



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

**“ASOCIACIÓN ENTRE EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA
DE β -CATENINA Y MMP-9 EN CARCINOMAS ORALES
DE CÉLULAS ESCAMOSAS”**

Fabián Andrés Lucero Lucero

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

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Andrea Maturana Ramírez.

TUTORES ASOCIADOS

Prof. TM. Montserrat Reyes Rojas.

Prof. Dra. Daniela Adorno Farías.

**Adscrito a Proyecto FIOUCH 13-008
Santiago - Chile
2015**



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

**“ASOCIACIÓN ENTRE EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA
DE β -CATENINA Y MMP-9 EN CARCINOMAS ORALES
DE CÉLULAS ESCAMOSAS”**

Fabián Andrés Lucero Lucero

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

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Andrea Maturana Ramírez.

TUTORES ASOCIADOS

Prof. TM. Montserrat Reyes Rojas.

Prof. Dra. Daniela Adorno Farías.

**Adscrito a Proyecto FIOUCH 13-008
Santiago - Chile
2015**

A MI FAMILIA POR EL AMOR INCONDICIONAL, SUSTENTO Y CONFIANZA.

A MIS AMIGOS/AS POR EL AFECTO, LEALTAD Y COMPRENSIÓN.

*A MIS MAESTROS Y TUTORAS DE ESTA TESIS, POR ENTREGARME LAS
HERRAMIENTAS Y APOYO CONSTANTE.*

A MIS PACIENTES POR LA CONFIANZA Y ALENTARME SIEMPRE.

MI GRATITUD Y ADMIRACIÓN ...

*Es
esa
libertad
espiritual, que
no se nos puede
arrebatar, lo que hace
que la
vida
tenga
sentido
y propó-
sito. Frankl.*

AGRADECIMIENTOS

- A las Tutoras de esta tesis:
 - Tutor Principal: Prof. Dra. Andrea Maturana Ramírez.
 - Tutores Asociados: Prof. TM. Montserrat Reyes Rojas y Prof. Dra. Daniela Adorno Farías.

- Al proyecto al cual está adscrita: FIOUCh N° 13-008: “Relación entre linfocitos T Reguladores y Natural Killer en el infiltrado linfocitario de Carcinoma de Células Escamosas”.

- Servicio de Anatomía Patológica. Departamento de Patología y Medicina Oral de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

ÍNDICE

	Página
Resumen	1
Introducción	2
Marco teórico	
- Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE)	3
- Epidemiología del Cáncer Oral	4
- Características clínicas e histológicas de COCE	5
- Pronóstico y supervivencia de pacientes con COCE	6
- Metaloproteinasa de matriz extracelular-9 (MMP-9)	8
- MMP-9 y su asociación con COCE	9
- Vía de Señalización Wnt/ β -catenina	11
- Wnt/ β -catenina y su asociación con COCE	14
- Asociación entre Wnt/ β -catenina y MMP-9	16
- Planteamiento del problema	18
Hipótesis	19
Objetivo general	19
Objetivos específicos	19
Metodología	20
- Tipo de estudio	20
- Fuente de información	20
- Descripción de la muestra	20
- Criterios de inclusión y exclusión	20
- Recolección de datos y procesamiento del tejido	21
- Técnica inmunohistoquímica (IHQ):	22
o Procesamiento previo a la técnica inmunohistoquímica	22
o Técnica IHQ para la detección de β -catenina y MMP-9	22
- Inmunomarcación y observación microscópica	23
o Recuento de células inmunopositivas	23
▪ Evaluación de β -catenina	23
▪ Evaluación de MMP-9	24

	Página
- Variables del estudio	25
- Análisis estadístico	25
Resultados	26
- Características clínico-patológicas del grupo en estudio	26
- Análisis de inmunoreactividad	29
o Marcación inmunohistoquímica de MMP-9 en COCE	29
o Marcación inmunohistoquímica de β -catenina en COCE	31
- Asociación entre inmunomarcación de MMP-9 y β -catenina en COCE	35
- Relación entre inmunomarcadores y parámetros clínico-patológicos	36
Discusión	37
- Limitaciones del estudio	46
- Aspectos éticos	46
Conclusiones	47
Referencias bibliográficas	48
Anexos	62
Aprobación proyecto de investigación FIOUCh 2013, Dirección de investigación Facultad de Odontología, Universidad de Chile.	63
Aprobación del comité de Ética Facultad de Odontología, Universidad de Chile.	67
Aprobación del comité de Bioseguridad Facultad de Odontología, Universidad de Chile.	68

RESUMEN

El Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE) es el tipo histológico más frecuente de Cáncer Oral, tiende a ser altamente agresivo e infiltrante, generando rápidamente metástasis. Los pacientes afectados presentan una baja sobrevida a los 5 años desde el momento del diagnóstico. La caracterización de moléculas alteradas en COCE es esencial para comprender los mecanismos moleculares involucrados en su patogénesis, autores señalan que tanto Metaloproteinasa-9 (MMP-9), a través de la degradación del colágeno tipo IV, como la expresión nuclear de β -catenina, regulador de la vía Wnt canónica, se asocian en su progresión e invasión. Este estudio tuvo como objetivo determinar la asociación entre β -catenina y MMP-9 en muestras de COCE.

Se seleccionaron 50 biopsias con diagnóstico histopatológico de COCE entre los años 2000 y 2013, desde el Servicio de Anatomía Patológica de la FOUCH, que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión. Las muestras fueron procesadas para el estudio histopatológico y teñidas con anticuerpos monoclonales anti- β -catenina y anti-MMP-9, evaluando la expresión de ambas moléculas a través de microscopía óptica. Se realizó el análisis estadístico mediante el software stata 11.0. Se detectó inmunoreactividad para MMP-9 en todas las muestras en estudio, con un promedio de 82,43% de las células. β -catenina fue detectada en todas las muestras en el citoplasma y en la membrana, en la cual su intensidad fue decreciendo a medida que disminuyó el grado de diferenciación celular; a nivel nuclear sólo 7 muestras fueron positivas. No se observó una asociación entre la expresión nuclear de β -catenina y la expresión de MMP-9 en las muestras de COCE. Sin embargo, se evidenció que las muestras con presencia positiva a nivel nuclear de β -catenina presentaron un nivel de expresión mayor de MMP-9 que las muestras negativas. Hubo una distribución similar en la expresión de β -catenina y MMP-9 entre los parámetros clínico-patológicos en las muestras de COCE. Este estudio es un acercamiento para analizar como se relaciona β -catenina y MMP-9 y tratar de comprender su rol en el desarrollo del COCE.

Palabras clave: Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE), β -catenina, Metaloproteinasa-9.

1. INTRODUCCIÓN

El Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE) es la neoplasia maligna más frecuente en la cavidad oral, se caracteriza por ser altamente agresivo e infiltrante, generando compromiso linfático y metástasis con facilidad. Habitualmente se diagnostica tardíamente, lo que repercute en parte, en la baja sobrevida a los 5 años de los pacientes, a pesar de los avances en su tratamiento.

Los mecanismos moleculares que subyacen su patogenia aún no se entienden completamente. Por lo tanto, una mejor comprensión de moléculas alteradas en COCE podría ayudar a predecir el pronóstico de estos pacientes. Las moléculas de adhesión celular, entre ellas β -catenina, y de degradación de la matriz extracelular (MEC), como la metaloproteinasa de matriz extracelular-9 (MMP-9), se han asociado con su desarrollo y progresión. MMP-9, a través de la degradación de componentes de la MEC y de la membrana basal, y β -catenina, a través de su acumulación citoplasmática y posterior translocación al núcleo, donde actuaría como un co-activador, induciendo la transcripción de genes diana de la vía de señalización Wnt canónica.

Por lo anteriormente descrito, este proyecto propone evaluar si existe una asociación entre la expresión de β -catenina y MMP-9 en muestras de COCE. Nuestro objetivo es evaluar si existe asociación entre estas variables, identificar su presencia y distribución para indagar su eventual participación en la patogénesis de COCE.

2. MARCO TEÓRICO

CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS (COCE)

La cavidad oral puede verse afectada por diversos tipos de neoplasias malignas, según la clasificación de tumores de la OMS del año 2005, se pueden dividir en tumores epiteliales malignos, carcinomas de glándulas salivales, tumores de tejidos blandos de la mucosa, tumores de tejidos hematolinfoides, melanomas y tumores secundarios (IARC 2005).

El tipo histológico más frecuente de cáncer oral es el Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE), también conocido como Carcinoma Espinocelular (CEC), el cual corresponde aproximadamente a un 90% de los cánceres orales (Neville y cols., 2002). Generalmente se desarrolla a partir de lesiones potencialmente malignas (Lambert y cols., 2011).

El desarrollo de COCE es un proceso secuencial influenciado por factores ambientales y de estilos de vida, que actuarían mediante el aumento de la tasa de mutaciones genéticas en individuos susceptibles (El-Mofty, 2014). Los factores de riesgo asociados al cáncer oral y faríngeo son el uso de tabaco, abuso del alcohol, bajo consumo de frutas y vegetales y un bajo nivel socioeconómico (Conway y cols., 2008; Scully y cols., 2009). Además, masticar la hoja de betel y nuez de areca (Asia) (Lambert y cols., 2011), la exposición solar (radiación UV), la radiación ionizante, algunos genotipos del Virus del Papiloma Humano (VPH) y ciertas infecciones o estados de compromiso inmunológico son otros factores asociados al desarrollo del cáncer oral (Scully y cols., 2009).

EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER ORAL

En el reporte de GLOBOCAN del año 2012 se estima una incidencia anual mundial de 300.373 casos de cáncer oral, incluyendo labio, correspondientes al 2,1% del total de cánceres y 145.353 casos en que constituyó la causa de muerte. El cáncer oral se encuentra dentro de los 15 tipos de cánceres más frecuentes en hombres (Ferlay y cols., 2014). Su mortalidad es considerable y depende principalmente del estadio clínico en el momento del diagnóstico de la enfermedad (Van der Waal, 2013).

En Estados Unidos, el cáncer oral y orofaríngeo corresponden aproximadamente al 3% de tumores malignos en hombres y al 2% en mujeres (Neville y cols., 2002). En países de América Latina y el Caribe las tasas de incidencia varían de forma amplia, pero tienden a ser menores o equivalentes a las de países desarrollados (Wünsch y cols., 2001). Chile no cuenta con registros sobre incidencia de cáncer oral a nivel nacional, pero se han iniciado registros poblacionales en Valdivia (1993), Antofagasta (1998) y Concepción (2003) (Minsal 2012). Riera y cols., estimaron que el cáncer oral y faríngeo corresponde al 1,6% del total de casos de cáncer entre los años 1969 y 2002, en este mismo periodo de observación la tasa de morbilidad por estos tipos de cánceres experimentó un aumento progresivo. La tasa de mortalidad por cáncer oral y faríngeo en Chile entre los años 2002 y 2010 fluctuó entre 1,11 a 1,25 por 100.000 habitantes (Ramírez y cols., 2015), manteniéndose estables a lo largo del periodo y sin presentar mayores cambios respecto a lo reportado por Riera y cols., entre 1981 y 2002 (Riera y cols., 2005).

El cáncer oral y faríngeo afecta principalmente a hombres, sobre los 45 años de edad, llegando al máximo de casos diagnosticados entre los 55–64 años, disminuyendo luego con la edad. En mujeres, se observa un aumento progresivo con la edad, teniendo su máximo de casos entre los 65–74 años, con una razón hombre: mujer de 2,3:1 (Riera y cols., 2005). En Chile más del 90% de los casos se diagnostica sobre los 40 años y más del 80% en estadios avanzados (Bórquez y cols., 2011).

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS DE COCE

Comúnmente la apariencia clínica de COCE varía desde úlceras que no cicatrizan con bordes firmes a la palpación (indurados) a lesiones exofíticas, leucoplásicas o eritroplásicas (Neville y cols., 2002a, 2008b).

La localización anatómica más frecuente es la lengua (50%), específicamente en la superficie póstero-lateral y ventral, seguida por el piso de boca (35%) (Neville. 2008). En Chile, se ha reportado que los sitios anatómicos más frecuentes son lengua (40,1%) y piso de boca (26,3%), seguido por trígono retromolar, reborde alveolar, paladar y mucosa yugal (Rojas-Alcayaga y cols., 2010).

Histológicamente es idéntico a los carcinomas de células escamosas de otros sitios como Carcinomas de Cabeza y Cuello (CCC), presentando signos de diferenciación escamosa, con queratina extracelular o intracelular y/o uniones intercelulares. Las células tumorales están generalmente adheridas unas a otras como en un "mosaico". El tumor puede estar dispuesto en nidos, masas, como grupos pequeños de células ó como células individuales. La invasión se produce como proyecciones romas o cordones finos desiguales e irregulares, existiendo por lo tanto dos patrones; expansivo e infiltrativo respectivamente. Según su grado de diferenciación pueden ser clasificados en bien, moderadamente o pobremente diferenciado, así, un COCE bien diferenciado presenta formación de perlas de queratina o queratinización intracelular, que lo hace similar a su tejido de origen. Al contrario, el COCE pobremente diferenciado muestra mucho pleomorfismo celular y nuclear, lo que dificulta identificar su tejido de origen. Tumores con apariencia entre estos dos extremos se denominan COCE moderadamente diferenciado (WHO. 1998; Neville y cols., 2002a, 2008b).

PRONÓSTICO Y SOBREVIDA DE PACIENTES CON COCE

El COCE se caracteriza por una alta tasa de invasión local y metástasis cervical, la que afecta directamente al pronóstico de los pacientes (Kohler y cols., 2012). La metástasis de ganglios linfáticos se considera hasta el momento el predictor más importante en las tasas de supervivencia. El 50% de los pacientes presentan compromiso ganglionar detectable al momento del diagnóstico, de este grupo, menos del 40% sobrevive luego de 5 años, comparado con el 90% de supervivencia de pacientes sin metástasis; es decir, la tasa de supervivencia disminuye cerca de un 50% cuando existen metástasis a nivel ganglionar (Sano y cols., 2007; Grimm y cols., 2012). En Chile, Bórquez y cols., han descrito una supervivencia global para el cáncer oral, no exclusivo para COCE, de 57% a los 5 años, los que varían desde 86% hasta un 51% según su estadio (Bórquez y cols., 2011).

A pesar de los avances en las opciones terapéuticas para COCE en las últimas décadas, la cirugía sigue siendo el pilar del tratamiento en etapas tempranas y tardías de la enfermedad. La adyuvancia con radioterapia y quimioterapia juegan un rol fundamental en los estadios avanzados para obtener el máximo control locoregional. Actualmente las pautas de tratamiento se basan en indicadores clínicos como el estadio, TNM y ubicación; y con base a parámetros histológicos, como el grado de diferenciación y profundidad de invasión. Sin embargo, estos factores no son del todo precisos para el pronóstico (Sano y cols., 2007; Kohler y cols., 2012).

