



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL
ÁREA DE ANATOMÍA PATOLÓGICA**

**PAPEL DEL CALCITRIOL EN LA REGULACIÓN DE
 β -CATENINA EN DISPLASIA ORAL**

Constanza Del Rosario Brunetto Guzmán

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Montserrat Reyes Rojas

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Andrea Maturana Ramírez

Prof. Daniel Peña Oyarzún

**Adscrito a Proyecto U-Inicia 024/19, FONDECYT 11221000, PRIO-ODO 19-001
Santiago – Chile
2022**



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL
ÁREA DE ANATOMÍA PATOLÓGICA**

**PAPEL DEL CALCITRIOL EN LA REGULACIÓN DE
β-CATENINA EN DISPLASIA ORAL**

Constanza Del Rosario Brunetto Guzmán

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Montserrat Reyes Rojas

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Andrea Maturana Ramírez

Prof. Daniel Peña Oyarzún

**Adscrito a Proyecto U-Inicia 024/19, FONDECYT 11221000, PRI-ODO 19-001
Santiago - Chile
2022**

DEDICATORIA

*A Lucrecia, Irene, Paola, Ana María y María Cecilia,
las mujeres que admiro.
Y a mi familia.*

AGRADECIMIENTOS

Posiblemente no me alcancen las palabras para expresar mi gratitud a todas las personas que me han acompañado y guiado a lo largo de esta carrera sin generar un escrito completamente aparte a este trabajo, pero en primer lugar quiero agradecerle a mi tutora, la Profesora Montserrat Reyes Rojas y al equipo del Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile quienes me permitieron ser partícipe de este proyecto brindándome su ayuda durante todo el proceso.

A mi familia: mi mamá Paola, mi abuela Irene, mi hermanito Cristóbal y mis tíos Gino, Anita y Raúl, por siempre estar a mi lado brindándome amor y apoyo incondicional desde que tengo memoria. Gracias a sus enseñanzas, valores y constante fe en mi persona he podido llegar hasta este momento. Mis logros son sus logros, gracias por su amor y presencia en mi vida.

A la familia Matus – Ramírez, mi familia extendida con quienes nos encontramos de una forma más que anecdótica gracias a la FOUCH y las vueltas de la vida, pero que no puedo estar más agradecida por su acogida y cariño que he sentido desde el primer momento.

A mis amigos Diego y Almendra por siempre estar en el momento y lugar indicado, creyendo en mi aun cuando yo misma no he podido hacerlo y traerme a tierra todas las veces que sean necesarias para cumplir mis objetivos.

Y a Marcelo, el mejor compañero que la vida me pudo dar.

Aquellos que han pasado por esta carrera saben bien que no es un proceso fácil, pero con un poco de suerte, al mirar en retrospectiva podremos ver todo el amor y risas que nos acompañaron en el proceso dejándonos, además de un título profesional, aprendizajes de vida y nuevas personas a quienes podemos llamar familia.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE

1. RESUMEN	9
2. INTRODUCCIÓN	11
3. MARCO TEÓRICO	12
3.1 Cáncer Oral	12
3.2. Desórdenes Potencialmente Malignos	13
3.3. Displasia Epitelial Oral	13
3.4 Valor Pronóstico de la Displasia Epitelial Oral	14
3.5. Vía de Señalización Wnt/ β -Catenina	14
3.6. Vía Wnt/ β -catenina y Carcinogénesis Oral	16
3.7. Calcitriol y Cáncer	17
3.8. Calcitriol y Cáncer Oral	19
3.9. Calcitriol y Vía Wnt/ β -catenina	20
3.10. Formulación del Problema	20
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS	21
5.1. Objetivo General	21
5.2. Objetivos Específicos	21
6. METODOLOGÍA	22
6.1. Cultivo celular	22
6.2. Tratamiento con $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	22
6.3. Inmunofluorescencia en línea celular DOK	22
6.4. Modelo de explante oral	23

6.4.1 Obtención de explantes de tejido oral:	23
6.4.2 Procesamiento de muestras en bloques de parafina	24
6.4.2 Inmunohistoquímica en tejidos incluidos en parafina	24
6.5 Viabilidad Celular.....	26
6.6 Migración celular.....	26
6.7 Análisis estadístico	27
7. RESULTADOS	28
7.1 OBJETIVO ESPECÍFICO N°1: Determinar el efecto del calcitriol en la localización de β -catenina en células de displasia oral	28
7.1.1 Las células de displasia oral DOK tratadas con calcitriol presentan una disminución en la localización nuclear de β -catenina en comparación a células de displasia oral DOK no tratadas.....	28
7.2 OBJETIVO ESPECÍFICO N°2: Determinar el requerimiento de calcitriol en la localización de β -catenina en un modelo de explante oral	30
7.2.1 Los explantes provenientes de desórdenes potencialmente malignos con diagnóstico de displasia oral tratados con calcitriol presentan una disminución en la localización nuclear de β -catenina en comparación a explantes no tratados.	30
7.3 OBJETIVO ESPECÍFICO N°3: Determinar el efecto del calcitriol sobre la viabilidad celular en células de displasia oral.	32
7.3.1. Las células de displasia oral DOK tratadas con calcitriol presentan una disminución en su viabilidad celular en comparación a células de displasia oral DOK no tratadas.....	32
7.4 OBJETIVO ESPECÍFICO N°4: Determinar el efecto del calcitriol sobre la migración celular en células de displasia oral.....	33
7.4.1. Las células de displasia oral DOK tratadas con calcitriol presentan una disminución en su migración celular en comparación a células de displasia oral DOK no tratadas.....	33

8. DISCUSIÓN	35
9. CONCLUSIONES	39
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
11. ANEXOS	45
11.1. Anexo 1	45
11.2. Anexo 2	45
11.3. Anexo 3	45

1. RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La activación anormal de la vía Wnt/ β -catenina ha sido demostrada en displasia oral, asociándose a proliferación y transformación maligna de estas. A su vez se ha observado que el calcitriol es capaz de inhibir dicha activación en diversos tipos de neoplasias, no existiendo evidencia a la fecha sobre su rol en displasia oral.

OBJETIVOS

El objetivo de este estudio es determinar si el calcitriol inhibe la localización nuclear de β -catenina, la viabilidad y migración celular en células de displasia oral.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un cultivo celular de células DOK (dysplastic oral keratinocyte), incubadas a 37°C con 5% CO₂. Las células fueron tratadas con calcitriol (1 α ,25(OH)₂D₃) a una concentración de a 0.1 μ M por 48 horas. Se evaluó la localización nuclear de β -catenina a través de inmunofluorescencia en células DOK e inmunohistoquímica en células provenientes de explantes de pacientes con diagnóstico de displasia oral. La viabilidad celular se estudió mediante un ensayo MTS, determinando la reducción del compuesto MTS en formazán mediante la medición de la absorbancia a 490 nm. Finalmente, la migración celular se determinó por medio de un ensayo Transwell. Se realizó el análisis estadístico de al menos 3 experimentos independientes a través de un t-test. Un valor $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Se observó una disminución significativa en la localización nuclear de β -catenina, la viabilidad y migración celular en células de displasia oral tratadas con calcitriol.

CONCLUSIONES

El tratamiento con calcitriol en células y tejidos de displasia oral disminuye la localización nuclear de β -catenina, la viabilidad y migración celular.

La inhibición de β -catenina a través de la administración de calcitriol, podría ser una terapia prometedora en la progresión de la displasia oral.

2. INTRODUCCIÓN

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, siendo a nivel global el responsable de 8.8 millones de defunciones en el año 2015 y sólo en Chile el responsable del 23% del total de muertes anuales (Riera S & Martínez R, 2005). El cáncer oral y orofaríngeo representan el 1.6% del total de cánceres en nuestro país, en donde el más frecuente en la cavidad oral corresponde al carcinoma oral de células escamosas (COCE) (Riera S & Martínez R, 2005). La gran mayoría de las veces el COCE está precedido por lesiones cuyo diagnóstico histopatológico es de displasia epitelial, la cual corresponde a alteraciones celulares y tisulares en el epitelio oral, que revelan una modificación en la maduración celular del epitelio y un aumento de la actividad proliferativa (van der Waal 2014).

La progresión del cáncer oral y específicamente sus alteraciones moleculares, no son totalmente comprendidas (Nasser et al., 2011). Al respecto, una de las vías de señalización comúnmente alterada en distintos tipos de cánceres, como por ejemplo en el cáncer colorrectal, es la vía Wnt/ β -catenina (Novellasmunt et al., 2015). Estudios recientes en displasias orales, han reportado la translocación nuclear de β -catenina y la transcripción de genes asociados a la proliferación celular en distintos estados de progresión de la displasia oral hacia el cáncer (Reyes et al., 2019).

Por otro lado, estudios previos sobre cánceres que presentan una activación aberrante de Wnt/ β -catenina, han reportado que el calcitriol actuaría inhibiendo la translocación nuclear de β -catenina y por lo tanto la progresión del cáncer (Deeb et al., 2007). Sin embargo, existen escasos estudios sobre una posible regulación de la vía Wnt/ β -catenina dependiente de calcitriol en carcinogénesis oral, lo cual podría abrir nuevas dianas terapéuticas para inhibir la progresión de este tipo de cáncer.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Cáncer Oral

El cáncer oral es un subtipo de cáncer de cabeza y cuello que se puede manifestar por medio de diversos tipos de neoplasias malignas en los tejidos que recubren la boca, encías y lengua, dentro de las cuales se encuentran tumores epiteliales malignos, carcinomas de glándulas salivales, tumores de tejidos blandos de la mucosa, tumores de tejidos hematolinfoides, melanomas y tumores secundarios (El-Naggar et al., 2017). Corresponde a una de las lesiones neoplásicas más comunes de cabeza y cuello (Alshafi et al., 2019) y se ubica como el sexto cáncer más común a nivel mundial (Warnakulasuriya, 2010; Rhodus et al., 2014). Aproximadamente el 90% de los cánceres orales, son diagnosticados como Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE), los cuales se originan en el epitelio estratificado no queratinizado de la mucosa oral (El-Naggar et al., 2017).

