

DEPARTAMENT D' ESTOMATOLOGIA

ESTUDIO CLÍNICO DEL CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS
ESCAMOSAS Y SU RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE
LOS LINFOCITOS T REGULADORES INFILTRANTES EN
EL TEJIDO TUMORAL.

M^a GRACIA SARRIÓN PÉREZ

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2011

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 20 de maig de 2011 davant un tribunal format per:

- Dr. Jorge Basterra Alegria
- Dr. German Esparza Gómez
- Dra. M^a José García-Pola Vallejo
- Dr. Jose López López
- Dr. Antonio Fons Font

Va ser dirigida per:

Dr. José Vicente Bagán Sebastián

Dr. Carlos Camps Herrero

Dr. Rafael Sirera Pérez

©Copyright: Servei de Publicacions

M^a Gracia Sarrión Pérez

I.S.B.N.: 978-84-370-8510-4

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115



VNIVERSITAT  DE VALÈNCIA
Departament d'Estomatologia

**ESTUDIO CLÍNICO DEL CARCINOMA ORAL DE
CÉLULAS ESCAMOSAS Y SU RELACIÓN CON LA
EXPRESIÓN DE LOS LINFOCITOS T REGULADORES
INFILTRANTES EN EL TEJIDO TUMORAL**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

M^aGracia Sarrión Pérez

Dirigida por:

Prof. José Vicente Bagán Sebastián

Dr. Carlos Camps Herrero

Dr. Rafael Sirera Pérez



VNIVERSITAT D VALÈNCIA
Departament d'Estomatologia

José Vicente Bagán Sebastián, Catedrático de Medicina Bucal del Departamento de Estomatología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia,

Carlos Camps Herrero, Jefe del Servicio de Oncología Médica del Hospital General Universitario de Valencia,

Rafael Sirera Pérez, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia

CERTIFICAN QUE:

D^a M^aGracia Sarrión Pérez ha realizado la tesis doctoral titulada:

“ESTUDIO CLÍNICO DEL CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS Y SU RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE LOS LINFOCITOS T REGULADORES INFILTRANTES EN EL TEJIDO TUMORAL” bajo nuestra dirección, informándola favorablemente para que pueda ser evaluada, leída y defendida ante el tribunal correspondiente de nuestra Universidad.

Lo que firmamos en Valencia a 25 de Mayo de 2010

Fdo. Prof. José Vte. Bagán Sebastián

Dr. Carlos Camps Herrero

Dr. Rafael Sirera Pérez

A Camilo, Mari, Paula y Jose

Agradecimientos:

En primer lugar quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Prof. José Vicente Bagán, responsable de que esta tesis doctoral sea una realidad, por su esfuerzo, dedicación y ayuda, así como por todos los conocimientos que he aprendido de él.

Al Dr. Carlos Camps, al Dr. Rafael Sirera y a su equipo por su colaboración prestada en este trabajo.

A la Dra. Yolanda Jiménez y la Dra. Carmen Gavaldá por el interés, ánimo y cariño que me han demostrado constantemente.

A todos y a cada uno de los integrantes del Servicio de Estomatología del Hospital General Universitario de Valencia, y en especial a los médicos adjuntos por su confianza y ayuda, con los que he compartido muchos ratos de trabajo, aportando cada uno de ellos su granito de arena.

A mis compañeros de investigación y de trabajo, con los que las horas de mayor esfuerzo se hacen más amenas.

Por último, y no menos importantes, a mis padres y a mi hermana porque sin su cariño y apoyo incondicional no hubiese podido realizar mis sueños, que son los suyos. Y como no, a Jose por su paciencia en los días duros de trabajo y por las horas que no he podido compartir con él en este largo camino.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	12
1. EL CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS	14
1.1. Incidencia	14
1.2. Etiología	16
1.3. Cuadro clínico	27
1.4. Diagnóstico	43
1.5. Histopatología	47
1.6. Estadiaje	49
1.7. Tratamiento	51
1.8. Pronóstico	53
2. TOLERANCIA INMUNE	55
2.1. Concepto	55
2.2. Células T reguladoras	56
2.3. Mecanismos de supresión de actividad inmunológica antitumoral mediados por células T reguladoras	59
2.4. Marcadores pronósticos	60
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	62
MATERIAL Y MÉTODOS	66
1. RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS	69
2. RECOGIDA DE MUESTRAS	72
3. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS	72
3.1. Extracción y purificación del ARN	72
3.2. Transcripción reversa	73
3.3. PCR cuantitativa a tiempo real	74
3.4. Cuantificación relativa de la expresión génica	76
4. MÉTODOS ESTADÍSTICOS	76
RESULTADOS	80
1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS DATOS CLÍNICOS	82
1.1. Datos generales	82
1.2. Síntomas y exploración clínica de la cavidad oral	86
1.3. Exploración radiológica de la lesión	89
1.4. Estadio	90
1.5. Anatomía patológica	92
1.6. Tratamiento	92
1.7. Evolución	93

2. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	94
3. ANÁLISIS DEL TIEMPO DE SUPERVIVENCIA	95
3.1. Análisis descriptivo global del tiempo de supervivencia	106
3.2. Análisis del tiempo de supervivencia según los diferentes factores	108
3.2.1. Edad	108
3.2.2. Sexo	110
3.2.3. Sintomatología	102
3.2.4. Localización de la lesión	115
3.2.5. Tipo de lesión	119
3.2.6. Tamaño clínico	122
3.2.7. Afectación ósea	124
3.2.8. Diámetro mayor	126
3.2.9. Diámetro menor	128
3.2.10. Área	130
3.2.11. Adenopatías	132
3.2.12. Valor TNM	134
3.2.13. Estadio	138
3.2.14. Diferenciación histológica	140
3.2.15. Marcadores tumorales	142
3.3. Modelo multivariante de regresión de Cox	153
DISCUSIÓN	156
CONCLUSIONES	170
BIBLIOGRAFÍA	174

INTRODUCCIÓN

1. EL CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS

Los tumores de la cavidad oral y orofaringe pueden ser epiteliales, mesenquimales o hematolinfoides. Los tumores epiteliales se clasifican en aquellos que se originan en el epitelio de recubrimiento de la cavidad oral y orofaringe y los derivados de los tejidos de las glándulas salivales (1).

El cáncer de cabeza y cuello es uno de los 10 cánceres más frecuente en el mundo, con aproximadamente 500000 casos nuevos diagnosticados anualmente.

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) se define como una neoplasia invasiva con diferentes grados de diferenciación y con gran tendencia a metastatizar fácilmente ganglios linfáticos, presentándose predominantemente en adultos de 50-60 años, fumadores y consumidores de alcohol. Es el tumor maligno de origen epitelial más frecuente en la cavidad oral y supone del 2 al 3% de todas las neoplasias y más del 90% de los cánceres orales (2).

1.1. INCIDENCIA

El COCE es el más frecuente de los carcinomas orales y representa aproximadamente el 3-4% de las neoplasias malignas y más del 95% de todos los cánceres de cabeza y cuello. La incidencia del COCE es variable dependiendo del área geográfica estudiada. En el año 2002 los cánceres de la cavidad oral representaron 274000 casos, con casi dos tercios de ellos en hombres. El área más afectada es Melanesia (31,5 por cada 100000 hombres y 20,2 por cada 100000 mujeres). La tasa en hombres es mayor en el este de Europa (11,3 por cada 100000), sur de Europa (9,2 por cada 100000), sur de Asia (12,7 por 100000), sur de África (11,1 por 100000), Australia y Nueva Zelanda (10,2 por 100000). En mujeres, la incidencia es relativamente mayor en el sur de Asia (8,3 por 100000). Estos patrones reflejan la prevalencia de factores de riesgo específicos como el uso de tabaco/alcohol en el este y sur de Europa y sur

de Asia o el hábito de mascar betel en el sur de Asia y Melanesia. La alta tasa de cáncer oral en Australia es debido al cáncer de labio (relacionado con la exposición solar). La mortalidad es por término medio menos que la mitad de la incidencia (3). En el año 2006, esta neoplasia se convirtió en el sexto cáncer más frecuente de Taiwan y en el cuarto entre la población taiwanesa masculina (1). En la India es la neoplasia más frecuente, representando hasta el 40-50% de todos los cánceres. Sin embargo, en EEUU o Europa su incidencia es sólo del 4%. Esta diferencia se debe a los diferentes hábitos en el consumo del tabaco aunque la tasa de incidencia ha aumentado últimamente en la mayoría de las regiones (4-6).

Entre la población afroamericana de EEUU la tasa de cáncer de la cavidad oral y orofaringe es 4 veces mayor que en blancos y latinos, siendo la supervivencia también menor en ese grupo etario asociado a un diagnóstico en etapas más tardías.

El COCE es más frecuente en hombres pero el incremento en el hábito tabáquico de la mujer desde finales de los años sesenta ha hecho que la proporción hombre/mujer haya cambiado de 10:1 a 2:1 o llegando incluso a cifras similares en ambos sexos en algunas localizaciones. Concretamente en España, se estima que la incidencia del cáncer oral es para los hombres de 5,7 a 12,9 casos por 100000 habitantes/año, y entre las mujeres del 0,6 al 2,1 por 100.000 habitantes/año (7). Antiguamente el COCE estaba asociado a hombres de 60 años consumidores de tabaco y alcohol, pero actualmente se ha observado un incremento en la incidencia del COCE (rango 0,4%-4%) en pacientes menores de 40 años y en mujeres en los que estos factores de riesgo no están presentes (8). De hecho, mientras la incidencia del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello ha descendido en general, la incidencia del cáncer orofaríngeo y de lengua ha aumentado en pacientes jóvenes, grupo en el cual el tiempo de consumo de tabaco y/o alcohol es menor (9-11). Así, durante el periodo 1973-2001 se ha observado un incremento del COCE en la lengua, base de la lengua y amígdala en EEUU en pacientes blancos de 20 a 40 años (11,12). Datos similares se han detectado en otros países como Inglaterra, Escocia, Suiza, Escandinavia y Eslovaquia (13).

Algunos autores sugieren que este hecho está unido al consumo de tabaco sin combustión (mascado o esnifado) o de marihuana por parte de la población joven (10, 14). Otros autores argumentan que algunas características biológicas del cáncer son específicas de la edad. Schantz y cols. (15) hipotetizaron que el desarrollo de este cáncer en gente joven podría estar relacionado con una predisposición genética a la carcinogénesis ambiental, debida a anormalidades cromosómicas, a un incremento de la susceptibilidad al daño cromosomal o a una deficiencia en la reparación del ADN.

1.2. ETIOLOGÍA

El tabaco y el alcohol son los factores mutágenos más importantes, pero el betel, la exposición a radiaciones, las infecciones o las inmunodepresiones son relevantes en algunos casos. Muchos factores están relacionados con el estilo de vida pero el entorno y la genética pueden también tomar parte.

Tabaco y alcohol

Los factores de riesgo por excelencia son el consumo de tabaco y abuso de alcohol, los cuales aumentan el riesgo sinérgicamente. El tabaco y el alcohol son los responsables del 75% de los cánceres orales y orofaríngeos en Europa, América y Japón. El aumento en la incidencia del COCE se ha atribuido al aumento del consumo de alcohol en el Norte de Europa y al aumento de tabaco en zonas del Sur de Europa. Aproximadamente el 80% de los pacientes con COCE han sido fumadores, teniendo estos pacientes un riesgo de 5 a 7 veces mayor de desarrollar tumores de cabeza y cuello que los no fumadores. Además, los pacientes que continúan fumando después del diagnóstico del tumor inicial tienen el riesgo multiplicado por 6 de desarrollar un segundo tumor primario en el tracto aerodigestivo que los pacientes que dejan de fumar (16).

Más de 300 carcinógenos han sido identificados en el tabaco o en sus componentes solubles que se filtran en la saliva. Los más estudiados son el benzopireno y las nitrosaminas específicas del tabaco, nitroso-nor-nicotina (NNN), nitrosopirrolidina, nitrosodimetilamina y 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK). El benzopireno es un potente carcinógeno que se encuentra en cada cigarro de 20 a 40 nanogramos. Las NNN y NNK se generan durante la pirolisis, pero también de manera endógena en algunos tipos de tabaco sin combustión, actuando localmente sobre los queratinocitos o en varios tejidos del organismo cuando se absorben. Interfieren en la replicación del ADN produciendo por tanto, un daño en la replicación de las células, incluyendo aquellas que intervienen en la respuesta inmune (17).

Sin embargo, gran parte del tabaco consumido en el mundo se hace sin combustión. Este tipo de tabaco está asociado con el desarrollo de COCE, aunque en una tasa menor que la del tabaco tradicional. El tabaco sin combustión normalmente se usa en forma de “paan”, “gutka” y “snuff” o rapé (“naswar”). El tabaco “paan” es la hoja de betel rellena de nuez de areca, lima, catecú y tabaco; la “gutka” es una combinación de nuez de betel, tabaco, especias aromáticas con o sin lima e hidróxido de calcio; el “naswar” es principalmente tabaco con una pequeña cantidad de especias, lima, cardamomo y mentol. El “paan” y el “gutka” son masticables mientras que el “naswar” se sitúa en contacto con las membranas mucosas, a través de las cuales la nicotina se absorbe, provocando la degeneración maligna en el sitio de la ubicación del tabaco (18). El tabaco mascado es muy común en los países asiáticos. El “snuff” o rapé son comunes en Escandinavia y en EEUU. El “toombak”, la forma usada en Sudán, contiene gran cantidad de nitrosaminas, y los consumidores de este tipo de tabaco muestran un incremento significativo del riesgo de padecer COCE (17,19). El tabaco mascado (betel) es la mayor causa de carcinoma de células escamosas oral y orofaríngeo en el continente indio, parte del Sudeste de Asia, China y Taiwan y en comunidades emigrantes, especialmente cuando el betel consumido contiene nuez de areca e hidróxido de calcio. La nuez de areca ha sido declarada como carcinógeno humano por un grupo experto de la *International Agency for*

Research on Cancer (IARC) (2003). En la India, el hábito de mascar tabaco supone el 50% de los carcinomas orales y orofaríngeos en hombres y más del 90% en mujeres (20).

El alcohol es un factor de riesgo de los cánceres del tracto digestivo superior. Estudios de laboratorio previos demostraron que el alcohol mejoraba la penetración de los carcinógenos del tabaco a través de la mucosa oral. Esto se produciría debido a la capacidad del alcohol de eliminar el componente lipídico que rodea el estrato espinoso epitelial (21,22). Otros estudios demostraron que el alcohol producía cambios tisulares macroscópicos y microscópicos, incluyendo cambios displásicos con queratosis, incremento de la densidad de la capa basal y atrofia (23). También se ha demostrado que el acetaldehído, primer metabolito del etanol, es carcinogénico. La IARC de la Organización Mundial de la Salud (OMS) concluyó en 1999 que existía suficiente evidencia en animales experimentales, aunque no en humanos, para declarar la naturaleza carcinogénica del acetaldehído (24). Aunque la mayoría del metabolismo del alcohol se produce en el hígado, se ha demostrado científicamente que también se produce a nivel extrahepático, concretamente en la cavidad oral. Un estudio previo ha demostrado que los *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus intermedius* y *Streptococcus mitis* son capaces de producir grandes cantidades de acetaldehído, por lo que esto supone una nueva teoría en el mecanismo de la patogénesis del alcohol en el cáncer. Este mecanismo podría explicar que pacientes con una higiene oral deficiente tengan un riesgo aumentado de desarrollar cáncer oral (25). Hasta el 50% de los pacientes diagnosticados de COCE presentan en su historia el consumo de alcohol. Estudios que intentan determinar las diferencias entre vino, cerveza y licores fuertes indican que la consumición excesiva de todo tipo de bebida alcohólica aumenta el riesgo. Aquellos pacientes que consumen más de 100g de alcohol al día tienen el riesgo 30 veces mayor de padecer COCE que aquellos que consumen menos de 15g de alcohol al día. El riesgo de degeneración maligna es de 100 veces mayor en grandes fumadores y bebedores. Entre el 34% y 57% de los pacientes continúan consumiendo alcohol y tabaco tras el diagnóstico del cáncer oral, hecho que aumenta el riesgo y las complicaciones asociadas con la cirugía y la recurrencia del cáncer, reduciendo además la supervivencia de la enfermedad (26).

El alcohol también se utiliza en los enjuagues bucales como disolvente para otros ingredientes. Sin embargo, al 10-12% actúa como conservante, antiséptico y agente caústico. Hay estudios que han demostrado que las altas concentraciones de alcohol en los enjuagues pueden tener efectos perjudiciales orales como desprendimiento epitelial, queratosis, ulceración de la mucosa, gingivitis, petequias y dolor. Esta posibilidad de que el alcohol de los enjuagues pueda contribuir en el desarrollo del cáncer oral no es nueva, sino que ya en el año 1983, Wynder y cols. (27) llevaron a cabo un estudio retrospectivo en pacientes que habían desarrollado un cáncer oral, encontrando mayor riesgo de desarrollarlo en mujeres que habían usado enjuagues con alcohol. Mientras algunos estudios apoyan esta hipótesis (28), otros no encuentran suficiente relación entre el uso diario de enjuagues bucales y el desarrollo del cáncer oral (29-31).

Virus del Papiloma Humano (VPH)

La participación del VPH en la carcinogénesis oral y orofaríngea fue propuesta inicialmente por Syrjänen y cols. (32) en el año 1983. Existen más de 120 tipos diferentes de VPH, con aproximadamente 40 tipos asociados a lesiones del tracto genital. El VPH, especialmente los genotipos que se sabe que tienen potencial oncogénico en el cérvix uterino y en piel, como el VPH 16 y 18, se encuentra en pequeñas proporciones a nivel oral. Estudios recientes sugieren que el VPH podría ser el responsable de una pequeña fracción de los cánceres orales y hasta de un 40% de los orofaríngeos (33-35). Esto ha llevado a pensar que el VPH provenga del contacto oro-genital (36,37). EL VPH se une a los receptores específicos proteicos de la membrana de los queratinocitos; una vez allí, elabora proteínas tempranas (E) que regulan el ciclo celular del tejido huésped y la mitosis. Las proteínas E6 y E7 son las más importantes; la E6 se une a la proteína p53 que se encarga de detener la división celular. Al unirse, ésta se degrada perdiendo su función. La proteína E7 se une a la proteína Rb y de igual modo se interrumpe el ciclo de regulación celular (38). Aunque el VPH se ha relacionado con la patogénesis del cáncer oral, la asociación es mayor con el cáncer orofaríngeo (39). Distintos

estudios muestran que los cánceres de cabeza y cuello asociados al VPH son histológicamente diferentes, están asociados a otros factores de riesgo y además presentan un mejor pronóstico que los cánceres VPH negativos (40-42).

Oncogenes

Se han descrito cambios en una serie de cromosomas en el COCE, implicándose más de 100 genes, pero el concepto fundamental en el cáncer es la sobreexpresión de oncogenes y/o inactivación de los genes supresores. Actualmente se conoce que el inicio del proceso de la carcinogénesis se debe a la aparición de los llamados oncogenes, los cuales son genes que, por una alteración en la secuencia del ADN, se transforman en genes que producen las mutaciones celulares, lo que conducirá a una proliferación celular excesivamente expresada. Por otro lado están los genes supresores tumorales. Los oncogenes a su vez pueden suprimir o inactivar a los genes supresores tumorales y por lo tanto permitir la expresión de otros oncogenes que estaban bloqueados. Los genes supresores tumorales son el primer sistema de vigilancia tumoral. Uno de ellos es el p53 que repara el ADN dañado o provoca la apoptosis. El gen p53 es considerado por muchos autores como "el guardián del genoma". A partir de este gen se sintetiza una proteína, que lleva el mismo nombre y se activa cuando la célula se dispone a dividirse, para vigilar la secuencia normal de acontecimientos genéticos que permiten la proliferación celular. Si el material genético de la célula resulta dañado o si algún sistema de control se desajusta, ésta lo detecta e intenta restaurarlo. Si la lesión no es grave, la p53 detiene la división celular y activa los genes reparadores del ADN. Si la p53 estima que el daño es irreparable, entonces ordena que se pongan en marcha los mecanismos genéticos para que la célula entre en apoptosis o muerte celular programada. Si el gen p53 sufre alguna mutación, no permite que la célula sea eliminada mediante la muerte programada, tampoco se ocupa de reparar los daños en el ADN y da lugar al inicio del proceso tumoral. Este gen es el más frecuentemente mutado en los cánceres humanos, más de un 50 % de los tumores tienen genes p53 anormales, produciéndose una proteína alterada. Varios estudios han detectado la proteína p53 mutante mediante

inmunohistoquímica en cánceres como el de pecho, pulmón, colon y cabeza y cuello (1). Existe mucha variabilidad en lo que respecta a la prevalencia de la expresión alterada del p53 en el COCE, oscilando entre 20 y 50%. También se ha detectado una expresión anormal de la proteína p53 en las displasias epiteliales orales en torno a un 10-50% existiendo un aumento en la prevalencia de la expresión del p53 a medida que aumenta el grado de displasia (43). Por lo tanto, el p53 continúa siendo el gen más estudiado y actualmente hay evidencia que tiene un papel predictivo en el resultado del paciente y en la respuesta al tratamiento (44-46).

Los polimorfismos que afectan a la expresión génica de citoquinas tales como la interleuquina 4, -6, -8, -10 así como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) parecen estar fuertemente asociados con un aumento de riesgo de COCE (45,46).

Lesiones precancerosas/ desórdenes potencialmente malignos

Existen unas lesiones y condiciones potencialmente malignas (Tabla 1), en donde la leucoplasia, el liquen plano oral y la eritroplasia son las más frecuentes. La OMS define la lesión precancerosa como un tejido de morfología alterada, más propenso a cancerizarse que el tejido equivalente de apariencia normal. Por estado precanceroso se entiende aquel proceso generalizado que se asocia con un riesgo significativamente mayor de presencia de cáncer. Se consideran lesiones precancerosas la leucoplasia y la eritroplasia, y estados precancerosos, la sífilis, la disfagia sideropénica, la fibrosis submucosa bucal, el liquen plano oral y el lupus eritematoso discoide (45,47). Recientemente la OMS recomienda utilizar el término desórdenes potencialmente malignos y no hacer la distinción entre lesión y estado precanceroso (45).

Tabla 1. Desórdenes potencialmente malignos (45)

POTENCIAL MALIGNO APROXIMADO	DESORDEN	FACTOR ETIOLÓGICO CONOCIDO
Muy alto (85%)	Eritroplasia	Tabaco/Alcohol
Alta según circunstancia (30%)	Queilitis actínica	Exposición solar
	Candidiasis crónica	Candida Albicans
	Disqueratosis congénita	Genética
	Leucoplasia (no homogénea)	Tabaco/Alcohol
	Leucoplasia verrugosa proliferativa	VPH
	Queratosis sublingual	Tabaco/alcohol
	Fibrosis submucosa	Nuez de areca
	Leucoplasia sifilítica	Treponema pallidum
	Xeroderma pigmentosum	Genética
Bajo (< 5%)	Atipia en pacientes inmunocomprometidos	VPH
	Diabetes	Idiopático
	Lupus eritematoso discoide	Autoinmune
	Síndrome de Fanconi	Genética; anemia
	Leucoplasia homogénea	Fricción/Tabaco/Alcohol
	Liquen plano	Idiopático
	Síndrome de Plummer-Vinson	Deficiencia de hierro
	Esclerodermia	Autoinmune

VPH: Virus del papiloma humano

La leucoplasia oral (LO) es la lesión precancerosa más frecuente de la mucosa oral. Se define como una lesión predominantemente blanca, no desprendible al raspado, que no puede catalogarse como ninguna otra lesión y en la que existe un riesgo constatado de desarrollar cáncer oral. Estudios recientes señalan una incidencia menor a lo reflejado años atrás. Actualmente se sitúa alrededor del 0,4%. La mayor frecuencia aparece en varones de 40-50 años siendo la encía y la mucosa yugal las localizaciones predominantes (47,48). Etiológicamente se distinguen dos tipos de leucoplasias: las asociadas al tabaco y las idiopáticas, siendo estas últimas de etiología desconocida. El tabaco fumado es el agente etiológico más destacable, pero otras formas de tabaco como el “snuff” o el betel están igualmente relacionados con la LO. También se ha descrito la relación con el uso de Viadent®, tanto en pasta como en colutorio (49). Existen dos tipos de leucoplasias, las homogéneas y las no homogéneas. La no homogéneas se subdividen en eritroleucoplasias, nodulares y exofíticas. La leucoplasia homogénea se caracteriza por ser una lesión predominantemente blanca, uniforme y plana. Por el contrario, la leucoplasia no homogénea es una lesión blanca o roja con una superficie irregular, nodular o exofítica. Histológicamente las leucoplasias pueden tener o no displasia epitelial. Existen una serie de factores que van a indicar el mayor o menor riesgo de malignización de una leucoplasia. Así, la localización en suelo de boca y superficie ventral de lengua, la presencia de displasia epitelial y el tipo de leucoplasia (no homogénea) conllevan mayor riesgo de malignización (2,50).

La eritroplasia se define como una lesión de la cavidad oral que presenta áreas rojas y que no puede ser reconocida como otra condición. La eritroplasia es menos frecuente que la leucoplasia, oscilando su rango de prevalencia entre 0,02% y 0,83%. Es más frecuente en pacientes de mediana edad con un ligero predominio en hombres. La etiología de la eritroplasia ha sido poco estudiada, siendo los factores predisponentes el alcohol y el tabaco. La localización más frecuente es el paladar blando y el suelo de boca, aunque pueden verse afectadas otras áreas como la zona retromolar y el labio. La lesión puede ser lisa, granular o moteada. En ocasiones se halla asociada a otras patologías, como el liquen plano oral. El grado

de malignización de la eritroplasia es muy elevado siendo frecuente la presencia de un carcinoma in situ (1,2).

La leucoplasia verrugosa proliferativa (LVP) fue descrita por Hansen (51) en 1985 como una enfermedad de origen desconocida que presenta una gran tendencia a desarrollar áreas de carcinoma. Es una forma especialmente agresiva de LO que se inicia como una simple placa blanca homogénea pero con tendencia a extenderse y a hacerse multifocal. La etiología es desconocida y no se conocen factores desencadenantes. Según estudios realizados, a diferencia de la LO, no parece tener relación con el tabaco. Se han barajado diferentes agentes etiológicos como el VPH, la *Candida Albicans*, oncogenes y factores de crecimiento. Es más frecuente en mujeres con una edad media de 70 años. La LVP puede manifestarse en muchos lugares de la mucosa oral, siendo la mucosa yugal donde suele iniciarse, seguida del paladar duro y blando, la mucosa alveolar, la lengua, suelo de boca, encía y labios. Las lesiones empiezan como una simple placa blanca homogénea que con el tiempo se extiende, haciéndose multifocal, exofítica y verrugosa. Presenta una alta tendencia a la recurrencia tras el tratamiento y un alto índice de desarrollar COCE (70-75%), además de una alta proporción de cancerización de campo. La localización de los COCE desarrollados en pacientes con LVP no suele ser la típica de los carcinomas orales convencionales, sino que es frecuente encontrarlos en encía.

Numerosos estudios han recalcado que el liquen plano oral (LPO), especialmente su forma erosiva, se asocia con un incremento del riesgo de cáncer, sin embargo, otras investigaciones ponen en duda esta asociación debido a la ausencia de un criterio diagnóstico universal del LPO (52,53).

La anemia ferropénica junto con la disfagia (conocido como síndrome de Plummer-Vinson o Paterson-Kelly) está asociada a un elevado riesgo de desarrollar carcinoma de la cavidad oral, orofaríngeo y de esófago (1,2,45).

La inmunosupresión parece predisponer a algunos individuos a un aumento del riesgo de cáncer, así por ejemplo, los carcinomas de labio se han observado en pacientes transplantados de riñón que reciben tratamiento inmunosupresor y los carcinomas orales han

sido documentados en pacientes jóvenes con el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (1,45,46).

La fibrosis submucosa es una enfermedad crónica, de etiología desconocida, que se puede localizar en cualquier área de la cavidad oral. En ella se produce una destrucción del tejido conjuntivo seguido de una fase de resolución cicatricial en la que se depositan densas bandas de colágeno, desapareciendo la elasticidad normal de la mucosa oral que se torna rígida y provoca limitaciones funcionales. Debido a la reducción de la vascularización, el epitelio se atrofia y queda más susceptible a la posible acción de los carcinógenos. Con frecuencia se encuentran signos de displasia epitelial, lo cual apoya el carácter precanceroso de esta enfermedad (1,45,54).

El lupus eritematoso discoide es una enfermedad inflamatoria del tejido conjuntivo producida por la aparición de autoanticuerpos pero de etiología desconocida. La frecuencia de malignización de la lesión discoide es del 0,1% al 4,2 %, siendo el borde bermellón del labio inferior el lugar más frecuente de transformación maligna (1,45,55).

Recientemente se ha relacionado la diabetes mellitus con el COCE. La base molecular que relaciona ambas patologías involucra al sustrato 1 del receptor de la insulina (IRS-1) y a la quinasa de adhesión focal (FAK) (56,57).

Otros factores

Algunos estudios implican a la higiene oral y al estado de los dientes, ya que se ha observado en los pacientes con COCE muy mala higiene oral, dientes en mal estado y una importante periodontitis; sin embargo, estas variables se asocian con el consumo de alcohol y tabaco por lo que su implicación en el cáncer es incierta. Recientemente se ha demostrado que un grupo de *Streptococcus* encontrado en la flora oral normal produce acetaldehído a partir del etanol mediante la enzima alcohol deshidrogenasa (58,59), implicando de este modo a la placa bacteriana como factor de riesgo.

También se ha citado el beneficio de una dieta rica en antioxidantes como prevención frente al cáncer, ya que se ha observado una baja ingesta de frutas y verduras en pacientes con cáncer oral. Según la OMS, el 35-55% de los cánceres y aproximadamente el 15% de los cánceres orofaríngeos pueden estar atribuidos a deficiencias dietarias o desequilibrios. La relación entre la nutrición y el cáncer puede verse desde dos puntos de vista. Por una parte, el efecto directo de los carcinógenos en la comida y los aditivos alimentarios, y por otra la síntesis *in vivo* de carcinógenos causada por cambios en el metabolismo debido a alteraciones de los hábitos dietarios (carcinogénesis indirecta). Como medidas preventivas se ha propuesto una dieta rica en vegetales y fruta, la reducción de la ingesta de grasas monosaturadas y carne roja o demasiado hecha, evitar la carne cocinada en la barbacoa, el uso de papel de aluminio y el microondas. Se recomiendan niveles óptimos de micronutrientes como la vitamina C, E, caroteno, folato y antioxidantes (60). Algunos autores sugieren que incluso con la presencia de tabaco y alcohol, una dieta rica en frutas y vegetales puede prevenir alrededor de un cuarto de los casos de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y posiblemente la mitad de los COCE (61,62).

El roce continuo con dientes o prótesis también ha sido propuesto como promotor en el proceso de la carcinogénesis oral. Algunos autores no encuentran relación topográfica entre la irritación de la mucosa y la localización del tumor mientras que otros encuentran relación en aquellos campos inicialmente afectados por otros carcinógenos como el tabaco o el alcohol (63, 64).

1.3. CUADRO CLÍNICO

El COCE suele aparecer como una tumoración ulcerada e indurada o como una úlcera dolorosa o indolora. Sin embargo, también puede manifestarse como una lesión blanca y roja con pérdida de elasticidad. A menudo se acompaña de adenopatías cervicales. El tamaño de las lesiones suele variar desde unos milímetros hasta varios centímetros (1,2). La localización más frecuente es la lengua, el suelo de la boca y la zona del paladar blando-pilar amigdalino.

Sintomatología

El dolor es el síntoma común de los pacientes con cáncer, representando del 30 al 40% de sus principales quejas. Aunque el dolor va a constituir el síntoma principal, generalmente el paciente lo experimenta cuando la lesión ya ha alcanzado un tamaño notable, siendo entonces cuando solicita asistencia médica. Así, las lesiones iniciales suelen pasar inadvertidas, ya que muchas veces son asintomáticas. A medida que la neoplasia se desarrolla el paciente puede notar la presencia de una úlcera que no cura. La sintomatología en las lesiones de mayor tamaño puede variar desde una leve molestia hasta un fuerte dolor, sobre todo en las lesiones localizadas en lengua. Otros síntomas incluyen: otalgia, hemorragias, movilidad de dientes, halitosis, dificultad para la fonación, deglución y uso de prótesis, trismus, parestesias, etc. En algunas localizaciones, como la lengua o suelo de boca, el dolor puede producirse desde el inicio. En el caso del COCE de lengua, la movilidad de ésta produce el roce con los dientes provocando dolor y en el suelo de boca, es la propia alimentación lo que puede producirlo. Por el contrario, en los carcinomas de labio y mucosa yugal, las algias sólo son intensas en estadios avanzados (1,2).

Ocasionalmente los pacientes pueden presentar adenopatías cervicales sin ninguna otra sintomatología de las lesiones orales.

En los estadios terminales, los pacientes pueden presentar fístulas orocutáneas, sangrados, anemia severa y caquexia (1,2).

Mashberg y cols. (65) en su estudio sobre 102 carcinomas orales encontraron la tumefacción, el ardor de boca y el dolor como los síntomas más frecuentemente reportados por los pacientes. Según Jainkitivong y cols. (66) la tumefacción y/o el dolor fueron los primeros signos y/o síntomas en los 342 pacientes de COCE estudiados (52,6%). En el estudio realizado por Al-Rawi y cols. (67) sobre 1425 casos de COCE, la ulceración y la tumefacción fueron las principales quejas referidas por los pacientes, seguidas del dolor, el sangrado, la disminución de la movilidad lingual, la disfagia y la parestesia. Cuffari y cols. (68) estudian un total de 1440 pacientes de COCE, de los cuales en el 19,2% el dolor fue el primer síntoma. Registraron 12 tipos de dolor, siendo los más frecuentes el dolor/irritación de garganta (37,6%) y el dolor en la lengua (14%) con las regiones más frecuentemente afectadas por el tumor (lengua y paladar). Otros síntomas incluían: dolor al tragar, dolor dental, dolor de oído, boca ardiente, dolor al masticar y dolor facial y de cuello. El dolor apareció en el 88,1% de los casos en estadios III/IV.

