



Inmunoexpresión de citoquina CXCR4 en leucoplasias según grado de displasia como posible marcador de transformación maligna.

Trabajo de investigación para optar al título de especialista en patología oral y maxilofacial.

Residente: Daniela Cavagnola E.

Docente guía:

Dr. Wilfredo González-Arriagada

Dr. Rodrigo Fuentes

Valparaíso – Chile

2022

INDICE

1. Introducción	4
2. Marco Teórico	5
2.1 Cáncer oral y desordenes orales potencialmente malignos.	5
2.2 Aspectos básicos de los biomarcadores	8
2.3 Quimioquinas y su rol dentro del cáncer	9
2.4 Eje CXCR4 y CXCL12.....	10
3. Pregunta de investigación, hipótesis y objetivos	13
3.1 Pregunta de investigación	13
3.2 Hipótesis	13
3.3 Objetivo general	13
3.4 Objetivos específicos	13
4. Materiales y métodos	14
4.1 Diseño de estudio.....	14
4.2 Recolección de muestras:	14
4.3 Evaluación en hematoxilina-eosina	15
4.4 Marcación inmunohistoquímica	17
4.5 Evaluación de inmunohistoquímica	18
4.6 Análisis estadístico.....	18
5. Resultados	19
6. Discusión	30
7. Conclusión	33
8. Resumen.....	34
9. Bibliografía	35

1. Introducción

El cáncer oral es uno de los cánceres más frecuentes en el mundo, el carcinoma oral de células escamosas corresponde al 90% de los cánceres de cavidad oral, el cual tiene una tasa de supervivencia del 50% a los 5 años post diagnóstico. Este tipo de cáncer proviene de desórdenes orales potencialmente malignos, de los cuales la leucoplasia es el más frecuente y el más estudiado (Saman Warnakulasuriya, 2020). La leucoplasia tiene una prevalencia del 2-3%, según la OMS y una tasa de transformación de un 13% (según el estudio oscila entre 0,03 y el 70,3%) (Saldivia-Siracusa & González-Arriagada, 2021). Actualmente el diagnóstico histológico de la leucoplasia oral se clasifica, según la OMS, se realiza identificando el grado de displasia en leve, moderada, avanzada, y se han propuesto clasificaciones binarias (alto grado y bajo grado), sin embargo ambas clasificaciones, que son puramente histológicas, tienen poco valor predictivo, sobre todo considerando que la transformación maligna ocurre después de los 5 años y muchas veces se pierde el seguimiento del paciente, por lo tanto es necesario asociar a la histología, factores clínicos (edad, sexo, historia de ca familiar, características de la leuco, localización, tiempo de evolución, etc.) y moleculares, para predecir con mayor certeza la transformación maligna de esta lesión . Por otro lado, el infiltrado inflamatorio subepitelial de las leucoplasias también tendría un rol importante en la progresión de la enfermedad, sin embargo, ha sido poco abordado en la literatura (El-Naggar et al., 2017.; Fernandes, 2020; Saldivia-Siracusa & González-Arriagada, 2021).

Respecto a los factores moleculares como auxilio para el pronóstico de las leucoplasias orales, se han reportado varios, pero debido a la falta de validación de estos y mejores estudios pronósticos con acompañamiento adecuado, aún se mantienen como biomarcadores con potencial valor predictivo (Gerber, 2017). Dentro de estos factores se proponen p53, E-cadherina, podoplanina, entre otros, (Taylor, 2019). Los receptores de quimioquinas han sido asociados con diferentes eventos del comportamiento del cáncer oral, tempranos como la transición epitelial e invasión, y tardíos como migración y metástasis. Es por la participación en los eventos precoces de la carcinogénesis que se propone que pudiesen tener un valor predictivo en las leucoplasias orales (da Silva et al.,

2016; Foschini et al., 2013; Kawaguchi et al., 2019). De estos receptores de quimioquinas el CXCR4 demostró su relación con transición epitelial mesenquimal (TEM) en estudios *in vitro* (Cheng et al., 2018) y también tiene un rol en la modulación de la inflamación en lesiones que han sido reportadas con potencial de transformación malignas como liquen plano oral (Rivera et al., 2020). CXCR4 forma un eje con su ligando CXCL12(SDF1) activando diversas vías intracelulares que activan factores de transcripción que pueden llevar a eventos tales como, TEM, migración, proliferación, etc. (González-Arriagada et al., 2018; Kawaguchi et al., 2019; Lazennec & Richmond, 2010a). En este camino nos propusimos estudiar la expresión de CXCR4 en leucoplasias orales y describir el infiltrado inflamatorio.

2. Marco Teórico

2.1 Cáncer oral y desordenes orales potencialmente malignos.

El cáncer de cabeza y cuello es el séptimo cáncer más frecuente, alcanzando 890.000 nuevos casos y 450.000 muertes en el 2018 (Johnson et al., 2020). Dentro de los tipos de neoplasias malignas que se encuentran en cavidad oral, la más frecuente es de tipo epitelial, específicamente el carcinoma oral de células escamosas (COCE), que representa el 90% de todas las neoplasias malignas en la cavidad oral (El-Naggar et al., 2017.; Johnson et al., 2020). Según GLOBOCAN en el año 2020 la incidencia del carcinoma oral de células escamosas fue de 377.313 casos y la mortalidad alcanzó la cifra de 17.775 a nivel mundial (Sung et al., 2021). Las metástasis linfonodales y las recurrencias se desencadenan en el 50% aproximadamente de los pacientes diagnosticados con COCE, lo que desfavorece el pronóstico y la sobrevida a 5 años del individuo (Johnson et al., 2020b). El COCE se puede desarrollar en cualquier sitio de cavidad oral y clínicamente se puede observar como un tumor ulcerado de bordes indurados, inicialmente asintomático (Conway et al., 2018).

Un estudio realizado por (Mello et al., 2018), describió una prevalencia de los Desordenes orales potencialmente malignos (DOPM) a nivel mundial de 4,47% y en Sudamérica, incluyendo el caribe la prevalencia corresponde a 3,93%, siendo los hombres asiáticos

los más afectados. Los factores de riesgo para estas entidades están bastante estudiados y son el consumo de tabaco, alcohol, nuez de betel y/o nuez de areca, siendo también factores de riesgo para cáncer oral. La tasa de transformación maligna oscila entre el 1.4% al 49.5% dependiendo el tipo de lesión estudiada (Locca et al., 2020). Los trastornos o desórdenes potencialmente malignos, antiguamente clasificados en lesiones y condiciones son: Leucoplasia, leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP), eritroplasia, fibrosis submucosa oral, liquen plano oral, queilitis actínica, lesión paladar en fumadores reversos, lupus eritematoso sistémico, disqueratosis congénita, lesiones liquenoides orales y enfermedad de injerto contra el huésped, según el último consenso realizado en el año 2022. (El-Naggar et al., 2017.; Neville et al., 2015; Warnakulasuriya, 2020)

La Leucoplasia es un diagnóstico clínico que se define como placa blanca que no se desprende al raspado, de riesgo cuestionable y se puede establecer luego de haber descartado un gran espectro de lesiones blancas de cavidad oral tales como nevo blanco esponjoso, queratosis friccional, queratosis del reborde, lesión química, leucoedema, entre otras. (Warnakulasuriya, 2020)

Aun no se puede predecir con certeza si una leucoplasia dará paso a un cáncer, pero hay factores que nos pueden guiar a un mayor o menor riesgo, como, por ejemplo: 1) el tipo de leucoplasia (homogénea vs no homogénea), 2) zona anatómica donde se encuentra ubicada la lesión y 3) presencia de displasia en el estudio al microscopio, entre otras evaluaciones clínicas como son factores de riesgo asociado, datos demográficos, historia familiar etc (Saldivia-Siracusa & González-Arriagada, 2021; Speight et al., 2018)

Respecto al tipo de leucoplasia, la podemos clasificar en leucoplasia homogénea y no homogénea (Van der Waal, 2019). La leucoplasia homogénea se describe como una lesión blanca uniforme, plana, y ligeramente corrugada, y la no homogénea se pueden encontrar, además de las zonas blancas, zonas rojas, siendo renombradas como leucoeritroplasia o eritroleucoplasia, cuya superficie puede ser plana, moteada o nodular y tiene un mayor riesgo de transformación maligna que la homogénea. Otra entidad que se estudia por separado, pero se incluye dentro del espectro de estas lesiones, es la leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) la cual es un trastorno progresivo, irreversible y

que se mantiene en el tiempo, múltiple y frecuentemente son de superficie verrucosa. Esta última, es la que tiene mayor riesgo de llevar a COCE o a carcinoma verrucoso ya que se describe que entre el 30-50% se malignizará. (Van der Waal, 2019; Warnakulasuriya, 2020)

La displasia se produce por cambios genéticos en las células epiteliales, los cuales se ven reflejados microscópicamente como cambios arquitectónicos y citológicos (Tabla 1), los que conllevan a modificar la proliferación, maduración y diferenciación celular. (El-Naggar et al., 2017).

Tabla 1: Cambios arquitectónicos y citológicos a evaluar en displasia epitelial (OMS, 2017)	
Cambios Arquitectónicos	Cambios citológicos
Estratificación epitelial irregular	Variación anormal del tamaño nuclear
Polaridad anormal de células basales	Variación anormal de la forma nuclear
Crestas epiteliales en forma de gota	Variación en el tamaño celular
Aumento en número de figuras mitóticas	Alteración de la forma celular
Figuras mitóticas superficiales	Aumento de la relación núcleo citoplasma
Queratinización prematura en células individuales	Figuras mitóticas atípicas
Perlas de queratina dentro de las crestas epiteliales	Aumento de número y tamaño de nucleolos
Pérdida de cohesión celular	Hipercromasia
(Adaptado de El-Naggar et al., 2017)	

Según la Organización mundial de la salud (OMS), podemos clasificar la displasia como leve, moderada, o avanzada, de acuerdo a qué tercio epitelial se encuentre afectado, siempre manteniendo la membrana basal intacta, siendo leve cuando la afectación es del tercio basal, moderada hasta el tercio medio y avanzada todo el espesor epitelial. En ésta última se incluye lo que antiguamente se denominaba carcinoma *in situ*. (El-Naggar et al.,

2017) Este análisis actualmente es considerado el *Gold standard* para el diagnóstico y pronóstico de los DOPM en general (Mello et al., 2018; Speight et al., 2018), sin embargo al no estar bien estandarizado hay situaciones en las que se habla de cierta subjetividad según el observador en base a la experiencia del evaluador para la graduación de displasia, junto con esto no se han masificado técnicas para evaluar efectivamente el potencial de malignidad de cada lesión y por eso se han propuesto biomarcadores que pretenden estimar si la muestra en cuestión está dentro del grupo que efectivamente puede desarrollar una neoplasia maligna. (Smith et al., 2009; Speight et al., 2018).