La tasa de supervivencia a cinco años de los pacientes no ha mejorado sustancialmente. Esto es en parte debido a un alto porcentaje (10- 50%) de recidivas loco-regionales y a distancia después de la cirugía, incluso en pacientes con márgenes quirúrgicos histopatológicamente negativos. (Neville y cols., 2008) Autores sugieren que la causa más importantes de recurrencia local es la persistencia de células tumorales en los márgenes de resección o linfonodos locales (Kademani. 2007). El examen histológico de los márgenes quirúrgicos conduce a la completa extirpación del tumor, pero las células cancerosas residuales mínimas no se pueden detectar con un examen histológico de rutina. La predicción del

comportamiento de COCE es diferente usando parámetros clínicos e histopatológicos convencionales. (Scully y cols., 2009)

La caracterización de moléculas alteradas en el cáncer oral es esencial para comprender los mecanismos moleculares involucrados en la progresión del tumor subyacente, así como para contribuir al hallazgo de biomarcadores de cáncer y el descubrimiento de dianas terapéuticas (Barakat. 2015). Biomarcadores moleculares que incluyen marcadores de adhesión celular y de la degradación de la matriz, como lo son las metaloproteinasas de matriz extracelular, han sido estudiados como herramientas potenciales para predecir el pronóstico de los pacientes con COCE.

METALOPROTEINASA DE MATRIZ EXTRACELULAR-9 (MMP-9)

El potencial de invasión y metástasis de COCE involucra varias etapas, que incluyen la degradación de la membrana basal y de la matriz extracelular (MEC), alteraciones en la adhesividad, motilidad celular y angiogénesis (Haddad y cols., 2008). Las células neoplásicas modifican la función de sus receptores de adhesión de superficie, elaboran proteasas y activan el citoesqueleto para su desplazamiento, migran a través de la matriz intersticial e invaden vasos para luego crecer de nuevo en ganglios linfáticos u órganos distantes (Weaver. 2006; Grimm y cols., 2012).

El sistema enzimático implicado en este proceso biológico pertenece a la familia de las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs), estas endopeptidasas dependientes de zinc, son secretadas como zimógenos y su acción se equilibra mediante el control de sus activadores e inhibidores tisulares endógenos (TIMP) que permiten una función adecuada, integrada en el crecimiento fisiológico del tejido (Vilen y cols., 2013). Su rol en la degradación de la MEC y componentes de la membrana basal en neoplasias malignas constituyen un importante mecanismo que precede la invasión local del tejido y metástasis (Shuman y cols., 2012).

MMPs estarían implicadas en la formación de un microambiente adecuado para la transformación de genes promotores, liberación de mediadores angiogénicos, factores de crecimiento y quimioquinas. Algunos estudios han demostrado la participación de diferentes MMPs en el COCE, asociado a invasión tumoral (Shuman y cols., 2012; Suarez-Roa y cols 2012).

Una de estas enzimas es la MMP-9, colagenasa tipo IV específica, presente en la lámina basal y en la MEC y que participa en la degradación de colágeno de tipo IV y en la liberación del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento asociado a la angiogénesis (Lothaire y cols., 2006; Bauvois. 2012; Fan y cols., 2012; Henriques y cols., 2012).

MMP-9 Y SU ASOCIACIÓN CON COCE

MMP-9 se ha asociado tradicionalmente con la naturaleza agresiva de CCC, incluyendo a COCE (Shuman y cols., 2012; Suarez-Roa y cols., 2012). Sin embargo, muchos investigadores han presentado resultados contradictorios (Yorioka y cols., 2002; Zhou y cols., 2010). Por ejemplo, Guttman y cols., no encontraron una correlación entre la expresión de MMP-9 y el tamaño del tumor primario o metástasis cervical en pacientes con COCE de lengua. Mientras tanto, Katayama y cols., informaron que altos niveles de expresión de MMP-9 en pacientes con CCC se correlacionó con ganglios linfáticos regionales y/o metástasis a distancia y un mal pronóstico (Guttman y cols., 2003; Katayama y cols., 2004).

Además, De Vicente y cols., mostraron que la expresión de MMP-9 no se asoció con variables clínicas, tales como la etapa del tumor o la tasa de recurrencia (De Vicente y cols., 2005). En otro estudio la actividad gelatinolítica y un aumento de la expresión tanto de MMP-2 como de MMP-9 en CCC estaban relacionados con la invasividad, pero no con el potencial metastásico (Ikebe y cols., 1999).

En general, tanto el aumento de la vascularización del tumor como la expresión de factores pro angiogénicos se han asociado con una fase avanzada de los tumores y pobre pronóstico en varios cánceres humanos. (Köhler y cols. 2012). MMP-9 jugaría un doble papel en este proceso, actuando como un factor pro angiogénico al activar la liberación de VEGF (Bergers y cols., 2000; Kim y cols., 2006; Henriques y cols., 2012). Como también podría tener un papel anti angiogénico, al provocar la escisión de colágeno tipo XVIII, que conduce a la liberación de endostatina, un potente inhibidor de la angiogénesis y la migración de células endoteliales; así como de la angiostatina, un fragmento de plasminógeno que inhibe la proliferación de células endoteliales. Aparte de la producción de endostatina y angiostatina, MMP-9 se asocia con la degradación proteolítica de colágeno de tipo IV, que produce un inhibidor de la angiogénesis, tumstatina (Vilen y cols., 2013).

Actualmente, MMP-9 se conoce como un modulador multifuncional que está implicada en cascadas de señalización celular muy complejas. En el proceso de invasión de COCE, participa en la señalización celular indirecta mediante el control de la biodisponibilidad y bioactividad de moléculas que se dirigen a receptores específicos, que regulan el crecimiento celular, la migración, la inflamación y la angiogénesis (Van Den Steen y cols., 2000; Bauvois. 2012; Vilen y cols., 2013).

Esclarecer el rol de MMP-9 en la progresión de COCE resulta relevante, pues estaría involucrada en procesos de invasión y metástasis, lo que repercute directamente en el pronóstico de pacientes con COCE.

Las cascadas de señalización que pueden resultar en carcinogénesis raramente funcionan solas o aisladas. La intercomunicación entre ellas es absolutamente compleja conllevando a diferentes respuestas celulares dependiendo del estímulo externo. Otra vía de señalización asociada a alteraciones celulares que derivan en cáncer corresponde a Wnt/ β -catenina, alteraciones en esta vía se asocian a Cáncer colorrectal esporádico, Carcinoma hepatocelular, Melanoma, Cáncer endometrial, Cáncer de ovario, Cáncer gástrico, Leucemias, Cáncer de próstata, entre otros (Logan y cols., 2004; Suzuki y cols., 2004; Alberts y cols., 2005; Vermeulen y cols., 2010). Aunque su rol en COCE no ha sido ampliamente estudiado (Iwai y cols., 2010).

VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT/ β -CATENINA

Un elemento importante en la asociación de células adyacentes son las uniones adherentes, están formadas por complejos constituidos por moléculas de adhesión, las cadherinas, y proteínas citoplasmáticas llamadas cateninas (alfa, beta, gamma y delta). La β -catenina es una proteína de 728 aminoácidos, que se encuentra unida al dominio citoplasmático de E-cadherina y que actúa como una proteína intermediaria para la unión de moléculas de adhesión y el citoesqueleto en las uniones celulares (Córdova y cols., 2009).

Inicialmente, se había establecido que la única función de β -catenina era participar en el control de la función adhesiva de la E-cadherina. Posteriormente, se logró establecer una segunda función, ser un componente importante de la vía de señalización intracelular Wnt.

En el ser humano se conocen 19 proteínas codificadas por genes Wnt. (Mlodzik y cols., 2002). Las proteínas Wnt son una familia de glicoproteínas de secreción con diversas funciones en el desarrollo, incluyendo la regulación, diferenciación, proliferación y muerte celular (Miller y cols., 2001).

Estas proteínas actúan como ligandos para estimular vías de transducción de señales mediadas por receptores en organismos vertebrados e invertebrados. Actualmente, se conocen cuatro vías de señalización Wnt: 1) vía canónica o Wnt/ β -catenina; 2) vía Wnt/ Ca^{+2} que involucra a la proteína quinasa A; 3) vía de polaridad celular planar, y 4) vía que involucra a la proteína quinasa C e interviene en el proceso de miogénesis. Algunas de las proteínas Wnt activan y modulan la vía canónica, la más importante y mejor estudiada vía de control y regulación citoplasmática relacionada con la proteína β -catenina, la cual se ha identificado como la principal responsable de alteraciones celulares que derivan en algunos tipos de cáncer (Ochoa-Hernández y cols., 2012).

La activación de la vía se inicia con la secreción de proteínas Wnt y su unión a los receptores de superficie celular Frizzled (Fzd). Los ligandos Wnt se producen en una amplia variedad de tejidos del organismo que van desde neuronas hasta fibroblastos, y utilizan generalmente un mecanismo de señalización de tipo autocrino (Luu y cols., 2004; Dosen y cols., 2006).

Los receptores Fzd pertenecen a una familia de proteínas con siete regiones transmembranales, su activación recluta a la proteína Dishevelled (Dvl) que, posteriormente es fosforilada (Alberts y cols., 2005; Takahashi-Yanaga y cols., 2007). La unión de Wnt con los receptores Fzd requiere, además, la participación de proteínas relacionadas con los receptores de lipoproteínas de baja densidad LRP5 o LRP6 (Winn y cols., 2006). La activación de la proteína Dvl bloquea al complejo protéico citoplasmático encargado de la degradación de la proteína β -catenina.

En ausencia del ligando Wnt, las β -cateninas citoplasmáticas son degradadas por un complejo multiprotéico que comprende la enzima glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK-3 β), la proteína poliposis adenomatosa coli (APC), Axina, encargada de mantener unido al complejo de degradación y la enzima caseína quinasa 1 α (CK1 α) (Takahashi-Yanaga y cols., 2007).

En el núcleo, en ausencia de la proteína β -catenina, los genes diana de la vía de señalización Wnt son normalmente inhibidos por un complejo protéico que incluye al factor estimulador linfoide (LEF) y al factor de células T (TCF) unidos a la proteína co-receptora Groucho. La inhibición de la degradación de β -catenina ocasionada por el ligando Wnt da como resultado la acumulación de dichas proteínas citoplasmáticas y su posterior translocación al núcleo para formar un complejo con LEF/TCF, que desplaza a la proteína Groucho y adopta la función de co-activador al inducir la transcripción de los genes diana de la vía Wnt (**Figura 1**) (Khul y cols., 2000; Reya y cols., 2005). Entre los genes diana activados por esta vía se encuentran: *c-Myc*, *c-Jun*, *CCND1*, *PPARD*, *FOSL1* y *UTERIN*, relacionados con crecimiento y proliferación celular (Gao y cols., 2005, Iwai y cols., 2005, Ochoa-Hernández y cols., 2012).

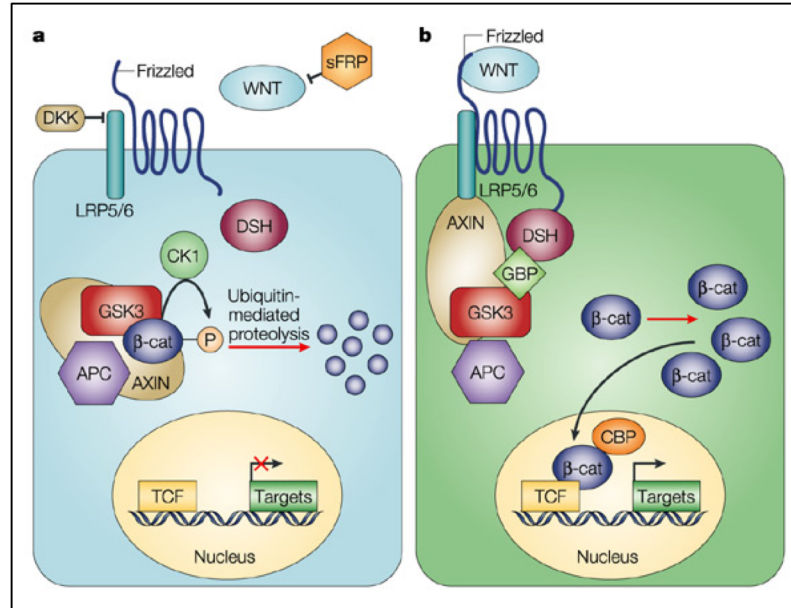


Figura 1. Vía de señalización Wnt canónica. En ausencia de Wnt activa (a), β -catenina es degradada, y los potenciales genes diana están en un estado reprimido. Si la señalización Wnt está activa (b), se reduce la degradación de β -catenina. Como β -catenina se acumula, transloca hacia el núcleo, se une a LEF/TCF y activa la transcripción. (Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. (2004) WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet.* 5(9):691-701.)

La molécula de adhesión epitelial E-cadherina puede actuar como regulador negativo de la vía, afectando la localización intracelular de β -catenina. La E-cadherina se une a β -catenina impidiendo su ingreso al núcleo (Ying y cols., 2008). La actividad de la vía depende de la concentración citoplasmática de β -catenina. Lo normal es que esta proteína se mantenga en bajas concentraciones en el citoplasma, gracias a su degradación estrictamente regulada (Córdova et al, 2010).

En la actualidad se conocen varios genes reguladores de esta vía que se encuentran alterados en los diferentes cánceres humanos ya mencionados (Logan y cols., 2004; Suzuki y cols., 2004; Alberts y cols., 2005; Vermeulen y cols., 2010). En todos estos casos el común denominador es la modificación en la expresión de los genes diana de la vía de señalización Wnt/ β -catenina (Johnson y cols., 2006).

WNT/ β -CATENINA Y ASOCIACIÓN CON COCE

En condiciones fisiológicas, la mucosa de la cavidad oral a través de inmunohistoquímica exhibe tinción en la membrana para β -catenina. En contraste, la acumulación citoplasmática de β -catenina se observa frecuentemente en COCE (Lo Muzio y cols., 1999; Gao y cols., 2005; Lopes y cols., 2009), aunque no está estrechamente asociado con alteraciones mutacionales, sugiriendo que la desregulación de la vía β -catenina y su consiguiente hiperactividad puede contribuir a la progresión de COCE (Iwai y cols., 2010).

Autores han demostrado que la activación de la vía Wnt/ β -catenina se correlaciona con la transición epitelial-mesenquimal (TEM), es decir, células del carcinoma cambian su morfología, reducen sus adherencias intercelulares y célula-matriz, aumentando su motilidad e invasividad (Sun y cols., 2008; Lopes y cols., 2009; Schmalhofer y cols., 2009; Takayama y cols., 2009). Sin embargo, algunos estudios inmunohistológicos de cáncer oral no lograron detectar una asociación entre la expresión de β -catenina y metástasis ganglionar (Tanaka y cols., 2003; Kurtz y cols., 2006).

Zaid. investigó la expresión inmunohistoquímica de E-cadherina y β -catenina en muestras de COCE, así como la correlación entre la expresión de ambas y la diferenciación histopatológica de este tumor. La pérdida de expresión de ambas moléculas fue un evento frecuente en COCE de todas las diferenciaciones histológicas (Zaid. 2014).