Gorsky y cols. (69) analizan una serie de pacientes con COCE de lengua, encontrando que el síntoma principal eran las molestias localizadas en lengua (66,5%). El 29% de los pacientes notaron un bulto en la lengua. Síntomas como el dolor de oído, cambios en la voz, tumoraciones cervicales y disfagia eran más comunes en los tumores de base de lengua. Un 35% de los pacientes refirieron pérdida de peso (Tabla 2).

Tabla 2. Sintomatología encontrada según los distintos autores.

Autor	Pacientes estudiados	Síntomas más frecuentes
Mashberg y cols. 1989 (65)	102 COCE	Tumefacción Ardor de boca Dolor
Jainkitivong y cols. 2009 (66)	342 COCE	Tumefacción y dolor (52,6%)
Al-Rawi y cols. 2007 (67)	1425 COCE	Ulceración (34%) Tumefacción (22,7%) Dolor (5,1%)
Cuffari y cols. 2006 (68)	1440 COCE	Dolor/irritación garganta (37,6%) Dolor lengua (14%)
Gorsky y cols. 2004 (69)	COCE en lengua	Molestias en lengua(66,5%) Tumefacción lingual(29%) Pérdida de peso(35%)

Localización

El COCE puede aparecer en cualquier localización aunque existen ciertas áreas en las que se observa con mayor frecuencia. La localización más frecuente es la lengua y el suelo de la boca, sobre todo en los países occidentales, donde se encuentra en más del 50% de los casos. Otras zonas de afectación son la mucosa yugal, el área retromolar, la encía, el paladar blando y menos frecuentemente, el dorso de la lengua y el paladar duro. El labio se afecta con más frecuencia en algunas áreas geográficas. En el sureste de Asia el cáncer oral es más común en la mucosa yugal, representando más del 40%; éste es debido al uso del “paan”, el cual es mantenido en la boca durante largos periodos de tiempo.

La mayor parte de los estudios que existen en la literatura muestran una mayor frecuencia de localización en la lengua. En un estudio realizado por Hirata y cols. (70) sobre 478 carcinomas en la cavidad oral entre 1947 y 1970, excluyendo los de labio, encontraron que un 40% se localizaban en la lengua y un 33% en suelo de boca. Oliver y cols. (71) en una revisión de 92 casos encontraron que el borde lateral y superficie ventral de la lengua, seguido del suelo de la boca fueron las localizaciones más frecuentes. Concluyen además que la

superficie ventral de la lengua y el suelo de la boca son los lugares más frecuentes cuando las lesiones afectan a varios sitios. El borde lateral de la lengua y suelo de boca (con extensión al paladar blando y área tonsilar en forma de herradura) se ha propuesto como una zona de alto riesgo de desarrollar cáncer (72, 73).

Estudios más recientes como el de Brandizzi (74) y cols. sobre 274 COCE encuentran un 30% de los casos con localización lingual, un 29% en encía y proceso alveolar, un 18% en mucosa yugal, un 10% en suelo de boca y un 4% en labio. Porcentajes más altos de cáncer en lengua encuentran Ariyoshi y cols. (75) con un 40,2%, seguido de la encía (32,7%), la mucosa yugal (10,1%) y el suelo de la boca (9%). Sin embargo, dependiendo de la zona geográfica, existen estudios que discrepan en cuanto a la localización más frecuente del COCE. Así, en una revisión realizada en Nigeria por Effiom (76) y cols. sobre 233 casos de COCE, aparece la encía como el lugar más afectado, seguido de la lengua y constituyendo el suelo de boca la localización menos afectada. Por otra parte, Nemes y cols. (77) en un estudio realizado en Hungría encuentran que el suelo de boca es la localización más frecuente (27,7%), seguido del labio (26,9%) y de la lengua (22,7%). En un estudio sobre 1425 casos de COCE en Iraq aparece el labio como la zona más frecuente de afectación con un 25,6%, seguida de la lengua (67). Mientras que en un estudio realizado en Zimbabwe por Chidzonga y Mahomva (78), la mayor localización del COCE aparece en la encía mandibular, seguido de la lengua y del suelo de boca. En menor frecuencia se afectan la encía maxilar, la mucosa yugal, el paladar y el labio.

Dahlstrom y cols. (79) comparan el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello entre pacientes fumadores y bebedores y pacientes no fumadores ni bebedores de alcohol. En ambos grupos de pacientes la localización más frecuentemente afectadas fue la lengua. En los pacientes con hábitos tóxicos le seguía el suelo de boca en frecuencia, la encía mandibular y el triángulo retromolar, mientras que en el otro grupo de pacientes el segundo lugar lo ocupaba la encía mandibular, seguida de la mucosa yugal y la encía maxilar. En el estudio de Poveda-Roda y cols. (80) también aparece la lengua como la localización más frecuente tanto en fumadores como en no fumadores.

Se ha visto un importante crecimiento de la incidencia del cáncer oral en pacientes jóvenes, en los que no se observan los factores de riesgo tradicionales como el tabaco y el alcohol. La mayoría de los estudios muestran un mayor porcentaje de afectación del COCE a nivel lingual. Así, Siriwardena y cols. (81) compararon el COCE en pacientes jóvenes y en pacientes de mayor edad encontrando que la lengua fue el lugar más afectado (41%) en los pacientes jóvenes mientras que para el grupo de mayor edad la localización más frecuente fue la mucosa yugal (37,5%) y la encía (25%). Sasaki y cols. (82) en su estudio sobre carcinomas orales en pacientes menores de 40 años encuentran mayor predilección por la lengua (51,3%), seguido del suelo de boca, mucosa yugal y encías. Sin embargo, Ribeiro y cols. (83) encuentran un ligero predominio de lesiones en paciente jóvenes en el suelo de boca (30%), seguido de la lengua (28%) y del labio inferior (13%). Otros estudios centrados en pacientes jóvenes, como el de Mallet y cols. (84), encuentran que la superficie lingual más afectada es el borde lateral correspondiendo a un 51% de los 52 carcinomas orales estudiados, seguida de la cara ventral con un 30% y del dorso lingual (15%).

También se ha observado un crecimiento del COCE en mujeres. Así, Girod y cols. (85) estudian el carcinoma oral y orofaríngeo en 171 mujeres, encontrando que el 37,4% de las neoplasias se localizaban en lengua, el 29,2% en orofaringe, el 8,8% en suelo de boca, el 5,9% en encía y el resto en otras localizaciones de la cavidad oral (Tabla 3).

Tabla 3. Distribución de la localización de los COCE según cada autor

Autor	Casos estudiados	Localización más frecuente
Hirata y cols. (70)	478 Carcinomas	Lengua (40%) Suelo de boca (33%)
Olivier y cols. (71)	92 COCE	Borde lateral y superficie ventral de la lengua Suelo de la boca
Brandizzi y cols. 2008 (74)	274 COCE	Lengua (30%) Encía y proceso alveolar (29%) Mucosa yugal (18%) Suelo de boca (10%) Labio (4%)
Ariyoshi y cols. 2008 (75)	1809 COCE	Lengua (40,2%) Encía (32,7%) Mucosa yugal (10,1%) Suelo de boca (9%)
Effiom y cols. 2008 (76)	233 COCE	Encía (55%) Lengua (17,6%) Suelo de boca (6,4%)
Nemes y cols. (77)	119 COCE	Suelo de boca (27,7%) Labio (26,9%) Lengua (22,7%)
Al-Rawi NH y Talabani (67)	1425 COCE	Labio (25,6%) Lengua (20,4 %) Reborde alveolar (17,8 %)
Chidzonga y Mahomva 2006 (78)	1723 COCE	Encía mandibular (27,6 %) Lengua (18,4 %) Suelo de boca (16,2 %)
Dahlstrom y cols. 2007 (79)	1131 CCECC (pacientes fumadores y bebedores)	Lengua (58,9%) Encía (24,6%) Mucosa yugal (9,6%)
	171 CCECC (pacientes no fumadores ni bebedores)	Lengua (42,3%) Suelo de boca (24,9%) Encía (20,3 %)
Poveda-Roda y cols. (80)	56 COCE (fumadores)	Lengua (44,6%) Encía (17,9%) Suelo de boca (16,1%)
	67 COCE (no fumadores)	Lengua (53,7%) Encía (25%) Mucosa yugal (11,9%)
Siriwardena y cols. 2005 (81)	100 COCE (<40 años)	Lengua (41%) Mucosa yugal (21 %) Reborde alveolar (9%)
	100 COCE (> 50 años)	Mucosa yugal (37,5%) Lengua (12%) Reborde alveolar (25%)
Sasaki y cols. 2005 (82)	529 COCE (<40 años)	Lengua (54,3%)
Ribeiro y cols. 2009 (83)	46 COCE	Suelo de boca (30%) Lengua (28%) Labio inferior (13%)
Mallet y cols. 2009 (84)	52 COCE lengua	Borde lateral (51%) Cara ventral (30%) Dorso lingual (15%)
Girod y cols. (85)	171 carcinoma oral y orofaríngeo	Lengua (37,4%) Orofaringe (29,2%) Suelo de boca (8,8%) Encía (5,9%)

Tipo de lesión

Las lesiones iniciales pueden pasar inadvertidas, ya que en muchas ocasiones son asintomáticas. Suelen ser placas de color rojo (eritroplasia), acompañadas o no de lesiones de color blanco (eritroleucoplasia). En algunas ocasiones puede tener el aspecto clínico de una leucoplasia. A medida que la lesión crece se vuelve más exofítica, sin embargo, algunos tumores pueden tener un crecimiento endofítico caracterizado por una superficie ulcerada y deprimida (2).

Las lesiones avanzadas pueden presentarse de tres formas clínicas:

a) Las formas exofíticas son tumoraciones de crecimiento hacia fuera. Aparecen como masas sobrelevadas de amplia base y superficie nodular. A la palpación se percibe la infiltración en los bordes y en la base (Figura 1).



Figura 1. Carcinoma oral de células escamosas, forma exofítica

b) La forma ulcerada es la más frecuente. Se caracteriza por una úlcera de forma irregular, profunda, de bordes evertidos, fondo sucio, consistencia dura e infiltración en profundidad (Figuras 2 y 3).



Figura 2. Carcinoma oral de células escamosas en encía y mucosa yugal, forma ulcerada



Figura 3. Detalle de la lesión anterior

c) En la forma mixta se asocian las dos formas anteriores (Figuras 4 y 5).



Figura 4. Carcinoma oral de células escamosas en lengua, forma mixta

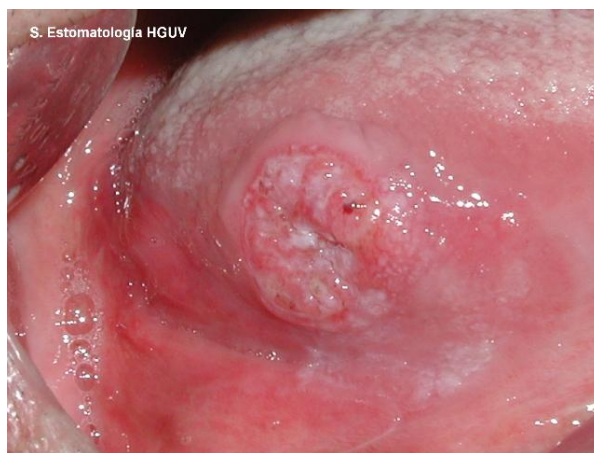


Figura 5. Detalle de la lesión anterior

Al-Rawi y Talabani (67) encontraron la ulceración y la tumoración exofítica como las dos formas clínicas más frecuentes de presentación, al igual que Jainkittivong y cols. (66). Effiom y cols. (76) también hallaron que el 85,4% de los pacientes revisados presentaron el COCE en forma de tumoración o ulceración. En un estudio sobre 40 carcinomas orales de células escamosas de lengua y suelo de boca, en estadio clínico I y II, Martínez-Conde y cols. (86) reportaron que el 65% de las neoplasias eran ulceradas.

Los cánceres muy avanzados se presentan como crecimientos ulcero-proliferativos junto con áreas de necrosis y extensión hacia estructuras vecinas, como el hueso, músculo y piel.

El COCE suele presentar una forma clínica característica según la localización:

Los cánceres de lengua pueden aparecer como un área roja interpuesta con nódulos o como una úlcera infiltrante en profundidad, provocando una reducción en la movilidad lingual. Estos tumores son dolorosos. Representan hasta un 49% de los cánceres orales. Entre el 55 y 70% de los cánceres de lengua aparecen en el borde lateral de lengua, entre el tercio medio y posterior; sólo un tercio de los carcinomas de lengua surgen en la base de la lengua donde es más difícil visualizarlos y las lesiones son menos sintomáticas (87). Los cánceres de la base de la lengua se presentan tardíamente en el curso de la enfermedad como un crecimiento ulcerado, doloroso e indurado.

Los carcinomas del suelo de la boca pueden manifestarse como un área roja, una pequeña úlcera o una lesión papilar. La mayoría de los pacientes presentan molestias o irritación en el lugar de la neoplasia. Los estadios avanzados se asocian con babeo. Representan hasta un 30% de los COCE de la cavidad oral.

Los cánceres de la mucosa yugal suelen manifestarse como una úlcera con bordes evertidos e indurados y con crecimiento verrucoso o exofítico. En estadios avanzados estas lesiones infiltran el hueso adyacente o la piel.

En el labio inferior, normalmente aparecen en el borde bermellón como una costra indurada o una ulceración. Los carcinomas en el labio superior son raros, originándose a

menudo en la piel y extendiéndose a la mucosa. Los COCE de labio suelen manifestarse en pacientes adultos con exposición crónica al sol.

El COCE de encía generalmente se presenta como un crecimiento ulcero-proliferativo. En el reborde alveolar pueden manifestarse como una dificultad o molestia al llevar las prótesis o como pérdida de dientes asociada a dolor y sangrado durante el cepillado.

Los tumores del paladar duro a menudo se manifiestan como un crecimiento exofítico o papilar, más que como una lesión ulcerada o lisa. Los pacientes suelen acudir refiriendo mal ajuste de la prótesis o ulceraciones que no curan. Representan del 3 al 6% de los COCE de la cavidad oral.

Los carcinomas del paladar blando y úvula aparecen frecuentemente como una lesión ulcerada con márgenes evertidos o como una masa exofítica.

El cáncer de amígdala suele aparecer como una lesión exofítica o ulcerada. A veces puede presentarse en forma de adenopatías sin ningún otro signo o síntoma.

Tamaño

Las lesiones de COCE presentan un tamaño variable, pudiendo oscilar desde unos milímetros a varios centímetros en los casos más avanzados. Las lesiones iniciales asintomáticas suelen tener un tamaño reducido.

El estudio de Mashberg y cols. (65) revisa un total de 102 COCEs asintomáticos en el que el 17% de las lesiones eran menores de 2 cm (T1), el 60% eran lesiones entre 2 y 4 cm (T2) y el 23% eran T3 o T4. Además encuentran relación entre el tamaño de las lesiones y la ulceración, el sangrado y las adenopatías. Cifras algo diferentes reportan Brandizzi y cols. (74) en sus 274 casos, con un 29% de COCEs menores de 2 cm, un 46% entre 2 y 4 cm y un 18% con lesiones mayores de 4 cm. Martínez-Conde y cols. (86) en un estudio retrospectivo sobre 40 pacientes con COCE en estadio I y II encuentran que el diámetro medio de la lesión es de 2,6 cm. Oliver y cols. (71) revisan 92 casos de COCE en los que las lesiones tenían un tamaño entre 0,5 cm y 8 cm y la mayoría de ellas eran menores de 4 cm en su dimensión mayor, con un

76% de los pacientes en estadios I y II. Sasaki y cols. (82) encuentran mayor número de pacientes con lesiones tumorales menores de 2 cm, tanto en menores de 40 años (48,6%) como en pacientes mayores de 40 años (44,5%). Sin embargo también hallan un número elevado de pacientes mayores de 40 años con lesiones en estadio T4 (32,7%). Otros estudios realizados sobre pacientes jóvenes, como el de Mallet y cols. (84) también reportan mayores porcentajes de pacientes con lesiones menores de 4 cm (74%). Asimismo, en un estudio sobre mujeres con COCE realizado por Girod y cols. (85), encuentran mayor número de pacientes con lesiones T1/T2 (72,5%).

A medida que la tumoración va creciendo, su tamaño aumenta, infiltrando y extendiéndose a tejidos vecinos y pudiendo llegar incluso a invadir los huesos maxilares y la piel (Figuras 6 y 7).



Figura 6. Carcinoma oral de células escamosas de gran tamaño en suelo de boca y encía



Figura 7. Afectación ósea de la lesión anterior

Así, Ghoshal y cols. (88), en un estudio sobre carcinomas de la mucosa yugal encuentran que la mayoría de los pacientes se presentaron en estadios avanzados: un 55% tenían lesiones T4 entre los cuales un 40,7% de estos pacientes tenían afectación de la piel y el hueso subyacente.

Adenopatías

Las metástasis ganglionares se producen cuando las células neoplásicas infiltran o embolizan los ganglios linfáticos, alcanzando los ganglios regionales y produciendo una multiplicación de las células tumorales en el interior de los mismos y reemplazando la arquitectura normal. El tamaño puede ser variable, desde uno a varios centímetros, la forma suele ser redondeada, dura y, en ocasiones, adherida a planos profundos debido a la ruptura de la cápsula del ganglio y su invasión a tejidos circundantes.

El porcentaje de ganglios con infiltración neoplásica es bastante elevado, entre un 30-50%. Los ganglios más comúnmente afectados son los submaxilares, seguidos de los de la cadena cervical.

Los ganglios linfáticos del cuello se dividen en 6 niveles basados en estructuras anatómicas (Figura 8). Cada área anatómica de la cavidad oral contiene un drenaje linfático a

más de 300 ganglios en el cuello. El nivel I incluye el grupo de ganglios submentales y sublinguales. El nivel IA, que corresponde a los ganglios submentales, está limitado en su parte inferior por el hueso hioides, por la sínfisis mandibular en su parte superior y lateralmente por el músculo digástrico. El nivel IB (grupo submandibular) está limitado por el vientre posterior del digástrico en su parte inferior, por el cuerpo mandibular en su límite superior, por el vientre anterior del músculo digástrico y posteriormente por el músculo estilohioideo. El nivel II incluye los ganglios de la cadena yugular superior rodeando la vena yugular interna y el nervio espinal accesorio. El nivel IIA está limitado inferiormente por el plano horizontal que forma el cuerpo inferior del hueso hioides, superiormente por la base del cráneo, en su parte anterior por el músculo estilohioideo y posteriormente por el plano vertical que forma el nervio accesorio espinal. El nivel IIB limita inferiormente por el plano horizontal determinado por el cuerpo inferior del hueso hioides, superiormente por la base del cráneo, anteriormente por el nervio accesorio espinal y posteriormente por el borde lateral del músculo esternocleidomastoideo (ECM). El nivel III incluye la cadena ganglionar de la yugular media rodeando la vena yugular interna. Está limitado inferiormente por el borde inferior del cartílago cricoides, superiormente por el cuerpo inferior del hueso hioides, anteriormente por el borde lateral de la musculatura esternohioidea y posteriormente por el borde lateral del ECM o por las ramas sensitivas del plexo cervical. El nivel IV incluye la cadena linfática de la yugular inferior rodeando la vena yugular interna. Limita en su parte inferior por la clavícula, superiormente por el plano horizontal que forma el borde inferior del cartílago cricoides, en su parte anterior por el borde lateral de la musculatura esternohioidea y posteriormente por las mismas estructuras que el nivel III. El nivel V incluye todos los ganglios del triángulo posterior, los ganglios del espinal accesorio y cervicales transversos y todos los ganglios de la yugular alta, media y baja por la parte posterior del ECM. El nivel VA está limitado inferiormente por el borde inferior del cartílago cricoides, superiormente por el ápice formado por la convergencia del ECM y los músculos trapecios, en su parte anterior por el ECM o las ramas sensitivas del plexo cervical y posteriormente por el músculo trapecio. El nivel VB limita en su parte inferior por las

clavículas, superiormente por el borde inferior del hueso hioides, y anterior y posteriormente por las mismas estructuras que el nivel VA, respectivamente. El nivel VI incluye los ganglios linfáticos pretraqueales, paratraqueales y prelaríngeos o también llamados los ganglios Delphian. Está limitado inferiormente por la escotadura supraesternal, en su parte superior por el hueso hioides y lateralmente por las arterias carótidas. Este nivel es también conocido como el compartimento anterior.

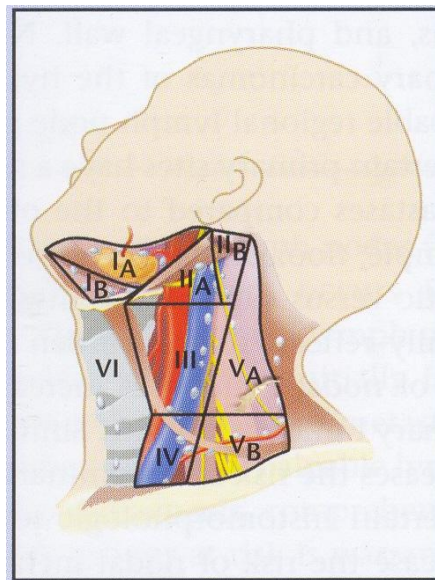


Figura 8. Niveles de los ganglios linfáticos cervicales

(Imagen tomada del libro "Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours")(1)

Los niveles de mayor riesgo de metástasis del COCE son los niveles I, II, III y en menor extensión el IV. El drenaje linfático es complejo y no sigue una secuencia regular de niveles en muchos pacientes.

El drenaje linfático de la lengua lo constituyen principalmente el nivel II, seguido de los niveles III y I. El COCE que afecta al borde lateral de la lengua generalmente metastatiza de manera ipsilateral, sin embargo, cuando el tumor afecta a la punta o al cuerpo de la lengua

puede presentar metástasis bilaterales. Los carcinomas del suelo de boca originan metástasis en los ganglios submandibulares y digátricos. El drenaje linfático de la mucosa yugal es el nivel I, seguido del nivel II. Las metástasis ganglionares en el cáncer de labio son infrecuentes. Los carcinomas del paladar duro generalmente metastatizan los niveles I y II, pudiendo afectar también a los nódulos retrofaríngeos.

La invasión bilateral cervical es probable que aparezca en tumores que afectan la línea media, particularmente tumores de la parte posterior lingual y del paladar blando. La infiltración extracapsular de los ganglios se asocia a un mal pronóstico (1,2). La presencia de una adenopatía metastásica reduce la supervivencia del paciente de 5 años al 50%. Así mismo, la diseminación extracapsular desciende la supervivencia otro 50%.

La diseminación por vía hematógena se produce cuando se han infiltrado los ganglios cervicales y posteriormente se ha producido una infiltración extracapsular. En el COCE este tipo de diseminación no es tan frecuente como la linfática, siendo el pulmón el órgano más frecuentemente infiltrado.

Brandizzi y cols. (74) encontraron en sus pacientes que el 40% cursaron sin adenopatías, mientras que un 39% presentaron adenopatías unilaterales o bilaterales móviles y sólo el 10 % las presentaron adheridas a planos profundos. Datos muy similares encuentran Mashberg y cols. (65) con una afectación ganglionar de un 45%. Ariyoshi y cols. (75) reportan cifras ligeramente menores de adenopatías. En el estudio de Sasaki y cols. (82) el 14,3% de los pacientes menores de 40 años presentaba afectación ganglionar mientras que en los pacientes mayores de 40 años la afectación ascendía al 22,7%. Datos similares encuentran Mallet y cols. (84) con sólo un 24% de pacientes con adenopatías u Oliver y cols. (71) con un 20%. Otros autores como Ghoshal y cols. (88) reportan un mayor porcentaje de pacientes con afectación ganglionar (62%) en carcinomas de la mucosa yugal, siendo el 54,8% limitados a N1.

1.4. DIAGNÓSTICO

Según Scully y Bagán (45), cualquier bulto solitario oral, úlcera, lesión blanca o roja persistente durante más de tres semanas o alveolo no cicatrizado, parestesia o pérdida de dientes sin causa evidente debería considerarse como un cáncer hasta que se demostrara lo contrario (Tabla 4).

Tabla 4. Características sugestivas de COCE

Lesión roja (eritroplasia)
Lesión mixta blanca/roja (eritroleucoplasia); lesión blanca irregular (leucoplasia verrugosa)
Tumoración
Úlcera de bordes evertidos y mal definidos
Dolor o parestesia
Vasos sanguíneos anormales sobre una tumoración
Pérdida dental
Alveolo no cicatrizado tras extracción

La exploración física debe incluir la inspección visual y palpación de las superficies mucosas, la palpación bimanual del suelo de la boca y la valoración de presencia de adenopatías cervicales.

El diagnóstico se confirma mediante la biopsia y está siempre indicada. La muestra debe tomarse de la zona más sospechosa, evitando áreas necróticas o muy ulceradas, pudiendo ser necesaria más de una biopsia. Si ésta fuera negativa ante la fuerte sospecha clínica de un lesión maligna, es importante reconsiderar una segunda toma de biopsia u otra opinión histológica. La biopsia se realizará tomando un fragmento de la lesión; en los casos iniciales se tomará de la zona que clínicamente se observe más alterada y en los casos avanzados se tomará bien de los bordes de la úlcera o en la zona que se palpe más induración o infiltración.

Las radiografías intraorales y la ortopantomografía pueden servir de ayuda para valorar la afectación ósea. La tomografía axial computarizada (TC) y la resonancia nuclear magnética (RNM) se utilizan normalmente como técnica complementaria para evaluar y estadiar el tumor primario y las adenopatías cervicales. Además estas técnicas ofrecen más información sobre la extensión local de la enfermedad y pueden ayudar a diagnosticar metástasis linfáticas. La TC es útil para evaluar la afectación ósea mientras que la RNM proporciona mayor información de la extensión de los tejidos blandos y de la afectación linfática y neurovascular. La TC se realiza normalmente preoperatoriamente con contraste intravenoso para delimitar bien entre estructuras vasculares y linfáticas. Se toman cortes entre 3 y 5 mm desde la base del cráneo hasta la clavícula. Una adenopatía se considera patológica cuando es mayor de 1,5 cm en la región yugulodigástrica o mayor de 1 cm en las otras regiones del cuello. La forma de las adenopatías ha sido sugerido como un criterio para distinguir las adenopatías patológicas, así la forma de una adenopatía normal o hiperplásica semeja una judía mientras que una forma esférica o redondeada es característico de una metástasis. Junto al tamaño, el indicador más específico de una metástasis en la imagen de TC es la presencia de necrosis intranodal. La RNM tiene la ventaja de proporcionar una visión del cuello y del tumor primario no disponible en la TC. La caracterización de los tejidos blandos y la localización anatómica proporcionada por estas dos técnicas complementarias las hacen herramientas valiosas en la valoración preoperatoria de los cánceres orales y orofaríngeos.

El estudio de las adenopatías mediante ultrasonidos ha aumentado en los países europeos. Es una técnica no invasiva, rápida, fácilmente repetible y económica. Puede usarse como estudio inicial, realizándose más estudios de imagen si son necesarios. La sensibilidad de la sonografía en la detección de nódulos linfáticos se sitúa en torno al 89-95% mientras que la especificidad es del 80 al 95%. Los criterios para evaluar la afectación ganglionar maligna incluyen la valoración de la forma, tamaño y necrosis central. Las adenopatías metastásicas se caracterizan por ser esféricas y frecuentemente hipocogénicas. Algunos estudios han concluido

que la ultrasonografía intraoral puede servir también para determinar el espesor del tumor y los márgenes del tumor en el momento de la cirugía (89).

La precisión de la técnica PET (Positron Emission Tomography) combinada con la TC para la detección de tumores primarios y metástasis cervicales ha demostrado ser comparable a la TC/RNM, aunque significativamente mayor para los carcinomas primarios. La técnica PET se basa en el realce de la actividad metabólica del tejido tumoral en el cual el aumento de la glicólisis es generalmente característico. Es una modalidad de imagen que puede usarse cuando la evaluación clínica es de N0. La técnica PET puede ser también útil en el control rutinario para la detección de recurrencias en pacientes subclínicos (90).

Aunque las metástasis a distancia del COCE son infrecuentes, se suele realizar una radiografía de tórax para descartar metástasis pulmonar.

En los pacientes que presentan adenopatías cervicales junto con el tumor primario intraoral, la biopsia debe tomarse en la zona del tumor y no en el nódulo cervical. En tales situaciones, la punción-aspiración con aguja fina (PAAF) puede esclarecer la afectación linfática. En pacientes con adenopatías cervicales que no se encuentre el tumor primario en boca, la PAAF puede ayudar a establecer el diagnóstico. En aquellos pacientes en los que la PAAF no sea diagnóstica pero exista una sospecha de COCE, está indicada la biopsia excisional de los ganglios.

También los genes se han querido utilizar como métodos de diagnóstico y pronóstico y como predictores, especialmente el p53, ya que la acumulación anormal de la proteína p53 es frecuente encontrarla en muchos cánceres humanos como el de pulmón, colon, pecho y cabeza y cuello (91, 92).

El azul de toluidina se ha utilizado como marcador de las lesiones orales potencialmente malignas, pudiendo identificar lesiones tempranas. Puede servir para perfilar la extensión del epitelio displásico o del carcinoma a la hora de realizar las biopsias o escisiones, además de detectar tumores multicéntricos o secundarios y ayudar en el seguimiento de los pacientes con cáncer oral. Hay estudios que sugieren que el azul de toluidina se une a las zonas donde se han

producido cambios genéticos (pérdida de la heterocigosidad) que se han asociado con la displasia y con el COCE. Puede servir de ayuda para tomar la biopsia, pero sin llegar a sustituirla (93,94).

Recientemente se han lanzado al mercado diferentes productos que intentan diagnosticar el COCE mediante la aplicación de luz fluorescente en la lesión. Algunos estudios concluyen que la aplicación de luz fluorescente ayuda a diagnosticar la lesión, sobre todo aquellas que pueden pasar inadvertidas mediante la exploración visual por parte de un profesional no especializado en patología oral (95). A pesar de la gran oferta de productos, según los expertos, no está clara su utilidad, siendo actualmente la exploración clínica y la toma de biopsia las actitudes más fidedignas.

En cuanto al diagnóstico de las metástasis cervicales, se han realizado numerosos estudios para determinar el ganglio centinela. El estudio del ganglio centinela se basa en el análisis anatómico-patológico del primer ganglio linfático donde confluye la linfa drenada desde la zona tumoral. Se trata, por lo tanto, del primer ganglio linfático que recibe células tumorales en caso de producirse una diseminación tumoral vía linfática, y a partir de la cual se afectan el resto de ganglios de la cadena linfática. La mayoría de los estudios realizados hasta la fecha tratan de demostrar la validez de esta técnica diagnóstica a partir de trabajos donde se incluyen pacientes con carcinoma de células escamosas de cavidad oral u orofaringe, clasificados clínicamente y radiográficamente como T1/T2 N0 M0. La mayoría de los pacientes con el estadio clínico N0 son tratados de manera profiláctica mediante un vaciamiento cervical selectivo y sólo el 30% aproximadamente de estos pacientes presentaría una progresión cervical de la enfermedad si no se realizara este tratamiento. Puesto que el vaciamiento cervical selectivo conlleva una morbilidad considerable y, según algunos autores, sería innecesario para aproximadamente tres cuartos de los pacientes N0, los estudios van encaminados a conseguir la validación de esta técnica ya que podría disminuir el número de vaciamientos cervicales selectivos, con la consiguiente disminución de la morbilidad de esta técnica quirúrgica (fístulas, infecciones, hemorragias, lesiones de estructuras nobles...), disminución del tiempo quirúrgico y de los

costes del tratamiento realizándose el vaciamiento cervical sólo en aquellos casos donde el ganglio centinela estuviera afectado (96, 97).

El diagnóstico precoz es el factor fundamental para mejorar la supervivencia del paciente, pudiéndose alcanzar cifras de hasta el 80-90% en lo que respecta a la curación del paciente.

1.5. HISTOPATOLOGÍA

El carcinoma oral de células escamosas se caracteriza por la proliferación de nidos, cordones o islotes neoplásicos que recuerdan en mayor o menor grado el epitelio escamoso de donde derivan y que penetran en el tejido conectivo. Se han propuesto diversas clasificaciones desde el punto de vista patológico, siendo la más aceptada la clasificación de la OMS que los divide en tres grados de malignidad, según el grado de queratinización, el pleomorfismo celular y nuclear y la actividad mitótica.

- Bien diferenciados: presentan una gran semejanza con las células epiteliales, se observa abundante formación de queratina en forma de perlas córneas o como queratinización celular individual. La atipia celular y el número de mitosis es mínima. Se observa un infiltrado inflamatorio crónico peritumoral bastante marcado, formado por linfocitos y células plasmáticas.
- Moderadamente diferenciados: presentan menor semejanza con las células epiteliales, y el grado de atipia nuclear así como el número de mitosis es mayor. Por otra parte, disminuye la formación de perlas córneas y la queratinización individual.
- Pobrementemente o poco diferenciados: la similitud con las células epiteliales es tan pequeña que en ocasiones es difícil establecer el origen escamoso de estos tumores y hay que recurrir a técnicas inmunohistoquímicas para demostrar si hay positividad a la citoqueratina. Existe un gran pleomorfismo nuclear y un elevado número de mitosis.

Los tumores bien y moderadamente diferenciados pueden ser agrupados como de bajo grado, mientras que los pobremente diferenciados e indiferenciados son de alto grado.

