



UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO



FACULTAD DE MEDICINA

CARRERA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

“Asociación entre la detección de β -catenina nuclear y la expresión de Wnt3a, Wnt5a, APC, Axina y GSK-3 β en displasia y carcinoma oral de células escamosas”

Seminario de Grado

presentado en conformidad a los requisitos para obtener el Grado Académico de “Licenciado en Tecnología Médica con mención en Morfofisiopatología y Citodiagnóstico”

Francisca Goñi Montenegro

Profesor guía:
T.M Montserrat Reyes Rojas MSc, PhD

Profesor co-guía:
T.M María José Flores

Año 2019

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi profesora guía, Montserrat Reyes, la profe Montse, por haberme ofrecido hacer esta tesis con ella, lo cual me hizo bastante feliz, ya que saber que ella confiaba en mis capacidades me hizo darme cuenta de que soy mejor de lo que creo, y porque además deseaba continuar mi estadía en Santiago, una vez finalizado mi internado. Gracias por guiarme y transmitirme todos sus conocimientos. Quiero agradecer además a todas las que estaban día a día en el SAP-FOUCH; a la señora Abby, por siempre buscar en la base de datos cuando necesitaba algo, además de sus recomendaciones de series. Y especialmente a mi profesora co-guía, María José Flores, la Coté, quien desde el internado siempre estuvo enseñándome y ayudándome con la mejor disposición, y gracias a ella recuperé el cariño hacia el trabajo del Tecnólogo Médico, que por un tiempo lo había perdido. Gracias a su supervisión y buena onda perdí el miedo en el laboratorio y recuperé la confianza en mí, en que soy capaz y buena para trabajar en un laboratorio.

Quiero agradecer enormemente a mi familia, a mi mamá, papá y hermana, quienes desde siempre me han apoyado en todas mis decisiones y nunca me han presionado en terminar mis procesos rápidamente, siempre velando por mi bienestar emocional y físico. También quiero agradecer a mis amigos, tanto los que están en Chile como en el extranjero, a quienes muchos conocí durante este año y medio que estuve viviendo en Santiago, pero que siempre estuvieron ahí, escuchando o leyendo mis preocupaciones, miedos, angustias y alegrías durante la realización de la tesis, apoyándome y aconsejándome.

Por último, se me hace muy importante mencionar los acontecimientos que han sucedido este 2019 durante mi proceso de tesis. La revolución feminista y medioambiental se fortalecieron este año, y en octubre del 2019 comenzamos a vivir tal vez el hito más importante de nuestra historia en los últimos 30 años: el estallido social. Chile ha despertado, Chile exige cambios reales y justicia.

Hasta que la Dignidad se haga costumbre.

RESUMEN

Introducción: La vía de señalización Wnt canónica juega un rol crítico en el desarrollo y en condiciones patológicas. El componente clave de esta vía es la proteína β -catenina, cuya actividad normalmente está regulada por un complejo de destrucción citoplasmático. Al activarse la vía Wnt, β -catenina actúa en el núcleo como un co-factor de la transcripción de genes relacionados con el crecimiento y proliferación celular. La pérdida de la regulación de β -catenina se asocia a diversos tipos de cáncer, incluyendo las lesiones orales potencialmente malignas y el carcinoma oral de células escamosas (COCE). Se ha reportado que la expresión nuclear de β -catenina es mayor en la displasia oral que en el COCE. Sin embargo, la expresión de otros componentes de la vía Wnt en displasia oral y COCE ha sido poco abordada, y poco se sabe sobre la asociación entre la detección de β -catenina nuclear y la expresión de las diferentes proteínas Wnt en patología oral. **Objetivo:** El objetivo de esta tesis fue determinar la asociación que existe entre la detección de β -catenina nuclear y la expresión de Wnt3a, Wnt5a, APC, Axina y GSK-3 β en displasia oral y COCE. **Metodología:** Se llevó a cabo la inmunodetección de β -catenina, Wnt3a, Wnt5a, APC, Axina y GSK-3 β en 60 muestras con las siguientes características: 15 displasias leves, 11 displasias moderadas, 4 displasias severas, 15 COCE bien diferenciados, 13 COCE moderadamente diferenciados y 2 COCE pobremente diferenciados. A través del microscopio óptico se determinó la localización epitelial y subcelular, el porcentaje de células positivas y la intensidad de cada una de las proteínas. Para el análisis estadístico, se utilizó el test ANOVA. **Resultados:** La inmunodetección demostró un aumento en la expresión de β -catenina nuclear a nivel de displasia moderada/severa. El ligando Wnt3a demostró mayor expresión en las displasias de mayor grado, mientras que en Wnt5a no hubo diferencias. La expresión citoplasmática de las proteínas del complejo de destrucción fue más intensa en las displasias de mayor grado, y GSK-3 β se presentó además nuclear en los COCE menos diferenciados. **Conclusiones:** La detección de β -catenina nuclear estaría asociada con la activación de esta vía mediante el ligando Wnt3a. En respuesta a esto, las proteínas del complejo de destrucción estarían intentando regular los niveles de β -catenina nuclear en las displasias orales.

Palabras clave: *Wnt, β -catenina, Wnt3a, Wnt5a, APC, Axina, GSK-3 β , displasia oral, carcinoma oral de células escamosas (COCE).*

ABSTRACT

Background: The canonical Wnt pathway plays a critical role in normal development and diseases. The key player of this pathway is β -catenin, whose activity is normally regulated by a cytoplasmatic destruction complex. When Wnt pathway is activated, β -catenin acts in the nucleus as a transcriptional factor of genes associated with cell growth and proliferation. Deregulation of β -catenin is associated with different types of cancer, including potentially malignant lesions and oral squamous cell carcinoma (OSCC). It has been reported that nuclear expression of β -catenin is increased in dysplasia compared to OSCC. However, the expression of the other components of Wnt pathway in dysplasia and OSCC has been poorly addressed, and the association between the detection of nuclear β -catenin and the expression of the different Wnt proteins in oral carcinogenesis is barely understood. **Objective:** The aim of this study was to determine the association between the detection of nuclear β -catenin and the expression of Wnt3a, Wnt5a, APC, Axin and GSK-3 β in oral dysplasia and OSCC. **Material and methods:** Immunodetection of β -catenin, Wnt3a, Wnt5a, APC, Axin and GSK-3 β was performed on 60 samples, with the following distribution: 15 mild dysplasia, 11 moderate dysplasia, 4 severe dysplasia, 15 well differentiated OSCC, 13 moderately differentiated OSCC and 2 poorly differentiated OSSC. Through microscopy observation, the epithelial and subcellular localization, the percentage of positive cells and the intensity of each protein were determined. For the statistical analysis, the ANOVA test was used. **Results:** Immunodetection showed augmented nuclear β -catenin especially in moderate/severe dysplasia. Wnt3a ligand showed augmented expression in high grade dysplasia, while Wnt5a didn't. The cytoplasmic expression of the destruction complex components was more intense in high grade dysplasia, and GSK-3 β was also nuclear in poorly differentiated OSSC. **Conclusions:** Nuclear β -catenin would be associated with the activation of this pathway by means of Wnt3a ligand. In response to this, the destruction complex proteins would be trying to regulate nuclear β -catenin levels in oral dysplasia.

Keywords: *Wnt, β -catenin, Wnt3a, Wnt5a, APC, Axin, GSK-3 β , oral dysplasia, oral squamous cell carcinoma (OSCC).*

LISTA DE ACRÓNIMOS

- APC: Poliposis adenomatosa coli
- ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
- BSA: Albúmina de suero bovino (*Bovine serum albumin*)
- CIS: Carcinoma *in situ*
- CK1 α : Caseína cinasa 1 α
- COCE: Carcinoma oral de células escamosas
- COX-2: Ciclooxygenasa 2
- DAB: Diaminobencidina
- Dvl: Dishevelled
- FOSL1: Antígeno 1 ligado a Fos
- Fzd: Frizzled
- GPCR: Receptor acoplado a proteínas G (*G protein-coupled receptor*)
- GSK-3 β : Glucógeno sintasa cinasa 3 β
- H-E: Hematoxilina-Eosina
- IHQ: Inmunohistoquímica
- LEF1: Factor estimulador linfoide 1 (*Lymphoid enhancer-binding factor 1*)
- LRP5/6: Proteína relacionada al receptor LDL tipo 5/6 (*Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6*)
- MMP-1: Metaloproteinasa-1
- MMP-7: Metaloproteinasa-7
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- PBS: Buffer fosfato salino (*Phosphate-buffered saline*)
- PCP: Polaridad celular planar
- PPAR δ : Receptor de peroxisoma proliferador activado delta (*Peroxisome proliferator-activated receptor delta*)
- R.T.U: Listo para usar (*Ready to use*)

- SAP-FOUCH: Servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile
- SNP: Polimorfismo de nucleótido único (*Single nucleotide polymorphism*)
- TCF: Factor de células T (*T-cell factor*)
- TNM: (tamaño y extensión del) Tumor, (extensión del cáncer que se ha diseminado a los) Nódulos, Metástasis.
- Tris-EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
- Tris-HCl: Tris hidrocloreuro
- VHS-1: Virus del herpes simple de tipo 1
- VPH: Virus papiloma humano

ÍNDICE

1	CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.1.1	Carcinoma Oral De Células Escamosas	3
1.1.2	Epidemiología del COCE	4
1.1.3	Etiología	4
1.1.4	Características clínicas	5
1.1.5	Características Histológicas.....	5
1.1.6	Diagnóstico y pronóstico	8
1.1.7	Lesiones potencialmente malignas	8
1.1.8	Diagnóstico clínico de las lesiones potencialmente malignas	9
1.1.9	Displasia oral: Diagnóstico histopatológico de las lesiones orales potencialmente malignas	10
1.1.10	Clasificación de las displasias orales.....	11
1.1.11	Valor pronóstico de la displasia oral	13
1.1.12	Vía de señalización Wnt/ β -catenina	14
1.1.13	Ligandos Wnt	14
1.1.14	β -catenina	15
1.1.15	Vía Wnt/ β -catenina inactiva	16
1.1.16	Vía Wnt activa.....	16
1.1.17	Vía Wnt/ β -catenina en la carcinogénesis	18
1.1.18	Alteraciones en la expresión de β -catenina en la carcinogénesis oral.....	19
1.1.19	Alteraciones en la expresión de los ligandos Wnt y su relación con β -catenina 20	
1.1.20	Alteraciones de la expresión de las proteínas del complejo de destrucción de β -catenina y su relación con β -catenina	22
1.2	PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	25
1.2.1	Pregunta de investigación.....	25
1.2.2	Hipótesis	25
1.2.3	Relevancia	26
2	CAPÍTULO 2: OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	27

2.1	OBJETIVO GENERAL.....	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3	CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1	TIPO DE ESTUDIO	28
3.2	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	28
3.2.1	Selección de la muestra	28
3.2.2	Tamaño de la muestra.....	29
3.3	CRITERIOS DE SELECCIÓN	29
3.3.1	Criterios de inclusión.....	29
3.3.2	Criterios de exclusión	30
3.4	VARIABLES DEL ESTUDIO	30
3.5	FUENTES Y MÉTODO DE RECOLECCIÓN DE DATOS	31
3.5.1	Revisión de la base de datos del SAP-FOUCH.....	31
3.5.2	Preselección de los bloques de parafina de displasias y COCE	32
3.5.3	Recopilación de los datos demográficos	32
3.5.4	Procesamiento de las muestras previo a las técnicas histológicas e IHQ.....	32
3.5.5	Tinción con Hematoxilina-Eosina	33
3.5.6	Estandarización de los anticuerpos.....	33
3.5.7	Técnica de IHQ.....	34
3.6	RECOLECCIÓN DE LOS RESULTADOS.....	35
3.6.1	Evaluación de la expresión de los anticuerpos utilizados.....	35
3.6.2	Análisis estadístico	36
4	CAPÍTULO 4: RESULTADOS	37
4.1	CARACTERIZACIÓN CLÍNICO-PATOLÓGICA.....	37
4.1.1	Caracterización clínico-patológica de las muestras diagnosticadas con displasia oral	37
4.1.2	Caracterización clínico-patológica de las muestras diagnosticadas con COCE	38
4.2	HISTOLOGIA DE LAS DISPLASIA Y COCE.	40
4.3	DETERMINAR LA PRESENCIA DE β -CATENINA NUCLEAR EN BIOPSIAS DE DISPLASIA ORAL Y COCE.	40
4.3.1	Determinar la presencia de β -catenina nuclear en biopsias de displasia oral.	42
4.3.2	Determinar la presencia de β -catenina nuclear en biopsias de COCE	42

4.4	DETERMINAR Y COMPARAR LA PRESENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS LIGANDOS WNT3A Y WNT5A EN MUESTRAS DE DISPLASIA ORAL Y COCE.	46
4.4.1	Determinar y comparar la presencia y distribución del ligando Wnt3a en muestras de displasia oral y COCE.....	46
4.4.2	Determinar y comparar la presencia y distribución del ligando Wnt5a en muestras de displasia oral y COCE.....	49
4.5	DETERMINAR Y COMPARAR LA PRESENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL COMPLEJO DE DESTRUCCIÓN DE β -CATENINA APC, AXINA Y GSK-3 β EN MUESTRAS DE DISPLASIA ORAL Y COCE.	53
4.5.1	Determinar y comparar la presencia y distribución de APC en muestras de displasia oral y COCE.....	53
4.5.2	Determinar y comparar la presencia y distribución de Axina en muestras de displasia oral y COCE.....	56
4.5.3	Determinar y comparar la presencia y distribución de GSK-3 β en muestras de displasia oral y COCE.....	60
5	CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN.....	64
6	CAPITULO 6: CONCLUSIONES.....	70
7	CONSIDERACIONES ÉTICAS	71
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
9	APÉNDICES.....	80
	APÉNDICE A: Procesamiento histológico de Hematoxilina-Eosina.....	80
	APÉNDICE B: Técnica de Inmunohistoquímica	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Epitelio de la mucosa oral sana.....	3
Figura 2.	Grados de diferenciación del COCE.....	6
Figura 3.	Características clínicas de las lesiones potencialmente malignas.....	9
Figura 4.	Graduación de la displasia oral.....	11
Figura 5.	Localización membranosa de β -catenina.....	15
Figura 6.	Vía de señalización Wnt β -catenina inactiva (A) y activa (B).....	17
Figura 7.	Localización IHQ de β -catenina.....	20
Figura 8.	Histología de las displasias y COCE.....	41

Figura 9. Expresión IHQ de β -catenina44

Figura 10. Localización nuclear de β -catenina45

Figura 11. Expresión IHQ de Wnt3a.....48

Figura 12. Expresión IHQ de Wnt5a.....52

Figura 13. Expresión IHQ de APC.....55

Figura 14. Expresión IHQ d Axina.....59

Figura 15. Expresión IHQ de GSK-3 β62

Figura 16. Localización nuclear de GSK-3 β63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios usados para el diagnóstico de displasia.....10

Tabla 2. Criterios utilizados para la estandarización de los anticuerpos primarios.....33

Tabla 3. Características de cada anticuerpo ya estandarizado.....34

Tabla 4. Características relevantes de cada anticuerpo primario.....34

Tabla 5. Características clínico-patológicas de las muestras diagnosticadas con displasia leve, moderada o severa.....38

Tabla 6. Características clínico-patológicas de las muestras diagnosticadas con COCE bien, moderado y pobremente diferenciado.....39

Tabla 7. Valoración de la intensidad de β -catenina, ligandos Wnt y proteínas del complejo de destrucción de β -catenina según diagnóstico.....40

Tabla 8. Expresión, porcentaje de células positivas y localización de β -catenina en mucosa oral normal, displasias y COCE.....43

Tabla 9. Expresión, porcentaje de células positivas y localización de Wnt3a en mucosa oral normal, displasias y COCE.....47

Tabla 10. Comparación de la intensidad de Wnt3a entre los diferentes grupos de estudio..49

Tabla 11. Expresión, porcentaje de células positivas y localización de Wnt5a en mucosa oral normal, displasias y COCE.....50

Tabla 12. Comparación de la intensidad de Wnt5a entre los diferentes grupos de estudio...51

Tabla 13. Expresión, porcentaje de células positivas, localización e intensidad de APC en mucosa oral normal, displasias y COCE.....54

Tabla 14. Comparación de la intensidad de APC entre los diferentes grupos de estudio....56

Tabla 15. Expresión, porcentaje de células positivas y localización de Axina en mucosa oral normal, displasias y COCE.....57

Tabla 16. Comparación de la intensidad de Axina entre los diferentes grupos de estudio...58

Tabla 17. Expresión, porcentaje de células positivas y localización de GSK-3 β en mucosa oral normal, displasias y COCE.....61

Tabla 18. Comparación de la intensidad de GSK-3 β entre los diferentes grupos de estudio.....63

1 CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

El cáncer oral es un subtipo de cáncer de cabeza y cuello (1) y se ubica como el sexto cáncer más común a nivel mundial (2,3). Aproximadamente el 90% de los cánceres orales corresponden a carcinoma oral de células escamosas (COCE), los cuales se originan en el epitelio estratificado no queratinizado de la mucosa oral (1). Los cánceres orales tienen una tasa de supervivencia de cinco años, por lo que la prevención y la detección temprana del cáncer o de lesiones potencialmente malignas son esenciales para aumentar la supervivencia y disminuir la incidencia (4).

El COCE normalmente está precedido por lesiones precursoras denominadas lesiones potencialmente malignas. Clínicamente, las lesiones potencialmente malignas más comunes son la leucoplasia y la eritroplasia. Actualmente, el *gold standard* para la valoración de estas lesiones es la evaluación microscópica de secciones teñidas con hematoxilina y eosina (H-E) para la examinación de la presencia de cambios tisulares y citológicos, conocidos como displasia oral (5).

Se ha identificado a la vía de señalización Wnt, específicamente a la vía canónica o vía Wnt/ β -catenina, como una vía clave en la carcinogénesis de varios tumores, incluyendo al COCE (6,7). La vía de señalización Wnt/ β -catenina está involucrada en diversas funciones biológicas, incluyendo la diferenciación, migración y proliferación celular (8). En condiciones normales, β -catenina, es regulada por un complejo de destrucción citoplasmático encargado de fosforilar a β -catenina para su posterior degradación proteasómica. La unión de los ligandos Wnt a los receptores de membrana desencadena la inhibición del complejo de destrucción de β -catenina, lo que ocasiona la estabilización de β -catenina en el citoplasma y su subsecuente translocación al núcleo, permitiendo la expresión de genes blanco de esta vía (9-11).

La vía de señalización Wnt/ β -catenina ha sido identificada como una vía de señalización clave en la carcinogénesis debido a que su activación aberrante es un mecanismo recurrente en varios tipos de cáncer, incluyendo el colorrectal, gástrico, cervical y melanoma

(12). Sin embargo, su relevancia en lesiones potencialmente malignas todavía no está del todo clara (13).

Bajo condiciones fisiológicas, la mucosa de la cavidad oral exhibe tinción membranosa de β -catenina; por el contrario, la pérdida de expresión de β -catenina en la membrana y el incremento en la localización citoplasmática se observan tanto en displasia oral como en COCE (14,15). Estudios anteriores reportaron acumulación nuclear de β -catenina en displasia oral (16,17), y más recientemente se demostró que β -catenina nuclear está presente en el 100% de biopsias diagnosticadas histopatológicamente como displasia moderada y severa, en comparación a la mucosa oral sana y al COCE, sugiriéndose un rol de β -catenina en la progresión de la displasia oral a COCE (18).

Existe evidencia de que los niveles del ligando Wnt3a incrementan en displasia oral en comparación a la mucosa oral sana (17), pero su relación con la expresión nuclear de β -catenina no es completamente conocida. Por otro lado, a pesar de que Wnt5a promueve la migración e invasión celular en COCE (19,20), la expresión y relación con la expresión de β -catenina no es conocida. Respecto a las proteínas del complejo de destrucción, si bien las mutaciones genéticas de APC, Axina y GSK-3 β son frecuentes en otros tipos de cáncer y se han visto asociadas al aumento de β -catenina nuclear, a nivel de COCE son poco frecuentes (21), y la expresión y relación con β -catenina nuclear a nivel de displasia oral no es comprendida.

Por lo tanto, la relación de la expresión y función de β -catenina con la expresión de los ligandos Wnt y las proteínas del complejo de destrucción en la carcinogénesis oral permanece poco comprendida hasta el momento. En esta tesis, se evaluó la expresión de β -catenina y su asociación con la expresión de Wnt3a, Wnt5a, APC, Axina y GSK-3 β en displasia oral y COCE, mediante la técnica de inmunohistoquímica aplicada en biopsias obtenidas del Servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (SAP-FOUCH).

1.1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 Carcinoma Oral de Células Escamosas

El cáncer oral es un subtipo de cáncer de cabeza y cuello. Puede surgir como una lesión primaria originándose en los tejidos que recubren la boca, labios, encías y lengua (1). El cáncer oral es una de las lesiones neoplásicas más comunes de cabeza y cuello (22) y se ubica como el sexto cáncer más común a nivel mundial (2,3).

De los cánceres orales, aproximadamente el 90% son diagnosticados como carcinoma oral de células escamosas (COCE), los cuales se originan en el epitelio estratificado no queratinizado de la mucosa oral (1) (figura 1). Otros corresponden a melanoma, linfoma, sarcomas, carcinomas de glándulas salivales menores y metástasis (23).

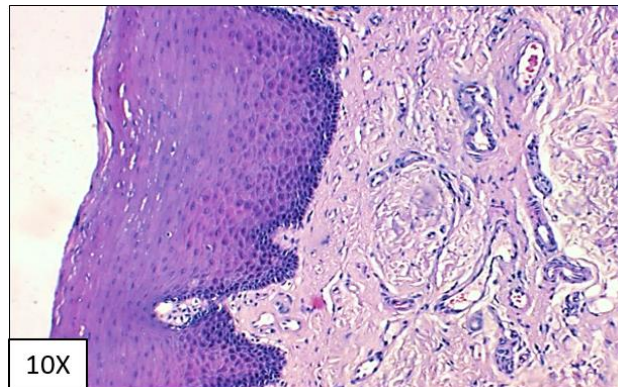


Figura 1. Epitelio de la mucosa oral sana. Tinción H-E, aumento 10x. Adaptada de Reyes et al (18).

El COCE tiene una tasa de sobrevida del 50% a los 5 años. Debido a que la tasa de sobrevida está directamente relacionada con el estado en el que se encuentra el cáncer en el diagnóstico, la prevención y la detección temprana de lesiones potencialmente malignas son esenciales para disminuir la incidencia y aumentar la sobrevida de los pacientes (4).

1.1.2 Epidemiología del COCE

El COCE es el onceavo cáncer más común en el mundo, contabilizando el 3% de todos los cánceres recientemente diagnosticados (1). En sociedades occidentales como Estados Unidos, Europa y Australia, el cáncer oral representa solo entre el 0.6% al 5.0% de todos los cánceres (2), mientras que es extremadamente prevalente en Melanesia y en el centro sur de Asia, y en India representa aproximadamente el 45% de todos los cánceres (2,24). Normalmente se presenta en hombres después de los 45 años, siendo la edad media los 64 años (23), pero se ha visto un aumento en la incidencia en personas menores de 40-45 años. A nivel mundial, el cáncer oral afecta más a los hombres que a las mujeres, con una razón de 2:1. Sin embargo, el cáncer oral en mujeres ha ido aumentando en algunas partes del mundo en el último siglo (3,4,24).