Reyes y cols., determinaron y compararon la expresión nuclear de β -catenina en muestras de displasia oral y COCE sugiriendo que la expresión nuclear de β -catenina puede estar relacionado con la proliferación celular, lo que sugiere un papel de esta proteína en la progresión de la displasia y transformación maligna temprana hacia el COCE, por lo que β -catenina sería un potencial marcador para lesiones displásicas de la cavidad oral (Reyes y cols., 2015).

La pérdida de adhesión intercelular es sólo una de las etapas necesarias para la aparición de metástasis. A su vez, es necesaria la existencia de otros fenómenos, tales como la destrucción de la MEC causada por metaloproteinasas de matriz extracelular, entre ellas MMP-9 (Lopes et al., 2009).

ASOCIACIÓN ENTRE WNT/ β -CATENINA Y MMP-9

En la literatura existen escasos estudios sobre la asociación entre Wnt/ β -catenina y MMP-9, más bien han evidenciado a modo de hallazgo, una posible interacción entre ambas, sin embargo, el mecanismo molecular de la interacción aún no se ha descrito.

Wu. y cols., estudiaron células endoteliales señalando que la vía Wnt estabiliza a β -catenina haciendo que se dirija directamente a los promotores de MMPs en el núcleo a través de LEF-1/TCF, por lo tanto, MMP-9 sería objetivo directo de la vía de señalización Wnt (Wu. y cols., 2007).

Algunos estudios han informado que la inhibición de β -catenina por algunos agentes farmacológicos también puede inhibir la expresión de MMP-9, los autores reportaron que el agente en estudio disminuyó la expresión nuclear de β -catenina, reduciendo la inducción de genes objetivos de la vía de señalización Wnt, entre ellos la expresión de MMP-9, provocando inhibición de la invasión y de metástasis (Song y cols., 2012; Singh y cols., 2013; Kwon y cols., 2014).

En un estudio in vitro, se ha señalado a modo de hallazgo que la actividad transcripcional de β -catenina se ha correlacionado positivamente con el aumento en los niveles de transcripción de MMP-9 en células escamosas orales (Li y cols., 2009).

Interesante es que en COCE, TGF β -1 aumenta la expresión de MMP-9 y desencadena la TEM (Sun y cols., 2008; Takayama y cols., 2009). Curiosamente, la forma inactiva de TGF- β 1 es activado por MMP-9 (Yu y cols., 2000). Cabe mencionar que un cambio bioquímico común asociado con TEM es la reducción en la expresión de E-cadherina (Iwai y cols., 2005).

Otros factores de crecimiento que se relacionan y potencian las acciones de β -catenina son el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) y VEGF activando la vía de señalización Rac/KRAS, que potencia la vía Wnt/ β -catenina incrementando el

tiempo de permanencia y concentración de β -catenina en el núcleo (Vermeulen y cols., 2010; Korkaya y cols., 2010; Takebe y cols., 2011). A su vez, como vimos anteriormente, está bien documentado el rol de MMP-9 en la liberación de VEGF. MMP-9 y VEGF se expresan durante COCE invasivo de lengua y en tumores metastásicos (Henriques y cols., 2012; Bauvois. 2012).

Estos hallazgos sugieren una posible correlación entre β -catenina y MMP-9 en COCE, ambas interactúan con moléculas ligadas al proceso de carcinogénesis, y al parecer MMP-9 sería un objetivo directo de la vía de señalización Wnt.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como describimos anteriormente, la tasa de supervivencia a cinco años de los pacientes diagnosticados con COCE no ha mejorado sustancialmente, en parte debido a un diagnóstico tardío. Riera y cols., señalan que la morbilidad por cáncer oral y faríngeo en Chile, estimada a partir de registros de egresos hospitalarios, experimentó un aumento progresivo entre el periodo 1969-2002 (Riera y cols., 2005). Pacientes con esta patología sufren un significativo deterioro en su calidad de vida, debido al dolor crónico, la pérdida de tejidos, pérdida de función y secuelas emocionales.

Este proyecto propone evaluar si existe una asociación entre la expresión de β -catenina y MMP-9 en muestras de COCE, registrados en los archivos del Servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile (FOUCH), entre los años 2000-2013. Nuestro objetivo es evaluar si existe asociación entre estas variables, identificar su presencia y distribución para indagar su eventual participación en la patogénesis de COCE.

3. HIPÓTESIS

Existe asociación entre expresión de β -catenina y MMP-9 en muestras de Carcinoma Oral de Células Escamosas evaluadas en este estudio.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar la asociación entre β -catenina y MMP-9 en muestras de Carcinoma Oral de Células Escamosas evaluadas en este estudio.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar la expresión de β -catenina y MMP-9 en Carcinoma Oral de Células Escamosas en este estudio.
- 2) Determinar el porcentaje de inmunomarcación de β -catenina y MMP-9 en Carcinoma Oral de Células Escamosas en este estudio.
- 3) Determinar la relación entre β -catenina y MMP-9 en muestras de COCE evaluadas en este estudio.
- 4) Describir aspectos clínico-demográficos y anátomo-patológicos de los casos de Carcinoma Oral de Células Escamosas en estudio.

6. METODOLOGÍA

Tipo de estudio

Estudio de tipo observacional analítico, de corte transversal.

Fuente de Información

La fuente de información fueron las fichas clínicas y biopsias en bloques de parafina con diagnóstico histopatológico de COCE, registrados en los archivos del Servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile (FOUCH).

Descripción de la muestra

Correspondió a un muestreo de tipo no probabilístico, por conveniencia. De la base de datos digital del Servicio de Anatomía Patológica de la FOUCH se seleccionaron 50 casos con diagnóstico histopatológico de COCE, según la Clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del año 1998, entre los años 2000 y 2013, que cumplieron con los criterios de inclusión.

Criterios de inclusión

- Diagnóstico confirmado de COCE por histopatólogo oral.
- Cantidad suficiente de material fijado e incluido en bloques de parafina que permita hacer los análisis de inmunohistoquímica.
- Área disponible de observación con un mínimo de 4 mm².
- Contar con datos clínico-demográficos de los casos de COCE en las fichas del paciente.

Criterios de exclusión

- Muestras que tengan artefactos de técnica quirúrgica y/o de procesamiento histológico.
- Muestras que correspondan a recidivas de la lesión inicial.

Recolección de datos y procesamiento de los tejidos

De la base de datos digital se obtuvieron los datos clínicos, el número de ficha clínica y el número de biopsia de los pacientes diagnosticados con COCE durante el periodo 2000-2013.

Luego de seleccionar los casos, se confirmó el diagnóstico y el cumplimiento de los criterios de inclusión y exclusión por un patólogo oral del Departamento de Patología y Medicina Oral de la FOUCH. Dichos casos previamente teñidos con hematoxilina-eosina (HE) fueron observados mediante un microscopio óptico Olympus CX21, con el cual se seleccionó el corte más representativo en los casos que existió más de una placa histológica, y con el que se confirmó el diagnóstico histopatológico de cada caso.

La información básica completa de los pacientes (edad, sexo y localización de la lesión) se obtuvo de las fichas clínicas seleccionadas.

La información obtenida fue recopilada en una planilla del programa computacional Microsoft Excel® 2015.

TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

Procesamiento previo a la IHQ

Una vez seleccionados los moldes, a cada bloque de parafina se le realizaron 2 cortes (uno para cada anticuerpo) de 4 μm con navajas de corte para tejidos blandos marca Feather®, en un micrótopo marca E. Leitz Wetzlar®. Posteriormente fueron colocadas en un baño de estirado marca Leblinc® a 38°C; cada corte fue recogido en portaobjetos con carga positiva (Laboratorio Cellpath, Inglaterra) y secados a 60°C por 30 min. en estufa marca Memmert®.

Técnica IHQ para la detección de β -catenina y MMP-9

Las muestras en cada portaobjeto fueron desparafinadas en xilol y rehidratadas en alcoholes descendentes hasta el agua destilada. Las secciones fueron colocadas en buffer citrato de sodio (pH= 6) por 45 min. en olla a presión 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 pre-incubadas con suero de caballo durante 20 min. a temperatura ambiente. Se incubaron durante 30 min. en cámara húmeda a 37°C con los siguientes anticuerpos primarios:

Tabla 1. Características de anticuerpos primarios utilizados en este estudio.

Anticuerpo primario	Anti- β -catenina	Anti-MMP 9
Tipo de Anticuerpo	Ac monoclonal Murino	Ac monoclonal conejo
Dilución	1:200	RTU
Laboratorio Comercial	Biogenex	Biogenex
Código del Producto	M3539	AN504-10M
Patrón de marcación	Membrana, Citoplasma, Núcleo	Citoplasma

Posteriormente fueron lavadas con PBS durante 5 min. e incubadas con el anticuerpo secundario biotinilado durante 20 min. a 37°C, y 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 con diaminobencidina (DAB) y fue contrarrestada con hematoxilina de Harris. En el procedimiento se incluyeron controles negativos obtenidos mediante sustitución del anticuerpo específico con PBS y controles positivos para β -catenina de adenocarcinoma de colon y para MMP-9 de médula ósea roja, necesarios para validar la técnica IHQ y la calidad del anticuerpo, bajo la recomendación del fabricante (Coussens LM y cols., 2000).

Inmunomarcación y observación microscópica

Los cortes procesados con inmunomarcación para β -catenina y para MMP-9 fueron etiquetados según número de molde y anticuerpo utilizado.

El análisis de la inmunotinción β -catenina (membranosa, citoplasmática y nuclear) y MMP-9 (citoplasmática), se basó en lo descrito en la literatura y se evaluó mediante microscopio de luz con un aumento de 40x.

Recuento de células inmunopositivas

Evaluación de β -catenina

Dependiendo del patrón de tinción la inmunolocalización β -catenina se clasificó en membranosa, citoplasmática y nuclear (Reyes M. y cols., 2015).

- En membrana la intensidad de la tinción se clasificó como leve, moderada o intensa. En los casos no homogéneos, se registró la intensidad predominante (más del 70% de las células neoplásicas).

- La tinción citoplasmática se registró como positiva o negativa. Se consideró positiva cuando se observó una marcación color pardo a nivel citoplasmático en más del 70% de las células neoplásicas, sin considerar intensidad.
- A nivel nuclear se evaluó como positiva o negativa. Se consideró positiva cuando se observó una marcación color pardo en el núcleo en más del 70% de las células neoplásicas, sin considerar intensidad.

Evaluación de MMP-9

Para evaluar la inmunomarcación de MMP-9 se consideró:

- La tinción citoplasmática de células neoplásicas, sin considerar intensidad.
- La expresión se analizó según porcentaje de células teñidas. El porcentaje de tinción fue evaluado cada 1000 células a 40X. Previamente se seleccionaron zonas *hot spots* a 10X, excluyendo áreas de necrosis y artefacto de técnica.
- De las zonas seleccionadas se obtuvo una fotomicrografía en el microscopio Olympus BX41, utilizando el programa *Micrometrics SE Premiun*, la que se analizó con el software libre *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), permitiendo realizar el conteo de células teñidas.

Dos operadores, en tiempos diferentes, realizaron la observación de las células inmunopositivas. Se realizó una calibración intra-observador. La observación de estos cortes fue realizada en el Área de Anatomía Patológica, Departamento de Patología y Medicina Oral de la FOUCH. La recopilación de datos fue recopilada en una planilla del programa computacional Microsoft Excel® 2015.

Variables del estudio

Inmunotinción de MMP-9:

- Marcación de color café a nivel citoplasmático en células neoplásicas, sin considerar intensidad.

Inmunotinción de β -catenina:

- Marcación de color pardo a nivel de membrana, la intensidad de la tinción se clasificó como leve, moderada o intensa. En los casos no homogéneos, se registró la intensidad predominante (más del 70% de las células neoplásicas)
- Marcación de color pardo a nivel citoplasmático y nuclear, sin considerar intensidad.

Aspectos clínico-demográficos y anátomo-patológicos:

- Edad, sexo, localización de la lesión, apariencia clínica y grado de diferenciación.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis exploratorio de los datos mediante análisis de normalidad de la curva a través de la prueba Shapiro Wilk. Las muestras al no tener distribución normal se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney.

Se consideró un nivel de significancia del 95% ($p < 0,05$) para aceptar diferencias estadísticamente significativas. Todas las pruebas estadísticas se realizaron mediante el software Stata 11.0 (StataCorp LP, CollegeStation, TX, USA).

7. RESULTADOS

En el estudio se analizaron 50 muestras de biopsias de COCE intraorales, entre los años 2000 y 2013, pertenecientes al Servicio de Anatomía Patológica de la FOUCH, que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión establecidos.

Características clínico-patológicas del grupo en estudio

Las características clínicas e histopatológicas de cada uno de los 50 casos estudiados de COCE se presentan en la **Tabla 2**. La primera columna muestra el número del caso asignado para este estudio. En las siguientes columnas se presentan los datos de edad, sexo, localización de la lesión, apariencia clínica y grado de diferenciación obtenida del informe de anatomía patológica.

Tabla 2. Casos de COCE incluidos en el estudio.