En el carcinoma de células escamosas existen otras variantes:

❖ Carcinoma verrugoso

Es un carcinoma poco agresivo de variedad histológica bien diferenciado. Tiene un excelente pronóstico y un comportamiento clínico poco agresivo. Se localiza más frecuentemente en la cavidad oral y en la laringe, aunque este tumor también puede afectar otras localizaciones como la región anorrectal, los genitales y la piel de las extremidades. La patogenia de esta neoplasia se ha asociado con las lesiones verrugosas benignas y factores carcinogénicos del tabaco, especialmente del tabaco mascado. Sin embargo se han reportado casos de pacientes sin historial de tabaco. Se ha sugerido una posible relación entre el carcinoma verrugoso y el VPH. Clínicamente, el carcinoma verrugoso se caracteriza por un crecimiento exofítico en forma de coliflor con una superficie verrugosa de coloración blanco-grisácea, pudiendo presentar también áreas eritematosas. A pesar de ser tratable en estadios iniciales, puede tornarse localmente agresivo si no se trata correctamente. Microscópicamente es predominantemente un crecimiento exofítico de epitelio escamoso estratificado con crestas profundas bulbosas que muestran o no atipia e invaginaciones profundas con paraqueratosis u ortoqueratosis (1,98).

❖ Carcinoma de células escamosas basaloides

El carcinoma de células escamosas basaloides (CCEB) es una variante de carcinoma de células escamosas, raro y agresivo, que fue inicialmente identificado como una entidad histopatológica separada (98). Se manifiesta principalmente en la laringe, hipofaringe, orofaringe, epiglotis y base de la lengua. Es más frecuente entre hombres de 60-70 años con un historial de consumo de tabaco y alcohol elevado. Clínicamente el tumor aparece como una masa firme, ulcerada y exofítica. A nivel microscópico puede tener un patrón lobular, cribiforme, en forma de cordón, de glándula o de nido.

El curso clínico y el pronóstico del CCEB es peor que el del carcinoma convencional.

❖ Otras variantes histológicas del carcinoma de células escamosas

Otros subtipos del COCE incluyen el carcinoma de células fusiformes, el carcinoma escamoso de células papilares, el carcinoma adenoescamoso, el carcinoma escamoso de células acantolíticas y el carcinoma cuniculatum. La mayoría de los casos descritos con estas neoplasias han sido en laringe e hipofaringe, existiendo pocos casos reportados a nivel de la cavidad oral (1).

1.6. ESTADIAJE

La finalidad de establecer una clasificación para el cáncer oral universalmente aceptada, es la de obtener grupos de pacientes similares y por tanto equivalentes desde un punto de vista estadístico, que permita unificar criterios en el momento del diagnóstico y tratamiento de los mismos. La primera clasificación de tumores malignos es la TNM de Pierre Denoix (1944), basada en la extensión del tumor primario (T), afectación de ganglios regionales (N) y la presencia de metástasis a distancia (M). Actualmente se aceptan los dos sistemas de clasificación TNM desarrollados por la UICC (International Union Against Cancer) y la AJCC (American Joint Committee in Cancer), siendo ambas similares (1). El sistema TNM constituye una herramienta válida a la hora de elaborar el enfoque diagnóstico y terapéutico de un paciente, el cual incluye una clasificación previa al tratamiento (cTNM), basada en el examen clínico y técnicas de imagen y otra clasificación postquirúrgica (pTNM), que introduce los datos obtenidos tras el estudio histopatológico de la pieza quirúrgica. El T se refiere al tumor primario, al tamaño en su dimensión máxima y a la infiltración a tejidos adyacentes (Tabla 5). La N se refiere a la presencia de adenopatías, dimensión de éstas y lado afectado según el tumor primario (homolaterales, contralaterales o bilaterales). La M mide las metástasis a distancia y se basa en la presencia o no de éstas. Cuando se presentan tumores sincrónicos se designa con el

sufijo m en la T, correspondiendo al estadiaje tumoral más alto. Para el uso clínico, a partir de esta clasificación la AJCC designó varios estadios clínicos (1)(Tabla 6).

Tabla 5. Clasificación de los tumores de cabeza y cuello

TUMOR PRIMARIO	
Tumor	Descripción
Tx	No se puede evaluar el tumor primario
T0	No hay evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor menor o igual a 2 cm
T2	Tumor entre 2 y 4 cm
T3	Tumor mayor de 4 cm
T4a	Tumor que invade estructuras adyacentes: hueso cortical, músculo extrínseco de la lengua en profundidad (geniogloso, hiogloso, palatogloso y estilogloso), seno maxilar o piel de la cara
T4b	Tumor que afecta al espacio masticatorio, apófisis pterigoides, base de cráneo y/o recubre la arteria carótida interna
GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES	
Adenopatía	Descripción
Nx	No pueden evaluarse los ganglios regionales
N0	No hay metástasis ganglionares
N1	Metástasis en un solo ganglio linfático homolateral igual o menor a 3 cm
N2	Metástasis en un solo ganglio linfático homolateral mayor de 3 cm y menor de 6 cm ; o múltiples ganglios ipsilaterales, no mayores a 6 cm en su máxima dimensión; o ganglios bilaterales o contralaterales, menores de 6 cm
N2a	Metástasis en un solo ganglio homolateral mayor de 3 cm y menor de 6 cm
N2b	Metástasis en múltiples ganglios homolaterales, menores de 6 cm
N2c	Metástasis en ganglios bilaterales o contralaterales, menores de 6 cm
N3	Metástasis en ganglios mayores de 6 cm
METÁSTASIS A DISTANCIA	
Metástasis	Descripción
Mx	No se pueden evaluar las metástasis a distancia
M0	No hay metástasis a distancia
M1	Hay metástasis a distancia

Es la profundidad tumoral el parámetro que ha adquirido en la última década una mayor relevancia como factor predictor pronóstico. En la nueva clasificación TNM de la AJCC, se recomienda el registro del espesor máximo tumoral aunque por el momento no se introduce en la clasificación por estadios (99, 100).

Tabla 6. Estadaje de los tumores de cabeza y cuello

ESTADIO	CLASIFICACIÓN TNM		
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio II	T2	N0	M0
Estadio III	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
Estadio IVA	T4a	N0	M0
	T4a	N1	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N2	M0
Estadio IVB	Cualquier T	N3	M0
	T4b	Cualquier N	M0
Estadio IVC	Cualquier T	Cualquier N	M1

1.7. TRATAMIENTO

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

En los estadios iniciales el tratamiento de elección es el quirúrgico, eliminándose el tumor con márgenes de seguridad y con o sin vaciamiento cervical según la localización, tamaño o sospecha de metástasis regional. El vaciamiento cervical se realiza según los diferentes niveles cervicales (I, II, III, IV y V) incluyendo o no el nervio espinal, la vena yugular interna y el músculo ECM. La glándula submaxilar y la vena yugular externa se incluyen siempre. Una vez realizado el vaciamiento cervical, se analiza histopatológicamente, y en el caso de estar afectadas las estructuras extirpadas se valora el tratamiento postquirúrgico con radioterapia (101, 102). Las disecciones cervicales se clasifican en:

- Vaciamiento cervical funcional: se realiza una extirpación de uno o más niveles, conservándose el nervio espinal, la vena yugular interna y el músculo ECM.
- Vaciamiento cervical radical modificado: se extirpan los ganglios de todos los niveles, pero se conservan o no el nervio espinal, la vena yugular interna y el ECM.
- Vaciamiento cervical radical: se extirpan los ganglios de todos los niveles, la vena yugular interna, el nervio espinal y el ECM.

La radioterapia puede aplicarse de forma local (braquiterapia) o externa (cobaltoterapia).

La radioterapia externa es la forma clásica de administrarla con la fuente de radiación alejada del organismo. Requiere un fraccionamiento de la dosis y un periodo de tiempo más largo para llevarla a cabo. Las fuentes de irradiación externa son la bomba de cobalto o los aceleradores lineales. La radioterapia convencional consiste en una dosis de 10 Gy semanales, 2 Gy diarios durante 5 días y 2 días de descanso, en un período de 7 semanas. La radioterapia fraccionada permite administrar una dosis total elevada en el tumor, respetando el tejido normal adyacente. Disminuye la toxicidad y condiciona la respuesta en los tejidos sanos y tumorales, mediante la reparación de las lesiones, ya que el tejido normal repara mejor el ADN dañado, sobre todo a bajas dosis, que el tejido tumoral; la reoxigenación de las células tumorales, aumentando su radiosensibilidad; y la repoblación del tejido entre las fracciones, especialmente durante el fin de semana, cuando la zona no es irradiada, reduciendo de ese modo los efectos tempranos. Cuando la radioterapia es exclusiva se suelen dar 60-80 Gy mientras que cuando es

postquirúrgica se administran dosis de 50-60 Gy (1). La braquiterapia, por otro lado, es un método que usa radiaciones ionizantes, situando el material radioactivo en las proximidades o en el interior del tumor. Existen diferentes modalidades de braquiterapia, de las cuales la más empleada para los tumores de cabeza y cuello es la radioterapia intersticial, que consiste en la ubicación de alambres u horquillas en la periferia o en el interior del tumor, marcados con isótopo radioactivo de iridio. La radioterapia intersticial destruye en mayor cantidad tanto a las células tumorales como a las normales, debido a que se coloca directamente en el tejido produciendo una emisión continua sin dejar un período de tiempo para la recuperación de las células normales. De ahí el alto riesgo de aparición de osteorradionecrosis, sobre todo en los casos de COCE de suelo de boca o lengua donde las agujas se colocan próximas al hueso cortical mandibular.

La quimioterapia se utiliza generalmente como tratamiento paliativo, aunque los protocolos actuales combinados con la radioterapia a dosis de 60-70 Gy están dando buenos resultados como tratamiento curativo. Se emplean el 5-fluoracilo y el cisplatino fundamentalmente, administrándose generalmente 3 ciclos.

1.8. PRONÓSTICO

El pronóstico del COCE depende de factores relacionados con el tumor, el tratamiento y el paciente. Está generalmente aceptado que el pronóstico es mejor en carcinomas detectados tempranamente y sin metástasis. Los pacientes con COCE detectados en estadios avanzados tienen una alta tasa de mortalidad. El tratamiento tiene una gran relevancia en el pronóstico, dependiendo de si se han limpiado los bordes y los ganglios. La presencia de metástasis ganglionares es uno de los factores pronósticos más importantes para el pronóstico del paciente, reduciendo la supervivencia hasta el 50% (103).

La reducción de la supervivencia en los tumores orofaríngeos localizados más posteriormente es conocida desde hace años, sin embargo en la cavidad oral, la localización del tumor no es tan influyente en el pronóstico. El tamaño del tumor afecta tanto a la elección del tratamiento como al éxito. Histológicamente, la afectación de los bordes de resección es un fuerte valor predictivo. El estadio pN es un predictor independiente de la mortalidad pero el significado pronóstico de las micrometástasis y de las células tumorales aisladas no se conoce, aunque estudios en el ganglio centinela pueden proporcionar una visión aproximada. El grado histológico del COCE también se ha relacionado con la supervivencia, aunque ha sido un tema de controversia (45,103,104). En cuanto a los subtipos histológicos, el carcinoma verrugoso y el carcinoma cuniculatum tiene mejor pronóstico que el carcinoma adenoescamoso y que el carcinoma escamoso basaloide (98). La infiltración peri/endoneural muestra una asociación significativa con el tamaño tumoral, la invasión, el grado histológico de malignidad y resultados en cuanto a metástasis ganglionar, estado de los márgenes reseçados, recurrencia local y supervivencia. La afectación ósea también afecta al pronóstico. El sialoadenotrofismo está asociado con un aumento de la recurrencia local y con la aparición de nuevos tumores primarios. La afectación de la piel es un signo de mal pronóstico (Tabla 7).

Tabla 7. Factores pronósticos relacionados con el tumor, el tratamiento y el paciente.

Factores relacionados con		
Tumor	Tratamiento	Paciente
Localización anatómica	Resección de márgenes	Edad
Estadio	Resección de ganglios linfáticos	Sexo
Profundidad tumoral	Radioterapia	Estilo de vida
Grado de diferenciación	Quimioterapia	Raza
Comportamiento de las células tumorales		Factores socioeconómicos
Infiltración ganglionar y extracapsular		Retraso diagnóstico
		Inmunidad
		Co-morbilidad

Los pacientes con carcinoma de células escamosas de la cavidad oral y orofaringe tienen riesgo de múltiples tumores primarios en la faringe y orofaringe, así como en la región traqueobronquial y esófago. Así, el riesgo de una recurrencia o de la aparición de un segundo cáncer se ha estimado en entre un 10 y 40% tras el tratamiento.

2. TOLERANCIA INMUNE

2.1. CONCEPTO

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

papel importante en el mantenimiento de la auto-tolerancia periférica así como en la regulación de descenso de las diversas respuestas inmunes (108, 109).

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

2.2 CÉLULAS T REGULADORAS

Las células T reguladores (Treg) son un subconjunto de linfocitos especializados, caracterizados por la inducción de la tolerancia periférica. Desempeñan un papel importante en el control de la reactividad inmunitaria contra los antígenos propios y tienen la capacidad de inhibir las respuestas inflamatorias crónicas y mantener la tolerancia inmune en el tumor de los huéspedes portadores (109). Las células Treg fueron por primera vez descubiertos por Sakaguchi (109) hace más de una década y se describieron como una población menor de células T CD4⁺ que coexpresaron CD25. Aunque con los Treg no se puede asociar ningún marcador de superficie específico, el factor de transcripción FoxP3 (forkhead box P3) ha sido identificado como un gen regulador clave para el desarrollo y la función de células Treg (112). Las células Treg se generan, *in vitro* e *in vivo*, a partir de células CD4⁺ T maduras bajo condiciones específicas de la estimulación del antígeno o la exposición a citoquinas (113). Las células Treg se pueden clasificar además sobre la base de su perfil de citoquinas sintetizado. Así, la activación crónica de los linfocitos Treg CD4⁺ humanos y de ratón en presencia de interleuquina (IL)-10 da lugar a las células Tr1 (T reguladoras tipo 1) con baja capacidad proliferativa que producen altos niveles de IL-10, bajos niveles de IL-2 y no produce IL-4 (114).

Las células Th3 (tipo T helper 3), una población que produce un alto nivel de TGF- β , son preferentemente inducidas por las células dendríticas en el intestino y su inducción es mayor en presencia de IL-4, el TGF- β , IL-10, y anti-IL-12 (115, 116). Además, las células T reguladoras pueden ser derivadas de células T CD8+. También se ha identificado que el subconjunto de células CD8+ CD25+ T reguladoras comparte el fenotipo, las características funcionales y el mecanismo de acción con las células CD4+ CD25+ T reguladoras naturales (117).

Se ha demostrado que las células Treg son capaces de inhibir una gran variedad de respuestas inmune, tanto *in vitro* como *in vivo* (118). A pesar de que las células Treg requieren la activación por la exposición al antígeno para iniciar las funciones supresoras, la fase efectora (de supresión) es independiente de la especificidad antigénica. Se han descrito múltiples mecanismos de represión por las células Treg, con diferencias observadas entre la supresión *in vitro* e *in vivo* y los resultados entre los distintos subconjuntos de células Treg. Las citoquinas solubles, los mecanismos dependientes del contacto célula-célula, o ambos han demostrado que contribuyen a las actividades de supresión mediada por las células Treg. En muchos sistemas experimentales las Treg funcionan *in vivo* produciendo las citocinas inmunosupresoras IL-10 (119) y el TGF- β (120) y por un mecanismo dependiente del contacto celular (121). Estas células expresan un alto nivel de GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor) y las moléculas FoxP3 y median la supresión inmune a través de un mecanismo de contacto célula-célula (112, 122).

Además de los mecanismos directos de supresión, las células Treg pueden inhibir las respuestas inmunes a través de la modulación de la función de las células dendríticas (123). Más recientemente, la IL-9 se ha demostrado que constituye un vínculo funcional a través del cual las Treg activadas reclutan y activan a los mastocitos para mediar en la supresión inmune regional en el modelo de tolerancia del injerto de la piel.

El elevado nivel de CD25 en las células Treg se basa más en su naturaleza esencial, que en el marcador convencional.

Hasta ahora hemos descrito la forma natural o principal del desarrollo de las células T CD25+CD4+ producidas en el timo, pero también existe la posibilidad de su desarrollo periférico extratímico. Estas células, llamadas Tr1 o Th3, fueron inicialmente generados por la estimulación crónica de las células T normales no reguladores en la presencia de IL-10 (124) y también han sido aislados de nodos linfáticos mesentéricos tras la inducción de tolerancia oral (125). La tabla 8 resume las diferentes características de las células Treg producidas tímicamente y extratímicamente.

Tabla 8. Resumen de las características de las células Treg CD4+

	Células Treg producidas en el timo	Células Treg producidas fuera del timo
Fenotipo	CD25, CTLA-4, GITR	CD25, CTLA-4
	Anérgicas in vitro	Anérgicas in vitro
	FoxP3	FoxP3
Señales de desarrollo	intracciones B7-CD28	citoquinas TGF- β , IL-4, IL-10
	intracciones CD40-CD40L	DCs inmaduros
	IL-2	anti-CD4 in vivo
	la cadena TCR α endógena	receptor CD46
Mecanismos de supresión		
<i>In vitro</i>	Dependientes del contacto	IL-10 y/o TGF- β
<i>In vivo</i>	Dependientes del contacto	IL-10 y/o TGF- β

2.3. MECANISMOS DE SUPRESIÓN DE ACTIVIDAD INMUNOLÓGICA ANTITUMORAL MEDIADOS POR CÉLULAS T REGULADORAS

Según North y col. (126) las células Treg específicas del tumor presentes pueden desempeñar un papel significativo en la supresión de la inmunidad antitumoral. Aunque el origen de las células Treg tumorales sigue siendo poco estudiado, parece que pueden surgir a partir de la activación por antígenos de las células T CD4+CD25- en el medio de la supresión inmune derivada de la acción de las citoquinas en el sitio de localización de tumor (127). El papel de las células Treg en la inmunidad antitumoral ha sido recientemente reevaluado en un modelo murino de tumor poco inmunogénico (128). La existencia de la supresión inmunitaria mediada por las células T CD4+ también se ha demostrado en los cánceres humanos (129). Así, la eliminación de células T CD4+CD25+ por un anticuerpo anti-CD25 en modelos animales provoca una mayor respuesta antitumoral (130). Recientemente, el aumento de las proporciones de células Treg se han detectado en varios pacientes con diferentes tipos de cánceres, incluidos los de pulmón, de mama y los tumores de ovario (116), demostrando que las células Treg suprimen la proliferación de las células T CD4+ e inhiben la secreción de IL-2 por las células CD4+ efectoras bajo la activación específica del tumor.

No obstante, no todas las células Treg son células T CD4+. De hecho, se ha identificado que las células CD8+ Treg median también la supresión inmune de forma dependiente de antígeno (131, 132). Estas células suprimen las células T CD4+ activadas por antígenos en un TCR de manera específica limitada por la molécula Qa-1 de MHC de clase Ib (133). En contraste con las células CD4+ CD25+ Treg naturales, las células CD8+ Treg se generan o inducen sólo después de cebado del antígeno (133).

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

2.4. MARCADORES PRONÓSTICOS

Un biomarcador es un indicador distintivo biológico o biológicamente derivado de un proceso, evento o condición. Existen cuatro tipos de biomarcadores: biomarcadores predictivos, pronósticos, de respuesta y los subrogados. Los marcadores predictivos son marcadores que pueden ser empleados para estimar el grado de respuesta o supervivencia de un paciente concreto a un tratamiento específico. Los biomarcadores pronósticos son aquellos que proporcionan información acerca del desarrollo neoplásico de los pacientes con independencia del tratamiento que hayan recibido. Los biomarcadores de respuesta, son aquellos que muestran un cambio cualitativo o cuantitativo después del tratamiento y están asociados a la diana modulada por el agente terapéutico de manera específica. Finalmente, los biomarcadores subrogados son aquellos cuya finalidad es substituir a un parámetro de valoración clínico.

Estudios previos han detectado el aumento de las proporciones de células Treg en pacientes con diferentes tipos de cánceres, como el de pulmón, mama, páncreas, ovario, recto y cabeza y cuello (134-137), dificultando la inmunovigilancia contra las células tumorales e impidiendo la respuesta inmune efectiva. Estos niveles elevados se han detectado tanto en sangre periférica como en tejido tumoral.

Actualmente se hace imperativo el contar con herramientas diagnósticas y pronósticas confiables, tanto para identificar sujetos de alto riesgo de padecer cáncer oral, así como para identificar pacientes oncológicos orales con mal pronóstico.

Debido a que varias familias de factores de transcripción, citoquinas, moléculas estimuladoras, moléculas de la superficie de las células T son imprescindibles para el crecimiento y la expansión de las células Treg, podría ser útil analizar en el COCE dichas moléculas para la elucidación de biomarcadores pronósticos.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El carcinoma oral de células escamosas es el más frecuente de los carcinomas orales y representa aproximadamente el 3-4% de las neoplasias malignas y más del 95% de todos los cánceres de cabeza y cuello. Clásicamente el carcinoma oral de células escamosas se ha asociado a hombres de 60 años consumidores de tabaco y alcohol, pero actualmente se ha observado un incremento en la incidencia (rango 0,4%-4%) en pacientes menores de 40 años y en mujeres en los que estos factores de riesgos no están presentes (111).

A pesar de los avances en el diagnóstico y el tratamiento, el pronóstico del cáncer oral avanzado sigue siendo desfavorable. La tasa de supervivencia del COCE a los 2 años se sitúa en torno al 65-85% (112). En el pronóstico se han relacionado factores como el tamaño tumoral, la presencia de adenopatías, el grado de diferenciación tumoral y el tratamiento, entre otros.

Los biomarcadores pronósticos son aquellos que proporcionan información acerca del desarrollo neoplásico de los pacientes con independencia del tratamiento que hayan recibido. La infiltración tumoral de linfocitos T se ha relacionado con la supervivencia de los pacientes en diferentes cánceres, reflejando así la actividad de la inmunidad antitumoral (113-115). Así mismo, el elevado nivel de infiltración de Treg en las neoplasias se ha relacionado con un peor pronóstico debido a la supresión inmune local (116, 117).

Los objetivos de nuestro proyecto de investigación fueron:

1. Analizar y describir los datos generales y las características clínico-patológicas y radiológicas de un grupo de 100 pacientes con carcinoma oral de células escamosas.
2. Determinar en un grupo de 36 muestras tumorales los niveles de expresión relativa de marcadores moleculares asociados a los linfocitos Treg (CTLA-4, FoxP3, IL-10, TGF β 1, CD4, CD8, CXCR4, CD127, CD25) comparándolo con muestras procedentes de tejido sano.
3. Analizar la posible correlación de la supervivencia global de los pacientes con los parámetros clínico-patológicos: edad, sexo, localización, tipo de lesión, sintomatología, afectación ósea, parestesia, tamaño de la lesión, estadio y diferenciación.

4. Valorar la posible aplicabilidad de los marcadores moleculares asociados a los linfocitos Treg como biomarcadores pronósticos en el COCE.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron retrospectivamente 100 pacientes con COCE, confirmados histológicamente. Todos los pacientes estudiados fueron diagnosticados y visitados en el Servicio de Estomatología del Hospital General Universitario de Valencia. El grupo estaba formado por 60 hombres y 40 mujeres, con edades comprendidas entre 33 y 92 años. Dentro de estos 100 pacientes se seleccionaron 36, a los cuales se les había tomado una muestra de tejido tumoral en el momento de la biopsia, inmediatamente después del diagnóstico clínico y antes de haber recibido cualquier tratamiento oncológico, para estudiar la expresión de linfocitos Treg en el tejido neoplásico. A fin de comparar estos resultados, se seleccionaron 8 pacientes sanos, provenientes también del Hospital General Universitario de Valencia, a los cuales se les tomó una muestra de tejido de la mucosa vestibular, valorando la infiltración de linfocitos Treg en el tejido sano. En este último grupo de pacientes se excluyeron aquellos que presentaban algún tipo de enfermedad tumoral, inmunológica o inflamatoria crónica, pacientes transplantados o con infecciones activas a nivel intraoral, así como aquellos que estaban en tratamiento con inmunosupresores o antiinflamatorios. El grupo de pacientes sanos estaba formado por 3 hombres y 5 mujeres, con edades comprendidas entre 14 y 42 años.

Los detalles del estudio fueron explicados a los pacientes a los cuales se les tomó una muestra de tejido sano y se entregó un consentimiento informado escrito antes de su inclusión en el estudio.

1. RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS

De todas las historias clínicas se recogieron los datos personales, los antecedentes médicos y los hábitos tóxicos que presentaba el paciente. Se estudiaron los datos clínicos, radiológicos y anatomopatológicos de la lesión. Por último se registró el tratamiento y la evolución de la enfermedad.

En los datos personales se anotaba la edad y el sexo de cada paciente. En los antecedentes médicos se registraban las enfermedades que padecían o habían padecido, sobre todo aquellas con potencial de desarrollar COCE, así como si el paciente había sufrido algún tipo de neoplasia anterior y la localización de ésta. En cuanto a los hábitos tóxicos se incluía:

- Tabaco: se anotaba si era o no fumador. En los fumadores se apuntaba el número de cigarros al día y el tipo de tabaco consumido (rubio/negro/puro). Los pacientes se clasificaron en 4 grupos atendiendo a la cantidad de tabaco consumida: de 3 a 10 cigarros al día, de 15 a 20, de 30 a 40 y de más de 40 cigarros al día.
- Alcohol: se consideraba al paciente bebedor si consumía habitualmente bebidas alcohólicas y no bebedor si no consumía o si lo hacía sólo esporádicamente.

En cuanto a la valoración clínica intraoral, se registraban los siguientes parámetros:

- Sintomatología relacionada con la lesión: se clasificaba según si era asintomática, si producía molestias o si presentaba dolor. En otro apartado se especificaba si existía o no parestesia asociada a la neoplasia.
- Localización de la lesión: se incluía en un mismo grupo las lesiones localizadas en suelo de boca, bordes laterales y superficie ventral de lengua. Las demás localizaciones correspondían a la encía, paladar, mucosa yugal, labios, trigono retromolar y dorso lingual.

- Tipo de lesión: se clasificaba según si se trataba de una eritroplasia, una ulceración, una tumoración o una lesión mixta.
- Tamaño clínico de la lesión: se anotaba el diámetro mayor en centímetros.
- Afectación ósea: anotando si había o no afectación.
- Lesiones precancerosas: se anotaba si el paciente presentaba lesiones de leucoplasia oral, liquen plano oral o factor irritativo asociado a la lesión.

Los datos de imagen se valoraban a partir de las resonancias magnéticas o en su defecto, de las tomografías computarizadas que se les habían realizado a los pacientes como pruebas complementarias al diagnóstico. Se estudiaron los siguientes aspectos:

- Tamaño de la lesión: anotando el diámetro mayor, el diámetro menor y la superficie afectada.
- Adenopatías: si eran homolaterales o bilaterales.

Una vez recogidos los datos de la anamnesis y las exploraciones clínicas y radiológicas, se reflejaba el estadio clínico según la clasificación TNM desarrollada por la *International Union Against Cancer (UICC)* (1). Para el parámetro N se tuvo en cuenta, en aquellos pacientes que habían sido tratados con cirugía, si existía infiltración ganglionar en los ganglios reseca-

Las lesiones se clasificaron histológicamente en COCE bien diferenciado, moderadamente diferenciado o mal diferenciado. Aquellas lesiones que presentaban una variedad verrugosa, papilar o basaloide se clasificaron en un mismo grupo.

En cuanto al tratamiento, se anotaba si el paciente había sido tratado con cirugía, radioterapia y/o quimioterapia. Por último se registraba si había tenido o no recidivas de la lesión tras el tratamiento.

El protocolo que se realizó para cada historial clínico fue el siguiente:

Nombre **Nº historia**

Edad:

Sexo: 1) varón 2) mujer

Hábitos

➤ Tabaco:

Fumador 1) No 2) Sí Cantidad diaria: Tipo de tabaco:

➤ Alcohol:

Bebedor 1) No 2) Sí

Antecedentes médicos

➤ Enfermedades:

➤ Neoplasias previas 1) No 2) Sí Localización del tumor:

Síntomatología

➤ Asintomático 1) No 2) Sí

➤ Molestias 1) No 2) Sí

➤ Dolor 1) No 2) Sí

➤ Parestesia 1) No 2) Sí

Exploración clínica intraoral:

➤ Localización

○ Suelo boca, superficie ventral y bordes lengua 1) No 2) Sí

○ Encía 1) No 2) Sí

○ Paladar 1) No 2) Sí

○ Mucosa yugal 1) No 2) Sí

○ Trígono retromolar 1) No 2) Sí

○ Dorso lingual 1) No 2) Sí

➤ Tipo (lesión más prevalente):

○ Eritroplasia 1) No 2) Sí

○ Ulceración 1) No 2) Sí

○ Tumoración (exofítica) 1) No 2) Sí

○ Mixta 1) No 2) Sí

➤ Tamaño (diámetro mayor):

➤ Afectación ósea 1) No 2) Sí

➤ Lesiones precancerosas:

○ Leucoplasia 1) No 2) Sí

○ Liquen plano oral 1) No 2) Sí

○ Factor irritativo 1) No 2) Sí

➤ Clasificación T N M

➤ Estadío:

Exploración radiográfica (RNM o TC)

➤ Tamaño

○ Diámetro mayor (DM):

○ Diámetro menor (dm):

○ Área afectada (DM x dm):

➤ Adenopatías

○ Homolaterales 1) No 2) Sí

○ Bilaterales 1) No 2) Sí

Anatomía patológica

➤ Bien diferenciado

➤ Moderadamente diferenciado

➤ Mal diferenciado

➤ Otras variedades

Tratamiento recibido tras el diagnóstico

➤ Cirugía 1) No 2) Sí

➤ Radioterapia 1) No 2) Sí

➤ Quimioterapia 1) No 2) Sí

Evolución

➤ Recidiva 1) No 2) Sí

2. RECOGIDA DE MUESTRAS

La recogida de tejido, tanto tumoral como sano, se llevó a cabo mediante hojas de bisturí desechables del número 15, tomando una cantidad mínima de tejido. Las muestras fueron inmediatamente almacenadas en tubos Eppendorf, embebidas en solución con inhibidores de nucleasas para evitar la acción de nucleasas endógenas (ADNasas y ARNasas) y mantener su integridad, y congeladas a -80° hasta la utilización de las mismas. En los pacientes con COCE las muestras fueron tomadas de la zona más representativa de la lesión, mientras que en los pacientes sanos las muestras se tomaron de la mucosa vestibular, de manera que pudiéramos proceder a una correcta hemostasia de la herida quirúrgica.

3. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

3.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ARN

Para la solubilización de las muestras se procedió, en primer lugar, a la rotura celular por homogenización (Tissue Lyser). La extracción del ARN se realizó a partir del homogenizado, en presencia de tiocianato de guanidinio, por adición de fenol, cloroformo y acetato sódico, seguido de agitación vigorosa y centrifugación, apareciendo el ARN en la fase acuosa superior. A continuación se procedió a valorar la calidad y la cantidad de ARN mediante los ensayos espectroscópico y electroforético, empleando un bioanalizador LabChip® Caliper Agilent 2100 (Agilent). El grado de pureza del ARN viene dado por el cociente de densidad óptica $260\text{nm}/280\text{nm}$. Este cociente debe tener un valor entre 1,6 y 2 para asegurar una buena pureza del ARN.

3.2. TRANSCRIPCIÓN REVERSA

Debido a que el ARN no sirve como molde para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Polymerase Chain Reaction) se transcribió el ARN a ADN utilizando un kit comercial; High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit® (Applied Biosystems) y un termociclador Mastercycle (Eppendorf), y se siguieron las instrucciones del fabricante. Se partió de una cantidad de 1µg de ARN total para un volumen final de reacción de 20 µL. Para preservar la integridad del ARN se trabajó siempre con hielo para mantener las muestras frescas. En la reacción de retrotranscripción se empleó el programa de temperaturas optimizado (Tabla 9) para el uso del kit de Applied Biosystems. Terminada la retranscripción, la muestra de ADN complementario de cadena sencilla (ADNc) se congeló inmediatamente a -20°C hasta su utilización.

Tabla 9. Programa de temperaturas y tiempos empleados para la transcripción reversa

Paso transcripción reversa	Tiempo	Temperatura
Paso 1°	10 minutos	25°C
Paso 2°	2 horas	37°C
Paso 3°	5 segundos	85°C

3.3. PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

Para la cuantificación de los niveles de cada transcrito problema en las muestras de pacientes, se optó por emplear la PCR cuantitativa a tiempo real o RTqPCR (Real Time-Polymerase Chain Reaction). Esta variante de la PCR incorpora una estrategia de medición por fluorescencia de la cantidad de ADN sintetizada en cada momento durante la amplificación, es decir, detecta la amplificación de un producto de PCR durante el desarrollo de la reacción y no mide la cantidad de producto de PCR generado tras un número determinado de ciclos.

En una amplificación ideal, la cantidad de moléculas se duplica en cada ciclo.

$$P_{Ct} = P_0 \times 2^{Ct}$$

Siendo P_0 la cantidad de ADN inicial en la muestra y P_{Ct} la cantidad de ADN final después de $n=Ct$ ciclos. En condiciones reales, la amplificación no duplica completamente la cantidad previa de ADN. Se introduce entonces el concepto de eficiencia (E), que es la fracción de moléculas de ADN que se duplica por ciclo.

La eficiencia de una reacción de PCR puede obtenerse representando el Ct de una muestra frente al $\log P_0$ y $\log P_{Ct}$, según las siguientes ecuaciones:

$$P_{Ct} = P_0 (1 + E)^{Ct}$$

$$\text{Log } P_{Ct} = \text{Log } P_0 + Ct \text{ Log } (1+E)$$

Las eficiencias para cada reacción de amplificación fueron calculadas usando una curva de diluciones seriadas de un calibrador, que en este caso fue ARN procedente de la línea celular V937.

