



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
ESCUELA DE GRADUADOS**

**PAPEL DE LA GTPASA ENDOSOMAL RAB5 EN LA
LOCALIZACIÓN NUCLEAR DE β -CATENINA EN
DISPLASIA ORAL**

MONTSERRAT DE LOS ÁNGELES REYES ROJAS

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

Director de Tesis: Prof. Dr. Vicente Torres

**Santiago - Chile
2019**

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE GRADUADOS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS**

Se informa al Consejo de Posgrado de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Odontológicas presentada por la candidata

MONTSERRAT DE LOS ÁNGELES REYES ROJAS

ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias Odontológicas, en examen rendido el día 26 de abril de 2019

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS

Dra. Andrea Paula Lima

Dr. Alfredo Criollo

Dr. Julio Tapia

Dra. Marcela Hernández
Presidente Comisión de Examen

A mi abuelo quien me dio el más grande amor

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco especialmente a mi familia, quienes siempre me han apoyado en todas mis decisiones y siempre han estado a mi lado, los amo mucho.

A mi Rafaela quien llegó a darme felicidad y me enseñó el amor incondicional.

A Vicente, quien además de ser mi tutor, ha sido un maestro y un gran amigo.

A todo el grupo del laboratorio AC/VT quienes fueron un apoyo fundamental en este proceso.

A Daniel quien ha sido mi amigo y compañero y me ha acompañado en todo este camino apoyándome en todo momento.

A la comisión evaluadora, que gracias a sus consejos contribuyeron enormemente en esta etapa de mi formación.

PRODUCTOS DERIVADOS DE LA TESIS

PUBLICACIONES

1. **Montserrat Reyes**, Daniel Peña-Oyarzun, Andrea Maturana, and Vicente A. Torres. Nuclear localization of β -catenin and expression of target genes are associated with increased Wnt secretion in oral dysplasia. *En revisión para re-envío* en revista Oral Oncology.
2. P Torres, M Castro, **M Reyes**, VA Torres. Histatins, wound healing, and cell migration. Oral Dis. 2018; 24(7): 1150-1160. DOI: 10.1111/odi.12816 2018.
3. Daniela Adorno-Farias, Juan Pablo Aitken, **Montserrat Reyes**, Ana Ortega, Blanca Urzúa, Lilian Jara, Alfredo Molina, José Jara, Jean Nunes dos Santos, Sandra Tarquínio, Ricardo Fernández-Ramires. “Alteraciones genéticas de la mucosa oral hacia la transformación maligna”. Acta Odontológica Venezolana Volumen 55, No. 2, Año 2017.

MANUSCRITOS EN PREPARACIÓN

1. Solange Rivas, Patricio Silva, **Montserrat Reyes**, Cecilia Arriagada, Hugo Sepúlveda, Luis Solano, Martín Montecino and Vicente A. Torres. The Rab GEF ALS2 is a hypoxia inducible target associated with the acquisition of aggressive traits in tumor cells and overexpressed in cancer.

EXPOSICIONES A CONGRESOS Y JORNADAS

- 1 **Reyes Montserrat**, Peña-Oyarzun Daniel, Maturana Andrea, and Torres Vicente
A. Increased nuclear β -catenin is associated to Wnt secretion in oral dysplasia.
Primer Congreso Anual ICOD “Del Laboratorio a la clínica”. 24-25 enero de 2019.
Facultad de Odontología. Universidad de Chile. Santiago. Chile
- 2 **Reyes M**, Torres V. Rab5 promotes nuclear localization of β -catenin in oral
dysplasia. XXXII Reunión Anual. Sociedad de Biología Celular de Chile. 22 al 26
de octubre de 2018. Puerto Varas. Chile
- 3 **Montserrat Reyes**. Carcinogénesis Oral: Enfermedad, mecanismos y búsqueda
de nuevos biomarcadores. Ciclo de charlas de la Escuela de Tecnología Médica.
Facultad de Medicina. Universidad de Valparaíso. Reñaca, 06 Octubre 2017
- 4 **Montserrat Reyes**. Búsqueda de nuevos marcadores en displasia y cáncer oral,
XVIII Congreso Chileno de Tecnología Médica y II Internacional. Chile, Santiago,
2016

PASANTÍA

- 1 Estadía de 2 meses, en colaboración con el Dr. Silvio Gutkind. Moores UCSD
Cancer Center, Universidad de California San Diego, EE.UU. Enero-Febrero
2018

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	18
1.1. Displasia Oral	18
1.2. Vía de Señalización Wnt/ β -Catenina	21
1.3. Rol del tráfico endocítico en la señalización Wnt/ β -Catenina	25
1.4. Proteínas Rabs: Reguladoras del tráfico endosomal	27
2. HIPÓTESIS	31
3. OBJETIVOS	32
3.1. Objetivo general	32
3.2. Objetivos específicos	32
4. DISEÑO EXPERIMENTAL	33
4.1. Objetivo específico 1: Determinar el efecto de ligandos Wnt en la localización de β -catenina en células de displasia oral	33
4.2. Objetivo específico 2: Analizar el efecto de la activación de Rab5 en la localización nuclear de β -catenina en células de displasia oral	35
4.3. Objetivo específico 3: Determinar si la actividad de Rab5 es necesaria para el reclutamiento de componentes del complejo de destrucción de β -catenina hacia endosomas tempranos en células de displasia oral	36
4.4. Objetivo específico 4: Evaluar la localización endosomal de GSK-3 β en biopsias de displasia oral con presencia nuclear de β -catenina	36
5. MATERIALES Y MÉTODOS	37
5.1. Reactivos	37
5.2. Cultivo Celular	38
5.3. Cultivo primario de queratinocitos orales	38
5.4. Plasmidios y transfecciones	39
5.5. Inhibidor WNT-C59	40
5.6. SDS-PAGE y Western Blot	40

5.7. Inmunofluorescencia en líneas celulares	41
5.8. Fraccionamiento Subcelular	42
5.9 Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de Polimerasa tiempo real (qRT-PCR)	43
5.10 Ensayo de Gen Reportero	44
5.11 Ensayo de Precipitación por afinidad de Rab5-GTP	45
5.12 Procesamiento de biopsias en bloques de parafina	46
5.13 Inmunofluorescencia en tejidos incluidos en parafina	46
5.14. Análisis estadístico	47
6. RESULTADOS	48
6.1 Objetivo específico 1: Determinar el efecto de ligandos Wnt en la localización de β -catenina en células de displasia oral	48
6.1.1 Las células de displasia oral DOK presentan un aumento en la localización nuclear de β -catenina en relación a queratinocitos orales y células de carcinoma oral	48
6.1.2 Las células displásicas orales secretan niveles más altos de Wnt 3a en relación con los queratinocitos orales	53
6.1.3 La localización nuclear de β -catenina y la expresión de genes diana requieren de la secreción de Wnt en células de displasia oral	55
6.1.4 El ligando Wnt derivado de células de displasia oral induce la transcripción dependiente de β -catenina en queratinocitos orales	59
6.1.5 Biopsias de tejido con diagnóstico histopatológico de displasia oral severa muestran presencia nuclear de β -catenina simultáneamente con un aumento en la expresión de Wnt 3a	66
6.1.6 Conclusión objetivo específico N°1	68
6.2 Objetivo específico 2: Analizar el efecto de la activación de Rab5 en la localización nuclear de β -catenina en células de displasia oral	69

6.2.1 La expresión de una mutante inactiva de Rab5 inhibe la translocalización nuclear de β -catenina en células de displasia oral	69
6.2.2 La expresión de una mutante inactiva de Rab5 disminuye la actividad transcripcional de β -catenina en células OKF-6 tratadas con medio condicionado de DOK	75
6.2.3 Conclusión objetivo específico N°2	77
6.3 Objetivo específico 3: Determinar si la actividad de Rab5 es necesaria para el reclutamiento de componentes del complejo de destrucción de β -catenina hacia endosomas tempranos en células de displasia oral	78
6.3.1 La actividad de Rab5 es necesaria para el reclutamiento de componentes del complejo de destrucción de β -catenina en endosomas tempranos	78
6.3.2 Conclusión objetivo específico N°3	84
6.4 Objetivo específico 4: Evaluar la localización endosomal de GSK 3- β en biopsias de displasia oral con presencia nuclear de β -catenina	85
6.4.1 Las células de tejidos diagnosticados con displasia oral severa presentan un aumento en el reclutamiento de GSK3- β en endosomas tempranos	85
6.4.2 Conclusión objetivo específico N°4	90
7. DISCUSIÓN	91
7.1. Activación de la vía Wnt/ β -catenina en displasia oral	91
7.2. Rol de Rab5 y el tráfico endocítico en la localización nuclear de β -catenina en displasia oral	97
8. CONCLUSIONES	102
9. BIBLIOGRAFÍA	103
10. ANEXO	111