Los principales factores de riesgo relacionados al desarrollo del COCE son el consumo de tabaco y alcohol (Dissanayaka et al., 2012), siendo el sitio más común para el desarrollo del COCE la lengua, seguido por el piso de boca (El-Naggar et al., 2017). Clínicamente, el COCE se presenta principalmente como una úlcera de aspecto necrótico con bordes irregulares, elevados y endurecidos a la palpación en la mucosa superficial (Anexo 1, Figura 1a y 1b) (Pindborg et al., 1997).

El diagnóstico temprano del COCE ha surgido como un objetivo prioritario en salud pública. 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 (El-Naggar et al., 2017). Normalmente el COCE es diagnosticado tardíamente en etapas avanzadas de la enfermedad y esto está directamente relacionado con que el pronóstico sea bastante desfavorable, pues se ha reportado que la tasa de supervivencia a dos años es del 48,3% y a cinco años del 33,9% (Maraboli y cols., 2018). Para mejorar el pronóstico del COCE, es de suma importancia la detección

temprana de desórdenes orales potencialmente malignos que pueden evolucionar a tumores invasivos (Momares D et al., 2014).

3.2. Desórdenes Potencialmente Malignos

El COCE generalmente está precedido por una variedad de alteraciones epiteliales (Pindborg et al., 1997). Estas alteraciones se denominan actualmente como “Desórdenes Potencialmente Malignos”, tales como la leucoplasia, eritroplasia, fibrosis submucosa, el liquen plano, el lupus eritematoso discoide, entre otras (El-Naggar et al., 2017). Dentro de estas lesiones, las más comunes en la cavidad oral son la leucoplasia, caracterizada por su aspecto de parche blanquecino que no se desprende al raspado (Anexo 1, Figura 2) y la eritroplasia, caracterizada por su aspecto de parche rojo (Anexo 1, Figura 3) (El-Naggar et al., 2017). Tanto la leucoplasia, como la eritroplasia deben ser utilizadas sólo como un término clínico; no tienen una connotación histopatológica específica y en la evaluación del paciente son un diagnóstico clínico de exclusión (El-Naggar et al., 2017). Por lo tanto, se requiere un estudio histopatológico para el diagnóstico definitivo, que puede corresponder a hiperplasia epitelial, hiperqueratosis, displasia epitelial o incluso carcinoma (Iocca et al., 2020).

3.3. Displasia Epitelial Oral

Actualmente, la valoración de los desórdenes orales potencialmente malignos se realiza a través de la evaluación microscópica de secciones teñidas con hematoxilina y eosina (El-Naggar et al., 2017), las cuales, la gran mayoría de las veces corresponden a una displasia epitelial oral (DEO). La definición de displasia epitelial oral ha cambiado durante los años y depende de la fuente. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), consiste en la proliferación, maduración y diferenciación anormal de células epiteliales y dependiendo de qué tercio del epitelio esté afectado, se clasifica según grado de severidad en displasia leve,

moderada o severa (El-Naggar et al., 2017). Hay evidencia que mientras más severa sea la displasia, mayor es la probabilidad de que progrese a COCE (Iocca et al., 2020).

3.4 Valor Pronóstico de la Displasia Epitelial Oral

La gran mayoría de las veces el COCE se antecede de lesiones con displasia epitelial oral y, por lo tanto, se considera el predictor más fuerte de transformación maligna; sin embargo, el diagnóstico histopatológico de displasia oral suele ser bastante complejo y subjetivo (El-Naggar et al., 2017). El valor pronóstico de los cambios genéticos tempranos no es totalmente conocido, pero se han detectado mutaciones genéticas y alteraciones moleculares en epitelios displásicos, sugiriendo una relación con su transformación maligna hacia el cáncer (Reyes et al., 2015). Al respecto, numerosos marcadores moleculares han sido identificados como factores predictivos que ayudarían a realizar un diagnóstico más objetivo de la displasia epitelial oral, 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, ni su potencial transformación maligna (Nasser et al., 2011; Reyes et al., 2015). En relación a esto, se han estudiado diversas vías de señalización implicadas en la carcinogénesis oral y se ha identificado a la vía de señalización Wnt/ β -catenina, como una de las vías claves en la carcinogénesis de varios tumores, incluyendo al COCE (Reyes et al., 2015).

3.5. Vía de Señalización Wnt/ β -Catenina

La vía de señalización Wnt está constituida por una familia de proteínas que actúan como ligandos para estimular vías de transducción de señales mediadas por receptores (Logan & Nusse, 2004). Esta vía participa en la proliferación celular, viabilidad, migración e invasión celular, tanto en eventos de la embriogénesis, como en la homeostasis tisular del organismo adulto (Logan & Nusse, 2004), debido a

esto, alteraciones en esta vía se relacionan con múltiples enfermedades hereditarias, así como con el cáncer (MacDonald et al., 2009).

La vía Wnt/ β -catenina posee una forma canónica y una no canónica, en donde la vía canónica regula el nivel de β -catenina, proteína que corresponde a un protooncogen/cofactor transcripcional (MacDonald et al., 2009). Su principal función corresponde a la adhesión célula-célula, encontrándose unida a la porción citoplasmática de E-cadherina en células epiteliales y, por otro lado, también actúa como regulador de la actividad transcripcional de factores de transcripción TCF/LEF (T cell transcription factor/ Lymphoid enhancer-binding factor), en el contexto de la vía Wnt (Clevers & Nusse, 2012).

La actividad de la vía Wnt/ β -catenina depende de la concentración de β -catenina presente en el citoplasma (MacDonald et al., 2009). Normalmente cuando esta vía se encuentra apagada existen bajos niveles de β -catenina citoplasmática, mientras que cuando se activa esta vía, se impide la degradación de β -catenina, permitiendo su translocación nuclear, regulando de esta manera la expresión génica (Clevers & Nusse, 2012).

La estabilidad de β -catenina está controlada por el complejo de destrucción (CD) que está formado por las proteínas supresoras de tumores Axina y Adenomatous Polyposis Coli (APC) y las quinasas Casein kinase 1 (CK1) y Glycogen Synthase Kinase 3 beta (GSK3- β) (Li et al., 2012). En ausencia de la señal Wnt, GSK3- β y CK1 fosforilan la región amino-terminal de β -catenina, cuando esta se encuentra en el citoplasma (MacDonald et al., 2009; Nusse & Clevers, 2017). Estas fosforilaciones permiten que E3 ligasa β -TrCP marque a β -catenina para su posterior degradación, manteniendo así bajos niveles citoplasmáticos de la proteína (Li et al., 2012).

La activación de la vía mediante la unión del ligando Wnt a un complejo receptor de la célula, compuesto por 2 proteínas transmembrana, Frizzled (FZD), con siete dominios, y el receptor de lipoproteínas de baja densidad 5/6 (LRP5/6) con uno, genera que las quinasas GSK3- β y CK1-fosforilen la porción citoplasmática de LRP reclutando a Axina hacia la membrana (Liu et al., 2022). De esta forma, se

reconfigura el complejo proteico encargado de fosforilar a β -catenina impidiendo su acción (Liu et al., 2022). Como consecuencia de lo anterior, β -catenina se acumula en el citoplasma y posteriormente se transloca al núcleo donde se une a miembros de la familia de TCF/LEF los cuales se encargan de regular la expresión génica, específicamente de genes *target* implicados en la proliferación e invasión celular, como c-myc, ciclina D1, c-jun, metaloproteinasa-1 (MMP-1) y metaloproteinasa-7 (MMP-7) (Figura 1) (MacDonald et al., 2009; Nusse & Clevers, 2017).

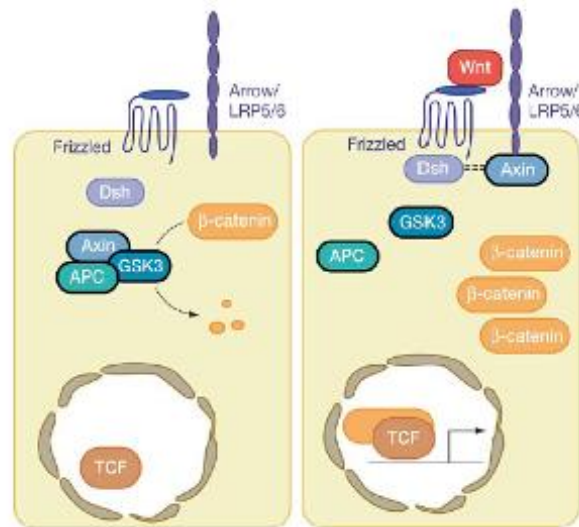


Figura 1. Vía de señalización Wnt/ β -catenina. En ausencia de señalización Wnt, β -catenina es fosforilada por su complejo de degradación, llevándola a su posterior degradación vía proteosomal (panel izquierdo). Por otra parte, la activación de la vía (panel derecho) causa la inhibición del complejo de destrucción, llevando a la estabilización de β -catenina y su concomitante translocación al núcleo. Fuente: Logan, C. Y., & Nusse, R. (2004). *The Wnt signaling pathway in development and disease. Annual review of cell and developmental biology*, <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126>, 781–810.

