1998.
51. Schlesselman JJ. Case – control studies. Design, conduct, analysis. Monographs in epidemiology and biostatistics. Oxford University Press. 1982.
52. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk A. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferation CD4T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med.* 192(9): 1213 – 22. 2000.
53. Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, Sullivan EL, Munoz O, Wood CR, Greenfield A, Freeman GJ. Blockade of programmed death- 1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *The Journal of Immunology*, 170: 1257- 1266. 2003.
54. Feng P, Yee KK, Rawson NE, Feldman LM, Feldman RS, Breslin PAS. Immune cells of the human peripheral taste system: dominant dendritic cells and CD4 T cells. *Brain, Behavior and Immunity* 23: 760- 766. 2009.
55. Wei Q, Costanzi S, Balasubramanian R, Gao ZG, Jacobson KA. A_{2B} adenosine receptor blockade inhibits growth of prostate cancer cells. *Prurinerbic Signalling.* 9: 271 – 280. 2013.
56. Panther E, Idzko M, Herouy Y, Rheinen H, Gebicke-Haerter PJ, Mrowietz U, Dichmann S, Norgauer J. Expression and function of adenosine receptors in human dendritic cells. *The FASEB Journal.* 15: 1963 - 1970. 2001.

ANEXO 1

Descripción del método por el cual se realizó el estudio de inmunohistoquímica, corresponde al método empleado en el Laboratorio de Inmunoterapia e Ingeniería de tejidos en la Facultad de Medicina de la UNAM.

ESTUDIO DE INMUNOHISTOQUÍMICA

La inmunohistoquímica es una técnica que permite identificar constituyentes celulares de tejidos (antígenos) por medio de interacciones antígeno - anticuerpo. La existencia del sitio de unión del anticuerpo se identifica, ya sea por marcaje directo del anticuerpo o por uso de un segundo método de marcaje (técnicas de laboratorio en biología celular y molecular).

El marcador utilizado (epítotope presente/ ausente) en inmunohistoquímica fueron marcadores de diferenciación y proteínas tejido específico, estos marcadores utilizados como antígenos pueden ser visualizados por medio de anticuerpos específicos, generados de diferentes especies de animales, estos anticuerpos una vez unidos a su receptor en el tejido son identificados por medios colorimétricos, la reacción química generada fue en la membrana celular.

Los tejidos de lengua fueron obtenidos, se fijaron en formaldehído al 10% y posteriormente se incluyeron en parafina de los cuales se realizaron once cortes a 4µm de grosor.

La primera muestra de la serie se tiñó con hematoxilina - eosina y los demás se utilizaron para inmunohistoquímica con el método de detección indirecto y el sistema biotina - avidina /peroxidasa (SBAP).

En el sistema biotina - avidina /peroxidasa (SBAP) el anticuerpo primario es posteriormente reconocido por un anticuerpo secundario químicamente unido con biotina, que actúa como puente para la unión del complejo avidina - peroxidasa y revelado con colorante; la enzima en presencia de peróxido de hidrógeno lleva a cabo un proceso de oxidación del colorante y la reacción final es la que puede ser visualizada.

Se emplearon los siguientes anticuerpos:

AntiCD1a marcas Santa Cruz BT y Serotec (con segundo anticuerpo anti-mouse)

Anti HLA-DR marca Zymed, anti HLA DP DQ DR marca Serotec (con segundo anticuerpo anti-mouse)

Anti CD 273 (B7 - DC, PD - L2) marca Biolegend (con segundo anticuerpo anti-ratón)

Anti CD 274 (B7 - H1, PD - L1) marca Biolegend (con segundo anticuerpo anti-ratón)

Anti receptor de adenosina A2a marca Novus Biological (con segundo anticuerpo anti- ratón).

Anti CD 80 marca Abcam (con segundo anticuerpo anti - conejo)

Anti CD 86 marca Abcam (con segundo anticuerpo anti - conejo)

Anti CD 207 marca abcam (con segundo anticuerpo anti - ratón)

El procedimiento empleado para la realización de inmunohistoquímica fue la siguiente:

1. Los cortes del tejido cortados a 4 μ m fueron montados en laminillas silanizadas, se identifico cada laminilla con el número de biopsia correspondiente.
2. Las laminillas se colocan en una canastilla de acero inoxidable y se colocaron en el horno a 60° C por 30 min para desparafinar las muestras.
3. Se hidrataron las muestras histológicas pasando las laminillas colocadas en la canastilla por

Xilol 1 por 5 minutos

Xilol 2 por 3 minutos

Alcohol absoluto 1 por 3 minutos

Alcohol absoluto 2 por 2 minutos

Alcohol al 90% por 2 minutos

Alcohol al 80% por 30 segundos

Alcohol al 70% por 30 segundos

Agua destilada por 5 minutos

4. Se realizó re-expresión de antígenos

Las laminillas con los tejidos se colocaron en buffer de citratos con un pH 6 al 0.1M en un vaso Coplin de propileno.

Se coloca el vaso Coplin de propileno al baño María en la olla a presión, cuando llega a los 120° C se deja 3 minutos más y se apaga.

Se deja enfriar la olla y que pierda la presión por 10 minutos y se procede a abrirla

El vaso de Coplin de propileno que contiene las laminillas se colocan en agua fría por 10 minutos.