2.2 Aspectos básicos de los biomarcadores

Los biomarcadores son moléculas, ácidos nucleicos, proteínas o derivados de estos, que permiten diferenciar un estado patológico de su contraparte normal, son cuantificables y se pueden evaluar de forma objetiva, gracias a esas características y a modo de uso pueden guiar a un diagnóstico, pronóstico, e incluso pueden funcionar como diana terapéutica (Tabla 2). La cuantificación de los biomarcadores permite evaluar y guiar terapia farmacológica, por lo que tienen como objetivo el diagnóstico, pronóstico y progresión de las patologías a evaluar. El método más utilizado para la evaluación en tejidos es el de inmunohistoquímica (IHQ), la cual se realiza en tejidos provenientes de biopsia, puede ser altamente sensible y específica (Taylor, 2019).

Tabla 2: Uso de Biomarcadores en contexto de cáncer.	
Para diagnóstico	Se utiliza para el diagnóstico de neoplasias, principalmente mal diferenciadas.
Para pronóstico	Se utiliza para determinar el curso y el progreso de la enfermedad.
Para uso predictivo de respuesta a tratamiento	Se utiliza para predecir la respuesta frente a una terapia definida (normalmente dirigida)
Para uso en monitoreo de tratamiento.	Se utiliza para medir la efectividad del tratamiento farmacológico

Algunos ejemplos de biomarcadores aprobados por la FDA son Pro2PSA, que permite discriminar entre una neoplasia maligna de una benigna de próstata, Tiroglobulina como control en cáncer de tiroides, antígeno carcino-embriionario, ayudando en manejo y pronóstico de cáncer colo-rectal (Füzéry et al., 2013), entre otros.

La IHQ es un método de detección de antígenos (Ag) mediante la utilización de anticuerpos (Ac). Este complejo Ag/Ac puede ser evidenciado en el tejido, previamente procesado, por enzimas, permitiendo realizar la observación al microscopio óptico convencional o fluorescente. En la mayoría de los casos los antígenos son aminoácidos o proteínas las cuales van a ser detectadas y amplificadas (Kim et al., 2016; Ramos-Vara, 2011).

Para poder observar la presencia o no de la molécula diana y su ubicación precisa, es necesario manejar bien la técnica para que no exista marcación de fondo, o exista la menor posible, y no altere la interpretación de la señal. Igualmente requiere que el patólogo tenga un adecuado entrenamiento.

Actualmente la FDA tiene aprobado un pool de biomarcadores moleculares los cuales se utilizan para diagnóstico, pronóstico o caracterización celular (Taylor, 2019), sin embargo, no existen en la actualidad biomarcadores moleculares que se utilicen de forma rutinaria para predecir el riesgo de transformación maligna en lesiones displásicas. Biomarcadores moleculares específicos permitirían reconocer si la entidad a estudiar tendría o no alto potencial oncogénico, esto permitiría planificar tratamientos enfocados y precisos en lesiones potencialmente malignas para evitar el desarrollo de cáncer (Reibel, 2003; Smith et al., 2009).

2.3 Quimioquinas y su rol dentro del cáncer

Las quimioquinas son un grupo de moléculas pequeñas de 8 a 17 kDa, las cuales se acoplan a receptores en la membrana plasmática, mayormente asociados a proteína G. Su función principal es activar y permitir la migración de leucocitos en estados fisiopatológicos como es la inflamación aguda y crónica, éstos pueden ser activados por

infecciones, reacciones de hipersensibilidad, daño tisular directo, y actualmente en inicio o progresión de algunos tipos de cáncer como pulmón, colon, hígado, mamas, entre otros. Varias quimioquinas pueden unirse a múltiples receptores y viceversa, lo que las categoriza como multifuncionales (Adlere et al., 2019; Lazennec & Richmond, 2010b; Xia et al., 2012).

Existen 4 subgrupos principales de quimioquinas, en el cual encontramos la CXC llamado así por poseer dos cisteínas y un grupo de aminoácidos variable entre éstas, fisiológicamente esta molécula se encuentra en concentraciones mínimas o incluso ausente (Lazennec & Richmond, 2010b). Entre las quimioquinas destacadas, en esta subfamilia encontramos el ligando CXCL12 también conocido como factor 1 derivado de células estromales (SDF-1), es una proteína compuesta por 89 aminoácidos y tiene afinidad por el receptor CXCR4 (Kawaguchi et al., 2019), se encuentra en la membrana plasmática las cuales se ha descrito que se encuentran sobre expresadas en células cancerígenas de estirpe epitelial, como por ejemplo cáncer de mama, de ovario, y cáncer oral. Se ha estudiado la relación de este eje con el COCE, pero no en DOPM (Bianchi & Mezzapelle, 2020; Xia et al., 2012).

2.4 Eje CXCR4/CXCL12

El crecimiento, la infiltración y la metástasis depende de la interacción existente entre las células malignas y el estroma que acompaña al tumor, incluyendo sus células, dentro de las cuales podemos encontrar macrófagos asociados a tumores (TAM), neutrófilos asociados a tumores (TAN), fibroblastos asociados a cáncer (CAF), lo cuales son encargados de secretar quimioquinas, reclutar más células y permitir, por ejemplo, el crecimiento tumoral, senescencia celular, angiogénesis, metástasis, modulando la respuesta tumoral (Lazennec & Richmond, 2010c). CXCR4, es un receptor de quimioquinas tipo 4, acoplado a proteína G, el cual se une a quimioquinas CXC ligando 12 (CXCL12) y tiene como función principal quimiotaxis de leucocitos en inflamación y enfermedades de origen autoinmune como lupus eritematoso, sistémico, artritis

reumatoides, psoriasis, enfermedades inflamatorias intestinales, entre otras. (Nazari et al., 2017; Rivera et al., 2020)

Por otro lado, se ha estudiado que constitutivamente CXCL12 es secretado y sintetizado por células nerviosas y se acopla a CXCR4, en respuesta a un daño en estas, ejerciendo función de reparación, en el SNC los encargados de la regulación de este eje son los astrocitos, los cuales en estudios *in vitro* fomenta proliferación y diferenciación neuronal (Bianchi & Mezzapelle, 2020; Nazari et al., 2017; Pawig et al., 2015). Adicionalmente, se ha reportado que promueve la reparación y regeneración de células del musculo esquelético, (Bianchi & Mezzapelle, 2020; Lee et al., 2018; Tirone et al., 2018).

Autores han descrito que, en neoplasias hematológicas, melanomas, cáncer de riñón, próstata, mama, entre otros, el eje CXCR4/CXCL12 está sobre expresado y se asocia con mal pronóstico, ya que actúa como factor pro-angiogénico y regulador de la apoptosis en células tumorales. (Bianchi & Mezzapelle, 2020; Mousavi, 2020; Mu È ller et al., 2001; Zlotnik, 2006).

Naturalmente, la presencia de CXCL12 y la inactivación de CXCR4 reduce metástasis según estudio realizado en cáncer hepático en ratones y en estudios *in vivo* en cáncer de pulmón. Durante el proceso de transformación maligna y finalmente metástasis, las células tumorales son capaces de evadir el sistema inmune, de manera que inactivan a los linfocitos T CD8+, esto gracias a que las células mieloides inmaduras expresan CXCR4, permitiendo así la progresión tumoral.(Benedicto et al., 2018).

2.5 Inflamación y transformación maligna

En leucoplasia, se ha descrito la posible relación entre inflamación y transformación maligna, asociado a la presencia de citoquinas que se han evaluado en saliva o directamente en los tejidos (Czerninski et al., 2014; Punyani & Sathawane, 2013), permitiendo concluir que las neoplasias, en su microambiente, sintetizan citoquinas pro-angiogénicas y activan al sistema inmune, permitiendo la progresión del tumor (Ingaleswar et al., 2016). Asociado a esto, el cambio en la población celular tumoral o

las llamadas células asociadas a tumores, secretan moléculas que se promueven el crecimiento del tumor (Sun et al., 2016). Se relata en la literatura que a medida que avanza el grado de displasia, la intensidad del infiltrado inflamatorio va aumentando, permitiendo concluir que el infiltrado inflamatorio asociado a displasia epitelial se relacionaría con mayor riesgo de transformación maligna en DOPM (Mashhadiabbas & Fayazi-Boroujeni, 2017).

Hasta la fecha se han estudiado múltiples biomarcadores moleculares que incluyen citoquinas, factores de crecimiento, moléculas de señalización celular, factores angiogénicos, canales iónicos, factores reguladores del ciclo celular, entre otros. Algunos ejemplos son: Proteína C reactiva, E-Cadherinas, receptor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés), variadas Interleucinas, Ki-67, metaloproteinasas, p53, podoplanina, etc. (Villa et al., 2019).

Según lo descrito anteriormente, es imperante buscar biomarcadores moleculares que potencien y mejoren la capacidad de predicción de transformación maligna desde un desorden oral potencialmente maligno hacia COCE, y que nos ayude a comprender el mecanismo de la carcinogénesis para poder proponer dianas terapéuticas específicas. Con base a esto, hipotetizamos que la citoquina CXCR4 podría ser utilizado como marcador pronóstico para el desarrollo de COCE en leucoplasias, ya que se ha descrito que estas citoquinas, en conjunto con otras de la misma familia, se encuentran aumentadas en procesos neoplásicos malignos, progresión, transición epitelio mesénquima y metástasis, desconociéndose su acción en los DOPM (González-Arriagada et al., 2018).

3. Pregunta de investigación, hipótesis y objetivos

3.1 Pregunta de investigación

¿La expresión inmunohistoquímica de CXCR4 está asociada al grado de displasia en leucoplasia oral?

Los resultados esperados buscan encontrar una relación entre la marcación del receptor de citoquina CXCR4 y grado de displasia en muestras de leucoplasia.