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de la Carcinogénesis	20
Figura 2. Vía de Señalización Wnt/ β -Catenina	22
Figura 3. Modelo de secuestro de GSK3- β en estructuras endosomales	26
Figura 4. Ciclo de activación e inactivación de las proteínas Rabs	28
Figura 5. Localización subcelular de β -Catenina total	50
Figura 6. Localización subcelular de β -Catenina no fosforilada	51
Figura 7. Detección de β -Catenina	52
Figura 8. Presencia de ligandos Wnt en medio condicionado de células DOK	54
Figura 9. Uso del inhibidor C-59 en células DOK	57
Figura 10. Expresión de Survivina y Ciclina D1 en células DOK tratadas con C-59	58
Figura 11. Localización y actividad transcripcional de β -catenina en queratinocitos orales tratados con medio condicionado de células DOK	62
Figura 12. Actividad transcripcional de β -catenina en queratinocitos orales tratados con C-59	63
Figura 13. Caracterización de queratinocitos orales primarios	64
Figura 14. Localización de β -catenina en queratinocitos orales primarios tratados con medio condicionado de células DOK	65
Figura 15. Inmunofluorecencia de β -catenina y Wnt3a	67
Figura 16. Actividad de Rab5 en células de displasia oral	71
Figura 17. Efecto de la activación de Rab5 en la localización nuclear de β -catenina	72
Figura 18. Detección de β -catenina en fracciones subcelulares	73
Figura 19. Efecto de la activación de Rab5 en la expresión de Survivina y Ciclina D1	74

Figura 20. Efecto de la activación de Rab5 en la actividad transcripcional de β -catenina	76
Figura 21. Co-localización de GSK-3 β con EEA1 en células de displasia oral	80
Figura 22. Co-localización de Axina con EEA1 en células de displasia oral	82
Figura 23. Co-localización de APC con EEA1 en células de displasia oral	82
Figura 24. Co-localización de Wnt3 con EEA1 en células de displasia	83
Figura 25. Inmunofluorescencia en tejidos de displasia oral severa y mucosa oral sana	88
Figura 26. Co-localización de GSK-3 β y EEA1 en tejidos con diagnóstico de displasia oral severa y mucosa oral sana a través de inmunofluorescencia	89
Figura 27. Modelo propuesto de la activación de la vía Wnt/ β -catenina y la posterior translocación nuclear de β -catenina en displasia oral.	101

RESUMEN

La displasia oral reúne un conjunto de alteraciones celulares y tisulares en el epitelio oral, cuyo diagnóstico está generalmente relacionado con una mayor tasa de transformación maligna hacia el cáncer. Una de las vías de señalización alterada en la carcinogénesis oral, es la vía Wnt Canónica, en donde la proteína β -catenina es su componente central. Al activarse la vía Wnt, β -catenina no es fosforilada y se estabiliza en el citoplasma, llevando a su posterior translocación nuclear, incrementando la transcripción de genes relacionados con la tumorigénesis. La pérdida en la regulación de β -catenina es comúnmente asociada a diversos tipos de cáncer, y lesiones potencialmente malignas, como en colon, sin embargo en displasia oral se desconoce si existen alteraciones en la actividad transcripcional de β -catenina, y menos aún se conoce el posible mecanismo involucrado en su translocación nuclear. En modelos no tumorales, se ha propuesto que el tráfico endocítico juega un papel clave en la activación de la vía Wnt canónica, a través del secuestro de proteínas claves para la degradación de β -catenina en endosomas tempranos, y en donde proteínas reguladoras del tráfico endocítico, como Rab5, podrían jugar un papel potencial en la translocación nuclear de β -catenina. Según lo anterior, existe la posibilidad de que Rab5 contribuya en la progresión tumoral, y específicamente en etapas tempranas de la carcinogénesis oral. Sin embargo, no se ha demostrado la relevancia de Rab5 en el desarrollo de la displasia oral. En base a lo

anteriormente señalado, se propone la siguiente hipótesis: **“la activación de Rab5 promueve la translocación nuclear de β -catenina, a través del reclutamiento de su complejo de destrucción hacia endosomas tempranos en displasia oral”**. El objetivo general de este proyecto es determinar si la translocación nuclear de β -catenina en displasia oral depende de la activación de Rab5 y del reclutamiento del complejo de destrucción hacia endosomas tempranos. Para esto, los objetivos específicos son: (1) Determinar el efecto de ligandos Wnt en la localización de β -catenina en células de displasia oral; (2) Analizar el efecto de la activación de Rab5 en la localización nuclear de β -catenina en células de displasia oral; (3) Determinar si la actividad de Rab5 es necesaria para el reclutamiento de componentes del complejo de destrucción de β -catenina hacia endosomas tempranos en células de displasia oral; (4) Evaluar la localización endosomal de GSK-3 β en biopsias de displasia oral con presencia nuclear de β -catenina. En esta tesis hemos demostrado una mayor presencia nuclear de β -catenina en células DOK (línea celular de displasia oral moderada), en comparación a células OKF-6/TERT2 (línea celular de queratinocitos orales no tumorales) y CAL-27 (línea celular de carcinoma oral de células escamosas), así como también un enriquecimiento de β -catenina total y β -catenina no fosforilada en fracciones nucleares de células DOK. Adicionalmente, el medio condicionado de células DOK previamente tratadas con el inhibidor de la porcupina C-59, el cual inhibe la secreción de ligandos Wnt, presentó un menor nivel de Wnt3a secretado, en comparación con la condición no tratada. Adicionalmente las células DOK

tratadas con C-59 presentaron una menor acumulación de β -catenina nuclear, y menores niveles totales de β -catenina no fosforilada, así como una disminución en los niveles de ARNm y proteína para los genes diana de β -catenina (survivina y ciclina D1). El tratamiento, ya sea de células OKF-6 o de queratinocitos orales primarios, con medio condicionado de células DOK, indujo una mayor localización y actividad transcripcional de β -catenina. Para finalizar los resultados del objetivo específico 1, se observó que tejidos de displasia oral severa presentaron localización nuclear de β -catenina y paralelamente un aumento de Wnt3a, en comparación con mucosa sana. Por su parte, resultados del objetivo específico 2 demostraron mayores niveles de la fracción activa de Rab5 en células DOK en comparación a células OKF-6, mientras que la transfección de células DOK con GFP-Rab5/S34N (mutante inactiva de Rab5) causó una disminución en la localización nuclear de β -catenina. Los resultados relacionados con el objetivo específico 3 indican que efectivamente hay co-localización entre el marcador de endosomas tempranos (EEA1) y proteínas del complejo de destrucción de β -catenina en células DOK, sin embargo, esta co-localización disminuye significativamente cuando éstas células son transfectadas con la mutante inactiva de Rab5. Por último, y en relación al objetivo específico 4 se demostró simultáneamente presencia nuclear de β -catenina y localización endosomal de GSK-3 β en tejidos de displasia oral severa, en comparación a tejidos de mucosa oral sana. En conclusión, esta tesis demuestra por primera vez cómo el tráfico endocítico se relaciona con la señalización Wnt canónica, induciendo la translocación nuclear de β -catenina y

contribuyendo así a la progresión tumoral en etapas tempranas de la carcinogénesis oral.