En Chile, el cáncer oral corresponde al 1.6% del total de los casos de cáncer, afectando principalmente a pacientes de sexo masculino sobre los 45 años, con una razón de 2.3:1 en comparación con las mujeres. En el 2002, las muertes a causa del cáncer oral representaron el 1% del total de muertes en Chile, significando un total de 193 muertes. Al igual que en el resto del mundo, el cáncer oral más frecuente en Chile es el COCE (23,25).

1.1.3 Etiología

A nivel mundial, los principales factores de riesgo relacionados al COCE son el uso de alcohol y tabaco, independiente del tipo de bebida alcohólica o de tabaco (26). El riesgo más elevado afecta a fumadores pesados y sin filtro, especialmente después de muchos años de uso. El alcohol puede actuar como promotor, teniendo un efecto sinérgico con el tabaco (27). Además, la nuez de betel juega un rol importante en la carcinogénesis oral en países como India, en donde masticar nuez de betel es un hábito común (2,26). Por otra parte, la infección por virus ha adquirido importancia en la etiología del cáncer oral, entre ellos el virus herpes simple (VHS-1) y los genotipos de alto riesgo del virus papiloma humano (VPH), como el VPH 16 o 18, ambos implicados en aproximadamente el 14% de los casos de cáncer

oral (2,3,23,24). Además, factores dietéticos, factores genéticos y la higiene oral también son reportados como factores de riesgo (2,26).

1.1.4 Características clínicas

El sitio más común para el desarrollo del COCE es la lengua, seguida por el piso de boca (4). El COCE se presenta principalmente como una úlcera de aspecto necrótico con bordes irregulares, elevados y endurecidos en la mucosa superficial. Al progresar la lesión, se puede transformar a en una masa exofítica con una superficie papilar o fungosa, de textura verrugosa, empedrada o relativamente lisa. El dolor no es un indicador confiable en cuanto a si una lesión en particular puede ser maligna, ya que en etapas tempranas el cáncer oral en general es asintomático o con molestias menores. Carcinomas más grandes y avanzados a menudo serán dolorosos, y en casos de infección secundaria o trauma suelen sangrar inmediatamente. Lesiones de mayor tamaño suelen interferir con el habla, masticación y al momento de tragar (3,4).

1.1.5 Características Histológicas

La graduación del COCE normalmente se realiza mediante el sistema TNM, donde T representa el tamaño del tumor, N indica el estado de los nódulos linfáticos regionales, y M indica la presencia o ausencia de metástasis (4). Sin embargo, la graduación en base a este sistema no es del todo adecuada, por lo que la evaluación de otras características también es importante. Se ha demostrado que existe una asociación entre el grado de diferenciación histológica del COCE con la posibilidad de invasión y recurrencia. La diferenciación histológica facilita la realización de un diagnóstico más exacto y permite la selección del abordaje terapéutico adecuado (28).

Histológicamente, la diferenciación escamosa, a menudo vista como queratinización con formación variable de “perlas” y crecimiento invasivo, es la característica previa del COCE. La invasión se manifiesta por la disrupción de la membrana basal y la extensión hacia el tejido conectivo. Los tumores son tradicionalmente graduados en COCE bien, moderadamente, y pobremente diferenciado (29) (figura 2).

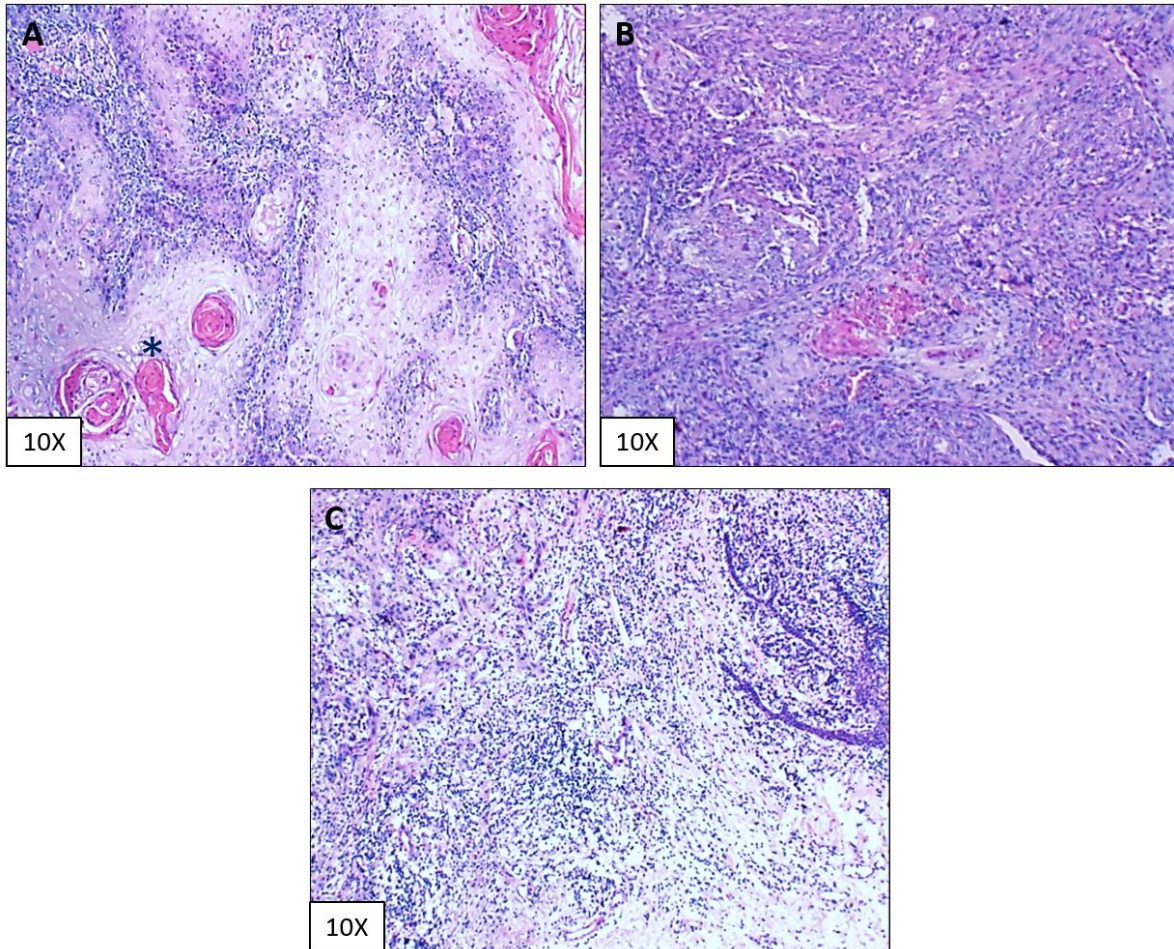


Figura 2. Grados de diferenciación del COCE. COCE bien diferenciado(A). Se puede observar la presencia de perlas córneas de queratina (*). COCE moderadamente diferenciado (B). COCE pobremente diferenciado (C). Tinción H-E, aumento 10x. Adaptada de Reyes et al (18).

1.1.5.1 Carcinoma oral de células escamosas bien diferenciado

El COCE bien diferenciado se asemeja al epitelio normal. Se compone de células escamosas bien diferenciadas, con núcleos de varias formas y tamaños, más grandes que los del epitelio normal, con nucléolos y cromatina heterogénea. Las células están organizadas en islas de varias formas y tamaños, con perlas de queratina en el interior, compuestas por células acidófilas de núcleo picnótico con cariólisis (22,28) (figura 2A).

1.1.5.2 Carcinoma oral de células escamosas moderadamente diferenciado

El COCE moderadamente diferenciado se compone de cordones o islas de células epiteliales atípicas neoplásicas, de aspecto ovalado o redondo. Los núcleos presentan pleomorfismo marcado, en general grandes y deformados, con nucléolos prominentes y mitosis anormales. En general hay menos queratinización que en el COCE bien diferenciado (22,28) (figura 2B).

1.1.5.3 Carcinoma oral de células escamosas pobremente diferenciado

El COCE pobremente diferenciado presenta cordones o islas de células predominantemente inmaduras de aspecto epitelioide de varias formas y tamaños, sin algún parecido a las células del epitelio original. Hay gran cantidad de mitosis normales y atípicas y queratinización mínima del epitelio (22,28) (figura 3C).

1.1.6 Diagnóstico y pronóstico

El diagnóstico temprano del COCE ha surgido como un objetivo prioritario de la salud pública en el mundo en donde los profesionales de la salud oral juegan un papel principal. La examinación visual convencional acompañada de la palpación de lesiones sospechosas sigue siendo la metodología *gold standard* de cribado, mientras que la biopsia y la examinación histopatológica de estas lesiones representan el método de elección universal para la confirmación diagnóstica (30). Normalmente el COCE es diagnosticado tardíamente en etapas avanzadas de la enfermedad debido a que los síntomas tempranos son extremadamente escasos o por el desconocimiento de los síntomas por parte de los pacientes (3,22). La detección tardía del COCE está directamente relacionada con que el pronóstico sea bastante desfavorable, donde la tasa de supervivencia en aproximadamente el 50% de los casos no supera los 5 años, sin diferencias de género (3,26).

En las últimas décadas, la tasa de supervivencia de 5 años no ha mejorado a pesar de los avances en las técnicas diagnósticas y mejoramientos en las modalidades de tratamiento, e incluso la incidencia y prevalencia ha ido aumentando, principalmente en personas más jóvenes (3). Para mejorar el pronóstico del COCE, es de suma importancia la detección temprana de lesiones orales potencialmente malignas que pueden evolucionar a tumores invasivos. La detección en etapas tempranas puede aumentar la tasa de supervivencia a los 5 años del 50% a más del 70% (4,22).

1.1.7 Lesiones potencialmente malignas

El COCE generalmente está precedido por una variedad de alteraciones epiteliales (5). Estas alteraciones, antes denominadas como premalignas o precancerosas, se denominan actualmente como “lesiones potencialmente malignas”. Este término fue recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2005, el cual indica que no todas las lesiones descritas bajo esta denominación necesariamente se transformarían en cáncer, sino

que existe una familia de alteraciones morfológicas entre las cuales algunas podrían tener un mayor potencial de transformación maligna (24,31).

1.1.8 Diagnóstico clínico de las lesiones potencialmente malignas

Los trastornos considerados como lesiones potencialmente malignas son la leucoplasia, eritroplasia, fibrosis submucosa, lesiones palatinas, y, aunque todavía siguen siendo cuestionados, el liquen plano y el lupus eritematoso discoide (32). Dentro de estas lesiones, las más comunes en la cavidad oral son la leucoplasia, caracterizada por su aspecto de parche blanquecino (figura 3A), y la eritroplasia, caracterizada por su aspecto de parche rojo (figura 3B). Sin embargo, también es aparente que el 50% de los COCE surgen a partir de una mucosa clínicamente normal (5). Tanto la leucoplasia como la eritroplasia deben ser utilizadas solo como un término clínico; no tienen una connotación histopatológica específica y en la evaluación del paciente son un diagnóstico clínico de exclusión (4). Se requiere un estudio histopatológico para el diagnóstico definitivo, que puede corresponder a hiperplasia epitelial, hiperqueratosis, displasia epitelial o incluso carcinoma (18).

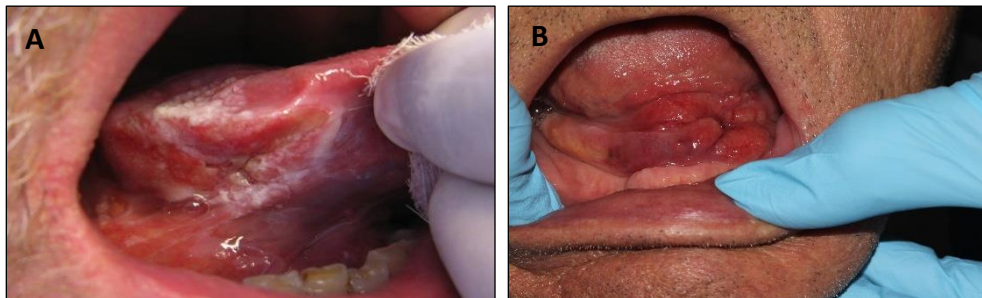


Figura 3. Características clínicas de las lesiones potencialmente malignas. Leucoplasia (A), y eritroplasia en la mucosa oral (B).

1.1.9 Displasia oral: Diagnóstico histopatológico de las lesiones orales potencialmente malignas

Actualmente, el *gold standard* para la valoración de las lesiones orales potencialmente malignas es la evaluación microscópica de secciones teñidas con hematoxilina y eosina (H-E) para la examinación de la presencia de cambios tisulares y citológicos, generalmente conocidos como displasia oral (5). El término displasia es aplicado cuando la alteración estructural del epitelio está acompañada de atipia citológica, expresada en variaciones en el tamaño y forma de los queratinocitos. Los criterios utilizados para el diagnóstico de displasia están resumidos en la tabla 1. Hay evidencia que mientras más severa sea la displasia, mayor es la probabilidad de que progrese a una lesión maligna (33).

Tabla 1. Criterios utilizados para el diagnóstico de displasia

<i>Arquitectura</i>	<i>Citología</i>
Estratificación epitelial irregular	Variaciones anormales en el tamaño nuclear (anisocariosis)
Pérdida de la polaridad de las células basales	Variaciones anormales en la forma nuclear (pleomorfismo nuclear)
Hiperplasia de las células basales	Variaciones anormales en el tamaño celular (anisocitosis)
Crestas interpapilares con forma de gota	Variaciones anormales en la forma celular (pleomorfismo celular)
Número de figuras mitóticas aumentado	Relación núcleo-citoplasma aumentada
Mitosis anormalmente superficiales	Tamaño nuclear aumentado
Queratinización prematura en células individuales (disqueratosis)	Figuras mitóticas atípicas
Perlas de queratina dentro de las crestas interpapilares	Incremento en el número y tamaño de los nucleolos
	Hipercromasia

Adaptada de Warnakulasuriya *et al* (33).

1.1.10 Clasificación de las displasias orales

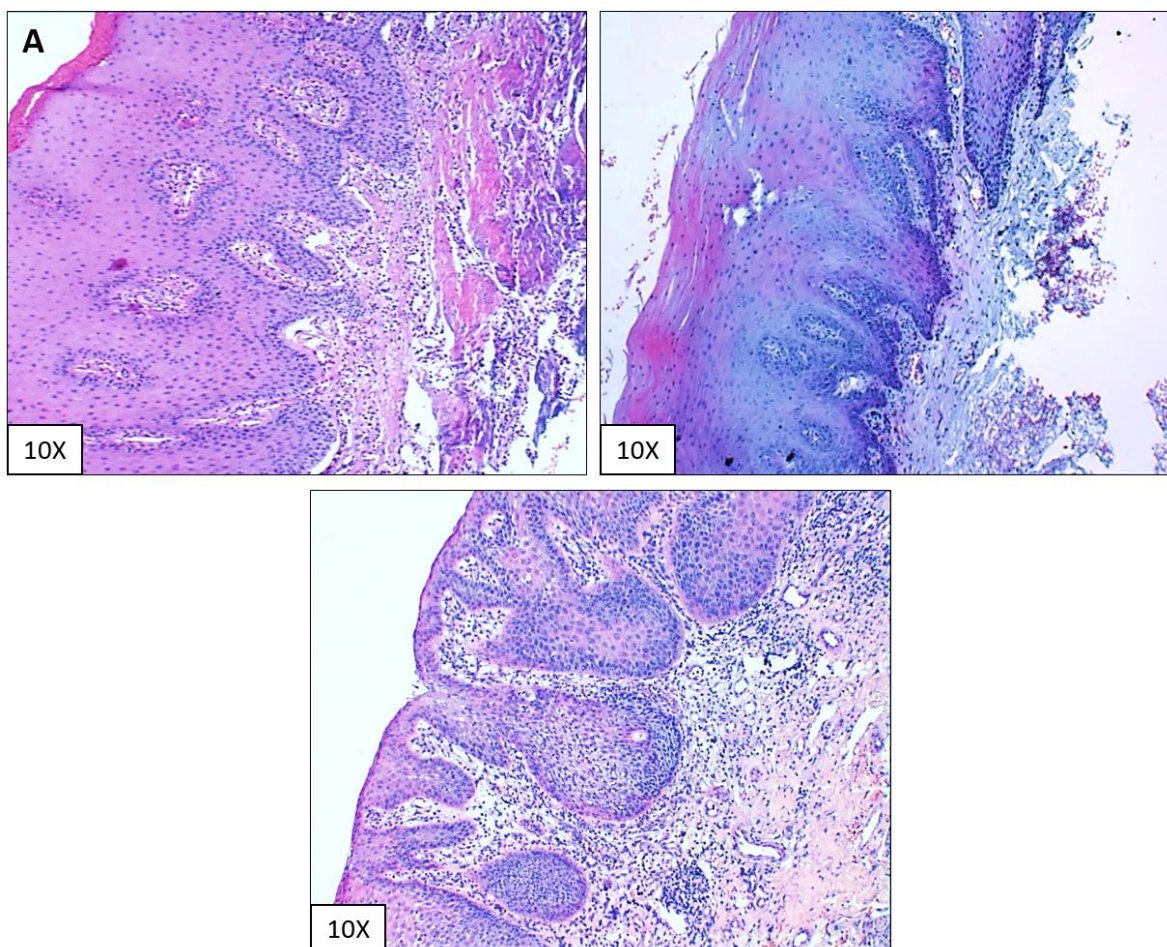


Figura 4. Graduación de la displasia oral. *Displasia leve (A); Displasia moderada (B); Displasia severa (C). Tinción H-E, aumento 10x. Adaptada de Reyes et al (18).*

El diagnóstico y graduación de la displasia oral se basa en la combinación de cambios tisulares y citológicos. Sin embargo, la evaluación de estos cambios suele ser subjetiva y sujeta a considerables variaciones inter e intra observador (5). La clasificación actualmente más aceptada de displasia es la desarrollada por la OMS el 2005 (34), en cuya última actualización realizada el 2017 propone un sistema de graduación más objetivo que divide a la displasia oral en leve, moderada y severa (figura 4) (35).

1.1.10.1 Displasia Leve

La displasia leve se caracteriza por una alteración estructural y celular limitada al tercio inferior del epitelio, expresada en la proliferación o hiperplasia de las células basales y parabasales. La atipia celular generalmente es mínima, solamente se observa pleomorfismo leve de las células o del núcleo. Las mitosis no son prominentes y si están presentes suelen ser normales y a nivel basal. Los cambios a nivel arquitectónico son mínimos (figura 4A) (5,33).

1.1.10.2 Displasia Moderada

La displasia moderada se identifica por la extensión de la alteración estructural al tercio medio del epitelio. Los cambios citológicos son más severos que en la displasia leve y se pueden observar cambios como pleomorfismo celular y nuclear aumentado e hiper cromatismo. Mitosis aumentadas y anormales pueden estar presentes, ubicadas normalmente en las capas basales. A pesar de que se pueden observar cambios estructurales en la mitad inferior del epitelio, la estratificación y maduración son relativamente normales, a veces suele presentarse con hiperqueratosis (figura 4B) (5,33).

1.1.10.3 Displasia Severa

La displasia severa presenta alteraciones estructurales en más de dos tercios del epitelio, con atipia citológica asociada. Hay una proliferación anormal de la capa basal hacia el tercio superior del epitelio, y los cambios citológicos y estructurales pueden ser bastante prominentes. Se pueden observar todos los cambios presentes en los grados anteriores de displasia, sumándose un marcado pleomorfismo celular y nuclear, con núcleos anormalmente largos y nucléolos prominentes o incluso múltiples. Hay mitosis anormales prominentes y suprabasales. A menudo hay pérdida completa de la estratificación del epitelio y queratinización anormal profunda, e incluso formación de perlas córneas. Otras

características que podrían ser importantes en el diagnóstico de displasia severa es la presencia de crestas interpapilares anormales, acantosis, y en algunos casos presencia de atrofia epitelial marcada (figura 4C) (5,33).

1.1.11 Valor pronóstico de la displasia oral

Debido a que la gran mayoría de las veces los COCE se anteceden de displasia oral, hace que estas sean el predictor más fuerte de transformación maligna. Sin embargo, el diagnóstico histopatológico de displasia oral suele ser bastante complejo y subjetivo (5). La acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas toma lugar durante la transformación maligna. El valor pronóstico de los cambios genéticos tempranos no es totalmente conocido, pero se han detectado mutaciones en epitelios displásicos, sugiriéndose una relación entre las mutaciones en las lesiones potencialmente malignas y en los tumores (33). Al respecto, numerosos marcadores moleculares han sido identificados como factores predictivos que ayudarían a realizar un diagnóstico más objetivo de la displasia oral, tales como la expresión aberrante de p16, inestabilidad cromosómica, pérdida de la heterocigosidad y TP53 mutado. Sin embargo, hasta la fecha no existe un conjunto de marcadores que de forma fiable pueda ser utilizado para detectar las lesiones con displasia oral (32). A lo anterior se suma que las alteraciones moleculares y los mecanismos biológicos que conducen la progresión de estas lesiones hacia el cáncer tampoco son totalmente comprendidos (18).

En relación a lo anterior, se han estudiado diversas moléculas de señalización que se encuentran implicadas en la carcinogénesis oral. Se ha identificado a la vía de señalización Wnt, específicamente a la vía canónica o vía Wnt/ β -catenina, como una de las vías claves en la carcinogénesis de varios tumores, incluyendo al COCE (6,7). A nivel de patología oral, existen estudios que han evidenciado una relación entre la vía Wnt/ β -catenina y la progresión de la displasia oral a COCE (18,17).

1.1.12 Vía de señalización Wnt/ β -catenina

La vía de señalización Wnt representa una de las tantas vías claves que regulan el destino de las células en los animales a lo largo de la vida (11), teniendo un papel importante en la diferenciación, proliferación, muerte y función de varios tipos celulares, y en procesos críticos de desarrollo, crecimiento y homeostasis (8). Generalmente es dividida en tres subtipos de vías: la vía canónica, la vía no canónica de polaridad celular planar (PCP) y la vía no canónica Wnt/Calcio (36). La más estudiada y revisada es la vía Wnt canónica, también conocida como vía Wnt/ β -catenina, la cual funciona regulando la cantidad de la proteína β -catenina, un cofactor transcripcional que controla la expresión de genes blancos responsables del control de diversas decisiones en relación al destino de células y tejidos (8,37).

1.1.13 Ligandos Wnt

Los ligandos Wnt son una familia de glucoproteínas de secreción lípido-modificadas cuyo genoma se encuentra bien conservado en el reino animal, catalogándose 19 genes Wnt en los mamíferos. Estas proteínas están involucradas en los eventos de señalización paracrinos y autocrinos, actuando como ligandos que estimulan vías de transducción de señales mediante receptores en organismos tanto vertebrados como invertebrados (9,38).