3.2 Hipótesis

1. La expresión de CXCR4 se asocia al grado de displasia.

3.3 Objetivo general

1. Evaluar niveles de inmunomarcación de CXCR4 en leucoplasias orales según grados de displasia.

3.4 Objetivos específicos

1. Comparar características clínico-patológicas y la marcación de CXCR4 en leucoplasias según grados de displasia.
2. Comparar la expresión de CXCR4 en muestras de leucoplasia oral, y otras lesiones de cavidad oral (Hiperplasia fibrosa y Liquen plano oral).
3. Evaluación del Infiltrado inflamatorio subepitelial de leucoplasias orales con diferentes grados de displasia.

4. Materiales y métodos

4.1 Diseño de estudio

Observacional, retrospectivo, de casos y controles.

4.2 Recolección de muestras

De los pacientes que asisten a la clínica de patología de la Universidad de Valparaíso, Chile; Universidade Federal de Alfenas, Brasil y clínica privada del Dr. Wilfredo González-Arriagada, Chile. Se seleccionaron las muestras que clínicamente se diagnosticaron como leucoplasia, hiperplasia fibrosa y liquen plano/reacción liquenoide a las cuales se les realizó biopsia y estudio histopatológico. Se reclutaron muestras desde el año 2011 hasta el momento de inicio el estudio. Las muestras fueron seleccionadas por conveniencia.

Criterios de inclusión:

- Muestras fijadas en formalina y embebidas en parafina.
- Muestras con datos demográficos necesarios para el estudio.

Criterios de exclusión:

- Muestras con artefactos de procesamiento.
- Muestras de no se observen de forma completa p problemas de orientación de la muestra.

Para la selección de los casos, las láminas fueron analizadas por un observador, residente de la especialidad de patología oral y maxilofacial de la Universidad de Valparaíso, previamente calibrado con sesiones de entrenamiento, y en caso de duda se le preguntó a un segundo observador, patólogo experto, llegando a acuerdo.

4.3 Evaluación en hematoxilina-eosina

Se inició el protocolo de tinción en muestras que fueron previamente fijadas con formalina 10% tamponada, a continuación, las muestras se deshidrataron con un gradiente de alcoholes del 70% al xilol y luego se incrustaron en parafina, lo que se hizo utilizando el equipo procesador de transferencia de tejidos (modelo: BW-12EP). Los bloques de parafina se prepararon en el equipo de incrustación (Tissue-Tec TEC). Se utilizó un micrótopo para obtener secciones de tejido de 3 μ m de grosor, que se colocaron en un baño de flotación a 45°C. A continuación, las secciones se montaron en los portaobjetos y se dejaron secar para la posterior tinción de los tejidos. La hidratación de los tejidos se realizó en un gradiente alcohólico que pasó por xilol, alcohol absoluto, etanol al 95%, etanol al 70%, etanol al 50% y agua. A continuación, el tejido se tiñó con hematoxilina Harris y eosina alcohólica, seguida de un paso de deshidratación en el mismo gradiente alcohólico en sentido inverso. Una vez realizado el protocolo de tinción se observaron las muestras para determinar características de las lesiones tales como: Grado de displasia, grado de queratinización superficial, grosor epitelial, presencia de estrato granuloso, distribución del infiltrado inflamatorio, cantidad de infiltrado inflamatorio descritos en la tabla 3.

Tabla 3: Definición de las variables.			
Variable	Definición operacional	Medición.	Codificación
Sexo	Condición biológica que diferencia al ser humano / según sexo biológico	Mujer/hombre	Mujer=1/Hombre=2
Edad	Tiempo que ha vivido una persona contando desde su nacimiento / años desde el nacimiento hasta el	\leq de 45 años / > de 45 años	1= \leq de 45 años / 2= > de 45 años

	momento del examen. Se describe una mayor tasa de transformación maligna en leucoplasias en individuos mayores de 50 años*		
Sitio	Lugar donde se obtuvo la muestra, para su posterior estudio histopatológico.	Borde lingual/Dorso lingual/Ventre lingual/Piso de boca/Paladar duro/Paladar Blando/Encía-Reborde/Mucosa yugal/ Mucosa labial/ Otro/ Sin información.	1= Borde lingual/ 2= Dorso lingual/ 3= Ventre lingual/ 4=Piso de boca/ 5= Paladar duro/ 6= Paladar blando/7= Encía-Reborde/ 8= Mucosa yugal/ 9= Mucosa labial/ 0=Otro/ Sin información.
Tipo de Leucoplasia	Diagnóstico clínico de la lesión.	Aislada/Leucoplasia verrucosa proliferativa.	1= Aislada/2= Leucoplasia verrucosa proliferativa.
Grado de displasia	Grado de alteración citológica y arquitectónica epitelial con relación a tercios afectados	Sin displasia/Leve/moderada/ grave/sin información.	0= Sin displasia/1= Leve/ 2= Moderada/ 3= grave/ 4 sin información. Displasia de bajo grado: 0 y 1 / Displasia de alto grado: 2 y 3
Queratosis	Caracterización del estrato corneo en el epitelio a evaluar.	No queratinizado/ Normoqueratinizado/ Hiperqueratinizado/ Sin información.	0= No queratinizado/ 1=Normoqueratinizado/ 2= Hiperqueratinizado / Sin información.
Grosor	Alteración del número de células epiteliales.	1= Atrofia/2= Acantosis / 3= Normal	Atrofia/ Acantosis / Normal
Granulosis	Presencia del estrato	Ausente/ Presente.	1= Ausente/ 2= Presente.

	granuloso en el epitelio		
Distribución del infiltrado inflamatorio	Disposición en que se encuentran las células inflamatorias en el tejido conectivo subyacente.	Ausente/ Focal/ Difuso/ En banda	0= Ausente/ 1= Focal/ 2=Difuso/ 3= En banda
Cantidad de infiltrado inflamatorio	Numero de células inflamatorias que se encuentran en el tejido conectivo subyacente.	Nulo/ Escaso/ Moderado/ Abundante.	0= Nulo/ 1=Escaso/ 2=Moderado/ 3=Abundante.
Expresión de CXCR4	Producto entre la intensidad de la tinción (IT) y la cantidad de células marcadas (CC)	Baja expresión/ Alta expresión.	Baja intensidad: producto entre IT y CC entre 1 y 4 / Alta intensidad: producto entre IT y CC entre 5 y 12.

*(Aguirre-Urizar et al., 2021)

4.4 Marcación inmunohistoquímica

Se utilizó el anticuerpo anti CXCR4 Antibody (35-8800) (PA5-19862, Invitrogen, Thermo Fischer). Se realizaron cortes de 3 µm de espesor, se desparafinaron en xileno y se rehidrataron en etanol en concentración decreciente y agua destilada. La recuperación de antígenos fue con ácido cítrico, inducida por calor (EnVision™ Flex, High pH, EnVision™ Flex; Dako) durante 20 minutos a 95°C. Los portaobjetos se enfriaron durante 20 minutos, se lavaron y luego se incubaron con el bloqueo de enzimas endógenas (reactivo de bloqueo de peroxidasa EnVision FLEX) durante 5 minutos. Tras el bloqueo de la actividad de la peroxidasa endógena las secciones se incubaron a 4°C *overnight* con los anticuerpos primarios (CXCR4 -1:400). Luego se lavó con agua

corriente y se incubó con anticuerpo secundario (EnVision FLEX HRP) durante una hora a temperatura ambiente. La revelación se hizo con el cromógeno diaminobenzidina (DAB) durante 10 minutos. Los portaobjetos se enjuagaron con tampón de lavado y se contrañieron con hematoxilina. Los controles negativos se realizaron omitiendo los anticuerpos primarios.

4.5 Evaluación de inmunohistoquímica

Se aplicó un sistema de puntuación semicuantitativo de acuerdo con métodos previamente publicados (Kaemmerer et al., 2014) para la evaluación de la intensidad de la tinción y el porcentaje de células teñidas. Los portaobjetos se puntuaron de forma independiente mediante observación en microscopio óptico (Leica DMLS2) sin conocimiento de los parámetros y resultados clínicos. La cantidad de células positivas en el grosor epitelial (CC) se definió como: 1, no marca; 2, marca hasta 25% del epitelio; 3, hasta 75% del epitelio y 4, marcación en 100% de las células epiteliales. La intensidad de la tinción (IT) se definió como: 0, no marca; 1: débil; 2: moderada y 3 marcación intensa. El producto entre CC y IT se cuantificó y clasificó entre marcación de baja intensidad: entre 1 y 4, y alta intensidad: entre 5 y 12 para el análisis estadístico.

4.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se codificaron y tabularon usando la aplicación de Excel. Se analizaron estadísticamente mediante la prueba de Chi cuadrado, para evaluar el grado de displasia frente a datos clínico-patológicos. El grado de displasia, para conveniencia de los análisis estadísticos, se agrupó en bajo grado que incluyó muestras interpretadas como sin displasia y displasia leve, y de alto grado muestras interpretadas como displasia moderada y avanzada, clasificación propuesta por la OMS el 2017 (El-Naggar et al., 2017). Luego se comparó la presencia del receptor de quimioquinas CXCR4 en muestras de leucoplasias versus controles. Finalmente se evaluaron las muestras de leucoplasias

marcadas con CXCR4 en comparación a los datos clínico-patológicos. El nivel de significancia considerado fue del 5% ($P \leq 0.05$).

5. Resultados

Este trabajo se encuentra bajo la aprobación ética del proyecto Fondecyt 1190775.

De 169 casos registrados, 127 corresponden a diagnóstico de leucoplasia. Se incluyeron como láminas control a 11 hiperplasias fibrosas y 19 lesiones liquenoides/liquen plano, las cuales fueron evaluadas en tinción de rutina Hematoxilina Eosina. Los datos clínico-patológicos evaluados fueron: edad, sexo, sitio de lesión, tipo de leucoplasia, grado de displasia, presencia de queratosis, grosor epitelial, presencia o no de granulosis, distribución del infiltrado inflamatorio en el tejido conectivo y cantidad de infiltrado inflamatorio, descritas en la Tabla 3. En relación con los datos clínicos-patológicos de las leucoplasias, más de la mitad de los pacientes se encuentran sobre los 45 años, siendo el promedio 55 años. Dentro de los sitios más afectados se encuentra la mucosa yugal con un 29,1%, seguido de encía/reborde alveolar con un 16,5%. El 87% de las leucoplasias se describen como lesiones únicas aisladas. Histopatológicamente el 39,4% se informó como displasia leve, 55,1% normoqueratinizado, 88,2% presenta acantosis, y el 61,4% estrato granuloso presente. En el tejido conectivo subyacente se caracterizó el infiltrado inflamatorio, el cual el 49,6% se clasificó como escaso y 71,7% tiene una distribución difusa. Dentro de la información solicitada de las muestras a utilizar, se encontraban algunas en las cuales no explicitaban todos los datos, o no había registro de ellos, por lo que se decidió utilizar el análisis de las láminas sin incorporar datos faltantes (Tabla 4).