Palabras Claves: *Displasia Oral, Rab5, β -catenina, complejo de destrucción*

SUMMARY

Oral dysplasia is characterized by a group of cellular and tissue alterations in the oral epithelium, whose diagnosis is generally associated with higher rates of malignant transformation to cancer. One of the altered signaling pathways in oral carcinogenesis is the canonical Wnt pathway, in which the protein β -catenin is a central component. Upon activation of the Wnt pathway, β -catenin phosphorylation is inhibited allowing its stabilization in the cytoplasm and nuclear translocation, where it induces the transcription of target genes, which are commonly associated with tumorigenesis. Loss in the regulation of β -catenin is commonly associated with various types of cancer and a subset of potentially malignant lesions, however the role that this signaling pathway plays in oral dysplasia, remains unknown, and consequently whether alterations at either transcriptional activity or the underlying mechanisms involved in nuclear localization, have not been evaluated in oral dysplasia. On the other hand, studies in non-tumor cell models, have identified the endocytic trafficking as a key player in the activation of the canonical Wnt pathway. Specifically, endosomal sequestering of proteins involved in the degradation of β -catenin accounts for stabilization and nuclear translocation of β -catenin. Here, it will be relevant to assess the role of regulators of the endocytic trafficking, such as Rab5, in the stabilization of β -catenin and tumor progression at early stages of oral carcinogenesis. However, the relevance of Rab5 in the development of oral dysplasia has not been demonstrated. Based on this background, the following hypothesis is proposed:

“The activation of Rab5 promotes the nuclear translocation of β -catenin, through the recruitment of its destruction complex towards early endosomes in oral dysplasia”. The general objective of this project is to determine if the nuclear translocation of β -catenin in oral dysplasia depends on the activation of Rab5, and hence the recruitment of the destruction complex towards early endosomes. To this end, the following specific aims are proposed: **(1)** To determine the effect of Wnt ligands in the localization of β -catenin in oral dysplastic cells; **(2)** To analyze the effect of Rab5 activity in nuclear localization of β -catenin in oral dysplastic cells; **(3)** To determine if Rab5 activity is necessary for the recruitment of components of the destruction complex of β -catenin within early endosomes in oral dysplastic cells; **(4)** To evaluate the endosomal localization of GSK-3 β in oral dysplasia biopsies with nuclear presence of β -catenin. In this thesis, we have shown higher levels of β -catenin in dysplastic oral keratinocytes (DOK cell line, moderate dysplasia), when compared with oral keratinocytes (OKF6/TERT2 cell line, immortalized) and oral squamous carcinoma cells (CAL-27 carcinoma cell line), as well as an enrichment of total β -catenin and non-phosphorylated β -catenin in nuclear fractions of DOK cells. Additionally, conditioned medium obtained from DOK cells, previously treated with C-59 (inhibitor of porcupine, which inhibits the secretion of Wnt ligands) showed reduced levels of secreted Wnt3a, when compared with control medium. Additionally, DOK cells treated with C-59 showed decreased accumulation of nuclear β -catenin, reduced levels of non-phosphorylated β -catenin, and

decreased mRNA and protein levels for the β -catenin target genes, Survivin and Cyclin D1. Treatment of OKF-6 cells and primary oral keratinocytes with DOK-derived conditioned medium promoted nuclear localization and transcriptional activity of β -catenin. Finally, biopsy tissues of severe oral dysplasia showed nuclear localization of β -catenin, which paralleled increased Wnt3a expression, when compared. Results of specific aim 2 showed higher levels of active Rab5 (Rab5-GTP) in DOK cells, when compared with OKF-6, whereas transfection of DOK cells with GFP-Rab5/S34N (inactive mutant of Rab5) decreased nuclear localization of β -catenin. Results related to specific aim 3 indicate that there is co-localization between markers of early endosomes (EEA1) and proteins belonging to the β -catenin destruction complex, however, this co-localization decreased significantly upon transfection with the inactive mutant of Rab5 in DOK cells. Finally, related to specific aim 4, simultaneous nuclear localization of β -catenin and the endosomal localization of GSK-3 β were demonstrated in tissues of severe oral dysplasia, when compared with healthy oral mucosa. In summary, this thesis demonstrates for the first time that the endocytic trafficking is related to the canonical Wnt signaling, and nuclear translocation of β -catenin in oral dysplasia, and thus, it contributes to understand the mechanisms associated with tumor progression in the early stages of oral carcinogenesis.

Key words: *Oral dysplasia, Rab5, β -catenin, destruction complex*

1. INTRODUCCIÓN

1.1 DISPLASIA ORAL

La carcinogénesis oral corresponde a un proceso multifactorial cuya etiología involucra alteraciones moleculares y cambios genéticos. El cáncer oral es un subtipo de cáncer de cabeza y cuello que puede surgir como una lesión de origen primario en los tejidos orales que recubren la boca, labios, encías y lengua (Huang Liu et al. 2014). Las malignidades orales y orofaríngeas representan aproximadamente el 3% de todos los tumores malignos en hombres y un 2% en mujeres en Estados Unidos (Neville and Day 2002). En Chile, un análisis correspondiente al año 2005 dio a conocer que el cáncer oral corresponde a un 1,6% del total de casos de cáncer, estando presente principalmente en hombres de más de 45 años de edad, con una tasa de 2,3:1 en comparación con las mujeres (Riera and Martinez 2005; Rojas-Alcayaga et al. 2010).

La incidencia del cáncer oral ha aumentado a nivel mundial, donde ya en el 2012 hubo nuevos casos por cada 100.000 habitantes, encontrándose entre los 11 tipos de cáncer más frecuentes en hombres (GLOBOCAN 2012). No obstante, sólo el 40-50% de los pacientes sobreviven a los 5 años, convirtiéndose en un importante problema de salud pública (Fronie et al. 2013), por lo tanto, su diagnóstico temprano es clave para mejorar la supervivencia de los pacientes y reducir significativamente las tasas de mortalidad (Dost

et al. 2014).

Alrededor del 90% del cáncer oral se origina en el epitelio estratificado no queratinizado de la mucosa oral, por lo cual es denominado Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE) y la gran mayoría de las veces está precedido por lesiones cuyo diagnóstico histopatológico es de displasia epitelial, la cual corresponde a alteraciones celulares y tisulares en el epitelio oral, que revelan una modificación en la maduración celular del epitelio y un aumento de la actividad proliferativa. En el año 2005 la OMS clasificó histológicamente la displasia oral según su grado de diferenciación entre **leve, moderada y severa**, y las características de cada una están íntimamente ligadas a los cambios en la arquitectura epitelial y presencia de atipias celulares, las cuales van aumentando en las capas del epitelio a medida que la displasia va progresando (Fleskens and Slootweg 2009; Speight 2007; Warnakulasuriya et al. 2008) (**Figura 1**).

El diagnóstico de displasia epitelial está asociado con una mayor tasa de desarrollo de cáncer invasivo, la cual varía considerablemente según distintos estudios, con una fluctuación que va desde el 2% al 36%, siendo estas diferencias debidas en parte, al tiempo de seguimiento de las lesiones (Dost et al. 2014; Martinez et al. 2016; van der Waal 2014). Si bien, la presencia de displasia epitelial es considerado el predictor más fuerte de transformación maligna, no todas las displasias avanzan a cáncer (Speight 2007; Warnakulasuriya et al. 2007; Warnakulasuriya et al. 2008).

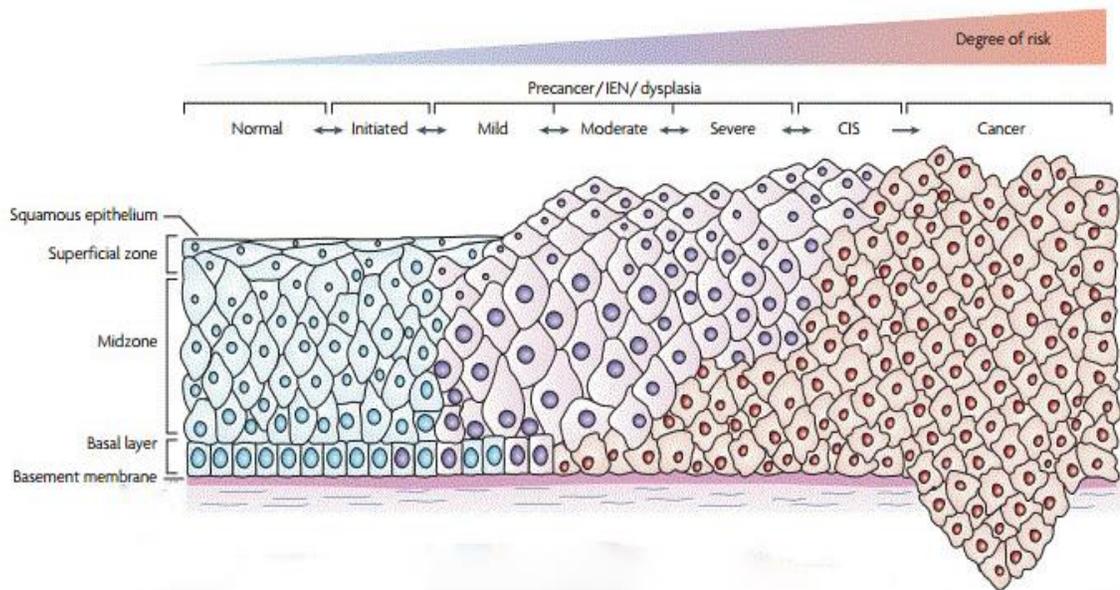


Figura 1. Etapas de la Carcinogénesis. Extraído de (Kelloff and Sigman 2007). En el esquema se destacan las distintas etapas de la carcinogénesis y de los distintos grados de displasia (leve, moderada, severa).