Los ligandos Wnt han sido separados en tres grupos: i) Wnt canónicos o dependientes de β -catenina (ej. Wnt2, Wnt2b, Wnt3, Wnt3a, Wnt8), ii) Wnt independientes de β -catenina, y iii) Wnts no canónicos (ej. Wnt5a, Wnt11, Wnt7a). Algunos Wnt, sin embargo, no encajan en esta clasificación, ya que activan tanto la vía canónica como las no canónicas (ej. Wnt11) (38).

Los ligandos Wnt se unen a una gran variedad de receptores para ejercer su función. Dentro de estos receptores se encuentran las proteínas Frizzled (Fzd), pertenecientes a una subfamilia muy específica del receptor acoplado a proteínas G (GPCR), y los co-receptores proteína relacionada al receptor LDL (LRP), LRP5 y LRP6 (38,39). El receptor Frizzled con

los co-receptores LRP5/6 forman un complejo receptor heterodimérico al cual se unirán los ligandos Wnt al interactuar con las células diana (40).

1.1.14 β -catenina

La proteína β -catenina pertenece a un grupo de proteínas formado por α -, β - y γ -catenina (*catena* es la palabra del latín para cadena), encargadas de ligar a las cadherinas a los filamentos del citoesqueleto (41).

La proteína β -catenina tiene múltiples funciones dependientes de su localización celular. Normalmente, se localiza en el lado citoplasmático como un componente de las uniones célula-célula a base de E-cadherina, cumpliendo su principal función en la mantención de la adhesión celular, contribuyendo a la preservación de la estructura normal de los epitelios (figura 5) (11,14). Por otro lado, cuando la vía Wnt canónica se encuentra activa, β -catenina actúa en el núcleo como un co-factor transcripcional de genes diana de la vía Wnt (14,38). β -catenina es la proteína de mayor importancia en la vía Wnt canónica, siendo el factor clave que transduce eventos proximales de la membrana plasmática al compartimiento nuclear (38).

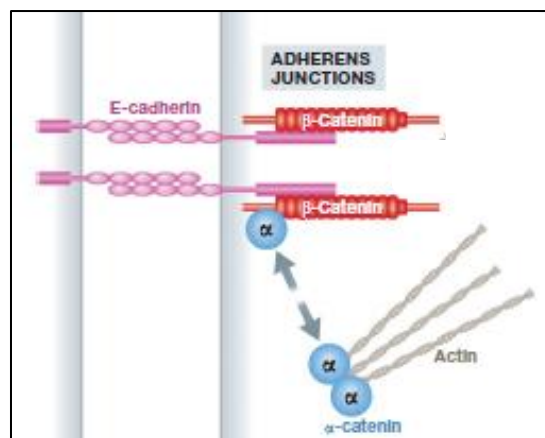


Figura 5. Localización membranosa de β -catenina. A nivel de la membrana plasmática, β -catenina (rojo) forma uniones con E-cadherina (rosado). Adaptada de Valenta et al (11).

1.1.15 Vía Wnt/ β -catenina inactiva

Cuando la vía de Wnt/ β -catenina está inactiva, β -catenina se encuentra junto a E-cadherina formando parte de las uniones intracelulares. β -catenina no unida a E-cadherina se encuentra en bajos niveles en el citoplasma, siendo continuamente fosforilada por un complejo de degradación multiproteico encargado de su degradación. Este complejo de degradación está formado principalmente por la proteína de agregación Axina, la proteína supresora de tumores poliposis adenomatosa coli (APC), y las quinasas caseína quinasa 1 α (CK1 α) y glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK-3 β) (40).

La proteína Axina se encarga de mantener al complejo de degradación al servir como un sitio de anclaje para β -catenina y las otras proteínas del complejo mediante diferentes dominios. La proteína APC también participa en la mantención del complejo e incrementa la afinidad de este hacia β -catenina. El andamiaje formado por Axina y APC facilita la interacción de las quinasas CK1 α y GSK-3 β con β -catenina, ambas encargadas de fosforilar a β -catenina en sus residuos amino terminal (9,11): CK1 α fosforila a β -catenina a nivel de los residuos serina 45, y luego los residuos treonina 41, serina 37 y serina 33 son fosforilados por GSK-3 β . La fosforilación de β -catenina en las serinas 33 y 37 crea un sitio de unión para la E3 ubiquitina ligasa β -Trecp, conduciendo a la ubiquitinación y degradación de β -catenina (figura 6A) (37).

1.1.16 Vía Wnt/ β -catenina activa

La vía Wnt canónica activa está definida por los siguientes eventos: 1) unión de los ligandos Wnt a los receptores en la membrana plasmática; 2) activación de la maquinaria intracelular que bloquea la degradación de β -catenina, conduciendo a su acumulación citoplasmática y translocación nuclear; y 3) acumulación nuclear de β -catenina, lo que, a su vez, conduce a cambios en la tasa de transcripción de los genes diana (38).

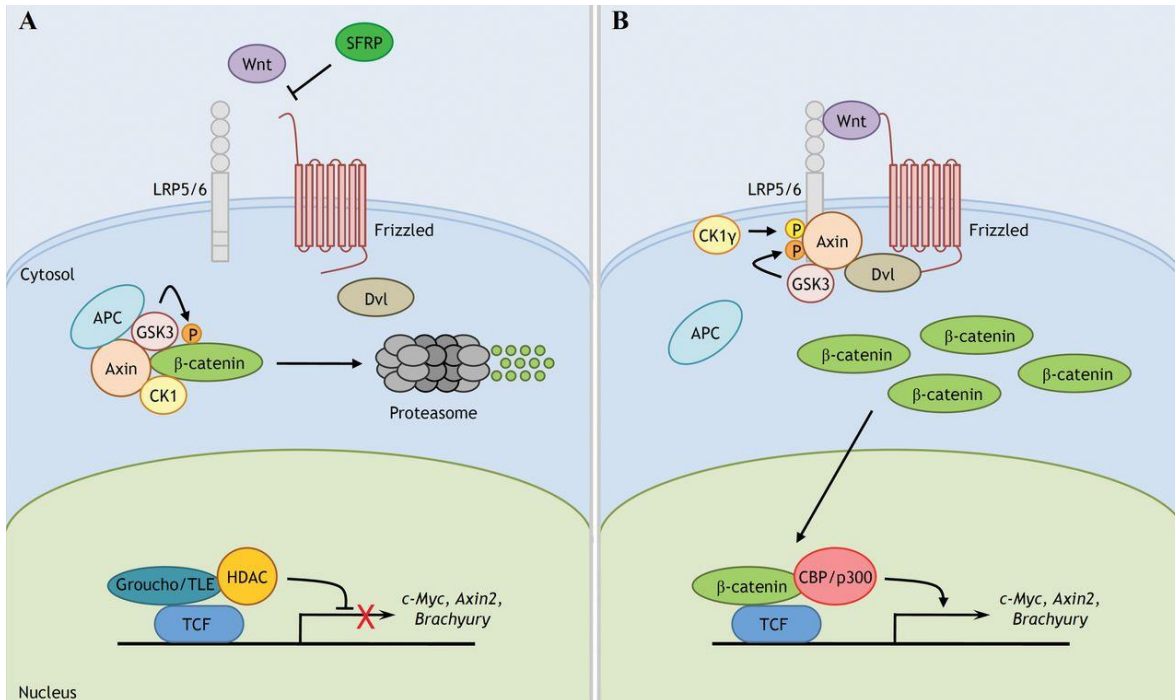


Figura 6. Vía de señalización Wnt β-catenina inactiva (A) y activa (B). En ausencia de ligandos Wnt, β-catenina citoplasmática es continuamente fosforilada por el complejo de destrucción de β-catenina para su posterior degradación proteasomal. En el núcleo, TCF/LEF1 está asociado al represor transcripcional Groucho (A). Después de la unión del ligando Wnt a los receptores, parte del complejo de destrucción es secuestrado en la membrana. Esto provoca la acumulación citoplasmática de β-catenina, la cual entra al núcleo, desplaza al represor Groucho e interacciona con TCF/LEF1, activándose la transcripción de genes diana (B). Adaptada de Kim et al (42).

1.1.16.1 Unión de los ligandos Wnt a los receptores de membrana y acumulación citoplasmática de β-catenina

Para que la vía Wnt/β-catenina inicie la señalización intracelular, es necesario que ocurra en primer lugar la secreción y posterior unión de los ligandos Wnt a los receptores de superficie celulares Fzd y LRP5/6 (36). La activación del receptor Fzd recluta a la proteína de andamio citoplasmática Dishevelled (Dvl) al complejo Wnt-Fzd-LRP5/6. La proteína Dvl recluta a Axina junto con las quinasas CK1α y GSK-3β hacia la membrana plasmática. De esta forma, CK1α y GSK-3β fosforilan la cola citoplasmática del co-receptor LRP5/6, evento

que bloquea la actividad de GSK-3 β (11,37,43). Como consecuencia, GSK-3 β ya no puede fosforilar a β -catenina, por lo que esta ya no es ubiquitinizada ni degradada, lo que permite su acumulación citoplasmática y posterior translocación al núcleo (figura 6B) (43,44).

1.1.16.2 *Translocación de β -catenina al núcleo y su acción como co-factor transcripcional*

Una vez translocada al núcleo, β -catenina forma un complejo con los factores de transcripción de unión al ADN de la familia TCF/LEF1 (factor de células T/factor estimulador linfóide 1). En ausencia de señales Wnt, los factores TCF/LEF1 actúan como represores transcripcionales al formar un complejo con la proteína co-receptora Groucho. β -catenina nuclear convierte al complejo represor TCF/LEF1 en un complejo activador de la transcripción al desplazar a la proteína Groucho. Además, recluta una serie de activadores y co-activadores, induciéndose la transcripción de genes diana de la vía Wnt (figura 6B). Entre los genes activados se encuentran *c-Myc*, *c-Jun*, *CCND1*, *PPARD*, *FOSL1* y *COX-2*, *Survivina*, *Ciclina D1*, *UTERIN*, relacionados con el crecimiento y proliferación celular (figura 6B) (9,10).

1.1.17 **Vía Wnt/ β -catenina en la carcinogénesis**

Dados los múltiples y críticos roles de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en el desarrollo y la homeostasis, no es de extrañarse que mutaciones en sus componentes estén asociadas a diversas patologías (37). La vía Wnt/ β -catenina ha sido identificada como una vía de señalización clave en la carcinogénesis y ha ganado interés en la investigación de tumores malignos (8). Se ha demostrado que alteraciones que promueven la activación aberrante de la vía de señalización Wnt, ya sea por ganancia o pérdida de función de sus componentes, conducen al cáncer colorrectal, gástrico, cervical y melanoma, entre otros (18). Estas alteraciones se traducen en la translocación de β -catenina al núcleo y en la modificación

en la expresión de genes relacionados con la proliferación e invasión, como c-Myc y ciclina D1, c-jun, MMP-1 y MMP-7 (9,10,15).

La vía Wnt es crítica para la formación de las estructuras craneofaciales como los dientes, papilas gustativas, labios y paladar. Sin embargo, se sabe poco sobre el rol que juega en la patogénesis oral benigna y maligna. En general, tanto β -catenina como los otros componentes de la vía han sido principalmente estudiados durante el desarrollo embrionario y solo recientemente en el COCE (6,41). La relevancia de esta vía a nivel de displasia oral todavía no es completamente comprendida (13).

1.1.18 Alteraciones en la expresión de β -catenina en la carcinogénesis oral

La pérdida de la expresión de β -catenina membranosa es un mecanismo oncogénico temprano en la carcinogénesis de varios cánceres epiteliales (14), como en el esófago de Barret (45), en adenocarcinomas de colon (46), en cáncer de laringe (47), y también en la carcinogénesis oral (7,9,13-15,17,18,41,48,49). La pérdida de la expresión membranosa de β -catenina se ha visto asociada con el aumento de su expresión citoplasmática/nuclear en las lesiones orales malignas (9,14,15).

Estudios previos han investigado la relación entre la displasia oral y los patrones de expresión de β -catenina (16-18,49). Los primeros estudios reportaron acumulación citoplasmática y nuclear de β -catenina sin mutaciones genéticas como un evento temprano de la carcinogénesis oral en células de rata (16). Posteriormente, estudios realizados en mucosa oral humana (17,18,49) definieron los patrones de expresión de β -catenina en la carcinogénesis oral. En la mucosa oral sana, β -catenina solo se encuentra presente a nivel de membrana (figura 7A); en displasia y COCE, β -catenina membranosa se va perdiendo y acumulando en el citoplasma, con ganancia de β -catenina nuclear de forma variable (17,18).

Se ha observado que la expresión β -catenina nuclear se encuentra en el 100% de las displasias moderadas y severas (figura 7C y D), mientras que en los COCEs es menor (figura 7E y F) (17,18). La presencia de β -catenina nuclear en lesiones con displasia de mayor

severidad sugiere que β -catenina está involucrada en la transformación maligna, por lo que se presenta como un potencial marcador para las lesiones displásicas de la cavidad oral (18).

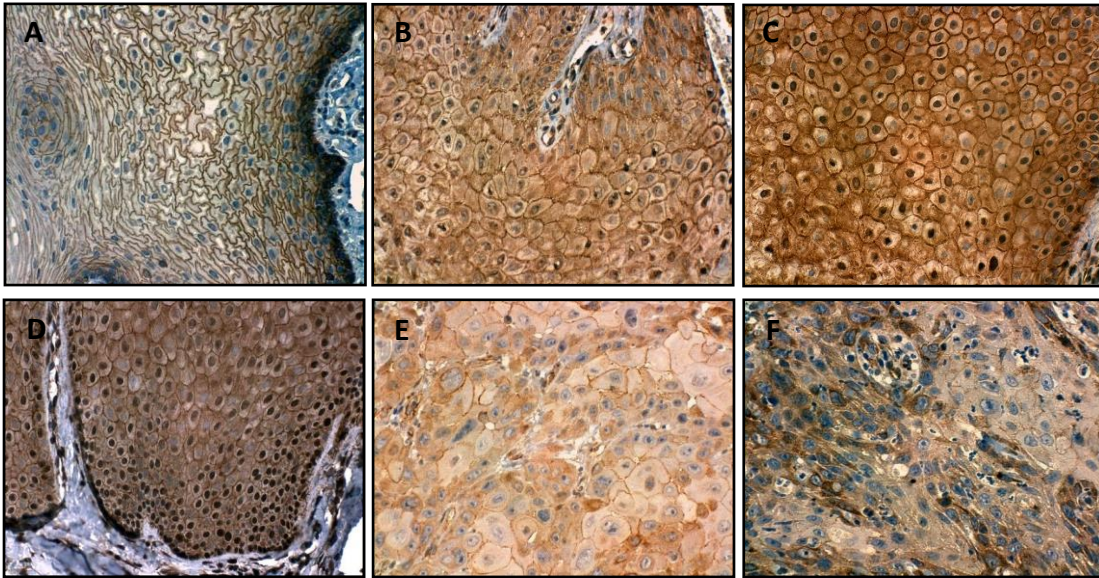


Figura 7. Localización IHQ de β -catenina. En la mucosa oral normal solo se observa expresión membranosa (A). En displasia leve, la proteína se localiza principalmente en la membrana y citoplasma (B). En displasia moderada, la expresión nuclear de β -catenina es mucho mayor (C), y en displasia severa la proteína se expresa intensamente nuclear en las capas inferiores del epitelio (D). En el COCE moderadamente diferenciado, la expresión de la proteína membranosa se pierde (E), y en el COCE pobremente diferenciado no se observa expresión nuclear de β -catenina (F). Adaptada de Reyes et al (18).

1.1.19 Alteraciones en la expresión de los ligandos Wnt y su relación con β -catenina

Una de las causas conocidas de la estabilización de β -catenina en el citoplasma es la activación de la vía Wnt canónica por interacción de los ligandos Wnt con sus receptores de membrana. Si bien se ha reportado que esta activación toma lugar en etapas tempranas de la carcinogénesis oral (14), la evidencia que aborda el rol de los ligandos Wnt en la displasia oral es menor (13,17,19), a diferencia del COCE, en donde la vía Wnt ha sido más estudiada (8,17,19,20,50).

1.1.19.1 *Alteración del ligando Wnt3a*

El ligando Wnt3a es un miembro típico de la familia Wnt ampliamente estudiado que activa la vía de señalización Wnt canónica. Su gen ha sido previamente sugerido como un gen que podría aumentar la susceptibilidad de desarrollar COCE, y se ha observado que la expresión de su ARNm aumenta en COCE (51).

Según la evidencia, la expresión del ligando Wnt3a no se encuentra presente en el epitelio oral sano (6,17,52). A nivel de COCE, se ha observado que hay un aumento considerable de los niveles de Wnt3a predominantemente en el frente invasivo, en casos en los que además hubo expresión membranosa y nuclear difusa de β -catenina (6,52). A nivel de displasia oral, un estudio indicó que la secreción del ligando Wnt3a está relacionada con la carcinogénesis oral temprana, cuya expresión se evidenció membranosa y citoplasmática en muestras de displasia oral con expresión nuclear de β -catenina (17). Esto último podría sugerir que existe una correlación positiva entre la expresión nuclear de β -catenina y Wnt3a en la carcinogénesis oral.

1.1.19.2 *Alteración del ligando Wnt5a*

El ligando Wnt5a pertenece a la familia de ligandos Wnt no canónicos que activa principalmente la vía no canónica Wnt/Ca²⁺ y la vía Wnt/PCP. Sin embargo, se ha visto que puede tanto inhibir como activar la vía Wnt/ β -catenina (19).

A nivel de la carcinogénesis oral, hay evidencia que indica que un aumento de Wnt5a en tejidos tumorales promovería la migración e invasión celular en el COCE (19,20). Un estudio reportó que la expresión citoplasmática de Wnt5a no estuvo en las células normales ni en las displasias orales de menor grado, pero sí en los casos de displasia de mayor grado y aún más en los COCE, por lo que Wnt5a podría ser un indicador de la transformación maligna de displasia a COCE. Además, se investigó el efecto que podría tener Wnt5a en β -catenina, pero no se encontró una correlación entre la expresión de Wnt5a y β -catenina (19).

1.1.20 Alteraciones de la expresión de las proteínas del complejo de destrucción de β -catenina y su relación con β -catenina

1.1.20.1 Alteración en la expresión de APC

La proteína APC se localiza normalmente en el citoplasma y en cúmulos cercanos a los extremos de los microtúbulos. Mediante señales de localización y exportación, APC se transloca desde el citoplasma al núcleo, en donde parece regular la cantidad de β -catenina (53).

Mutaciones o pérdida de la heterocigosidad del gen que codifica a la proteína APC han sido encontradas principalmente en el cáncer de colon y también en el cáncer gástrico, esofágico, pancreático y de pulmón (54-58). La mutación del gen APC provoca que β -catenina se acumule en el citoplasma y no se degrade, al no poder unirse con β -catenina (53). Algunos estudios han reportado porcentajes variables de pérdida de la heterocigosidad y mutaciones del gen APC que podrían llevar a alteraciones en la función de APC en COCE (7,59,60). Sin embargo, la frecuencia de las mutaciones en APC es baja y no se relacionarían con cambios en la expresión y localización de la proteína APC (53).

En relación a lo anterior, en un estudio se vio que la localización de APC era principalmente citoplasmática en el proceso de transformación maligna, y que tendía a cambiar de localización principalmente al núcleo en células cancerígenas, indicando que cambios en los niveles de expresión y la localización intracelular de APC son factores importantes en la carcinogénesis oral y en la diferenciación, proliferación e invasión del COCE (53). En un estudio posterior, se evidenció que la expresión citoplasmática y nuclear de APC aumentaba significativamente desde displasia leve a COCE, y además se observó una relación positiva entre APC y la expresión citoplasmática y/o nuclear de β -catenina (48).

1.1.20.2 *Alteración en la expresión de Axina*

Axina actúa como un gen onco-supresor en la vía de señalización Wnt, al igual que APC, al actuar como la proteína de andamio del complejo de destrucción de β -catenina (61). Se sabe que el gen AXINA1 se encuentra mutado en algunos carcinomas como el hepatocelular y el de colon, produciéndose una pérdida de la funcionalidad de la proteína Axina que conduce a la estabilización nuclear de β -catenina (44,62,63). Al igual que el gen APC, la mayoría de los autores no han encontrado mutaciones genéticas en líneas celulares o en muestras clínicas de COCE (14,21). Hasta la fecha, solo un estudio ha reportado una mutación funcional genética a nivel de COCE, tratándose de un polimorfismo del gen que podría producir una forma truncada de la proteína Axina, lo que impediría su unión a β -catenina y por ende esta última no podría ser fosforilada por GSK-3 β (7).

Hay pocos estudios en relación a la expresión de Axina en la carcinogénesis oral. En un estudio se detectó expresión nuclear heterogénea de Axina en la mayoría de los casos de COCE y en prácticamente todos de los casos de mucosa sana (21). La axina nuclear, al igual que APC, ha sido reportada como mediadora en la exportación de β -catenina del núcleo en varias células, lo que podría explicar su presencia nuclear (11). En un estudio posterior, se evidenció que la expresión del ARNm del gen AXINA1 en COCE era considerablemente mayor que en la mucosa oral sana, y que además habría una correlación positiva con la expresión de WNT3A y GSK3- β (51).

1.1.20.3 *Alteración en la expresión de GSK-3 β*

GSK-3 β es un regulador negativo de la vía Wnt/ β -catenina. Desencadena la degradación e inactivación de varios factores de transcripción oncogénicos y de oncoproteínas como β -catenina al fosforilarlos, por lo que se cree que GSK-3 β reprime la transformación maligna y el desarrollo tumoral (8). La inactivación de GSK-3 β ha sido reportada en varios cánceres (64), incluyendo el COCE (65). Esta inactivación tendría un rol

central en la progresión del cáncer oral, ya que se imposibilitaría la fosforilación de β -catenina y esta podría actuar como un factor de la transcripción de oncogenes (65).

En un estudio realizado el 2003, se detectó que la expresión de GSK-3 β se encontraba presente de manera heterogénea tanto en células de COCE y normales, ya sea solamente en la membrana, citoplasma o núcleo o en el citoplasma y núcleo a la vez. Se concluyó que los patrones de expresión de GSK-3 β no tendrían relación con alteraciones a nivel genético y que la expresión aberrante de GSK-3 β no tendría un rol importante en la carcinogénesis oral (21). Sin embargo, en un estudio posterior se observó que existía una asociación significativa entre una mutación del gen GSK3 β , un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) intrónico, con el COCE, y que podría estar asociado al aumento observado en la expresión citoplasmática de GSK-3 β (51). Se ha propuesto que la manipulación de GSK-3 β activado podría proporcionar esperanza en el tratamiento del cáncer oral (65).