Representando el Ct frente a $\log P_0$, la pendiente es $[-1 / \log(1+E)]$. Aplicando la siguiente relación podremos obtener directamente el valor de la eficiencia de amplificación para cada reacción:

$$E = (10^{-1/\text{pendiente}}) - 1$$

En el análisis se utilizaron los ensayos TaqMan® Gene Expression Assay de Applied Biosystems correspondientes a los genes a analizar (Tabla 10). Los genes estudiados fueron: CTLA-4, FoxP3, IL-10, TGFβ1, CD4, CD8, CXCR4 , CD127, CD25.

Tabla 10. Ensayos TaqMan® empleados en la RTqPCR

Gen	Tamaño del amplicón	TaqMan® Gene Expression Assay (código de ensayo)
CTLA-4	79	Hs01011591_m1
FoxP3	64	Hs00203958_m1
IL10	119	Hs00174086_m1
TGFB1	125	Hs99999918_m1
CD4	60	Hs00181217_m1
CD8	58	Hs00233520_m1
CXCR4	78	Hs00237052_m1
CD127	68	Hs00233682_m1
CD25	67	Hs00166229_m1

Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos. Cada ensayo se llevó a un volumen final de 10 µL. De acuerdo con las proporciones de reactivos especificados por Applied Biosystems, se emplearon 5 µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix, 3,5 µL de agua, 0,5 µL de Sondas TaqMan®, y 1 µL de muestra del ADNc. Cada ensayo se hizo por duplicado. Se incluyeron los siguientes controles negativos: de la extracción, de la transcripción y de la RTqPCR, para descartar posibles contaminaciones.

Se empleó el programa de temperaturas optimizado para el uso de TaqMan® Gene Expression Assays® en el aparato 7900 HT Fast Real Time PCR System, proporcionado por Applied Biosystems.

3.4. CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Como método de cuantificación se empleó el método matemático de análisis de datos descrito por Pfaffl (138), basado en la cuantificación relativa de un gen problema respecto a un gen de referencia, que sirve de elemento normalizador y que debe mantenerse invariable entre las diferentes condiciones experimentales.

Los genes de referencia comúnmente empleados se caracterizan por ser genes endógenos no regulados, por lo que su nivel de expresión es estable. En este trabajo se utilizó el gen de la β -glucuronidasa (GUS). La β -glucuronidasa es una hidrolasa lisosomal involucrada en la ruta de degradación del ácido glucurónico que contiene glucosaminoglicanos.

Para comparar la expresión de los genes de las muestras de tejido tumoral y las muestras de tejido sano obtuvimos un resultado mediano de expresión para cada uno de los genes de las muestras de tejido sano considerándolo como valor de referencia.

4. MÉTODO ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos mediante el protocolo de estudio se analizaron estadísticamente mediante el programa SPSS. Realizamos una estadística descriptiva, analizando la media, valores mínimos, máximos y desviación estándar en las variables cuantitativas. En las variables cualitativas analizamos el número y el porcentaje.

Para el análisis de supervivencia de los pacientes se realizó un seguimiento de su enfermedad neoplásica desde el momento del diagnóstico (excepto 4 de ellos por defunción inmediata o no acudir a las revisiones). Dicho seguimiento terminaba en el momento del fallecimiento o al cierre del estudio si permanecía vivo. Se registró el tiempo de supervivencia global para cada paciente y se analizó la supervivencia según los diferentes factores. Los factores para los cuales se analizó su influencia en la supervivencia de los pacientes fueron: edad, sexo, sintomatología y parestesia, localización de la tumoración, tipo y tamaño de la

lesión, afectación ósea, adenopatías, clasificación TNM, estadio y diferenciación histológica. Además, en los 31 pacientes en los que se analizó la expresión de marcadores asociados a linfocitos Treg, se estudió la influencia de dichos marcadores en la supervivencia.

Las técnicas estadísticas empleadas en el estudio de supervivencia fueron:

⇒ Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier para estudiar el comportamiento de la supervivencia. Esta metodología permite contrastar si los diferentes estados o niveles del factor producen o no curvas de supervivencia significativamente distintas.

Como estadísticos de contraste, se empleó el test del Logaritmo del Rango y el test de Breslow.

Tanto para la muestra global como para las submuestras con los diferentes estados del factor se proporcionó media, error típico e intervalo de confianza al 95%.

⇒ Análisis de Regresión de Cox: permite modelizar la supervivencia en función de un factor o conjunto de factores independientes.

Permitió la estimación de parámetros relacionados con el riesgo que tiene un paciente por tener un determinado perfil social, clínico e histopatológico.

El método empleado para la incorporación de las variables al modelo fue de 'selección paso a paso hacia delante con criterio condicional', esto es, inicialmente todas las variables están fuera del modelo y en cada iteración se incorpora una variable al mismo. El proceso se detiene cuando ya no hay variables significativas que incorporar. El p-valor del estadístico de Wald de entrada al modelo fue de 0,05 y el de salida del mismo 0,1.

El análisis de Cox exige establecer, para cada factor independiente, una categoría de referencia; ya que se va a comparar por cuánto se multiplica el impacto o tasa de

riesgo si el paciente pertenece a una determinada categoría respecto a la de referencia. En el estudio, se consideró la 1ª categoría de cada factor como la de referencia (por ejemplo, se estima por cuánto se multiplica el riesgo en una paciente con afectación ósea frente a un paciente de referencia sin afectación ósea).

El nivel de significatividad empleado en todos los análisis fue el habitual del 5% ($\alpha=0.05$). Cualquier p-valor menor a 0.05 es indicativo de una relación estadísticamente significativa. Por contra, un p-valor mayor o igual a 0.05 indica ausencia de relación.

RESULTADOS

1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS DATOS CLÍNICOS

1.1. DATOS GENERALES

EDAD

La edad media de los 100 pacientes estudiados fue de 63,30 años, con un valor mínimo de 33 años y un máximo de 92 años (Figura 9). La desviación estándar fue de 12,84.

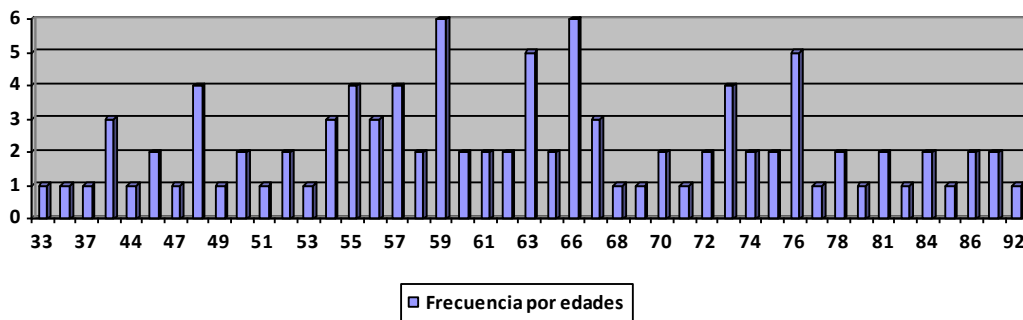


Figura 9. Frecuencia mostrada por edades de los pacientes estudiados

SEXO

Entre los pacientes estudiados 60 eran varones (60%) y 40 mujeres (40%), con una proporción hombre/mujer igual a 3/2 (Tabla 11 y Figura 10).

Tabla 11. Frecuencia por sexo

SEXO	FRECUENCIA	PORCENTAJE
HOMBRE	60	60,0
MUJER	40	40,0

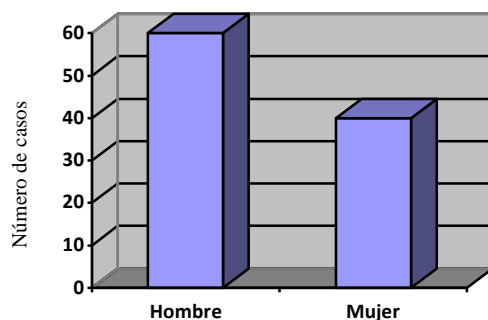


Figura 10. Distribución del sexo de los pacientes

HÁBITOS

Consumo de tabaco

En relación al hábito tabáquico de los pacientes, 40 eran fumadores en el momento del diagnóstico y 60 no fumadores (Figura 11). Los pacientes fumadores se agruparon según la cantidad de tabaco consumido. Así, 8 pacientes fumaban entre 3 y 10 cigarrillos al día, 17 fumaban entre 15 y 20, 10 pacientes entre 30 y 40, y sólo 4 pacientes fumaban más de 40 cigarrillos al día (Figura 12). En 1 paciente no se pudo registrar la cantidad de tabaco consumido diariamente ya que no figuraba en la historia.

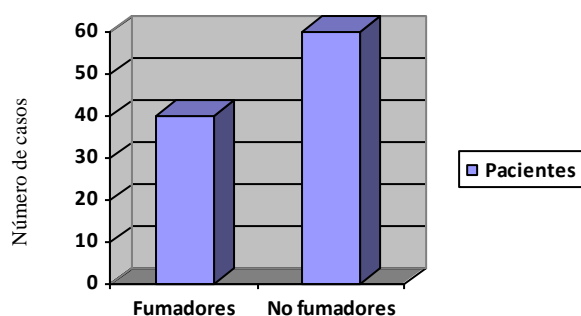


Figura 11. Distribución de los pacientes según el hábito tabáquico

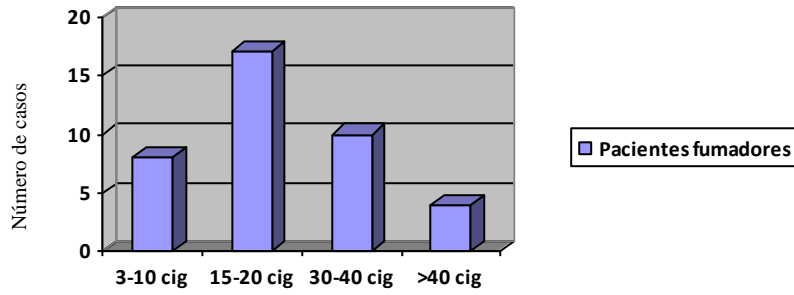


Figura 12. Cantidad de tabaco diario consumido en los pacientes fumadores

El tipo de tabaco consumido por todos los pacientes fumadores era el tabaco con combustión, no existiendo ningún paciente que consumiera tabaco mascado o esnifado. El 62,2% de los pacientes fumadores consumía tabaco rubio, el 32,4% tabaco negro, el 2,7% fumaban indistintamente tabaco rubio o negro y otro 2,7% fumaba puros (Figura 13).

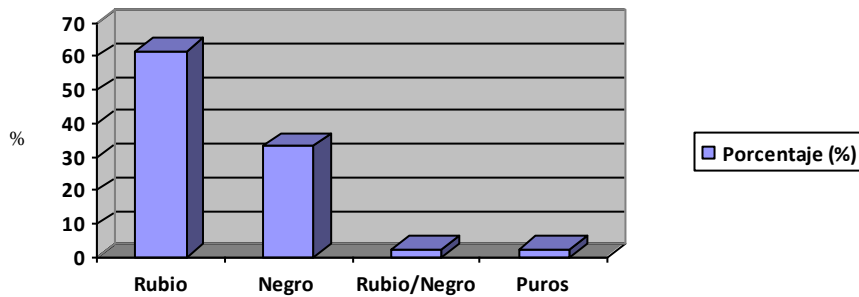


Figura 13. Tipo de tabaco con combustión consumido

Consumo de alcohol

En relación al consumo de alcohol, 41 pacientes eran bebedores mientras que 59 no eran consumidores habituales de alcohol (Figura 14).

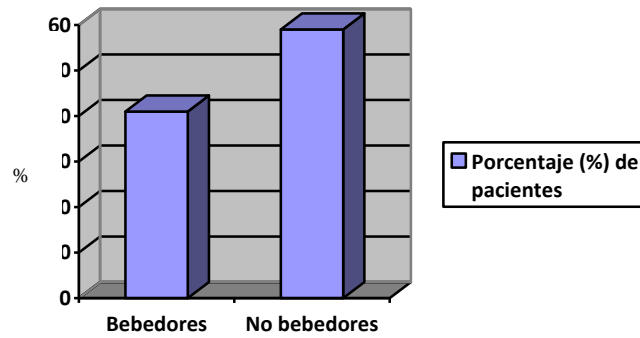


Figura 14. Consumo de alcohol

CÁNCERES PREVIOS

Se estudiaron los antecedentes neoplásicos de los pacientes, encontrando un total de 4 pacientes que habían padecido un cáncer anteriormente, todos ellos de localización extraoral.

1.2. SÍNTOMAS Y EXPLORACIÓN CLÍNICA DE LA CAVIDAD ORAL

SINTOMATOLOGÍA

Atendiendo a la sintomatología referida por parte del paciente, se realizaron 3 grupos, en función de si el paciente refería molestias, dolor o por el contrario estaba asintomático. El síntoma predominante fue el dolor, presente en un 40% de los pacientes. Un 29% refería molestias y un 31% estaba asintomáticos (Tabla 12 y Figura 15).

SINTOMATOLOGÍA	FRECUENCIA	PORCENTAJE
Asintomático	31	31,0
Molestias	29	29,0
Dolor	40	40,0

Tabla 12. Distribución de la sintomatología

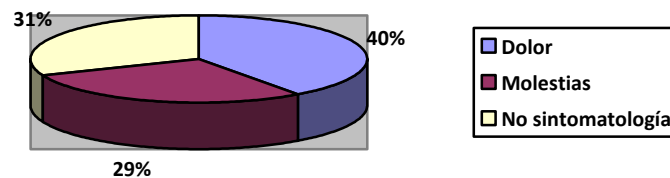


Figura 15. Distribución de la sintomatología

En función de si el paciente refería o no parestesia relacionada con la lesión en el momento del diagnóstico se realizaron dos grupos. Sólo 6 pacientes referían parestesia, coincidiendo con lesiones que además tenían afectación ósea.

LOCALIZACIÓN DE LA LESIÓN

Las lesiones neoplásicas se dividieron según su localización anatómica en siete grupos. Se encontraron 57 carcinomas a nivel del suelo de la boca, superficie ventral y bordes de lengua. En la encía se registraron 21 lesiones, en el triángulo retromolar 11, en la mucosa yugal 9, en el labio 4 lesiones, en el paladar 2 y a nivel del dorso lingual 2 (Tabla 13). Además, seis pacientes presentaron lesiones con afectación de dos zonas anatómicas, según los grupos establecidos.

LOCALIZACIÓN	FRECUENCIA	PORCENTAJE
Suelo boca o superficie ventral/bordes laterales lengua	57	57,0
Encía	21	21,0
Triángulo retromolar	11	11,0
Mucosa yugal	9	9,0
Labio	4	4,0
Paladar	2	2,0
Dorso lingual	2	2,0

Tabla 13. Distribución de la localización de las lesiones

El suelo de boca, la superficie ventral de lengua y los bordes laterales linguales fue la localización más frecuentemente afectada, seguida de la encía y de la zona del triángulo retromolar. Cuando las lesiones afectaron a más de una localización, la combinación más frecuente fue el suelo de boca y la encía.

TIPO DE LESIÓN

Los carcinomas se clasificaron en 4 grupos según el tipo de lesión predominante: eritroplasia, ulceración, tumoración y lesión mixta. El 59% de las lesiones se presentaron en forma de ulceración, el 14% en forma de eritroplasia, el 8% en forma de tumoración y el 19% eran lesiones mixtas (Figura 16).

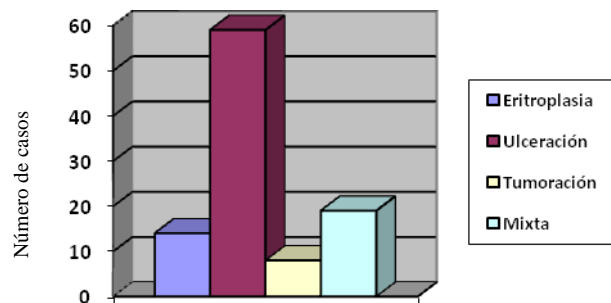


Figura 16. Tipo de lesión predominante.

Los resultados muestran una clara predominancia de la lesión ulcerativa.

TAMAÑO CLÍNICO

El tamaño clínico medido sobre el diámetro mayor de las lesiones osciló entre 0,3 cm y 7 cm, con una media de 2,67 cm y una desviación estándar de 1,37. En sólo uno de los pacientes estudiados no se pudo registrar el tamaño clínico de la lesión por carecer de datos en la historia clínica y de fotos clínicas.

AFECTACIÓN ÓSEA

Las lesiones se clasificaron según si presentaban o no afectación ósea. El 27% de los casos afectaban a tejido óseo (Tabla 14).

AFECTACIÓN ÓSEA	FRECUENCIA	PORCENTAJE
NO	73	73,0
SÍ	27	27,0

Tabla 14. Distribución de la afectación ósea

LESIONES PRECANCEROSAS

Entre los pacientes estudiados, seis presentaban una leucoplasia oral anterior al diagnóstico del COCE, dos de ellos tenían lesiones de liquen plano oral y sólo uno había sido diagnosticado de leucoplasia verrugosa proliferativa. Las neoplasias se localizaron en la misma zona de de las lesiones precancerosas.

1.3. EXPLORACIÓN RADIOLÓGICA DE LA LESIÓN

TAMAÑO

El tamaño de las lesiones medido sobre la RNM o la TC sólo pudo registrarse en 65 pacientes, debido a que en el resto de pacientes la lesión no era detectable en las técnicas de imagen. El diámetro mayor de las lesiones osciló entre 6 cm y 0,4 cm con una media de 2,88 cm. El valor medio del diámetro menor fue de 1,94 cm con un valor máximo de 4,7 cm y un mínimo de 0,4 cm.

El valor medio del área afectada por carcinoma fue de 6,57 cm² con un valor mínimo de 0,6 cm² y un máximo de 23,5 cm².

1.4. ESTADIO

La clasificación TNM se aplicó en todo el grupo de pacientes. Los resultados se muestran en la tabla 15.

Clasificación TNM			Nº de pacientes
Tis	N0	M0	1
T1	N0	M0	27
T2	N0	M0	16
T3	N0	M0	1
T4	N0	M0	25
T2	N1	M0	2
T2	N2	M0	3
T3	N2	M0	2
T4	N1	M0	5
T4	N2	M0	11
T2	N2	M1	1
T3	N1	M1	1
T4	N1	M1	2
T4	N2	M1	3

Tabla 15. Relación de pacientes según la clasificación TNM

La mayoría de los pacientes tenían lesiones en T4 o T1, sin lesiones evidentes de afectación nodal o metástasis a distancia. Un 30% de los pacientes presentaron adenopatías y sólo un 7% metástasis a distancia.

En cuanto al tamaño tumoral (T), encontramos un total de 27 tumores T1 (menores o igual a 2 cm), 22 neoplasias T2 (entre 2 y 4 cm), 4 tumores T3 (mayores de 4 cm) y 46 tumores T4. Uno de los pacientes tenía un Tis (carcinoma in situ). Los resultados muestran que el 50% de los carcinomas se diagnosticaron en estadios avanzados.

Respecto a la presencia de ganglios linfáticos regionales, 70 pacientes no tenían afectación ganglionar (N0), 10 pacientes presentaban metástasis en un solo ganglio linfático

homolateral igual o inferior a 3 cm (N1) y 20 pacientes tenían metástasis en un solo ganglio linfático homolateral mayor de 3 cm pero menor de 6 cm; o múltiples ganglios ipsilaterales, no mayores a 6 cm en su máxima dimensión; o ganglios bilaterales o contralaterales, menores de 6 cm (N2).

Sólo 7 pacientes presentaban metástasis a distancia (M1).

Según estos parámetros clasificamos a los pacientes en los estadios clínicos designados por la AJCC. En el estadio 0 había un paciente (TisN0M0); en el estadio I (T1N0M0) encontramos 27 pacientes; en el estadio II (T2N0M0) 16; 3 pacientes se encontraban en el estadio III (T3N0M0; T1N1M0; T2N1M0; T3N1M0); 46 pacientes presentaban un estadio IVA (T4N0M0; T4N1M0; T1N2M0; T2N2M0; T3N2M0; T4N2M0) y 7 pacientes se encontraban en el estadio IVC (cualquier T, cualquier N M1). No se encontró ningún paciente en el estadio IVB (Figura 17).

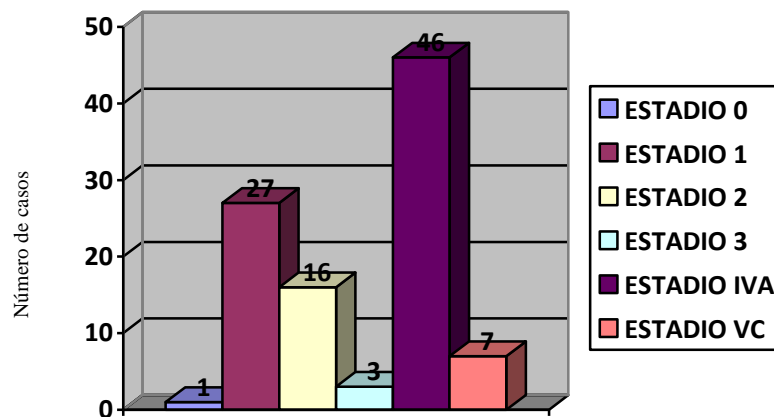


Figura 17. Distribución según estadio

1.5. ANATOMÍA PATOLÓGICA

Según el grado de diferenciación histológica los COCE se clasificaron en 5 grupos diferentes. El COCE más frecuente fue el carcinoma bien diferenciado (55,3%), seguido del moderadamente diferenciado (34%) y del pobremente diferenciado (7,4%). En porcentajes menores encontramos otras variedades como la variedad verrugosa, la papilar y la basaloide (3,2%) (Figura 18).

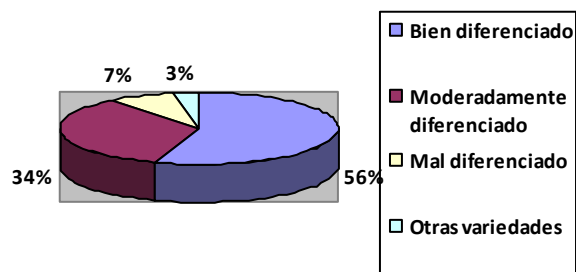


Figura 18. Distribución de los COCE según estudio anatomopatológico

1.6. TRATAMIENTO

Todos los pacientes, excepto 1, fueron tratados en el Hospital General Universitario mediante cirugía radical o complementaria, radioterapia y/o quimioterapia. Un total de 41 pacientes fueron tratados con cirugía local resectiva sola o asociada a disección cervical. 14 pacientes se trataron con cirugía asociada a radioterapia, 27 pacientes fueron tratados mediante radioterapia y quimioterapia y 7 pacientes recibieron sólo radioterapia. Únicamente un paciente fue tratado con quimioterapia (Figura 19).

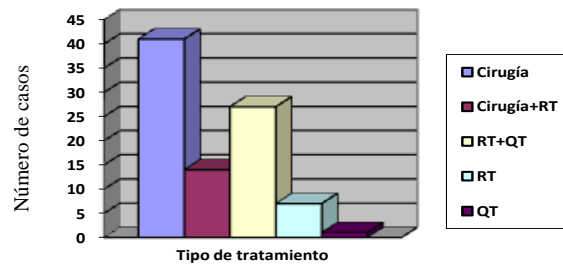


Figura 19. Distribución del tipo de tratamiento

1.7. EVOLUCIÓN

Respecto a la evolución del paciente valoramos si había tenido alguna recidiva tras el tratamiento.

De los 99 pacientes tratados, 32 presentaron una recidiva a nivel intraoral, es decir, aproximadamente un tercio del total de los pacientes (Tabla 16).

RECIDIVA	FRECUENCIA	PORCENTAJE
NO	67	68,0
SÍ	32	32,0

Tabla 16. Porcentaje de recidivas tumorales tras el tratamiento

2. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

A 36 pacientes del estudio se les extrajo una muestra de tejido tumoral. La cantidad de muestra osciló entre 0,01–0,07 gramos. Se obtuvieron, en promedio, 176 µg de RNA/mL del tejido tumoral.

Rendimiento de la extracción:

$$\mu\text{g de RNA /mg tejido} = \frac{\text{Dilución} \times \text{RNA} \mu\text{g} / 1000 \mu\text{L}}{\text{mgtejido}}$$

La concentración y la pureza del ARN total obtenido se determinaron mediante la medición de la absorbancia a 260 nm y 280 nm. Una unidad de A260 es equivalente a 40 µg/ml de ARN. El ratio A260/A280 indica la pureza del ARN. El ratio de 2 indica una pureza de ARN elevada, disminuyendo éste cuando el ARN está contaminado con proteínas. Para los estudios de PCR utilizamos ARN con un ratio superior a 1,6. Los valores calculados de la eficiencia fueron cercanos a 2 en todos los genes estudiados.

La cuantificación relativa se basa en la determinación de la expresión de un gen problema respecto a un gen de referencia, comparando tal expresión relativa de la muestra tumoral frente a la muestra normal de cada paciente. Se detectó expresión génica en los genes de interés en el 86 % de las muestras tumorales estudiadas (31 muestras). Detectamos sobreexpresión de los genes TGF-β1 y FoxP3, e infraexpresión de los genes IL-10, CXCR4, CD127.

En la figura 20 se resumen, para los genes CTLA-4, FoxP3, IL-10, TGFB1, CXCR4, CD127 Y CD25, los niveles de expresión relativos a GUS obtenidos en muestras tumorales y muestras normales.

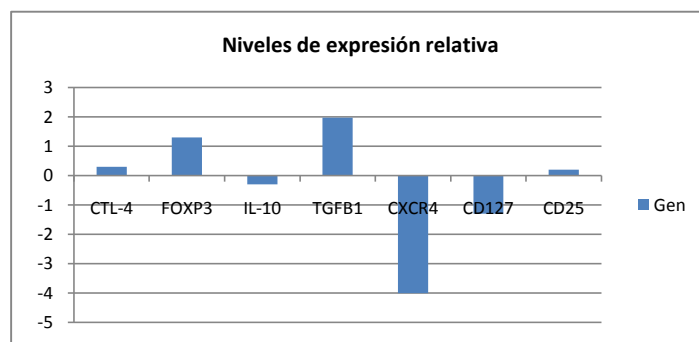


Figura 20. Niveles de expresión relativa de las muestras normales y tumorales

Dado que los niveles de expresión se expresaron de acuerdo al modelo de Pfaffl (138), aquellos genes que muestren una expresión mayor que el gen de referencia presentaran valores de expresión relativa por encima de 1 y los que presenten menor expresión, presentaran valores por debajo de 0.5. Por este motivo, para representar de manera proporcional tanto los genes con expresión superior al gen de referencia como los genes con expresión inferior, se optó por una transformación logarítmica de los datos. Los valores positivos indican que el gen presenta un nivel de expresión mayor que el gen GUS, mientras los valores negativos indican que el nivel de expresión es menor que GUS. Tal y como se observa en la figura los genes que presentaron mayor nivel de expresión fueron los genes TGF-β1 y FoxP3.

3. ANÁLISIS DEL TIEMPO DE SUPERVIVENCIA

A los 100 pacientes se les realizó un seguimiento de la enfermedad desde el momento del diagnóstico (excepto a 4 de ellos por defunción inmediata o por no acudir a las revisiones). Dicho seguimiento terminaba en el momento del fallecimiento o al cierre del estudio si permanecía vivo. Se registró el tiempo de supervivencia para cada paciente.

Además, en un grupo de 31 pacientes también se analizó la expresión de marcadores asociados a linfocitos Treg en el tejido tumoral.

De los 100 pacientes, el 17,0% falleció (Figura 21).

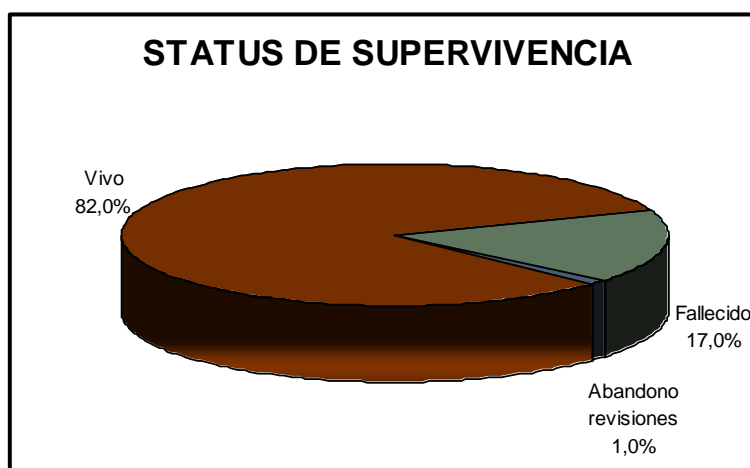


Figura 21. Representación de la supervivencia de los pacientes

Los factores en los que se analizó la influencia en la supervivencia de los pacientes fueron: edad, sexo, sintomatología y presencia o no de parestesia, tipo y tamaño de la lesión, localización, afectación ósea, adenopatías, clasificación TNM, estadio tumoral y diferenciación histológica. En el grupo de 31 pacientes se analizó además la influencia de la expresión génica de: CTLA-4, FoxP3, IL-10, TGFB1, CD4, CD8, CXCR4, CD127 Y CD25.

La distribución de cada una de las variables o factores a analizar fue la siguiente:

Tabla 17. Distribución según el sexo

Sexo	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Hombre	60	60,0	60,0
	Mujer	40	40,0	100,0
	Total	100	100,0	100,0

Tabla 18. Distribución según la edad

	Edad	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	<40 años	3	3,0	3,0	3,0
	40-55 años	25	25,0	25,0	28,0
	56-70 años	41	41,0	41,0	69,0
	>70 años	31	31,0	31,0	100,0
	Total	100	100,0	100,0	

Tabla 19. Distribución según la sintomatología referida (asintomático, molestias o dolor)

	Sintomatología	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	No molestias	31	31,0	31,0	31,0
	Molestias	29	29,0	29,0	60,0
	Dolor	40	40,0	40,0	100,0
	Total	100	100,0	100,0	

Tabla 20. Distribución según la presencia o no de parestesia

	Parestesia	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	No	94	94,0	94,0	94,0
	Sí	6	6,0	6,0	100,0
	Total	100	100,0	100,0	

Tabla 21. Distribución según la localización de la lesión

	Localización	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Lengua y suelo boca	53	53,0	53,0	53,0
	Encía	19	19,0	19,0	72,0
	Paladar	2	2,0	2,0	74,0
	Trígono retromolar	11	11,0	11,0	85,0
	Dorso lingual	2	2,0	2,0	87,0
	Mucosa yugal	9	9,0	9,0	96,0
	Labio	4	4,0	4,0	100,0
	Total	100	100,0	100,0	

Tabla 22. Distribución según el tipo de lesión

	Tipo de lesión	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Eritroplasia	14	14,0	14,0	14,0
	Ulceración	59	59,0	59,0	73,0
	Tumoración	8	8,0	8,0	81,0
	Mixta	19	19,0	19,0	100,0
	Total	100	100,0	100,0	

Tabla 23. Distribución según el tamaño clínico de la lesión

	Tamaño	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	<=2	37	37,0	37,4	37,4
	2.1-4	51	51,0	51,5	88,9
	>4	11	11,0	11,1	100,0
	Total	99	99,0	100,0	
Perdidos	Sistema	1	1,0		
Total		100	100,0		

Tabla 24. Distribución según la presencia o no de afectación ósea

Afectación ósea		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	No	73	73,0	73,0	73,0
	Sí	27	27,0	27,0	100,0
	Total	100	100,0	100,0	

Tabla 25. Distribución según el diámetro mayor de la lesión (medido sobre RNM o TC)

Diámetro mayor		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	<=2	22	22,0	33,8	33,8
	2.1-4	33	33,0	50,8	84,6
	>4	10	10,0	15,4	100,0
	Total	65	65,0	100,0	
Perdidos	Sistema	35	35,0		
Total		100	100,0		

Tabla 26. Distribución según el diámetro menor de la lesión (medido sobre RNM o TC)

Diámetro menor		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	<=2	44	44,0	67,7	67,7
	2.1-4	20	20,0	30,8	98,5
	>4	1	1,0	1,5	100,0
	Total	65	65,0	100,0	
Perdidos	Sistema	35	35,0		
Total		100	100,0		

Tabla 27. Distribución según el área de afectación de la lesión (medido sobre RNM o TC)

Área	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	<=2	11	11,0	16,9
	2.1-4	19	19,0	46,2
	>4	35	35,0	100,0
	Total	65	65,0	100,0
Perdidos	Sistema	35	35,0	
Total	100	100,0		

Tabla 28. Distribución según el tipo de adenopatías cervicales

Adenopatías	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Ninguna	70	70,0	70,0
	Homolaterales	22	22,0	92,0
	Bilaterales	8	8,0	100,0
	Total	100	100,0	100,0

Tabla 29. Distribución según el valor T

Valor T	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	0	1	1,0	1,0
	1	27	27,0	28,0
	2	22	22,0	50,0
	3	4	4,0	54,0
	4	46	46,0	100,0
	Total	100	100,0	100,0

Tabla 30. Distribución según el valor N

Valor N	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
0	70	70,0	70,0	70,0
1	10	10,0	10,0	80,0
2	20	20,0	20,0	100,0
Total	100	100,0	100,0	

Tabla 31. Distribución según el valor M

Valor M	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
0	93	93,0	93,0	93,0
1	7	7,0	7,0	100,0
Total	100	100,0	100,0	

Tabla 32. Distribución según el estadio

Estadio	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
0	1	1,0	1,0	1,0
I	27	27,0	27,0	28,0
II	16	16,0	16,0	44,0
III	3	3,0	3,0	47,0
IVA	46	46,0	46,0	93,0
IVC	7	7,0	7,0	100,0
Total	100	100,0	100,0	

Tabla 33. Distribución según el grado de diferenciación histológica

	Diferenciación	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Bien diferenciado	52	52,0	55,3	55,3
	Moderadamente diferenciado	32	32,0	34,0	89,4
	Pobremente diferenciado	7	7,0	7,4	96,8
	Otras	3	3,0	3,2	100,0
	Total	94	94,0	100,0	
Perdidos	Sistema	6	6,0		
Total		100	100,0		

Tabla 34. Distribución para el marcador CTLA-4

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	<=34	16	51,6	51,6	51,6
	>34	15	48,4	48,4	100,0
	Total	31	100,0	100,0	

Tabla 35. Distribución para el marcador FoxP3

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	<=31.5	15	48,4	50,0	50,0
	>31.5	15	48,4	50,0	100,0
	Total	30	96,8	100,0	
Perdidos	Sistema	1	3,2		
Total		31	100,0		

Tabla 36. Distribución para el marcador IL10

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	<=36	15	48,4	53,6	53,6
	>36	13	41,9	46,4	100,0
	Total	28	90,3	100,0	
Perdidos	Sistema	3	9,7		
Total		31	100,0		

Tabla 37. Distribución para el marcador TGFB1

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	<=27	14	45,2	45,2	45,2
	>27	17	54,8	54,8	100,0
	Total	31	100,0	100,0	

Tabla 38. Distribución para el marcador CD4

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	<=31.4	15	48,4	50,0	50,0
	>31.4	15	48,4	50,0	100,0
	Total	30	96,8	100,0	
Perdidos	Sistema	1	3,2		
Total		31	100,0		

Tabla 39. Distribución para el marcador CD8

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	<=32	14	45,2	46,7	46,7
	>32	16	51,6	53,3	100,0
	Total	30	96,8	100,0	
Perdidos	Sistema	1	3,2		
Total		31	100,0		

Tabla 40. Distribución para el marcador CXCR4

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	<=31.7	15	48,4	48,4	48,4
	>31.7	16	51,6	51,6	100,0
	Total	31	100,0	100,0	

Tabla 41. Distribución para el marcador CD127

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	<=30.2	15	48,4	48,4	48,4
	>30.2	16	51,6	51,6	100,0
	Total	31	100,0	100,0	

Tabla 42. Distribución para el marcador CD25

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	<=32.9	15	48,4	48,4	48,4
	>32.9	16	51,6	51,6	100,0
	Total	31	100,0	100,0	

De cada una de las variables cuantitativas a estudiar se obtuvo el valor mínimo, el valor máximo, la media y la desviación típica (Tabla 43).