3.6 Vía Wnt/ β -catenina y Carcinogénesis Oral

Uno de los primeros cánceres donde se evidenció el rol de Wnt/ β -catenina fue en el cáncer de colon, en el cual una mutación en APC aumenta la translocación de β -catenina al núcleo, aunque también se ha asociado a mutaciones en Axina y/o β -catenina, dependiendo del tipo de cáncer colorrectal (Novellademunt et al., 2015). La relación cáncer - vía Wnt/ β -catenina también se ha evidenciado en cáncer de páncreas y hepatocelular, entre otros (Nusse & Clevers, 2017). Sin embargo, la

investigación relacionada a la carcinogénesis oral es aún escasa (Munemitsu et al., 1995).

En relación a la carcinogénesis oral, a diferencia de lo que ocurre en otros cánceres dependientes de Wnt, se ha descrito la presencia nuclear de β -catenina en lesiones que anteceden al cáncer oral (Reyes et al., 2015). Se ha reportado en desórdenes potencialmente malignos con diagnóstico clínico de leucoplasia y eritroplasia cuyo diagnóstico histopatológico corresponde a displasia moderada y severa, una fuerte presencia nuclear de β -catenina observada a través de inmunohistoquímica (IHQ), en comparación con muestras de COCE en donde se presenta disminución de la expresión nuclear de la proteína y en mucosa oral sana, donde la presencia de β -catenina se encuentra limitada a la membrana celular (Reyes et al., 2015). Además, se ha evidenciado que la presencia nuclear de β -catenina en muestras de displasia oral conlleva a la transcripción de genes implicados en la proliferación celular como Survivina y Ciclina D1, debido a un aumento y activación de la vía mediada por el ligando Wnt3a, evidenciando un rol de β -catenina en la proliferación celular en displasia y en la transformación maligna hacia el cáncer (Reyes et al., 2019). Esto recalca la importancia del estudio del rol de la vía Wnt/ β -catenina en la carcinogénesis oral y a la importancia de la búsqueda de herramientas terapéuticas que permitan modular esta vía de señalización.

3.7 Calcitriol y Cáncer

La vitamina D es un esteroide que se ha relacionado con la carcinogénesis, donde tendría un rol preventivo y terapéutico (Fathi et al., 2019). Se ha descrito su acción en terapias conjuntas con quimioterapia, donde se ha observado que su uso podría presentar beneficios, mostrando una mejor respuesta al tratamiento (Dalirsani et al., 2012). También se ha planteado su rol preventivo y su relación con el riesgo de desarrollo del cáncer (Udeabor et al., 2020). Según su isoforma, la vitamina D puede ser sintetizada en la piel por acción de la radiación ultravioleta (UV) o bien una pequeña parte puede adquirirse en la dieta, para luego ser hidrolizada en diversos órganos del cuerpo y así ejercer su acción (Fathi et al.,

2019). Su función más conocida es la regulación del metabolismo del calcio y fósforo, donde el metabolito con mayor acción biológica corresponde al calcitriol ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) (Fathi et al., 2019). La mayoría de las acciones biológicas del calcitriol son mediadas por su receptor de vitamina D (VDR), que pertenece a la familia de receptores nucleares. Inicialmente el calcitriol se une a VDR, lo que induce su interacción con Retinoid X Receptor (RXR), formando un complejo que se acopla a Elementos de Respuesta a Vitamina D (VDRE) en varias regiones reguladoras localizadas en los genes target (Figura 2) (Fathi et al., 2019).

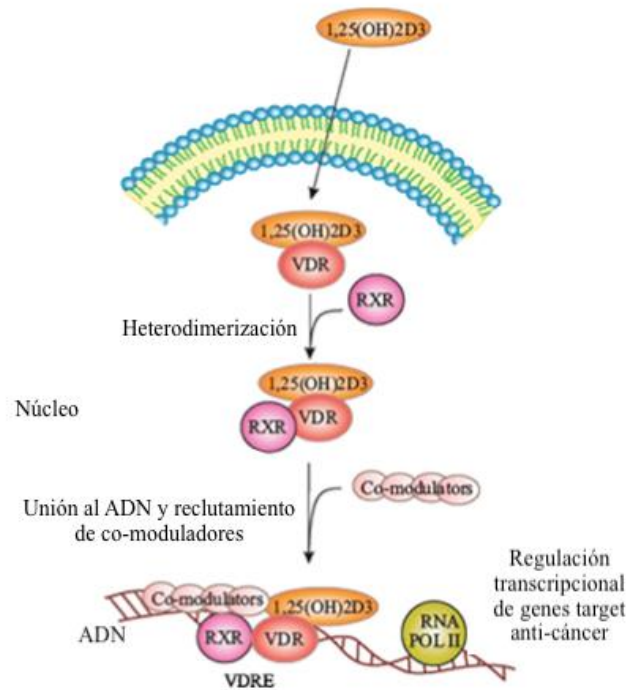


Figura 2. Mecanismo de acción de calcitriol en el núcleo celular. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ingresa al núcleo celular tras su unión con el receptor VDR, donde posteriormente es heterodimerizado por RXR. Este complejo $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR-RXR reclutará co-moduladores para actuar en la hebra de ADN de genes target antineoplásicos. Esta es la vía de acción más estudiada del calcitriol en la regulación génica del proceso cancerígeno. Fuente: Fathi N, (2019). Role of vitamin D and vitamin D receptor (VDR) in oral cancer. *Biomed Pharmacother.* 10.1016/j.biopha.2018.10.102, 391–401.

Respecto a su rol en la carcinogénesis, se ha descrito que los mecanismos en los que el calcitriol actúa abarcan el proceso neoplásico completo, adjudicándose propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antiproliferativas, pro-diferenciación, inductor de la apoptosis, inhibición de metástasis e invasión e inhibición de angiogénesis (Giammanco et al., 2015). Estas propiedades se han estudiado en varios tipos de cánceres: colorrectal, de vejiga, hígado, mamas, gástrico, ovárico, hematológico, de pulmón, próstata, pancreático, de piel y de cabeza y cuello (Deeb et al., 2007).

3.8 Calcitriol y Cáncer Oral

Estudios que relacionen el efecto que tiene el calcitriol sobre la displasia y el COCE son muy escasos. Se ha reportado mediante modelos *in vitro* en líneas celulares de COCE, que la administración de calcitriol proporciona una respuesta dosis-dependiente en la inhibición de la proliferación celular (Kingsley et al., 2013). También se ha estudiado una posible terapia administrando calcitriol en modelos *in vitro*, pero no se ha establecido como un tratamiento propiamente tal, sino más bien como una terapia co-adyuvante, ya que la combinación de calcitriol, 5-fluorouracil y 13-cis ácido retinoico logró un mayor porcentaje de apoptosis al ser comparado con el efecto que se logra al evaluar cada uno por separado (Dalirsani et al., 2012). Otro estudio comparó los niveles séricos de vitamina D de pacientes con COCE previo al tratamiento y pacientes control sin COCE, y concluyó que un 74,51% de los pacientes con COCE tenían deficiencia moderada a severa de vitamina D, mientras que solo un 20,35% de los pacientes control tenían deficiencia moderada de vitamina D, sin ninguna deficiencia severa (Udeabor et al., 2020). Por otra parte, también se ha observado una relación entre la disminución de la expresión de VDR y la recurrencia del tumor (Grimm et al., 2013). Por lo tanto, una terapia basada en la administración de calcitriol podría ser prometedora en pacientes con COCE, sobre todo en etapas iniciales de la carcinogénesis oral, como es la displasia oral.

3.9 Calcitriol y Vía Wnt/ β -catenina

La relación entre calcitriol y la vía Wnt/ β -catenina se ha estudiado en algunos tipos de cánceres, principalmente en el cáncer de colon, donde se ha reportado en modelos *in vitro* que la administración de calcitriol promueve una interacción directa entre VDR y β -catenina, impidiendo la unión de β -catenina a TCF/LEF, y por lo tanto, inhibiendo la transcripción de genes implicados en la proliferación celular (Pálmer et al., 2001). También se ha descrito que el calcitriol induce la relocalización de β -catenina desde el núcleo hacia la membrana plasmática para formar complejos con E-cadherina, inhibiendo su acción de regulación génica (Ma et al., 2013). Además, se ha propuesto la capacidad del calcitriol de inducir la producción de otras proteínas de membrana inhibiendo la proliferación, invasión y migración celular (Pálmer et al., 2001).

3.10. Formulación del Problema

Si bien no existen reportes hasta el momento que evalúen el rol del calcitriol en la actividad de Wnt/ β -catenina en displasia y COCE, un estudio muy reciente ha observado que algunos metabolitos de la vitamina D resultantes de su ruta metabólica alternativa o no calcémicos, tienen un efecto en la acumulación nuclear de β -catenina en células de carcinoma oral mediante modelos *in vitro*, disminuyendo su concentración en el núcleo y promoviendo su degradación (Oak et al., 2020). Sin embargo no existen estudios en displasia oral. Por lo tanto, nuevos estudios son necesarios para determinar el mecanismo de cómo el calcitriol inhibe la acción de β -catenina disminuyendo la viabilidad y migración celular en displasia oral, lo cual podría ser una terapia prometedora en la progresión de la displasia oral al COCE.

4. HIPÓTESIS

“El calcitriol inhibe la localización nuclear de β -catenina, la viabilidad y migración celular en células de displasia oral”.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Determinar si el calcitriol inhibe la localización nuclear de β -catenina, la viabilidad y migración celular en células de displasia oral.