Se sacan las laminillas del vaso Coplin de propileno y cada una se lava con agua destilada.

Las laminillas se colocan en una cámara húmeda y a cada una se le coloca PBS (Tampón de fosfato salino).

Se retira el exceso de PBS de las laminillas.

5. Se inhibe la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 10% en agua.

Se cubre cada tejido de las laminillas con la peroxidasa endógena y se dejan sobre la cámara húmeda por 10 minutos.

6. Se hacen tres lavados a cada laminilla con PBS cada uno por 5 minutos.

7. Se lava cada laminillas con PBS albúmina al 0.1% por 10 min.

8. Se incuba cada laminilla con el primer antígeno toda la noche en el refrigerador a 4° C.

Primeros antígenos: anti HLA – II 1: 100; anti CD1a concentrado, anti CD80 1:100, anti CD86 1:300, anti CD273 1:30, anti CD274 1: 30, anti CD207 1:100, anti receptor de adenosina A2a 1:500.

9. Se hacen tres lavados a cada laminilla con PBS cada uno por 5 minutos.

10. Se lava cada laminilla con PBS albumina al 0.1% por 10 minutos.

11. Se retira el exceso de PBS y se incuba cada laminilla con el segundo antígeno biotilado, se colocan en la cámara húmeda y se llevan al horno por 30 minutos a 37° C.

Segundos anticuerpos: Anti Mouse (para: anti CD1a, anti CD 207, anti HLA – II, anti CD273, anti CD 274), Anti Rabbit (para: anti CD80. Anti CD86, anti receptor de adenosina A2a).

12. Se saca la cámara húmeda y sin destapar se deja enfriar a temperatura ambiente por 3 minutos.

13. Se hacen tres lavados a cada laminilla con PBS cada uno por 3 minutos.

14. Se retira el exceso de PBS, y a cada laminilla sobre el tejido se incuba con el complejo estreptoavidina peroxidasa (HRP) se colocan en la cámara húmeda y se pone en el horno por 30 min a 37° C.

15. Se saca la cámara húmeda y sin destapar se deja enfriar a temperatura ambiente por 3 minutos.

16. Se hacen cuatro lavados a cada laminilla con PBS cada uno por 3 minutos.

17. Con guantes de latex se revela con DAB (3,3 deaminobencidina) colocándoselo al tejido de cada laminilla y dejándolo por 5 minutos.

18. Se observa la laminilla en el microscopio óptico hasta que la reacción calorimétrica sea adecuada de acuerdo al control positivo.

19. Se lava con agua destilada las laminillas (los restos van en un frasco de desecho especial que contiene hipoclorito de sodio al 6%).

20. Se retira el exceso de agua y se tiñe cada tejido de las laminillas con Hematoxilina por 1 minuto.

21. Se lava cada laminilla con agua de corriente.

22. Se deshidrataron las muestras histológicas pasando las laminillas colocadas en la canastilla por

Alcohol al 70% por 30 segundos

Alcohol al 80% por 30 segundos

Alcohol al 90% por 30 segundos

Alcohol absoluto 1 por 3 minutos

Alcohol absoluto 2 por 3 minutos

Xilol 1 por 5 minutos

Xilol 2 por 5 minutos

23. Se dejan secar las laminillas y se les coloca resina y el cubreobjetos a cada una de las muestras, se dejan secando en la campana de extracción por 20 minutos.

24. Se observa cada laminilla al microscopio.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

1. PBS

Cloruro de sodio (NaCl) 7 g

Fosfato de sodio monobásico (Na_2HPO_4) 1.48 g

Fostato de potasio dibásico (KH_2PO_4) 0.43 g

Ajustar pH a 7.4 con NaOH (Hidróxido de sodio)

Aforar a 1 Lt o la cantidad necesaria.

2. PBS ALBUMINA

Cloruro de sodio (NaCl) 7 g

Fosfato de sodio monobásico (Na_2HPO_4) 1.48 g

Fostato de potasio dibásico (KH_2PO_4) 0.43 g

Albumina 0.1%

Twin 20 al 0.05%

Ajustar pH a 7.4 con NaOH (Hidróxido de sodio)

Aforar a 1 Lt o la cantidad necesaria.

3. BUFFER DE CITRATOS

Biocare medical. Reveal Decloaker 10 X diluído 1/10 para usar en agua destilada (40 ml para un vaso de copling)

4. PEROXIDASA ENDOGENA

5. DAB

Kit Zymed

1000µm de agua destilada

32µm de cada reactivo (1, 2, 3) y disolver cuando se agregan.

Preparar antes de usar y dejarlo reaccionar de 5 a 10 minutos. Se usa para la reacción con agua destilada.

6. LAMINILLAS CON SILANO

Lavar las laminillas con dextran y luego enjuagarlas con agua corriente.

Colocar las laminillas en una canastilla, secarlas.

Colocar las laminillas en alcohol al 96% por 15 minutos

Secar las laminillas en el horno.

Colocar las laminillas en Silano al 5 % en acetona pura por 5 minutos.

Lavar las laminillas con agua corriente.

Secar las laminillas en el horno.

Usarlas o guardarlas sin que se empolven.