CASO	EDAD	SEXO	LOCALIZACIÓN	APARIENCIA CLÍNICA	GRADO DIFERENCIACIÓN
1	34	H	REBORDE	TUMOR	BIEN DIFERENCIADO
2	51	H	PALADAR	TUMOR	BIEN DIFERENCIADO
3	73	M	LENGUA	TUMOR	BIEN DIFERENCIADO
4	61	M	s/i	s/i	BIEN DIFERENCIADO
5	68	M	LENGUA	LEUCOPLASIA	BIEN DIFERENCIADO
6	70	H	REBORDE	ÚLCERA	BIEN DIFERENCIADO
7	60	M	REBORDE	LEUCOPLASIA	BIEN DIFERENCIADO
8	44	M	LENGUA	ÚLCERA	POBREMENTE DIFERENCIADO
9	80	M	LABIO	TUMOR	MODERADAMENTE DIFERENCIADO
10	68	H	LENGUA	TUMOR	BIEN DIFERENCIADO
11	48	H	REBORDE	TUMOR	POBREMENTE DIFERENCIADO
12	60	M	REBORDE	ÚLCERA	BIEN DIFERENCIADO
13	69	H	PISO BOCA	ÚLCERA	MODERADAMENTE DIFERENCIADO
14	97	M	REBORDE	TUMOR	MODERADAMENTE DIFERENCIADO
15	72	M	LENGUA	TUMOR	BIEN DIFERENCIADO
16	46	M	REBORDE	TUMOR	MODERADAMENTE DIFERENCIADO
17	45	M	LENGUA	ERITROPLASIA	MODERADAMENTE DIFERENCIADO
18	55	H	REBORDE	TUMOR	BIEN DIFERENCIADO
19	61	M	PISO BOCA	ÚLCERA	MODERADAMENTE DIFERENCIADO
20	61	H	PALADAR	s/i	BIEN DIFERENCIADO

21	77	M	PALADAR	ÚLCERA	MODERADAMENTE DIFERENCIADO
22	56	H	MUCOSA	ÚLCERA	BIEN DIFERENCIADO
23	64	H	s/i	s/i	MODERADAMENTE DIFERENCIADO
24	64	H	s/i	s/i	MODERADAMENTE DIFERENCIADO
25	70	H	REBORDE	s/i	BIEN DIFERENCIADO
26	59	H	LABIO	s/i	BIEN DIFERENCIADO
27	76	H	s/i	s/i	BIEN DIFERENCIADO
28	65	H	PISO BOCA	ÚLCERA	MODERADAMENTE DIFERENCIADO
29	61	M	PALADAR	ÚLCERA	MODERADAMENTE DIFERENCIADO
30	69	H	PISO BOCA	ÚLCERA	MODERADAMENTE DIFERENCIADO
31	83	M	REBORDE	TUMOR	BIEN DIFERENCIADO
32	60	H	REBORDE	TUMOR	BIEN DIFERENCIADO
33	68	M	MUCOSA	TUMOR	BIEN DIFERENCIADO
34	82	M	REBORDE	ÚLCERA	BIEN DIFERENCIADO
35	57	H	LENGUA	ÚLCERA	BIEN DIFERENCIADO
36	74	M	LENGUA	LEUCOPLASIA	BIEN DIFERENCIADO
37	54	M	LENGUA	LEUCOPLASIA	BIEN DIFERENCIADO
38	55	H	LENGUA	ÚLCERA	BIEN DIFERENCIADO
39	54	H	LENGUA	ÚLCERA	BIEN DIFERENCIADO
40	46	H	MUCOSA	ÚLCERA	MODERADAMENTE DIFERENCIADO
41	89	M	MUCOSA	TUMOR	BIEN DIFERENCIADO
42	58	H	MUCOSA	TUMOR	BIEN DIFERENCIADO
43	58	H	MUCOSA	TUMOR	BIEN DIFERENCIADO
44	69	H	LENGUA	ÚLCERA	MODERADAMENTE DIFERENCIADO
45	83	M	LENGUA	ERITROPLASIA	BIEN DIFERENCIADO
46	53	H	REBORDE	LEUCOPLASIA	BIEN DIFERENCIADO
47	66	M	LENGUA	ÚLCERA	BIEN DIFERENCIADO
48	47	H	REBORDE	TUMOR	BIEN DIFERENCIADO
49	70	H	REBORDE	ÚLCERA	BIEN DIFERENCIADO
50	80	M	MUCOSA	TUMOR	BIEN DIFERENCIADO

s/i: sin información

La edad presentó un rango que fluctuó entre los 34 y 97 años, con un promedio de 63,8 (DS: 12,6) años, en hombres 59,5 (DS: 9,5) y en mujeres 68,6 (DS: 14,1) años, un 64% de los pacientes presentaron una edad igual o mayor a 60 años. La muestra está formada por 54% (n=27) de hombres y 46% (n=23) de mujeres, la localización más frecuente fue reborde (30%), seguido por lengua (28%). El aspecto clínico más frecuente fue úlcera (36%) y tumor (36%). Histológicamente se clasificaron según el

grado de diferenciación en bien, moderada o pobremente diferenciadas, siendo bien diferenciadas el 68% (n=34), 28% fueron moderadamente diferenciadas (n=14) y tan sólo el 4% pobremente diferenciadas (n=2). Como se observa en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Características clínico-patológicas.

Características	n (%)
Grupo de edad	
< 60 años	18 (36)
≥ 60 años	32 (64)
Localización tumor	
Reborde	15 (30)
Mucosa	7 (14)
Lengua	14 (28)
Paladar	4 (8)
Piso de boca	4 (8)
Labio	2 (4)
s/i	4 (8)
Apariencia clínica	
Tumor	18 (36)
Úlcera	18 (36)
Leucoplasia	5 (10)
Eritroplasia	2 (4)
s/i	7 (14)
Grado de diferenciación	
Bien	34 (68)
Moderado	14 (28)
Pobre	2 (4)
Total	50 (100)

Análisis de inmunoreactividad

Marcación inmunohistoquímica de MMP-9 en COCE

Se realizó un análisis inmunohistoquímico para evaluar el porcentaje de células neoplásicas positivas para MMP-9. La localización de la inmunomarcación analizada fue citoplasmática.

Se observó marcación positiva en las células neoplásicas de COCE y en células inflamatorias. La inmunomarcación de MMP-9 sólo se evaluó en el citoplasma de células neoplásicas, evaluando el porcentaje de tinción cada 1000 células sin considerar intensidad, seleccionando zonas *hot spots*, excluyendo áreas de necrosis y artefacto de técnica. La tinción se observó de color café con distintos grados de intensidad, **Figura 2**, en la cual se observa la localización de tinción en las células neoplásicas.

De los 50 casos analizados, el 100% de ellos presentó algún grado de inmunoreactividad para MMP-9. El promedio de inmunomarcación fue de 82,43%, como se consigna en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Inmunomarcación de MMP-9 en casos de COCE en estudio.

Marcador	Inmunomarcación positiva n (%)	Porcentaje células positivas	
		Promedio (DS)	Mediana (p25-p75)
MMP- 9	50 (100,0)	82,43 (7,8)	84,36 (77,16 – 88,56)

Al clasificar las muestras según grado de diferenciación, a menor grado de diferenciación se observó un mayor porcentaje de inmunomarcación de MMP-9, el COCE pobremente diferenciado presentó un 89,24% en comparación con los casos bien diferenciados los cuales tuvieron un 81,67% como se observa en la **Tabla 5**, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,63$).

Figura 2. Características de la inmunotinción analizada con MMP-9 en COCE.

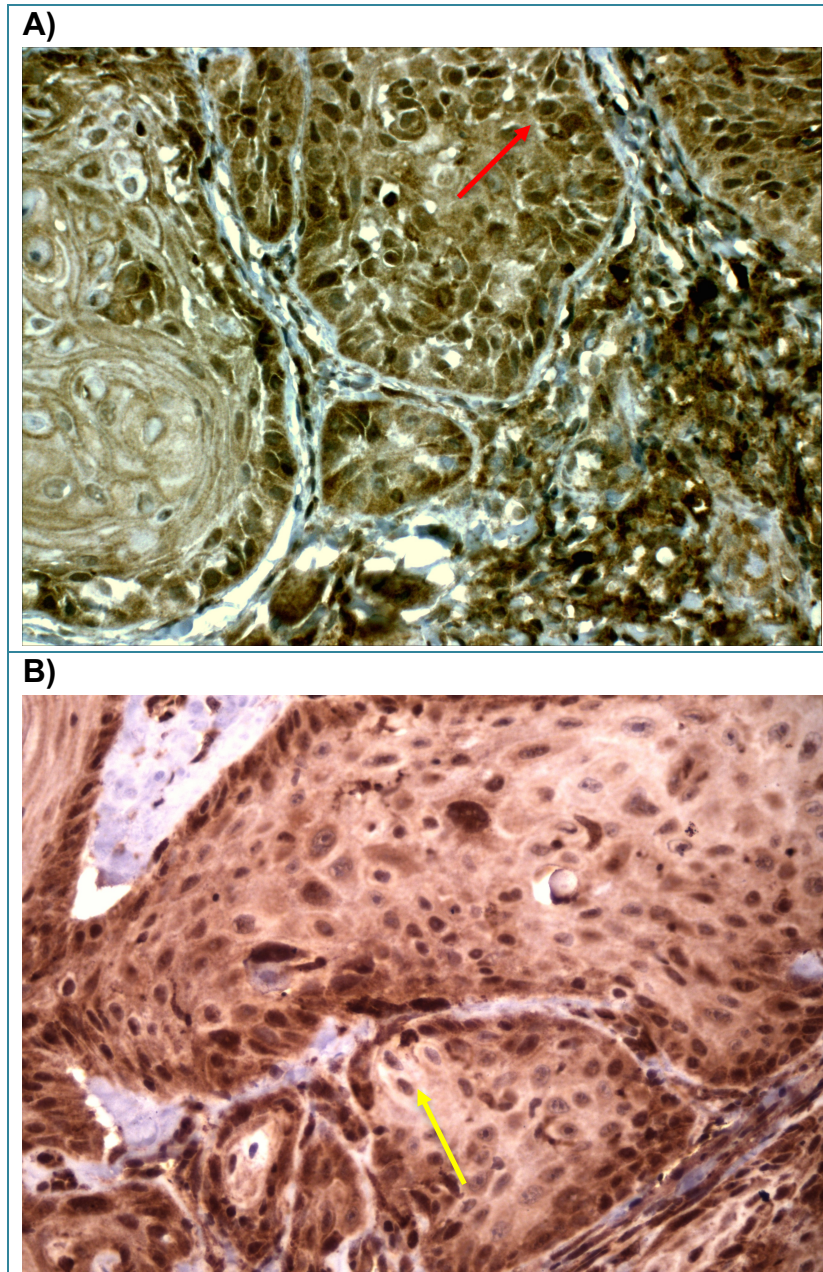


Figura 2. Muestras de COCE con inmunomarcación para MMP-9. A) Flecha roja, tinción citoplasmática positiva, color café para MMP-9, 40X. **B)** Flecha amarilla, tinción citoplasmática negativa para MMP-9, 40X.

Tabla 5. Inmunomarcación de MMP-9 según grado de diferenciación de COCE.

Grupo	n	Porcentaje células positivas MMP-9		
		Promedio (%)	Mediana	p
COCE-BD	34	81,67	83,88	0,63
COCE-MD	14	83,33	83,97	
COCE-PD	2	89,24	89,24	

Tabla 5. Inmunomarcación de MMP-9 en casos de COCE, clasificados según grado de diferenciación histológica. COCE: carcinoma oral de células escamosas. BD: bien diferenciado. MD: moderadamente diferenciado, PD: pobremente diferenciado.

Marcación inmunohistoquímica de β -catenina en COCE

Dependiendo del patrón de inmunolocalización de β -catenina se clasificó en membranoso, citoplasmático y nuclear. En membrana la intensidad de tinción se clasificó como leve, moderada o intensa; a nivel citoplasmático y nuclear la tinción se registró en forma dicotómica como positiva o negativa. En la **Figura 3A**, se observa la localización de la tinción en mucosa oral normal (MON), presentando inmunomarcación para β -catenina sólo a nivel de la membrana celular. La **Figura 3B**, presenta una muestra de COCE con inmunotinción para β -catenina a nivel de membrana celular, citoplasma y núcleo (flechas color celeste, verde y amarillo respectivamente).

Expresión de β -catenina en COCE

En el presente estudio, muestras de epitelio de mucosa oral normal (MON) presentaron expresión de β -catenina únicamente en membrana celular, tanto en citoplasma como en núcleo la inmunotinción fue negativa. El 100% de las muestras de COCE mostraron inmunotinción para β -catenina positiva a nivel citoplasmático.

A nivel de membrana la expresión de β -catenina fue positiva en la totalidad de las muestras y su intensidad se atenuó a medida que disminuyó el grado de diferenciación celular (**Figura 4A, 4C, 4E**), por lo general, tendió a perderse en las capas superiores del epitelio.

Figura 3. Características de la inmunotinción para β -catenina.

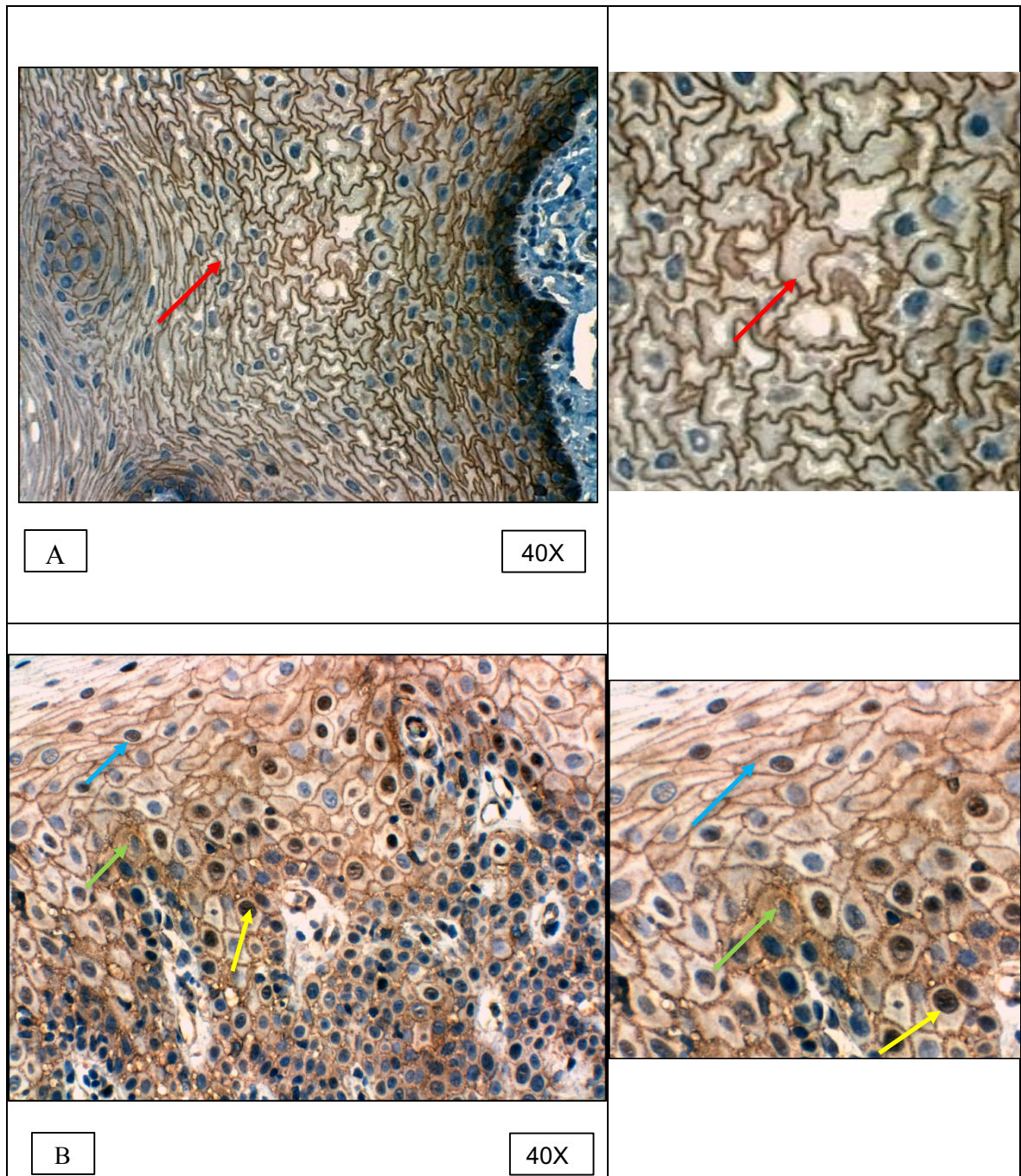


Figura 3. Muestras de COCE con inmunomarcación para β -catenina A) Mucosa oral normal (MON) con inmunomarcación para β -catenina, se observa tinción a nivel de membrana celular (flecha roja), 40X. B) COCE con inmunomarcación para β -catenina. **Flecha celeste:** tinción en membrana. **Flecha verde:** tinción citoplasmática. **Flecha amarilla:** tinción nuclear,

Como se observa en la **Tabla 6**, el 44% de las muestras presentaron a nivel de membrana una intensidad débil, el 68,2% (n=15) de ellas correspondió a COCE bien diferenciado, seguidas de un 27,7% (n=6) de muestras de COCE moderadamente diferenciado y tan sólo un 4,54% (n=1) eran de COCE pobremente diferenciado. El 56% de las muestras restantes tuvieron intensidad moderada para membrana, 67,85% (n=19) fueron de COCE bien diferenciado, 28,57% (n=8) moderado y un 3,57% (n=1) era pobremente diferenciado. No se observó una tinción intensa a nivel de membrana celular.