1.1.21 Mutaciones genéticas y el COCE

Las mutaciones del gen CTNNB1 que codifica para la proteína β -catenina o de los genes que codifican a las proteínas del complejo de destrucción de β -catenina en el citoplasma pueden producir la acumulación citoplasmática y posterior translocación nuclear de β -catenina (14). Estudios previos han demostrado que alteraciones de los genes como APC, AXINA1 y GSK3- β podrían afectar en la degradación de β -catenina en varios tipos de cánceres humanos, incluyendo el cáncer de colon, gástrico y hepático (54-56,62,64). Sin embargo, las mutaciones de estos genes son raras en el COCE, lo que sugiere no se asociarían con la acumulación aberrante de β -catenina en el cáncer oral (21).

En resumen, si bien la localización de β -catenina tanto en displasia oral como en COCE ya ha sido reportada, la expresión de otros componentes de la vía Wnt en biopsias de pacientes con distintos grados de displasia oral y COCE a través de IHQ ha sido poco abordada en la literatura y no existen reportes que estudien la asociación entre la detección de β -catenina nuclear y la expresión de diferentes proteínas Wnt tanto en displasia como en

COCE. Por lo tanto, este proyecto podría ser importante para la comprensión de cómo los componentes de la vía Wnt/ β -catenina podrían participar en la translocación y función nuclear de β -catenina, contribuyendo así a la progresión tumoral de la carcinogénesis oral.

1.2 PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.2.1 Pregunta de investigación

¿Existe asociación entre la detección de β -catenina nuclear y la expresión de Wnt3a, Wnt5a, APC, Axina y GSK-3 β en displasia y carcinoma oral de células escamosas?

1.2.2 Hipótesis

Por lo anteriormente señalado, la hipótesis de este trabajo es:

“La detección de β -catenina nuclear se asocia a una alteración de la expresión de los ligandos Wnt3a y Wnt5a, y a una desregulación de la expresión de componentes del complejo de destrucción como APC, Axina y GSK-3 β en displasia y carcinoma oral de células escamosas”.

1.2.3 Relevancia

Este proyecto es relevante para una mayor comprensión de cómo los componentes de la vía Wnt/ β -catenina se relacionan con la translocación nuclear de β -catenina y su función, contribuyendo así a la progresión tumoral de la carcinogénesis oral. Las asociaciones establecidas entre los componentes podrían ayudar a facilitar el diagnóstico y tratamiento de la displasia oral y COCE al servir como blancos terapéuticos.

2 CAPÍTULO 2: OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la asociación que existe entre la detección de β -catenina nuclear y la expresión de Wnt3a, Wnt5a, APC, Axina y GSK-3 β en displasia y carcinoma oral de células escamosas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la presencia de β -catenina nuclear en biopsias de displasia oral y COCE.
2. Determinar y comparar la presencia y distribución de los ligandos Wnt3a y Wnt5a en muestras de displasia oral y COCE.
3. Determinar y comparar la presencia y distribución de las proteínas del complejo de destrucción de β -catenina: APC, Axina y GSK-3 β en muestras de displasia oral y COCE.

3 CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDIO

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

Fue de tipo observacional, porque no existió ninguna intervención en las muestras utilizadas, las que ya habían sido anteriormente obtenidas y procesadas, limitándose solamente a observar y analizar la expresión de las proteínas obtenidas mediante la técnica de inmunohistoquímica.

Fue de tipo analítico, ya que mediante la tabulación de los datos y estadística se buscó establecer la asociación entre los patrones de expresión de los ligandos Wnt y de las proteínas del complejo de destrucción con la expresión de β -catenina.

Fue de corte transversal, debido a que la medición de la expresión de las proteínas se realizó en un momento determinado de la evolución de la enfermedad, ya sea displasia leve, moderada o severa, o COCE bien, moderado o pobremente diferenciado, sin continuar con la evolución de la enfermedad de cada paciente en particular.

3.2 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

3.2.1 Selección de la muestra

A través de la base de datos del Servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (SAP-FOUCH), se seleccionaron los casos de aquellos pacientes que tuvieran el diagnóstico histopatológico entre los años 2000-2018 de

displasia epitelial leve, moderada y severa, y de COCE bien, moderado y pobremente diferenciado. Posteriormente, se seleccionaron de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión.

3.2.2 Tamaño de la muestra

Para el estudio se seleccionaron un total de 60 casos, de las cuales 30 tenían el diagnóstico histopatológico de displasia epitelial, y 30 el diagnóstico histopatológico de COCE. Cada grupo se dividió de la siguiente manera:

- 15 casos de displasias leves.
- 15 casos displasias moderadas (11 en total) y severas (4 en total).
- 15 casos de COCE bien diferenciados
- 15 casos de COCE moderado (13 en total) y pobremente diferenciados (2 en total).

3.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN

3.3.1 Criterios de inclusión

Fueron considerados en el presente estudio todos aquellos casos en que:

- Las biopsias cuyo diagnóstico histopatológico entre los años 2000-2018 fue el de displasia oral leve, moderada o severa.
- Las biopsias cuyo diagnóstico histopatológico entre los años 2000-2018 fue el de COCE pobre, moderadamente y bien diferenciado.
- Las biopsias con los diagnósticos anteriormente mencionados que contaran con los bloques de parafina en el registro.
- La calidad y cantidad suficiente de material fijado e incluido en bloques de parafina que permitieran hacer los análisis IHQ.

3.3.2 Criterios de exclusión

No se consideraron en este estudio aquellos casos en que:

- Las muestras tuvieran artefactos de técnica quirúrgica y/o procesamiento histológico.
- Las muestras fueran recidivas de la lesión inicial.

3.4 VARIABLES DEL ESTUDIO

- **Presencia o ausencia de Inmunotinción:** Variable categórica nominal utilizada para informar la tinción IHQ de β -catenina, Wnt3a, Wnt5a, APC, Axina y GSK-3 β , evaluada por un profesional a través de observación microscópica. Entrega dos valores de inmunotinción: a la ausencia de inmunotinción se le asigna el valor 0; a la presencia de inmunotinción, el valor 1.
- **Porcentaje de células positivas:** Variable de intervalo que se utiliza para informar el resultado de la cantidad en porcentajes de células que son positivas a la expresión IHQ de β -catenina, Wnt3a, Wnt5a, APC, Axina y GSK-3 β , evaluada por un profesional a través de la observación microscópica. Entrega 4 valores: si el porcentaje es de 1-25%, se le asigna el valor 1; si es de 25-50%, se le asigna el valor 2; si es de 50-75%, se le asigna el valor 3; y si el porcentaje es de 75-100%, se le asigna el valor 4.
- **Distribución epitelial del antígeno:** Variable nominal utilizada para informar el resultado de la distribución de tinción IHQ de β -catenina, Wnt3a, Wnt5a, APC, Axina y GSK-3 β , en las distintas localizaciones epiteliales del tejido, evaluada por un profesional a través de observación microscópica. Entrega 3 valores de distribución epitelial: si la distribución del anticuerpo se localiza solamente en el estrato basal del epitelio, se le asigna el valor 1; si la distribución del anticuerpo se localiza en los estratos inferiores, el valor 2; y si la distribución del anticuerpo se localiza en todos los estratos, se le asigna el valor 3.

- **Distribución subcelular del antígeno:** Variable nominal utilizada para informar el resultado de la distribución de tinción IHQ de β -catenina, Wnt3a, Wnt5a, APC, Axina y GSK-3 β en las distintas localizaciones subcelulares en la célula, evaluada por un profesional a través de observación microscópica. Entrega 3 valores de distribución subcelular: si la distribución del antígeno se localiza en la membrana celular, se le asigna el valor 1; si se localiza en el citoplasma, se le asigna el valor 2; y si la distribución del antígeno se localiza en el núcleo, se le asigna el valor 3.
- **Intensidad del antígeno:** Variable ordinal que se utiliza para informar el resultado de la intensidad de la expresión IHQ de β -catenina, Wnt3a, Wnt5a, APC, Axina y GSK-3 β , evaluada por un profesional a través de la observación microscópica. Entrega 3 valores: si la intensidad es leve, se le asigna el valor +; si es moderada, se le asigna el valor ++; y si la intensidad es fuerte, se le asigna el valor +++.

3.5 FUENTES Y MÉTODO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

3.5.1 Revisión de la base de datos del SAP-FOUCH

Se solicitó la base de datos ingresada en el programa Microsoft Excel de todas las displasias y carcinomas orales diagnosticados hasta la fecha. La búsqueda de los casos se realizó a través del diagnóstico histopatológico consignado entre los años 2000 y 2018. En el caso de los carcinomas orales, se seleccionaron solamente aquellos cuyo diagnóstico histopatológico haya sido el de COCE y no otro.

De la misma base de datos se obtuvieron los antecedentes clínicos de cada caso, además del número del taco de parafina correspondiente.

3.5.2 Preselección de los bloques de parafina de displasias y COCE

A partir de los casos de displasia oral y de COCE revisados en la base de datos, utilizando el número de cada caso se buscaron los bloques de parafina correspondientes. Mediante esta búsqueda, se seleccionaron 30 muestras de displasia oral y 30 de COCE, aplicando los criterios de inclusión y exclusión.

3.5.3 Recopilación de los datos demográficos

Teniendo los bloques de parafina de cada muestra ya seleccionados, la información demográfica de los pacientes (edad, género y localización de la lesión, diagnóstico clínico e histopatológico) obtenida a partir de la base de datos del SAP-FOUCH fue recopilada en una planilla mediante el programa Microsoft Excel.

3.5.4 Procesamiento de las muestras previo a las técnicas histológicas e IHQ

Aquellas muestras que se encontraban mal incluidas fueron reincluidas en nuevos *cassettes* en el centro de inclusión marca Thermo Scientific HistoStar, modelo A81000105. Posteriormente, a cada molde se le realizaron 8 cortes de 3 μm utilizando navajas de corte para tejidos blandos marca Feather, en un micrótopo marca Thermo Scientific, modelo Microm HM 325, para las muestras incluidas en *cassettes* nuevos, y en el micrótopo marca E. Leitz Wetzlar, modelo 10141, para las muestras incluidas en bloques antiguos de parafina. Del total de los 8 cortes de cada muestra, uno fue destinado para cada uno de los 7 anticuerpos, y el restante para la técnica de H-E.

Los cortes fueron estirados en un baño de estirado marca Lab-Line, modelo 25104 a 38°C; cada corte fue recogido en portaobjetos con carga positiva marca Thermo Scientific y secados a 60°C por 1 hora en estufa marca Memmert,

3.5.5 Tinción con Hematoxilina-Eosina

Se seleccionó una placa de cada muestra para ser teñida con H-E, técnica realizada según el Apéndice A. La placa de cada muestra se observó través del microscopio óptico marca Olympus, modelo CX41, con el objetivo de evaluar la histología y comprobar la presencia suficiente de muestra para realizar la técnica IHQ. Las muestras que no cumplieran con lo especificado fueron descartadas y reemplazadas por otros casos que tuvieran el mismo diagnóstico.

3.5.6 Estandarización de los anticuerpos

Los criterios estandarizados para cada anticuerpo fueron el tipo de recuperador antigénico, la dilución del anticuerpo y el tiempo de incubación. Las características de cada criterio se detallan en la tabla 2.

Tabla 2. Criterios utilizados para la estandarización de los anticuerpos primarios

<i>Recuperador Antigénico</i>	<i>Dilución del Anticuerpo</i>	<i>Tiempo de incubación del Anticuerpo</i>
Citrato pH 6.0	1:500	1 hora (37°C)
Tris-EDTA 9.0	1:200	Overnight (4°C)
-	1:100	-
-	1:50	-

Cada anticuerpo fue estandarizado en el tejido control especificado en sus respectivos *datasheets* o en la literatura. En la tabla 3 se detallan las características de cada anticuerpo ya estandarizado.

Tabla 3. Características de cada anticuerpo ya estandarizado

<i>Anticuerpo</i>	<i>Recuperador antigénico</i>	<i>Dilución del anticuerpo</i>	<i>Tiempo de incubación del anticuerpo</i>	<i>Tejido control</i>
<i>Wnt3a</i>	Tris-EDTA	1:200	Overnight	Riñón
<i>Wnt5a</i>	Citrato	1:200	Overnight	Melanoma
<i>GSK-3β</i>	Citrato	1:200	Overnight	Ovario
<i>APC</i>	Citrato	1:200	Overnight	Colon
<i>β-catenina</i>	Citrato	1:50	1 hora	Colon
<i>Axina</i>	Citrato	1:100	1 hora	Piel

3.5.7 Técnica de IHQ

La técnica de IHQ se realizó según el Apéndice B. Primero se realizó la técnica de IHQ para el anticuerpo Wnt3a, luego para el anticuerpo Wnt5a, los anticuerpos APC y GSK-3 β , y finalmente para los anticuerpos Axina y β -catenina. En la tabla 4 se describen aspectos importantes de cada anticuerpo.

Tabla 4. Características relevantes de cada anticuerpo primario

<i>Anticuerpo primario</i>	<i>Tipo de anticuerpo</i>	<i>Dilución</i>	<i>Laboratorio comercial</i>	<i>Código del producto</i>
<i>Wnt3a</i>	Monoclonal Conejo	1:200	Abcam	EPR21889
<i>Wnt5a</i>	Monoclonal Murino	1:200	Santa Cruz Biotechnology	sc-365370
<i>GSK-3β</i>	Monoclonal Murino	1:200	BD Biosciences	610201
<i>APC</i>	Monoclonal Murino	1:200	Santa Cruz Biotechnology	sc-9998
<i>β-catenina</i>	Monoclonal Murino	1:50	Dako	M3539
<i>Axina</i>	Monoclonal Murino	1:100	Santa Cruz Biotechnology	sc-293190

En el procedimiento se incluyó como control una muestra de mucosa oral sana con el fin de poder visualizar la expresión de cada anticuerpo en condiciones normales, y se le aplicó los mismos procedimientos que a los tejidos de los casos en estudio.

3.6 RECOLECCIÓN DE LOS RESULTADOS

3.6.1 Evaluación de la expresión de los anticuerpos utilizados

Para la evaluación de cada anticuerpo, en primer lugar, se ordenaron todas las láminas teñidas según el número de caso desde el más antiguo al más actual y su diagnóstico histopatológico: para cada caso, se incluyó la lámina teñida con H-E y 7 cortes sometidos a IHQ para la evaluación de cada uno de los anticuerpos. Además, se incluyeron los cortes de mucosa oral sana para la observación de cada anticuerpo en condiciones normales. El orden de observación fue desde displasia oral leve, moderada, severa, COCE bien, moderado y pobremente diferenciado.

Respetando el orden establecido, cada muestra fue observada mediante el microscopio óptico, marca Olympus CX41. A partir del *screening* completo a un aumento de 10x, se evaluó la expresión de cada anticuerpo en las zonas con epitelio en base a cada variable establecida. La inmunexpresión positiva fue determinada según la observación de un color pardo en las células del epitelio. Los campos de los casos que resultaran más representativos para cada diagnóstico y anticuerpo fueron fotografiados.

3.6.2 Análisis estadístico

Se realizó un análisis exploratorio de los datos clínico-patológicos (sexo, edad, diagnóstico clínico y localización de la lesión) mediante estadística descriptiva.

Se realizó un análisis estadístico de los resultados obtenidos respecto a la expresión de cada antígeno según las variables. El análisis de normalidad de la curva se realizó a través de la prueba Shapiro Wilk, obteniéndose una distribución normal.

Para el análisis de la expresión de las proteínas en cada grupo diagnóstico (displasias leves, displasias moderada/severas, COCE bien diferenciados y COCE moderado-pobremente diferenciados), se utilizó el test ANOVA. Se consideró un valor de significancia menor del 5% ($p < 0.05$) para aceptar diferencias estadísticamente significativas. Todas las pruebas estadísticas se realizaron mediante el software Stata 11.0.

4 CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Se analizó un total de 30 muestras de displasia, 15 displasias leves y 15 displasias moderada/severas; estas últimas se distribuyeron en 11 displasias moderadas y 4 displasias severas. Se analizó un total de 30 muestras de COCE, 15 COCE bien diferenciados y 15 COCE moderado y pobremente diferenciados; estas últimas se distribuyeron en 13 COCE moderadamente diferenciados y 2 COCE pobremente diferenciados.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para la detección de cada una de las proteínas en relación con los objetivos planteados, además de la caracterización clínico-patológica de las muestras.

4.1 CARACTERIZACIÓN CLÍNICO-PATOLÓGICA

4.1.1 Caracterización clínico-patológica de las muestras diagnosticadas con displasia oral

En la tabla 5 se presentan las características clínico-patológicas de las muestras del estudio según el grado de la displasia.

Tanto en los casos de displasia leve como moderada hubo un total de 8 casos (53.3% y 72.7%, respectivamente) correspondientes a pacientes de sexo femenino, mientras que de las displasias severas la mitad de los casos (50%) correspondieron a pacientes de sexo masculino. En relación a la edad de los pacientes, 10 casos (66.7%) de las displasias leves correspondieron a pacientes menores de 60 años, mientras que en las displasias moderada/severas predominaron los mayores de 60 años, con 5 (45.5%) y 2 casos (50%) respectivamente. Del total de los casos, aproximadamente el 83% fueron diagnosticados

clínicamente como leucoplasia. La localización más frecuente de las displasias leves fue la lengua, con 6 casos (40%), y de las displasias moderadas fue la encía, con 5 casos (45.5%). Algunas lesiones se localizaron en más de una zona.

Tabla 5. Características clínico-patológicas de las muestras diagnosticadas con displasia leve, moderada o severa

	DL	DM	DS
Casos totales	15 (100%)	11 (100%)	4 (100%)
Sexo			
Femenino	8 (53.3%)	8 (72.7%)	1 (25%)
Masculino	7 (46.7%)	3 (27.3%)	2 (50%)
s/i	0	0	1 (25%)
Edad (años)			
< 60	10 (66.7%)	4 (36.4%)	1 (25%)
≥ 60	5 (33.3%)	5 (45.5%)	2 (50%)
s/i	0	2 (18.2%)	1 (25%)
Diagnóstico clínico			
Leucoplasia	11 (73.3%)	10 (90.9%)	2 (50%)
Eritroplasia	2 (13.3%)	1 (9.1%)	0
Otros	2 (13.3%)	0	2 (50%)
s/i	0	0	0
Localización			
Lengua	6 (40%)	2 (18.2%)	1 (25%)
Paladar	4 (26.7%)	0	0
Piso de boca	0	3 (27.3%)	0
Encía	5 (33.3%)	5 (45.5%)	1 (25%)
Mejilla	1 (6.7%)	1 (9.1%)	0
Mucosa labial	2 (13.3%)	1 (9.1%)	2 (50%)
Trígono retromolar	0	1 (9.1%)	0

DL: displasia leve; DM: displasia moderada; DS: displasia severa; s/i: sin información

4.1.2 Caracterización clínico-patológica de las muestras diagnosticadas con COCE

En la tabla 6 se presentan las características clínico-patológicas de las muestras del estudio según el grado de diferenciación del COCE.

Según el grado de diferenciación, 10 casos (66.7%) de los COCE bien diferenciados correspondieron a pacientes de sexo femenino, mientras que en los moderadamente

diferenciados 8 casos (61.5%) correspondieron a pacientes de sexo masculino, y en los pobremente diferenciados hubo un caso de cada sexo. En relación a la edad de los pacientes, en los COCE bien diferenciados 11 casos (73.3%) correspondieron a pacientes mayores de 60 años, y en los casos de COCE moderado y pobremente diferenciados la cantidad de pacientes menores y mayores de 60 años fue la misma (ambos rangos etarios con 46.2% y 50% de los COCE moderado y pobremente diferenciados, respectivamente). El diagnóstico clínico fue de cáncer oral, sin embargo, en una gran cantidad de casos no se especificaba el diagnóstico clínico en sus fichas clínicas. La localización más frecuente en los COCE bien diferenciados fue la lengua, con 6 casos (40%), mientras que en los moderadamente diferenciados fue la encía, con 6 (38.5%), y en los pobremente diferenciados hubo igual cantidad en lengua y paladar. Algunas lesiones se localizaron en más de una zona.

Tabla 6. Características clínico-patológicas de las muestras diagnosticadas con COCE bien, moderado y pobremente diferenciado

	COCE BD	COCE MD	COCE PD
Casos totales	15 (100%)	13 (100%)	2 (100%)
Sexo			
Femenino	10 (66.7%)	4 (30.8%)	1 (50%)
Masculino	5 (33.3%)	8 (61.5%)	1 (50%)
s/i	0	1 (7.7%)	0
Edad (años)			
< 60	4 (26.7%)	6 (46.2%)	1 (50%)
≥ 60	11 (73.3%)	6 (46.2%)	1 (50%)
s/i	0	1 (7.7%)	0
Diagnóstico clínico			
Cáncer oral	12 (80%)	5 (38.5%)	1 (50%)
Otros	0	1 (7.7%)	0
s/i	3 (20%)	7 (53.9%)	1 (50%)
Localización			
Lengua	6 (40%)	4 (30.8%)	1 (50%)
Paladar	0	1 (7.7%)	1 (50%)
Piso de boca	1 (6.7%)	0	0
Encía	3 (20%)	5 (38.5%)	0
Mejilla	2 (13.3%)	0	0
Mucosa labial	2 (13.3%)	1 (7.7%)	0
Trígono retromolar	1 (6.7%)	2 (15.4%)	0
s/i	2 (13.3%)	2 (15.4%)	0

COCE BD: COCE bien diferenciado; COCE MD: COCE moderadamente diferenciado; COCE PD: COCE pobremente diferenciado.

4.2 HISTOLOGIA DE LAS DISPLASIA Y COCE.

En la figura 8 se puede observar la histología de la displasia leve, moderada y severa, y del COCE bien, moderado y pobremente diferenciado.

4.3 DETERMINAR LA PRESENCIA DE β -CATENINA NUCLEAR EN BIOPSIAS DE DISPLASIA ORAL Y COCE.

En la tabla 7 se presentan los valores de intensidad de cada proteína obtenidos según el diagnóstico.

Tabla 7. Valores de la intensidad expresada de cada proteína en los diferentes grados de displasia y diferenciación de COCE.