5.2. Objetivos Específicos

1. Determinar el efecto del calcitriol en la localización de β -catenina en células de displasia oral.
2. Determinar el efecto del calcitriol en la localización de β -catenina en un modelo de explante oral.
3. Determinar el efecto del calcitriol sobre la viabilidad celular en células de displasia oral.
4. Determinar el efecto del calcitriol sobre la migración celular en células de displasia oral.

6. METODOLOGÍA

6.1 Cultivo celular

La línea celular comercial de displasia oral, DOK (dysplastic oral keratinocyte), fue mantenida en medio DMEM-high glucose, suplementado con los antibióticos penicilina 10.000 U/ml y estreptomina 10 µg/ml, 20% de Suero Fetal Bovino (SFB) y 25 µl de Hidrocortisona. Las células fueron incubadas a 37°C y 5% CO₂.

6.2 Tratamiento con 1α,25(OH)₂D₃

1α,25(OH)₂D₃ o calcitriol fue reconstituido en isopropanol a una concentración de 0,2 mM y guardado en tubos eppendorf oscuros a -20°C hasta la adición en medios de cultivo. Las células fueron expuestas a una concentración de 1α,25(OH)₂D₃ a 0,1 µM por 48 horas y se realizaron los ensayos posteriores.

6.3 Inmunofluorescencia en línea celular DOK

Las células fueron crecidas sobre cubreobjetos de vidrio de 18-mm de diámetro y luego fijadas con paraformaldehído al 4%, durante 15 minutos. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS y permeabilizadas con Tritón X-100 al 0,3% en PBS durante 15 minutos, lavadas 2 veces y luego bloqueadas, incubándolas con seroalbúmina de bovino (BSA) al 5% durante 45 minutos. Las células fueron incubadas con el anticuerpo primario monoclonal anti-β-catenina (M3539) de DAKO (DAKO, USA), seguido de la incubación con el respectivo anticuerpo secundario Alexa Flúor 568 acoplado a molécula fluorescente de Invitrogen (Carlsbad, CA), y posterior montaje utilizando el medio de montaje DAKO (DAKO, USA). Las muestras fueron visualizadas mediante microscopía de fluorescencia, usando un microscopio confocal C2 Plus.

6.4 Modelo de explante oral

6.4.1 Obtención de explantes de tejido oral:

Evaluación oral: Pacientes atendidos en la Unidad de Diagnóstico del Hospital San José, fueron evaluados por la presencia de desórdenes potencialmente malignos, como leucoplasia, eritroplasia o leucoeritroplasia, histopatológicamente compatibles con displasia oral. Dos pacientes fueron seleccionados para participar de este trabajo, las características clínico-demográficas de cada uno se detallan a continuación:

Características clínico-demográficas de los pacientes:

Paciente N°1: paciente de género masculino, de 74 años de edad, fue atendido en el Hospital Clínico San José en la unidad de diagnóstico. Al examen intraoral el paciente presentó en superficie dorsal de lengua en lado derecho zonas atróficas y nódulos blancos redondeados, de 5 mm de diámetro los cuales no se desprendían al raspado, levemente verrucoso. El diagnóstico clínico fue de Leucoplasia Verrugosa Proliferativa. Posterior a la firma del consentimiento informado, se procedió a tomar una muestra representativa de la lesión.

Paralelamente se le solicitaron los niveles séricos de vitamina D al paciente cuyo resultado fue de 12,27 ng/ml (valores recomendados de 30 ng/ml a 50 ng/ml).

El diagnóstico histopatológico fue realizado por un patólogo oral y correspondió a una displasia epitelial leve.

Paciente N°2: paciente de género masculino, de 75 años de edad, fue atendido en el Hospital Clínico San José en la unidad de diagnóstico. Al examen intraoral el paciente presentó placas blancas rugosas, de límites poco definidos en reborde alveolar inferior y en reborde desdentado superior lado derecho, cuyo diagnóstico clínico fue de Leucoplasia Proliferativa. Posterior a la firma del

consentimiento informado, se procedió a tomar una muestra representativa de las lesiones.

Paralelamente se le solicitaron los niveles séricos de vitamina D al paciente cuyo resultado fue de 23,4 ng/ml (valores recomendados de 30 ng/ml a 50 ng/ml).

El diagnóstico histopatológico fue realizado por un patólogo oral y correspondió a una displasia epitelial moderada.

Los tejidos obtenidos de los pacientes fueron conservados en medio de cultivo hasta la llegada al laboratorio. Cada muestra fue cortada en dos partes. La mitad de cada muestra fue tratada con calcitriol al 0,1 μ M por 48 hrs mientras que la otra mitad fue tratada con el vehículo de la solución. Posteriormente los tejidos fueron fijados en formalina tamponada al 10% y procesados como se detalla a continuación:

6.4.2 Procesamiento de muestras en bloques de parafina

Las muestras provenientes de los explantes anteriormente descritos fueron fijadas en formalina tamponada al 10% y posteriormente incluidas en parafina. A cada molde, se le realizó 1 corte de 3 μ m, con navajas de corte para tejidos blandos marca Feather®, en un micrótopo marca E. Leitz Wetzlar. Posteriormente, los cortes se colocaron en baño de estirado marca Labline® a 38°C; y fueron recogidos en portaobjetos con carga positiva (Laboratorio Cellpath, Inglaterra) y secados a 60°C por 30 min en estufa marca Memmert® para posteriormente realizar técnica inmunohistoquímica para la detección de β -catenina como se detalla a continuación.

6.4.3 Inmunohistoquímica en tejidos incluidos en parafina

Las secciones de 3 μ m de muestras en bloques de parafina fueron desparafinadas en xilol y rehidratadas en alcoholes descendentes hasta el agua destilada. Las secciones se colocaron en buffer citrato 1mM pH 6.0 a 95°C durante 1 hora, para la recuperación antigénica, y posteriormente fueron lavadas con buffer

fosfato salino (PBS) durante 5 min. La actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada incubando las secciones en H₂O₂ al 3% en metanol a temperatura ambiente durante 20 min. Las secciones fueron incubadas con suero de caballo durante 20 min a temperatura ambiente y después se incubaron durante 1 hora en cámara húmeda a 37°C con el anticuerpo anti β -catenina M3539 DAKO y Ki-67 (SP6) Cell Marque. Posteriormente, las secciones se lavaron con PBS durante 5 min y fueron incubadas con el anticuerpo secundario biotinilado durante 20 min a 37°C y posteriormente con peroxidasa-estreptavidina conjugada (Sistema Detección Universal Vectastain Elite Kit amplio espectro ABC-HRP, RTU, Vector-USA, EE.UU.) durante 20 min a 37°C; la reacción se visualizó finalmente con diaminobencidina (DAB) y fue contrarrestada con hematoxilina de Harris. Se determinó la localización subcelular de β -catenina a través del microscopio óptico Olympus CX41.

Para el recuento de las células inmunopositivas se llevaron a cabo los siguientes pasos: las láminas teñidas se enumeraron de acuerdo al número de molde al cual pertenecían y se etiquetaron de tal forma que se especificó el anticuerpo utilizado. Las células inmunopositivas se evaluaron microscópicamente con un aumento de 40x y se seleccionaron 5 campos de forma no aleatoria, los cuales tuvieran presencia de epitelio displásico con áreas de mayor marcación positiva. Esta marcación se evaluó como positiva para las proteínas de β -catenina y Ki-67 en el caso de contar con una marca de color pardo en el núcleo de las células epiteliales sin considerar intensidad. Los campos fueron fotografiados con un microscopio Olimpus CX41 con el programa Micrometrics SE Premium. En estas microfotografías se contaron hasta 1000 células epiteliales displásicas en total utilizando el programa Image J, determinando el número de células epiteliales positivas para cada uno de los anticuerpos testeados. De acuerdo a este criterio se consideró positivo aquellos casos donde independiente del número de células, hubo marcación positiva para el antígeno respectivo.

6.5 Viabilidad Celular

Ensayo MTS. Corresponde a un ensayo colorimétrico que consiste en la utilización de sales de tetrazolio para medir la viabilidad celular, esto ocurre debido a que las enzimas oxidorreductasas presentes en células metabólicamente activas son capaces de reducir el compuesto MTS a productos derivados del formazán altamente pigmentados. La cantidad de formazán producida es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo y puede ser medida a través de la absorbancia.

Las células DOK fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 1×10^4 células por pocillo. La viabilidad celular fue evaluada con el kit MTS®, luego de 24 hrs de cultivo en medio completo. Para ello, se agregó 20 μ l de una mezcla 20:1 de MTS:PMS a cada pocillo. Fueron incubados por 1 h a 37°C y la reacción se detuvo por adición de 10 μ l de SDS al 10%. Finalmente, se determinó la reducción del compuesto MTS en formazán mediante la medición de la absorbancia a 490 nm, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega, Madison, WI, US).

6.6 Migración celular

Ensayo Transwell. La migración celular fue evaluada en cámara Boyden (Transwell) cubierta de fibronectina (Transwell Costar, 6,5-mm de diámetro, tamaño de poro 8 μ m). Las células (100.000 células por condición) fueron re-suspendidas en 100 ml de medio libre de suero, y sembradas en la parte superior de los insertos Transwell lo que les permitió migrar hacia las cámaras inferiores que contienen medio suplementado con 10% de suero. Después de 2,5 h, los insertos fueron removidos, lavados y las células que migraron hacia el lado inferior de los insertos fueron teñidas con cristal violeta 0,1% en metanol al 2% y cuantificadas en microscopio invertido.