Tabla 43. Estadísticos descriptivos de cada una de las variables

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Edad	100	33	92	63,30	12,846
Tamaño	99	,3	7,0	2,674	1,3787
DiámayorRM	65	,4	6,0	2,885	1,2263
DiámenorRM	65	,4	4,7	1,936	,9430
ÁreaRM	65	,6	23,5	6,573	5,3114
CTLA4	31	29,25920600	39,62000300	34,25487448	2,576669212
FOXP3	30	27,97061250	35,71800350	31,59412447	1,806157534
IL10	28	31,05551250	39,41841850	35,79432677	2,275967532
TGFB1	31	23,65766000	30,28422850	27,25775611	1,722139356
CD4	30	27,26492250	34,76083100	31,24763750	1,807152430
CD8	30	25,91111300	38,42257300	32,02033535	2,891173112
CXCR4	31	26,16939750	37,32479700	31,49098563	2,182448590
CD127	31	25,29742700	34,82766900	30,28310950	2,133034660
CD25	31	28,88295250	36,90670150	32,72543103	2,058198449
N válido (según lista)	5				

3.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO GLOBAL DEL TIEMPO DE SUPERVIVENCIA

En la tabla 44 de estimaciones se indica que los pacientes presentaron un tiempo de supervivencia medio de 139,2 meses, con un intervalo de confianza al 95% [123,4 155,1]:

Tabla 44. Medias del tiempo de supervivencia

Media ¹			
Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
		Limite inferior	Limite superior
139,241	8,105	123,355	155,126

1. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

La curva de supervivencia de Kaplan-Meier (Figura 22) muestra que la probabilidad acumulada de supervivencia desciende con fuerza durante los primeros 20 meses aproximadamente, continúa bajando a un ritmo más atenuado hasta los 40 y se produce una estabilización a partir de ese momento.

Función de supervivencia

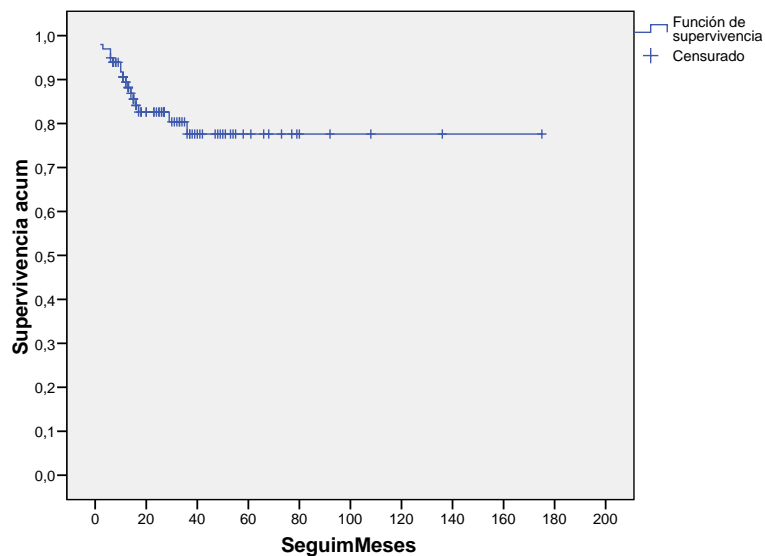


Figura 22. Curva de supervivencia global

Se denominan censurados aquellos pacientes que en el momento del cierre del seguimiento continúan vivos.

Del análisis de la curva se concluye que a los 15 meses la supervivencia se cifra en torno al 85% y a los 40 meses se inicia la fase de estabilidad (75% de supervivencia).

3.2. ANÁLISIS DEL TIEMPO DE SUPERVIVENCIA SEGÚN LOS DIFERENTES FACTORES

3.2.1. EDAD

La figura 23 representa las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en función de la edad del paciente: no hay fallecimientos entre los menores de 40 años.

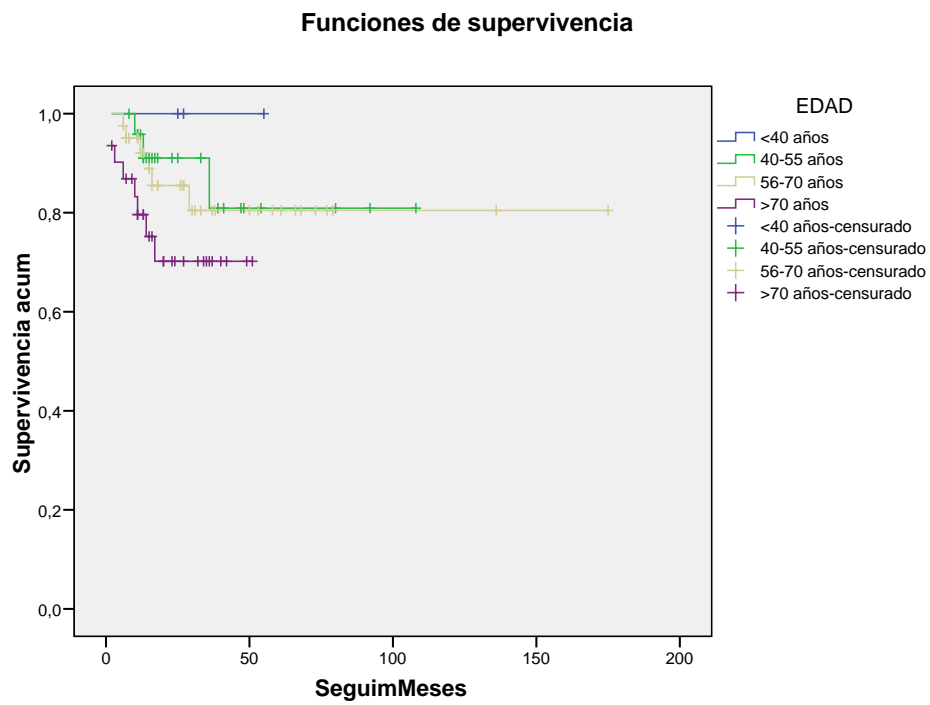


Figura 23. Curvas de supervivencia para la variable edad

El tiempo medio de supervivencia es más elevado en los pacientes con edades entre 56 y 70 años (Tabla 45).

Tabla 45. Medias del tiempo de supervivencia en función de la edad

EDAD	Media ¹			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
40-55 años	92,081	8,710	75,009	109,153
56-70 años	143,973	11,778	120,887	167,058
>70 años	38,458	3,777	31,055	45,862
Global	138,037	8,338	121,695	154,379

1. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

El test del Logaritmo del Rango revela que las curvas de supervivencia son estadísticamente iguales (p -valor>0.05) (Tabla 46).

Tabla 46. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de edad

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	3,791	3	,285

Por tanto, la edad no influye en la supervivencia del paciente.

3.2.2. SEXO

La figura siguiente representa las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en función del género del paciente:

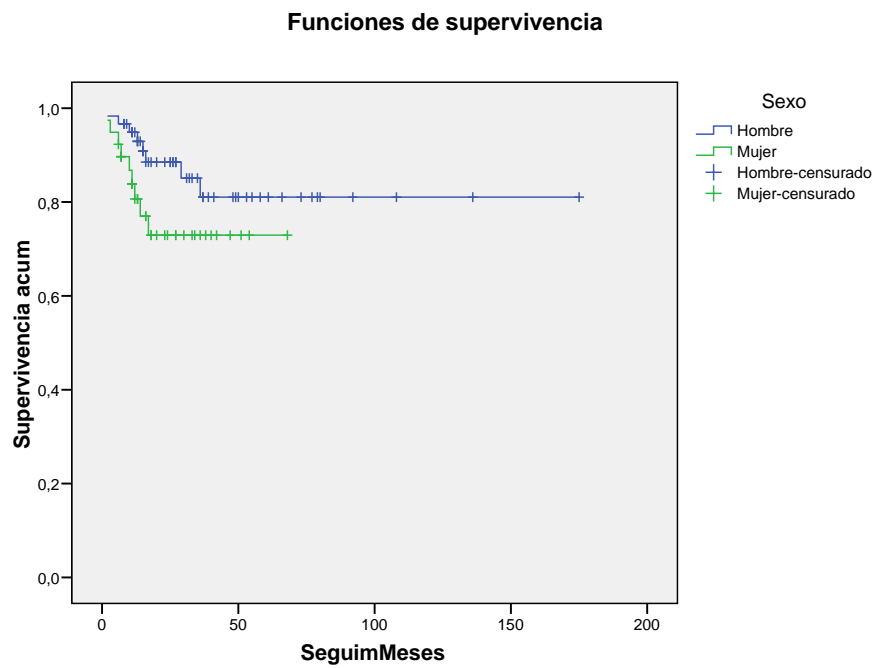


Figura 24. Curva de supervivencia para la variable sexo

El tiempo medio de supervivencia para los pacientes hombres es de 145,5 meses, bastante más elevado que el registrado entre las mujeres (52,3 meses) (Tabla 47).

Tabla 47. Medias del tiempo de supervivencia en función del sexo

Sexo	Media ¹			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
Hombre	145,525	9,890	126,141	164,909
Mujer	52,263	4,562	43,320	61,205
Global	139,241	8,105	123,355	155,126

1. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

Sin embargo, a pesar de las diferencias en el tiempo medio de supervivencia, el test del Logaritmo del Rango confirma que las curvas de supervivencia son estadísticamente iguales (p -valor > 0,05) (Tabla 48).

Tabla 48. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de Sexo.

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	2,335	1	,127

3.2.3. SINTOMATOLOGÍA

La figura 25 representa las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en función de los síntomas referidos presentada por el paciente.

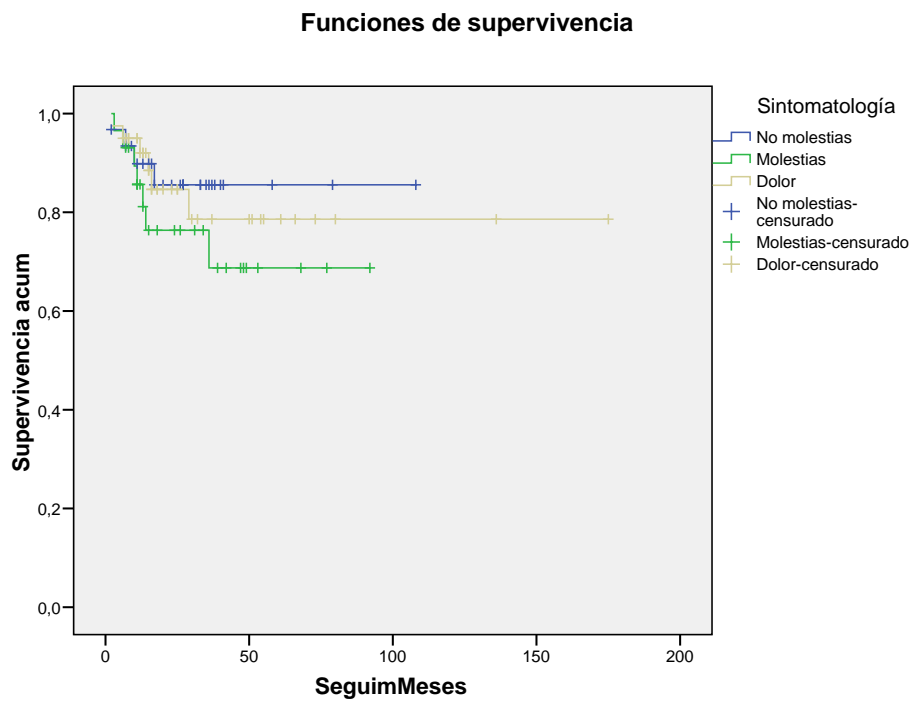


Figura 25. Curvas de supervivencia para la variable sintomatología

El tiempo medio de supervivencia es mayor entre los pacientes que presentan dolor; sin embargo, los pacientes que sólo refieren molestias tienen un tiempo medio de supervivencia menor frente a los que están asintomáticos (Tabla 49).

Tabla 49. Medias y medianas del tiempo de supervivencia en función de la sintomatología

Sintomatología	Media ¹			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
No molestias	93,795	6,611	80,838	106,752
Molestias	68,334	7,689	53,263	83,404
Dolor	141,003	13,033	115,458	166,548
Global	139,269	8,102	123,390	155,148

1. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

El test de Breslow revela que las curvas de supervivencia son estadísticamente iguales (p-valor>0,05) (Tabla 50).

Tabla 50. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de sintomatología

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Breslow (Generalized Wilcoxon)	1,220	2	,543

Entre los pacientes que presentan parestesia, no hay ningún fallecido, por tanto, la figura siguiente representa las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en función de si presentan o no parestesia donde una de ellas es una línea recta.

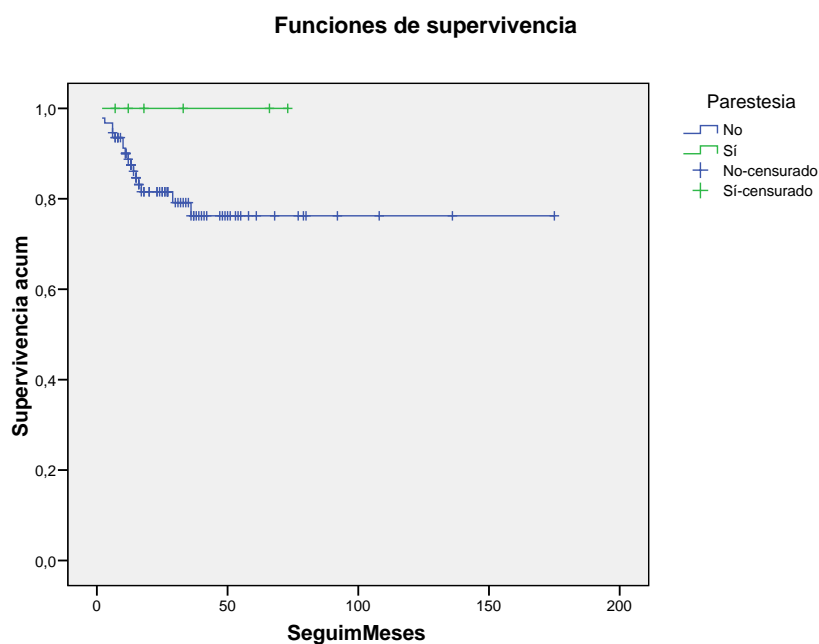


Figura 26. Curvas de supervivencia para la variable parestesia

A pesar de las diferencias observables en el gráfico, el test del logaritmo revela que las curvas de supervivencia son estadísticamente iguales ($p\text{-valor} > 0,05$) (Tabla 51). Probablemente el escaso tamaño muestral (6 casos) vinculado a la curva de parestesia sea la razón para ello.

Tabla 51. Prueba de igualdad de distribuciones para la existencia o no de parestesia

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1,159	1	,282

3.2.4. LOCALIZACIÓN DE LA LESIÓN

El figura siguiente representa las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en función de la localización de la lesión. Para los casos con lesión en el labio, no se produce ningún fallecimiento.

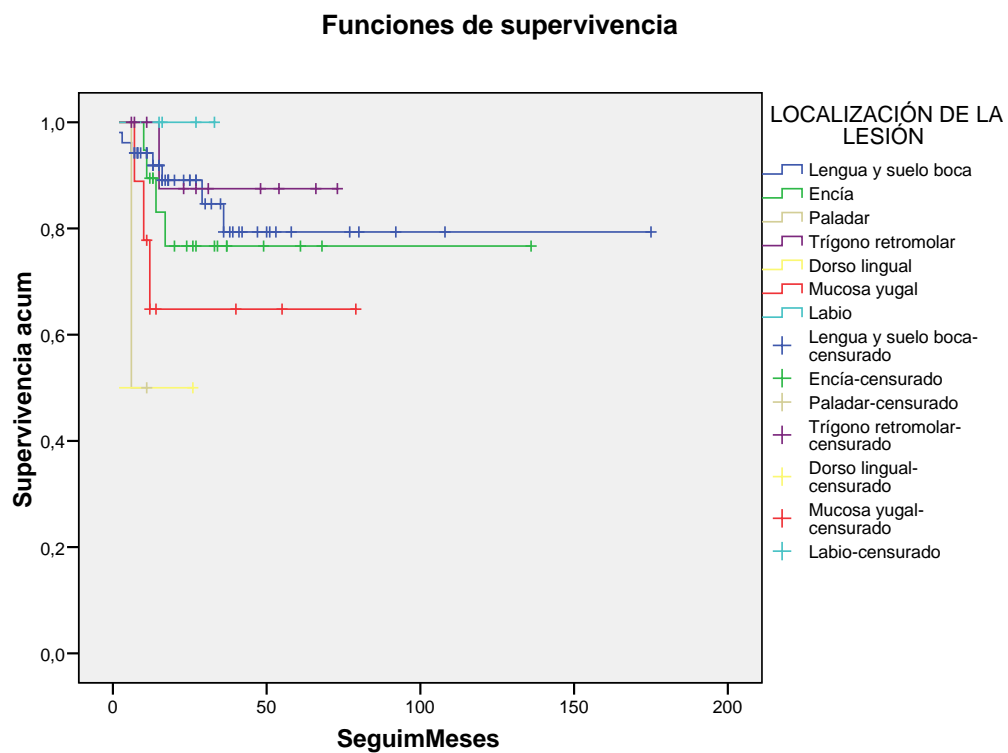


Figura 27. Curvas de supervivencia para la variable localización de la lesión

El test de Breslow revela que las curvas de supervivencia son estadísticamente diferentes (p-valor<0,05) (Tabla 52).

Tabla 52. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes localizaciones de la lesión.

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Breslow (Generalized Wilcoxon)	14,383	6	,026

Sin embargo, es probable que esta diferencia detectada en las curvas de supervivencia se vea condicionada por los casos con la lesión en el labio sin fallecimientos. Además, sólo hay dos casos con lesión en el paladar y otros dos en el dorso lingual. Juntamos estos cuatro casos en una categoría de ‘otros’.

En la nueva curva de supervivencia (Figura 28) observamos un acortamiento de la supervivencia en los dos primeros años para pacientes con lesión en encía o mucosa yugal respecto a pacientes con lesión en lengua y suelo boca.

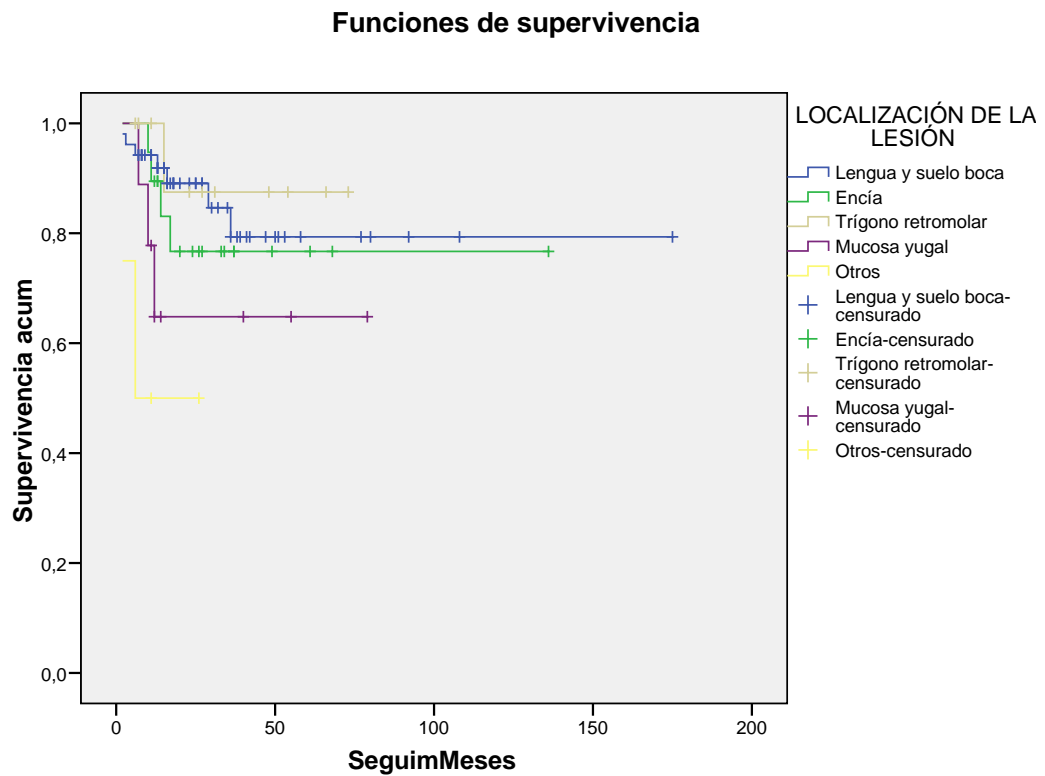


Figura 28. Curvas de supervivencia para la variable localización de la lesión

La tabla 53 de la estimación del tiempo de supervivencia revela, por ejemplo, que los pacientes con la lesión en la encía viven el doble que los pacientes con la lesión en la mucosa yugal.

Tabla 53. Medias del tiempo de supervivencia en función de la localización de la lesión

LOCALIZACIÓN DE LA LESIÓN	Media ¹			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
Lengua y suelo boca	143,016	11,640	120,202	165,830
Encía	107,387	12,642	82,609	132,165
Trígono retromolar	65,750	6,782	52,458	79,042
Mucosa yugal	54,648	11,425	32,256	77,041
Otros	15,000	5,545	4,131	25,869
Global	137,917	8,316	121,618	154,216

¹. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

Además el test de Breslow confirma que las curvas de supervivencia son estadísticamente diferentes (p-valor<0,05) (Tabla 54).

Tabla 54. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes localizaciones de la lesión

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Breslow (Generalized Wilcoxon)	13,090	4	,011

3.2.5. TIPO DE LESIÓN

La figura siguiente representa las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en función del tipo de lesión. Para los casos con eritroplasia, no se produce ningún fallecimiento.

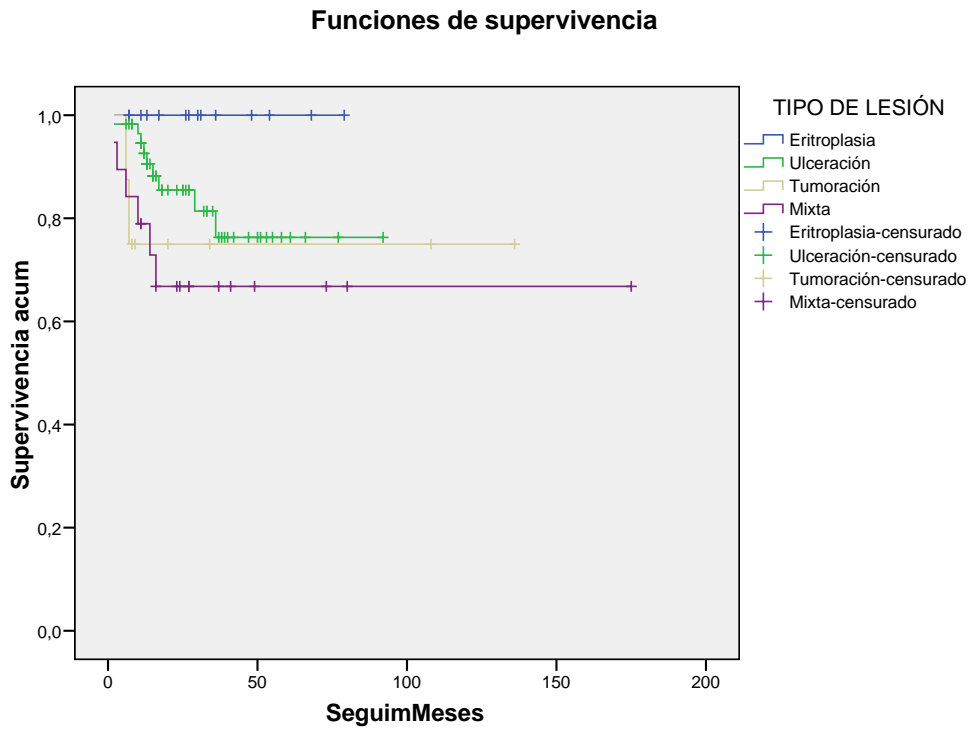


Figura 29. Curvas de supervivencia para la variable tipo de lesión

Quando las curvas de supervivencia se entrecortan, sobre todo al principio del seguimiento, es más potente el test de Breslow que el test del Logaritmo del Rango para confirmar que las curvas de supervivencia son estadísticamente diferentes (p -valor $<0,05$) (Tabla 55).

Tabla 55. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de tipo de lesión.

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Breslow (Generalized Wilcoxon)	7,946	3	,047

Es probable que, al igual que en la localización de lesión, esta diferencia detectada en las curvas de supervivencia se vea condicionada por los casos con eritroplasia sin fallecimientos. La figura 30 muestra las curvas de supervivencia ignorando este tipo de lesión:

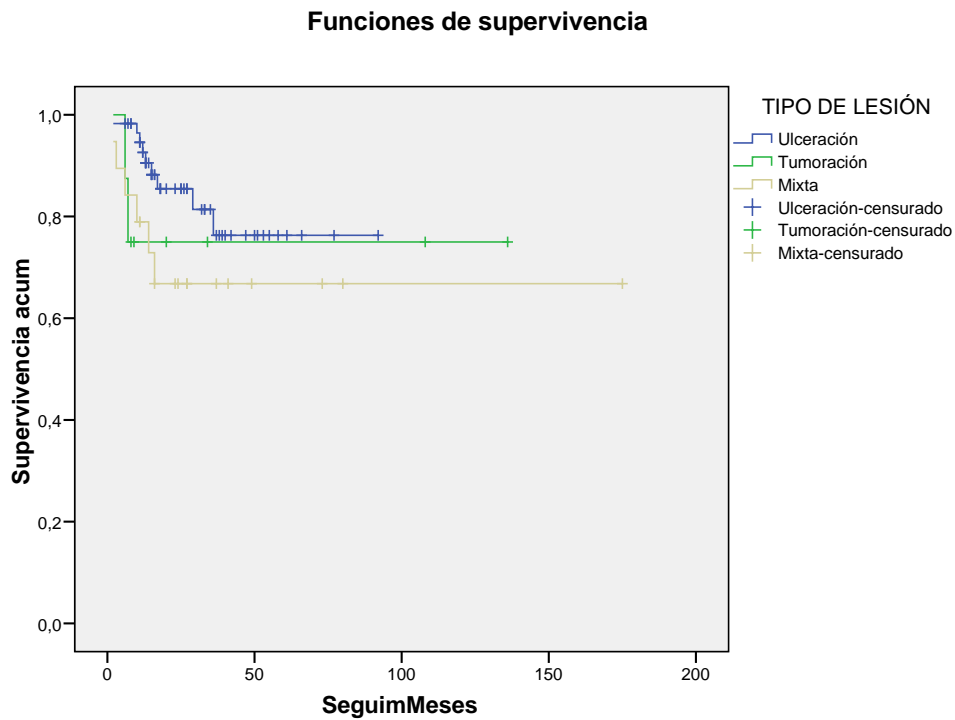


Figura 30. Curvas de supervivencia para la variable tipo de lesión (desestimando la eritroplasia)

La tabla 56 de la estimación del tiempo de supervivencia revela que los pacientes con ulceración son los que menos tiempo sobreviven y los que presentan una lesión mixta los que más.

Tabla 56. Medias del tiempo de supervivencia para según el tipo de lesión

TIPO DE LESIÓN	1 Media			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
Ulceración	74,956	5,249	64,668	85,245
Tumoración	103,625	19,826	64,767	142,483
Mixta	119,830	18,551	83,469	156,190
Global	133,403	9,259	115,254	151,551

1. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

Sin embargo, a pesar de las diferencias en el tiempo medio de supervivencia, el test de Breslow confirma que las curvas de supervivencia son estadísticamente iguales (p-valor>0,05) (Tabla 57).

Tabla 57. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de tipo de lesión

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Breslow (Generalized Wilcoxon)	4,402	2	,111

Por tanto, excepto para pacientes con eritroplasia que sobreviven todos al final del seguimiento, el resto de lesiones tienen supervivencias similares.

3.2.6. TAMAÑO CLÍNICO

El gráfico siguiente representa las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en función del tamaño clínico en cm de la lesión.

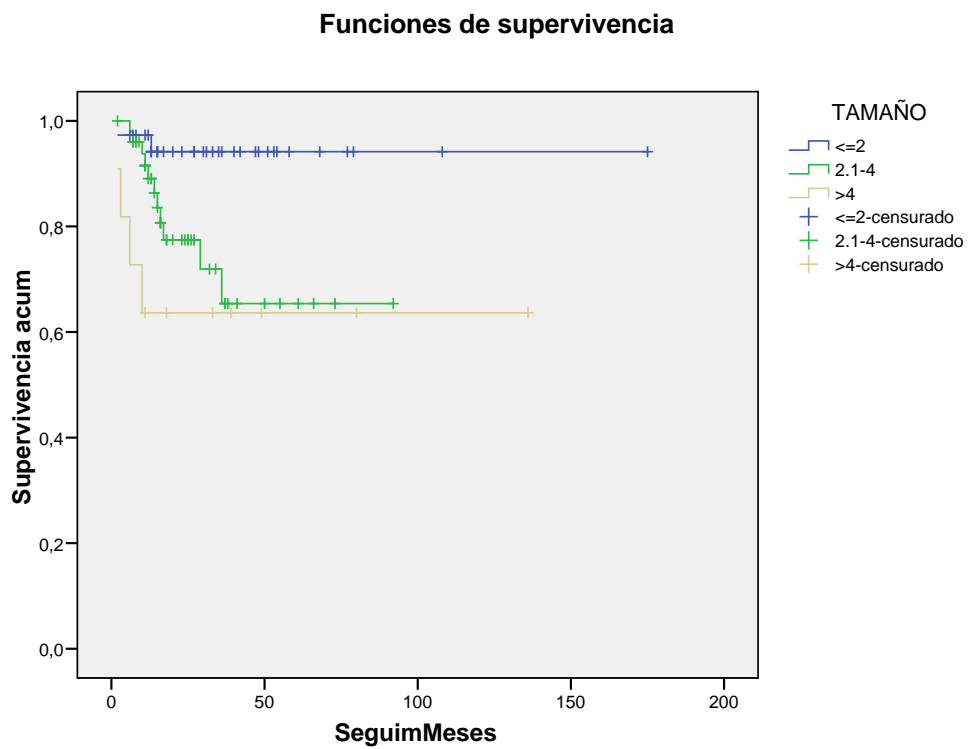


Figura 31. Curvas de supervivencia para la variable tamaño

Es evidente el acortamiento de la supervivencia a medida que aumenta el tamaño de la lesión.

El tiempo medio de supervivencia en pacientes con lesiones pequeñas (menor de 2 cm) es, aproximadamente, el doble que en paciente con lesiones más grandes (Tabla 58).

Tabla 58. Medias del tiempo de supervivencia en función del tamaño de la lesión

TAMAÑO	Media ¹			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
<=2	165,240	6,710	152,088	178,391
2.1-4	66,952	6,634	53,951	79,954
>4	88,455	18,973	51,268	125,641
Global	138,941	8,152	122,963	154,919

1. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

Además, el test de Breslow confirma que las curvas de supervivencia son estadísticamente distintas (p -valor<0,001) (Tabla 59).

Tabla 59. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de tamaño

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Breslow (Generalized Wilcoxon)	9,141	2	,010

3.2.7. AFECTACIÓN ÓSEA

La figura siguiente representa las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en función de si presentan o no afectación ósea. Ambas funciones son muy similares.