	β -cat	Wnt3a	Wnt5a	APC	Axina	GSK-3 β
Grado de la displasia (n° de casos)						
Leve (n = 15)	++	++	++	+	++	+
Moderada (n = 11)	+++	++	+++	++	+++	++
Severa (n = 4)	+++	++/+++	++/+++	++	+++	++/+++
Diferenciación del COCE (n° de casos)						
Bien diferenciado (n = 15)	++	++	+++	+	++	++
Moderadamente diferenciado (n = 13)	+++	+	++	++	++	++
Pobremente diferenciado (n = 2)	+++	++	++/+++	+/++	+	+/++

Intensidad de tinción: 0 = nula, + = leve, ++ = moderada, +++ = fuerte

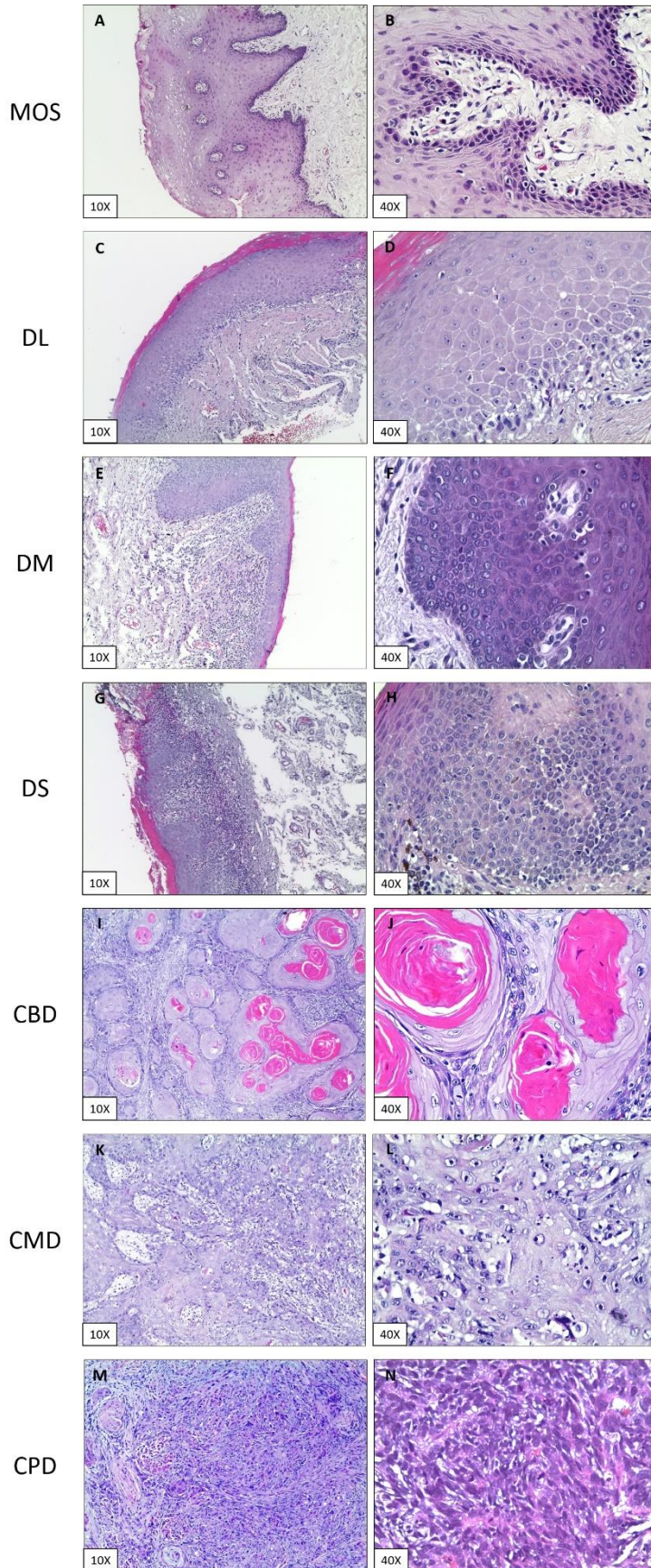


Figura 8. Histología de las displasias y COCE. Mucosa oral sana (MOS) (A, B); Displasia leve (DL) (C, D); Displasia moderada (DM) (E, F); Displasia severa (DS) (G, H). COCE bien diferenciado (CBD) (I, J); COCE moderadamente diferenciado (CMD) (K, L); COCE pobremente diferenciado (CPD) (M, N). Tinción H-E. Aumentos 10x y 40x.

4.3.1 Determinar la presencia de β -catenina nuclear en biopsias de displasia oral

De las 30 muestras de displasias analizadas, el 100% de las células epiteliales presentó presencia de β -catenina, en todos los estratos del epitelio (tabla 8).

De las 15 displasias leves analizadas, el 100% mostró presencia citoplasmática de la proteína; 14 casos (93.3%) presentaron además presencia membranosa y en 8 casos la proteína se localizó en el núcleo de los estratos inferiores del epitelio (tabla 8 y figura 9C y D). La intensidad de la proteína fue evaluada como ++ (tabla 7). De las 15 displasias moderada/severas, el 100% presentó localización nuclear de β -catenina en conjunto con una distribución citoplasmática y membranosa de la proteína (tabla 8 y figura 9E, F, G y H). La intensidad del antígeno fue evaluada como +++ (tabla 7).

4.3.2 Determinar la presencia de β -catenina nuclear en biopsias de COCE

De un total de 30 muestras de COCE analizadas, el 100% de las células epiteliales presentó presencia de β -catenina, en todos los estratos del epitelio (tabla 8).

De los 15 COCE bien diferenciados, el 100% presentó localización citoplasmática de β -catenina; 14 casos (93.3%) presentaron además localización membranosa del antígeno y solo 3 casos (20%) nuclear (tabla 8 y figura 9I y J). La intensidad fue evaluada como ++ (tabla 7). De los 15 COCE moderado y pobremente diferenciados, el 100% mostró presencia citoplasmática de β -catenina (figura 9K, L, M y N). Además, 3 (23.1%) y 4 (30.8%) casos presentaron localización membranosa y nuclear (tabla 8). La intensidad fue evaluada como +++ (tabla 7).

Tabla 8. Expresión, porcentaje de células positivas y localización de β -catenina en mucosa oral normal, displasias y COCE

	<i>MOS</i>	<i>DL</i>	<i>DM</i>	<i>DS</i>	<i>COCE BD</i>	<i>COCE MD</i>	<i>COCE PD</i>
Casos totales	3 (100%)	15 (100%)	11 (100%)	4 (100%)	15 (100%)	13 (100%)	2 (100%)
Tinción							
<i>Positiva</i>	3 (100%)	15 (100%)	11 (100%)	4 (100%)	15 (100%)	13 (100%)	2 (100%)
<i>Negativa</i>	0	0	0	0	0	0	0
% células positivas							
<i>1-25%</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>25-50%</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>50-75%</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>75-100%</i>	3 (100%)	15 (100%)	11 (100%)	4 (100%)	15 (100%)	13 (100%)	2 (100%)
Localización epitelial							
<i>Solo estratos inferiores</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Todos los estratos</i>	3 (100%)	15 (100%)	11 (100%)	4 (100%)	15 (100%)	13 (100%)	2 (100%)
Localización subcelular							
<i>Membrana</i>	3 (100%)	14 (93.3%)	8 (72.7%)	4 (100%)	14 (93.3%)	3 (23.1%)	0
<i>Citoplasma</i>	0	15 (100%)	11 (100%)	4 (100%)	15 (100%)	13 (100%)	2 (100%)
<i>Núcleo</i>	0	8 (53.3%)	11 (100%)	4 (100%)	3 (20%)	4 (30.8%)	0

MOS: mucosa oral sana; DL: displasia leve; DM: displasia moderada; DS: displasia severa; COCE BD: COCE bien diferenciado; COCE MD: COCE moderadamente diferenciado; COCE PD: COCE pobremente diferenciado.

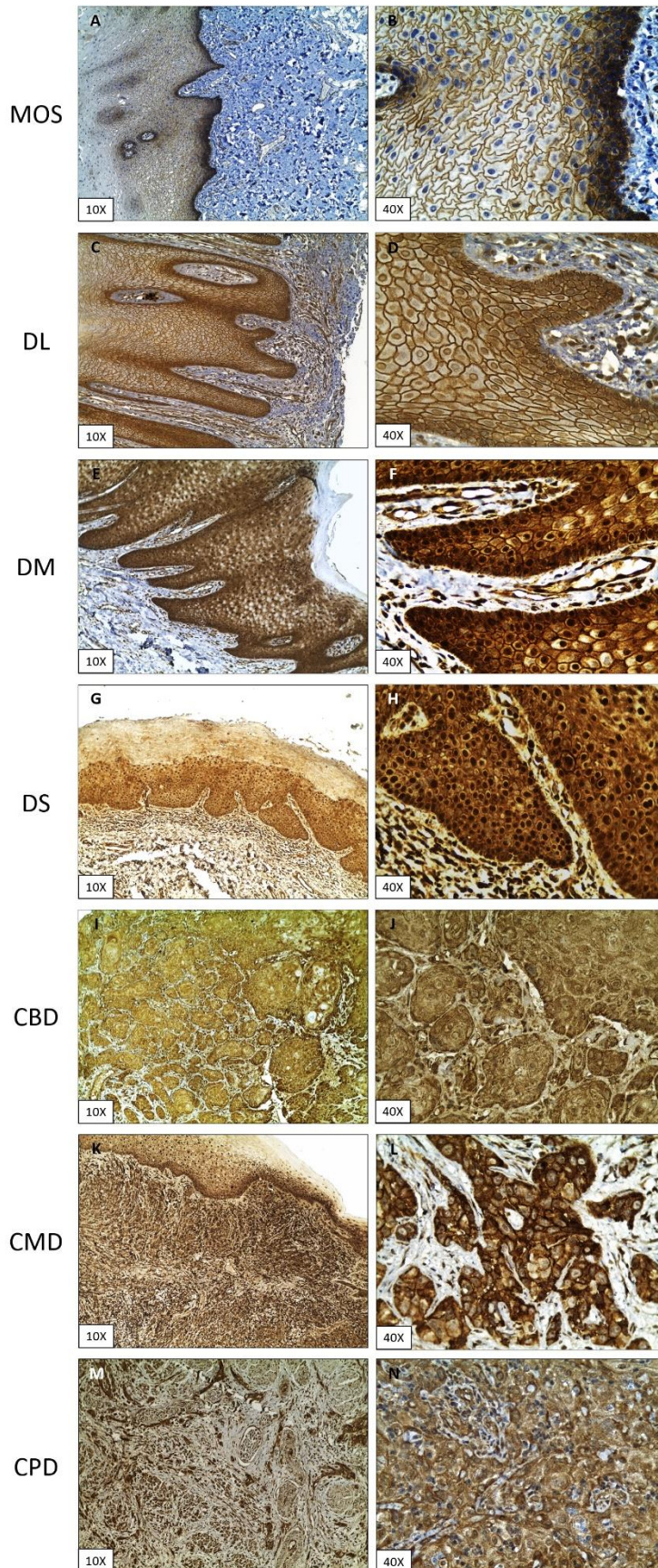


Figura 9. Expresión IHQ de β -catenina. En la mucosa oral sana (MOS), la proteína se expresa a nivel de membrana (A, B). En la displasia leve (DL) se observa más citoplasmática y ligeramente nuclear (C, D). En la displasia moderada (DM) su expresión nuclear se hace más intensa (E, F), alcanzando la mayor intensidad en la displasia (DL) severa (G, H). En el COCE bien diferenciado (CBD) disminuye considerablemente su expresión nuclear (I, J), y en los COCE moderado y pobremente diferenciado (CMD y CPD) la expresión nuclear y membranosa se pierde (K, L y M, N). Aumentos 10x y 40x.

Las muestras de displasia oral severa presentaron predominantemente localización nuclear de β -catenina en comparación a las muestras de COCE, que presentaron principalmente una localización citoplasmática del antígeno (figura 10).

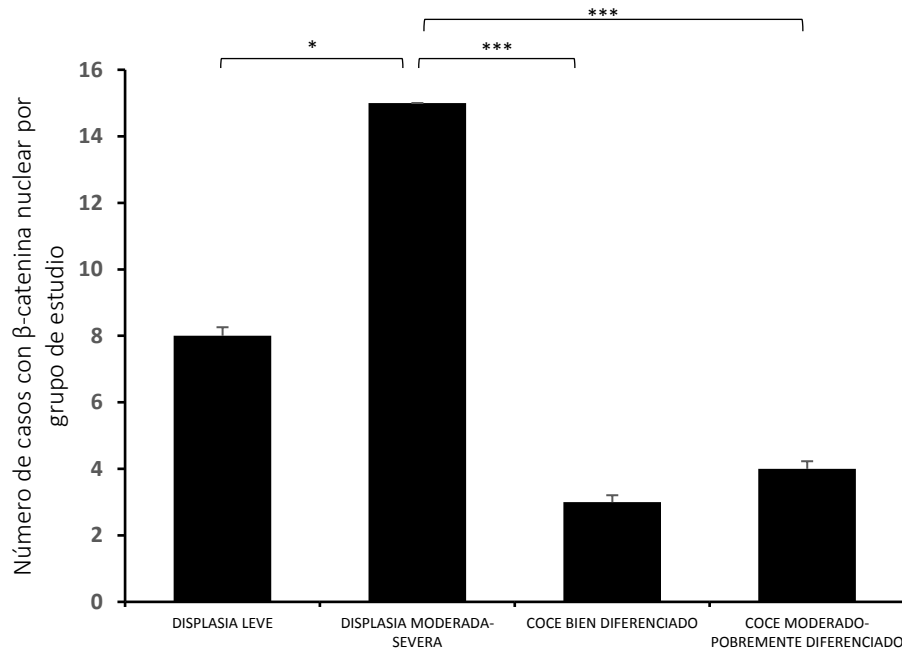


Figura 10. Localización nuclear de β -catenina. Número de casos con localización nuclear de β -catenina. El gráfico muestra el promedio \pm el error estándar (one-way ANOVA; * = $p \leq 0.05$ *** = $p \leq 0.001$).

4.4 DETERMINAR Y COMPARAR LA PRESENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS LIGANDOS WNT3A Y WNT5A EN MUESTRAS DE DISPLASIA ORAL Y COCE.

4.4.1 Determinar y comparar la presencia y distribución del ligando Wnt3a en muestras de displasia oral y COCE

4.4.1.1 Determinar y comparar la presencia y distribución del ligando Wnt3a en muestras de displasia oral.

De las 30 displasias analizadas, el 100% de las células epiteliales presentó presencia de Wnt3a, en todos los estratos del epitelio (tabla 9).

De las 15 displasias leves analizadas, el 100% presentó localización citoplasmática del antígeno (tabla 9 y figura 11C y D), y la intensidad fue evaluada como ++ (tabla 7). De las 15 displasias moderada/severas analizadas, el 100% presentó localización citoplasmática del antígeno (tabla 9 y figura 11E, F, G y H). La intensidad de Wnt3a fue evaluada como ++ en las displasias moderadas, y en las severas como ++/+++ (tabla 7).

4.4.1.2 Determinar y comparar la presencia y distribución del ligando Wnt3a en muestras de COCE.

De un total de 30 muestras de COCE analizadas, el 100% de las células epiteliales presentó presencia de Wnt3a, en todos los estratos del epitelio (tabla 9).

De los 15 COCE bien diferenciados analizados, el 100% presentó localización citoplasmática de Wnt3a (tabla 9 y figura 11I y J), con intensidad evaluada como ++ (tabla 7). Del total de 15 COCE moderado y pobremente diferenciados, el 100% mostró presencia citoplasmática del antígeno (tabla 9 y figura 11K, L, M y N). Respecto a la intensidad de

Wnt3a, en los COCE moderadamente diferenciados fue evaluada como +, y en los pobremente diferenciados como ++/+++ (tabla 7).

Tabla 9. Expresión, porcentaje de células positivas y localización de Wnt3a en mucosa oral normal, displasias y COCE

	MOS	DL	DM	DS	COCE BD	COCE MD	COCE PD
Casos totales	3 (100%)	15 (100%)	11 (100%)	4 (100%)	15 (100%)	13 (100%)	2 (100%)
Tinción							
Positiva	3 (100%)	15 (100%)	11 (100%)	4 (100%)	15 (100%)	13 (100%)	2 (100%)
Negativa	0	0	0	0	0	0	0
% células positivas							
1-25%	3 (100%)	0	0	0	0	0	0
25-50%	0	0	0	0	0	0	0
50-75%	0	1 (6.7%)	0	0	0	0	0
75-100%	0	14 (93.3%)	11 (100%)	4 (100%)	15 (100%)	13 (100%)	2 (100%)
Localización epitelial							
Solo estratos inferiores	0	1 (6.7%)	0	0	0	0	0
Todos los estratos	3 (100%)	14 (93.3%)	11 (100%)	4 (100%)	15 (100%)	13 (100%)	2 (100%)
Localización subcelular							
Membrana	0	0	0	1 (25%)	0	0	0
Citoplasma	3 (100%)	15 (100%)	11 (100%)	4 (100%)	15 (100%)	13 (100%)	2 (100%)
Núcleo	0	0	0	0	0	0	0

MOS: mucosa oral sana; DL: displasia leve; DM: displasia moderada; DS: displasia severa; COCE BD: COCE bien diferenciado; COCE MD: COCE moderadamente diferenciado; COCE PD: COCE pobremente diferenciado.

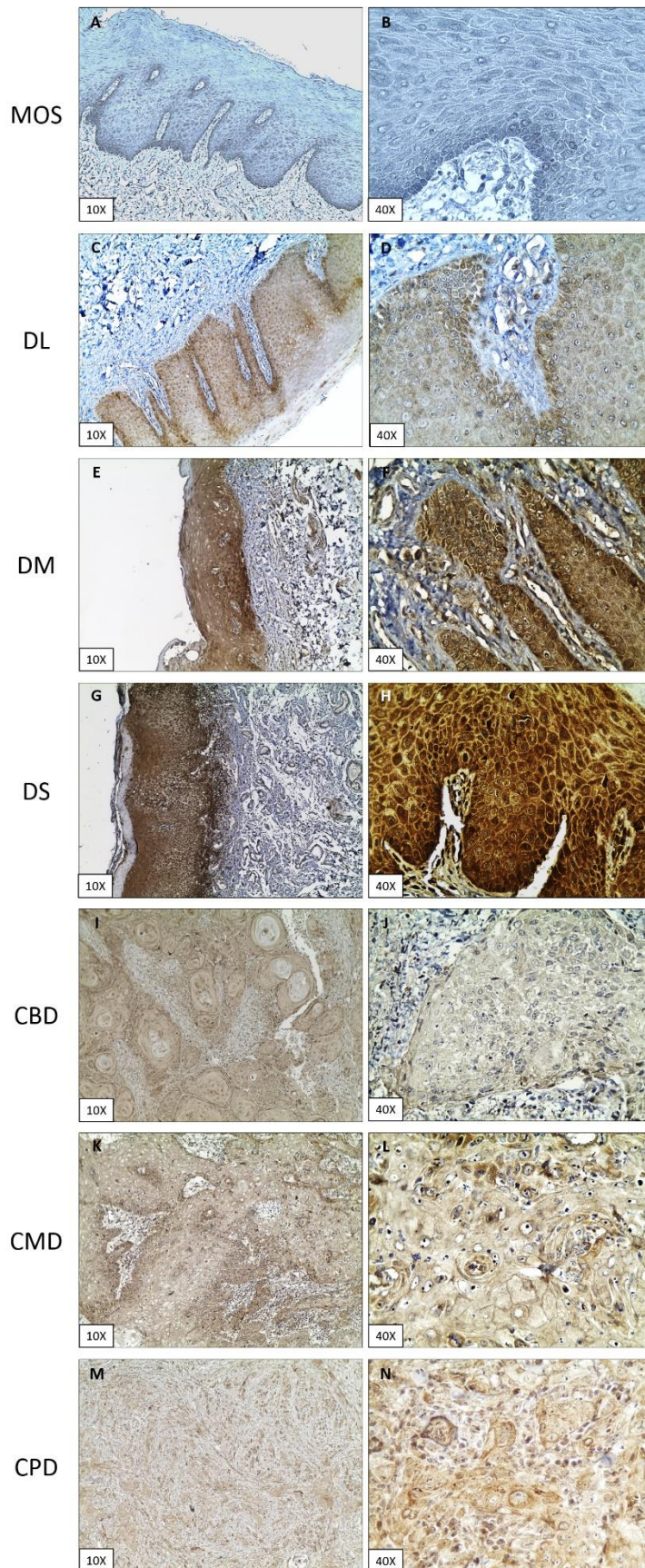


Figura 11. Expresión IHQ de Wnt3a. En la mucosa oral sana (MOS) se observa mínima expresión del ligando en el citoplasma (A, B). En la displasia leve (DL) se observa débilmente citoplasmática (C, D). En la displasia moderada (DM) su expresión citoplasmática se hace más intensa (E, F), alcanzando la mayor intensidad en la displasia severa (DS) (G, H). En el COCE bien y moderadamente diferenciado (CBD y CMD) disminuye considerablemente su expresión citoplasmática (I, J y K, L), y en el COCE pobremente diferenciado (CPD) la expresión ya es muy débil (M, N). Aumentos 10x y 40x.

Las muestras de displasia moderada/severa presentaron mayor intensidad de Wnt3a que las muestras de displasia leve, así como también presentaron mayor intensidad en comparación con las muestras de COCE bien diferenciado y con el grupo de COCE moderado/pobremente diferenciado (tabla 10).

Tabla 10. Comparación de la intensidad de Wnt3a entre los diferentes grupos de estudio

**Comparación de la intensidad de Wnt3a entre los
diferentes grupos de estudio**

	DL	DM/DS	COCE/BD
DM/DS	*= p ≤ 0.05		
COCE/BD	s.d	*=p ≤ 0.05	
COCE/MD/PD	s.d	***=p ≤ 0.001	s.d

DL: displasia leve; DM: displasia moderada; DS: displasia severa; COCE BD: COCE bien diferenciado; COCE MD: COCE moderadamente diferenciado; COCE PD: COCE pobremente diferenciado. One-way ANOVA; s.d (sin diferencias).

4.4.2 Determinar y comparar la presencia y distribución del ligando Wnt5a en muestras de displasia oral y COCE

4.4.2.1 Determinar y comparar la presencia y distribución del ligando Wnt5a en muestras de displasia oral.

De las 30 muestras de displasias analizadas, el 100% de las células epiteliales presentó presencia de Wnt5a, en todos los estratos del epitelio (tabla 12).

De las 15 displasias leves analizadas, el 100% mostró presencia citoplasmática de la proteína (tabla 12 y figura 12C y D), cuya intensidad fue evaluada como ++ (tabla 7). De las 15 displasias moderada/severas analizadas el 100% presentó localización citoplasmática de la proteína en todos los estratos del epitelio (tabla 12 y figura 12 E, F, G y H). La intensidad

del antígeno fue evaluada como +++ en las displasias moderadas, y en las displasias severas como ++/+++ (tabla 7).

4.4.2.2 *Determinar y comparar la presencia y distribución del ligando Wnt5a en muestras de COCE.*

De un total de 30 muestras de COCE analizadas, el 100% de las células epiteliales presentó presencia de Wnt5a, en todos los estratos del epitelio (tabla 12).

De los 15 COCE bien diferenciados analizados, el 100% presentó localización citoplasmática de Wnt5a (tabla 12 y figura 12I y J), cuya intensidad fue evaluada como +++ (tabla 7). Del total de 15 COCE moderado y pobremente diferenciados, el 100% mostró presencia citoplasmática del antígeno (tabla 12 y figura 12K, L, M y N). Respecto a la intensidad de Wnt5a, en los COCE moderadamente diferenciados fue evaluada como ++, y en los COCE pobremente diferenciados como ++/+++ (tabla 7).

No se encontraron diferencias entre la intensidad de Wnt5a al comparar los diferentes grupos de estudio (tabla 11).

Tabla 11. *Comparación de la intensidad de Wnt5a entre los diferentes grupos de estudio*

Comparación de la intensidad de Wnt5a entre los diferentes grupos de estudio

	DL	DM/DS	COCE/BD
DM/DS	s.d		
COCE/BD	s.d	s.d	
COCE/MD/PD	s.d	s.d	s.d

DL: displasia leve; DM: displasia moderada; DS: displasia severa; COCE BD: COCE bien diferenciado; COCE MD: COCE moderadamente diferenciado; COCE PD: COCE pobremente diferenciado. One-way ANOVA; s.d (sin diferencias).