6.7 Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico de al menos 3 experimentos independientes. Las variables corresponden a variables cuantitativas continuas por lo que las pruebas para estimar diferencias estadísticas en las distintas condiciones fueron a través de un t-test no pareado, esto debido a que se analizaron dos grupos independientes y la distribución de las variables en cada grupo siguen una distribución normal. Un valor $p < 0,05$ fue considerado como estadísticamente significativo. Los datos se graficaron señalando el promedio \pm el error estándar de 3 experimentos independientes. Todas las pruebas estadísticas se realizaron mediante el software Stata 11.0.

7. RESULTADOS

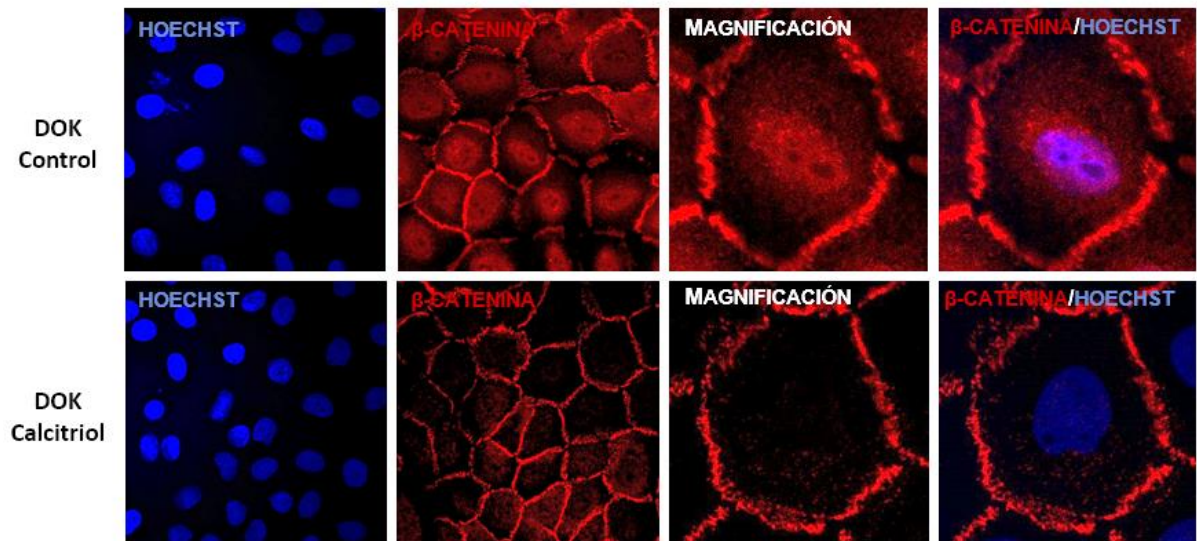
7.1 OBJETIVO ESPECÍFICO N°1:

Determinar el efecto del calcitriol en la localización de β -catenina en células de displasia oral.

7.1.1 Las células de displasia oral DOK tratadas con calcitriol presentan una disminución en la localización nuclear de β -catenina en comparación a células de displasia oral DOK no tratadas.

Se determinó la localización subcelular de β -catenina total a través de inmunofluorescencia en células DOK (displasia oral) tratadas con calcitriol al 0.1 μ M por 48 hrs. Las células DOK tratadas con calcitriol presentaron una disminución en la localización nuclear de β -catenina en comparación a las células no tratadas (Figuras 3A). Se realizó una cuantificación determinando el número de células con localización nuclear positiva a través del programa Image J (3 experimentos independientes: 100 células por experimento), la observación y conteo de células fueron realizadas por la Dra. Reyes y la alumna Constanza Brunetto. Las células DOK tratadas con calcitriol presentaron un 61% de localización nuclear de β -catenina total en comparación a las células DOK no tratadas las cuales presentaron un 98% de localización nuclear de la proteína (Figura 3 B).

A.



B.

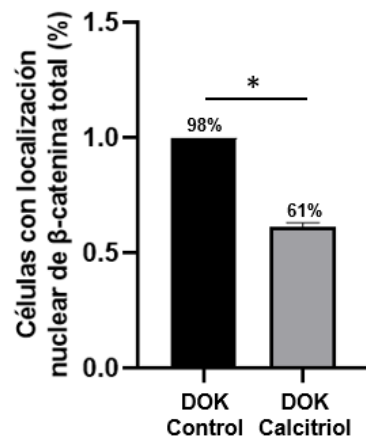


Figura 3. Localización de β -catenina total. (A) Inmunofluorescencia para β -catenina total en células DOK tratadas con calcitriol y células no tratadas. (B) Promedio de células con localización nuclear de β -catenina total (cuantificación a través del programa Image J). El gráfico muestra el promedio \pm el error estándar de 3 experimentos independientes (ttest; * = $p \leq 0.05$).

7.2 OBJETIVO ESPECÍFICO N°2:

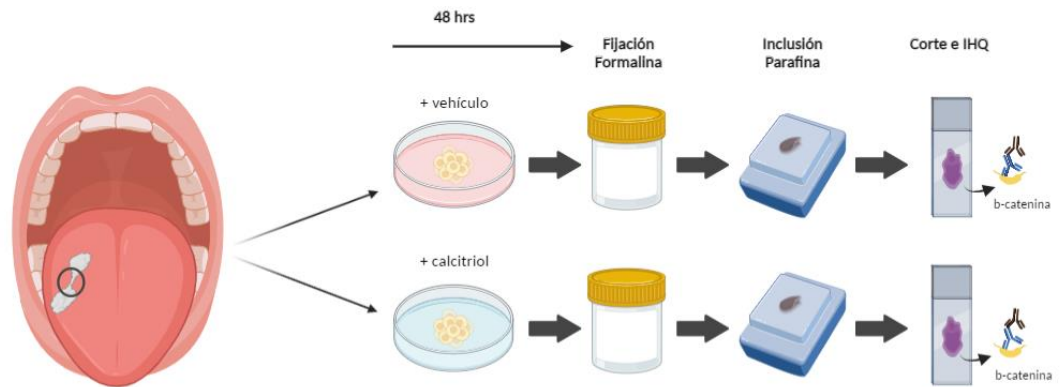
Determinar el requerimiento de calcitriol en la localización de β -catenina en un modelo de explante oral

7.2.1 Los explantes provenientes de pacientes con desórdenes potencialmente malignos con diagnóstico de displasia oral tratados con calcitriol presentan una disminución en la localización nuclear de β -catenina en comparación a explantes no tratados.

Se determinó la localización subcelular de β -catenina total a través de inmunohistoquímica. Los explantes tratados con calcitriol presentaron principalmente una localización membranosa de β -catenina en comparación a los explantes no tratados los cuales presentaron mayoritariamente una localización nuclear de esta proteína (92% de positividad nuclear para explantes no tratados y 15% de positividad nuclear para explantes tratados) (Figura 4B). Además de manera de complementar nuestros resultados realizamos detección de Ki-67 un marcador de proliferación celular. Los explantes tratados con calcitriol presentaron menor expresión de Ki-67 en comparación a los explantes no tratados (89% de positividad nuclear para explantes no tratados y 10% de positividad nuclear para explantes tratados).

Paralelamente se llevó a cabo el diagnóstico histopatológico en el servicio de biopsias del Hospital San José, realizado por un Especialista en Patología Buco Maxilofacial, cuyo diagnóstico en ambos pacientes correspondió a una displasia epitelial oral.

A.



B.

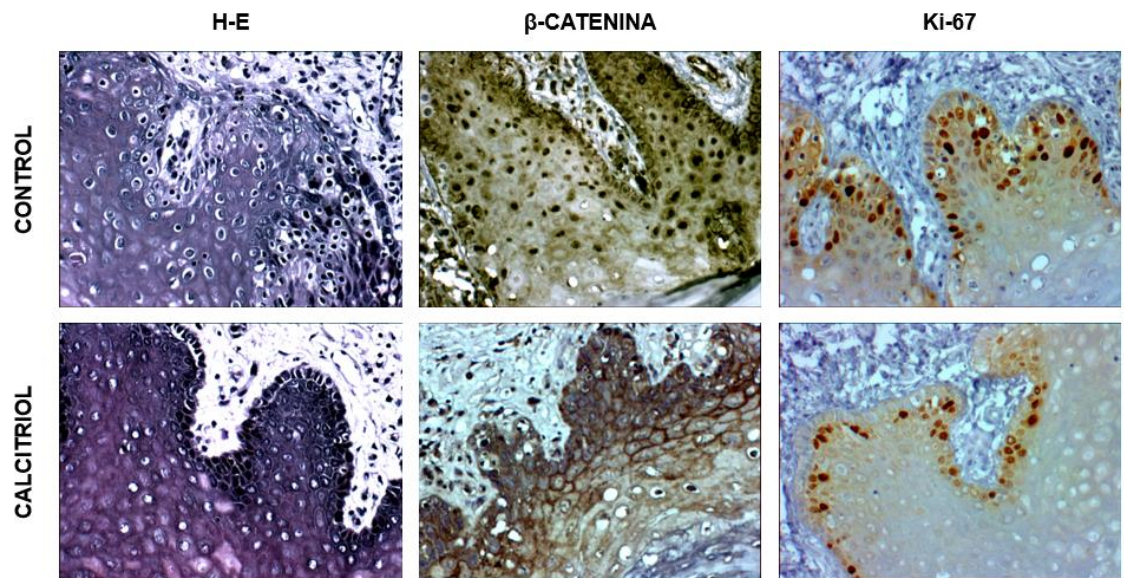


Figura 4. Procesamiento de explantes y localización de β -catenina mediante inmunohistoquímica. (A) Obtención de explantes con diagnóstico de displasia oral, cada explante fue procesado por mitades en donde una se trató con calcitriol y la otra únicamente con el vehículo de la solución, posterior fijación en formalina, inclusión de los tejidos en parafina, corte y aplicación de técnica inmunohistoquímica. (B) Localización inmunohistoquímica de β -catenina, en los tejidos tratados con calcitriol se observa localización mayoritariamente membranosa de β -catenina, mientras que en los no tratados su localización es principalmente nuclear. Localización inmunohistoquímica de Ki-67, en los tejidos tratados con $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ se observa disminución en la expresión del marcador de proliferación celular Ki-67, en comparación a los tejidos no tratados.