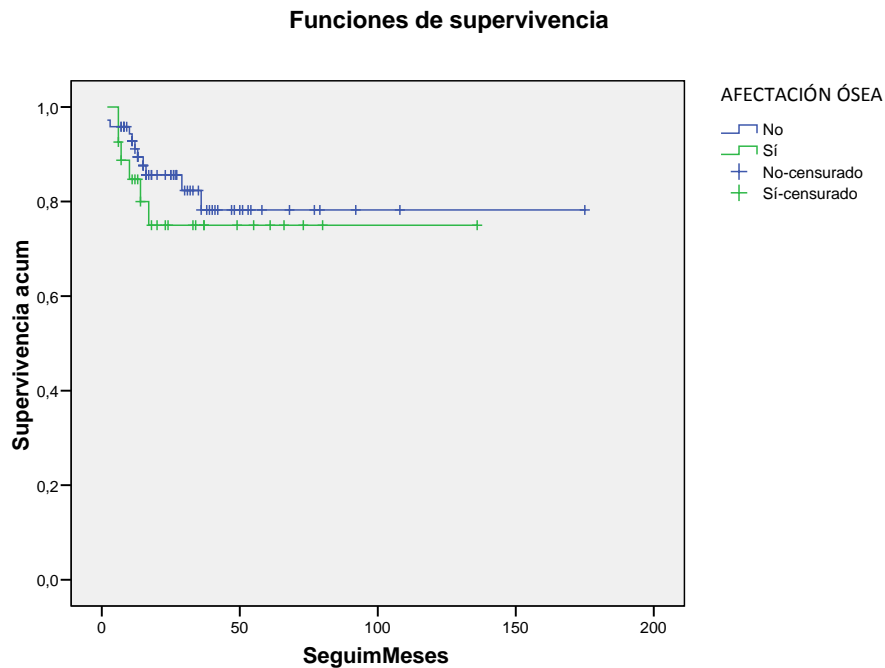


Figura 32. Curvas de supervivencia para la variable afectación ósea

La tabla 60 de la estimación del tiempo de supervivencia revela que los pacientes con afectación ósea viven un poco menos que los que no padecen afectación.

Tabla 60. Medias del tiempo de supervivencia según la afectación ósea

Afectósea	Media ¹			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
No	140,748	9,901	121,342	160,154
Sí	104,621	11,238	82,595	126,647
Global	139,241	8,105	123,355	155,126

¹. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

El test de Breslow revela que las curvas de supervivencia son estadísticamente iguales (p-valor>0,05) (Tabla 61).

Tabla 61. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de afectación ósea.

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Breslow (Generalized Wilcoxon)	1,000	1	,317

3.2.8. DIÁMETRO MAYOR

La figura siguiente representa las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en función del tamaño en cm del diámetro mayor medido sobre la RNM o la TC.

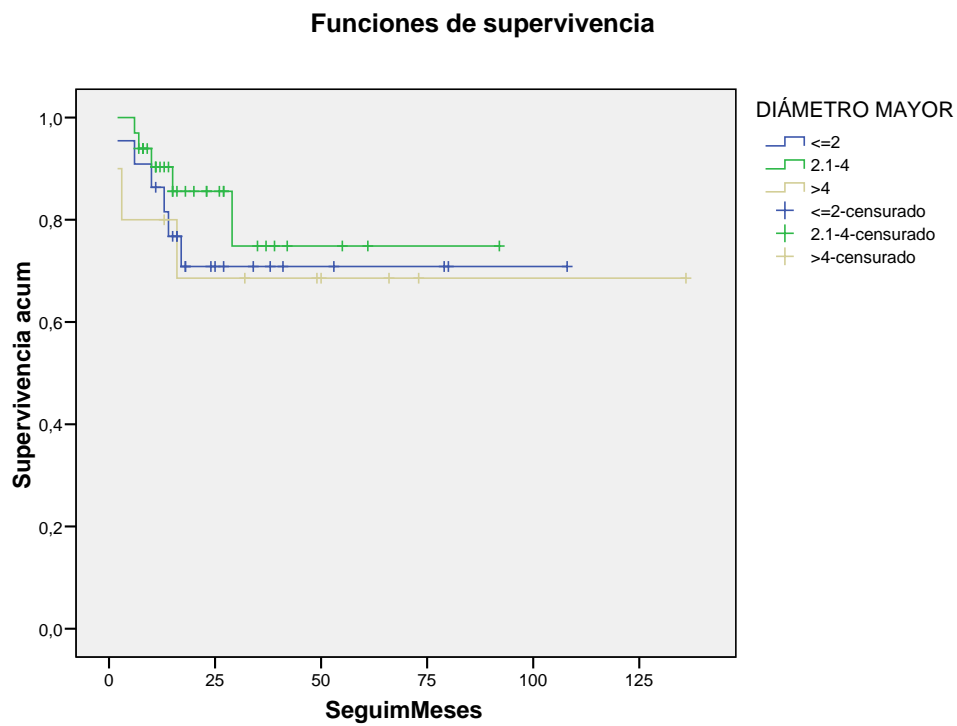


Figura 33. Curvas de supervivencia para la variable diámetro mayor

El tiempo medio de supervivencia en pacientes con lesiones de diámetro mayor por encima de 4 cm es unos 20 meses superior que en pacientes con diámetros menores (Tabla 62).

Tabla 62. Medias y medianas del tiempo de supervivencia según el diámetro mayor

DIÁMETRO MAYOR	Media ¹			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
<=2	79,649	9,848	60,347	98,951
2.1-4	73,456	8,060	57,658	89,254
>4	95,586	19,438	57,487	133,684
Global	103,254	7,846	87,876	118,632

1. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

Sin embargo, el test de Breslow concluye que las curvas de supervivencia son estadísticamente iguales ($p\text{-valor} > 0,05$) (Tabla 63).

Tabla 63. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para los diferentes niveles de diámetro mayor

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Breslow (Generalized Wilcoxon)	1,392	2	,499

3.2.9. DIÁMETRO MENOR

La figura siguiente representa las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en función del tamaño en cm del diámetro menor medido sobre la RNM o la TC (sólo hay un caso con tamaño mayor de cuatro, el cual se añadió a la segunda categoría).

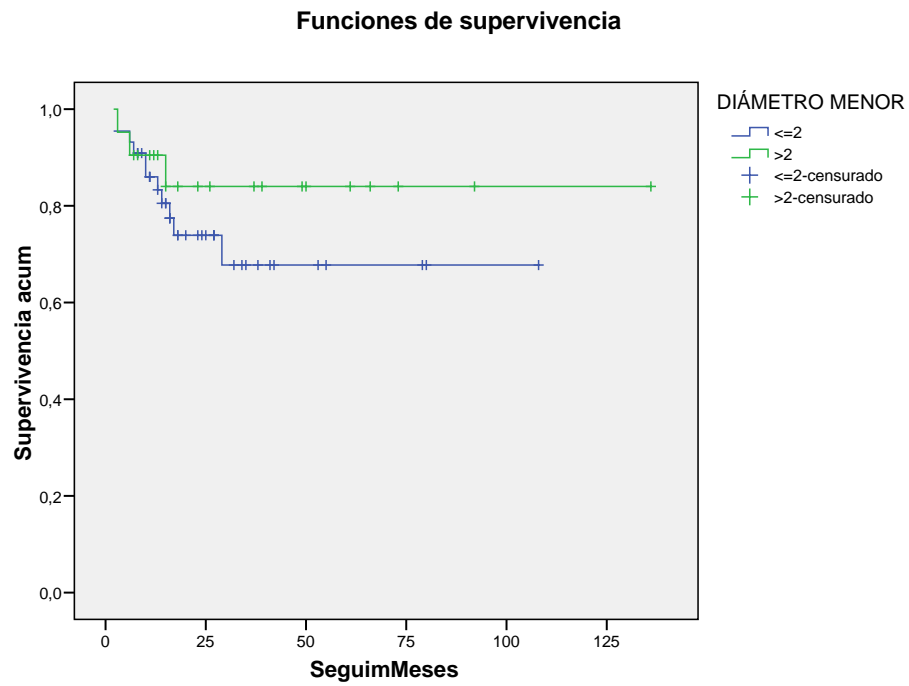


Figura 34. Curvas de supervivencia para la variable diámetro menor

El tiempo medio de supervivencia en pacientes con lesiones de diámetro menor por debajo de 2 cm es un 33% inferior que en pacientes con diámetros mayores (Tabla 64).

Tabla 64. Medias del tiempo de supervivencia para el diámetro menor

DMENR	Media ¹			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
<=2	77,671	8,055	61,883	93,458
>2	115,656	10,896	94,300	137,013
Global	103,254	7,846	87,876	118,632

1. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

A pesar de las diferencias del tiempo medio de supervivencia según tamaño del diámetro menor, el test de Breslow confirma que las curvas de supervivencia son estadísticamente iguales ($p\text{-valor} > 0,05$) (Tabla 65).

Tabla 65. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de diámetro menor

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Breslow (Generalized Wilcoxon)	,506	1	,477

3.2.10. ÁREA

La figura 35 representa las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en función del área de la lesión obtenida a partir de la RNM o de la TC.

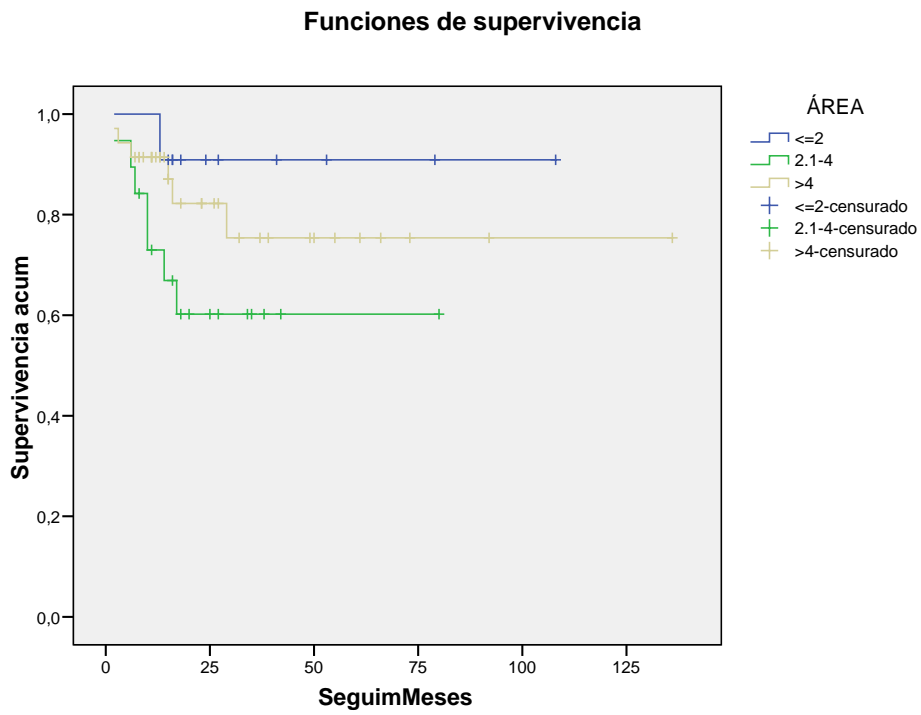


Figura 35. Curvas de supervivencia para la variable área

El tiempo medio de supervivencia en pacientes con lesiones de áreas superiores a 4 cm² es, aproximadamente, el doble que en pacientes con áreas de la lesión entre 2 y 4 cm² (Tabla 66).

Tabla 66. Medias y medianas del tiempo de supervivencia para el área

ÁREA	Media ¹			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
<=2	99,364	8,234	83,224	115,503
2.1-4	52,069	8,295	35,810	68,329
>4	106,251	11,181	84,337	128,165
Global	103,254	7,846	87,876	118,632

1. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

Sin embargo, el test de Breslow confirma que las curvas de supervivencia son estadísticamente iguales ($p\text{-valor} > 0,05$) (Tabla 67).

Tabla 67. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de área

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Breslow (Generalized Wilcoxon)	4,266	2	,118

3.2.11. ADENOPATÍAS

La figura 36 representa las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en función de si presentan o no adenopatías. Entre los pacientes con adenopatías bilaterales no se ha producido ningún fallecimiento.

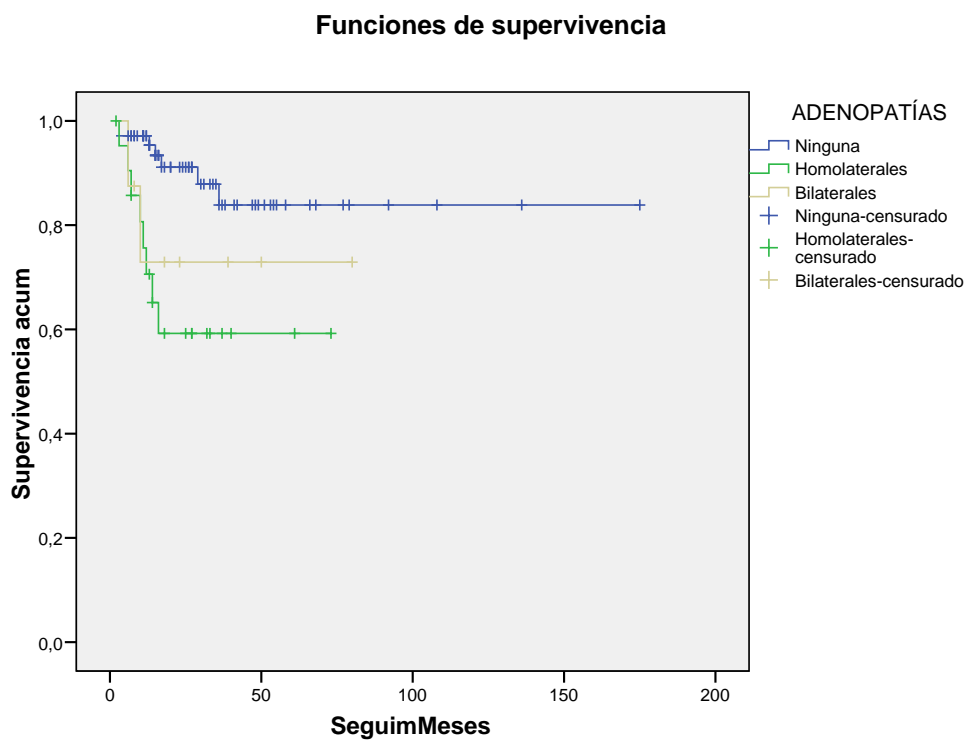


Figura 36. Curvas de supervivencia para la variable adenopatías

Es evidente el acortamiento de la supervivencia cuando aparecen adenopatías, sobre todo, las homolaterales.

Como ya mostraban las gráficas de supervivencia, en promedio, un paciente con adenopatía homolateral vive un 33% del tiempo que vive otro sin adenopatías (Tabla 68).

Tabla 68. Medias y medianas del tiempo de supervivencia

ADENOPATÍAS	Media ¹			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
Ninguna	150,128	9,158	132,178	168,077
Homolaterales	47,375	7,052	33,554	61,197
Bilaterales	60,542	11,831	37,354	83,730
Global	139,269	8,102	123,390	155,148

1. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

El test de Breslow revela que las curvas de supervivencia son estadísticamente distintas (p-valor<0,001) (Tabla 69).

Tabla 69. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de adenopatías

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Breslow (Generalized Wilcoxon)	11,261	2	,004

3.2.12. VALOR TNM

Las figuras siguientes representan las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en función de los parámetros T, N, M de la clasificación tumoral.

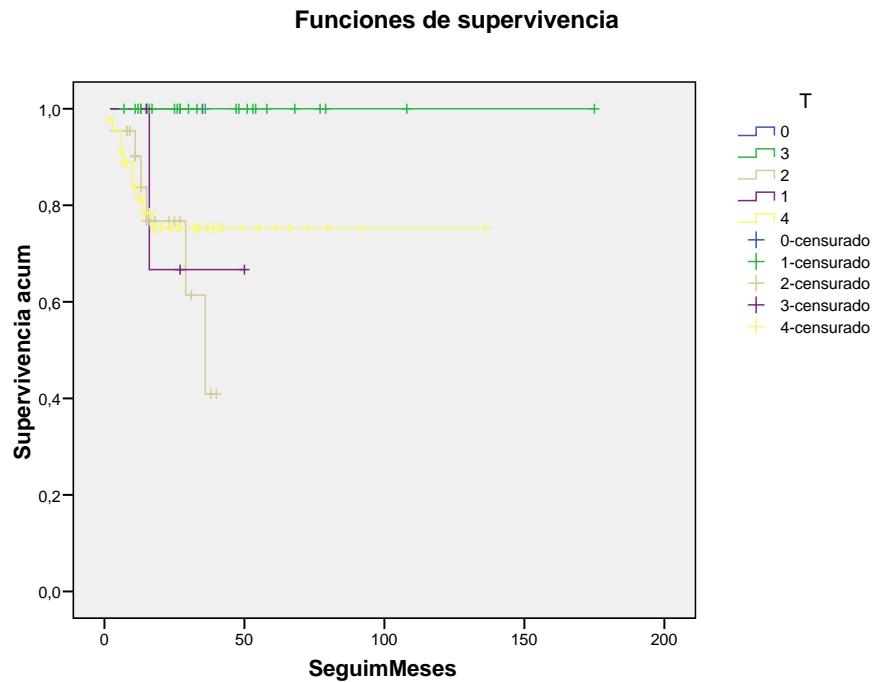


Figura 37. Curvas de supervivencia para la variable T

El test de Breslow indica que no existen diferencias significativas ($p\text{-valor} > 0.05$) entre las distintas curvas de supervivencia según valores de T (Tabla 70).

Tabla 70. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de T

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Breslow (Generalized Wilcoxon)	7,721	4	,102

Funciones de supervivencia

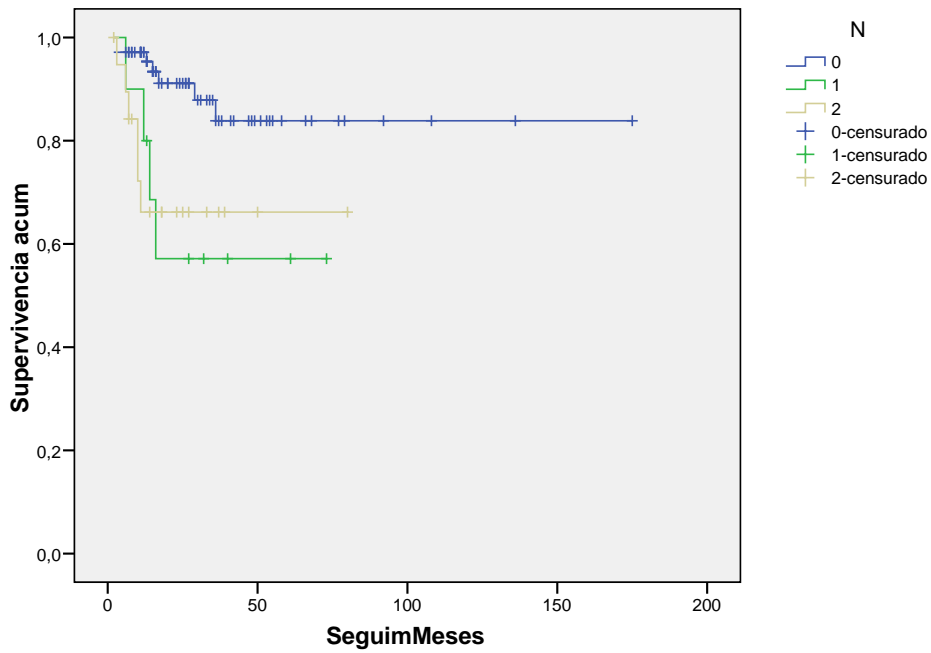


Figura 38. Curvas de supervivencia para la variable N

El tiempo medio de supervivencia de un paciente con valor 0 en N es tres veces mayor que en pacientes con otros valores de N (Tabla 71).

Tabla 71. Medias y medianas del tiempo de supervivencia para el valor N

N	Media ¹			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
0	150,128	9,158	132,178	168,077
1	46,943	9,948	27,444	66,441
2	55,639	8,148	39,669	71,609
Global	139,269	8,102	123,390	155,148

1. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

El test de Breslow indica que las curvas de supervivencia son estadísticamente distintas (p -valor <0.05) según los valores de N (Tabla 72).

Tabla 72. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de N

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Breslow (Generalized Wilcoxon)	10,843	2	,004

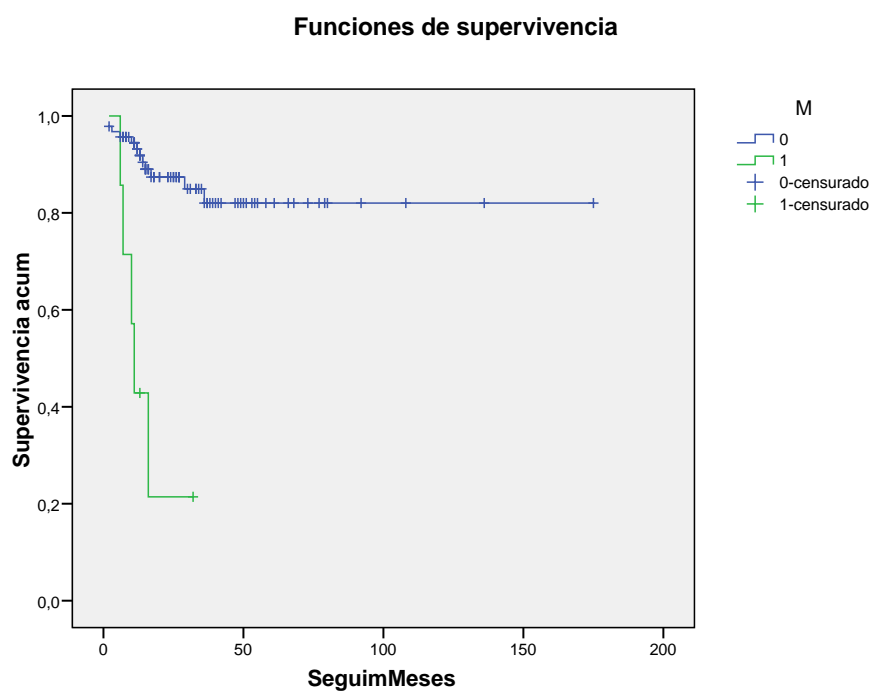


Figura 39. Curvas de supervivencia para la variable M

El tiempo medio de supervivencia de un paciente con valor 0 en M es casi 10 veces superior al de un paciente con valor 1 de M (Tabla 73).

Tabla 73. Medias y medianas del tiempo de supervivencia para el valor M

M	Media ¹			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
0	146,588	7,880	131,143	162,033
1	15,143	3,825	7,646	22,640
Global	139,269	8,102	123,390	155,148

¹. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

El test de Breslow indica que las curvas de supervivencia son estadísticamente distintas (p-valor<0.05) según los valores de N (Tabla 74).

Tabla 74. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de M

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Breslow (Generalized Wilcoxon)	21,350	1	,000

3.2.13. ESTADIO

La figura 40 representa las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en función del estadio. Entre los pacientes con estadios I y III no se ha producido ningún fallecimiento.

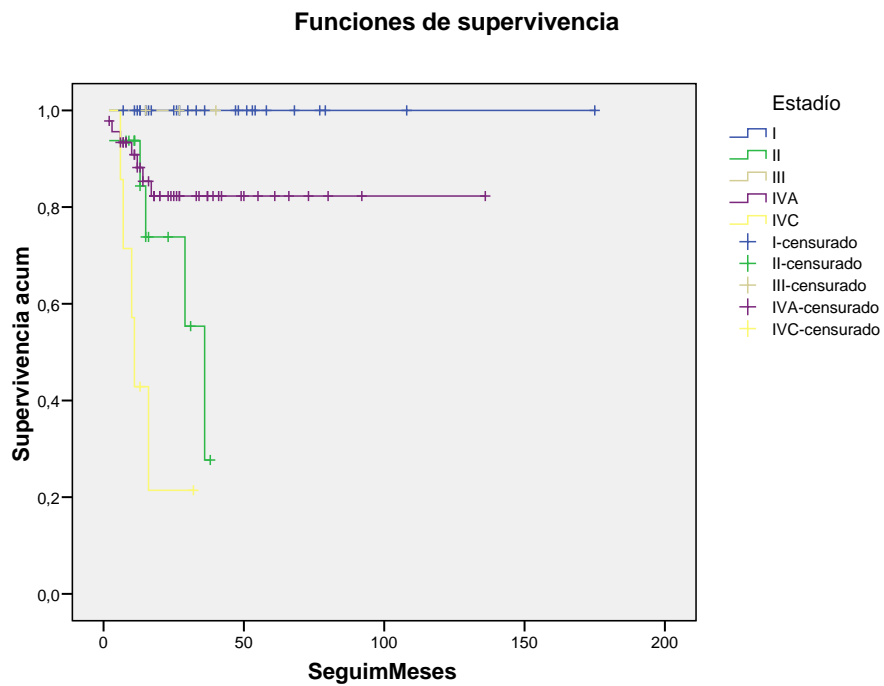


Figura 40. Curvas de supervivencia para la variable estadio

La supervivencia en los estadios II y IVC se acorta significativamente respecto al estadio IVA.

La siguiente tabla muestra los tiempos medios de supervivencia para los estadios en los que se producen fallecimientos:

Tabla 75. Medias y medianas del tiempo de supervivencia para el estadio

Estadio	Media ¹			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
II	28,766	3,417	22,069	35,463
IVA	113,649	7,741	98,477	128,821
IVC	15,143	3,825	7,646	22,640
Global	95,223	8,693	78,184	112,262

1. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

Como ya mostraban las gráficas de supervivencia, en promedio, un paciente en estadio II ó IVC vive mucho menos que otro en estadio IVA (entre 85 y 100 meses menos).

El test de Breslow revela que las curvas de supervivencia son estadísticamente distintas (p-valor<0,001) (Tabla 76).

Tabla 76. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles del estadio

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Breslow (Generalized Wilcoxon)	26,402	4	,000

3.2.14. DIFERENCIACIÓN HISTOLÓGICA

La siguiente figura representa las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en función de la diferenciación histológica.

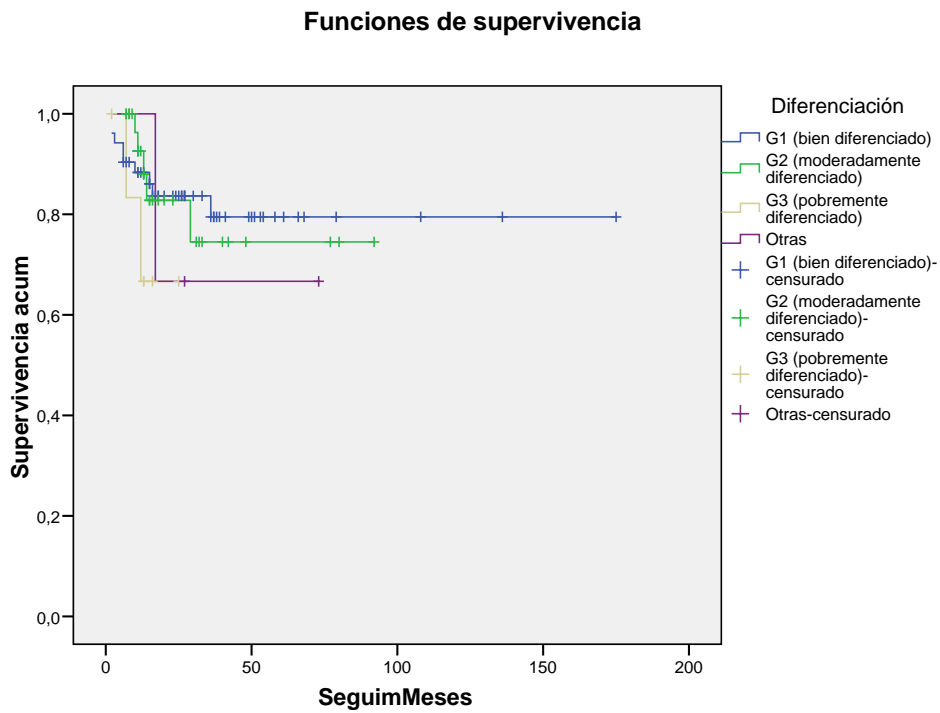


Figura 41. Curvas de supervivencia para la variable diferenciación histológica

El tiempo medio de supervivencia de un paciente con COCE bien diferenciado es muy superior al tiempo medio de supervivencia de pacientes con diferenciación moderada o pobre (Tabla 77).

Tabla 77. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de diferenciación histológica

Diferenciación	Media ¹			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
Bien diferenciado	141,909	10,215	121,887	161,931
Moderadamente diferenciado	73,054	7,654	58,052	88,055
Pobrementemente diferenciado	19,833	3,041	13,874	25,793
Otras	54,333	15,241	24,460	84,206
Global	136,640	8,626	119,732	153,547

1. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

Sin embargo, el test de Breslow revela que las curvas de supervivencia son estadísticamente iguales ($p\text{-valor} > 0,05$) (Tabla 78).

Tabla 78. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de diferenciación histológica

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Breslow (Generalized Wilcoxon)	1,564	3	,668

3.2.15. MARCADORES TUMORALES

En este apartado analizamos la influencia de los niveles de expresión de los marcadores tumorales asociados a los linfocitos Treg en la supervivencia de los 31 pacientes a los que se les determinaron dichos valores.

Para ello, se clasificó a cada uno de los marcadores en dos grupos según su valor medio de expresión en las distintas muestras tumorales. Las figuras y tablas siguientes representan las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y el tiempo medio de supervivencia para los distintos marcadores tumorales, respectivamente:

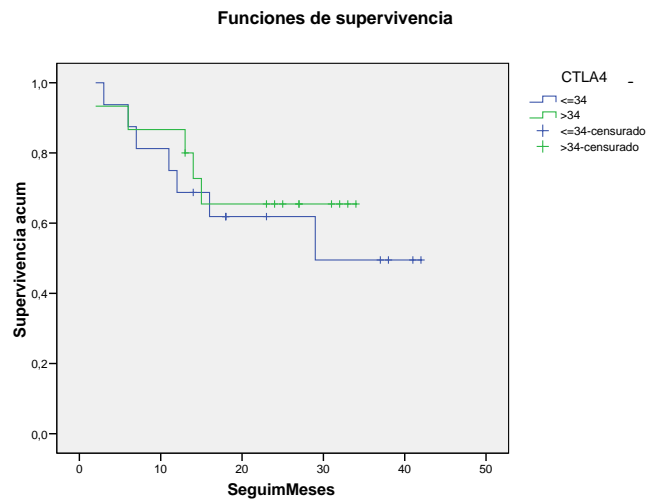


Figura 42. Curva de supervivencia para la variable CTLA4

Tabla 79. Medias y medianas del tiempo de supervivencia para CTLA4

CTLA4	Media ¹			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
<=34	27,916	4,014	20,049	35,783
>34	25,764	3,072	19,743	31,785
Global	29,355	2,878	23,715	34,995

1. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

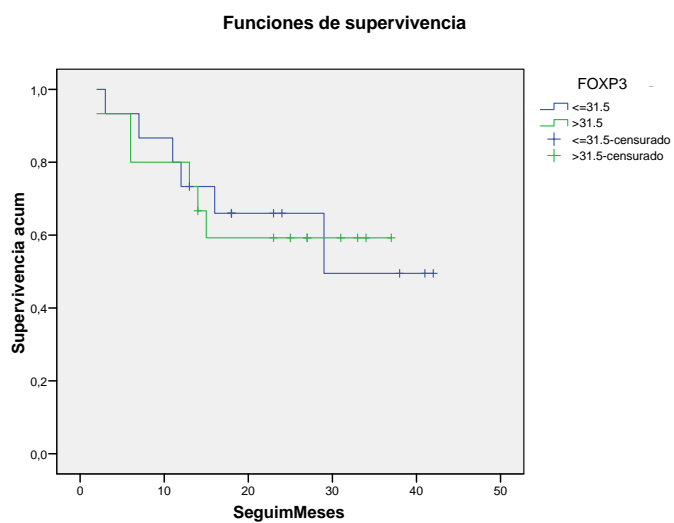


Figura 43. Curva de supervivencia para la variable FoxP3

Tabla 80. Medias y medianas del tiempo de supervivencia para FoxP3

FOXP3	Media ¹			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
<=31.5	28,948	4,070	20,971	36,926
>31.5	25,770	3,622	18,672	32,869
Global	28,859	2,952	23,072	34,645

1. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

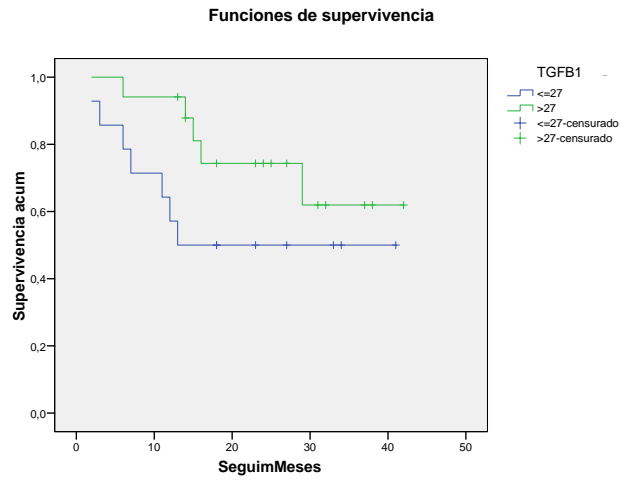


Figura 44. Curva de supervivencia para la variable TGFB1

Tabla 81. Medias y medianas del tiempo de supervivencia para TGFB1

TGFB1	1 Media			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
<=27	24,357	4,514	15,510	33,204
>27	32,934	3,346	26,375	39,493
Global	29,355	2,878	23,715	34,995

1. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

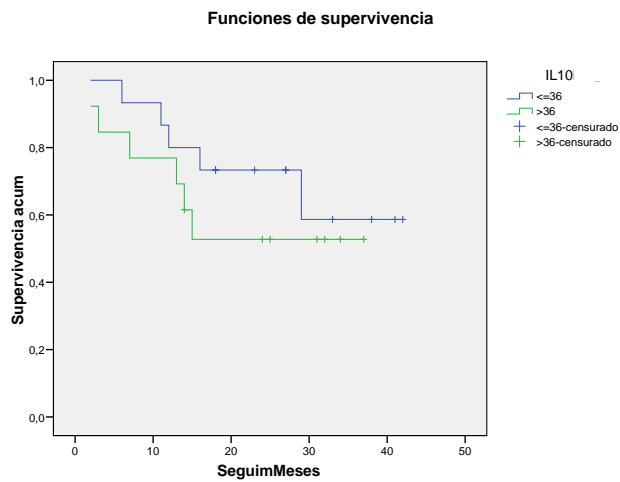


Figura 45. Curva de supervivencia para la variable IL10

Tabla 82. Medias y medianas del tiempo de supervivencia para IL10

IL10	Media ¹			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
<=36	31,893	3,669	24,701	39,085
>36	23,835	4,037	15,923	31,747
Global	29,513	2,974	23,684	35,342

1. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

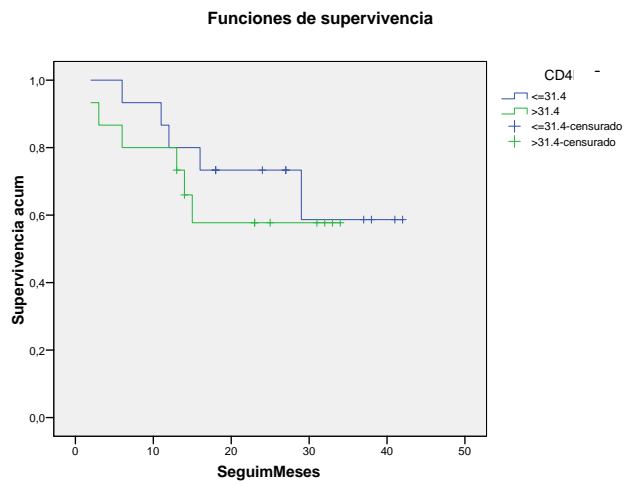


Figura 46. Curva de supervivencia para la variable CD4

Tabla 83. Medias y medianas del tiempo de supervivencia para CD4

CD4	Media ¹			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
<=31.4	31,893	3,669	24,701	39,085
>31.4	23,499	3,377	16,880	30,119
Global	30,100	2,875	24,464	35,736

¹. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

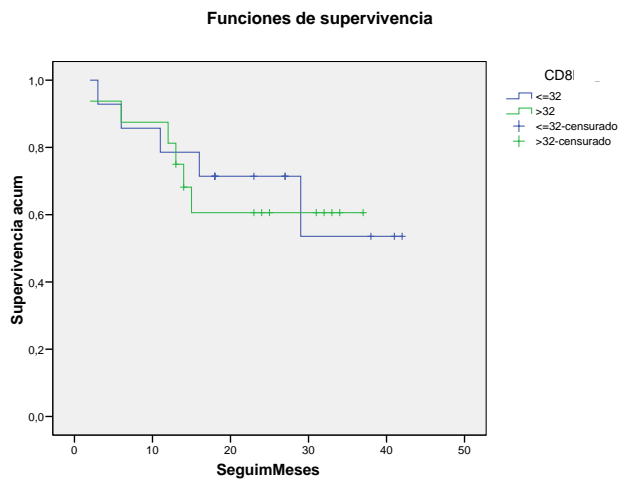


Figura 47. Curvas de supervivencia para la variable CD8

Tabla 84. Medias y medianas del tiempo de supervivencia para CD8

CD8	Media ¹			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
<=32	30,250	4,177	22,064	38,436
>32	26,578	3,401	19,911	33,244
Global	30,100	2,875	24,464	35,736

1. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

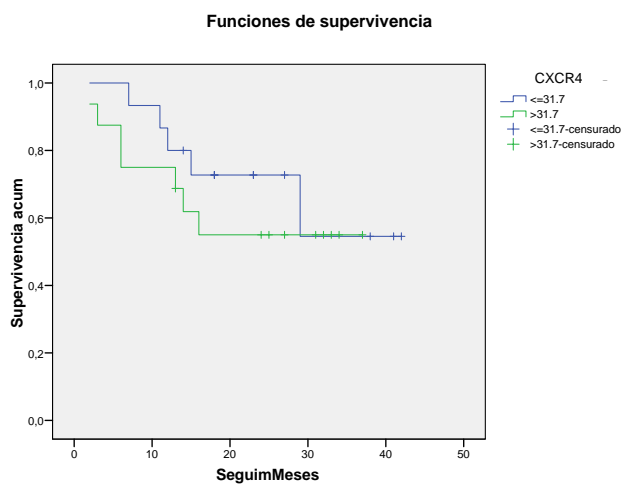


Figura 48. Curvas de supervivencia para la variable CXCR4

Tabla 85. Medias y medianas del tiempo de supervivencia para CXCR4

CXCR4	Media ¹			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
<=31.7	31,273	3,809	23,808	38,738
>31.7	24,288	3,669	17,097	31,478
Global	29,355	2,878	23,715	34,995

1. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

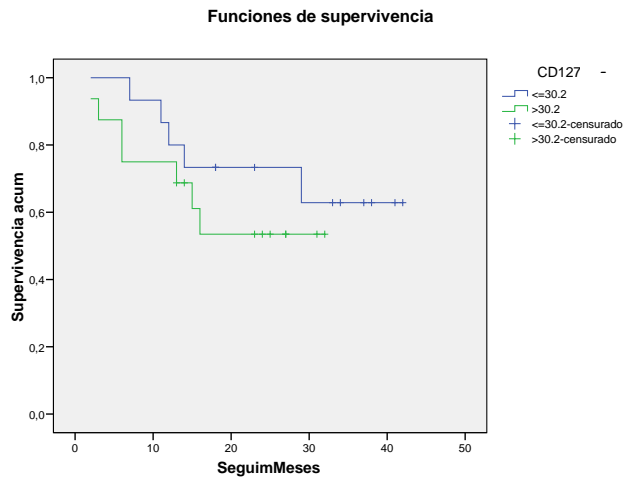


Figura 49. Curvas de supervivencia para la variable CD127

Tabla 86. Medias y medianas del tiempo de supervivencia para CD127

CD127	Media ¹			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
<=30.2	32,371	3,575	25,365	39,378
>30.2	21,354	3,076	15,326	27,383
Global	29,355	2,878	23,715	34,995

¹. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

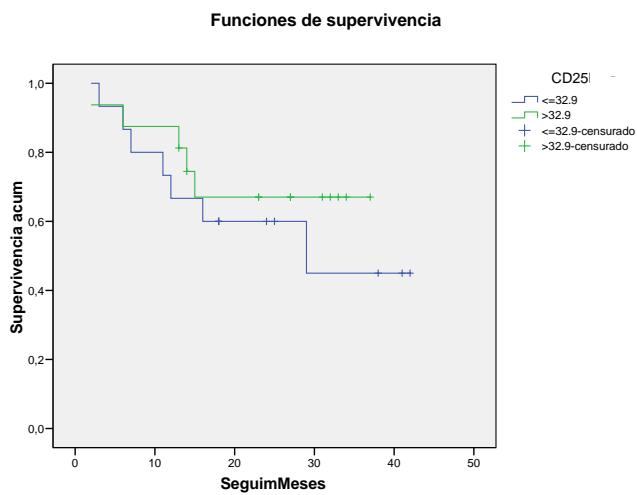


Figura 50. Curvas de supervivencia para la variable CD25

Tabla 87. Medias y medianas del tiempo de supervivencia para CD25

CD25	Media ¹			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
<=32.9	26,917	4,165	18,753	35,080
>32.9	28,179	3,309	21,694	34,664
Global	29,355	2,878	23,715	34,995

1. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

Se observa que, en ningún marcador, la diferencia en el tiempo medio de supervivencia varía en función del valor de dicho marcador. Así lo confirman las pruebas de homogeneidad de curvas: todos los p-valores son mayores que 0.05, por lo que, para cada marcador, las curvas de supervivencia definidas por los dos grupos de valores son estadísticamente iguales (Tabla 88).

Tabla 88. Pruebas de homogeneidad de curvas para cada uno de los marcadores tumorales

MARCADOR	Log Rank (Mantel-Cox) p-valor	Breslow (Generalized Wilcoxon) p-valor
CTLA4	---	0,693
FoxP3	---	0,772
TGFB1	0,145	---
IL10	0,410	---
CD4	0,551	---
CD8	---	0,727
CXCR4	0,487	---
CD127	0,351	---
CD25	---	0,530

Dado que las curvas de Kaplan-Meier se han admitido como homogéneas en cada uno de los marcadores, se descarta la aplicación del modelo de Cox.

3.3. MODELO MULTIVARIANTE: REGRESIÓN DE COX

Se han identificado en los apartados anteriores factores que inducen tiempos de supervivencia diferentes estadísticamente. Los modelos de Cox nos permiten, de modo similar a la regresión convencional:

- Identificar esos factores desde un punto de vista multivariante: todas las variables se ponen en relación a la variable dependiente (el tiempo de supervivencia); pero en un contexto de interacción mutua con el resto de factores. Se trata de una representación más fiable de lo que pasa en la realidad.
- Expresar las relaciones detectadas en forma de ecuación, para así cuantificar con exactitud cómo afecta el factor sobre la supervivencia.

Entre las variables a considerar por la regresión de Cox se descartaron estadio y localización por motivos de colinealidad y escasez de muestra respectivamente.

La correlación entre M y estadio es marcada debido a que siempre que M=1, estadio=5.

Por otra parte, existe un elevado rango de localizaciones donde el número de fallecidos se reduce a tamaños muestrales muy bajos, por lo que no es posible la convergencia del modelo con su inclusión.

La tabla siguiente (explicita coeficientes estimados, error típico y estadístico para el contraste de diferencias respecto a categoría de referencia) indica que de las variables tamaño, adenopatías, M y N, sólo dos pasan a formar parte de la ecuación de Cox: M y tamaño.

Tabla 89. Variables en la ecuación

		B	ET	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
Paso 1	M	2,176	,549	15,692	1	,000	8,811
Paso 2	M	2,058	,551	13,972	1	,000	7,828
	Tamaño	,400	,173	5,344	1	,021	1,492

La ecuación de regresión de Cox para el modelo presente es:

$$H(t) = H_0(t) 7,82^{(M=1)} 1,49^{(TAMAÑO)}$$

donde $H(t)$ representa una función de impacto de la mortalidad (equivalente a la supervivencia; pero en sentido inverso. A más supervivencia, menor impacto y viceversa).

- ⇒ La variable M produce diferencias significativas en la función de impacto. Concretamente cuando un paciente con valor 1 de M se compara a uno con valor 0 de M , su función de impacto se multiplica por 7,8, es decir, un 780%.
- ⇒ El *tamaño* también genera diferencias significativas, de tal manera que una unidad más de tamaño multiplica por casi 1,5 (un 50%) el impacto.

Se trata de aspectos absolutamente determinantes de la supervivencia. En presencia de éstos, no es necesario recurrir a otros para obtener un pronóstico fiable de lo que pasará al paciente.

DISCUSIÓN

El COCE es el tumor maligno de origen epitelial más frecuente en la cavidad oral. Su incidencia es variable dependiendo del área estudiada. Concretamente en España, se estima que la incidencia del cáncer oral es para los hombres de 5,7 a 12,9 casos por 100.000 habitantes/año, y entre las mujeres del 0,6 al 2,1 por 100.000 habitantes/año (7).

La edad de aparición suele ser de 50 a 70 años, aunque recientemente se ha observado un incremento en la incidencia del COCE en pacientes menores de 40 años y en mujeres en los que estos factores de riesgos no están presentes (6).

En nuestro estudio, realizado sobre 100 pacientes con COCE, la edad mínima de presentación de la enfermedad fue de 33 y la máxima de 92, encontrando la mayor frecuencia en los pacientes de edades comprendidas entre 56 y 70 años, correspondiendo esta franja etaria a un 41%. La edad media encontrada en nuestros pacientes fue de 63,3, coincidiendo con la mayoría de los estudios como el de Brandizzi y cols. (74) en el que la edad media la sitúan en 62 años o el de Favia y cols. (139) con una edad media de 64,18 años. Respecto a la mayor afectación del COCE que se ha reportado en los últimos años en pacientes jóvenes, nosotros sólo encontramos un total de 3 pacientes menores de 40 años, lo que supone un 3%. Jainkittivong y cols. (66) muestran un porcentaje algo mayor (4,7%) en estos pacientes. Autores como Favia y cols. (139) encuentran cifras más elevadas en pacientes menores de 45 años (9,3%).

El COCE ha sido considerado una enfermedad más ligada a los varones. Sin embargo, la revisión de la literatura muestra como los estudios más actuales encuentran una mayor prevalencia en mujeres con respecto a otros más anteriores (71,140), con proporciones hombre/mujer bastante similares. Así Jainkittivong y cols. (66) encuentran un ratio hombre/mujer 1:1, al igual que Ortholan y cols. (141) en su estudio sobre 260 pacientes de 80 o más años. Autores como Andisheh-Tadbir (142) y cols. sitúan el ratio en 1,4:1, similar a nuestro ratio que fue de 3:2. Por tanto, podemos observar, que aunque se ha producido un aumento en el número de pacientes mujeres, el hombre sigue siendo el más afectado.

Aunque con la etiopatogenia del cáncer oral se han relacionado varios factores como el alcohol, el VPH, una dieta pobre en frutas y vegetales o la genética, el tabaco es el principal factor de riesgo en el COCE. En la mayoría de los estudios sobre COCE existe un alto porcentaje de pacientes fumadores. Nemes y cols. (77) encuentran que en el momento del diagnóstico el 65,5% de los pacientes fumaban. Cifras similares encontraron Tabdi y cols. (143) en los pacientes mayores de 45 años (62,5%). Ortholan y cols. (141) demostraron que el tabaco o el alcohol fueron los principales factores de riesgo en el 66% de los hombres y en el 16% de las mujeres. Poveda-Roda y cols. (80) revisan 123 pacientes con COCE, encontrando que el 45,5% eran fumadores y de ellos, el 67,9% consumían más de un paquete de cigarrillos al día. De los 100 pacientes estudiados, 40 (40%) eran fumadores y la mayoría de ellos fumaba un paquete o más al día. El tipo de tabaco más consumido por parte de los pacientes fumadores fue el rubio con un 62,2%. La mayoría de los pacientes estudiados por Ribeiro y cols. (83) eran fumadores y bebedores. En nuestro estudio, respecto al hábito enólico, el 41% de los pacientes bebía alcohol de forma diaria. La mayoría de los estudios reportan cifras similares o algo más elevadas en lo que respecta al consumo de alcohol (77, 144). Recientemente se ha observado un incremento del cáncer de lengua y orofaríngeo en pacientes jóvenes en los que la exposición a tabaco y alcohol es menor (145). Algunos estudios intentan estudiar los factores de riesgo presentes en estos pacientes, relacionándolo con el consumo de marihuana o con el VPH-16 (146). Nosotros en nuestro estudio sólo tuvimos en cuenta como factores de riesgo el tabaco y el alcohol, encontrando un alto porcentaje de pacientes fumadores.

Tanto la leucoplasia como la leucoplasia verrugosa proliferativa y el liquen plano oral han sido descritos como desórdenes potencialmente malignos. Entre los pacientes estudiados, el 6% presentaba una leucoplasia oral anterior al diagnóstico del COCE, el 2% tenía lesiones de liquen plano oral y sólo un 1% había sido diagnosticado anteriormente de leucoplasia verrugosa proliferativa. Haya-Fernández y cols. (50) llevaron a cabo un estudio en el cual determinaron la prevalencia de leucoplasia oral en pacientes con COCE, encontrando cifras bastante superiores a las nuestras. Así, el 19,56% de sus pacientes presentaron lesiones de leucoplasia oral asociadas

a la lesión neoplásica. Ortholan y cols. (141) también encontraron cifras más elevadas en su estudio en relación a los pacientes que previamente presentaban una leucoplasia oral o un liquen plano, con un 55% para las mujeres y un 11% en los hombres.

En el cáncer oral, el dolor puede ser el síntoma inicial que conduzca al diagnóstico de la enfermedad. Normalmente, las lesiones iniciales suelen ser asintomáticas, siendo las lesiones más avanzadas las que más sintomatología presentan. Se ha sugerido que la molestia oral es la sintomatología más común previa al diagnóstico en la mayoría de los pacientes y que el dolor es el síntoma inicial en aproximadamente el 20% de los casos (68). De ahí que clasificáramos a nuestros pacientes en tres grupos, encontrando que el 31% no presentaba ninguna sintomatología, el 29% refería molestias y el 40% refería dolor. Además encontramos que el dolor estaba asociado, en la mayoría de los casos, a las lesiones más avanzadas, representando éstas el 50%. Cuffari y cols. (68) encontraron en sus pacientes que el dolor aparecía como primer síntoma en el 19,2% demostrando además que éste estaba asociado al estadiaje TNM en los cánceres de lengua y suelo de boca. En el estudio de Gorsky y cols. (69) la mayoría de los pacientes presentaron algún síntoma en el momento del diagnóstico, siendo las molestias en lengua el más frecuente. Otros autores como Al-Rawi y cols. (67) encuentran en sus estudios que los síntomas más frecuentes son la ulceración y la tumefacción, representando el dolor sólo un 5,1% mientras que Mashberg y cols. (65) reportan la tumefacción, la sensación de quemazón y el dolor como los más frecuentes. La parestesia la encontramos en tan sólo 6 pacientes, en los cuales la lesión invadía al tejido óseo. Nuestros resultados, por tanto, concluyen que las lesiones en estadio más avanzado se asocian con más frecuencia al dolor.

La localización más frecuente del COCE es la lengua y el suelo de la boca aunque dependiendo del área geográfica estudiada puede variar. Autores como Oliveira y cols. (146), Losi-Guembarovsky (147), Rivera (144) o Dalhstrom y cols. (79) muestran mayor afectación de la lengua, en diferentes zonas de América. En Irán, Andisheh-Tabdid (142) encuentra un 53% de afectación en la lengua. En Italia, autores como Arduino y cols. (148), Brandizzi y cols. (74) y Favia y cols. (139) demuestran en sus estudios la mayor prevalencia del COCE en lengua. Sin

embargo en zonas más orientales como Irak, el labio inferior aparece como el lugar más frecuente de afectación seguido de la lengua (67). Jainkittivong (66) en su estudio sobre pacientes tailandeses encuentra mayor afectación en la encía (50%). En España, Izarzugaza y cols. (149) destacan la mayor afectación de la lengua del COCE, sobre todo a nivel de la base y de los bordes linguales. En nuestro estudio incluimos en un mismo apartado a los pacientes con COCE de superficie ventral de lengua, bordes linguales y suelo de boca, encontrando un 57% de afectación en esta localización, seguido de la encía con un 19% y del trígono retromolar con un 11%.

El COCE suele aparecer como una tumoración o como una úlcera. Aunque las lesiones iniciales pueden manifestarse en forma de placas rojas (eritroplasia) acompañadas o no de lesiones blancas (eritroleucoplasia), cuando los pacientes llegan a la consulta ya suelen presentar una forma ulcerada, exofítica o mixta. La mayoría de los autores encuentran la ulceración o la tumoración como la forma más frecuente de presentación (66,67,76). Nuestros resultados muestran mayor prevalencia de las lesiones ulceradas con un 59%, seguidas de las formas mixtas (19%) y de las eritroplásicas (14%). En un 8% de los casos encontramos tumoración.

Las lesiones neoplásicas presentan un tamaño variable dependiendo del tiempo de evolución de las mismas, por lo que el tamaño clínico de las lesiones en el momento del diagnóstico difiere según los estudios. Heng y Rossi (150) observaron que el tamaño medio de los tumores estudiados era de 2,2 cm, con un rango de 0,3 a 6 cm. Oliver y cols. (71) revisaron 92 casos de COCE encontrando que la mayoría de las lesiones eran menores de 4 cm en su diámetro mayor. Nosotros hemos constatado un tamaño medio de 2,67 cm, resultados muy similares a los encontrados por Martínez-Conde y cols. (86) aunque en este estudio sólo se incluyeron pacientes en estadios I y II.

En nuestro estudio encontramos un 50% de los pacientes con lesiones avanzadas (T3 y T4) en el momento del diagnóstico, al igual que Ortholan y cols. (141) quienes encuentran un 53% de sus pacientes con tumores en T3 y T4. Otros estudios muestran porcentajes mayores,

como el estudio realizado por Ribeiro y cols. (83) con un 65% de los pacientes con lesiones en T3 o T4 en el momento del diagnóstico. Otros autores, por el contrario, encuentran en mayor porcentaje lesiones de menor tamaño en estadio T1 o T2 (65, 82, 148, 151).

El porcentaje de ganglios afectados en el COCE oscila entre el 30% y el 50%. Nuestros resultados muestran una afectación del 30% de los casos, datos equiparables a los presentados por Arduino y cols. (148). Otros estudios encuentran mayor frecuencia de adenopatías llegando hasta un 60%, el doble de lo reportado por nosotros (74).

Las metástasis a distancia no son frecuentes en el COCE. Así en nuestro estudio, encontramos sólo un 7% de pacientes metástasis a distancia. En la literatura las cifras oscilan entre el 1 y 16% (75,152, 153).

Los estadios I y II están considerados como iniciales mientras que los estadios III y IV como avanzados. El diagnóstico tardío en el cáncer oral ha sido reportado en diferentes estudios. En nuestro estudio se observa una distribución homogénea en cuanto a los estadios iniciales y los avanzados, destacando en frecuencia el estadio IVA con un 46% de afectación, seguido del estadio I con un 27%. Estas cifras varían según los estudios, así Ribeiro y cols. (83) reportan un 65% de sus pacientes en estadios avanzados mientras que Oliver y cols. (71) encuentran un 76% de los pacientes en estadios I y II. En el estudio realizado por Poveda-Roda y cols. (80) en España, la mayoría de los pacientes (el 78,9%) fueron diagnosticados en estadios iniciales (I y II).

El tipo histológico más frecuentemente encontrado en los trabajos de investigación es el carcinoma bien diferenciado. Jankittivong y cols. (66) encuentran un 78,6% del tipo bien diferenciado, cifras similares a las de Al-Rawi y cols. (70,73%) (67) y algo inferiores a las de Ortholan y cols. (84,%) (141). Nuestros resultados son muy similares a los de Andisheh-Tadbir y cols. (142), encontrando un 55,3% en esta variedad histológica.

La cirugía y la radioterapia son los métodos más empleados en el tratamiento del COCE aunque la quimioterapia también se emplea en algunos casos, sólo o en combinación con la

radioterapia. En nuestra revisión, la mayoría de los pacientes fueron tratados con cirugía sola o asociada a la radioterapia.

El riesgo de recurrencia o de un segundo cáncer oral se ha estimado en un 10 y un 40% tras el tratamiento. Así Oliver y cols. (71) observaron recidivas en el 10% de los pacientes estudiados. Nuestros resultados, algo mayores, se encuentran dentro del rango reportado en la literatura con un porcentaje de recidiva del 32%.

La supervivencia global de nuestros pacientes también se halla dentro del rango publicado en la literatura reciente, mostrando una tasa de supervivencia en torno al 85% a los 2 años tras el diagnóstico. Siriwardena y cols. (81) cifran la supervivencia a los 3 años en torno al 90%. Para Vallecillo Capilla y cols. (154) la tasa de supervivencia a los 2 años y medio es del 75%. Rusthoven y cols. (155) reportan una tasa de supervivencia del 65% a los 2 años para pacientes con COCE de lengua.

El tiempo medio de supervivencia en nuestros pacientes se estimó en 139,2 meses, es decir, aproximadamente unos 11 años. Vallecillo Capilla y cols. (154) reportan cifras menores, en torno a los 6 años en un estudio realizado en Andalucía.

A pesar de los avances en el diagnóstico y el tratamiento, no se ha observado una notable mejoría en la supervivencia de los pacientes con COCE en los últimos años. En la literatura publicada podemos observar como diferentes factores se han evaluado como marcadores pronósticos en el cáncer oral. Así, el sexo, la edad, el estadio clínico, la diferenciación histológica o el tratamiento, entre otros han sido estudiados con el fin de encontrar marcadores pronósticos fidedignos. Leite y cols. (156) estudiaron varios parámetros, destacando el estadio clínico, el sexo, el diagnóstico precoz, la modalidad de tratamiento y el tiempo transcurrido entre la presentación de los síntomas iniciales y el tratamiento como los principales factores pronósticos. Beltrami y cols. (157) estudiaron la influencia en la supervivencia de factores como la zona de afectación de la neoplasia, el tamaño tumoral, el grado histológico y el contenido de ADN. Por su parte, Oliveira y cols. (146) describieron la supervivencia a los 5 años en un grupo de pacientes con COCE e investigaron los efectos de la

edad, el sexo, la localización anatómica, el tiempo de evolución del tumor, el tabaco y el alcohol, la afectación ganglionar, la recurrencia tumoral, la clasificación histológica, la inmunoexpresión del p53 y del p63, la presencia del VPH en el ADN y el tratamiento en el pronóstico de los pacientes. Otros autores, como González-Moles y cols. (158) evaluaron los parámetros clínicos e histopatológicos en relación con la supervivencia, siendo los factores más influyentes la localización, el tamaño, las metástasis ganglionares, el estadio clínico, el grado de diferenciación celular y el pleomorfismo. En nuestro análisis de supervivencia hemos estudiado los siguientes factores: edad, sexo, sintomatología referida y presencia o no de parestesia, localización de la neoplasia, tipo de lesión, tamaño, afectación ósea, tipo de adenopatías (homolaterales o bilaterales), clasificación TNM, estadio, diferenciación histológica y por último, en un subgrupo de pacientes hemos valorado la asociación de la supervivencia con una serie de marcadores asociados a linfocitos Treg (CTLA-4, FoxP3, TGFβ1, , IL-10, CD4, CD8, CXCR4, CD127 y CD25).

Respecto a la tasa de supervivencia según la edad de los pacientes existe controversia en la literatura. En nuestro estudio, clasificamos a los pacientes en cuatro grupo de edades a fin de determinar la supervivencia en cada uno ellos, sin embargo, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes más jóvenes y los de edad más avanzada. Siriwardena y cols. (81) en su estudio comparativo entre pacientes de 40 años o menores y pacientes de 50 años o mayores tampoco encuentran diferencias en la supervivencia a los 3 años. Ho y cols. (152) reportan una menor supervivencia en pacientes mayores de 45 años. Leite y cols. (156) dicen que la edad avanzada en el momento del diagnóstico afecta a la supervivencia. De igual forma Oliveira y cols. (146) y Ribeiro y cols. (83) piensan que la menor supervivencia en pacientes de mayor edad viene determinada por la mayor presencia de enfermedades debilitantes y otras complicaciones asociadas a la edad.

Existen diferentes opiniones en la literatura respecto al sexo como posible marcador pronóstico. Pugliano y cols. (159) y Leite y cols. (156) hablan de una supervivencia mayor en mujeres mientras que Shah y cols. (160) piensan que la supervivencia en mujeres es menor.

Vallecillo Capilla y cols. (154) en su estudio también apuntan hacia una peor supervivencia en pacientes varones. Otros autores, como Arduino y cols. (148), Oliveira y cols. (146), Garavello y cols. (161), Montoro y cols. (103) no encuentran diferencias entre las curvas de supervivencia de ambos sexos. Al igual que la mayoría de los autores, nosotros tampoco encontramos diferencias significativas en la supervivencia entre hombres y mujeres.

El consumo de tabaco y alcohol, en términos de supervivencia, es un tema controvertido, encontrando algunos autores mayor supervivencia en los pacientes que no presentan estos hábitos tóxicos (79, 82), frente a otros que dejan en duda su relación (156). Nosotros en nuestro estudio, no tuvimos en cuenta este parámetro para calcular la supervivencia de los pacientes.

En cuanto a la sintomatología, en nuestro estudio hemos constatado que aquellas lesiones con dolor se asocian a lesiones de mayor tamaño, y como veremos más adelante, el tamaño de la lesión parece influir en el tiempo de supervivencia. Sin embargo no se han hallado diferencias estadísticamente significativas entre el tipo de sintomatología referida por los pacientes y las curvas de supervivencia.

Respecto a la parestesia también parece ser un factor predictivo en la supervivencia del paciente. Así, Sanchis y cols. (162) obtienen una supervivencia del 45% a los 9 meses en 8 pacientes con COCE y en un paciente con fibrosarcoma. Nosotros encontramos parestesia sólo en 6 pacientes que además presentaba afectación ósea, sin embargo, el estudio estadístico no muestra una menor supervivencia para estos pacientes. Esto posiblemente se deba al escaso tamaño muestral vinculado a la parestesia.

La localización del tumor parece influir en la supervivencia de los pacientes, según la literatura. Así Vallecillo-Capilla y cols. (154) encuentran que las zonas de mayor riesgo de mortalidad son la encía y el trígono retromolar. Garzino-Demo y cols. (163) obtienen menor supervivencia a los 3 y 5 años en los pacientes con COCE en zonas posteriores (tercio posterior lingual y trígono y mucosa yugal retromolar). Sin embargo Leite y cols. (156) y Oliveira y cols. (146) reportan que la lengua, el suelo la boca y el paladar son los lugares que presentan peor

tiempo de supervivencia, correspondiendo al COCE de labio inferior el que presenta menor tasa de mortalidad. Estos autores explican este hecho por la menor incidencia de metástasis regional en los tumores localizados en labio. De acuerdo con estos autores, en nuestra serie de pacientes no hemos detectado ningún fallecimiento en los pacientes con COCE de labio, sin embargo la tasa de menor supervivencia la hemos encontrado en los pacientes con COCE de encía y mucosa yugal, respecto a aquellas neoplasias localizadas en lengua y suelo de boca. Otros autores no encuentran relación entre la localización del tumor y la supervivencia global (152, 164).

Respecto al tipo de lesión, no hemos encontrado resultados estadísticamente significativos en relación con el tiempo de supervivencia de los pacientes. Tampoco hemos encontrado en la literatura datos sobre este parámetro y el pronóstico.

El tamaño de la lesión ha sido considerado como un importante factor pronóstico en diferentes estudios (154, 156) así como el sistema de estadiaje TNM, el cual constituye un factor pronóstico representativo. En la clasificación TNM la mayor dimensión de superficie se utiliza para determinar el tamaño tumoral, aunque actualmente el espesor del tumor ha sido considerado también como factor pronóstico (99, 100). El tiempo medio de supervivencia de los pacientes que presentan lesiones menores de 2 cm es prácticamente el doble que en pacientes con lesiones de mayor tamaño, según este estudio.

La afectación ganglionar cervical ha sido ampliamente reconocida como un gran factor pronóstico en los pacientes con COCE (165-168). Kalnins y cols. (169) afirman que la presencia de adenopatías reduce la supervivencia a los 5 años hasta el 45%. En nuestra serie de pacientes hemos encontrado una reducción de la supervivencia global aproximada del 66% en pacientes con metástasis ganglionar.

Para los pacientes con metástasis a distancia la supervivencia, según nuestros resultados, la supervivencia se reduce considerablemente.

El valor pronóstico del grado de diferenciación histológica es controvertido. Mientras algunos estudios han mostrado una correlación significativa entre el bajo grado de

diferenciación histológica y el pronóstico (148, 164) otros, como el nuestro, no encuentran esta relación (79). Algunos estudios previos han mostrado correlaciones significativas entre el bajo grado histológico y el mal pronóstico de los pacientes (170). Sin embargo, al igual que la mayoría de los estudios, coincidimos en que no existe asociación entre la clasificación histológica y la supervivencia de los pacientes (146, 164).

La infiltración tumoral de linfocitos T se ha considerado, en diferentes cánceres humanos, un inmunomecanismo anticáncer importante. Entre los linfocitos infiltrantes de tumor, la mayoría de células CD8+ son linfocitos T citotóxicos que reconocen antígenos asociados al tumor y tienen la capacidad de destruir directamente células tumorales. Estudios previos en cáncer colorrectal, esofágico, pancreático, del conducto biliar y vesícula relacionan la infiltración de células CD8+ con un pronóstico favorable (171-176). En cambio, en otros cánceres como el cáncer de pulmón de célula pequeña los resultados son controvertidos (177). A nivel de cáncer oral, Zancope y cols. (178) encontraron un incremento de CD8+ y de linfocitos T citotóxicos en el COCE intraoral y en el carcinoma de labio al compararlo con lesiones premalignas y con tejido normal, siendo mayores los niveles en el cáncer de labio, el cual presenta mayor supervivencia. En este estudio no hemos encontrado relación entre la infiltración de CD8+ y la supervivencia del paciente.

El control inmunológico del tumor está mediado por diferentes subtipos de células T reguladoras. Estudios previos han detectado el aumento de las proporciones de células Treg en pacientes con diferentes tipos de cánceres, incluidos los de pulmón, mama, páncreas, ovario y colorrectal (134-136), dificultando la inmunovigilancia contra las células tumorales e impidiendo la respuesta inmune efectiva. Estos niveles elevados se han detectado tanto en sangre periférica como en tejido tumoral. Resultados similares se han observado también en el cáncer de cabeza y cuello (137). Gasparoto y cols. (179) determinaron la frecuencia y la actividad de las células Treg en la sangre periférica y en el tejido tumoral de pacientes con COCE. Encontraron que más del 80% de las células T CD4+CD25+ expresaron FoxP3. En nuestro estudio hemos observado un incremento en el número de FoxP3 existiendo diferencias

significativas de expresión entre el tejido tumoral y el tejido sano. TGF- β 1 ha sido descrito como un mediador potencial de la supresión por las células Treg, aportando un carácter firme del mecanismo de inmunosupresión. En varios estudios ha sido demostrada la sobreexpresión de TGF- β 1 en el tejido tumoral (180, 181). Así, Gholamin y cols. (180) encontraron que el 37,5% de los pacientes estudiados con carcinoma esofágico de células escamosas presentaron sobreexpresión de TGF- β 1 en el tejido tumoral al compararlo con tejido libre de tumor. Acorde con estos autores, hemos encontrado mayor expresión de TGF- β 1 en los pacientes oncológicos.