Tabla 4: Características clínicas, histopatológicas y del infiltrado inflamatorio en muestra total de leucoplasia	
	Leucoplasia n (%)
Edad	
≤45	22 (17,3)
>45	74 (58,3)
Sin información	31 (24,4)
Sexo	
M	68 (53,5)
F	57 (44,9)
Sin información	2 (1,6)
Sitio	
Borde lingual	20 (15,7)
Dorso lingual	2 (1,6)
Ventre lingual	6 (4,7)
Piso de boca	8 (6,3)
Paladar duro	2 (1,6)
Paladar blando	9 (7,1)
Encía/Reborde	21 (16,5)
Mucosa yugal	37 (29,1)
Mucosa labial	0 (0,0)
Otro*	20 (15,7)
Sin información	2 (1,6)
Tipo de Leucoplasia	
Aislada	111 (87,4)
LVP	16 (12,6)
Grado de displasia	
Sin displasia	31 (24,4)
Leve	50 (39,4)
Moderada	39 (30,7)
Avanzada	5 (3,9)
Sin información	2 (1,6)
Queratosis	
Normoqueratinizada	70 (55,1)
Hiperqueratinizada	39 (30,7)
No queratinizada	14 (11,0)
Sin información	4 (3,1)
Grosor	
Atrofia	7 (5,5)

Acantosis	117 (92,1)
Normal	3 (2,4)
Granulosis	
Ausente	78 (61,4)
Presente	49 (38,6)
Distribución de infiltrado inflamatorio	
Ausente	13 (10,2)
Focal	9 (7,1)
Difuso	91 (71,7)
En banda	14 (11,0)
Cantidad de infiltrado inflamatorio	
Nulo	16 (12,6)
Escaso	63 (49,6)
Moderado	30 (23,6)
Abundante	18 (14,2)
Total de muestras evaluadas	127 (100,0)

*trígono retromolar y fondo de vestíbulo

Tabla 5: Características clínicas, histopatológicas y del infiltrado inflamatorio en muestras de leucoplasia según grado de displasia agrupados.

	Bajo grado n (%)	Alto grado n (%)	Total	<i>p</i>
Edad				
≤45	13 (16,0)	9 (20,5)	22	0,52
>45	49 (60,4)	24 (54,5)	73	
Sin información	19 (23,4)	11 (25,0)	30	
Sexo				
M	42 (51,8)	24 (54,5)	66	0,19
F	37 (45,6)	20 (45,5)	57	
Sin información	2 (2,4)	0 (0,0)	2	
Sitio				
Borde lingual	10 (12,3)	10 (22,7)	20	0,34
Dorso lingual	1 (1,2)	1 (2,3)	2	
Ventre lingual	1 (1,2)	5 (44,4)	6	
Piso de boca	4 (4,9)	3 (6,8)	7	
Paladar duro	0 (0,0)	2 (4,5)	2	
Paladar blando	7 (8,6)	2 (4,5)	9	
Encía/Reborde	14 (17,2)	7 (15,9)	21	
Mucosa yugal	26 (32,0)	10 (22,7)	36	

Mucosa labial	0 (0,0)	0 (0,0)	0	
Otro*	16 (19,7)	4 (91)	20	
Sin información	2 (2,4)	0 (0,0)	2	
Tipo de Leucoplasia				
Aislada	72 (88,8)	38 (86,4)	110	0,17
LVP	9 (11.,1)	6 (13,6)	15	
Queratosis				
Sin queratosis	8 (9,8)	5 (11,4)	13	0,54
Normoqueratinizada	48 (59,2)	22 (50,0)	70	
Hiperqueratinizada	21 (25,9)	17 (38,6)	38	
Sin información	4 (4,9)	0 (0,0)	4	
Grosor				
Atrofia	5 (6,2)	2 (4,5)	7	0,92
Acantosis	74 (91,3)	41 (93,2)	115	
Normal	2 (2,4)	1 (2,3)	3	
Granulosis				
Sin granulosis	46 (56,8)	30 (68,2)	76	0,60
Ausente	32 (39,5)	14 (31,8)	46	
Presente	3 (3,7)	0 (0,0)	3	
Distribución de infiltrado inflamatorio				
Ausente	8 (9,8)	5 (11,4)	13	0,006*
Focal	6 (7,4)	3 (6,8)	9	
Difuso	63 (77,7)	25 (56,8)	88	
En banda	4 (4,9)	10 (22,7)	14	
No evaluado	0 (0,0)	1 (2,3)	1	
Cantidad de infiltrado inflamatorio				
Nulo	8 (9,8)	7 (15,9)	15	0,29
Escaso	44 (54,3)	18 (40,9)	62	
Moderado	20 (24,7)	10 (22,7)	30	
Abundante	9 (35,8)	9 (20,5)	18	
CXCR4 en epitelio				
Baja expresión	7 (8,6)	11 (25,0)	18	0.006*
Alta expresión	47 (58,0)	17 (38,6)	64	
*trígono retromolar y fondo de vestíbulo. Total de muestras evaluadas de leucoplasia con displasia de bajo grado: 81; Total muestras evaluadas de leucoplasia de displasia de alto grado: 44; total de muestras CXCR4 con displasia de bajo grado; 54, total de muestras CXCR4 con displasia de alto grado: 28.				

Según el grado de displasia evaluado (Tabla 5) en su mayoría no hubo significancia estadística, excepto al comparar el grado de displasia frente a la distribución del infiltrado

inflamatorio ($p= 0,006$). Al comparar el nivel de CXCR4 respecto al grado de la displasia, también se encontró valor estadísticamente significativo ($p=0,006$, en el cual se ve una mayor inmunomarcación en displasias de bajo grado.

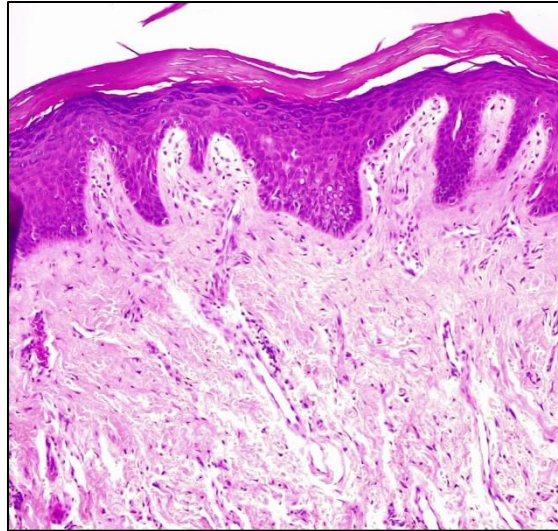
La alta expresión de CXCR4 (Tabla 6) en leucoplasias fue estadísticamente significativo al momento de compararlo con los controles ($p=0,02$)

Tabla 6: Expresión de CXCR4 en controles y leucoplasias.						
	Controles		Leucoplasia		Total	p
	n	(%)	n	(%)		
CXCR4 en epitelio						
Baja expresión	1 (3,4)		18 (22,0)		19	0,02*
Alta expresión	28 (96,6)		64 (78,0)		92	
Total de controles evaluados: 29; Total de Leucoplasias evaluadas; 82; Total de muestras: 111.						

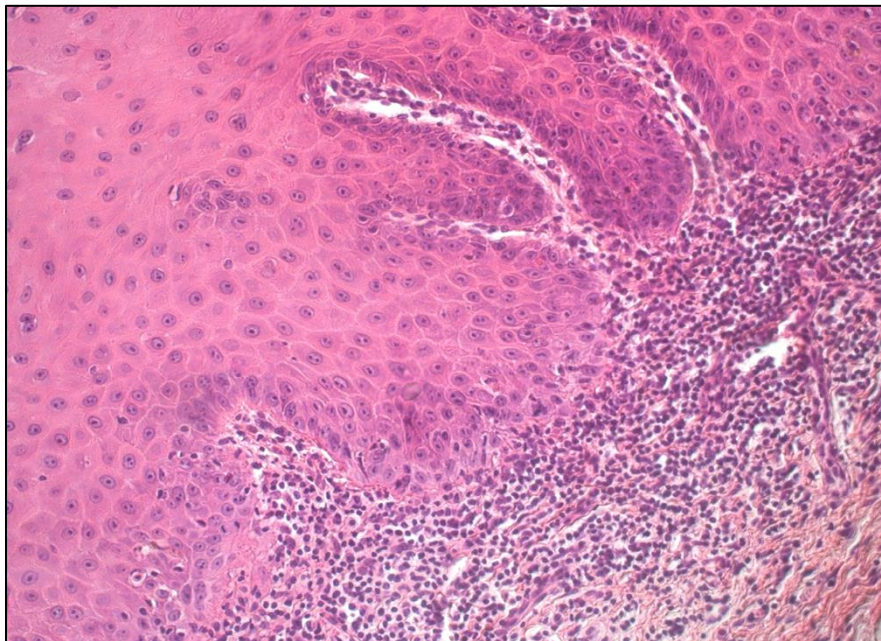
Finalmente, la expresión del marcador CXCR4 comparado con las características clínico-patológicas de las muestras (Tabla 7) expresa que la única variable estadísticamente significativa fue la presencia del estrato granuloso en la evaluación histopatológica ($p=0,01$).