7.3 OBJETIVO ESPECÍFICO N°3:

Determinar el efecto del calcitriol sobre la viabilidad celular en células de displasia oral.

7.3.1. Las células de displasia oral DOK tratadas con calcitriol presentan una disminución en su viabilidad celular en comparación a células de displasia oral DOK no tratadas.

Se determinó la viabilidad celular mediante un ensayo MTS. Tras 24 h de cultivo en medio completo, la mitad de los pocillos de la placa fueron tratados con calcitriol al 0.1 μM y la otra mitad únicamente con el vehículo de la solución. Después de 48 h se determinó la reducción del compuesto MTS en formazán mediante la medición de la absorbancia a 490 nm. La viabilidad celular de las células DOK tratadas con calcitriol disminuyó en un 20% en comparación a las células DOK no tratadas (Figura 5).

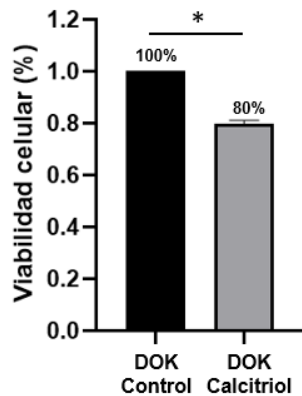


Figura 5. Determinación de viabilidad celular. Porcentaje de células viables determinado a través de la medición de la absorbancia tras la reducción del sustrato MTS a formazán. El gráfico muestra el promedio \pm el error estándar de 3 experimentos independientes (*t*test; * = $p \leq 0.05$).

7.4 OBJETIVO ESPECÍFICO N°4:

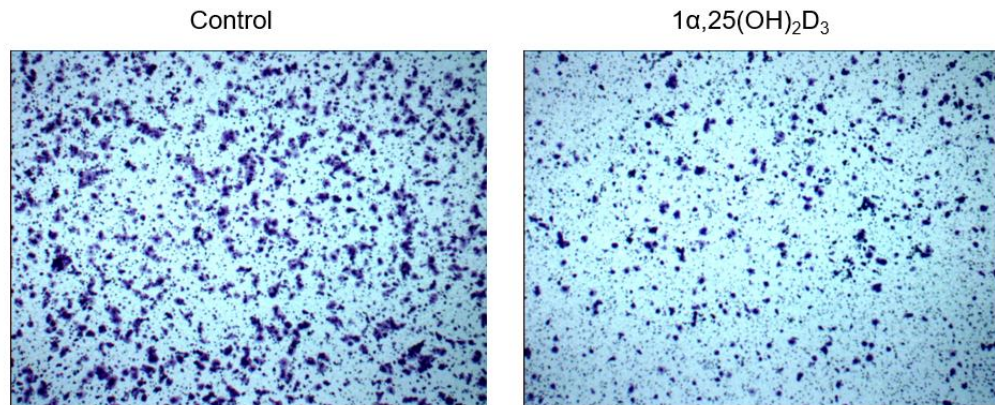
Determinar el efecto del calcitriol sobre la migración celular en células de displasia oral.

7.4.1. Las células de displasia oral DOK tratadas con calcitriol presentan una disminución en su migración celular en comparación a células de displasia oral DOK no tratadas.

Se determinó la capacidad migración celular, a través de una evaluación en cámara Boyden (Transwell). Las células DOK fueron cultivadas en medio completo, para posteriormente ser divididas en dos grupos, en donde uno fue expuesto a calcitriol por 48 hrs, mientras que el otro únicamente al vehículo de la solución. Las células fueron re-suspendidas en medio libre de suero, y sembradas en la parte superior de los insertos Transwell lo que les permitió migrar hacia las cámaras inferiores que contienen medio suplementado con 10% de suero. Las células que migraron fueron posteriormente teñidas con cristal violeta al 0,1% en metanol al 2% y cuantificadas en microscopio invertido. Las células DOK tratadas con calcitriol tuvieron una disminución estadísticamente significativa en comparación a las células DOK no tratadas. (Figura 6)

A.

Ensayo de Migración Transwell



B.

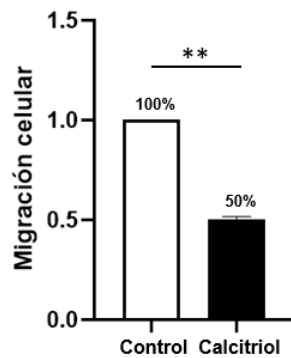


Figura 6. Determinación de migración celular. (A) Se observa disminución en la migración celular del grupo tratado con $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en comparación al control, tinción con cristal violeta. (B) Porcentaje de células migradas a través de los insertos Transwell, cuantificación a través de microscopio invertido. El gráfico muestra el promedio \pm el error estándar de 3 experimentos independientes (ttest; * = $p \leq 0.05$).

8. DISCUSIÓN

La activación aberrante de la vía Wnt/ β -catenina en displasia oral ha sido demostrada previamente, y se encuentra asociada a la proliferación y su transformación maligna (Reyes et al., 2019). A su vez, se ha estudiado el rol del calcitriol ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) en la regulación de la vía Wnt/ β -catenina en múltiples neoplasias malignas, tales como cáncer de mama, pulmón y cáncer colorectal, entre otros, siendo este último el más estudiado (Pálmer et al., 2001). Sin embargo, hasta la fecha existe muy escasa evidencia sobre la acción del calcitriol en la regulación de la vía Wnt/ β -catenina en displasia oral.

Los resultados obtenidos sugieren que el calcitriol disminuye la localización nuclear de β -catenina. Estudios previos en cáncer de colon han descrito que el calcitriol regula la vía Wnt/ β -catenina a través de diversos mecanismos de acción, uno de ellos es la capacidad del calcitriol o $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ de aumentar la expresión del receptor VDR quien a su vez se une a β -catenina a nivel citoplasmático, impidiendo su traslocación al núcleo, unión a TCF/LEF y posterior transcripción de genes involucrados en la proliferación celular. Además, el calcitriol tiene la capacidad de inducir la expresión de E-cadherina, proteína de unión intercelular que comúnmente se encuentra en la membrana junto a β -catenina. La inducción de E-cadherina provocada por $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ causa la traslocación de β -catenina desde el núcleo a la membrana citoplasmática (Pálmer et al., 2001). Por otra parte se ha demostrado que el calcitriol tiene la capacidad de aumentar la expresión de Dickkopf (DKK)-1, inhibidor extracelular de Wnt que en células sanas es capaz de regular a la vía Wnt/ β -catenina mediante feedback negativo, pero se ha observado que en células de cáncer colorectal su expresión se encuentra disminuida de forma anómala (González-Sancho et al. 2005; Aguilera et al. 2007). En células de melanoma por su parte, se ha reportado que el tratamiento con calcitriol y el aumento de la expresión de VDR inhiben a la vía Wnt/ β -catenina y el crecimiento celular, así como una mayor expresión de VDR en estas células tumorales, lo cual se ha asociado a una menor mortalidad (Muralidhar et al. 2019).

El rol del calcitriol en el desarrollo del cáncer ha sido estudiado a lo largo de las últimas décadas, observándose que niveles séricos de vitamina D menores a 30 ng/ml corresponden a una insuficiencia de esta y se asocian a un aumento en el riesgo de generar diversas neoplasias (Holick, 2007). A su vez, estudios de prevalencia han demostrado bajos niveles séricos de calcitriol (<30 ng/ml) en hasta el 80% de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama y cáncer colorectal, entre otros (Gupta et al., 2011). En relación al cáncer oral, Grimm estudió los niveles séricos de Vitamina D en pacientes con diagnóstico de displasia oral y COCE en conjunto con la expresión de VDR en biopsias de sus tejidos, hallando que todos los pacientes poseían insuficiencia moderada a severa de vitamina D mientras que la expresión de VDR presentó una disminución significativa en los tejidos con diagnóstico de COCE (Grimm et al., 2015). Esto coincide con los resultados de nuestra investigación, ya que ambos pacientes cuyas muestras de explantes fueron tratadas con calcitriol, tenían un déficit en los niveles séricos de Vitamina D, lo cual podría estar asociado al desarrollo de los desórdenes potencialmente malignos con diagnóstico de displasia oral.

Investigaciones previas han analizado el efecto del tratamiento con $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en la aparición de neoplasias malignas en modelos de cáncer oral desarrollados en hámsters, obteniendo como resultado que solo el 10% de los animales tratados con calcitriol presentó tumores en comparación al 70% del grupo control (Meier et al., 2007). A su vez, estudios recientes han investigado el impacto del calcitriol en la carcinogénesis oral en un modelo de inducción de COCE en ratones, observándose una reducción estadísticamente significativa del número de lesiones displásicas así como inhibición de la transformación maligna del grupo tratado con calcitriol en comparación al control (Vincent-Chong et al., 2019).

La migración celular es de gran relevancia en el estudio de la carcinogénesis debido a su rol en la invasión de tejidos y consiguiente metástasis, de este modo reportes previos han observado a través de células *in vitro* provenientes de diferentes carcinomas una disminución significativa ($p < 0.001$) de la migración celular posterior al tratamiento con $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, sugiriendo a su vez una

asociación de este fenómeno con el incremento de la expresión de E-cadherina (Ma et al. 2013).