El diagnóstico histopatológico de displasia oral suele ser bastante complejo y subjetivo (Speight 2007) y en la actualidad no disponemos de marcadores definitivos que nos puedan predecir su existencia y su evolución, es por esto que el estudio de biomarcadores que detecten las primeras etapas de la transformación maligna o displasia oral, y que revelen cambios genéticos y moleculares relacionados con su carcinogénesis, puede mejorar significativamente la detección precoz de lesiones iniciales, lo cual convellaría a la identificación de pacientes con alto riesgo de desarrollar cáncer oral (Mishra 2012; Polanska et al. 2014). Lo anterior se debe principalmente a que la evolución que sufren estas lesiones hasta el desarrollo del cáncer, y específicamente sus alteraciones

moleculares, no son totalmente comprendidas (Angiero et al. 2008; Gonzalez-Moles et al. 2010; Gonzalez-Moles et al. 2000; Kurokawa et al. 2005; Nasser et al. 2011). Al respecto, una de las vías de señalización que podría estar involucrada en la progresión de la displasia oral, es la vía de Wnt/ β -catenina, la cual ha sido poco estudiada en el desarrollo de esta enfermedad.

1.2 VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT/ β -CATENINA

La vía de señalización Wnt/ β -catenina (o Wnt canónica) está involucrada en funciones biológicas variadas, entre ellas la diferenciación, migración y proliferación celular (Valenta et al. 2012). Esta vía tiene como componente central a la proteína β -catenina, la cual además de ser la molécula efectora de la señal de activación Wnt, es una proteína involucrada en la adhesión celular junto a E-cadherina (Logan and Nusse 2004). La fosforilación de β -catenina es un paso clave para su degradación, en ausencia de las señales Wnt, proceso mediado por el complejo de destrucción multiproteico formado por la enzima Caseína Kinasa 1 α (CK1 α), la enzima Glucógeno Sintasa Kinasa 3 β (GSK-3 β), la proteína supresora de tumores Poliposis Adenomatosa Coli (APC) y Axina. Este complejo lleva a cabo la fosforilación de residuos amino terminal de β -catenina, incluyendo Ser33/Ser37/Thr41, llevándola a su degradación vía proteosoma, disminuyendo de esta forma los niveles citoplasmáticos de esta proteína (Logan and Nusse

2004; Nusse 2012) (**Figura 2**).

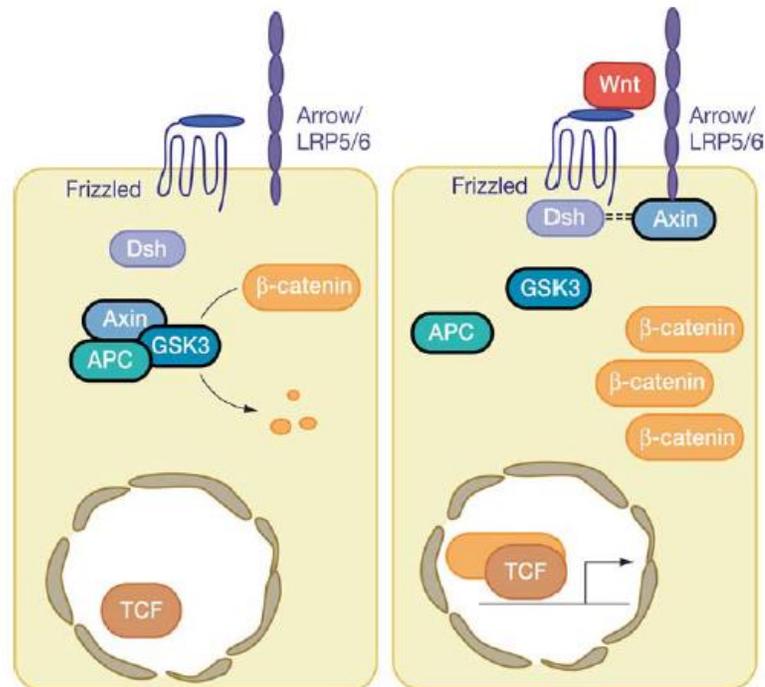


Figura 2. Vía de señalización Wnt/β-catenina. Extraído de (Logan and Nusse 2004). En ausencia de señalización Wnt, β-catenina es fosforilada por su complejo de degradación, llevándola a su posterior degradación vía proteosomal (panel izquierdo). Por otra parte, la activación de la vía (panel derecho) causa la inhibición del complejo de destrucción, llevando a la estabilización de β-catenina y su concomitante translocación al núcleo.

La activación de la vía Wnt/β-catenina se inicia por unión de ligandos Wnt a los receptores de superficie celular Frizzled (Fzd) y al co-receptor LRP 5/6, formando un complejo trimérico que lleva al reclutamiento de la proteína Dishevelled (Dvl) la cual bloquea al complejo de destrucción de β-catenina, llevando a su estabilización citoplasmática y consecuente translocación al núcleo. Una vez translocada al núcleo,

β -catenina forma un complejo con los factores de transcripción TCF/LEF-1 llevando a la activación transcripcional de genes blanco, tales como Ciclina D1 y Survivina entre otros, relacionados con el crecimiento y la proliferación celular (Kimelman and Xu 2006; Logan and Nusse 2004; MacDonald and He 2012) (**Figura 2**).

Varios reportes han demostrado la activación aberrante de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en diferentes cánceres humanos, como el cáncer de colon, gástrico, cervical y melanoma; y por lo tanto, hay evidencia considerable de anormalidades en la vía de señalización Wnt canónica en tumorigénesis (Luo et al. 2007; Ochoa-Hernandez et al. 2012). Sin embargo, es poco lo que se conoce de esta vía en la carcinogénesis oral.

La estabilización de β -catenina es un evento temprano en muchos modelos de carcinogénesis, (Logan and Nusse 2004), por ejemplo en colon, estómago o mama (Bian et al. 2000; Khalil et al. 2012; Sun et al. 2012). En displasia oral, algunos estudios han reportado mediante inmunohistoquímica una sobreexpresión de proteínas reguladoras de la proliferación y el ciclo celular y cuyos genes son dependientes de la actividad de β -catenina, tales como Ciclina D1, Survivina y Cox-2, proponiéndolos como marcadores de etapas tempranas de la carcinogénesis oral (Basnaker et al. 2014; Lo Muzio et al. 2003; Mauro et al. 2010; Ramakrishna et al. 2013; Ramasubramanian et al. 2013; Renkonen et al. 2002; Shibata et al. 2005).

En concordancia con lo anterior, nuestro grupo ha demostrado la presencia nuclear de β -catenina mediante inmunohistoquímica en el 100% de biopsias con diagnóstico

histopatológico de displasia oral moderada y severa en comparación a un 27.7% de las muestras de COCE incluidas en el estudio, mientras que en la mucosa oral sana sólo presencia membranosa de β -catenina (Reyes et al. 2015). Nuestros resultados fueron consistentes con la mayoría de los informes que muestran una mayor presencia de β -catenina nuclear en displasia moderada y severa, en comparación con displasia leve; sin embargo, la expresión de β -catenina disminuyó después de comenzar el proceso neoplásico invasivo (Ishida et al. 2007; Sato et al. 2002). **Estas observaciones sugieren un papel de esta proteína en la progresión de la displasia; sin embargo, no existen estudios moleculares sobre el posible mecanismo involucrado en su translocación nuclear.** Al respecto, estudios en células no tumorales demostraron que el secuestro de GSK-3 β en endosomas tempranos y posteriormente en cuerpos multivesiculares es uno de los mecanismos necesarios para la activación de la vía Wnt/ β -catenina y la consecuente translocación de β -catenina al núcleo (Taelman et al. 2010), aunque no existen estudios de este posible mecanismo en displasia oral.

1.3 ROL DEL TRÁFICO ENDOCÍTICO EN LA SEÑALIZACIÓN WNT/ β -CATENINA

Durante años, el tráfico endocítico fue aceptado solamente como un mecanismo de silenciamiento de la señalización de muchas vías, debido a que la internalización de los receptores de superficie celular y su posterior transporte desde endosomas tempranos hacia endosomas tardíos y lisosomas, lleva a su degradación (Miaczynska et al. 2004). No obstante, la endocitosis juega un papel clave en la activación de vías de señalización, entre ellas la vía Wnt canónica, ya que la internalización del complejo trimérico, formado por el ligando Wnt, receptor Frizzled y el co-receptor LRP6, en conjunto con el complejo de destrucción de β -catenina en compartimientos endosomales, inicia la activación de la vía Wnt/ β -catenina (Dobrowolski and De Robertis 2012).