Tabla 12. Expresión, porcentaje de células positivas y localización de *Wnt5a* en mucosa oral normal, displasias y COCE

	MOS	DL	DM	DS	COCE BD	COCE MD	COCE PD
Casos totales	3 (100%)	15 (100%)	11 (100%)	4 (100%)	15 (100%)	13 (100%)	2 (100%)
Tinción							
Positiva	3 (100%)	15 (100%)	11 (100%)	4 (100%)	15 (100%)	13 (100%)	2 (100%)
Negativa	0	0	0	0	0	0	0
% células positivas							
1-25%	0	0	0	0	0	0	0
25-50%	0	1 (6.7%)	0	0	0	0	0
50-75%	3 (100%)	1 (6.7%)	0	0	0	0	0
75-100%	0	13 (86.7%)	11 (100%)	4 (100%)	15 (100%)	13 (100%)	2 (100%)
Localización epitelial							
Solo estratos inferiores	0	1 (6.7%)	0	0	0	0	0
Todos los estratos	3 (100%)	14 (93.3%)	11 (100%)	4 (100%)	15 (100%)	13 (100%)	2 (100%)
Localización subcelular							
Membrana	0	0	0	0	0	0	1 (50%)
Citoplasma	3 (100%)	15 (100%)	11 (100%)	4 (100%)	15 (100%)	13 (100%)	2 (100%)
Núcleo	0	0	0	0	0	0	0

MOS: mucosa oral sana; DL: displasia leve; DM: displasia moderada; DS: displasia severa; COCE BD: COCE bien diferenciado; COCE MD: COCE moderadamente diferenciado; COCE PD: COCE pobremente diferenciado.

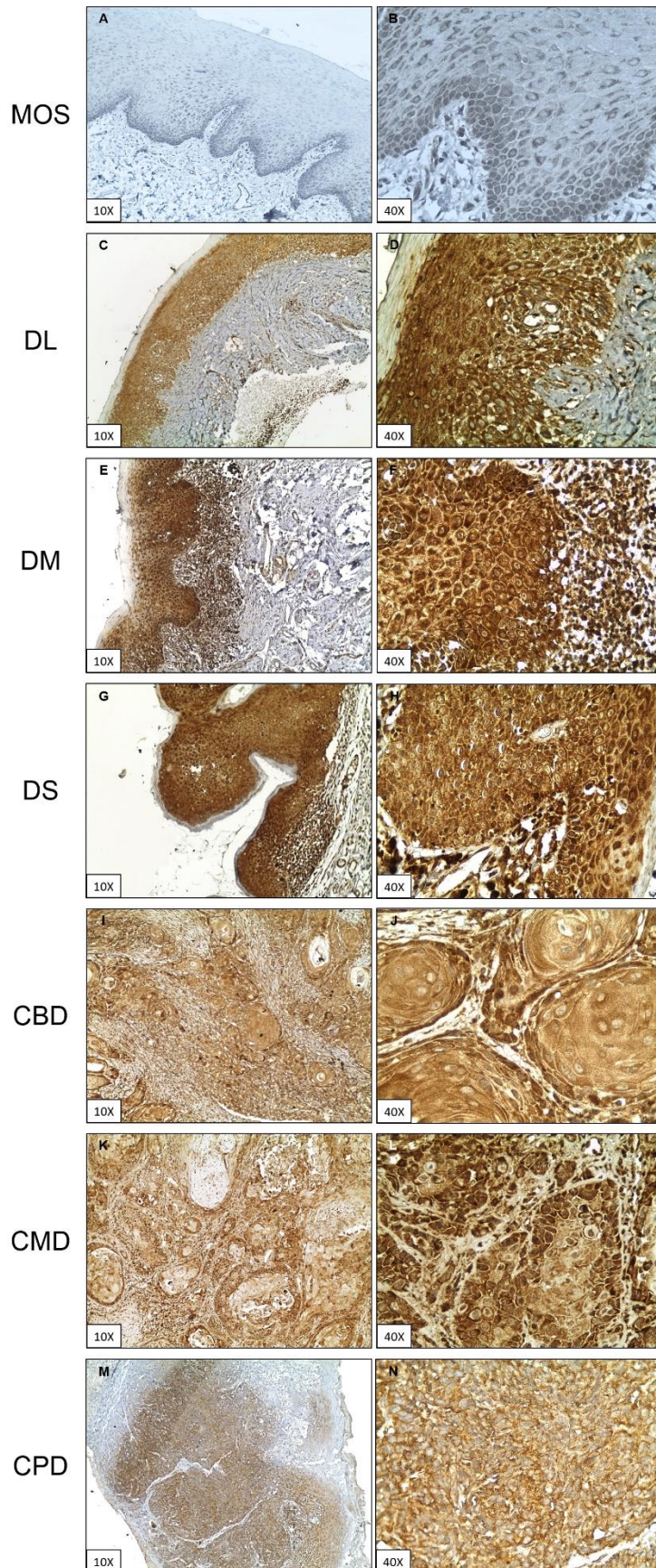


Figura 12. Expresión IHQ de Wnt5a. En la mucosa oral sana (MOS) se observa expresión débil del ligando en el citoplasma (A, B). Tanto en la displasia leve (DL), moderada (DM) y severa (DS) (A, B, C, D, E, F, G y H), como en los COCE bien (CBD), moderado (CMD) y pobremente diferenciado (CPD) (I, J, K, L, M, N), la localización de Wnt5a se observa citoplasmática y la intensidad es la misma en todos los casos. Aumentos 10x y 40x.

4.5 DETERMINAR Y COMPARAR LA PRESENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL COMPLEJO DE DESTRUCCIÓN DE β -CATENINA APC, AXINA Y GSK-3 β EN MUESTRAS DE DISPLASIA ORAL Y COCE.

4.5.1 Determinar y comparar la presencia y distribución de APC en muestras de displasia oral y COCE.

4.5.1.1 Determinar y comparar la presencia y distribución de APC en muestras de displasia oral.

De las 30 muestras de displasias analizadas, entre el 75% a 100% de las células epiteliales presentó presencia de APC, en todos los estratos del epitelio (tabla 13).

De las 15 displasias leves analizadas, el 100% mostró presencia citoplasmática de la proteína; sumado a esto, 13 casos (86.7%) presentaron además localización membranosa de APC (tabla 12 y figura 13C y D). En cuanto a la intensidad de APC, fue evaluada como + (tabla 7). De las 15 displasias moderada/severas analizadas el 100% presentó localización citoplasmática de la proteína y además se presentó localización membranosa en 9 (81.8%) y 4 (100%) displasias moderadas y severas, respectivamente (tabla 12 y figura 13E, F, G y H). La intensidad del antígeno fue evaluada como ++ en ambos diagnósticos (tabla 7).

4.5.1.2 Determinar y comparar la presencia y distribución de APC en muestras de COCE.

De un total de 30 muestras de COCE analizadas, en la mayoría de los casos el 100% de las células epiteliales presentó presencia de APC, en todos los estratos del epitelio (tabla 12).

De los 15 COCE bien diferenciados analizados, el 100% presentó localización citoplasmática de APC, y 8 casos (53.3%) presentaron además su presencia a nivel de

membrana (tabla 12 y figura 13I y J). La intensidad del antígeno fue evaluada como ++ (tabla 7). Del total de 15 COCE moderado y pobremente diferenciados, la localización subcelular de APC fue citoplasmática. La cantidad de COCE con presencia membranosa de APC fue de 4 casos (30.8%) de COCE moderadamente diferenciados (tabla 12 y figura 13K, L, M y N). Por otro lado, la intensidad en los COCE moderadamente diferenciados fue evaluada como ++ y en los COCE pobremente diferenciados como +/++ (tabla 7).

Tabla 13. Expresión, porcentaje de células positivas, localización e intensidad de APC en mucosa oral normal, displasias y COCE

	<i>MOS</i>	<i>DL</i>	<i>DM</i>	<i>DS</i>	<i>COCE BD</i>	<i>COCE MD</i>	<i>COCE PD</i>
Casos totales	3 (100%)	15 (100%)	11 (100%)	4 (100%)	15 (100%)	13 (100%)	2 (100%)
Tinción							
<i>Positiva</i>	3 (100%)	15 (100%)	11 (100%)	4 (100%)	15 (100%)	13 (100%)	2 (100%)
<i>Negativa</i>	0	0	0	0	0	0	0
% células positivas							
<i>1-25%</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>25-50%</i>	3 (100%)	0	1 (9.1%)	0	0	1 (7.7%)	1 (50%)
<i>50-75%</i>	0	7 (46.7%)	5 (45.5%)	3 (75%)	2 (13.3%)	0	0
<i>75-100%</i>	0	8 (53.3%)	5 (45.5%)	1 (25%)	13 (86.7%)	12 (92.3%)	1 (50%)
Localización epitelial							
<i>Solo estratos inferiores</i>	0	1 (6.7%)	2 (18.2%)	0	0	0	0
<i>Todos los estratos</i>	3 (100%)	14 (93.3%)	9 (81.8%)	4 (100%)	15 (100%)	13 (100%)	2 (100%)
Localización subcelular							
<i>Membrana</i>	0	13 (86.7%)	9 (81.8%)	4 (100%)	8 (53.3%)	4 (30.8%)	0
<i>Citoplasma</i>	3 (100%)	15 (100%)	11 (100%)	4 (100%)	15 (100%)	12 (92.3%)	2 (100%)
<i>Núcleo</i>	0	0	0	0	0	0	0

MOS: mucosa oral sana; DL: displasia leve; DM: displasia moderada; DS: displasia severa; COCE BD: COCE bien diferenciado; COCE MD: COCE moderadamente diferenciado; COCE PD: COCE pobremente diferenciado.

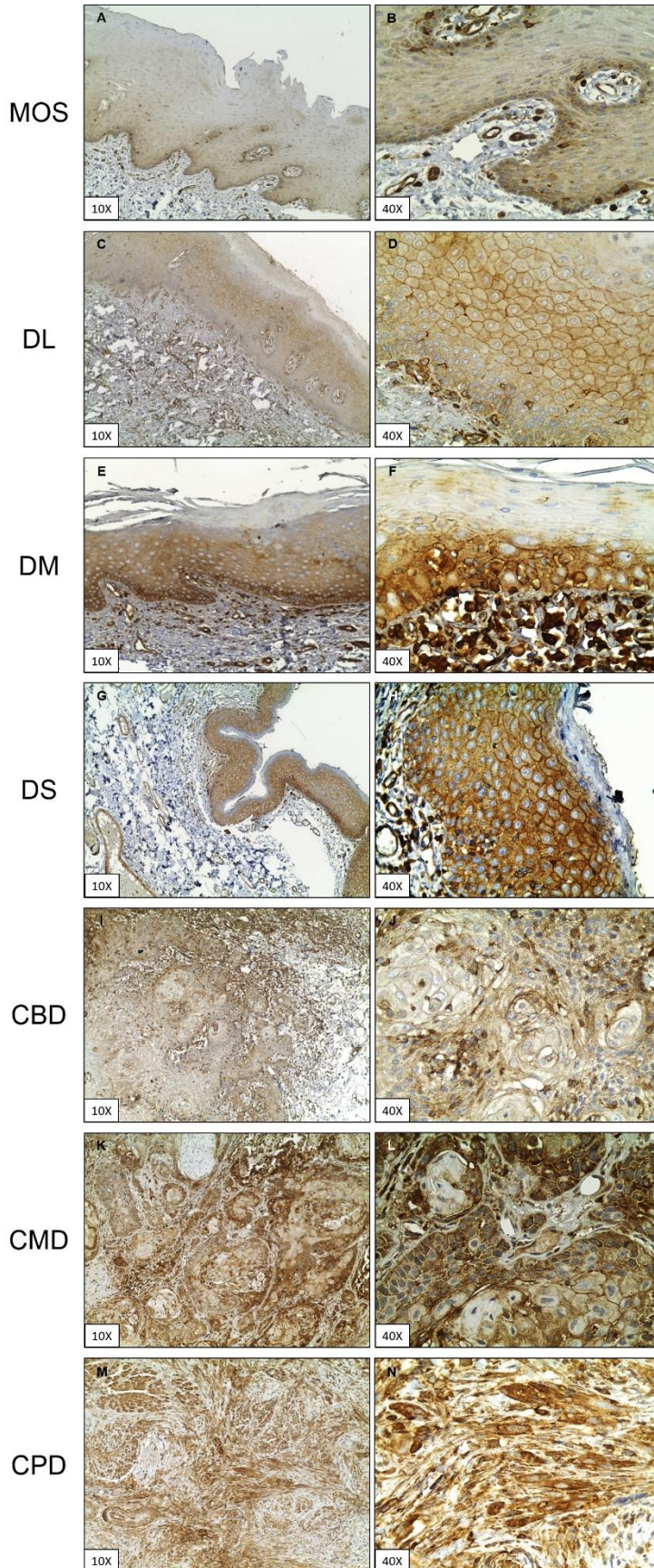


Figura 13. Expresión IHQ de APC. En la mucosa oral sana (MOS) la expresión de APC es débil en el citoplasma (A, B). En la displasia leve (DL), la proteína se expresa citoplasmática y membranosa (C, D). En la displasia moderada (DM) y severa (DS), la intensidad de expresión es mayor que en la displasia leve (E, F y G, H). En el COCE bien diferenciado (CBD), la expresión es principalmente citoplasmática y en menos casos membranosa (I, J). En los COCE moderado (CMD) y pobremente diferenciados (CPD) la localización membranosa se va perdiendo (K, L y M, N). Aumentos 10x y 40x.

Las muestras de displasia moderada/severa presentaron mayor intensidad de APC que las muestras de displasia leve. No se encontraron diferencias entre la intensidad de APC, al comparar los otros grupos de estudio (tabla 14).

Tabla 14. Comparación de la intensidad de APC entre los diferentes grupos de estudio

**Comparación de la intensidad de APC entre los diferentes
grupos de estudio**

	DL	DM/DS	COCE/BD
DM/DS	** = $p \leq 0.01$		
COCE/BD	s.d	s.d	
COCE/MD/PD	s.d	s.d	s.d

DL: displasia leve; DM: displasia moderada; DS: displasia severa; COCE BD: COCE bien diferenciado; COCE MD: COCE moderadamente diferenciado; COCE PD: COCE pobremente diferenciado. One-way ANOVA; * = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$; s.d (sin diferencias).

4.5.2 Determinar y comparar la presencia y distribución de Axina en muestras de displasia oral y COCE.

4.5.2.1 Determinar y comparar la presencia y distribución de Axina en muestras de displasia oral.

De las 30 muestras de displasias analizadas, el 100% de las células epiteliales presentó presencia de Axina, en todos los estratos del epitelio (tabla 15).

De las 15 displasias leves, el 100% mostró localización citoplasmática de la proteína y 1 (6.7%) mostraron además localización membranosa y nuclear (tabla 15 y figura 14 C y D). Por otra parte, la intensidad de la proteína fue evaluada como ++ (tabla 7). De las 15 displasias moderada/severas analizadas, el 100% presentó localización citoplasmática del antígeno y una muestra (9.1%) presentó además localización nuclear (tabla 15 y figura 14E, F, G y H) y su intensidad fue +++ en ambos diagnósticos (tabla 7).

4.5.2.2 Determinar y comparar la presencia y distribución de Axina en muestras de COCE.

De un total de 30 muestras de COCE analizadas, el 100% de las células epiteliales presentó presencia de Axina, en todos los estratos del epitelio (tabla 15).

De los 15 COCE bien diferenciados analizados, el 100% presentó localización citoplasmática de Axina (tabla 15 y figura 14I y J), cuya intensidad fue evaluada como ++ (tabla 7). Del total de 15 COCE moderado y pobremente diferenciados, el 100% mostró presencia citoplasmática del antígeno (tabla 15 y figura 14K, L, M y N). En relación a la intensidad, en los COCE moderadamente diferenciados fue evaluada como ++ y en los COCE pobremente diferenciados como + (tabla 7).

Tabla 15. Expresión, porcentaje de células positivas y localización de Axina en mucosa oral normal, displasias y COCE

	MOS	DL	DM	DS	COCE BD	COCE MD	COCE PD
Casos totales	3 (100%)	15 (100%)	11 (100%)	4 (100%)	15 (100%)	13 (100%)	2 (100%)
Tinción							
Positiva	3 (100%)	15 (100%)	11 (100%)	4 (100%)	15 (100%)	13 (100%)	2 (100%)
Negativa	0	0	0	0	0	0	0
% células positivas							
1-25%	0	0	0	0	0	0	0
25-50%	0	0	0	0	0	0	0
50-75%	0	1 (6.7%)	1 (9.1%)	0	1 (6.7%)	0	0
75-100%	3 (100%)	14 (93.3%)	10 (90.9%)	4 (100%)	14 (93.3%)	13 (100%)	2 (100%)
Localización epitelial							
Solo estratos inferiores	0	0	0	0	0	0	0
Todos los estratos	3 (100%)	15 (100%)	11 (100%)	4 (100%)	15 (100%)	13 (100%)	2 (100%)
Localización subcelular							
Membrana	0	1 (6.7%)	1 (9.1%)	0	0	0	0
Citoplasma	3 (100%)	15 (100%)	11 (100%)	4 (100%)	15 (100%)	13 (100%)	2 (100%)
Núcleo	0	1 (6.7%)	1 (9.1%)	0	0	0	0

MOS: mucosa oral sana; DL: displasia leve; DM: displasia moderada; DS: displasia severa; COCE BD: COCE bien diferenciado; COCE MD: COCE moderadamente diferenciado; COCE PD: COCE pobremente diferenciado.

Las muestras de displasia presentaron mayor intensidad de Axina en comparación a las muestras de COCE, la cual disminuyó considerablemente en los COCE pobremente diferenciados (tabla 16).

Tabla 16. Comparación de la intensidad de Axina entre los diferentes grupos de estudio.

**Comparación de la intensidad de Axina entre los diferentes
grupos de estudio**

	DL	DM/DS	COCE/BD
DM/DS	s.d		
COCE/BD	s.d	*= $p \leq 0.05$	
COCE/MD/PD	***= $p \leq 0.001$	***= $p \leq 0.001$	*= $p \leq 0.05$

DL: displasia leve; DM: displasia moderada; DS: displasia severa; COCE BD: COCE bien diferenciado; COCE MD: COCE moderadamente diferenciado; COCE PD: COCE pobremente diferenciado. One-way ANOVA; *= $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$; ***= $p \leq 0.001$; s.d (sin diferencias).

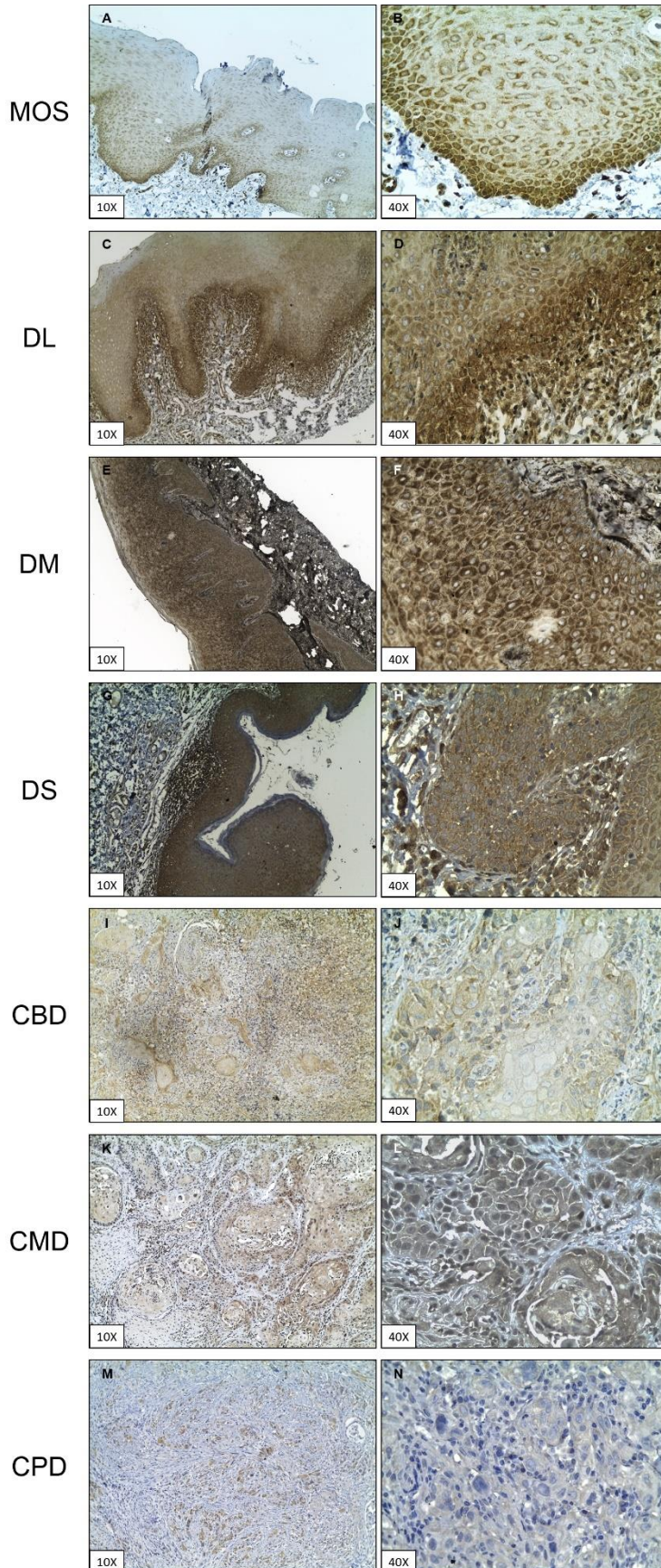


Figura 14. Expresión IHQ de Axina. En la mucosa oral sana (MOS) la expresión de Axina es moderada y citoplasmática (A, B). Tanto en las displasias leve (DL), moderada (DM) y severa (DS) como en los COCE bien (CDB), moderado (CMD) y pobremente diferenciado (CPD) la localización de Axina se observa citoplasmática. La intensidad de las displasias se observa mayor en comparación a los COCE (C, D, E, F, G, H), la cual disminuye considerablemente en los COCE de menor diferenciación (K, L, M, N). Aumentos 10x y 40x.

4.5.3 Determinar y comparar la presencia y distribución de GSK-3 β en muestras de displasia oral y COCE.

4.5.3.1 Determinar y comparar la presencia y distribución de GSK-3 β en muestras de displasia oral.

De las 30 muestras de displasia analizadas, 29 muestras resultaron positivas. Entre el 75% a 100% de las células epiteliales presentó presencia de GSK-3 β , en todos los estratos del epitelio (tabla 17).