Los resultados de este trabajo condicen con la evidencia previamente descrita, planteando que el calcitriol ejerce un rol inhibitorio en la viabilidad y migración celular de células de displasia oral. Además, el antígeno Ki-67 es ampliamente reconocido como un marcador de proliferación celular, el cual fue localizado en las muestras de tejidos de explantes de este trabajo, presentando una disminución en su expresión en los tejidos tratados con calcitriol en comparación a los no tratados, sugiriendo que $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ puede poseer un rol inhibitorio en la proliferación de las células de displasia oral. Por otra parte, resultados paralelos de nuestro grupo de investigación han demostrado un aumento de E-cadherina en la membrana celular y de VDR nuclear tanto en células como explantes tratados con calcitriol en comparación a los no tratados. Además, se observaron mayores niveles de mRNA y proteína de genes dianas de β -catenina relacionados con la proliferación celular, como Ciclina D1 y Survivina, respectivamente (datos no mostrados en esta tesis).

Si bien en este trabajo de investigación hemos demostrado que el tratamiento con calcitriol en células y tejidos de displasia oral disminuye la localización nuclear de β -catenina, la viabilidad y migración celular, no determinamos una relación causal, por lo tanto, es necesaria más investigación acerca del rol inhibitorio del calcitriol sobre la vía Wnt/ β -catenina en displasia oral. Además, es requerida más evidencia sobre el efecto del calcitriol en modelos de investigación que permitan estudiar dicha acción en modelos *in vivo*, para así generar estrategias terapéuticas en base a calcitriol que sean efectivas y se comporten de forma segura en el organismo, debido a su rol en el metabolismo del calcio y fósforo.

Por lo tanto, pese a las limitaciones previamente señaladas, estos resultados permiten establecer nuevas bases en la investigación acerca de los estadios tempranos de la carcinogénesis oral y la vía Wnt/ β -catenina, así como proponer nuevas estrategias terapéuticas para la aplicación clínica en el abordaje de los desórdenes potencialmente malignos tratándolos de forma precoz, evitando su

transformación maligna a COCE y, por consecuente, favoreciendo el pronóstico de los pacientes.

9. CONCLUSIONES

Se ha demostrado en esta investigación que el tratamiento con calcitriol en células y tejidos de displasia oral disminuye la localización nuclear de β -catenina, la viabilidad y migración celular.

Esto es significativo debido a que la gran mayoría de las veces el Carcinoma Oral de Células Escamosas, que corresponde a la neoplasia maligna más frecuente de la cavidad oral, es precedido por desórdenes potencialmente malignos con diagnóstico histopatológico de displasia oral. Debido al bajo índice de supervivencia de este cáncer, es que el diagnóstico y tratamiento temprano de la displasia oral es fundamental para favorecer el pronóstico de los pacientes.

Sin embargo es necesaria más evidencia para establecer con precisión la relación entre el calcitriol y la vía Wnt/ β -catenina, así como el desarrollo de estrategias para su aplicación clínica. Es por esto que la inhibición de β -catenina a través de la administración de calcitriol, podría ser una terapia prometedora en la progresión de la displasia oral.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilera, O., Peña, C., García, J. M., Larriba, M. J., Ordóñez-Morán, P., Navarro, D., Barbáchano, A., López de Silanes, I., Ballestar, E., Fraga, M. F., Esteller, M., Gamallo, C., Bonilla, F., González-Sancho, J. M., & Muñoz, A. (2007). The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 associated to the differentiation of human colon cancer cells. *Carcinogenesis*, 28(9), 1877–1884. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm094>
- Alsahafi, E., Begg, K., Amelio, I., Raulf, N., Lucarelli, P., Sauter, T., & Tavassoli, M. (2019). Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges. *Cell death & disease*, 10(8), 540. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1769-9>
- Clevers, H., & Nusse, R. (2012). Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*, 149(6), 1192–1205. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.012>
- Dalirsani Z, Farajnia S, Javadzadeh Y, Mehdipour M, Koozegari S. (2012). The Effects of 5-fluorouracil Alone and in Combination with 13-cis Retinoic Acid and Vitamin D3 on Human Oral Squamous Cell Carcinoma Lines. *J Contemp Dent Pract*. 13(3):345–50.
- Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. (2007). Vitamin D signalling pathways in cancer: Potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 7(9):684–700.
- Dissanayaka WL, Pitiyage G, Kumarasiri PVR, Liyanage RLPR, Dias KD y cols. (2012). Clinical and histopathologic parameters in survival of oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 113(4):518–25.
- Dost F, Lê Cao K, Ford PJ, Ades C, Farah CS. (2014). Malignant transformation of oral epithelial dysplasia: A real-world evaluation of histopathologic grading. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. (2014). 117(3):343–52.
- El-Naggar A.K., Chan J.K.C., Grandis J.R., Takata T. SP. (2017). WHO classification of head and neck tumors 2017. *WHO classification of Head and neck Tumors 2017*. 215–220.
- Fathi N, Ahmadian E, Shahi S, Roshangar L, Khan H y cols. (2019). Role of vitamin D and vitamin D receptor (VDR) in oral cancer. *Biomed Pharmacother*. 109:391–401.

- Giammanco, M., Di Majo, D., La Guardia, M., Aiello, S., Crescimanno, M., Flandina, C., Tumminello, F. M., & Leto, G. (2015). Vitamin D in cancer chemoprevention. *Pharmaceutical biology*, *53*(10), 1399–1434. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.988274>
- González-Sancho, J. M., Aguilera, O., García, J. M., Pendás-Franco, N., Peña, C., Cal, S., García de Herreros, A., Bonilla, F., & Muñoz, A. (2005). The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer. *Oncogene*, *24*(6), 1098–1103. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208303>
- Grimm M, Alexander D, Munz A, Hoffmann J, Reinert S. (2013). Is 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor expression a potential Achilles' heel of CD44+ oral squamous cell carcinoma cells? *Target Oncol.* *8*(3):189–201.
- Gupta, D., Vashi, P. G., Trukova, K., Lis, C. G., & Lammersfeld, C. A. (2011). Prevalence of serum vitamin D deficiency and insufficiency in cancer: Review of the epidemiological literature. *Experimental and therapeutic medicine*, *2*(2), 181–193. <https://doi.org/10.3892/etm.2011.205>
- Holick M. F. (2007). Vitamin D deficiency. *The New England journal of medicine*, *357*(3), 266–281. <https://doi.org/10.1056/NEJMra070553>
- Iocca O, Sollecito TP, Alawi F, Weinstein GS, Newman JG y cols. (2020). Potentially malignant disorders of the oral cavity and oral dysplasia: A systematic review and meta-analysis of malignant transformation rate by subtype. *Head and Neck*. John Wiley and Sons Inc. *42*:539–55.
- Kingsley K, Keiserman MA, Bergman C, Kingsley K, Keiserman MA y cols. Interactive Effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 and Soy Protein Extract (SPE) on Oral Cancer Growth In Vitro: Evidence for Potential Functional Relationships. https://digitalscholarship.unlv.edu/dental_fac_articles. (Agosto 26, 2020).
- Li, V. S., Ng, S. S., Boersema, P. J., Low, T. Y., Karthaus, W. R., Gerlach, J. P., Mohammed, S., Heck, A. J., Maurice, M. M., Mahmoudi, T., & Clevers, H. (2012). Wnt signaling through inhibition of β -catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell*, *149*(6), 1245–1256. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.002>

- Liu J, Xiao Q, Xiao J, Niu C, Li Y, Zhang X, Zhou Z, Shu G, Yin G. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduct Target Ther.* 2022 Jan 3;7(1):3. doi: 10.1038/s41392-021-00762-6. PMID: 34980884; PMCID: PMC8724284.
- Logan CY, Nusse R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 20:781–810.
- Ma, Y., Yu, W. D., Su, B., Seshadri, M., Luo, W., Trump, D. L., & Johnson, C. S. (2013). Regulation of motility, invasion, and metastatic potential of squamous cell carcinoma by 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol. *Cancer*, 119(3), 563–574. <https://doi.org/uchile.idm.oclc.org/10.1002/cncr.27531>
- MacDonald BT, Tamai K, He X. (2009). Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Developmental Cell. Dev Cell.* 17:9–26.
- Maraboli S, Adorno D, Maturana A, Rojas G, Fuentes M, y cols.(2018). Sobrevida de carcinoma oral de células escamosas: reporte de la Universidad de Chile. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, 11(3), 147-151.
- Meier, J. D., Enepekides, D. J., Poirier, B., Bradley, C. A., Albala, J. S., & Farwell, D. G. (2007). Treatment with 1-alpha,25-dihydroxyvitamin D3 (vitamin D3) to inhibit carcinogenesis in the hamster buccal pouch model. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*, 133(11), 1149–1152. <https://doi.org/10.1001/archotol.133.11.1149>
- Momares BD, Contreras GC, Martínez BR, Ávalos Nicolás J, Carmona LR. (2014). SOBREVIDA EN CARCINOMA ESPINOCELULAR DE MUCOSA Oral: análisis de 161 Pacientes*. 66(6): 568-76.
- Munemitsu S, Albert I, Souza B, Rubinfeld D, Polakis P. (1995). Regulation of intracellular β -catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(7):3046–50.
- Muralidhar, S., Folia, A., Nsengimana, J., Poźniak, J., O'Shea, S. J., Diaz, J. M., Harland, M., Randerson-Moor, J. A., Reichrath, J., Laye, J. P., van der Weyden, L., Adams, D. J., Bishop, D. T., & Newton-Bishop, J. (2019). Vitamin D-VDR Signaling Inhibits Wnt/ β -Catenin-Mediated Melanoma Progression and Promotes Antitumor Immunity. *Cancer research*, 79(23), 5986–5998. <https://doi.org/uchile.idm.oclc.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3927>