Específicamente, la activación de los receptores Wnt por unión con su ligando, provoca la fosforilación de la cola citoplasmática de LRP 5/6 por GSK-3 β y CK1 α . Esta fosforilación estimula la unión de las proteínas restantes del complejo de destrucción hacia la membrana plasmática formando una estructura llamada LRP6 signalosoma, la cual contiene agregados de Frizzled, LRP5/6 fosforilado, Dvl, Axina, APC y GSK-3 β , y cuyo complejo es internalizado en estructuras endosomales (Blitzer and Nusse 2006; Dobrowolski and De Robertis 2012; Hagemann et al. 2014; Kikuchi and Yamamoto 2007; Yamamoto et al. 2006). Se ha reportado que un paso clave para la señalización de Wnt es

la inactivación constante de GSK-3 β , la cual comienza con su unión a la cola citoplasmática de LRP6, y continúa tras su secuestro en endosomas tempranos, tardíos y cuerpos multivesiculares. De esta forma, β -catenina no puede ser fosforilada por GSK-3 β , por lo que se estabiliza en el citoplasma y posteriormente se transloca al núcleo, donde activa la transcripción de los genes blanco de la vía Wnt canónica (Taelman et al. 2010)

(Figura 3).

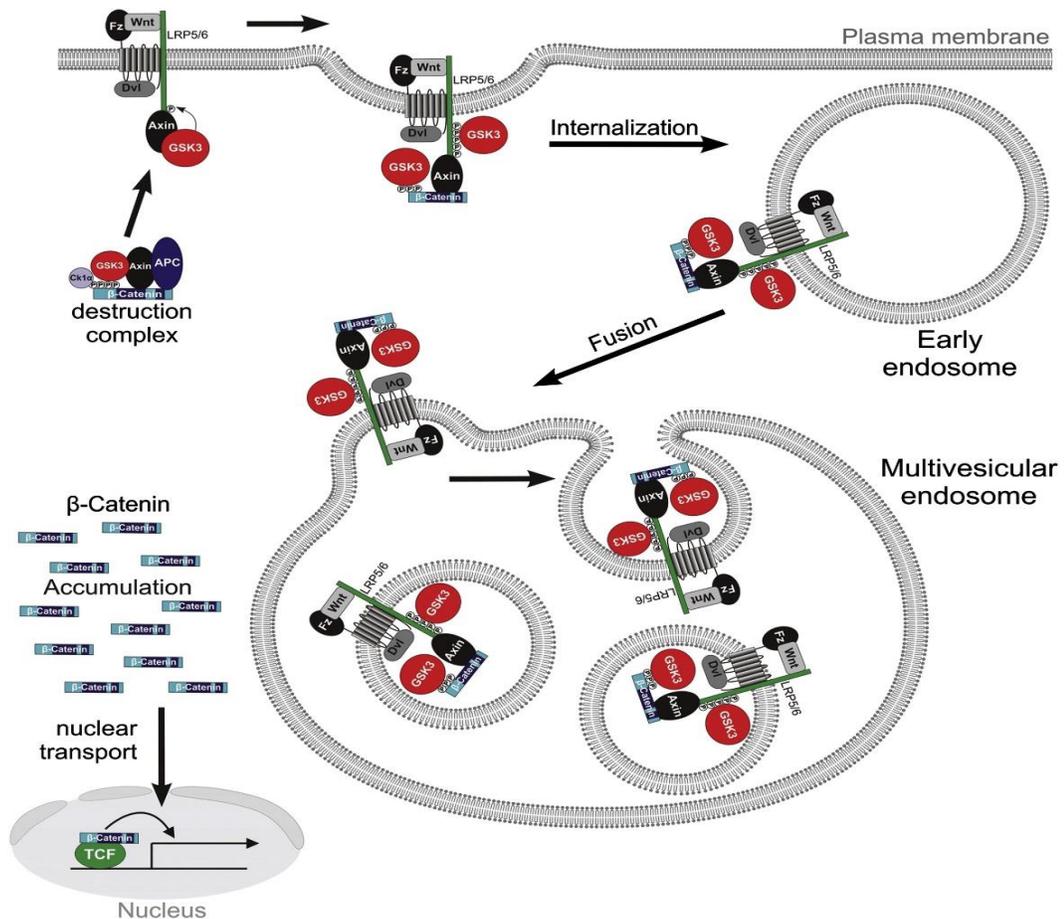


Figura 3. Modelo de secuestro de GSK-3 β en estructuras endosomales. Extraído de (Taelman et al. 2010).

Aún cuando el mecanismo de secuestro del complejo de destrucción de β -catenina ha sido descrito, el papel de los componentes regulatorios de la vía endocítica y del tráfico endosomal en la vía Wnt/ β -catenina, son todavía poco conocidos, y mucho menos se sabe acerca de la relevancia de este mecanismo y los componentes de tráfico endocítico en carcinogénesis oral.

1.4 PROTEÍNAS RAB: REGULADORAS DEL TRÁFICO ENDOSOMAL

Las proteínas Rabs son GTPasas pequeñas, las cuales se localizan en compartimientos intracelulares específicos, donde cumplen funciones claves en la regulación del tráfico endosomal, estando implicadas en la distribución de cargos, formación de vesículas, y eventos de fusión de membranas (Stenmark 2009). La proteína Rab5, en conjunto con Rab21 y Rab22, regulan la formación de endosomas tempranos. Por otra parte, Rab7 y Rab9 controlan la dinámica de los endosomas tardíos, mientras que Rab4 y Rab11 controlan los endosomas de reciclaje (Somsel Rodman and Wandinger-Ness 2000; Stenmark 2009). Estas GTPasas alternan entre dos estados, unidas a GTP (estado que se define como activo) permitiendo su unión con proteínas efectoras, o unidas a GDP en un estado inactivo (Stenmark 2009). Este cambio de conformación es regulado por dos grupos de proteínas: GEFs (*Guanosine nucleotide Exchange Factors*), que permiten el intercambio de GDP por GTP activando a la proteína Rab (Rab-GTP); y

GAPs (*GTPase Activating Proteins*), que provocan la hidrólisis rápida del GTP, llevando a la inactivación de la proteína Rab (Rab-GDP). Ambas proporcionan un sistema integrado en el control general del tráfico endosomal (Seabra and Wasmeier 2004; Stenmark 2009; Torres and Stupack 2011) (**Figura 4**).

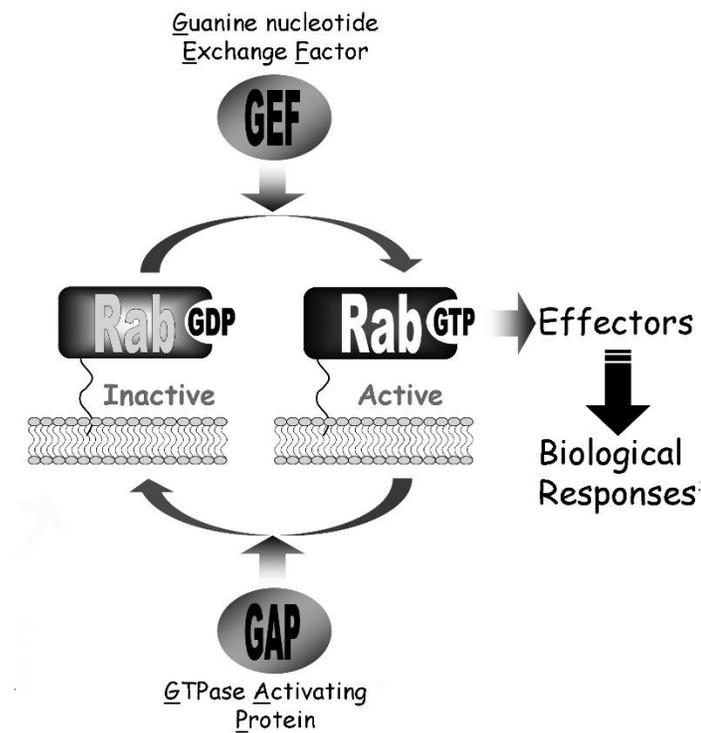


Figura 4. Ciclo de activación e inactivación de las proteínas Rab. Adaptado de (Torres and Stupack 2011).