De las 15 displasias leves, el 100% mostró localización citoplasmática de la proteína, y 2 muestras (13.3%) mostraron además localización nuclear (tabla 17 y figura 15C y D). Por otra parte, la intensidad fue evaluada como + (tabla 7). De las 14 displasias moderada/severas en total positivas, el 100% presentó localización citoplasmática del antígeno, y un caso de displasia severa (25%) presentó además localización nuclear y membranosa (tabla 17 y figura 15E, F, G y H). La intensidad del antígeno fue evaluada como ++ en las displasias moderadas y como ++/+++ en las severas (tabla 7).

4.5.3.2 Determinar y comparar la presencia y distribución de GSK-3 β en muestras de COCE.

De un total de 30 muestras de COCE analizadas, en la mayoría el 100% de las células epiteliales presentó presencia de GSK-3 β , en todos los estratos del epitelio (tabla 17).

De los 15 COCE bien diferenciados analizados, el 100% presentó localización citoplasmática de GSK-3 β , de los cuales 4 (26.7%) presentaron además localización nuclear (tabla 17 y figura 15I y J). En relación a la intensidad, esta fue evaluada como ++ (tabla 7). Del total de 15 COCE moderado y pobremente diferenciados, el 100% mostró presencia citoplasmática del antígeno, y casi la mitad de los moderadamente diferenciados presentaron además localización nuclear, con 6 casos (46.2%) en total (tabla 17 y figura 15K, L, M y N).

En los COCE moderadamente diferenciados la intensidad fue evaluada como ++, y en los pobremente diferenciados como +/++ (tabla 7).

Tabla 17. Expresión, porcentaje de células positivas y localización de GSK-3 β en mucosa oral normal, displasias y COCE

	MOS	DL	DM	DS	COCE BD	COCE MD	COCE PD
Casos totales	3 (100%)	15 (100%)	11 (100%)	4 (100%)	15 (100%)	13 (100%)	2 (100%)
Tinción							
Positiva	3 (100%)	15 (100%)	10 (90.9%)	4 (100%)	15 (100%)	13 (100%)	2 (100%)
Negativa	0	0	1 (9.1%)	0	0	0	0
% células positivas							
1-25%	0	0	0	0	0	0	0
25-50%	0	0	0	0	0	1 (7.7%)	0
50-75%	3 (100%)	3 (20%)	2 (20%)	1 (25%)	2 (13.3%)	0	0
75-100%	0	12 (80%)	8 (80%)	3 (75%)	13 (86.7%)	12 (92.3%)	2 (100%)
Localización epitelial							
Solo estratos inferiores	0	1 (6.7%)	1 (10%)	1 (25%)	0	0	0
Todos los estratos	3 (100%)	14 (93.3%)	9 (90%)	3 (75%)	15 (100%)	13 (100%)	2 (100%)
Localización subcelular							
Membrana	0	0	0	1 (25%)	0	0	0
Citoplasma	3 (100%)	15 (100%)	10 (100%)	4 (100%)	15 (100%)	13 (100%)	2 (100%)
Núcleo	0	2 (13.3%)	0	1 (25%)	4 (26.7%)	6 (46.2%)	0

MOS: mucosa oral sana; DL: displasia leve; DM: displasia moderada; DS: displasia severa; COCE BD: COCE bien diferenciado; COCE MD: COCE moderadamente diferenciado; COCE PD: COCE pobremente diferenciado.

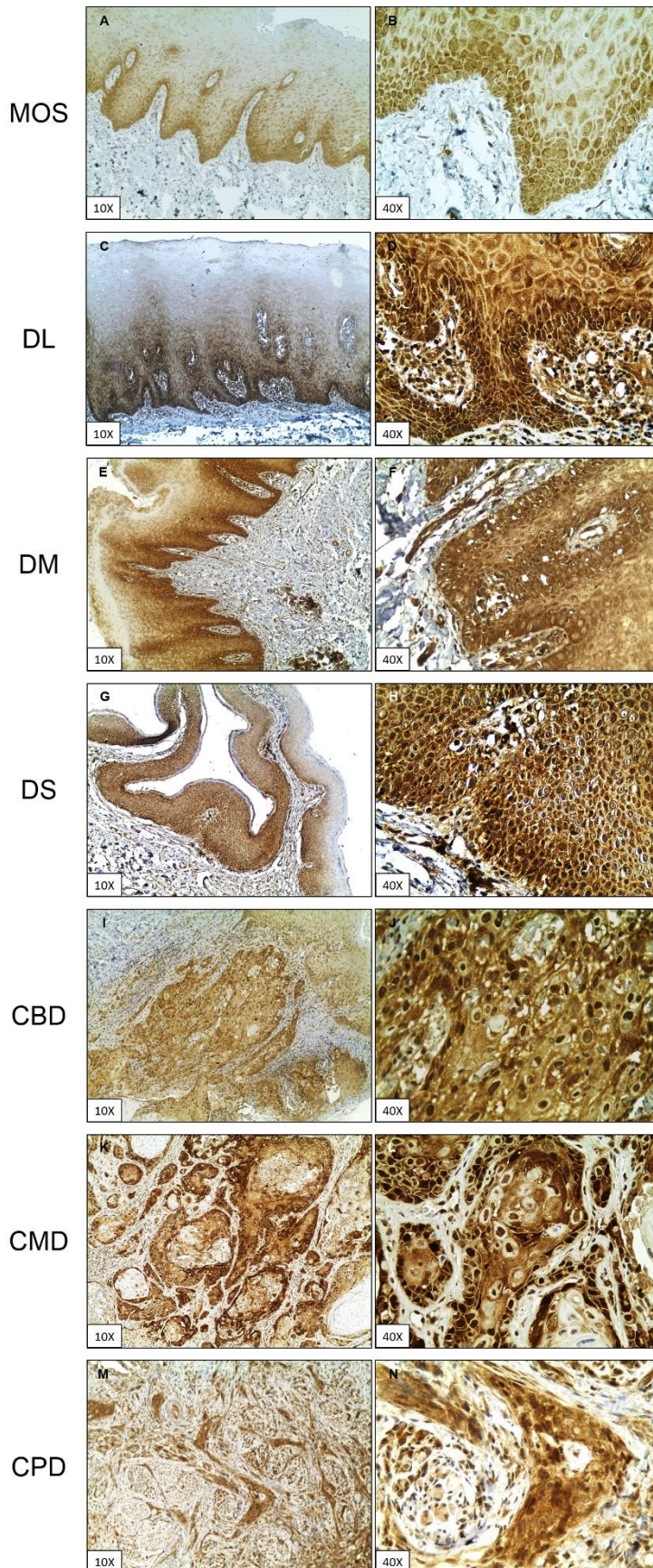


Figura 15. Expresión IHQ de GSK-3 β . En la mucosa oral sana (MOS) se observa expresión moderada citoplasmática de GSK-3 β (A, B). Las muestras de displasia leve (DL), moderada (DM) y severa (DS) presentan principalmente expresión citoplasmática de la proteína (C, D, E, F, G, H). La intensidad de expresión se observa mayor en las displasias moderada/severa en comparación a las leve (E, F, G, H). En el COCE bien diferenciado (CBD) la localización de GSK-3 β fue en general citoplasmática (I, J). Los COCE moderado (CMD) y pobremente diferenciado (CPD) presentaron mayor localización nuclear en comparación a las displasias (K, L, M, N). Aumentos 10x y 40x.

Las muestras de COCE moderado/pobrementemente diferenciado presentaron mayor localización nuclear de GSK-3 β en comparación a las muestras displasia, que presentaron principalmente una localización citoplasmática del antígeno (figura 16). En cuanto a la intensidad las muestras de displasia moderada/severa presentaron mayor intensidad en comparación a las muestras de displasia leve (tabla 18).

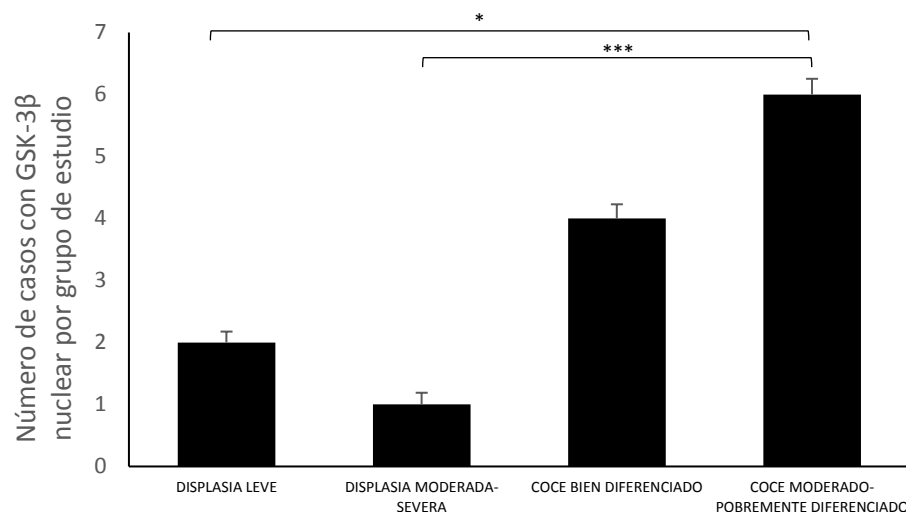


Figura 16. Localización nuclear de GSK-3 β . Número de casos con localización nuclear de GSK-3 β por grupo de estudio. El gráfico muestra el promedio \pm el error estándar (one-way ANOVA; * = $p \leq 0.05$ *** = $p \leq 0.001$).

Tabla 18. Comparación de la intensidad de GSK-3 β entre los diferentes grupos de estudio

Comparación de la intensidad de GSK-3 β entre los diferentes grupos de estudio

	DL	DM/DS	COCE/BD
DM/DS	***= $p \leq 0.001$		
COCE/BD	s.d	s.d	
COCE/MD/PD	s.d	s.d	s.d

DL: displasia leve; DM: displasia moderada; DS: displasia severa; COCE BD: COCE bien diferenciado; COCE MD: COCE moderadamente diferenciado; COCE PD: COCE pobrementemente diferenciado. One-way ANOVA; * = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$; ***= $p \leq 0.001$; s.d (sin diferencias).

5 CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

La activación aberrante de la vía Wnt/ β -catenina está comúnmente asociada a la progresión de varias patologías. Sin embargo, el rol de la activación aberrante y la relación existente entre sus componentes con el aumento de la expresión de β -catenina nuclear en la carcinogénesis oral no están completamente claros (13,41). Actualmente es sabido que el aumento de la expresión de β -catenina nuclear está asociado a un mayor grado de severidad de la displasia oral y la pérdida de su expresión de membrana se asocia a invasividad y a un peor pronóstico del COCE (15,18). El objetivo de esta tesis fue determinar la asociación que existe entre la detección de β -catenina nuclear y la expresión de los ligandos Wnt3a, Wnt5a y las proteínas del complejo de destrucción APC, Axina y GSK-3 β en displasia oral y COCE.

Los resultados de este estudio mostraron que aproximadamente el 77% de los casos de displasia oral fueron diagnosticados clínicamente como leucoplasia, lo que concuerda con la literatura (4,5). En cuanto a la caracterización por género, los casos diagnosticados como COCE bien diferenciados ocurrieron mayormente en mujeres (66.7%), y en los casos con menor grado de diferenciación predominaron los casos de sexo masculino (60%). Al respecto, se ha reportado que el COCE se presenta predominantemente en hombres, pero que ha ido en aumento en las mujeres en el último siglo (3,4,24). Nuestros resultados indicaron que la edad de los pacientes con COCE fue mayor de 60 (60%), similar a lo reportado en la literatura, siendo la edad media 64 años a nivel mundial (23).

En relación a la expresión nuclear de β -catenina, Sato *et al.*, fueron los primeros en demostrar que existe una acumulación intracitoplasmática y nuclear de β -catenina en displasias inducidas por carcinógenos en la mucosa oral de ratas (16). Posteriormente, Ishida *et al.*, indicaron que la expresión nuclear aumenta durante la progresión de la severidad de las displasias orales en leucoplasias (17). Reyes *et al.*, fueron los primeros en demostrar que existe un incremento en la expresión nuclear de β -catenina en las displasias de mayor severidad, pero no en COCE, sugiriendo a β -catenina como un marcador para la detección de la displasia oral (18). Los resultados obtenidos en esta tesis concuerdan con lo ya

observado, ya que la expresión β -catenina nuclear fue significativamente mayor en los casos de displasia moderada y severa en comparación con los casos de displasia de menor grado y COCE, en donde hubo una marcada disminución en la expresión de la proteína. Sin embargo, la causa de la activación de la vía Wnt y la posterior translocación de β -catenina al núcleo en estas lesiones siguen sin ser ampliamente estudiadas.

Se ha asociado la activación aberrante de la vía Wnt/ β -catenina con un aumento en la secreción de los ligandos Wnt en diferentes tipos de cáncer. Específicamente, el ligando Wnt3a activa la vía Wnt/ β -catenina y se ha observado que un aumento en la expresión de su ARNm estaría relacionado con una mayor susceptibilidad de desarrollar COCE (51), y que en el frente invasivo de biopsias de carcinoma oral hay niveles aumentados de la expresión de Wnt3a (6,52). Sin embargo, existen pocos estudios (17) que evalúen la expresión y el rol de Wnt3a y su relación con β -catenina en la displasia oral. Por otro lado, se ha descrito que el ligando Wnt5a puede activar la vía Wnt/ β -catenina, y que un aumento en los niveles de su expresión se correlacionaría con la severidad de la displasia, alcanzando los mayores niveles en COCE, lo que promovería la migración e invasión celular. Sin embargo, se cree que no existiría una relación directa entre la expresión de Wnt5a y β -catenina nuclear (19,20). Por lo anterior, en esta tesis se investigó mediante IHQ la asociación que existe entre la expresión de los ligandos Wnt3a y Wnt5a con la detección nuclear de β -catenina, esperando encontrar que la alteración de la expresión de los ligandos Wnt estuviera asociada a la detección de β -catenina nuclear. Los resultados revelaron que hubo expresión citoplasmática tanto de Wnt3a como de Wnt5a en el 100% de las células epiteliales en todos los casos de displasia y COCE. En el caso de Wnt3a, su intensidad fue mucho mayor en los casos de displasia moderada y severa en comparación con las displasias leves y COCE. Por otro lado, no se presentaron diferencias significativas en relación a la expresión del ligando Wnt5a entre las distintas muestras del estudio. En concordancia con lo esperado, el aumento en la intensidad de Wnt3a en las displasias de mayor grado se podría correlacionar con el aumento observado de β -catenina nuclear en las displasias, indicando una mayor secreción y actividad del ligando. En relación a esto, Ishida *et al.*, demostraron que la expresión de Wnt3a se relaciona con la carcinogénesis oral temprana, cuya expresión citoplasmática aumentaba en muestras que presentaban expresión nuclear de β -catenina (17). Al contrario de Wnt3a, la expresión de Wnt5a no tendría una relación directa con la expresión de β -catenina nuclear, por lo que

podría estar relacionada con la progresión del COCE sin estar asociada a β -catenina nuclear. Reyes *et al.*, en su estudio más reciente, fueron los primeros en dilucidar el rol de los ligandos Wnt en displasias con localización nuclear de β -catenina a través de ensayos *in vitro*, concluyendo que la secreción de Wnt3a es necesaria para la localización nuclear y función de β -catenina, mientras que la secreción Wnt5a no parece estar asociada (13). Por lo tanto, nuestros resultados coinciden con lo reportado y aportan evidencia a nivel de muestras de biopsias de pacientes respecto a la relación previamente establecida entre la expresión de los ligandos Wnt y β -catenina nuclear.

Si bien la activación aberrante de la vía Wnt/ β -catenina y la posterior translocación nuclear de β -catenina en el cáncer se han asociado con mutaciones en los componentes del complejo de destrucción (63,64,66), las mutaciones de los componentes de esta vía son poco frecuentes en la carcinogénesis oral (21,53,67), por lo que las mutaciones no estarían asociadas con la acumulación nuclear de β -catenina en displasia oral (13). Ante la ausencia de mutaciones que podrían explicar la activación de la vía Wnt en displasia oral, postulamos que la sobreexpresión de ligando Wnt3a provoca la activación de la vía Wnt mediante su unión a los receptores de membrana, lo cual estaría afectando los patrones de expresión de las proteínas del complejo de destrucción de β -catenina, y esto a su vez podría estar asociado a la detección nuclear de la proteína. Para probar nuestra hipótesis, en este estudio detectamos mediante IHQ la expresión de los componentes del complejo de destrucción APC, Axina y GSK-3 β en displasia oral y COCE.

β -catenina ejerce su actividad en el núcleo, por lo que es importante entender cómo es regulada la distribución de β -catenina entre el citoplasma y el núcleo (68). Debido a que β -catenina carece de secuencias de localización o exportación nuclear (69), son necesarias proteínas chaperonas que faciliten este transporte. Estudios previos han sugerido que la exportación nuclear de β -catenina por APC y Axina jugaría un rol importante en controlar la señalización Wnt. Ambas proteínas, mediante señales de exportación nuclear, promoverían la exportación de β -catenina hacia el citoplasma (68,70-75). Los resultados de nuestro estudio revelaron que la localización subcelular de APC y Axina fue en todos los casos citoplasmática. Se ha visto que las señales de exportación nuclear mantienen los niveles citoplasmáticos de APC y Axina (68,70,71,75). A nivel de carcinogénesis oral, Tsuchiya *et*

al., observaron localización citoplasmática de APC en displasia, mientras que en COCE fue además nuclear (53), y Chaw *et al.*, observaron que la localización fue citoplasmática y nuclear en displasia y COCE (48). Por otro lado, a nivel de otros tejidos se ha visto que la expresión de Axina no mutada tanto en condiciones normales como en cáncer es citoplasmática (76). Si bien en nuestro estudio no hubo cambios en la localización, se presentaron diferencias en la intensidad de la expresión de APC y Axina. La intensidad de APC fue significativamente mayor en las displasias moderada/severas en comparación con las leves, similar a lo observado por Tsuchiya *et al.* (53) y Chaw *et al.* (48). Por otra parte, la intensidad de Axina fue significativamente mayor en las displasias en comparación con los COCE, la cual disminuyó considerablemente en los pobremente diferenciados. A nivel de otros tejidos, en estudios como los de Nakajima *et al.*, se ha visto que la expresión citoplasmática de Axina disminuye en los casos de carcinoma (77); Xu *et al.*, observaron que los patrones de expresión de Axina se relacionarían con los de β -catenina (76). A nivel oral, Andrade Filho *et al.*, detectaron que aumento de expresión de Axina en COCE en comparación a la mucosa oral sana (51). Sin embargo, no hay evidencia a nivel de displasia oral, por lo que nuestra tesis aporta evidencia novedosa respecto a la expresión de Axina.

El hecho de que haya una sobreexpresión de estas proteínas en displasia oral al mismo tiempo que la acumulación nuclear de β -catenina es evidente, podría estar indicando que la expresión y función de APC y Axina podrían estar influenciadas por el aumento de la actividad de β -catenina en el núcleo. Al respecto, Chaw *et al.*, sugirieron que la sobreexpresión de APC podría ser una respuesta biológica al incremento de la expresión citoplasmática y/o nuclear de β -catenina, en un intento de prevenir la actividad tumorigénica (48). Por lo tanto, la evidencia avala nuestra creencia de que APC se sobreexpresa en el citoplasma en respuesta a un aumento de β -catenina nuclear, intentando disminuir la actividad nuclear de β -catenina desde el citoplasma. Por otro lado, si bien no hay evidencia respecto a la asociación de la expresión Axina y β -catenina en displasia oral, al igual que APC, la sobreexpresión de Axina podría ser una respuesta biológica al incremento de la expresión nuclear de β -catenina, y, aunque se presentaron casos aislados en nuestros resultados, no se puede descartar la idea de que la presencia de Axina en el núcleo en las displasias orales podría relacionarse con que esta estaría actuando como una chaperona de exportación/importación nuclear de β -catenina.

Se sabe que GSK-3 β es un regulador negativo de la vía Wnt/ β -catenina al fosforilar a β -catenina y provocar su posterior degradación vía proteosomal (8). Sin embargo, la activación de la señalización de Wnt por medio de la unión ligando-receptor inhibe la fosforilación de GSK-3 β , permitiendo la liberación citoplasmática de β -catenina (64,65). Andrade Filho *et al.*, observaron que un aumento en la expresión citoplasmática de GSK-3 β podría estar asociada al COCE (51). Sin embargo, en ningún estudio se han analizado los patrones de expresión de GSK-3 β en displasia oral y su asociación con la detección de β -catenina nuclear. Los resultados obtenidos en esta tesis mostraron que las muestras de COCE moderado/pobrementemente diferenciado presentaron mayor localización nuclear de GSK-3 β en comparación a las displasias, cuya localización fue principalmente citoplasmática. La literatura plantea que GSK-3 β también entra y sale del núcleo para regular la función de β -catenina (78,79). Caspi *et al.*, evidenciaron que, en líneas celulares de cáncer de colon, GSK-3 β tiene como función nuclear disminuir la actividad de β -catenina, mediante la formación de complejos con la proteína que conducen a una disminución en los niveles de transcripción mediados por el complejo β -catenina/TCF (80). De acuerdo a esto, nuestro estudio sería el primero en evidenciar a nivel de carcinogénesis oral que la presencia de GSK-3 β en el núcleo podría estar relacionada con la pérdida de la expresión de β -catenina nuclear en COCE, al estar inhibiendo su función como co-factor de la transcripción genética. Como APC y Axina, la intensidad de GSK-3 β fue mayor en las displasias de mayor grado. Del mismo modo, se podría pensar que hay una sobreexpresión citoplasmática de GSK-3 β en respuesta al aumento de β -catenina nuclear en las displasias orales moderada/severas. Por lo tanto, nosotros proponemos que GSK-3 β podría tener una doble función: regulando a β -catenina nuclear desde el citoplasma en las displasias orales, e inhibiendo la función de β -catenina aún presente en el núcleo en el COCE.

En base a los resultados expuestos, se puede concluir que la detección de β -catenina nuclear en muestras de displasia oral y COCE estaría asociada con la activación de la vía mediante el ligando Wnt3a, y que en respuesta a la activación y acumulación β -catenina en el núcleo, las proteínas del complejo de destrucción aumentarían su expresión al estar intentando regular los niveles de β -catenina nuclear en las displasias orales.

Los resultados de este estudio son relevantes ya que aportan información para la comprensión de cómo la alteración de los componentes de la vía Wnt/ β -catenina se asocian a la presencia de β -catenina nuclear en la carcinogénesis oral temprana al establecer por primera vez asociaciones de estos componentes, sirviendo como punto de partida para estudios posteriores y su posible uso como dianas terapéuticas de la progresión de la carcinogénesis oral temprana al COCE.