Tabla 7: Expresión de CXCR4 en el epitelio de leucoplasias según características clínico-patológicas.					
	Baja Expresión		Alta expresión	Total	p
	n (%)	n (%)	n (%)		
Edad					
≤45	3 (16,7)		10 (15,6)	13	0,96
>45	11 (61,1)		38 (59,4)	49	
Sin evaluación	4 (22,2)		16 (25)	20	
Sexo					
M	13(72,2)		35 (54,7)	48	0,18
F	5 (27,7)		28 (43,8)	33	
Sin evaluación	0 (0,0)		1 (1,6)	1	
Sitio					
Borde lingual	1 (5,6)		9 (14,1)	10	0,07
Dorso lingual	1 (5,6)		0 (0,0)	1	

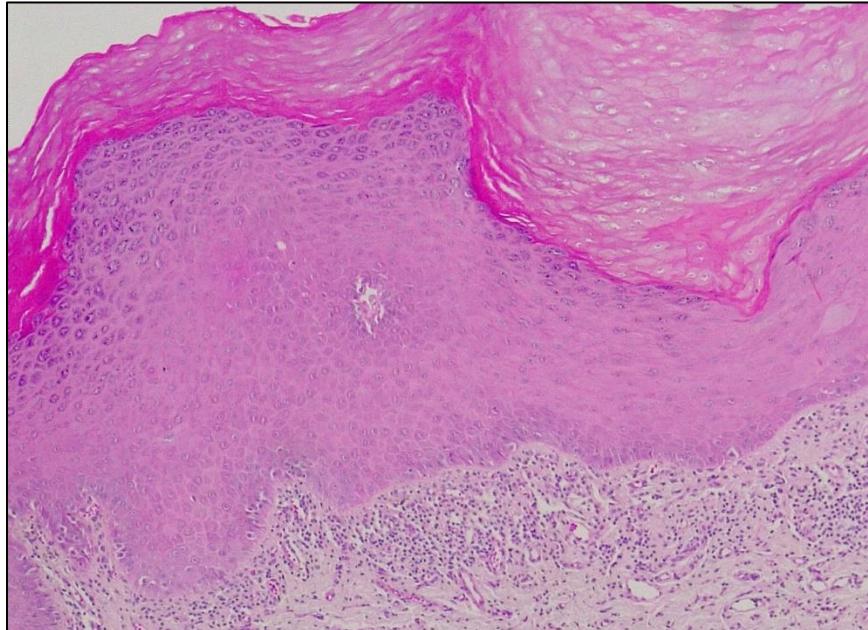
Vientre lingual	0 (0,0)	5 (7,8)	5	
Piso de boca	2 (11,1)	4 (6,3)	6	
Paladar duro	1 (5,6)	0 (0,0)	1	
Paladar blando	2 (11,1)	5 (7,8)	7	
Encía/Reborde	3 (16,7)	6 (9,4)	9	
Mucosa yugal	5 (27,8)	24 (37,5)	29	
Mucosa labial	0 (0,0)	0 (0,0)	0	
Otro*	3 (16,7)	11 (17,2)	14	
Tipo de Leucoplasia				
Aislada	17 (94,4)	59 (92,2)	76	0,74
LVP	1 (5,6)	5 (7,8)	6	
Queratosis				
Sin queratosis	2 (11,1)	6 (9,4)	8	0,66
Normoqueratinizada	12 (66,7)	36 (56,3)	48	
Hiperqueratinizada	3 (16,7)	20 (31,3)	23	
Sin evaluación	1 (5,6)	2 (3,1)	3	
Grosor				
Atrofia	0 (0,0)	3 (4,7)	3	0,59
Acantosis	18 (100)	60 (93,8)	78	
Normal	0 (0,0)	1 (1,6)	1	
Granulosis				
Ausente	16 (88,9)	37 (57,8)	53	0,01*
Presente	2 (11,1)	27 (42,2)	29	
Distribución de infiltrado inflamatorio				
Ausente	3 (16,7)	9 (14,1)	12	0,95
Focal	1 (5,6)	3 (4,7)	4	
Difuso	13 (72,2)	46 (71,9)	59	
En banda	1 (5,6)	6 (9,4)	7	
Cantidad de infiltrado inflamatorio				
Nulo	3 (16,7)	9 (14,1)	12	0,68
Escaso	12 (66,7)	35 (57,7)	47	
Moderado	2 (11,1)	13 (20,3)	15	
Abundante	1 (5,6)	7 (10,9)	8	
*trígono retromolar y fondo de vestíbulo. Total de muestras evaluadas de CXCR4 de baja expresión: 18; Total de muestras evaluadas CXCR4 de alta expresión: 64; Total de muestras evaluadas de CXCR4: 82				

Imagen 1

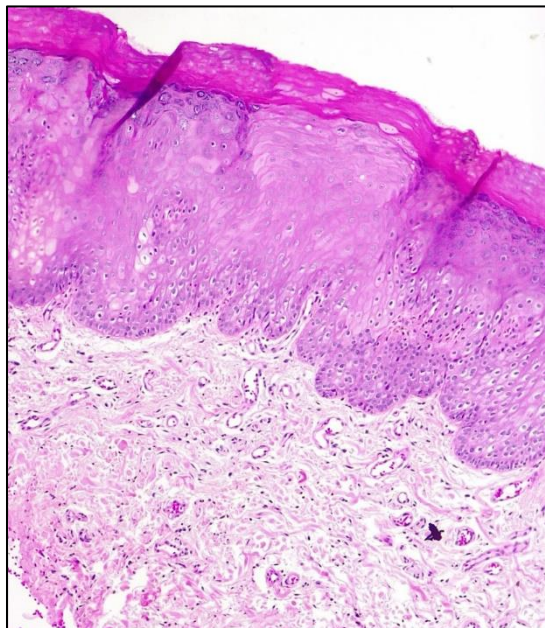
Microfotografía aumento 10x en tinción de HE, se observa atrofia epitelial, presencia de estrato granuloso marcado, hiperqueratosis e infiltrado inflamatorio escaso y difuso, displasia de bajo grado.

Imagen 2

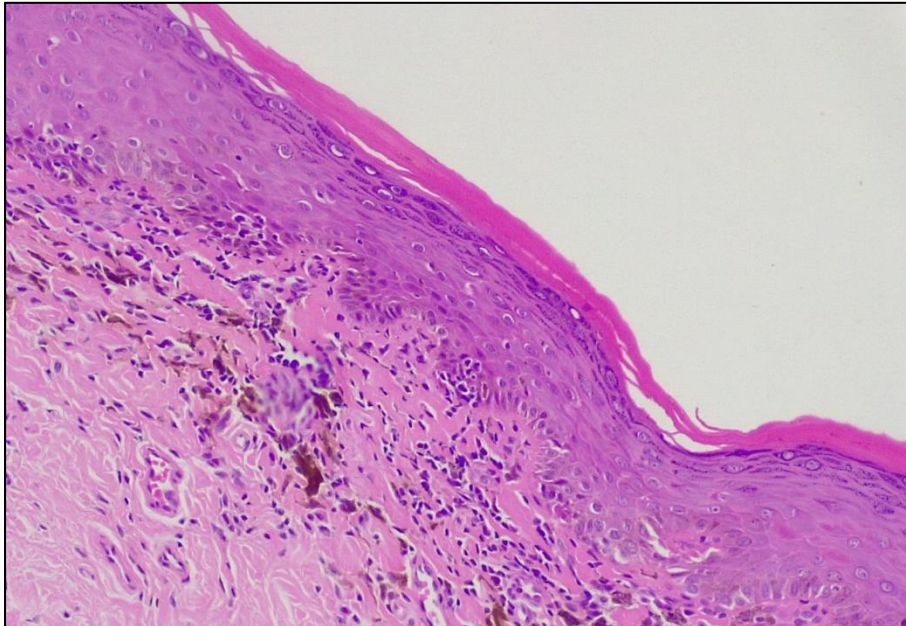
Microfotografía en aumento 20x tinción de HE, se observa infiltrado abundante inflamatorio en banda subepitelial, displasia de bajo grado.

Imagen 3

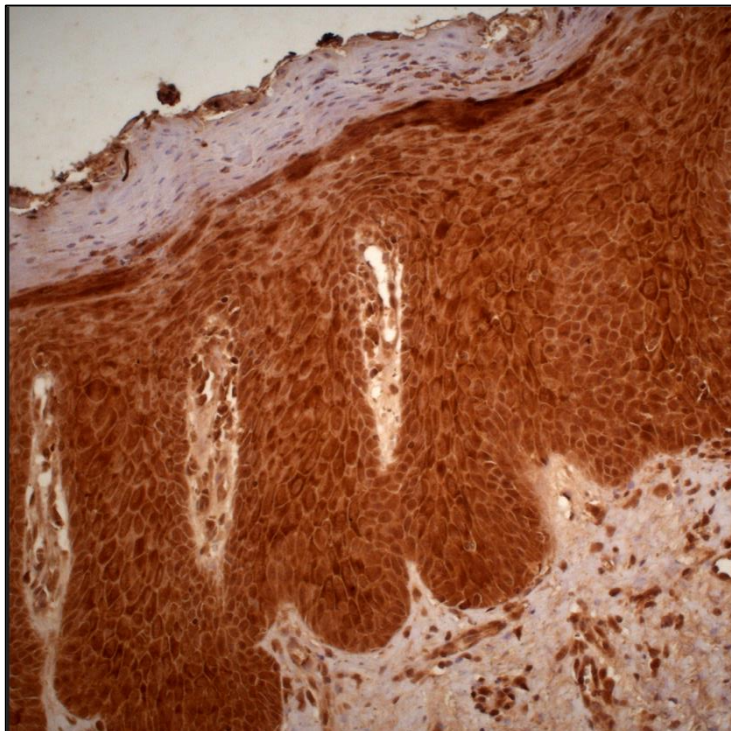
Microfotografía aumento 10x en tinción de HE, se observa acantosis, presencia de estrato granuloso marcado, hiperqueratosis Displasia de bajo grado e infiltrado inflamatorio escaso difuso escaso y difuso.

Imagen 4

Microfotografía 10x en tinción de HE, se observa acantosis epitelial, hiperqueratosis, displasia de alto grado, e infiltrado inflamatorio escaso y difuso.

Imagen 5

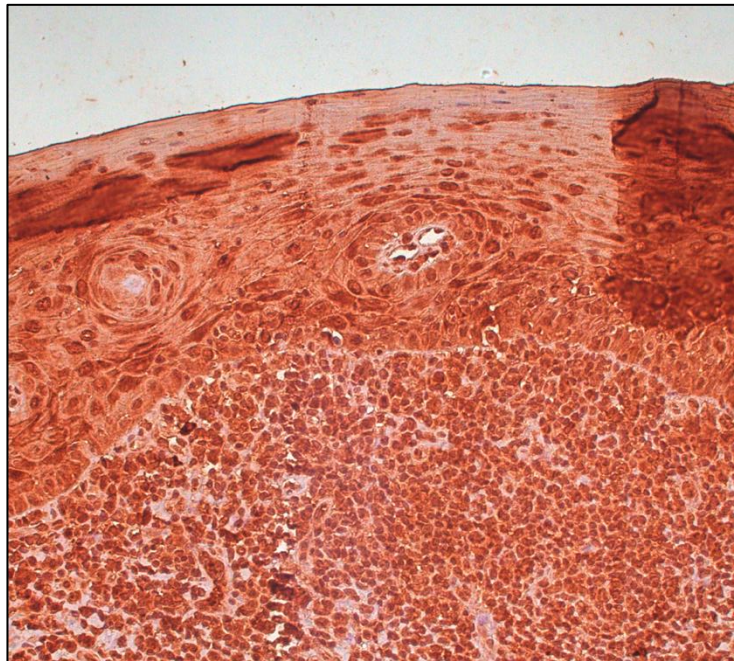
Microfotografía 10x en tinción de HE, se observa atrofia epitelial, queratosis, Infiltrado inflamatorio escaso y difuso.