Un 14% (n=7) de las muestras de COCE presentaron expresión nuclear de β -catenina, el 85,71% (n=6) de ellas eran bien diferenciadas y un 14,28% (n=1) pobremente diferenciadas (**Tabla 6**).

Tabla 6. Localización de β -catenina en el grupo de estudio.

Grupo	n	Intensidad en tinción de membrana			Tinción citoplasmática		Tinción nuclear	
		Débil	Moderada	Intensa	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa
MON	3	0	0	3	0	3	0	3
COCE-BD	34	15	19	0	34	0	6	28
COCE-MD	14	6	8	0	14	0	0	14
COCE-PD	2	1	1	0	2	0	1	1
Total COCE	50	22	28	0	50	0	7	43

Tabla 6. Localización de β -catenina en muestras de MON y COCE, clasificadas según grado de diferenciación histológica. **COCE**: Carcinoma Oral de Células Escamosas. **MON**: Mucosa Oral Normal. **BD**: Bien Diferenciado. **MD**: Moderadamente Diferenciado, **PD**: Pobremente Diferenciado.

Figura 4. Localización inmunohistoquímica de β -catenina y MMP-9 según grado de diferenciación de COCE.

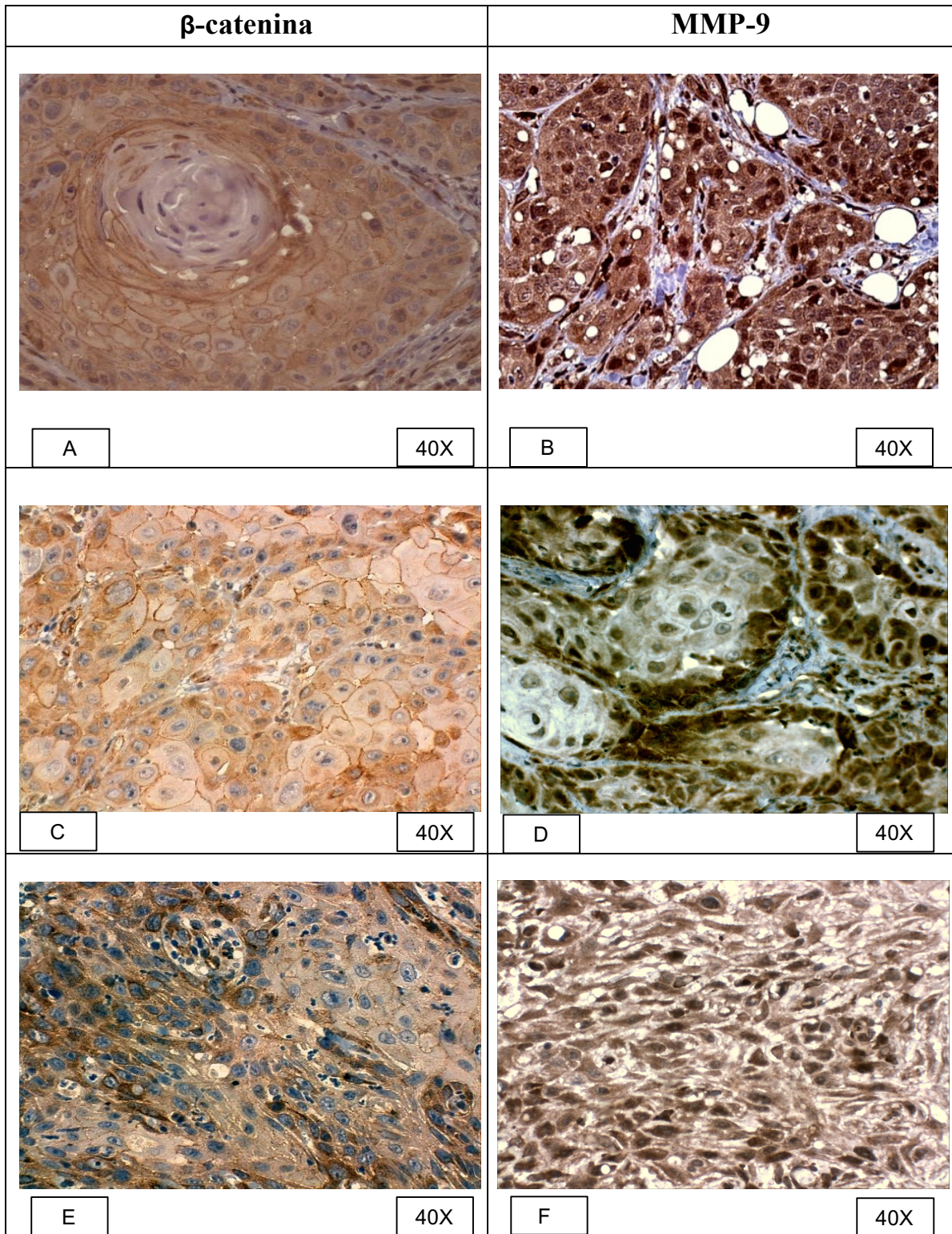


Figura 4. **A,B:** COCE bien diferenciado, 40X. **C,D:** COCE Moderadamente diferenciado, 40X. **E-F:** COCE pobremente diferenciado, 40X. **A:** β -catenina es localizada principalmente en membrana y citoplasma, la expresión nuclear es muy baja, **B,D,F:** Expresión de MMP-9 no presentó una diferencia significativa entre los distintos grados de diferenciación de COCE **C:** Expresión de β -catenina en membrana se va perdiendo a menor grado de diferenciación, **E:** No se muestra expresión en membrana de β -catenina.

Asociación entre inmunomarcación MMP-9 y β -catenina en COCE.

Al asociar la expresión nuclear de β -catenina (positiva o negativa) y el recuento de células positivas o negativas para MMP-9 (**Tabla 7**), la diferencia no fue estadísticamente significativa. Sin embargo, se observó un mayor recuento de células positivas para MMP-9 cuando la expresión nuclear de β -catenina fue positiva.

Tabla 7. Relación entre la expresión nuclear de β -catenina y la expresión de MMP-9.

	β -catenina nuclear (+)	β -catenina nuclear (-)	p
Promedio células			
MMP-9 Positivas (DS)	988,57 (377,8)	898,34 (343,7)	0,11
MMP-9 Negativas (DS)	298,57 (117,9)	212,55 (111,6)	0,19

Al analizar la expresión de β -catenina a nivel citoplasmático y el número de células positivas para MMP-9, no se encontró una asociación significativa entre dichas variables ($p= 0,9$). Al evaluar el porcentaje de células positivas para MMP-9 y clasificarlas de acuerdo al patrón de localización de β -catenina (**Tabla 8**) se observó un mayor porcentaje a nivel de membrana en muestras de intensidad débil en comparación a intensidad moderada (no hubo muestras con expresión intensa en membrana). Lo mismo ocurrió a nivel nuclear donde las muestras positivas tuvieron un porcentaje mayor (87,49%) en comparación con las negativas (81,61%). A nivel citoplasmático todas las muestras fueron positivas.

Tabla 8. Asociación entre porcentaje de células positivas para β -catenina y MMP-9 en COCE.

	Localización β -catenina						
	Intensidad tinción en membrana			Tinción citoplasmática		Tinción nuclear	
	Débil	Moderada	Intensa	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa
MMP-9 n (%)	22 (84,39)	28 (80,90)	0	50 (82,43)	0	7(87,49)	43 (81,61)

Relación entre inmunomarcadores y parámetros clínico-patológicos de los casos estudiados con COCE.

Al relacionar el porcentaje de MMP-9 y β -catenina con las variables clínico-patológicas (**Tabla 9**), se observaron valores similares en cuanto a sexo, edad, localización, aspecto clínico y grado de diferenciación.

Tabla 9. MMP-9 y β -catenina según características clínico-patológicas.

Variables	n (%)	MMP-9 (%)	Localización β -catenina						
			Tinción membrana (n)			Tinción citoplasmática (n)		Tinción nuclear (n)	
			Débil	Moderada	Intensa	(+)	(-)	(+)	(-)
Sexo									
Mujer	23 (46)	82,74	9	14	0	23	0	4	19
Hombre	27 (54)	82,17	13	14	0	27	0	3	24
Edad									
< 60 años	18 (36)	82,03	5	13	0	18	0	2	16
\geq 60 años	32 (64)	82,66	17	15	0	32	0	5	27
Localización del tumor									
Reborde	15 (30)	84,16	8	7	0	15	0	2	13
Mucosa	7 (14)	81,57	2	5	0	7	0	0	7
Lengua	14 (28)	81,80	4	10	0	14	0	4	10
Paladar	4 (8)	84,87	3	2	0	4	0	1	3
Piso de boca	4 (8)	83,42	2	2	0	4	0	0	4
Labio	2 (4)	82,30	2	0	0	2	0	0	2
s/i	4 (8)	76,35	2	2	0	4	0	0	4
Aspecto clínico									
Tumor	18 (36)	85,61	7	11	0	18	0	3	15
Úlcera	18 (36)	82,26	7	11	0	18	0	3	15
Leucoplasia	5 (10)	79,62	3	2	0	5	0	1	4
Eritroplasia	2 (4)	71,60	0	2	0	2	0	0	2
s/i	7 (14)	78,48	5	2	0	7	0	0	7
Grado de diferenciación									
Bien	34 (68)	81,67	15	19	0	34	0	6	28
Moderado	14 (28)	83,33	6	8	0	14	0	0	14
Pobre	2 (4)	89,24	1	1	0	2	0	1	1

8. DISCUSIÓN

COCE es la neoplasia maligna más frecuente en la cavidad oral, a pesar de los avances en las opciones terapéuticas en las últimas décadas, la tasa de supervivencia a cinco años de los pacientes no ha mejorado sustancialmente. Esto es en parte, debido a un alto porcentaje (10- 50%) de recidivas loco-regionales y a distancia después de la cirugía y la facilidad con que este cáncer genera compromiso linfático y metástasis (Hinerman y cols., 2004).

La predicción del comportamiento de COCE es diferente usando parámetros clínicos e histopatológicos convencionales (Olivera y cols., 2011). Por lo tanto, biomarcadores moleculares incluidos los marcadores de adhesión celular, entre ellos β -catenina, y de degradación de la matriz, como MMP-9, han sido estudiados para analizar su rol como herramientas potenciales para predecir el pronóstico de estos pacientes.

Bajo la hipótesis de que existe asociación entre la expresión de β -catenina y MMP-9 en muestras de COCE, este proyecto tuvo como objetivo evaluar si existe dicha asociación, además de identificar su presencia y distribución y así mejorar la comprensión de su posible rol en la patogénesis de COCE.

MMP-9 y su asociación con COCE

Las metaloproteinasas de matriz extracelular son peptidasas implicadas en la degradación de componentes de la matriz extracelular. Su rol en la degradación de la MEC y componentes de la membrana basal en neoplasias malignas constituyen un importante mecanismo asociado con la progresión tumoral. MMP-9 ha sido asociada a invasión tumoral (Klein y cols., 2011), niveles elevados de esta metaloproteinasas se han asociado con un riesgo mayor de metástasis en cáncer de mama, cerebro, ovario, colorrectal, próstata, melanoma, entre otros (Roomi y cols., 2009; Bauvois. 2012).

Nuestro estudio detectó inmunoreactividad en las 50 muestras analizadas de COCE (100%). En promedio, un 82,43% de las células epiteliales neoplásicas fueron positivas por cada caso, lo que está en concordancia con lo reportado por algunos autores, por ejemplo, Kim y cols., mencionan que el porcentaje promedio fue de 78,9% en casos de COCE de lengua y; Fan y cols., señalan que en mucosa sana existe marcación muy leve o nula de MMP-9, en cambio, en muestras de COCE de lengua detectó su presencia en el 92% de los casos, mientras que Hong y cols., un 73,7% de expresión en COCE (Hong y cols., 2000; Kim y cols., 2006; Fan y cols., 2012; Henriques y cols., 2012).

Respecto a las variables clínico-patológicas según sexo, edad, localización del tumor y aspecto clínico las muestras en estudio, presentaron una distribución similar en la expresión de MMP-9. A su vez, al clasificarlas según grado de diferenciación histológica, a menor grado de diferenciación se observó un mayor porcentaje de inmunomarcación para MMP-9, los casos pobremente diferenciados presentaron un porcentaje de 89,24%, en comparación con las bien y moderadamente diferenciadas, las cuales presentaron un 81,67% y 83,33% respectivamente, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Pese a esto, dicha tendencia podría sugerir el aumento de la expresión de MMP-9 a medida que disminuye la diferenciación del tumor, lo que podría tener relación con un incremento en la progresión e invasividad del tumor en nuestras muestras de COCE pobremente diferenciadas, aunque en la actualidad el grado de diferenciación no es un parámetro que determine pronóstico en COCE (Kantola y cols., 2000; Bundgaard y cols., 2002; Kholer y cols., 2012; Piazza y cols., 2014).

En relación al CCC, Werner y cols., demostraron que la sobreexpresión de MMP-9 se correlaciona con un fenotipo invasivo y potencial metastásico de las células tumorales. Akdeniz y cols., en su estudio en Carcinoma Laríngeo de Células Escamosas, reportaron que los casos con expresión positiva de MMP-9 presentan un aumento a medida que disminuye la diferenciación del tumor, la diferencia entre los tumores bien y moderadamente/pobremente diferenciados fue estadísticamente significativa, además que el aumento de la expresión de MMP-9 fue directamente proporcional al incremento en la invasividad del tumor (Werner y cols., 2002; Akdeniz y cols., 2013). La capacidad de progresión e invasividad de un tumor se

asocia a la degradación de la membrana basal debido a la actividad proteolítica de la MMP-9 que degrada el colágeno de tipo IV (Lothaire y cols., 2006; Bauvois. 2012).