6 CAPITULO 6: CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación, se puede concluir lo siguiente:

1. La presencia de β -catenina nuclear se detectó principalmente a nivel de displasia moderada/severa, lo que concuerda con lo reportado en la literatura.
2. La expresión Wnt3a se presentó más intensa en las displasias moderada/severas, aumento que podría relacionarse con una mayor secreción del ligando, lo que conlleva a la activación de la vía Wnt y posterior translocación nuclear de β -catenina.
3. No hubo diferencias significativas respecto a la expresión de Wnt5a, por lo que probablemente no estaría relacionada con la activación de la vía y con β -catenina nuclear.
4. Se presentaron diferencias en la intensidad de APC a nivel de displasias, siendo mayor en las moderada/severas, lo que podría estar asociado a la expresión nuclear de β -catenina.
5. La intensidad de Axina fue mucho mayor a nivel de displasia moderada/severa en comparación con los COCE. Por esto, la sobreexpresión de Axina podría estar asociada a la expresión nuclear de β -catenina en la displasia, mientras que la disminución de su intensidad en COCE podría estar relacionada a la ausencia de β -catenina nuclear.
6. La expresión de GSK-3 β se evidenció nuclear en los casos de COCE, principalmente en los menos diferenciados, lo que explica la ausencia de β -catenina nuclear, ya que se ha reportado que en otros cánceres GSK-3 β en el núcleo inhibe a β -catenina.

7 CONSIDERACIONES ÉTICAS

La información disponible en las fichas clínicas de los pacientes, registradas y almacenadas en la Unidad de Biobanco de Patología Oral que comprenden variables demográficas (edad, sexo, nacionalidad, fecha de nacimiento y estado civil) y datos personales (nombres y apellidos, registro único tributario (RUT), domicilio, número telefónico, profesión o actividad y previsión social) fueron anonimizadas, mantenidas en estricta confidencialidad y secreto profesional, y no fueron utilizadas con fines comerciales o divulgación a terceros en ámbitos no académicos/científicos.

Este estudio contó con la aprobación del comité de ética perteneciente a la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile para el proyecto *Role of the endosomal GTPase Rab5 in the transcriptional activity of β -catenin in oral dysplasia* cuya responsable es Montserrat Reyes.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Huang Liu R, Chen SP, Lu TM, Tsai WY, Tsai CH, Yang CC, et al. Selective apoptotic cell death effects of oral cancer cells treated with destruxin B. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2014; 14(207).
2. Kirsch C. Oral cavity cancer. *Topics in Magnetic Resonance Imaging*. 2007; 18(4): p. 269-280.
3. Feller L, Lemmer J. Oral squamous cell carcinoma: Epidemiology, clinical presentation and treatment. *Journal of Cancer Therapy*. 2012; 3: p. 263-268.
4. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2002; 54: p. 195-215.
5. Speight PM. Update on oral epithelial dysplasia and progression to cancer. *Head and Neck Pathology*. 2007; 1: p. 61-66.
6. Uraguchi M, Morikawa M, Shirakawa M, Sanada K, Imai K. Activation of WNT family expression and signaling in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Journal of Dental Research*. 2004; 83(4): p. 327-332.
7. Iwai S, Katagiri W, Kong C, Amekawa S, Nakazawa M, Yura Y. Mutations of the APC, beta-catenin, and axin 1 genes and cytoplasmic accumulation of beta-catenin in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2005; 131: p. 773-782.
8. Noguti J, Gomes de Moura CF, Hossaka TA, Franco M, Oshima CT, Dedivitis RA, et al. The role of canonical WNT signaling pathway in oral carcinogenesis: a comprehensive review. *Anticancer Research*. 2012; 32(3): p. 873-878.
9. Ochoa-Hernández AB, Juárez-Vázquez CI, Rosales-Reynoso MA, Barros-Núñez P. La vía de señalización Wnt- β -catenina y su relación con el cáncer. *Cirugía y Cirujanos*. 2012; 80(4): p. 389-398.
10. Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Research*. 2005; 15(1): p. 28-32.
11. Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of b-catenin. *The EMBO Journal*. 2012; 31: p. 2714-2736.
12. Logan CY, Nusse R. The wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2004; 20: p. 781-810.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

13. Reyes M, Peña-Oyarzun D, Maturana A, Torres VA. Nuclear localization of β -catenin and expression of target genes are associated with increased Wnt secretion in oral dysplasia. *Oral Oncology*. 2019; 94(1): p. 58-67.
14. González-Moles MA, Ruiz-Ávila I, Gil-Montoya JA, Plaza-Campillo J, Scully C. b-Catenin in oral cancer: An update on current knowledge. *Oral Oncology*. 2014; 50(818-824).
15. Iwai S, Yonekawa A, Harada C, Hamada M, Katagiri W, Nakazawa M, et al. Involvement of the Wnt- β -catenin pathway in invasion and migration of oral squamous carcinoma cells. *International Journal of Oncology*. 2010; 37: p. 1095-1103.
16. Sato K, Okazaki Y, Tonogi M, Tanaka Y, Yamane Gy. Expression of b-catenin in rat oral epithelial dysplasia induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Oral Oncology*. 2002; 38: p. 772-778.
17. Ishida K, Ito S, Wada N, Deguchi H, Hata T, Hosoda M, et al. Nuclear localization of beta-catenin involved in precancerous change in oral leukoplakia. *Molecular Cancer*. 2007; 6(62).
18. Reyes M, Rojas-Alcayaga G, Maturana A, Aitken JP, Rojas C, Ortega AV. Increased nuclear β -catenin expression in oral potentially malignant lesions: A marker of epithelial dysplasia. *Medicina Oral, Patología Oral, Cirugía Bucal*. 2015; 20(5): p. 540-546.
19. Prgomet Z, Andersson T, Lindberg P. Higher expression of WNT5A protein in oral squamous cell carcinoma compared with dysplasia and oral mucosa with a normal appearance. *European Journal of Oral Sciences*. 2017; 125: p. 237-246.
20. Prgomet Z, Axelsson L, Lindberg P, Andersson T. Migration and invasion of oral squamous carcinoma cells is promoted by WNT5A, a regulator of cancer progression. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2015; 44: p. 776-784.
21. Yeh KT, Chang JG, Wang YE, Chang JY, Shih MC, Lin CC. Correlation between protein expression and epigenetic and mutation changes of Wnt pathway-related genes in oral cancer. *International Journal of Oncology*. 2003; 23(4): p. 1001-1007.
22. Fronie A, Bunget A, Afrem E, Preotescu LL, Corlan Puscu P, Streba L, et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinical and pathological aspects. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. 2013; 53(2): p. 343-348.

23. Riera P, Martínez B. Morbidity and mortality for oral and pharyngeal cancer in Chile. *Revista Médica Chilena*. 2005; 133: p. 555-563.
24. Johnson NW, Jayasekara P, Amarasinghe HK. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. *Periodontology* 2000. 2011; 57(1).
25. Rojas-Alcayaga G, Brignardello R, Espinoza I, Franco ME, Lobos N, Ortega-Pinto AV. Oral malignant tumours: a report on 728 cases in Chile. *Acta Odontológica Latinoamericana*. 2010; 23(2): p. 136-142.
26. de Camargo Cancela M, Voti L, Guerra-Yi M, Chapuis F, Mazuir M, Curado MP. Oral cavity cancer in developed and in developing countries: population-based incidence. *Head & Neck*. 2010; 32(3): p. 357-367.
27. Martínez C, Hernández M, Martínez B, Adorno D. Frecuencia de displasia epitelial y carcinoma escamoso en mucosa oral y orofaríngea en Chile, entre los años 1990 y 2009. *Revista Médica de Chile*. 2016; 144: p. 169-174.
28. Fang KH, Kao HK, Cheng MH, Chang YL, Tsang NM, Huang YC, et al. Histological differentiation of primary oral squamous cell carcinomas in an area of betel quid chewing prevalence. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*. 2009; 141: p. 743-749.
29. Radhakrishnan R, Shrestha B, Bajracharya D. Oral cancer - An overview. In Ogbureke KUE, editor. *Oral Cancer*. Rijeka: InTech; 2012. p. 47-64.
30. Leston JS, Dios PD. Diagnostic clinical aids in oral cancer. *Oral Oncology*. 2010; 46: p. 418-422.
31. Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2007; 36: p. 575-580.
32. van del Waal I. Oral potentially malignant disorders: Is malignant transformation predictable and preventable? *Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal*. 2014; 19(4): p. 386-390.
33. Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2008; 37: p. 127-133.
34. Dost F, Le Cao K, Ford PJ, Ades C, Farah CS. Malignant transformation of oral epithelial dysplasia: a real-world evaluation of histopathologic grading. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology*. 2014; 117(3): p. 343-352.

35. International Agency for Research on Cancer. WHO Classification of Head and Neck Tumours. Cuarta ed. El-Naggar AK, Chan JC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, editors.; 2017.
36. Duchartre Y, Kim YM, Kahn M. The Wnt Signaling Pathway in Cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2016; 99: p. 141-149.
37. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental Cell*. 2010; 17(1).
38. Tortelote GG, Reis RR, de Almeida Mendes F, Garcia Breu J. Complexity of the Wnt/ β -catenin pathway: Searching for an activation model. *Cellular Signaling*. 2017; 40: p. 30-43.
39. Alok A, Lei Z, Jagannathan NS, Kaur S, Harmston N. Wnt proteins synergize to activate β -catenin signaling. *Journal of Cell Science*. 2017; 130(9): p. 1532-1544.
40. Clevers H, Nusse R. Wnt/b-Catenin Signaling and Disease. *Cell*. 2012; 149: p. 1192-1205.
41. Ferreira Andrade M, Mota Loyola A, Barbosa Silva MJ, da Silva Morales A, Matsuo FS, Vitorino Cardoso S, et al. The role of β -catenin in the context of oral squamous cell carcinoma and its clinical implications. In Braunfeld A, Mirsky GR, editors. *Beta-Catenin*. Primera ed.: Nova Science Publishers; 2013.
42. Kim W, Kim M, Jho Eh. Wnt/ β -catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. *Biochemical Journal*. 2013; 450(1): p. 9-21.
43. Nusse R. Wnt Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2012;(4): p. a011163.
44. Novellademunt L, Antas P, Li VSW. Targeting Wnt signaling in colorectal cancer. A Review in the Theme: Cell Signaling: Proteins, Pathways and Mechanisms. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2015; 309: p. 511-521.
45. Bailey T, Biddlestone L, Shepherd N, Barr H, Warner P, Jankowski J. Altered cadherin and catenin complexes in the Barrett's esophagus-dysplasia-adenocarcinoma sequence: correlation with disease progression and dedifferentiation. *The American Journal of Pathology*. 1998; 152(1): p. 135-144.
46. Hao X, Palazzo JP, Ilyas M, Tomlinson I, Talbot IC. Reduced expression of molecules of the cadherin/catenin complex in the transition from colorectal adenoma to carcinoma. *Anticancer Search*. 1997; 17(3C): p. 2241-2247.

47. Psyrri A, Kotoula V, Fountzilas E, Alexopoulou Z, Bobos M, Televantou D, et al. Prognostic significance of the Wnt pathway in squamous cell laryngeal cancer. *Oral Oncology*. 2014; 50(4): p. 298-305.
48. Chaw SY, Abdul Majeed A, Dalley AJ, Chan A, Stein S, Farah CS. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers – E-cadherin, beta-catenin, APC and Vimentin – in oral squamous cell carcinogenesis and transformation. *Oral Oncology*. 2012; 48: p. 997-1006.
49. Lo Muzio L, Lo Russo L, Falaschini S, Ciavarella D, Pentenero M, Arduino P, et al. beta- and gamma-catenin expression in oral dysplasia. *Oral Oncology*. 2009; 45: p. 501-504.
50. Shiah SG, Hsiao JR, Chang WM, Chen YW, Jin YT, Wong TY, et al. Downregulated miR329 and miR410 Promote the Proliferation and Invasion of Oral Squamous Cell Carcinoma by Targeting Wnt-7b. *Cancer Research*. 2014; 74(24): p. 7560-7572.
51. Andrade Filho PA, Letra A, Cramer A, Prasad JL, Garlet GP, Vieira AR, et al. Insights from Studies with Oral Cleft Genes Suggest Associations between WNT-pathway Genes and Risk of Oral Cancer. *Journal of Dental Research*. 2011; 90(6): p. 740-746.
52. Sogabe Y, Suzuki H, Toyota M, Ogi K, Imai T, Nojima M, et al. Epigenetic inactivation of SFRP genes in oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Oncology*. 2008; 32(6): p. 1253-1261.
53. Tsuchiya R, Yamamoto G, Nagoshi Y, Aida T, Irie T, Tachikawa T. Expression of adenomatous polyposis coli (APC) in tumorigenesis of human oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*. 2004; 40: p. 932-940.
54. Horii A, Nakatsuru S, Miyoshi Y, Ichii S, Nagase H, Kato Y, et al. The APC gene, responsible for familial adenomatous polyposis, is mutated in human gastric cancer. *Cancer Research*. 1992; 52(11): p. 3232-3233.
55. Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, et al. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Human Molecular Genetics*. 1992; 1(4): p. 229-233.
56. Boynton RF, Blount PL, Yin J, Brown VL, Huang Y, Tong Y, et al. Loss of heterozygosity involving the APC and MCC genetic loci occurs in the majority of human esophageal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992; 89(8): p. 3385-3388.
57. Horii A, Nakatsuru S, Miyoshi Y, Ichii S, Nagase H, Ando H, et al. Frequent somatic mutations of the APC gene in human pancreatic cancer. *Cancer Research*. 1992; 52(23): p. 6696-6698.

58. D'Amico DB, Carbone DP, Johnson BE, Meltzer SJ, Minna JD. Polymorphic sites within the MCC and APC loci reveal very frequent loss of heterozygosity in human small cell lung cancer. *Cancer Research*. 1992; 52: p. 1996-1999.
59. Largey JS, Meltzer SJ, Sauk JJ, Hebert CA, Archibald DW. Loss of heterozygosity involving the APC gene in oral squamous cell carcinomas. *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology*. 1994; 77(3): p. 260-263.
60. Chang KW, Lin SC, Mangold KA, Jean MS, Yuan TC, Lin SN, et al. Alterations of adenomatous polyposis Coli (APC) gene in oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2000; 29(3): p. 223-226.
61. Kikuchi A. Roles of Axin in the Wnt Signalling Pathway. *Cellular Signalling*. 1999; 11(11): p. 777-778.
62. Ishizaki Y, Ikeda S, Fujimori M, Shimizu Y, Kurihara T, Itamoto T, et al. Immunohistochemical analysis and mutational analyses of B-catenin, Axin family and APC genes in hepatocellular carcinomas. *International Journal of Oncology*. 2004; 24: p. 1077-1083.
63. Clevers H. Axin and hepatocellular carcinomas. *Nature Genetics*. 2000; 24(3): p. 206-208.
64. Ma C, Wang J, Gao Y, Gao TW, Chen G, Bower KA, et al. The role of glycogen synthase kinase 3beta in the transformation of epidermal cells. *Cancer Research*. 2007; 67: p. 7756-7764.
65. Mishra R. Glycogen synthase kinase 3 beta: can it be a target for oral cancer. *Molecular Cancer*. 2010; 9(144): p. 1-15.
66. Su LK, Vogelstein B, Kinzler KW. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science*. 1993; 262: p. 1734-1737.
67. Gasparoni A, Chaves A, Fonzi L, Johnson GK, Schneider GB, Squier CA. Subcellular localization of beta-catenin in malignant cell lines and squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2002; 31: p. 385-394.
68. Cong F, Varmus H. Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of β -catenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004; 101(9): p. 2882-2887.
69. Fagotto F, Glück U, Gumbiner BM. Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of β -catenin. *Current Biology*. 1998; 8(4): p. 181-190.

70. Wiechens N, Heinle K, Englmeier L, Schohl A, Fagotto F. Nucleo-cytoplasmic Shuttling of Axin, a Negative Regulator of the Wnt-b-Catenin Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279(7): p. 5263-5267.
71. Henderson BR. Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates b-catenin subcellular localization and turnover. *Nature Cell Biology*. 2000; 2(1): p. 653-660.
72. Neufeld KL, Nix DA, Bogerd H, Kang Y, Beckerle MC, Cullen BR, et al. Adenomatous polyposis coli protein contains two nuclear export signals and shuttles between the nucleus and cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000; 97(2): p. 12085-12090.
73. Rosin-Arbesfeld R, Townsley F, Bienz M. The APC tumour suppressor has a nuclear export function. *Nature*. 2000; 406: p. 1009-1012.
74. Bienz M. The subcellular destinations of APC proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2002; 3: p. 328-338.
75. Rosin-Arbesfeld R, Cliffe A, Brabletz T, Bienz M. Nuclear export of the APC tumour suppressor controls b-catenin function in transcription. *The EMBO Journal*. 2003; 22(5): p. 1101-1113.
76. Xu HT, Wang L, Lin D, Liu Y, Liu N, Yuan XM, et al. Abnormal β -Catenin and Reduced Axin Expression Are Associated With Poor Differentiation and Progression in Non-Small Cell Lung Cancer. *Anatomic Pathology*. 2006; 125: p. 534-541.
77. Nakajima M, Fukuchi M, Miyazaki T, Masuda N, Kato H, Kuwano H. Reduced expression of Axin correlates with tumour progression of oesophageal squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer*. 2003; 88: p. 1734-1739.
78. Bijur GN, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 β is highly activated in nuclei and mitochondria. *NeuroReport*. 2003; 14(18): p. 2415-2419.
79. Schmitz Y, Rateitschak K, Wolkenhauer O. Analysing the impact of nucleo-cytoplasmic shuttling of β -catenin and its antagonists APC, Axin and GSK3 on Wnt/ β -catenin signalling. *Cellular Signalling*. 2013; 25: p. 2210-2221.
80. Caspi M, Zilberberg A, Eldar-Finkelman H, Rosin-Arberfeld R. Nuclear GSK-3 β inhibits the canonical Wnt signalling pathway in a b-catenin phosphorylation-independent manner. *Nature*. 2008; 27: p. 3546-3555.
81. Krishnamurthy N, Kurzrock R. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. *Cancer Treatment Reviews*. 2018; 62: p. 50-60.
82. Yavropoulou MP, Yovos JG. The role of the wnt signaling pathway in osteoblast commitment and differentiation. *Hormones*. 2007; 6(4): p. 279-294.

83. Fleskens S, Slootweg P. Grading systems in head and neck dysplasia: their prognostic value, weaknesses and utility. *Head & Neck Oncology*. 2009; 1(11).
84. Ying J, Li H, Yu J, Ng KM, Poon FF, Wong SC, et al. WNT5A exhibits tumor-suppressive activity through antagonizing the Wnt/beta-catenin signaling, and is frequently methylated in colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*. 2015; 14: p. 55-61.
85. Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G, Rosenblatt K, Duray P, Bittner M, et al. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell*. 2002; 1: p. 279-288.
86. Anderson CB, Neufeld KL, White RL. Subcellular distribution of Wnt pathway proteins in normal and neoplastic colon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002; 99(13): p. 8683-8688.
87. Clevers H. Axin and hepatocellular carcinomas. *Nature Genetics*. 2000; 24: p. 206-208.

9 APÉNDICES

APÉNDICE A: Procesamiento histológico de Hematoxilina-Eosina

A.1 Desparafinado e hidratación

- | | |
|----------------------------|--------|
| 1. Xilol I | 10 min |
| 2. Xilol II | 10 min |
| 3. Alcohol 100° I | 10 min |
| 4. Alcohol 100° II | 10 min |
| 5. Alcohol 95° | 10 min |
| 6. Alcohol 70° | 10 min |
| 7. Lavar en agua corriente | 5 min |

A.2 Tinción con Hematoxilina-Eosina

- | | |
|--|------------------------------------|
| 1. Hematoxilina de Harris | 3 min |
| 2. Lavar en agua corriente | hasta que el agua salga cristalina |
| 3. Azular en Bórax saturado | 1 <i>dipping</i> |
| 4. Lavar en agua corriente | 2 min |
| 5. Eosina acuosa 5% | 5 min |
| 6. Lavado en agua corriente | hasta que el agua salga cristalina |
| 7. Alcohol 70° | 15 <i>dippings</i> |
| 8. Alcohol 95° | 15 <i>dippings</i> |
| 9. Alcohol 100° I | 15 <i>dippings</i> |
| 10. Alcohol 100° II | 15 <i>dippings</i> |
| 11. Xilol I | 15 <i>dippings</i> |
| 12. Xilol II | 15 <i>dippings</i> |
| 13. Montaje con Flo-texx (Lerner Laboratories) | |

APÉNDICE B: Técnica de Inmunohistoquímica

B.1 Desparafinado e hidratación

- | | |
|----------------------------|-----------|
| 1. Xilol I | 15 min |
| 2. Xilol II | 15 min |
| 3. Alcohol 100° I | 10 min |
| 4. Alcohol 100° II | 10 min |
| 5. Alcohol 95° | 10 min |
| 6. Alcohol 70° | 10 min |
| 7. Lavar en agua destilada | 3 cambios |

B.2 Técnica de inmunohistoquímica

1. Recuperación antigénica en Citrato pH 6.0 o en Tris-EDTA pH 9.0 en olla a presión eléctrica marca Oster, 44 min.
2. Lavado en agua destilada, 3 cambios.
3. Lavado en PBS 1X, 3 cambios, 5 min c/u.
4. En cámara húmeda, encerrar las muestras con un lápiz hidrófobo y dejarlos en *coppling* con PBS 1X. Secarlas y dejarlas nuevamente en la cámara húmeda.
5. Incubar con Peróxido de Hidrógeno 3% en metanol a T° ambiente, 15 min.
6. Lavar en PBS 1X en *coppling*, 3 cambios 5 min c/u.
7. Pre-incubar con Suero de caballo RTU VECTOR NORMAL HOUSE SERUM (2,5%) marca VECTOR a T° ambiente, 30 min.
8. Mientras las muestras están siendo pre-incubadas, preparar el anticuerpo primario en BSA 5% o en Tris-HCl, dependiendo del anticuerpo.
9. Incubar con el anticuerpo primario en la cámara húmeda a 37°C por 1 hora, o a 4°C *Overnight*.
10. Lavar en PBS 1X en *coppling*, 3 cambios 5 min c/u.
11. Incubar con el anticuerpo secundario R.T.U BIOTINYLATED UNIVERSAL ANTIBODY ANTI-RABBIT/MOUSE IgG marca VECTOR en cámara húmeda por 30 minutos a 37°C.
12. Lavar en PBS 1X en *coppling*, 3 cambios 5 min c/u.

13. Incubar con peroxidasa-estreptavidina conjugada R.T.U ELITE ABC REAGENT marca VECTOR en cámara húmeda por 30 minutos a 37°C.
14. Lavar en PBS 1X en *coppling*, 3 cambios 5 min c/u.
15. Incubar con diaminobencidina (DAB), preparado en 1000 µl de IMPACT DAB PEROXIDASE SUBSTRATE KIT SK-4105 marca VECTOR por 5 minutos a T° ambiente.
16. Lavar en agua corriente, 5 min.
17. Teñir los núcleos con Hematoxilina de Harris, de 30 segundos a 1 minuto.
18. Lavar en agua corriente hasta que salga cristalina.
19. Azular en bórax saturado, 1 *dipping*.
20. Lavar en agua corriente rápidamente.
21. Alcohol 70°, 15 *dippings*.
22. Alcohol 95°, 15 *dippings*.
23. Alcohol 100° I, 15 *dippings*.
24. Alcohol 100° II, 15 *dippings*.
25. Xilol I, 15 *dippings*.
26. Xilol II, 15 *dippings*.
27. Montar con medio de montaje Flo-Texx.