En su estado activo unido a GTP las proteínas Rabs se localizan en las membranas intracelulares, donde pueden reclutar e interactuar con una variedad de proteínas conocidas como proteínas efectoras de Rabs (Grosshans et al. 2006). De hecho, es a través

de la unión a estos efectores, que las proteínas Rabs llevan a cabo sus múltiples roles en los eventos de tráfico endocítico. Rab5 es la proteína Rab que ha sido más ampliamente estudiada en la vía endocítica temprana, mientras que el antígeno endosomal temprano 1 (EEA1) es uno de sus efectores más conocidos, siendo considerado como un marcador convencional de endosomas tempranos, debido a su localización específica en este compartimento (Simonsen et al. 2001). De hecho, es a través de la unión a EEA1 que la GTPasa Rab5 regula aspectos como la fusión de las vesículas, el transporte mediado por proteínas motoras del citoesqueleto y la destinación hacia compartimientos específicos (Stenmark et al. 1994). Sin embargo, estudios realizados por diferentes grupos, incluyendo el nuestro, han demostrado que Rab5 además participa en diversos procesos alterados en cáncer, como mitosis (Lanzetti 2012), migración celular e invasión (Mendoza et al. 2014; Mendoza et al. 2013; Torres et al. 2010) y remodelamiento de la matriz extracelular (Diaz et al. 2014; Silva et al. 2016). Además, nuestro grupo ha demostrado que Rab5 es requerida para la proliferación y motilidad de células tumorales (Silva et al. 2015). Más aún, numerosos estudios sugieren que tanto la expresión, como la actividad de Rab5 podrían estar implicadas en el desarrollo de distintos tipos de cáncer, entre ellos cáncer de mama, melanoma, pulmón, páncreas e incluso COCE (da Silva et al. 2015; Johnson et al. 2015; Liu et al. 2015; Silva et al. 2016; Tzeng and Wang 2016; Yang et al. 2011; Yu et al. 2015). No obstante, la participación de Rab5 en displasia oral no ha sido investigada, así como tampoco se ha evidenciado a nivel mecanístico la relevancia de Rab5 en el

secuestro endosomal del complejo de destrucción de β -catenina.

En resumen, si bien existen estudios *in vitro* en modelos celulares que nos han permitido comprender el mecanismo que relaciona el tráfico endocítico con la activación de la vía Wnt/ β -catenina, no existen reportes de que este mecanismo esté implicado en el desarrollo de la displasia oral. Asimismo, tampoco se ha evaluado la relevancia del regulador maestro de la endocitosis, Rab5, en la activación de la vía Wnt/ β -catenina. Lo anterior cobra relevancia con el antecedente de que la expresión de Rab5 está aumentada en diversas neoplasias, incluyendo el COCE. Por lo tanto, este proyecto podría ser importante para la comprensión de cómo el tráfico endocítico se relaciona con la señalización Wnt canónica, induciendo la translocación nuclear de β -catenina y contribuyendo así a la progresión tumoral en etapas tempranas de la carcinogénesis oral.

En base a lo señalado anteriormente, se propone la siguiente hipótesis de trabajo:

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La activación de Rab5 promueve la translocación nuclear de β -catenina, a través del reclutamiento de su complejo de destrucción hacia endosomas tempranos en displasia oral.

3. OBJETIVOS DEL PROYECTO

3.1 Objetivo General

Determinar si la translocación nuclear de β -catenina en displasia oral depende de la activación de Rab5 y del reclutamiento del complejo de destrucción hacia endosomas tempranos.

3.2 Objetivos Específicos

1. Determinar el efecto de ligandos Wnt en la localización de β -catenina en células de displasia oral.
2. Analizar el efecto de la activación de Rab5 en la localización nuclear de β -catenina en células de displasia oral.
3. Determinar si la actividad de Rab5 es necesaria para el reclutamiento de componentes del complejo de destrucción de β -catenina hacia endosomas tempranos en células de displasia oral.
4. Evaluar la localización endosomal de GSK-3 β en biopsias de displasia oral con presencia nuclear de β -catenina.

4. DISEÑO EXPERIMENTAL

4.1 Objetivo Específico 1: Determinar el efecto de ligandos Wnt en la localización de β -catenina en células de displasia oral.

Estrategia Experimental: Se evaluó la localización subcelular (superficie, citoplasma, núcleo) de β -catenina total y no fosforilada Ser33/37/Thr41 (transcripcionalmente funcional) en células DOK (línea celular de displasia oral moderada) (Chang et al. 1992), mediante microscopía de fluorescencia confocal y fraccionamiento subcelular. El mismo procedimiento fue realizado en células OKF-6/TERT2 (línea celular de queratinocitos orales no tumorales inmortalizados con telomerasa) (Dickson et al. 2000) y CAL-27 (línea celular de carcinoma oral de células escamosas) (Gioanni et al. 1988), como control.

Las células DOK fueron tratadas con el inhibidor C-59, un potente inhibidor de la proteína Porcupine, la cual es indispensable para la palmitolación, secreción y actividad biológica de Wnt (Cheng et al. 2015; Herr and Basler 2012; Proffitt et al. 2013), con el fin de determinar si la localización nuclear de β -catenina se debe a la secreción de ligando Wnt en células DOK. Usando concentraciones crecientes del inhibidor C-59 (10 μ M, 30 μ M, 50 μ M), durante 72h, se determinaron los niveles proteicos de los ligandos Wnt 3a, Wnt 5a y Wnt 7b, a través de Western Blot. Adicionalmente, se evaluaron los niveles proteicos de Wnt 3a en medios condicionados de las células OKF-6, DOK y CAL-27.

Bajo las mismas condiciones en presencia de concentraciones crecientes del inhibidor se

analizó la localización subcelular (superficie, citoplasma, núcleo) de β -catenina total. Además, se evaluaron los niveles proteicos de β -catenina total, β -catenina no fosforilada, survivina y ciclina D1 a través de Western blot, en células DOK tratadas con el inhibidor C-59. Adicionalmente los niveles de ARNm de survivina y ciclina D1 fueron evaluados también en estas células a través de RT-qPCR.

De manera alternativa, las células OKF-6 fueron tratadas con medio condicionado obtenido de células DOK por 24h y posteriormente se detectó la localización subcelular (superficie, citoplasma, núcleo) de β -catenina total y la actividad transcripcional de β -catenina mediante el sistema de actividad reportera luciferasa, utilizando el plasmidio pTOP-FLASH, el cual codifica para el gen de la luciferasa precedido por un promotor con 3 sitios de unión a TCF/Lef en tándem, mientras que como control, se usó el plasmidio pFOP-FLASH, que contiene mutaciones puntuales en los sitios de unión a TCF/Lef (van de Wetering et al. 1997). Las determinaciones fueron realizadas en un luminómetro.

Del mismo modo, queratinocitos orales obtenidos a partir de cultivos primarios provenientes de donadores sanos, fueron tratados con medio condicionado de células DOK por 24h y posteriormente se detectó la localización subcelular (superficie, citoplasma, núcleo) de β -catenina total. Para determinar si la actividad transcripcional de β -catenina depende de la secreción de ligandos Wnt derivados de células DOK, las células OKF-6 se trataron con medios condicionados a partir de células DOK tratadas con el inhibidor C-59 o con DMSO (control). En paralelo, las células OKF-6 también se

sometieron al tratamiento con el inhibidor C-59 y DMSO, y se utilizaron sus medios condicionados como control.

Por último, se utilizaron biopsias diagnosticadas con displasia oral severa y muestras de mucosa oral sana para determinar la localización subcelular de la β -catenina y la expresión de Wnt3a a través de la inmunofluorescencia.

4.2 Objetivo específico 2: Analizar el efecto de la activación de Rab5 en la localización nuclear de β -catenina en células de displasia oral.

Estrategia Experimental: Se evaluó la fracción activa de Rab5 mediante ensayo de precipitación por afinidad de Rab5-GTP (Pull-Down) en células DOK y OKF-6 (Torres et al. 2008). Para evaluar el efecto de la activación de Rab5 en la localización nuclear de β -catenina, las células DOK fueron transfectadas con plasmidios que codifican GFP-Rab5/S34N (mutante inactiva, Rab5-GDP). Esta mutante inactiva, contiene un residuo serina mutada a una asparagina (S34N), y de esta forma la proteína tiene una afinidad por el GDP que es 100 veces mayor que por el GTP. La caracterización bioquímica de esta mutante ha sido descrita en (Bucci et al. 1992; Stenmark et al. 1994). Paralelamente las células fueron transfectadas con los mismos plasmidios, para luego realizar inmunofluorescencia, fraccionamiento subcelular y evaluar la localización subcelular de β -catenina, además de western blot para evaluar los niveles de survivina y ciclina D1.