MMP-9 se ha relacionado con la naturaleza agresiva de COCE (Shuman y cols., 2012; Suarez-Roa y cols 2012), aunque muchos investigadores han presentado resultados contradictorios (Guttman y cols., 2003; De vicente y cols., 2005). Kim y cols, en casos de COCE de lengua, no observaron correlación con edad, sexo, TNM, grado de diferenciación ni sobrevida, similar a lo reportado por Fan y cols, en su estudio en COCE de lengua, quien tampoco observó asociación con sexo, edad ni con el grado de diferenciación histológica, aunque asociaron MMP-9 con compromiso linfático y menor sobrevida. Franchi y cols., señalan que no encontraron correlación con parámetros clínicos, sólo con metástasis de linfonodos. Sin embargo, Katayama y cols., informaron que la expresión de MMP-9 en pacientes con COCE se correlacionó con ganglios linfáticos regionales, metástasis a distancia y un mal pronóstico, asociado con una menor sobrevida. Hong y cols., encontraron una relación significativa entre la expresión de MMP-9 y metástasis cervical (Fan y cols., 2012 ; Franchi y cols., 2002; Hong y cols., 2000; Katayama y cols., 2004; Kim y cols., 2006).

Ciertamente, se requiere un mayor conocimiento sobre el papel de MMP-9 en la progresión del COCE y de las interacciones moleculares que regulan la invasión celular. La regulación de MMP-9 es sumamente compleja, dependiendo de un gran número de citoquinas, moléculas y factores de crecimiento (Moon y cols., 2004). Además si consideramos la falta de estandarización en la medición de su expresión en la literatura, dificulta la posibilidad de hacer comparaciones con otros estudios publicados.

β -catenina y su asociación con COCE

β -catenina es un componente importante de la vía de señalización intracelular Wnt canónica, la cual se ha identificado como responsable de alteraciones celulares que derivan en varios tipos de cánceres en humanos.

Todas las muestras analizadas en este estudio mostraron tinción positiva en membrana para β -catenina, tendiendo a decrecer a medida que disminuyó el grado de diferenciación celular, llegando a desaparecer en los estratos superiores del epitelio. Estos hallazgos estarían en concordancia con lo reportado en la literatura, donde un menor grado de diferenciación de COCE se asocia a una reducción progresiva de la expresión de β -catenina en la membrana celular, demostrando una estrecha asociación entre la reducción de la adhesión intercelular y la pérdida de diferenciación celular (Gasparoni y cols., 2002; Laxmidevi y cols., 2010).

Células epiteliales de la mucosa oral, en condiciones fisiológicas, exhiben tinción en la membrana para β -catenina. Estudios han relacionado la reducción en la expresión en membrana y una mayor expresión citoplasmática de β -catenina con una naturaleza agresiva de COCE (Beavon. 2000, Yu y cols., 2000; Lo muzio y cols., 2010; Laxmidevi y cols., 2010). Reyes y cols., reportaron que un menor grado de diferenciación en COCE se asoció con una reducción progresiva en la expresión membranosa de β -catenina. Li y cols., señalan que la sobreexpresión citoplasmática de β -catenina en COCE se correlacionó con el grado de diferenciación histológica del tumor, similar a lo reportado por Zaid (Li y cols., 2009; Zaid. 2014; Reyes y cols., 2015).

La expresión citoplasmática de β -catenina se observó en el 100% de las muestras en estudio, concordando con publicaciones que señalan que la acumulación citoplasmática de β -catenina y la subsiguiente translocación nuclear se observa frecuentemente en COCE (Gao y cols., 2005; Lopes y cols., 2009; Lo Muzio y cols., 2010), sin embargo, en nuestro estudio tan sólo 7 de las 50 muestras mostraron localización nuclear de β -catenina, sugiriendo que no sólo es necesario la presencia de β -catenina a nivel citoplasmático para que esta transloque hacia el núcleo, sino

que diversos factores inciden en la regulación de la vía Wnt/ β -catenina y su consiguiente actividad.

Respecto a la localización nuclear de β -catenina, las 7 muestras positivas corresponden al 14% del total de muestras, de las bien diferenciadas el 17,64% presentó expresión nuclear y de las pobremente diferenciadas un 50%, las muestras moderadamente diferenciadas no presentaron expresión nuclear. Cabe destacar que tan sólo 2 casos del total de muestras resultaron ser pobremente diferenciados, por lo que el reducido tamaño de la muestra podría influir en la diferencia entre estos porcentajes. La acumulación nuclear de β -catenina sólo se observó en muestras de COCE no en mucosa oral normal, sugiriendo un posible vínculo con carcinogénesis. Li S y cols., manifestaron que la acumulación nuclear de β -catenina sólo se observó en muestras de COCE en contraste con las muestras de displasia y epitelio normal, la expresión nuclear de β -catenina se atribuyó a la progresión de COCE en lengua, además estaba fuertemente asociada con metástasis en los ganglios linfáticos, pero no se asoció con los parámetros clínico-patológicos estudiados (edad, sexo, estadio clínico) (Li y cols., 2009). Similar a lo encontrado en este estudio, donde se observó una distribución similar en la localización de β -catenina según sexo, edad, localización y aspecto clínico.

El rol de β -catenina en la progresión tumoral podría sustentarse en que al desunirse de E-cadherina, β -catenina quedaría libre en el citoplasma aumentando la posibilidad de que transloque hacia el núcleo, donde participaría en la transcripción de genes que inducirían la TEM, o sea, aumentaría la motilidad e invasividad de las células tumorales. Prasad y cols., consideraron que la acumulación de β -catenina en células de COCE induce redistribución de E-cadherina y reorganización del citoesqueleto de actina (Prasad y cols., 2008). Varios estudios han mostrado que la desregulación de complejo cadherina-catenina, además de la reducción de expresión de β -catenina en los complejos adhesivos, está presente en varios tipos de tumores malignos, especialmente aquellos de una naturaleza más agresiva y con un mayor potencial metastásico (Beavon. 2000; Kurtz y cols., 2006).

Purcell y cols., informaron que el pronóstico es malo cuando la expresión de β -catenina está presente en el núcleo en el Carcinoma de Células Escamosas de Faringe. Ishida y cols., observaron la expresión nuclear en 10 de 15 muestras de COCE y la reducción de la expresión en la membrana de la proteína se asoció con invasión tumoral y metástasis, además, se observó un incremento en la expresión nuclear de la molécula durante la progresión en la severidad de leucoplasias orales. Reyes y cols., determinaron y compararon la expresión de β -catenina nuclear en muestras de displasia oral y COCE, la localización nuclear de β -catenina fue encontrado principalmente en las capas epiteliales inferiores y medias a medida que la severidad de la displasia era mayor, sugiriendo que la expresión nuclear de β -catenina puede estar relacionado con la proliferación celular, teniendo un papel en la progresión de displasia a COCE. (Ishida y cols., 2007; Reyes y cols., 2015; Purcell y cols., 2011). Sin embargo, otros estudios inmunohistológicos de cáncer oral no lograron detectar una asociación entre la expresión de β -catenina y la metástasis ganglionar (Tanaka y cols., 2003; Kurtz y cols., 2006).

Asociación entre MMP-9 y β -catenina

La pérdida de adhesión intercelular es una de las etapas necesarias durante la progresión de COCE, pero es fundamental la existencia de otros fenómenos, como la pérdida de adhesión celular a la MEC, causada por ejemplo, por la expresión de MMP-9 (Lopes y cols., 2009).

El estudio de Li y cols., en COCE de lengua, estableció que la actividad transcripcional de β -catenina se ha correlacionado positivamente con los niveles de transcripción de MMP-9. Mediante modelos experimentales de invasión en matrigel y metástasis, generaron in vitro un descenso en los niveles de β -catenina provocando que los niveles de MMP-9 también disminuyeran y junto con esto se inhibió la invasión y metástasis. Por lo tanto, los autores atribuyeron este efecto en la progresión tumoral al descenso en la expresión de MMP-9 (Li y cols., 2009).

Los mecanismos por los que MMP-9 controla su propia síntesis y la implicancia de la vía Wnt en la regulación de MMP-9 son de gran interés dado el amplio alcance de las MMPs en el comportamiento de las células normales y cancerosas. Estudios sugieren que MMP-9 sería un objetivo directo de la vía de señalización Wnt/ β -catenina (Wu y cols., 2007; Ingraham y cols., 2011; Song y cols., 2012; Singh y cols., 2013; Kwon y cols., 2014). Sin embargo, en nuestro estudio no se observó una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de MMP-9 y la expresión de β -catenina a nivel nuclear, lo que podría tener relación con el reducido número de muestras positivas a nivel nuclear de β -catenina, 7 muestras en comparación con las 43 que resultaron negativas a este nivel, o quizás, β -catenina no actuaría de forma directa en la inducción de la expresión de MMP-9, participando a modo de intermediarias otras moléculas o vías de señalización.

No obstante, se observó que las muestras con presencia positiva a nivel nuclear de β -catenina presentaron un mayor nivel de expresión de MMP-9 que las muestras negativas, aunque esta diferencia no fue significativa, estaría en concordancia con lo reportado por algunos autores que han pesquisado una posible interacción entre el nivel de β -catenina y la expresión de MMP-9 (Wu y cols., 2007; Ingraham y cols., 2011; Kwon y cols., 2014; Li y cols., 2009), lo que sugiere que la actividad de β -catenina a nivel nuclear sí induciría la transcripción de genes relacionados con la expresión de MMP-9, potenciando así su función en la degradación de la MEC.

El mecanismo molecular mediante el cual se asocian dichas moléculas es desconocido, sin embargo, podría tener relación con diversas moléculas que participan en la carcinogénesis de COCE, MMP-9 al degradar la MEC puede generar, liberar o interactuar con moléculas bioactivas que influyen en la progresión tumoral, como por ejemplo TGF β -1 quien aumenta la expresión de MMP-9 y desencadena la TEM (Sun y cols., 2008; Takayama y cols., 2009). Como vimos anteriormente también se ha vinculado a β -catenina con la inducción de TEM, ambas moléculas podrían actuar de forma coordinada en dicha inducción. Factores de crecimiento que se relacionan y potencian las acciones de β -catenina, son el factor de crecimiento epidermal (EGF) y VEGF, activando la vía de señalización Rac/KRAS, que potencia la vía Wnt/ β -catenina incrementando el tiempo de

permanencia y concentración de β -catenina en el núcleo (Vermeulen y cols., 2010; Korkaya y cols., 2010; Takebe y cols., 2011). Como mencionamos en párrafos anteriores, está bien documentado el rol de MMP-9 en la liberación de VEGF, quien actúa como un factor pro angiogénico. MMP-9 y VEGF se expresan durante COCE invasivo de lengua y en metástasis tumoral (Henriques y cols., 2012; Bauvois. 2012). Por lo tanto, MMP-9 no sólo sería un objetivo de β -catenina, sino que mediante VEGF también potenciaría la acción de β -catenina a nivel nuclear.

A su vez, es necesario estudiar otros fenómenos relacionados con la estimulación de la expresión de β -catenina. Otro factor que puede influir en la vía Wnt, y que ha sido asociado a la acumulación nuclear de β -catenina, es el Virus Papiloma Humano (VPH), específicamente las oncoproteínas E6 y E7 en genotipos de alto riesgo como VPH 16 y 18, los cuales han sido ampliamente estudiados en el desarrollo de cáncer cérvico uterino. A nivel orofaríngeo se ha evidenciado la acumulación nuclear de β -catenina en muestras VPH positivas mediante E6 y E7, cuya función sería inhibir la regulación de β -catenina (vía ubiquitina-proteosoma) (Rampias y cols., 2010), la implicancia de VPH en la expresión del nivel nuclear de β -catenina en COCE puede haber influido en nuestros resultados, las muestras de COCE en estudio pudieron haber sido VPH-negativas o bien VPH-positivas pero genotipos de bajo riesgo, ya que tan sólo 7 de las 50 muestras fueron positivas a nivel nuclear. Cabe destacar que VPH en COCE no cuenta con estudios que demuestren un posible rol etiológico, pero se ha evidenciado una asociación, situación que ameritaría mayores estudios al respecto (Miller. 2001; Campisi y cols., 2007).

El rol en la progresión tumoral de MMP-9, altamente dependiente del contexto, permite vislumbrar la complejidad de las cascadas de señalización que pueden resultar en carcinogénesis, las cuales raramente funcionan solas o aisladas. La intercomunicación entre ellas es absolutamente compleja conllevando a diferentes respuestas celulares dependiendo del estímulo externo; la vía de señalización Wnt canónica tiene tal cantidad de pasos e interactúa con tantos factores, que para comprender a cabalidad su efecto en la expresión de MMP-9, se hace necesario el estudio de otras moléculas que influyan en este proceso y los múltiples factores que inciden.

Además, es necesario tener en cuenta que en el análisis inmunohistoquímico la mayoría de los anticuerpos no distinguen entre proformas y formas activas de la proteína, por ende, la cantidad total de expresión de MMP-9 y/o β -catenina no significa necesariamente que se haya encontrado en su forma activa, son necesarios nuevos estudios al respecto, con un mayor número de muestras e investigando otras variables asociadas a la carcinogénesis en COCE para determinar si efectivamente estas moléculas poseen un rol en su patogénesis.

Este estudio es un acercamiento para analizar cómo se relaciona β -catenina y MMP-9 y tratar de comprender su rol en el desarrollo del COCE, pero estamos lejos de determinar si poseen un rol en la carcinogénesis, para eso hay que realizar estudios experimentales, que involucren a otros actores relacionados con dicho proceso, por ejemplo, moléculas relacionadas con angiogénesis, otras metaloproteinasas de matriz extracelular, VPH de alto riesgo, algunos autores han implicado incluso a patógenos periodontales, como *Porphyromonas gingivalis* en invasión en COCE a través de la inducción de MMP-9. Además sería interesante correlacionar β -catenina y MMP-9 con localización, aspecto clínico, estadiaje TNM y sobrevida, debido a la baja sobrevida a los 5 años de los pacientes con COCE, sobretodo en estadios clínicos avanzados (III y IV) (Bórquez y cols., 2011). Ofreciendo así una herramienta complementaria para caracterizar mejor el COCE, lo que a futuro podría ser un factor a considerar al momento de definir el pronóstico del paciente, permitiendo orientar el tratamiento al identificar carcinomas escamosos orales biológicamente agresivos o con pobre pronóstico de sobrevida.

Limitaciones del estudio

Este estudio contó con un limitado tamaño muestral, ajustado a la disponibilidad de muestras, además de la falta de información en las fichas clínicas en cuanto a localización, aspecto clínico, TNM y datos de sobrevida.

Aspectos éticos

Estudio adscrito a proyecto FIOUCh N° 13-008: “Relación entre linfocitos T Reguladores y Natural Killer en el infiltrado linfocitario de Carcinoma de Células Escamosas”, fue aprobado por el Comité de Ética y por el Comité de Bioseguridad de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Anexos 2 y 3). Toda la información respecto a los pacientes de este estudio se mantuvo en absoluta confidencialidad, respetando los principios de la declaración de Helsinki para la investigación con seres humanos.