Lee y cols. (182) estudiaron el significado pronóstico de la expresión de CXCR-4 en pacientes con COCE. Encontraron que la expresión de CXCR-4 así como el tamaño tumoral, las metástasis ganglionares, el estadio clínico y las recurrencias estaban relacionados con el pronóstico de los pacientes, destacando que la expresión de CXCR-4 es un indicador de mal pronóstico para los pacientes con COCE. Por tanto, el elevado nivel de infiltración de Treg en las neoplasias se ha relacionado con un peor pronóstico debido a la supresión inmune local. Sin embargo, nuestros resultados, al igual que los obtenidos por Schwarz y cols. (183) no han demostrado que el tiempo de supervivencia varíe en función del valor de la infiltración para cada uno de los genes estudiados.

CONCLUSIONES

Tras el estudio realizado en 100 pacientes afectados de carcinoma oral de células escamosas llegamos a las siguientes conclusiones:

1. La lesión más frecuentemente observada en el carcinoma oral de células escamosas fue la ulceración acompañada de dolor o molestias. La localización más prevalente fue el suelo de boca, superficie ventral de lengua y bordes laterales, siendo el COCE bien diferenciado el tipo histológico más común.
2. La mitad de los casos fueron diagnosticados en estadios avanzados, correspondiendo el estadio IVA el más frecuente en el momento del diagnóstico, seguido del estadio I.
3. Los genes TGF- β 1 y FoxP3 presentaron mayores niveles de expresión en los tejidos con COCE que en los tejidos sanos.
4. El tiempo de supervivencia estuvo influenciado por la localización de la lesión, la presencia de adenopatías, el tamaño de la lesión y, consecuentemente por el estadio. La presencia de adenopatías disminuye la supervivencia en aproximadamente un 66%.
5. La expresión de los marcadores tumorales asociados a los linfocitos Treg no influyó en el tiempo de supervivencia de los pacientes con COCE, por lo que serían necesarios más estudios para valorar su posible aplicabilidad como marcadores pronósticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC; 2005.
2. Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer: Clinical features. *Oral Oncol.* 2010 Apr 16.
3. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005;55:74-108.
4. Braakhuis BJ, Visser O, Leemans CR. Oral and oropharyngeal cancer in The Netherlands between 1989 and 2006: Increasing incidence, but not in young adults. *Oral Oncol.* 2009;45:e85-9.
5. Karim-Kos HE, de Vries E, Soerjomataram I, Lemmens V, Siesling S, Coebergh JW. Recent trends of cancer in Europe: a combined approach of incidence, survival and mortality for 17 cancer sites since the 1990s. *Eur J Cancer.* 2008;44:1345-89.
6. Curado MP, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol.* 2009;21:194-200.
7. García-Pola Vallejo MJ. Cáncer oral. Magnitud del problema en España. *RCOE.* 2009;14:167-70.
8. Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people – a comprehensive literature review. *Oral Oncol.* 2001;37:401-18.
9. Sherin N, Simi T, Shameena P, Sudha S. Changing trends in oral cancer. *Indian J Cancer.* 2008;45:93-6.
10. Chitapanarux I, Lorvidhaya V, Sittitrai P, Pattarasakulchai T, Tharavichitkul E, Sriuthaisiriwong P, et al. Oral cavity cancers at a young age: analysis of patient, tumor and treatment characteristics in Chiang Mai University Hospital. *Oral Oncol.* 2006;42:83-8.
11. Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RCK. Tongue and tonsil carcinoma – increasing trends in the US population ages 20–44 years. *Cancer.* 2005;103:1843-9.

12. Schantz SP, Yu GP. Head and neck cancer incidence trends in young Americans, 1973-1997, with a special analysis for tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002;128:268-74.
13. Annertz K, Anderson H, Biorklund A, Moller T, Kantola S, Mork J, et al. Incidence and survival of squamous cell carcinoma of the tongue in scandinavia, with special reference to young adults. *Int J Cancer.* 2002;101:95-9.
14. Donald PJ. Marijuana smoking--possible cause of head and neck carcinoma in young patients. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1986;94:517-21.
15. Schantz SP, Hsu TC, Ainslie N, Moser RP. Young adults with head and neck cancer express increased susceptibility to mutagen-induced chromosome damage. *JAMA.* 1989;262:3313-5.
16. Pelucchi C, Gallus S, Garavello W, Bosetti C, La Vecchia C. Cancer risk associated with alcohol and tobacco use: focus on upper aero-digestive tract and liver. *Alcohol Res Health.* 2006;29:193-8.
17. Johnson N. Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J Dent Educ.* 2001;65:328-39.
18. Ali NS, Khuwaja AK, Ali T, Hameed R. Smokeless tobacco use among adult patients who visited family practice clinics in Karachi, Pakistan. *J Oral Pathol Med.* 2009;38:416-21.
19. Idris AM, Prokopczyk B, Hoffmann D. Toombak: a major risk factor for cancer of the oral cavity in Sudan. *Prev Med.* 1994;23:832-9.
20. Chen YJ, Chang JT, Liao CT, Wang HM, Yen TC, Chiu CC, et al. Head and neck cancer in the betel quid chewing area: recent advances in molecular carcinogenesis. *Cancer Sci.* 2008;99:1507-14.
21. Squier CA, Cox P, Hall BK. Enhanced penetration of nitrosornicotine across oral mucosa in the presence of ethanol. *J Oral Pathol.* 1986;15:276-9.
22. Howie NM, Trigkas TK, Cruchley AT, Wertz PW, Squier CA, Williams DM. Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. *Oral Dis.* 2001;7:349-54.

23. Maier H, Weidauer H, Zöller J, Seitz HK, Flentje M, Mall G, et al. Effect of chronic alcohol consumption on the morphology of the oral mucosa. *Alcohol Clin Exp Res.* 1994;18:387-91.
24. Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide. Proceedings of the IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, France, 17-24 February 1998. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 1999;71 Pt 1:1-315.
25. Kurkivuori J, Salaspuro V, Kaihovaara P, Kari K, Rautemaa R, Grönroos L, et al. Acetaldehyde production from ethanol by oral streptococci. *Oral Oncol.* 2007;43:181-6.
26. Viswanathan H, Wilson JA. Alcohol--the neglected risk factor in head and neck cancer. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 2004;29:295-300.
27. Wynder EL, Kabat G, Rosenberg S, Levenstein M. Oral cancer and mouthwash use. *J Natl Cancer Inst.* 1983;70:255-60.
28. McCullough MJ, Farah CS. The role of alcohol in oral carcinogenesis with particular reference to alcohol-containing mouthwashes. *Aust Dent J.* 2008;53:302-5.
29. Winn DM, Blot WJ, McLaughlin JK, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, et al. Mouthwash use and oral conditions in the risk of oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 1991;51:3044-7.
30. Winn DM, Diehl SR, Brown LM, Harty LC, Bravo-Otero E, Fraumeni JF Jr, et al. Mouthwash in the etiology of oral cancer in Puerto Rico. *Cancer Causes Control.* 2001;12:419-29.
31. Lachenmeier DW, Gumbel-Mako S, Sohnius EM, Keck-Wilhelm A, Kratz E, Mildau G. Salivary acetaldehyde increase due to alcohol-containing mouthwash use: a risk factor for oral cancer. *Int J Cancer.* 2009;125:730-5.
32. Syrjänen K, Syrjänen S, Lamlaberg M, Pyrhönen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg.* 1983;12:418-24.
33. Chocolatewala NM, Chaturvedi P. Role of human papilloma virus in the oral carcinogenesis: an Indian perspective. *J Cancer Res Ther.* 2009;5:71-7.

34. Hobbs CG, Sterne JA, Bailey M, Heyderman RS, Birchall MA, Thomas SJ. Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol.* 2006;31:259-66.
35. Nair S, Pillai MR. Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers. *Oral Dis.* 2005;11:350-9.
36. D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S, Gillison ML. Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *J Infect Dis.* 2009;199:1263-9.
37. Scully C. Oral cancer; the evidence for sexual transmission. *Br Dent J.* 2005 27;199:203-7.
38. Campisi G, Panzarella V, Giuliani M, Lajolo C, Di Fede O, Falaschini S, et al. Human papillomavirus: its identity and controversial role in oral oncogenesis, premalignant and malignant lesions (review). *Int J Oncol.* 2007;30:813-23.
39. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:709-20.
40. El-Mofty SK, Lu DW. Prevalence of human papillomavirus type 16 DNA in squamous cell carcinoma of the palatine tonsil, and not the oral cavity, in young patients: a distinct clinicopathologic and molecular disease entity. *Am J Surg Pathol.* 2003;27:1463-70.
41. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, et al. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100:407-20.
42. Jo S, Juhasz A, Zhang K, Ruel C, Loera S, Wilczynski SP, et al. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in oropharyngeal squamous cell carcinomas treated in a prospective phase II clinical trial. *Anticancer Res.* 2009;29:1467-74.
43. Shahnava SA, Regezi JA, Bradley G, Dubé ID, Jordan RC. p53 gene mutations in sequential oral epithelial dysplasias and squamous cell carcinomas. *J Pathol.* 2000;190:417-22.
44. Yamazaki Y, Chiba I, Ishikawa M, Satoh C, Notani K, Ohiro Y, et al. Serum p53 antibodies as a prognostic indicator in oral squamous cell carcinoma. *Odontology.* 2008;96:32-7.

45. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol.* 2009;45:301-8. 26.
46. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis.* 2009;15:388-99.
47. Ben Slama L. Precancerous lesions of the buccal mucosa. *Rev Stomatol Chir Maxillofac.* 2001;102:77-108.
48. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin.* 2002;52:195-215.
49. Mascarenhas AK, Allen CM, Moeschberger ML. The association between Viadent use and oral leukoplakia--results of a matched case-control study. *J Public Health Dent.* 2002;62:158-62.
50. Haya-Fernández MC, Bagán JV, Murillo-Cortés J, Poveda-Roda R, Calabuig C. The prevalence of oral leukoplakia in 138 patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis.* 2004;10:346-8.
51. Hansen LS, Olson JA, Silverman S Jr. Proliferative verrucous leukoplakia. A long-term study of thirty patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985;60:285-98.
52. de Sousa FA, Paradella TC, Carvalho YR, Rosa LE. Comparative analysis of cell proliferation ratio in oral lichen planus, epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2009;14:e563-7.
53. González-Moles MA, Scully C, Gil-Montoya JA. Oral lichen planus: controversies surrounding malignant transformation. *Oral Dis.* 2008;14:229-43.
54. Yanjia H, Xinchun J. The role of epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma and oral submucous fibrosis. *Clin Chim Acta.* 2007;383:51-6.
55. Keith WD, Kelly AP, Sumrall AJ, Chabra A. Squamous cell carcinoma arising in lesions of discoid lupus erythematosus in black persons. *Arch Dermatol.* 1980;116:315-7.
56. Vairaktaris E, Kalokerinos G, Goutzanis L, Spyridonidou S, Vassiliou S, Derka S, et al. Diabetes alters expression of p53 and c-myc in different stages of oral oncogenesis. *Anticancer Res.* 2007;27:1465-73.

57. Goutzanis L, Vairaktaris E, Yapijakis C, Kavantzas N, Nkenke E, Derka S, et al. Diabetes may increase risk for oral cancer through the insulin receptor substrate-1 and focal adhesion kinase pathway. *Oral Oncol.* 2007;43:165-73.
58. Sasaki M, Yamaura C, Ohara-Nemoto Y, Tajika S, Kodama Y, Ohya T, et al. Streptococcus anginosus infection in oral cancer and its infection route. *Oral Dis.* 2005;11:151-6.
59. Kurkivuori J, Salaspuro V, Kaihovaara P, Kari K, Rautemaa R, Grönroos L, et al. Acetaldehyde production from ethanol by oral streptococci. *Oral Oncol.* 2007;43:181-6.
60. Taghavi N, Yazdi I. Type of food and risk of oral cancer. *Arch Iran Med.* 2007;10:227-32.
61. Boccia S, Cadoni G, Sayed-Tabatabaei FA, Volante M, Arzani D, De Lauretis A, et al. CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, EPHX1 exons 3 and 4, and NAT2 polymorphisms, smoking, consumption of alcohol and fruit and vegetables and risk of head and neck cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008;134:93-100.
62. Pavia M, Pileggi C, Nobile CG, Angelillo IF. Association between fruit and vegetable consumption and oral cancer: a meta-analysis of observational studies. *Am J Clin Nutr.* 2006;83:1126-34.
63. Pérez MA, Raimondi AR, Itoiz ME. An experimental model to demonstrate the carcinogenic action of oral chronic traumatic ulcer. *J Oral Pathol Med.* 2005;34:17-22.
64. Hary M, Buna G, Matekovits G. The role of chronic trauma caused by dental prostheses in the etiology of buccal cancer. *Rev Chir Oncol Radiol O R L Oftalmol Stomatol Ser Stomatol.* 1974;21:425-30
65. Mashberg A, Merletti F, Boffetta P, Gandolfo S, Ozzello F, Fracchia F, et al. Appearance, site of occurrence, and physical and clinical characteristics of oral carcinoma in Torino, Italy. *Cancer.* 1989;63:2522-7.
66. Jankittivong A, Swasdison S, Thangpitsityotin M, Langlais RP. Oral squamous cell carcinoma: a clinicopathological study of 342 Thai cases. *J Contemp Dent Pract.* 2009;10:E033-40.

67. Al-Rawi NH, Talabani NG. Squamous cell carcinoma of the oral cavity: a case series analysis of clinical presentation and histological grading of 1,425 cases from Iraq. *Clin Oral Investig*. 2008;12:15-8.
68. Cuffari L, Tesseroli de Siqueira JT, Nemr K, Rapaport A. Pain complaint as the first symptom of oral cancer: a descriptive study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;102:56-61.
69. Gorsky M, Epstein JB, Oakley C, Le ND, Hay J, Stevenson-Moore P. Carcinoma of the tongue: a case series analysis of clinical presentation, risk factors, staging, and outcome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004;98:546-52.
70. Hirata RM, Jaques DA, Chambers RG, Tuttle JR, Mahoney WD. Carcinoma of the oral cavity. An analysis of 478 cases. *Ann Surg*. 1975;182:98-103.
71. Oliver AJ, Helfrick JF, Gard D. Primary oral squamous cell carcinoma: a review of 92 cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 1996;54:949-54; discussion 955.
72. Jovanovic A, Schulten EA, Kostense PJ, Snow GB, van der Waal I. Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 1993;22:459-62.
73. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin*. 2002;52:195-215.
74. Brandizzi D, Gandolfo M, Velazco ML, Cabrini RL, Lanfranchi HE. Clinical features and evolution of oral cancer: A study of 274 cases in Buenos Aires, Argentina. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008;13:E544-8.
75. Ariyoshi Y, Shimahara M, Omura K, Yamamoto E, Mizuki H, Chiba H, et al; Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons, 2002. Epidemiological study of malignant tumors in the oral and maxillofacial region: survey of member institutions of the Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons, 2002. *Int J Clin Oncol*. 2008;13:220-8.

76. Effiom OA, Adeyemo WL, Omitola OG, Ajayi OF, Emmanuel MM, Gbotolorun OM. Oral squamous cell carcinoma: a clinicopathologic review of 233 cases in Lagos, Nigeria. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66:1595-9.
77. Nemes JA, Redl P, Boda R, Kiss C, Márton IJ. Oral cancer report from Northeastern Hungary. *Pathol Oncol Res.* 2008;14:85-92.
78. Chidzonga MM, Mahomva L. Squamous cell carcinoma of the oral cavity, maxillary antrum and lip in a Zimbabwean population: a descriptive epidemiological study. *Oral Oncol.* 2006;42:184-9.
79. Dahlstrom KR, Little JA, Zafereo ME, Lung M, Wei Q, Sturgis EM. Squamous cell carcinoma of the head and neck in never smoker-never drinkers: a descriptive epidemiologic study. *Head Neck.* 2008;30:75-84.
80. Poveda-Roda R, Bagán JV, Jiménez-Soriano Y, Margaix-Muñoz M, Sarrión-Pérez MG. Changes in smoking habit among patients with a history of oral squamous cell carcinoma (OSCC). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010 Apr 11.
81. Siriwardena BS, Tilakaratne A, Amaratunga EA, Tilakaratne WM. Demographic, aetiological and survival differences of oral squamous cell carcinoma in the young and the old in Sri Lanka. *Oral Oncol.* 2006;42:831-6.
82. Sasaki T, Moles DR, Imai Y, Speight PM. Clinico-pathological features of squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients <40 years of age. *J Oral Pathol Med.* 2005;34:129-33.
83. Ribeiro AC, Silva AR, Simonato LE, Salzedas LM, Sundefeld ML, Soubhia AM. Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma in young people: a descriptive study in Brazilians. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2009;47:95-8.
84. Mallet Y, Avalos N, Le Ridant AM, Gangloff P, Moriniere S, Rame JP, et al. Head and neck cancer in young people: a series of 52 SCCs of the oral tongue in patients aged 35 years or less. *Acta Otolaryngol.* 2009;129:1503-8.

85. Girod A, Mosseri V, Jouffroy T, Point D, Rodriguez J. Women and squamous cell carcinomas of the oral cavity and oropharynx: is there something new? *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67:1914-20.
86. Martínez-Conde R, Aguirre JM, Burgos JJ, Rivera JM. Clinicopathological factors in early squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth, in Biscay (the Basque Country, Spain). *Med Oral.* 200;6:87-94.
87. Krupala JL, Gianoli GJ. Carcinoma of the oral tongue. *J La State Med Soc.* 1993;145:421-6.
88. Ghoshal S, Mallick I, Panda N, Sharma SC. Carcinoma of the buccal mucosa: analysis of clinical presentation, outcome and prognostic factors. *Oral Oncol.* 2006;42:533-9.
89. Natori T, Koga M, Aneqawa E, Nakashima Y, Tetsuka M, Yoh J, et al. Usefulness of intra-oral ultrasonography to predict neck metastasis in patients with tongue carcinoma. *Oral Dis.* 2008;14:591-9.
90. Scully C, Bagan JV. Recent advances in Oral Oncology 2007: imaging, treatment and treatment outcomes. *Oral Oncol.* 2008;44:211-5.
91. Motta Rda R, Zettler CG, Cambruzzi E, Jotz GP, Berni RB. 18.Ki-67 and p53 correlation prognostic value in squamous cell carcinomas of the oral cavity and tongue. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2009;75:544-9.
92. Hitt R, Ciruelos E, Amador ML, Benito A, Sanchez JJ, Ballestin C, et al. Prognostic value of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and p53 in advanced head and neck squamous cell carcinoma patients treated with induction chemotherapy. *Eur J Cancer.* 2005;41:453-60.
93. Epstein JB, Sciubba J, Silverman S Jr, Sroussi HY. Utility of toluidine blue in oral premalignant lesions and squamous cell carcinoma: continuing research and implications for clinical practice. *Head Neck.* 2007;29:948-58.
94. Gandolfo S, Pentenero M, Broccoletti R, Pagano M, Carrozzo M, Scully C. Toluidine blue uptake in potentially malignant oral lesions in vivo: clinical and histological assessment. *Oral Oncol.* 2006;42:89-95.

95. Epstein JB, Silverman S Jr, Epstein JD, Lonky SA, Bride MA. Analysis of oral lesion biopsies identified and evaluated by visual examination, chemiluminescence and toluidine blue. *Oral Oncol.* 2008;44:538-44. Erratum in: *Oral Oncol.* 2008;44:615.
96. Stoeckli SJ, Alkureishi LW, Ross GL. Sentinel node biopsy for early oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2009; 266:787-93.
97. Burns P, Foster A, Walshe P, O'Dwyer T. Sentinel lymph node biopsy in node-negative squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *J Laryngol Otol.* 2009;123:439-43.
98. Pereira MC, Oliveira DT, Landman G, Kowalski LP. Histologic subtypes of oral squamous cell carcinoma: prognostic relevance. *J Can Dent Assoc.* 2007;73:339-44.
99. Sánchez López JD, Sicilia Gutiérrez MA, Capitán Cañadas LM, Labrot Moleón I, Martínez-Villalobos Castillo S, Valencia Laseca E. Profundidad tumoral en el carcinoma epidermoide lingual. Repercusiones diagnósticas. *Rev Esp Cir Oral y Maxilofac.* 2007;29:33-42.
100. Larsen SR, Johansen J, Sørensen JA, Krogdahl A. The prognostic significance of histological features in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2009;38:657-62.
101. Ferlito A, Rinaldo A, Silver CE, Gourin CG, Shah JP, Clayman GL, et al. Elective and therapeutic selective neck dissection. *Oral Oncol.* 2006; 42: 14-25.
102. Keski-Säntti H, Atula T, Törnwall J, Koivunen P, Mäkitie A. Elective neck treatment versus observation in patients with T1/T2 N0 squamous cell carcinoma of oral tongue. *Oral Oncol.* 2006;42:96-101.
103. Montoro JR, Hicz HA, Souza L, Livingstone D, Melo DH, Tiveron RC, et al. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2008;74:861-6.
104. Scully C, Bagan JV. Recent advances in Oral Oncology 2008; squamous cell carcinoma imaging, treatment prognostication and treatment outcomes. *Oral Oncol.* 2009;45:e25-30.
- 82.
105. Palmer E. Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:383-91.

106. Walker LS, Abbas AK. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:11-9.
107. Guerder S, Picarella DE, Linsley PS, Flavell RA. Costimulator B7-1 confers antigen-presenting-cell function to parenchymal tissue and in conjunction with tumor necrosis factor alpha leads to autoimmunity in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:5138-42.
108. Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol.* 2001;1:220-8.
109. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell.* 2000;101:455-8.
110. Pan PY, Ozao J, Zhou Z, Chen SH. Advancements in immune tolerance. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60:91-105.
111. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:267-96.
112. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003;299:1057-61.
113. Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol.* 2005;6:1219-27.
114. Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG. Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med.* 2001;193:1295-302.
115. Carrier Y, Yuan J, Kuchroo VK, Weiner HL. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. *J Immunol.* 2007;178:179-85.
116. Seder RA, Marth T, Sieve MC, Strober W, Letterio JJ, Roberts AB, et al. Factors involved in the differentiation of TGF-beta-producing cells from naive CD4+ T cells: IL-4 and IFN-

gamma have opposing effects, while TGF-beta positively regulates its own production. *J Immunol.* 1998;160:5719-28.

117. Bienvenu B, Martin B, Auffray C, Cordier C, Bécourt C, Lucas B. Peripheral CD8+CD25+ T lymphocytes from MHC class II-deficient mice exhibit regulatory activity. *J Immunol.* 2005;175:246-53.

118. Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol.* 2002;168:1080-6.

119. Annacker O, Burlen-Defranoux O, Pimenta-Araujo R, Cumano A, Bandeira A. Regulatory CD4 T cells control the size of the peripheral activated/memory CD4 T cell compartment. *J Immunol.* 2000;164:3573-80.

120. Levings MK, Sangregorio R, Sartirana C, Moschin AL, Battaglia M, Orban PC, et al. Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J Exp Med.* 2002;196:1335-46.

121. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol.* 1998;10:1969-80.

122. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, et al. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev.* 2000;182:18-32.

123. Mahnke K, Johnson TS, Ring S, Enk AH. Tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells: a two-way relationship. *J Dermatol Sci.* 2007;46:159-67.

124. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature.* 1997;389:737-42.

125. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*. 1994;265:1237-40.
126. North RJ, Awwad M. Elimination of cycling CD4⁺ suppressor T cells with an anti-mitotic drug releases non-cycling CD8⁺ T cells to cause regression of an advanced lymphoma. *Immunology*. 1990;71:90-5.
127. Dieckmann D, Bruett CH, Ploettner H, Lutz MB, Schuler G. Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J Exp Med*. 2002;196:247-53.
128. Turk MJ, Guevara-Patino JA, Rizzuto GA, Engelhorn ME, Houghton AN. Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. *J Exp Med*. 2004;200:771-82.
129. Chakraborty NG, Twardzik DR, Sivanandham M, Ergin MT, Hellstrom KE, Mukherji B. Autologous melanoma-induced activation of regulatory T cells that suppress cytotoxic response. *J Immunol*. 1990; 52: 213-28
130. Tanaka H, Tanaka J, Kjaergaard J, Shu S. Depletion of CD4⁺ CD25⁺ regulatory cells augments the generation of specific immune T cells in tumor-draining lymph nodes. *J Immunother*. 2002;25:207-17.
131. Sarantopoulos S, Lu L, Cantor H. Qa-1 restriction of CD8⁺ suppressor T cells. *J Clin Invest*. 2004;114:1218-21.
132. von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol*. 2005;6:338-44.
133. Jiang H, Chess L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest*. 2004;114:1198-208.
134. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol*. 2002;169:2756-61.

135. Okita R, Saeki T, Takashima S, Yamaguchi Y, Toge T. CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with breast cancer and non-small cell lung cancer. *Oncol Rep.* 2005;14:1269-73.
136. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004;10:942-9.
137. Strauss L, Bergmann C, Whiteside TL. Functional and phenotypic characteristics of CD4+CD25highFoxp3+ Treg clones obtained from peripheral blood of patients with cancer. *Int J Cancer.* 2007;121:2473-83.
138. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:e45.
139. Favia G, Maiorano E, Capodiferro S, Pilolli GP, Lacaita MG, Lajolo C, et al. Oral squamous cell carcinoma: a mono-institutional epidemiological study on 462 cases highlighting differences among young and adult patients. *Minerva Stomatol.* 2008;57:413-21.
140. Ballard BR, Suess GR, Pickren JW, Greene GW Jr, Shedd DP. Squamous-cell carcinoma of the floor of the mouth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1978;45:568-79.
141. Ortholan C, Lusinchi A, Italiano A, Bensadoun RJ, Auperin A, Poissonnet G, et al. Oral cavity squamous cell carcinoma in 260 patients aged 80 years or more. *Radiother Oncol.* 2009;93:516-23.
142. Andisheh-Tadbir A, Mehrabani D, Heydari ST. Epidemiology of squamous cell carcinoma of the oral cavity in Iran. *J Craniofac Surg.* 2008;19:1699-702.
143. Tadbi AA, Mehrabani D, Heydari ST. Sociodemographic and etiologic differences of malignant orofacial tumors in Iran. *J Craniofac Surg.* 2009;20:837-40.
144. Rivera H, Nikitakis NG, Correnti M, Maissi S, Ponce JG. Oral and oropharyngeal cancer in a Venezuelan population. *Acta Odontol Latinoam.* 2008;21:175-80.
145. Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RC. Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the U.S. population ages 20-44 years. *Cancer.* 2005;103:1843-9.

146. Oliveira LR, Ribeiro-Silva A, Costa JP, Simões AL, Matteo MA, Zucoloto S. Prognostic factors and survival analysis in a sample of oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106:685-95.
147. Losi-Guembarovski R, Menezes RP, Polisel F, Chaves VN, Kuasne H, Leichsenring A, et al. Oral carcinoma epidemiology in Paraná State, Southern Brazil. *Cad Saude Publica.* 2009;25:393-400.
148. Arduino PG, Carrozzo M, Chiecchio A, Broccoletti R, Tirone F, Borra E, et al. Clinical and histopathologic independent prognostic factors in oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 334 cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66:1570-9.
149. Izarzugaza MI, Esparza H, Aguirre JM. Epidemiological aspects of oral and pharyngeal cancers in the Basque Country. *J Oral Pathol Med.* 2001;30:521-6.
150. Heng Christine LT, Rossi Edward P. A report on 222 cases of oral squamous cell carcinoma. *Military Medicine.* 1995;160:319-23
151. Fernández-Martínez JA, Ruiz-Avila I, Bravo M, Ramos MC, Martínez-Lara I, Urquía M, et al. Some histopathological and clinical correlations in oral squamous cell carcinoma. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol.* 1995;38:11-5.
152. Ho HC, Lee MS, Hsiao SH, Hwang JH, Hung SK, Chou P, et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity in young patients: a matched-pair analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2008;265:S57-61.
153. León X, Quer M, Orús C, del Prado Venegas M, López M. Distant metastases in head and neck cancer patients who achieved loco-regional control. *Head Neck.* 2000;22:680-6.
154. Vallecillo Capilla M, Romero Olid MN, Olmedo Gaya MV, Reyes Botella C, Bustos Ruiz V. Factors related to survival from oral cancer in an Andalusian population sample (Spain). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2007;12:E518-23.
155. Rusthoven KE, Raben D, Song JI, Kane M, Altoos TA, Chen C. Survival and patterns of relapse in patients with oral tongue cancer. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68:584-9.

156. Leite IC, Koifman S. Survival analysis in a sample of oral cancer patients at a reference hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Oral Oncol.* 1998;34:347-52.
157. Beltrami CA, Desinan L, Rubini C. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity. A retrospective study of 80 cases. *Pathol Res Pract.* 1992;188:510-6.
158. González-Moles M, Rodríguez Archilla A, Caballero R, Ruiz Ávila I, García Anillo M, Bravo I. Estudio de los parámetros clínicos e histopatológicos del carcinoma epidermoide de cavidad oral. Implicaciones pronósticas. *Av Odontoestomatol.* 1998;14:589-610.
159. Pugliano FA, Piccirillo JF, Zequeira MR, Fredrickson JM, Perez CA, Simpson JR. Clinical-severity staging system for oral cavity cancer: five-year survival rates. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999;120:38-45.
160. Shah JP, Cendon RA, Farr HW, Strong EW. Carcinoma of the oral cavity. Factors affecting treatment failure at the primary site and neck. *Am J Surg.* 1976;132:504-7.
161. Garavello W, Spreafico R, Somigliana E, Gaini L, Pignataro L, Gaini RM. Prognostic influence of gender in patients with oral tongue cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008;138:768-71.
162. Sanchis JM, Bagán JV, Murillo J, Díaz JM, Poveda R, Jiménez Y. Mental neuropathy as a manifestation associated with malignant processes: its significance in relation to patient survival. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66:995-8.
163. Garzino-Demo P, Dell'Acqua A, Dalmasso P, Fasolis M, La Terra Maggiore GM, Ramieri G, et al. Clinicopathological parameters and outcome of 245 patients operated for oral squamous cell carcinoma. *J Craniomaxillofac Surg.* 2006;34:344-50.
164. Kademani D, Bell RB, Bagheri S, Holmgren E, Dierks E, Potter B, et al. Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63:1599-605.
165. Shingaki S, Takada M, Sasai K, Bibi R, Kobayashi T, Nomura T, et al. Impact of lymph node metastasis on the pattern of failure and survival in oral carcinomas. *Am J Surg.* 2003;185:278-84.

166. Shingaki S, Nomura T, Takada M, Kobayashi T, Suzuki I, Nakajima T. The impact of extranodal spread of lymph node metastases in patients with oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1999;28:279-84.
167. Eiband JD, Elias EG, Suter CM, Gray WC, Didolkar MS. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the larynx. *Am J Surg.* 1989;158:314-7.
168. Denis F, Garaud P, Manceau A, Beutter P, Garand G, le Floch O, et al. Prognostic value of the number of involved nodes after neck dissection in oropharyngeal and oral cavity carcinoma. *Cancer Radiother.* 2001;5:12-22.
169. Kalnins IK, Leonard AG, Sako K, Razack MS, Shedd DP. Correlation between prognosis and degree of lymph node involvement in carcinoma of the oral cavity. *Am J Surg.* 1977;134:450-4.
170. Lo WL, Kao SY, Chi LY, Wong YK, Chang RC. Outcomes of oral squamous cell carcinoma in Taiwan after surgical therapy: factors affecting survival. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003;61:751-8.
171. Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, et al. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998;58:3491-4.
172. Nakano O, Sato M, Naito Y, Suzuki K, Orikasa S, Aizawa M, et al. Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res.* 2001;61:5132-6.
173. Schumacher K, Haensch W, Röefzaad C, Schlag PM. Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res.* 2001;61:3932-6.
174. Cho Y, Miyamoto M, Kato K, Fukunaga A, Shichinohe T, Kawarada Y, et al. CD4+ and CD8+ T cells cooperate to improve prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2003;63:1555-9.

175. Nakakubo Y, Miyamoto M, Cho Y, Hida Y, Oshikiri T, Suzuoki M, et al. Clinical significance of immune cell infiltration within gallbladder cancer. *Br J Cancer*. 2003;89:1736-42.
176. Oshikiri T, Miyamoto M, Shichinohe T, Suzuoki M, Hiraoka K, Nakakubo Y, et al. Prognostic value of intratumoral CD8+ T lymphocyte in extrahepatic bile duct carcinoma as essential immune response. *J Surg Oncol*. 2003;84:224-8.
177. Mori M, Ohtani H, Naito Y, Sagawa M, Sato M, Fujimura S, et al. Infiltration of CD8+ T cells in non-small cell lung cancer is associated with dedifferentiation of cancer cells, but not with prognosis. *Tohoku J Exp Med*. 2000;191:113-8.
178. Zancope E, Costa NL, Junqueira-Kipnis AP, Valadares MC, Silva TA, Leles CR, et al. Differential infiltration of CD8(+) and NK cells in lip and oral cavity squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2009 Sep 14.
179. Gasparoto TH, de Souza Malaspina TS, Benevides L, de Melo EJ Jr, Costa MR, Damante JH, et al. Patients with oral squamous cell carcinoma are characterized by increased frequency of suppressive regulatory T cells in the blood and tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother*. 2010;59:819-28.
180. Gholamin M, Moaven O, Memar B, Farshchian M, Naseh H, Malekzadeh R, et al. Overexpression and interactions of interleukin-10, transforming growth factor beta, and vascular endothelial growth factor in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Surg*. 2009;33:1439-45.
181. Jin X, Li J, Li Z, Li Y. Expression of transforming growth factor beta(TGF-beta) subtypes in oral squamous cell carcinoma. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2001;19:377-9.
182. Lee JI, Jin BH, Kim MA, Yoon HJ, Hong SP, Hong SD. Prognostic significance of CXCR-4 expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod*. 2009;107:678-84.

183. Schwarz S, Butz M, Morszeck C, Reichert TE, Driemel O. Increased number of CD25 FoxP3 regulatory T cells in oral squamous cell carcinomas detected by chromogenic immunohistochemical double staining. *J Oral Pathol Med.* 2008;37:485-9.