Imagen 6

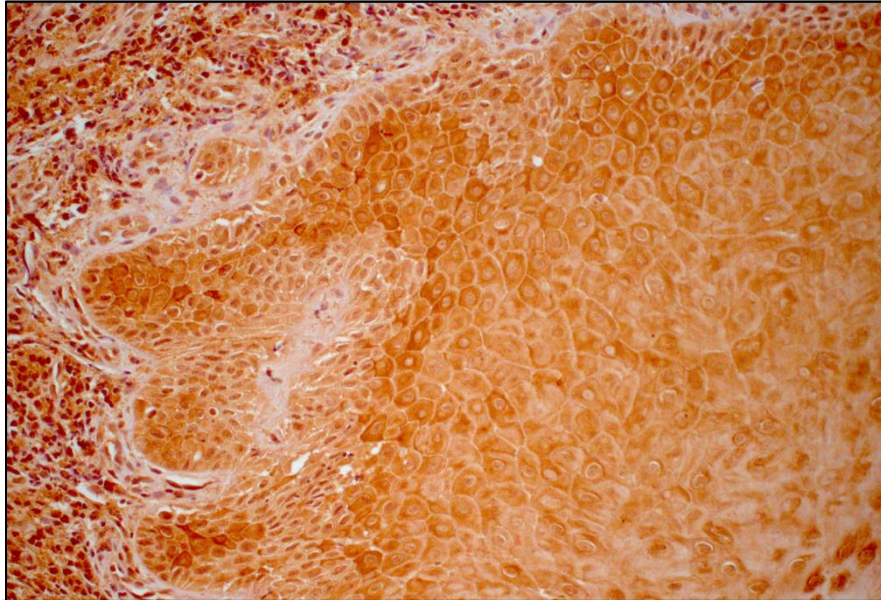
Microfotografía 20x IHQ contra CXCR4 alta intensidad
Diagnóstico clínico de leucoplasia. Displasia de bajo grado.

Imagen 7

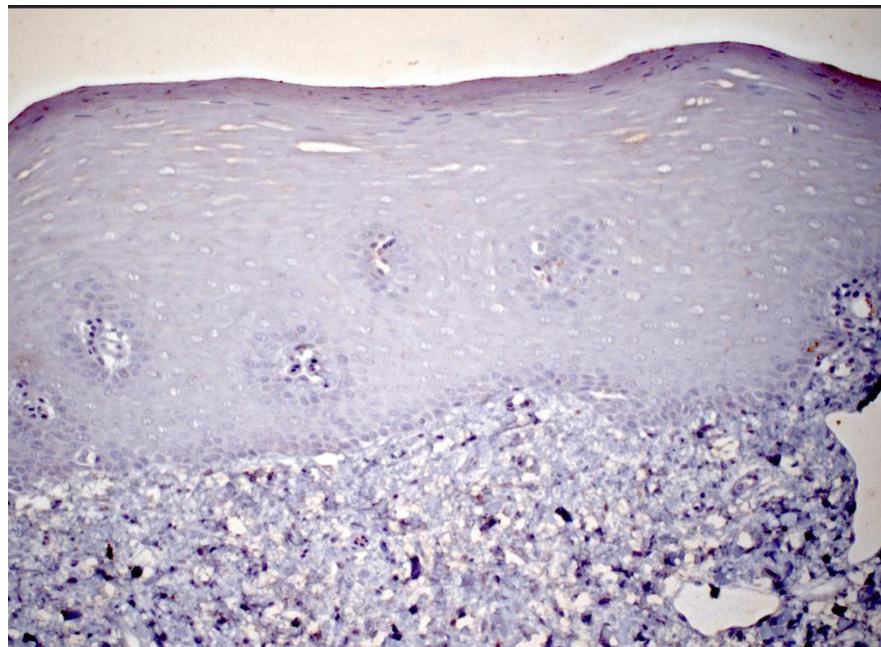
Microfotografía 10x IHQ contra CXCR4 alta intensidad. Diagnóstico de Hiperplasia fibrosa.

Imagen 8

Microfotografía 10x IHQ contra CXCR4 alta intensidad de marcación en epitelio e infiltrado inflamatorio. Diagnóstico Liquen plano oral, sin displasia.

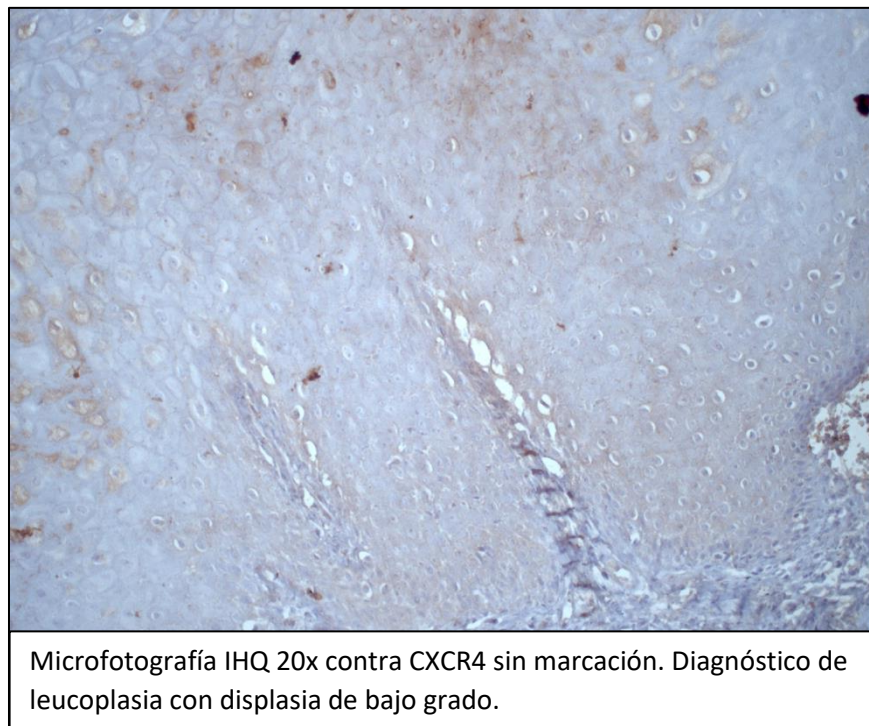
Imagen 9

Microfotografía IHQ 20x contra CXCR4 alta intensidad de marcación en epitelio e infiltrado inflamatorio. Diagnóstico clínico: Leucoplasia oral, displasia de alto grado.

Imagen 10

Microfotografía IHQ 10x contra CXCR4 sin marcación. Diagnóstico de Hiperplasia fibrosa.

Imagen 11



6. Discusión

Los DOPM son entidades las cuales, pueden o no llevar al desarrollo de cáncer (S. Warnakulasuriya et al., 2007), si se diagnostican a tiempo, se puede evitar el desarrollo de una neoplasia maligna, En su mayoría carcinoma oral de células escamosas. Uno de los principales problemas es el poco interés por evaluar mucosas orales de parte de los odontólogos, por lo cual los DOPM pasan desapercibidos. El diagnóstico temprano tanto de DOPM permite un tratamiento oportuno, sin embargo, no se puede predecir con certeza cual de todos los DOPM tendrán evolución hacia una patología maligna y ahí es donde se está poniendo énfasis en diferencias líneas de investigación las cuales han propuesto evaluar biomarcadores moleculares de transformación maligna en lesiones potencialmente malignas (Villa et al., 2019). Bajo esa premisa radica la necesidad de buscar, determinar y evaluar biomarcadores moleculares que indiquen cuan posible o probable es que esa placa blanca, no desprendible al raspado sea potencial para el desarrollo de COCE.

En el presente estudio se observó que la distribución del infiltrado inflamatorio de tipo difuso en leucoplasias se detecta con mayor frecuencia en displasia de bajo grado, mientras que en displasia de alto grado es más frecuente un infiltrado subepitelial, más denso, tipo liquenoide. Esto se puede explicar ya que el sistema inmune del huésped tendría una respuesta celular que regularía la apoptosis, generando un efecto proliferativo descontrolado, sin embargo otros estudios relatan la asociación del microambiente tumoral inflamatorio crónico, incluyendo células del hospedero y vías de señalización, como participantes en la transición desde un DOPM hacia COCE. Se desconoce si la organización del infiltrado inflamatorio y el tipo de células presentes pueden modificar el comportamiento molecular del carcinoma. Hay autores que relatan que un aumento en el cambio del tipo de infiltrado inflamatorio en DOPM y cáncer como un cambio en la relación de linfocitos T CD4+/C8+ y neutrófilos/linfocitos (Ingaleshwar et al., 2016, Hanahan, 2022. Mahdi et al., 2019) Ejemplo de eso es PD-1/PDL-1 receptor y ligando de muerte celular programada-1, que son capaces de modular la respuesta inmune, pero si se descontrola su producción, no realiza su función contra las células tumorales, ese eje y su desregulación ya se ha estudiado en COCE (Ries et al., 2021). IL-27, una interleuquina proinflamatoria, se ha encontrado aumentada en enfermedades inflamatorias crónicas, se ha correlacionado el aumento de IL-27 en cáncer por ejemplo de mamas, próstata y colon (Wang et al., 2022), permitiendo correlacionar un inmunoambiente proinflamatorio con el desarrollo de neoplasias malignas.

La marcación de CXCR4 en muestras con displasia de bajo grado, fue estadísticamente significativa mayor en relación con la presencia de CXCR4 en muestras con displasia de alto grado. Se ha estudiado que la presencia del aumento de CXCR4 está asociado con peor pronóstico, ya que promueve angiogénesis, proliferación, metástasis y quimiotaxis, y, gracias a eso se ha visto aumentado en diversos tipos de neoplasias malignas, por ejemplo: Hígado, pulmón, riñón, esófago, cavidad oral, páncreas y cerebro (Lazennec & Richmond, 2010). En consecuencia, tumores mal diferenciados han expresado mayor positividad a CXCR4.