9. CONCLUSIONES

- Se observó la presencia de β -catenina y MMP-9 en todas las muestras de COCE en estudio.
- No se observó una asociación significativa entre la expresión nuclear de β -catenina y la expresión de MMP-9 en las muestras de COCE.
- Hubo una distribución similar en los parámetros clínico-patológicos en las muestras de COCE en estudio entre la expresión de β -catenina y MMP-9.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2005). Signaling Pathways That Depend on Regulated Proteolysis. En: *Molecular Biology of the Cell*. (Eds) Garland Science 4th. Edición. New York: Garland Science, p. 893-899.
- Akdeniz, O., Akduman, D., Haksever, M., Ozkarakas, H., Müezzinoğlu, B. (2013). Relationships Between Clinical Behavior of Laryngeal Squamous Cell Carcinomas and Expression of VEGF, MMP-9 and E-Cadherin. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14 (9), 5301-5310.
- Barakat, C. (2015). β -Catenin Alterations in Squamous Cell Carcinoma of the Lip. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 16(13), 5187.
- Beavon, I. (2000). The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation. *Eur J Cancer*, 36, 1607-20.
- Bauvois, B. (2012). New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1825(1), 29-36.
- Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, TH., Itoh, T. & Tamaki, K. (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. Hanahan D. *Nat Cell Biol*. 2000 Oct;2(10):737-44.
- Bórquez, P., Capdeville, F., Madrid, A., Veloso, M. & Cárcamo, M. (2011). "Sobrevida global y por estadios de 137 pacientes con cáncer intraoral: Experiencia del Instituto Nacional del Cáncer." *Revista chilena de cirugía* 63(4): 351-355.

- Bundgaard T, Rossen K, Henriksen SD, Charabi S, Sogaard H, Grau C. (2002) Histopathologic parameters in the evaluation of T1 squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Head Neck*.24(7): 656-60.
- Campisi, G., Panzarella, V., Giuliani, M., Lajolo, C., Di Fede, O., Falaschini, S., Di Liberto, C., Scully, C. & Lo Muzio, L. (2007) Human papillomavirus: its identity and controversial role in oral oncogenesis, premalignant and malignant lesions (review). *Int J Oncol* 30, 813-823.
- Conway, D., Petticrew, M., Marlborough, H., Berthiller, J., Hashibe, M. & Macpherson, L. (2008) Socioeconomic inequalities and oral cancer risk: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Int J Cancer*. 2008 Jun 15;122(12):2811-9.
- Córdova, A. T., Maldonado, M. D. C. N., & García, A. R. (2009). Catenina Beta: características estructurales y funcionales. *ContactoS*, 75, 15-20.
- Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z. (2000). MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell*. 2000 Oct 27;103(3):481-90.
- De Vicente, J., Fresno, M., Villalain, L., Vega, J., & Hernandez, G. (2005). "Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma," *Oral Oncology*, vol. 41, no. 3, pp. 283–293.
- Døsen, G., Tenstad, E., Nygren, MK., Stubberud, H., Funderud, S. & Rian, E. (2006). Wnt expression and canonical Wnt signaling in human bone marrow B lymphopoiesis. *BMC Immunology* 2006;7:13.
- El-Mofty, SK. (2014). Histopathologic risk factors in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma variants: an update with special reference to HPV-related carcinomas. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 19, 377-85.

- Fan, HX., Li, HX., Chen, D., Gao, ZX. & Zheng JH. (2012). Changes in the expression of MMP2, MMP9, and Col IV in stromal cells in oral squamous tongue cell carcinoma: relationships and prognostic implications. *J Exp Clin Cancer Res.* 2012 Oct 29;31:90.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C. & Rebelo, M. Et al. (2014). "Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012." *Int J Cancer.*
- Franchi A, Santucci M, Masini E, Sardi I, Paglierani M, Gallo O (2002) Expression of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in carcinoma of the head and neck. *Cancer.* 2002 Nov 1;95(9):1902-10.
- Gao, S., Eiberg, H., Krogdahl, A., Liu, CJ. & Sorensen, JA. (2005). Cytoplasmic expression of E-cadherin and beta-catenin correlated with LOH and hypermethylation of the APC gene in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 34: 116-119, 2005.
- Garg, P., Sarma, D., Jeppsson, S., Patel, N. R., Gewirtz, A. T., Merlin, D., & Sitaraman, S. V. (2010). Matrix metalloproteinase-9 functions as a tumor suppressor in colitis-associated cancer. *Cancer research*, 70(2), 792-801.
- Grimm, M., (2012). Prognostic value of clinicopathological parameters and outcome in 484 patients with oral squamous cell carcinoma: microvascular invasion (V+) is an independent prognostic factor for OSCC. *ClinTranslOncol.* 2012 Nov;14(11):870-80.

- Guttman, D., Stern, Y., Shpitzer, T., Ulanovski, D., Druzd, T. & Feinmesser, R. (2004). Expression of MMP-9, TIMP-1, CD-34 and factor-8 as prognostic markers for squamous cell carcinoma of the tongue. *Oral Oncol.* 2004 Sep;40(8):798-803.
- Haddad, RI. & Shin, DM. (2008). Recent advances in head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2008 Sep 11;359(11):1143-54.
- Henriques, AC., de Matos, FR., Galvão, HC. & Freitas, R de A. (2012). Immunohistochemical expression of MMP-9 and VEGF in squamous cell carcinoma of the tongue. *J Oral Sci.* 2012 Mar;54(1):105-11.
- Hong SD, Hong SP, Lee JI, Lim CY (2000). Expression of matrix metalloproteinase-2 and-9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. *Oral Oncol*, **36**, 207-13.
- IARC, W. H. O. (2005). "World Health Organization Classification of Tumours." from <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb9/index.php>.
- Ikebe, T., Shinohara ,M., Takeuchi, H., et al. (1999). Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase in tumor tissues correlates with the invasiveness of oral cancer. *Clin Exp Metastasis* 1999;17:315–23.
- Ingraham, CA., Park, GC., Makarenkova, HP. & Crossin, KL. (2011) Matrix metalloproteinase (MMP)-9 induced by Wnt signaling increases the proliferation and migration of embryonic neural stem cells at low O2 levels. *J Biol Chem.* 2011 May 20;286(20):17649-57.1.
- Ishida K, Ito S, Wada N, Deguchi H, Hata T, Hosoda M. (2007) Nuclear localization of beta-catenin involved in precancerous change in oral leukoplakia. *Mol Cancer*;6:62.

- Iwai, S., Katagiri, W., Kong, C., Amekawa, S., Nakazawa, M. & Yura, Y. (2005). Mutation of the APC, beta-catenin, and axin1 genes and cytoplasmic accumulation of beta-catenin in oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 15: 1-10, 2005.
- Iwai, S., Yonekawa, A., Harada, C., Hamada, M., Katagiri, W., Nakazawa, M., & Yura, Y. (2010). Involvement of the Wnt- β -catenin pathway in invasion and migration of oral squamous carcinoma cells. *International Journal of Oncology*, 37, 1095-1103.
- Johnson, ML.& Rajamannan, N. (2006), Diseases of Wnt signaling. *Rev Endocr Metab Disord* 2006;7(1-2):41-49.
- Kademani, D. (2007). "Oral cancer." *Mayo Clin Proc* 82(7): 878-887.
- Kademani, Lewis, Lamb, Rallis, Harrington. (2009). Angiogenesis and CD34 Expression as a Predictor of Recurrence in Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Oral MaxillofacSurg* 67:1800-1805, 2009.
- Kantola S, Parikka M, Jokinen K, Hyrynkans K, Soini Y, Alho OP, Salo T(2000). Prognostic factors in tongue cancer relative importance of demographic, clinical and histopathological factors. *Br J Cancer*.83(5):614-9.
- Katayama, A., Bandoh, N., Kishibe, K., Takahara, M., Ogino, T. & Nonaka, S. (2004). Expressions of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis. *Clin Cancer Res*. 2004 Jan 15;10(2):634-40.
- Kato, K., Hara, A., Kuno, T. et al. (2005). "Matrix metalloproteinases 2 and 9 in oral squamous cell carcinomas: manifestation and localization of their activity," *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 131, no. 6, pp. 340–346, 2005.

- Kim, SH., Cho, NH., Kim, K., Lee, JS., Koo, BS., Kim, JH., et al. (2006). Correlations of oral tongue cancer invasion with matrix metalloproteinases (MMPs) and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression. *J Surg Oncol.* 2006 Mar 15;93(4):330-7.
- G. Klein, E. Vellenga, M.W. Fraaije, W.A. Kamps, E.S. de Bont, (2004). The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 50 87–100.
- Köhler, HF. & Kowalski, LP. (2012). Prognostic impact of the level of neck metastasis in oral cancer patients. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2012 Dec;78(6):15-20.
- Korkaya, H. & Wicha, MS. (2010). Cancer stem cells: nature versus nurture. *Nat Cell Biol* 2010;12:419-421.
- Kühl, M., Sheldahl, LC., Park, M., Miller, JR. & Moon, RT. (2000). The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet;* 16(7):279-283.
- Kurahara, S., Shinohara, M., Ikebe, T., et al. (1999). “Expression of MMPs, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis,” *Head and Neck*, vol. 21, no. 7, pp. 627–638, 1999.
- Kurtz, KA., Hoffman, HT., Zimmerman, MB., et al (2006). Decreased E-cadherin but not beta-catenin expression is associated with vascular invasion and decreased survival in head and neck squamous carcinomas. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 134, 142-6.

- Kwon M, Lee SJ, Wang Y, Rybak Y, Luna A, Reddy S. y cols. (2014). Filamin A interacting protein 1-like inhibits WNT signaling and MMP expression to suppress cancer cell invasion and metastasis. *Int J Cancer*; 135(1):48-60. doi: 10.1002/ijc.28662.
- Lambert, R., C. Sauvaget, M. de Camargo Cancela and R. Sankaranarayanan (2011). "Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx." *Eur J Gastroenterol Hepatol* 23(8): 633-641.
- Laxmidevi LB, Angadi PV, Pillai RK, Chandreshekar C. (2010) Aberrant beta-catenin expression in the histologic differentiation of oral squamous cell carcinoma and verrucous carcinoma: an immunohistochemical study. *J Oral Sci.*;52:633-40.
- Li, S., Jiao, J., Lu, Z., & Zhang, M. (2009). An essential role for N-cadherin and β -catenin for progression in tongue squamous cell carcinoma and their effect on invasion and metastasis of Tca8113 tongue cancer cells. *Oncology Reports*, 21,
- Li, J., Zhou, X. D., Yang, K. H., Chen, W. P., Jiang, L. F., Bao, J. P., ... & Xiong, Y. (2014). Hinokitiol reduces matrix metalloproteinase expression by inhibiting Wnt/ β -Catenin signaling in vitro and in vivo. *International immunopharmacology*, 23(1), 85-91.
- Logan, CY. & Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:781-810.
- Lo Muzio L, Lo Russo L, Falaschini S, Ciavarella D, Pentenero M, Arduino P, et al. (2010) beta- and gamma-catenin expression in oral dysplasia. *Oral Oncol.*; 45:501-4.
- Lopes, F.F., da Costa Miguel, M.C., Pereira, A.L., et al (2009). Changes in immunoexpression of E-cadherin and betacatenin in oral squamous cell carcinoma with and without nodal metastasis. *Ann Diagn Pathol*, 13, 22-9.

- Lothaire, P., de Azambuja, E., Dequanter, D., Lalami, Y., Sotiriou, C., Andry, G., et al. (2006). Molecular markers of head and neck squamous cell carcinoma: promising signs in need of prospective evaluation. *A Head Neck*;28(3):256-69.
- Luu, HH., Zhang, R., Haydon, RC., Rayburn, E., Kang, Q., Si, W., et al. (2004). Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway as Novel Cancer Drug Targets. *Curr Cancer Drug Tar*;4(8):653-671.
- Luukkaa, H., Klemi, P., Leivo, I., et al. (2010). "Expression of matrix metalloproteinase-1, -7, -9, -13, Ki-67, and HER-2 in epithelial- myoepithelial salivary gland cancer," *Head and Neck*, vol. 32, no. 8, pp. 1019–1027, 2010.
- Miller, J. (2001). The Wnts. *Genome Biology*;3:3001.1-3001.15
- MINSAL. Diaz, N., G. J., Jofré, A., Moya, J., Umaña, M., Vallebuona, C., Vicuña, P. (2012). "Primer Informe de Registros poblacionales de Cáncer de Chile Quinquenio 2003-2007." from <http://epi.minsal.cl/vigilancia-epidemiologica/vigilancia-de-cancer/>.
- Mlodzik, M. (2002). Planar cell polarization: do the same mechanisms regulate drosophila tissue polarity and vertebrate gastrulation? *Trends Genet* 2002;18:564-571.
- Montgomery E, Torbenson MS, Kaushal M, Fisher C, Abraham SC.(2002) Beta-catenin immunohistochemistry separates mesenteric fibromatosis from gastrointestinal stromal tumor and sclerosing mesenteritis. *Am J Surg Pathol*. 2002 Oct;26(10):1296-301.
- Montgomery E, Folpe AL. (2005) The diagnostic value of beta-catenin immunohistochemistry. *Adv Anat Pathol*. 2005 Nov;12(6):350-6.

- Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. (2004) WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet.* 5(9):691-701.
- Nagase, H., Woessner, JF. (1999). Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999 Jul 30;274(31):21491-4.
- Neville, B. W. and T. A. Day (2002). "Oral cancer and precancerous lesions." *CA Cancer J Clin* 52(4): 195-215.
- Neville Brad, D. D. D., Allen Carl M., Bouquot Jerry. (2008). *Oral & maxillofacial pathology* (3rd Ed.)
- Ochoa-Hernández, A. B., Juárez-Vázquez, C. I., Reynoso, M. A. R., & Barros-Núñez, P. (2012). [WNT- β -catenin signaling pathway and its relationship with cancer]. *Cirugia y cirujanos*, (80), 389-98.
- Oliveira-Neto, Gleber-Netto, de Sousa, Miranda França, Cássia Ferreira Aguiar.(2012)A comparative study of microvessel density in squamous cell carcinoma of the oral cavity and lip. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 113(3):391-8.
- Prasad, CP., Mirza, S., Sharma, G., Prashad,. R., DattaGupta, S., Rath, G. & Ralhan, R. (2008). Epigenetic alterations of CDH1 and APC genes: relationship with activation of Wnt/beta-catenin pathway in invasive ductal carcinoma of breast. *Life Sci* 83: 318-325, 2008.
- Purcell, R., Childs, M., Maibach, R., et al. (2011). HGF/c-Met related activation of beta-catenin in hepatoblastoma. *J Exp Clin Cancer Res*, 30, 96.