- Nasser W, Flechtenmacher C, Holzinger D, Hofele C, Bosch FX. (2011). Aberrant expression of p53, p16INK4a and Ki-67 as basic biomarker for malignant progression of oral leukoplakias. *J Oral Pathol Med.* 40(8):629–35.
- Novellademunt L, Antas P, Li VSW. (2015). Targeting Wnt signaling in colorectal cancer. A review in the theme: Cell signaling: Proteins, pathways and mechanisms. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 309(8):C511–21.
- Nusse R, Clevers H. (2017). Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell.* 169(6): 985–99.
- Oak ASW, Bocheva G, Kim TK, Brozyna AA, Janjetovic Z y cols. (2020). Noncalcemic Vitamin D hydroxyderivatives inhibit human oral squamous cell carcinoma and down-regulate hedgehog and WNT/ β -catenin pathways. *Anticancer Res.* 40(5):2467–74.
- Pálmer HG, González-Sancho JM, Espada J, Berciano MT, Puig I y cols. (2001). Vitamin D3 promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of β -catenin signaling. *J Cell Biol.* 154(2):369–87.
- Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, van der Waal I. (1997). Histological Typing of Cancer and Precancer of the Oral Mucosa. *Histological Typing of Cancer and Precancer of the Oral Mucosa.*
- Reyes M, Peña-Oyarzun D, Maturana A, Torres VA. (2019). Nuclear localization of β -catenin and expression of target genes are associated with increased Wnt secretion in oral dysplasia. *Oral Oncol.* 94:58–67.
- Reyes M, Rojas-Alcayaga G, Maturana A, Aitken JP, Rojas C y cols. (2015). Increased nuclear β -catenin expression in oral potentially malignant lesions: A marker of epithelial dysplasia. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 20(5):e540–6.
- Rhodus NL, Kerr AR, Patel K. (2014). Oral Cancer. Leukoplakia, Premalignancy, and Squamous Cell Carcinoma. *Dental Clinics of North America.* W.B. Saunders. 58:315–40.
- Riera S P, Martínez R B. (2005). Morbilidad y mortalidad por cáncer oral y faríngeo en Chile. *Rev Med Chil* 133(5):555–63.
- Rojas-Alcayaga G, Brignardello R, Espinoza I, Franco ME, Lobos N y cols. (2010). Oral malignant tumours: a report on 728 cases in Chile. *Acta Odontol Latinoam.* 23(2):136–42.

- Udeabor SE, Albejadi AM, Al-Shehri WAK, Onwuka CI, Al-Fathani SY y cols. (2020). Serum levels of 25-hydroxy-vitamin D in patients with oral squamous cell carcinoma: Making a case for chemoprevention. *Clin Exp Dent Res*. 6(4):1–5.
- van der Waal I. (2014). Oral potentially malignant disorders: is malignant transformation predictable and preventable?. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*, 19(4), e386–e390. <https://doi.org/10.4317/medoral.20205>
- Vincent-Chong, V. K., DeJong, H., Attwood, K., Hershberger, P. A., & Seshadri, M. (2019). Preclinical Prevention Trial of Calcitriol: Impact of Stage of Intervention and Duration of Treatment on Oral Carcinogenesis. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 21(4), 376–388. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2019.02.002>
- Warnakulasuriya S. (2010). Living with oral cancer: Epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. *Oral Oncology*. 46:407–10.

11. ANEXOS

11.1. Anexo 1



Figura 1a. Fotografía clínica de carcinoma oral de células escamosas en borde lateral de lengua. Agradecimientos a la Dra. Andrea Maturana. Clínica Odontológica. Facultad de Odontología. Universidad de Chile



Figura 1b. Fotografía clínica de carcinoma oral de células escamosas ubicado en piso de boca. Agradecimientos a Dra. Andrea Maturana. Clínica Odontológica. Facultad de Odontología. Universidad de Chile.



Figura 2. Fotografía clínica de leucoplasia oral en borde lateral de lengua. Agradecimientos a la Dra. Andrea Maturana. Clínica Odontológica. Facultad de Odontología. Universidad de Chile.



Figura 3. Fotografía clínica de eritroplasia oral en borde lateral de lengua. Agradecimientos a la Dra. Andrea Maturana. Clínica Odontológica. Facultad de Odontología. Universidad de Chile.

11.2. Anexo 2

Agencia
Nacional de
Investigación
y Desarrollo

Ministerio de Ciencia,
Tecnología, Conocimiento
e Innovación ANID/Subdirección de Proyectos/N°60

Santiago, 28 de Enero del 2022
Ref.: Proyecto N° 11221000

Señora
MONTSERRAT DE LOS ANGELES REYES ROJAS

Estimada señora REYES:

En nombre de la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo, me dirijo a usted para informar que ha sido aprobado su proyecto N°11221000, postulado al Concurso FONDECYT de Iniciación en Investigación 2022.

En la presente convocatoria, concursaron 1.289 proyectos, de los cuales 398 (30,8 %) fueron adjudicados. Su proyecto fue revisado en el Grupo de Evaluación de MEDICINA G1 - CS. BIOMÉDICAS, donde obtuvo el lugar N° 2 y un puntaje de 4,625. En este Grupo concursaron 38 propuestas, se adjudicaron 12 (31,6%) y la calificación del último proyecto financiado fue de 4,100 puntos.

A continuación de esta carta, se informan las calificaciones y comentarios que recibió el proyecto y adjunta un certificado que acredita su adjudicación. Asimismo, en el Sistema de Evaluación en Línea, podrá acceder:

- Al presupuesto aprobado para cada año de ejecución. Recuerde que puede redistribuir los fondos anualmente, si lo estima pertinente.
- Al Informe Autorizaciones-Certificaciones donde se indica los documentos que deberá presentar al inicio del proyecto, si corresponde.
- A comunicar si acepta o rechaza la adjudicación del proyecto (botón "Decisión de Ejecutar"). Esto último, en un plazo máximo de 10 días hábiles administrativos, a partir de la fecha de esta carta. Si no le es posible realizar esta acción en el sistema, agradeceremos nos informe su decisión a través de Ayuda ANID (<https://ayuda.anid.cl/so/e/s>). Tenga presente que, de no comunicar la aceptación en el plazo antes indicado, perderá sus derechos en este concurso y se dejará sin efecto la adjudicación.

Respecto al proceso de Firma de Convenio y Transferencia de recursos, revise el instructivo correspondiente, disponible en [InstructivoFirmaConvenioIniciacion2022.pdf](#). En caso de consultas, solicitamos realizarlas a través del Centro de Ayuda IRs (<https://fondocyt.anid.cl/>).

En la página web de ANID, Subdirección de Proyectos de Investigación, encontrará información respecto al proceso de evaluación del Concurso.

Desde ya reciba nuestras felicitaciones por este importante logro en su carrera científica.

Saluda atentamente a Ud.,



ALEJANDRA VIDALES CARMONA
Subdirectora
Subdirección de Proyectos de Investigación
Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo

11.3. Anexo 3



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

ACTA DE APROBACIÓN DE PROYECTO

[Documento en versión 3.1 corregida 17.11.2020]

Con fecha 22 de marzo de 2022, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dr. Manuel Oyarzún G., Médico Neumólogo, Profesor Titular, Presidente
 Dra. Lucía Cifuentes O., Médico Genetista, Profesor Titular, Vicepresidente Subrogante
 Sra. Claudia Marshall F., Educadora, Representante de la comunidad
 Dra. Grisel Orellana V., Médico Neuropsiquiatra, Profesor Asociado
 Prof. Julieta González B., Bióloga Celular, Profesor Asociado
 Dra. María Angela Delucchi B., Médico Pediatra Nefrólogo, Profesor Titular
 Dr. Miguel O'Ryan G., Médico Infectólogo, Profesor Titular
 Dra. María Luz Bascuñán R., Psicóloga PhD, Profesor Asociado
 Sra. Karima Yarmuch G., Abogada, Dirección Jurídica, Facultad de Medicina
 Srta. Javiera Cobo R., Nutricionista, Secretaría Ejecutiva
 Prof. Verónica Allaga C., Kinesióloga, Magíster en Bioética, Profesor Asociado
 Dr. Dante Cáceres L., Médico Veterinario, Doctor en Salud Pública, Profesor Asociado

Ha revisado el Proyecto de Investigación titulado: **"ROLE OF PORCN IN TOBACCO SMOKE-INDUCED ORAL CARCINOGENESIS: A NOVEL THERAPEUTIC APPROACH TO PREVENT MALIGNANT TRANSFORMATION OF ORAL KERATINOCYTES"**. Cuyo investigador responsable es la Dra. Montserrat Reyes, quien desarrolla labores en el Departamento de Patología y Medicina Oral, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

El Comité revisó los siguientes documentos del estudio:

- Proyecto Concursable FONDECYT de Iniciación N°11221000
- Curriculum Vitae de los investigadores
- Consentimiento Informado
- Carta de autorización del Establecimiento:
 1. Dr. Vladimir Pizarro Díaz, Director Clínica Odontológica, Universidad de Chile
- Carta Compromiso del Investigador

El proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos CIOMS 2016, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

22/MAR/2022



Teléfono: 29789536 - Email: caish.med@uchile.cl