En los resultados expuestos, existe discordancia entre lo planteado en la hipótesis la cual plantea que la presencia de CXCR4 es concordante con el grado de displasia, ya que se

vio mayor marcación en muestras con displasia de bajo grado, esto podría sugerir que las displasias de bajo grado que expresaron CXCR4, molecularmente hablando, tendrían un potencial de malignización mayor que las displasias de alto grado que no expresaron CXCR4. Por otra parte, es posible que la clasificación para las displasias haya sido inadecuada, se podrían reevaluar las muestras categorizando las displasias en: sin displasia, displasia leve, moderada y severa y realizar los análisis correspondientes. Otro factor por evaluar y que podría llevar a un resultado diferente a lo esperado es la técnica inmunohistoquímica inadecuada, para ese caso es necesario realizar todas las tinciones de manera estandarizada, incluyendo el montaje y corte de las láminas. Otra sugerencia que se extrapola de los resultados sería que simplemente CXCR4 no sería un buen marcador de predicción de transformación maligna.

El presente estudio se evaluó el marcador CXCR4 en muestras de leucoplasias, hiperplasias fibrosas y liquen plano oral, evidenciando que tanto en muestras de leucoplasias sin displasia, displasia leve, moderada, avanzada y controles hay expresión de CXCR4, sin embargo, no es posible asegurar que sea un buen biomarcador de pronóstico de transformación maligna. Actualmente las lesiones liquenoides y el liquen plano oral son considerado como un DOPM (Saman Warnakulasuriya, 2020), de baja tasa de malignización, por lo que no son un buen control. Además, puede ser necesario ajustar el anticuerpo a una relación más diluida.

La Caracterización clínico-patológica sólo dejó entrever diferencia estadísticamente significativa en la evaluación de la presencia del estrato granuloso en muestras de leucoplasias según grado de displasia, estando más presente en muestras de mayor grado de displasia. No se encontró literatura con respecto a la evaluación de este parámetro en DOPM. La granulosis se asocia a hiperortoqueratosis, lo que se ha descrito como asociado a queratosis de significancia indeterminada, lo que, a pesar de no tener cambios evidentes citológicos, puede ser definido como cambios incipientes de displasia.

Es imperante tener en consideración la correlación bajo factores de grado asociados a leucoplasias como es el tabaco y el alcohol, además dentro de los controles evaluar si mantener al liquen plano, ya que es considerado un DOPM, y genera un inmunoambiente

inherente a su fisiopatología. Además, al tener potencial de malignización es probable que tenga una inmunomarcación intensa de CXCR4. Por parte de las hiperplasias fibrosas, pueden estar o no asociadas a inflamación, por lo que en ambas patologías, liquen plano oral e hiperplasia fibrosa puede verse alterada la expresión de receptores de citoquinas proinflamatorias como lo es el CXCR4.

Hay que tener en consideración para futuras investigaciones, como grupo control, tejidos que no se encuentren bajo procesos inflamatorios, ya que, CXCR4 aumenta su expresión y contribuye a un ambiente proinflamatorio. También se debe revisar y estandarizar mejor la técnica de inmunomarcación. Adicionalmente, se debe tomar en cuenta otros datos clínico-patológicos como lo son consumo de tabaco y alcohol, para ver el efecto que tienen sobre el inmunoambiente y si generan lesiones molecularmente más agresivas. Por otro lado, realizar estudios prospectivos en donde se pueda ir caracterizando molecularmente mediante técnicas de inmunohistoquímica, e ir evaluando los cambios del biomarcador, podría ayudar a dilucidar si CXCR4 es un marcador potencial de transformación maligna.

7. Conclusión

Existe diferencia en la distribución del infiltrado inflamatorio en el tejido conectivo subyacente al epitelio entre displasias de alto y bajo grado. El infiltrado difuso es más frecuentemente observado en displasias de bajo grado y el infiltrado liquenoide en displasias de alto grado. En muestras de leucoplasias, la distribución del infiltrado inflamatorio de forma difusa se encontró en más del 50% de las muestras evaluadas con displasia de bajo grado, en displasia de alto grado también hubo una tendencia de la organización del infiltrado inflamatorio hacia algo más difuso, sin ser significativo.

La evaluación de inmunomarcación de CXCR4 entre otras lesiones orales de cavidad oral (hiperplasia fibrosa, liquen plano oral y recciones liquenoides) y leucoplasias fue que, tanto en leucoplasias como en controles, hubo una alta expresión de CXCR4 en el epitelio. La interpretación de esta marcación es compleja y se sugiere el uso de técnicas

más precisas como PCR o inmunofluorescencia para evaluar la presencia de este biomarcador.

Al comparar leucoplasias de alto y bajo grado, y sus características clínico-patológicas la presencia del estrato granuloso epitelial fue estadísticamente significativa, estando mayormente ausente en leucoplasias con displasia de alto grado.

Es necesario realizar mejoras al protocolo de investigación para obtener resultados más útiles para el diagnóstico histopatológico con apoyo de marcadores inmunohistoquímicos como receptores de quimioquinas en leucoplasias.

8. Resumen

El cáncer de cabeza y cuello es el séptimo cáncer más frecuente mundialmente hablado, alcanzando 890.000 nuevos casos y 450.000 muertes en el 2018, el retraso diagnóstico es principalmente por no detectar tempranamente lesiones incipientes o lesiones llamadas desordenes orales potencialmente malignos (DOPM), el principal DOPM es la leucoplasia que se describe como placa blanca que no se desprende al raspado, y de riesgo cuestionable. Histopatológicamente puede corresponder a displasia, la cual guía hacia un mayor riesgo, pero no es posible determinarlo con certeza. Se han evaluado biomarcadores en carcinoma oral de células escamosas presentes dentro del tumor y su posibilidad de uso en DOPM estudiando la presencia y asociando a transformación maligna. Un ejemplo de esto es el receptor de citoquinas CXCR4, la cual tiene funciones fisiológicas y patológicas comprobadas como: potente quimiotáctico para linfocitos, inducción de angiogénesis y por lo anterior, facilita el proceso de invasión y metástasis. El objetivo del estudio fue evaluar niveles de inmunomarcación de CXCR4 en leucoplasias orales según grados de displasia, sin embargo, la inmunomarcación de CXCR4 en leucoplasias y otras lesiones orales de cavidad oral fue alta y su interpretación es cuestionable para riesgo de transformación maligna.

9. Bibliografía

- Adlere, I., Caspar, B., Arimont, M., Dekkers, S., Visser, K., Stuijt, J., de Graaf, C., Stocks, M., Kellam, B., Briddon, S., Wijtmans, M., de Esch, I., Hill, S. & Leurs, R. (2019). Modulators of CXCR4 and CXCR7/AckR3 function. In *Molecular Pharmacology* (Vol. 96, Issue 6, pp. 737–752). American Society for Pharmacology and Experimental Therapy. <https://doi.org/10.1124/mol.119.117663>
- Aguirre-Urizar, J. M., Lafuente-Ibáñez de Mendoza, I. & Warnakulasuriya, S. (2021). Malignant transformation of oral leukoplakia: Systematic review and meta-analysis of the last 5 years. In *Oral Diseases* (Vol. 27, Issue 8, pp. 1881–1895). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/odi.13810>
- Benedicto, A., Romayor, I. & Arteta, B. (2018). CXCR4 receptor blockage reduces the contribution of tumor and stromal cells to the metastatic growth in the liver. *Oncology Reports*, 39(4), 2022–2030. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6254>
- Bianchi, M. E. & Mezzapelle, R. (2020). The Chemokine Receptor CXCR4 in Cell Proliferation and Tissue Regeneration. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02109>
- Cheng, Y., Song, Y., Qu, J., Che, X., Song, N., Fan, Y., Wen, T., Xu, L., Gong, J., Wang, X., Zhang, C., Qu, X. & Liu, Y. (2018). The Chemokine Receptor CXCR4 and c-MET Cooperatively Promote Epithelial-Mesenchymal Transition in Gastric Cancer Cells. *Translational Oncology*, 11(2), 487–497. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.02.002>
- Conway, D. I., Purkayastha, M. & Chestnutt, I. G. (2018). The changing epidemiology of oral cancer: Definitions, trends, and risk factors. *British Dental Journal*, 225(9), 867. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2018.922>
- Czerninski, R., Basile, J. R., Kartin-Gabay, T., Laviv, A. & Barak, V. (2014). Cytokines and tumor markers in potentially malignant disorders and oral squamous cell carcinoma: A pilot study. *Oral Diseases*, 20(5), 477–481. <https://doi.org/10.1111/odi.12160>
- da Silva, J. M., Soave, D. F., Moreira Dos Santos, T. P., Batista, A. C., Russo, R. C., Teixeira, M. M. & da Silva, T. A. (2016). Significance of chemokine and chemokine receptors in head and neck squamous cell carcinoma: A critical review. In *Oral Oncology* (Vol. 56, pp. 8–16). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2016.02.016>
- El-Naggar, A. K., Chan, J. K. C., Rubin Grandis, J., Takata, T., Slotweg, P. J. & International Agency for Research on Cancer. (n.d.). *WHO classification of head and neck tumours*.

fernandes2020. (n.d.).