La actividad transcripcional de β -catenina fue evaluada mediante el sistema pTOP-FLASH (descrito anteriormente) en células OKF-6 transfectadas previamente con los plasmidios que codifican GFP-Rab5/S34N y GFP, y luego sometidas al medio condicionado de células DOK por 24 hrs.

4.3 Objetivo específico 3: Determinar si la actividad de Rab5 es necesaria para el reclutamiento de componentes del complejo de destrucción de β -catenina hacia endosomas tempranos en células de displasia oral.

Estrategia Experimental: Se realizaron análisis de co-localización mediante inmunofluorescencia confocal de proteínas claves del complejo de destrucción de β -catenina tales como Wnt 3a, GSK-3 β , APC y Axina, con respecto a la proteína efectora de Rab5, EEA1, en células DOK transfectadas con plasmidios que codifican GFP-Rab5/S34N y GFP.

4.4 Objetivo específico 4: Evaluar la localización endosomal de GSK-3 β en biopsias de displasia oral con presencia nuclear de β -catenina

Estrategia Experimental: En biopsias de pacientes diagnosticados con displasia oral severa y mucosa oral sana se determinó la presencia nuclear de β -catenina y **paralelamente, en otro corte seriado**, se determinó la co-localización entre GSK-3 β y EEA1

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 REACTIVOS

En el desarrollo de este trabajo se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti- β -catenina monoclonal (M3539) de DAKO (DAKO, USA). Anti- β -catenina no fosforilada Ser33/37/Thr41 monoclonal (88145) de Cell Signaling Technology. Anti-Wnt3 (sc-74537), Wnt5a (sc-365370), Ciclina D1 (sc-246), Survivina (sc-17779), GAPDH (sc-365062), anti-Rab5 monoclonal (sc-46692), anti-EEA1 (sc33585), Axina (2B11), APC (F-3), e Histona H-3 (AH3-120) fueron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-Wnt7b (AF3460) de R&D systems. Anti-Wnt3a (ab219412) fue obtenido de Abcam (Cambridge, UK), Vimentina (377M-16) y Citoqueratina AE1/AE3 (313M-16) fueron obtenidos de Cell Marque (St Louis, MO). Anti GSK-3 β (7/ GSK-3 β) fue obtenido de Bioscience (Bioscience Laboratories). Alexa-Fluor-488 y Alexa-Fluor-568 conjugados con anticuerpos secundarios fueron obtenidos de Invitrogen (Carlsbad, CA). Anticuerpos anti-conejo y anti-ratón acoplados a peroxidasa de rábano (HRP) fueron obtenidos de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). El medio de cultivo, los antibióticos y el suero bovino fetal fueron de Corning Mediatech. El reactivo de transfección (Lipofectamine 2000), fue obtenido desde Invitrogen (Carlsbad, CA). Las perlas de Glutación-Sefarosa provienen de GE Healthcare (Piscataway, NJ). El sustrato de quimioluminiscencia EZ-ECL provienen de Pierce Chemical (Rockford, IL).

5.2 CULTIVO CELULAR

La línea celular comercial de displasia oral, DOK (dysplastic oral keratinocytes), fue obtenida de Sigma-Aldrich y mantenida en medio DMEM-high glucose, suplementado con los antibióticos penicilina 10,000 U/ml y estreptomicina 10 µg/ml, 20% de Suero Fetal Bovino (SFB) y 25 µl de hidrocortisona. Las células fueron incubadas a 37°C y 5% CO₂.

La línea celular comercial de queratinocitos orales, OKF6/TERT2 fue donada por la Dra. Denisse Bravo de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y fue cultivada en medio KFSM, suplementado con los antibióticos penicilina 10,000 U/ml y estreptomicina 10 µg/ml, más 25 mg/500mL de extracto de pituitaria de bovino, 2,5 ng/500mL factor de crecimiento epidermal y 0.3 mM CaCl₂. Las células fueron incubadas a 37°C y 5% CO₂.

La línea celular comercial de cáncer oral de células escamosas, CAL-27 fue obtenida desde la ATCC y mantenida en medio DMEM-high glucose, suplementado con los antibióticos penicilina 10,000 U/ml y estreptomicina 10 µg/ml y 10% de SFB. Las células fueron incubadas a 37°C y 5% CO₂.

5.3 CULTIVO PRIMARIO DE QUERATINOCITOS ORALES

Las células se obtuvieron de tejidos de mucosa oral humana sana de sujetos donantes. El consentimiento informado se obtuvo antes de la recolección de las muestras de tejido, y este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología,

Universidad de Chile (documento Anexo). Los tejidos fueron tratados con tripsina (0,25%) y posteriormente desintegrados y cultivados en medio libre de suero de queratinocitos (KSFM; GIBCO, Carlsbad, CA, EE. UU.), suplementados con los antibióticos penicilina 10,000 U/ml y estreptomina 10 µg/ml, extracto de pituitaria bovina y factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (K-SFM kit) y CaCl₂ 0.3 mM. La contaminación por fibroblastos se eliminó rutinariamente del cultivo de queratinocitos mediante tripsinización (tripsina al 0,05%/EDTA al 0,02%). Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂, según lo descrito previamente (Leelahavanichkul and Gutkind 2013).

5.4 PLASMIDIOS Y TRANSFECCIONES

Las células fueron transfectadas con los plasmidios pEGFP-C1 que codifican GFP y GFP-Rab5/S34N (mutante inactiva, Rab5-GDP). Las transfecciones se llevaron a cabo utilizando Lipofectamina 2000® (Invitrogen) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. En cada condición se utilizó 1 µg de DNA por 1x10⁶ células. Los plasmidios fueron incubados durante 20 minutos con lipofectamina 2000 en medio Opti-MEM (LifeTechnologies), a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas con PBS y se les agregó medio Opti-MEM, de manera que posteriormente, la mezcla de DNA plasmidial-lipofectamina fue agregada a las células mediante goteo utilizando una micropipeta, e incubadas durante 3 horas a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente, se extrajo el

medio de transfección y se adicionó medio de cultivo completo (suplementado con SFB al 10%).

5.5 INHIBIDOR WNT-C59

El inhibidor de Porcupine C-59 (Calbiochem, Cat: 5.00496.0001) se diluyó en DMSO para obtener una solución stock de 10 mM. Se utilizaron concentraciones de 10 μ M, 30 μ M y 50 μ M como soluciones de trabajo en ensayos *in vitro* en células DOK.

5.6 SDS-PAGE Y WESTERN BLOT

Para la detección de proteínas desde extractos totales, las células fueron lavadas 3 veces con PBS frío. Luego, sobre hielo, se agregó 60 μ l de solución para lisis T-PER™ (ThermoFisher Scientific) suplementado con inhibidores de proteasas (1 mM PMSF y BAL; Benzamida 10 μ g/ml, Antipaina 2 μ g/ml, Leupeptina 1 mM) y tirosina-fosfatasa (Ortovanadato de sodio 1 mM) por placa de 35 mm. La lisis de las células se completó raspando la placa con un rastrillo plástico. Posteriormente, las células lisadas en solución fueron transferidas a tubos cónicos de 1,5 ml y centrifugadas a 12,000 RPM durante 10 min a 4°C, para remover remanentes de membranas celulares. Se rescató el sobrenadante y se cuantificó utilizando el método colorimétrico de Bradford. En breve, la técnica consistió en mezclar 100 μ l de solución Bradford 1X (a partir de un *stock* comercial 5X; BioRad) y 5 μ l de lisis celular, durante 5 min a temperatura ambiente. Se determinó la

absorbancia de las muestras utilizando un espectrofotómetro de cubetas plásticas, para luego interpolar los valores en una curva de calibración previamente determinada. Después de cuantificar las muestras, se les adicionó tampón Laemmli a partir de un *stock* 4X (SDS 2%p/v; Glicerol 10%v/v; Tris-HCl 62,5 mM pH 6.8, β -Mercaptoetanol 5%v/v; azul de Bromofenol 0,01%p/v) y se incubaron durante 10 min a 100°C en placa calefactora. Posteriormente, los extractos de proteínas totales se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE). Las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas con gelatina de piel de pescado al 5% en 0,1% Tween-TBS y luego incubadas con anticuerpos. Los anticuerpos primarios fueron detectados con anticuerpos secundarios conjugados con la enzima peroxidasa de rábano (HRP) utilizando el sistema de quimioluminiscencia EZ-ECL.