- Ramirez, V., Vásquez-Rozas, P., Ramírez-Eyraud, P. (2015). "Mortalidad por cáncer oral y faríngeo en Chile, años 2002-2010". Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral. Vol. 08. Núm. 02.
- Rampias T, Boutati E, Pectasides E, Sasaki C, Kountourakis P, Weinberger P y cols (2010). Activation of Wnt Signaling Pathway by Human Papillomavirus E6 and E7 Oncogenes in HPV16-Positive Oropharyngeal Squamous Carcinoma Cells. *Mol Cancer Res* 2010; 8:433-443.
- Reya, T. & Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005;434:843-850.
- Reyes M, Rojas-Alcayaga G, Maturana A, Aitken JP, Rojas C, Ortega AV. (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.
- Riera, S. P. and B. Martínez R (2005). "Morbilidad y mortalidad por cáncer oral y faríngeo en Chile." *Revista médica de Chile* 133(5): 555-563.
- Rojas-Alcayaga, G. G., R. R. Brignardello, I. I. Espinoza, M. E. M. Franco, N. N. Lobos and A. V. A. Ortega-Pinto (2010). "Oral malignant tumours: a report on 728 cases in Chile."
- Roomi MW, Monterrey JC, Kalinovsky T, Rath M, Niedzwiecki A (2009). Distinct patterns of matrix metalloproteinase-2 and -9 expression in normal human cell lines. *Oncol Rep*, **21**, 821-6.
- Rosado, P., Lequerica-Fernandez, P., Fernandez, S., et al. (2013). E-cadherin and beta-catenin expression in well-differentiated and moderately-differentiated oral squamous cell carcinoma: relations with clinical variables. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 51, 149-56

- Sano, D. & J. N. Myers (2007). "Metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue." *Cancer Metastasis Rev* 26(3-4): 645-662.
- Schmalhofer, O., Brabletz, S. & Brabletz, T. (2009). E-cadherin, beta- catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 28: 151-166.
- Scully, C. & J. Bagan (2009). "Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications." *Oral Dis* 15(6): 388-399.
- Sher, D. J., V. Thotakura, T. A. Balboni, C. M. Norris, Jr., R. I. Haddad, M. R. Posner, J. Lorch, L. A. Goguen, D. J. Annino & R. B. Tishler (2011). Treatment of oral cavity squamous cell carcinoma with adjuvant or definitive intensity-modulated radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. United States, 2011 Elsevier Inc. 81: e215-222.
- Shuman Moss, LA., Jensen-Taubman, S. & Stetler-Stevenson, WG. (2012). Matrix metalloproteinases: changing roles in tumor progression and metastasis. *Am J Pathol*. 2012 Dec;181(6):1895-9.
- Singh T, Katiyar SK. (2013). Honokiol Inhibits Non-Small Cell Lung Cancer Cell Migration by Targeting PGE2-Mediated Activation of β -Catenin Signaling. *PLoS One*, 8(3):e60749.
- Song, Y., Yang, Q. X., Zhang, F., Meng, F., Li, H., Dong, Y., & Han, A. (2012). Suppression of nasopharyngeal carcinoma cell by targeting β -catenin signaling pathway. *Cancer epidemiology*, 36(2), e116-e121.
- Suarez-Roa, ML., Asbun-Bojalil, J., Ruiz-Godoy, LM., Meneses-García, AA. (2012). Immunoexpression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in

different areas of oral squamous cell carcinoma. *Aust Dent J.* 2012 Sep;57(3):300-7.

- Sun, L., Diamond, ME., Ottaviano, AJ, Joseph, MJ., Ananthanarayan, V. & Munshi, HG. (2008). "Transforming growth factor- $\beta\beta 1$ promotes matrix metalloproteinase-9- mediated oral cancer invasion through snail expression," *Molecular Cancer Research*, vol. 6, no. 1, pp. 10–20, 2008.
- Suzuki, H., Watkins, DN., Jair, KW., Schuebel, KE., Markowitz, SD., Chen, WD., et al. (2004). Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet* 2004;36:417-422.
- Takahashi-Yanaga, F. & Sasaguri, T. (2007). The Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway as a Target in Drug Discovery. *J Pharmacol Sci*;104(4):293- 302
- Takayama, S., Hatori, M., Kurihara, Y., Kinugasa, Y., Shiota, T. & Shintai S. (2009). "Inhibition of TGF- $\beta\beta 1$ suppresses motility and invasiveness of oral squamous cell carcinoma cell lines via modulation of integrins and down-regulation of matrix- metalloproteinases," *Oncology Reports*, vol. 21, no. 1, pp. 205–210, 2009.
- Takebe, N., Harris, PJ., Warren, RQ. & Ivy, SP. (2011). Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8:97-106.
- Tanaka, N., Odajima, T., Ogi, K., Ikeda, T. & Satoh, M. (2003). Expression of E-cadherin, alpha-catenin and beta-catenin in the process of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 89: 557-563, 2003.
- Van den Steen, P.E., Proost, P., Wuyts, A., Van Damme, J., and Opdenakker, G. (2000). Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by amino-

terminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 96, 2673–2681.

- Van der Waal, I. (2013). Are we able to reduce the mortality and morbidity of oral cancer; Some considerations. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 18: e33-37.
- Vermeulen, L., De Sousa, E., Melo, F., Van der Heijden, M., Cameron, K., de Jong, JH., Borovski T., et al. (2010). Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol*;12:468-476.
- Vilen, ST., Salo, T., Sorsa, T. & Nyberg, P. (2013). Fluctuating roles of matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. *Scientific World Journal*. 2013;2013:920595.
- Weaver, AM. (2006). Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion. *Clin Exp Metastasis*. 2006;23(2):97-105. Epub 2006 Jul 9.
- Werner JA, Rathcke IO, Mandic R (2002) The role of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Exp Metastasis* 19, 275-282.
- World Health Organization. (1998). *International histological classification of tumors*, 2nd ed., Springer: Berlin; 1998. 15-168.
- Wu, B., Crampton, SP. & Hughes, CC. (2007). Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration. *Immunity* 26: 227-239, 2007.
- Wünsch-Filho, V. & E. A. de Camargo (2001). "The burden of mouth cancer in Latin America and the Caribbean: Epidemiologic issues." *Seminars in Oncology* 28(2): 158-168.

- Ying, Y. & Tao, Q. (2009). Epigenetic disruption of the WNT/ β -catenin signaling pathway in human cancers. *Epigenetics* 2009;4(5):307-312.
- Yorioka, W, Coletta, RD., Alves, F., Nishimoto, IN., Kowalski, LP. & Graner, E. (2002). "Matrix metalloproteinase-2 and -9 activities correlate with the disease-free survival of oral squamous cell carcinoma patients," *International Journal of Oncology*, vol. 20, no. 1, pp. 189–194, 2002.
- Yu, Z., Weinberger, PM., Provost, E., et al. (2005). beta-Catenin functions mainly as an adhesion molecule in patients with squamous cell cancer of the head and neck. *Clin Cancer Res*, 11, 2471-7.
- Yu, J., Tao, Q., Cheng, Y.Y., Lee, K.Y., Ng, SSM., Cheung, KF., et al. (2009). Promoter methylation of the Wnt/ β -catenin signaling antagonist Dkk-3 is associated with poor survival in gastric cancer. *Cancer* 2009;115(1):49- 60.
- Zaid, KWM. (2014). Immunohistochemical Assessment of E-cadherin and β -catenin in the Histological Differentiations of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Asian Pacific Organization for Cancer Prevetion*. Volume 15, Issue 20, 2014, pp.8847-8853.
- Zhou, X., Gao, Y., Johnson, N. & Gao J. (2010). "Immunoexpression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in the metastasis of squamous cell carcinoma of the human tongue," *Australian Dental Journal*, vol. 55, no. 4, pp. 385–389, 2010.

11. ANEXOS

1. Aprobación proyecto de investigación FIOUCh 2013, Dirección de investigación Facultad de Odontología, Universidad de Chile.
2. Aprobación comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.
3. Aprobación comité de Bioseguridad de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

ANEXO N° 1



Santiago, diciembre 10 de 2013
DIFO N° 0155 / 2013
Mat.: Aprobación y asignación código FIOUCh

Señorita
Dra. Daniela Adorno Farias
 Departamento de Patología y Medicina Oral
 Facultad de Odontología
Presente

Estimada doctora Adorno:

Me permito informar a usted que su proyecto **“Relación entre linfocitos T Reguladores y Natural Killer en el infiltrado linfocitario de Carcinoma de Células Escamosas”** fue aprobado en el Concurso de Proyectos de Investigación en Odontología FIOUCh 2013.

Dicho proyecto ha recibido el siguiente código de inscripción en la Dirección de Investigación: **FIOUCh 13-008**. La fecha de inicio es diciembre de 2013 y cuenta con una duración máxima de un año (fecha de término: diciembre de 2014).

Recuerdo a usted que, según información entregada el 30 de agosto, todas las compras serán realizadas con el centro de costo de la Dirección de Investigación y las solicitudes de adquisiciones y de salida de bodega, deberán ser firmadas por el Director de Investigación; la Dirección Económica y Administrativa **NO** recibirá solicitudes de compras para proyectos FIOUCh que no provengan de la Dirección de Investigación.

Por lo señalado anteriormente, solicito a usted hacer llegar a esta Dirección el Formulario de Adquisición completo (se adjunta), cotizaciones en caso de ser necesario e indicar la fecha en que requiere los productos se encuentren en la Facultad.

Para formalizar el inicio del proyecto, solicitamos a usted firmar la carta de compromiso adjunta.

Sin otro particular, se despide cordialmente de usted,



Dra. GONZALO RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
 Profesor Asistente
 Director de Investigación

Dirección de Investigación, Sergio Livingstone Pohlhammer N° 943 3er Piso, Independencia
 Fono: 2978 1845 / E-mail: investigacion@odontologia.uchile.cl / <http://odontologia.uchile.cl>

ANEXO N° 2



28/08/2013

ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

ACTA N°: 2013/12

1. Acta de Aprobación de Protocolo de Estudio N° 2013/23.

2. Miembros del Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile participantes en la aprobación del Proyecto:

Dra. María Angélica Torres
Presidente del CEC

Dra. Claudia Lefimil Puente
Secretaria del CEC

Dr. Eduardo Rodríguez
Miembro permanente del CEC

Srta. Karín Lagos
Miembro permanente del CEC

Dra. Blanca Urzúa
Miembro permanente del CEC

Dra. Ximena Lee
Miembro permanente del CEC

3. Fecha de Aprobación: 28/08/2013

4. Título completo del proyecto: "Relación entre linfocitos T Reguladores y Natural Killer en el infiltrado linfocitario de Carcinoma de Células Escamosas". Proyecto Fiouch. Versión 21/08/2013.

5. Investigador responsable: Dra. Daniela Adorno.

6. Institución: Departamento de Patología y Medicina Oral, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

7. Documentación Revisada:

- CV del Investigador principal y del Investigador Alterno.
- Autorización del Director del Departamento de Patología y Medicina Oral para el uso de material biológico almacenado en el Biobanco del Departamento.

8. Fundamentación de la aprobación:

El cáncer oral representa uno de los diez cánceres más prevalentes en el mundo, siendo el carcinoma de células escamosas el que más afecta la cavidad oral. Diversos protagonistas de la respuesta inmune están implicados en el desarrollo y pronóstico de cáncer. Las Natural Killer son células de la respuesta inmune innata encargadas de la vigilancia y lisis antitumoral. Por otro lado, los linfocitos T reguladores, implicados en suprimir una potente e ideal respuesta antitumor, han sido descritos como fundamentales en la progresión tumoral. Existe poca evidencia del papel que tendrían estas células en el cáncer oral por lo que se torna necesario generar mayor información al respecto. El objetivo de este trabajo es identificar la relación entre la presencia de linfocitos T reguladores y células Natural Killer en el infiltrado linfocitario de carcinoma de células escamosas oral, así como su relación con la progresión de este cáncer. Esto podría permitir mayor precisión en el pronóstico de los pacientes, y por otro lado, nuevas herramientas en la búsqueda de terapias complementarias anti tumor.

Las muestras a utilizar corresponden a biopsias mantenidas en el Biobanco del Departamento de Patología y Medicina Oral. El estudio tiene validez científica, es de interés y los investigadores tienen experiencia en el tema.

Este comité ha emitido una evaluación de este proyecto basado en la capacidad de los comités éticos científicos de decidir la legitimidad ética de una investigación que usa muestras y datos de ficha clínica anonimizados sin consentimiento informado, cuando la investigación no es de riesgo. De otro modo, sería impracticable y no se podría responder a una pregunta importante de investigación de acuerdo a pautas éticas internacionales (Pautas CIOMS 2008 de Estudios Epidemiológicos) en y dada la ausencia de legislación específica en Chile, ya que el artículo 13 de la ley 20.584 no hace referencia a investigación retrospectiva en fichas clínicas y bases de datos y se refiere más bien a temas de salud poblacional y ensayos clínicos.

En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, Aprueba el estudio "Relación entre linfocitos T Reguladores y Natural Killer en el infiltrado linfocitario de Carcinoma de Células Escamosas". Proyecto Fiouch. Versión 21/08/2013, bajo la conducción de la Dra. Daniela Adorno, del Departamento de Patología y Medicina Oral, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

Este Comité se reserva el derecho de monitorear este proyecto si lo considera necesario y el investigador deberá, bajo mutuo acuerdo, presentar los antecedentes solicitados.


Dra. María Angélica Torres V.
Presidente C.E.C.

c/c.: Investigador Principal y Secretaría C.E.C.



ANEXO N° 3



Comité Institucional de Bioseguridad
Administración Conjunta Campus Norte
FDO N°21

Santiago, 02 de Diciembre de 2013.

C E R T I F I C A D O

El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha analizado el Proyecto de Investigación presentado al Concurso FIOUCH 2013, titulado “**Relación entre linfocitos T reguladores y natural killer en el infiltrado linfocitario de carcinoma de células escamosas**”. El Investigador Responsable de este proyecto es la Dra. Daniela Adorno Farías, Académica del Departamento de Patología y Medicina Oral.

Los procedimientos experimentales, que involucran el uso de agentes químicos de riesgo con características irritantes, tóxicas y/o inflamables, se realizarán en el laboratorio de Anatomía Patológica dirigido por la T.M. Montserrat Reyes en la Facultad de Odontología.

El CIB certifica que el laboratorio y la Facultad mencionada anteriormente, cuenta con las facilidades para el manejo y desecho del material químico a utilizar en el proyecto de acuerdo al Manual de Bioseguridad, Conicyt 2008. Además, el investigador se compromete a velar por el cumplimiento de las normas de bioseguridad, durante el desarrollo del proyecto.

Se extiende el presente certificado a solicitud de la Dra. Adorno para ser presentado a la Dirección de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Dr. Mario Chiong
Secretario

Dra. Carla Lozano M.
Presidenta

Facultad de Odontología. Sergio Livingstone P. 943, Independencia, Fono 9781793-9781832, Fax: 9781748, Santiago.
<http://odontologia.uchile.cl>
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Sergio Livingstone P. 1007, Independencia, Fono 9781792 Fax: 9781748, Santiago.
<http://www.quimica.uchile.cl/>