- Foschini, M. P., Leonardi, E., Eusebi, L. H., Farnedi, A., Poli, T., Tarsitano, A., Cocchi, R., Marchetti, C., Gentile, L., Sesenna, E., Marucci, G. & Montebugnoli, L. (2013). Podoplanin and E-cadherin expression in preoperative incisional biopsies of oral squamous cell carcinoma is related to lymph node metastases. *International Journal of Surgical Pathology*, 21(2), 133–141. <https://doi.org/10.1177/1066896912471851>
- Füzéry, A. K., Levin, J., Chan, M. M. & Chan, D. W. (2013). Translation of proteomic biomarkers into FDA approved cancer diagnostics: Issues and challenges. In *Clinical Proteomics* (Vol. 10, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/1559-0275-10-13>
- González-Arriagada, W. A., Lozano-Burgos, C., Zúñiga-Moreta, R., González-Díaz, P. & Coletta, R. D. (2018). Clinicopathological significance of chemokine receptor (CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7 and CXCR4) expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 47(8), 755–763. <https://doi.org/10.1111/jop.12736>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. In *Cancer Discovery* (Vol. 12, Issue 1, pp. 31–46). American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Ingaleshwar, P., Pandit, S., Desai, D., Redder, C., Shetty, A. & Mithun, K. (2016). Immunohistochemical analysis of angiogenesis by CD34 and mast cells by toluidine blue in different grades of oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 20(3), 467–473. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.190950>
- Iocca, O., Sollecito, T. P., Alawi, F., Weinstein, G. S., Newman, J. G., de Virgilio, A., di Maio, P., Spriano, G., Pardiñas López, S. & Shanti, R. M. (2020). Potentially malignant disorders of the oral cavity and oral dysplasia: A systematic review and meta-analysis of malignant transformation rate by subtype. In *Head and Neck* (Vol. 42, Issue 3, pp. 539–555). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/hed.26006>
- Johnson, D. E., Burtneß, B., Leemans, C. R., Lui, V. W. Y., Bauman, J. E. & Grandis, J. R. (2020a). Head and neck squamous cell carcinoma. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 6, Issue 1). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00224-3>
- Johnson, D. E., Burtneß, B., Leemans, C. R., Lui, V. W. Y., Bauman, J. E. & Grandis, J. R. (2020b). Head and neck squamous cell carcinoma. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 6, Issue 1). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00224-3>

- Kaemmerer, D., Reimann, C., Specht, E., Wirtz, R. M., Sayeg, M., Baum, R. P., Schulz, S. & Lupp, A. (2014). *Differential expression and prognostic value of the chemokine receptor CXCR4 in bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms* (Vol. 6, Issue 5). www.impactjournals.com/oncotarget
- Kawaguchi, N., Zhang, T. T. & Nakanishi, T. (2019). Involvement of CXCR4 in normal and abnormal development. In *Cells* (Vol. 8, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells8020185>
- Kim, S. W., Roh, J. & Park, C. S. (2016). Immunohistochemistry for pathologists: Protocols, pitfalls, and tips. In *Journal of Pathology and Translational Medicine* (Vol. 50, Issue 6, pp. 411–418). Seoul National University. <https://doi.org/10.4132/jptm.2016.08.08>
- Lazennec, G. & Richmond, A. (2010a). Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. In *Trends in Molecular Medicine* (Vol. 16, Issue 3, pp. 133–144). <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.01.003>
- Lazennec, G. & Richmond, A. (2010b). Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. In *Trends in Molecular Medicine* (Vol. 16, Issue 3, pp. 133–144). <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.01.003>
- Lazennec, G. & Richmond, A. (2010c). Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. In *Trends in Molecular Medicine* (Vol. 16, Issue 3, pp. 133–144). <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.01.003>
- Lee, G., Santo, A. I. E., Zwingenberger, S., Cai, L., Vogl, T., Feldmann, M., Horwood, N. J., Chan, J. K. & Nanchahal, J. (2018). Fully reduced HMGB1 accelerates the regeneration of multiple tissues by transitioning stem cells to GAlert. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(19), E4463–E4472. <https://doi.org/10.1073/pnas.1802893115>
- Mahdi, Dr. H., Eymael, Ms. D. L., Ali, Dr. A. & Magalhaes, Dr. M. (2019). CHARACTERIZATION OF THE INFLAMMATORY INFILTRATES IN ORAL EPITHELIAL DYSPLASIA AND ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA USING A NEW MFCA METHOD. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 128(1), e57. <https://doi.org/10.1016/J.OOOO.2019.02.131>
- Mashhadiabbas, F. & Fayazi-Boroujeni, M. (2017). Correlation of Vascularization and Inflammation with Severity of Oral Leukoplakia. *JOURNAL OF PATHOLOGY Iranian Journal of Pathology*, 12(3), 225–230.
- Mello, F. W., Miguel, A. F. P., Dutra, K. L., Porporatti, A. L., Warnakulasuriya, S., Guerra, E. N. S. & Rivero, E. R. C. (2018). Prevalence of oral potentially malignant disorders: A systematic review and meta-analysis. In *Journal of Oral Pathology and*

Medicine (Vol. 47, Issue 7, pp. 633–640). Blackwell Publishing Ltd.
<https://doi.org/10.1111/jop.12726>

- Mousavi, A. (2020). CXCL12/CXCR4 signal transduction in diseases and its molecular approaches in targeted-therapy. In *Immunology Letters* (Vol. 217, pp. 91–115). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.11.007>
- Mu È ller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., Luis Barrerak, J., Mohark, A., Vera À stegui, E. & Zlotnik, A. (2001). *Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis*. www.nature.com
- Nazari, A., Khorramdelazad, H. & Hassanshahi, G. (2017). Biological/pathological functions of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 axes in the pathogenesis of bladder cancer. In *International Journal of Clinical Oncology* (Vol. 22, Issue 6, pp. 991–1000). Springer Tokyo. <https://doi.org/10.1007/s10147-017-1187-x>
- Neville, B. W., Damm, D. D., Allen, C. M. & Chi, A. C. (n.d.). Color Atlas of Oral and Maxillofacial Diseases - Brad W. Neville, Douglas D. Damm, Carl M. Allen, Angela C. Chi - (2019) 546pp. 978-0323552257. In *Color Atlas of Oral and Maxillofacial Diseases*.
- Pawig, L., Klasen, C., Weber, C., Bernhagen, J. & Noels, H. (2015). Diversity and inter-connections in the CXCR4 chemokine receptor/ligand family: Molecular perspectives. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 6, Issue AUG). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00429>
- Punyani, S. R. & Sathawane, R. S. (2013). Salivary level of interleukin-8 in oral precancer and oral squamous cell carcinoma. *Clinical Oral Investigations*, 17(2), 517–524. <https://doi.org/10.1007/s00784-012-0723-3>
- Ramos-Vara, J. A. (2011). Principles and methods of immunohistochemistry. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 691, 83–96. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-849-2_5
- Reibel, J. (2003). Prognosis of oral pre-malignant lesions: Significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. In *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* (Vol. 14, Issue 1, pp. 47–62). <https://doi.org/10.1177/154411130301400105>
- Ries, J., Agaimy, A., Wehrhan, F., Baran, C., Bolze, S., Danzer, E., Frey, S., Jantsch, J., Möst, T., Büttner-Herold, M., Wickenhauser, C., Kesting, M. & Weber, M. (2021). Importance of the pd-1/pd-l1 axis for malignant transformation and risk assessment of oral leukoplakia. *Biomedicines*, 9(2), 1–26. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9020194>

- Rivera, C., Crisóstomo, M. F., Peña, C., González-Díaz, P. & González-Arriagada, W. A. (2020). Oral lichen planus interactome reveals CXCR4 and CXCL12 as candidate therapeutic targets. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62258-7>
- Saldivia-Siracusa, C. & González-Arriagada, W. A. (2021). Difficulties in the Prognostic Study of Oral Leukoplakia: Standardisation Proposal of Follow-Up Parameters. *Frontiers in Oral Health*, *2*. <https://doi.org/10.3389/froh.2021.614045>
- Smith, J., Rattay, T., McConkey, C., Helliwell, T. & Mehanna, H. (2009). Biomarkers in dysplasia of the oral cavity: A systematic review. In *Oral Oncology* (Vol. 45, Issue 8, pp. 647–653). <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2009.02.006>
- Speight, P. M., Khurram, S. A. & Kujan, O. (2018). Oral potentially malignant disorders: risk of progression to malignancy. In *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* (Vol. 125, Issue 6, pp. 612–627). Mosby Inc. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2017.12.011>
- Sun, Y., Liu, N., Guan, X., Wu, H., Sun, Z. & Zeng, H. (2016). Immunosuppression Induced by Chronic Inflammation and the Progression to Oral Squamous Cell Carcinoma. *Mediators of Inflammation*, *2016*. <https://doi.org/10.1155/2016/5715719>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Taylor, C. R. (2019). Introduction to Predictive Biomarkers: Definitions and Characteristics. In *Predictive Biomarkers in Oncology* (pp. 3–18). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95228-4_1
- Tirone, M., Tran, N. L., Ceriotti, C., Gorzanelli, A., Canepari, M., Bottinelli, R., Raucci, A., di Maggio, S., Santiago, C., Mellado, M., Saclier, M., François, S., Careccia, G., He, M., de Marchis, F., Conti, V., Larbi, S. ben, Cuvelier, S., Casalgrandi, M., ... Vénéreau, E. (2018). High mobility group box 1 orchestrates tissue regeneration via CXCR4. *Journal of Experimental Medicine*, *215*(1), 303–318. <https://doi.org/10.1084/jem.20160217>
- van der Waal, I. (2019). Oral leukoplakia; a proposal for simplification and consistency of the clinical classification and terminology. *Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal*, *24*(6), e799–e803. <https://doi.org/10.4317/medoral.23372>
- Villa, A., Celentano, A., Glurich, I., Borgnakke, W. S., Jensen, S. B., Peterson, D. E., Delli, K., Ojeda, D., Vissink, A. & Farah, C. S. (2019). World Workshop on Oral Medicine VII: Prognostic biomarkers in oral leukoplakia: A systematic review of

- longitudinal studies. In *Oral Diseases* (Vol. 25, Issue S1, pp. 64–78). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/odi.13087>
- Wang, Q. M., Huang, X. Y. & Guan, W. Q. (2022). Expressions of Interleukin-27 in Oral Lichen Planus, Oral Leukoplakia, and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Inflammation*, 45(3), 1023–1038. <https://doi.org/10.1007/s10753-021-01599-5>
- Warnakulasuriya, S., Johnson, N. W. & van der Waal, I. (2007). Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. In *Journal of Oral Pathology and Medicine* (Vol. 36, Issue 10, pp. 575–580). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2007.00582.x>
- Warnakulasuriya, Saman. (2020). Oral potentially malignant disorders: A comprehensive review on clinical aspects and management. *Oral Oncology*, 102. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.104550>
- Xia, J., Chen, N., Hong, Y., Chen, X., Tao, X., Cheng, B. & Huang, Y. (2012). Expressions of CXCL12/CXCR4 in oral premalignant and malignant lesions. *Mediators of Inflammation*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/516395>
- Zlotnik, A. (2006). Chemokines and cancer. In *International Journal of Cancer* (Vol. 119, Issue 9, pp. 2026–2029). <https://doi.org/10.1002/ijc.22024>