5.7 INMUNOFLUORESCENCIA EN LINEAS CELULARES

Las células fueron crecidas sobre cubreobjetos de vidrio y luego fijadas con paraformaldehído al 4%, durante 15 minutos. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS y permeabilizadas con Tritón X-100 al 0,1% en PBS durante 15 minutos, lavadas 3 veces y luego bloqueadas, incubándolas con seroalbúmina de bovino (BSA) al 5%, durante 30 minutos. Las células fueron incubadas con anticuerpos primarios, seguido de la incubación con los respectivos anticuerpos secundarios acoplados a molécula

fluorescente, y posterior montaje utilizando el medio de montaje DAKO. Las muestras fueron visualizadas mediante microscopía, usando un microscopio confocal C2 Plus Nikon.

5.8 FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

Para la detección de proteínas nucleares y citoplasmáticas mediante fraccionamiento subcelular, se cultivaron las células en una placa de cultivo de 100 mm en una incubadora a 37°C suministrada con un 5% de CO₂, hasta obtener un 75% de confluencia. Posteriormente se lavaron 2 veces con PBS frío y se agregó inmediatamente 500 µl de Buffer de Fraccionamiento (BF) (250 mM de Sucrosa, 20mM Hepes (pH 7.4), 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM DTT, más inhibidores de proteasas), en seguida se recolectaron las células en un tubo eppendorf de 1,5 ml. El homogenizado celular se agitó a 4°C por 30 minutos a 30-50 rpm. Posteriormente se centrifugó a 720x g a 4°C por 5 minutos. Se lavó el pellet con 500 µl de BF y se centrifugó nuevamente a 720x g a 4°C por 10 minutos. Se removió el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo, obteniendo la fracción citosólica y de membrana. El pellet se resuspendió en 500 µl Buffer de Lisis Nuclear (50 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0,5% desoxicolato de sodio, 0,1% SDS), el cual se incubó durante 15 minutos a 4°C, obteniendo la fracción nuclear.

5.9 TRANSCRIPCIÓN INVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA TIEMPO REAL (qRT-PCR)

El ARN total fue extraído utilizando TRIZOL® (Invitrogen, Life Technologies) desde células crecidas en placas de cultivo de 6 cm. Posteriormente el ARN fue precipitado con isopropanol y lavado con etanol 75% para eliminar impurezas. Finalmente, el material fue resuspendido en 50 µl de agua libre de nucleasas.

Tratamiento con DNAsa y obtención de cDNA a partir de ARN total. El ARN se sometió a un tratamiento con el Kit DNAsa de Promega®, incubando la muestra con la enzima DNAsa por 30 minutos a 37°C, luego la actividad de la enzima fue detenida con una solución STOP presente en el kit. Posteriormente, el ARN total fue cuantificado y se determinó su pureza mediante la razón 260nm/280nm, utilizando el lector de microplacas Cytation (BioTek Instruments).

Posteriormente se preparó la reacción de master mix 2x para la transcripción inversa (RT) con un volumen final por muestra de 10 µl, utilizando buffer 10x RT, dNTPs mix 100mM, partidores aleatorios 10x y agua libre de nucleasas. Luego se preparó 2 µg de ARN en 10µl de agua libre de nucleasas, para mezclarlo con 10 µl de la reacción de RT, los que fueron sometido a 25°C x 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 84°C por 5 minutos y finalmente a 4°C, obteniendo el cDNA como indica el protocolo del fabricante (Applied Biosystem ®).

PCR en tiempo real (qRT-PCR)

Posterior a la síntesis de cDNA se realizó la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real utilizando el equipo Applied Biosystems más el kit SYBR green (Life Technologies), calculando la abundancia relativa de los genes. Los productos de PCR fueron generados utilizando las siguientes secuencias:

Survivina	Fw 5' GCTTCGCTGGAAACCTCTGGA-3'
	Rv 5'-TCTGGGCAGATGGCTGTTGG-3'
Ciclina D1	Fw 5'-CCACCTGTCCCACTCCTACGAT-3'
	Rv 5'-GCAGGGCCGTTGGGTAGAAA-3'
GAPDH	Fw 5'ACCCACTCCTCCACCTTTGA-3'
	Rv 5'CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT-3'

5.10 ENSAYO DE GEN REPORTERO

Medición de la Actividad Transcripcional de TCF/Lef. Se utilizó el sistema de actividad reportera luciferasa basado en el plasmidio pTOP-FLASH, el cual codifica para el gen de la luciferasa precedido por un promotor con 3 sitios de unión a TCF/Lef en tándem, mientras que como control, se usó el plasmidio pFOP-FLASH, que contiene mutaciones puntuales en los sitios de unión a TCF/Lef (van de Wetering et al. 1997). El vector constitutivamente activo que codifica para Renilla Luciferasa (Promega, Madison, WI,

USA) fue usado como control de transfección.

Las células fueron transfectadas con 1µg de uno u otro plasmidio, según sea el caso, y después de 24h, las células fueron homogenizadas en un buffer conteniendo 0.1 M KH_2PO_4 (pH 7,9), 1 mM DTT, 0,5% Triton X-100, y posteriormente se agregó 50 µl de tampón KTME (Tris HCl 100 mM pH 7,8; MgSO_4 10 mM; EDTA 2 mM) con los sustratos luciferina 0,073 mM y ATP 5,5 µM. La actividad luciferasa fue cuantificada en un luminómetro.

5.11 ENSAYO DE PRECIPITACIÓN POR AFINIDAD DE RAB5-GTP

Las células fueron homogenizadas en una solución isotónica de HEPES 25 mM (pH 7,4), NaCl 100 mM, MgCl_2 5 mM, NP-40 1%, glicerol 10%, DTT 1 mM y una mezcla de inhibidores de proteasas. Los extractos fueron centrifugados a 13,000 rpm durante 1 min a 4°C. Los sobrenadantes fueron utilizados para ensayos de precipitación por afinidad (pull-down) utilizando perlas de Glutathion-Sepharosa precubiertos con GST-R5BD (previamente descrito en (Torres et al. 2008)). Las perlas fueron incubadas con los sobrenadantes por 15 min a 4°C en un agitador rotatorio. Posteriormente, las perlas fueron colectadas por centrifugación (3,6 rpm, 30 segundos), lavadas 3 veces con solución tampón y fueron solubilizadas en tampón de Laemmli de carga de proteínas, incubados por 5 minutos a 100°C y separadas mediante SDS-PAGE para análisis por Western blot.

5.12 PROCESAMIENTO DE BIOPSIAS EN BLOQUES DE PARAFINA

Se seleccionaron biopsias en bloques de parafina con diagnóstico histopatológico de displasia oral severa, provenientes del Servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile, lo cual fue aprobado por el Comité de Ética, de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile (documento anexo). Posteriormente a cada molde seleccionado, se le realizó un corte de 3 μm , con navajas de corte para tejidos blandos marca Feather®, en un micrótomos marca E. Leitz Wetzlar. Posteriormente, los cortes fueron colocados en baño de estirado marca Labline® a 38°C; y fueron recogidos en portaobjetos con carga positiva (Laboratorio Cellpath, Inglaterra) y secados a 60°C por 30 min en estufa marca Memmert® (previamente descrito en (Reyes et al. 2015)).

5.13 INMUNOFLUORESCENCIA EN TEJIDOS INCLUIDOS EN PARAFINA

Las secciones de 3 μm de biopsias en bloques de parafina fueron desparafinadas en xilol y rehidratadas en alcoholes descendentes hasta el agua destilada. Las secciones se colocaron en Tris-EDTA 1mM, pH 8.0, durante 15 min a 95°C, para la recuperación antigénica, y posteriormente fueron lavadas con buffer fosfato salino (PBS) durante 5 min. Luego, las muestras fueron permeabilizadas con Tritón X-100 al 0,3% en PBS durante 15 minutos, lavadas 2 veces y bloqueadas con seroalbúmina de bovino (BSA) al 5% durante 30 minutos. Las muestras fueron incubadas con anticuerpos primarios, seguido de la incubación con los respectivos anticuerpos secundarios acoplados a sonda fluorescente

(Alexa Flúor) y posterior montaje utilizando el medio de montaje DAKO. Las muestras fueron visualizadas mediante microscopía, usando un microscopio confocal C2 Plus Nikon.

5.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresaron como el promedio \pm error estándar (ES) de al menos 3 experimentos independientes. Las pruebas para estimar diferencias estadísticas en las distintas condiciones se analizaron mediante las pruebas t Student para comparar dos grupos y el análisis de varianza (ANOVA) en la comparación de más de tres grupos si las muestras tuvieron distribución normal. De forma contraria, se analizaron mediante la prueba de Mann Whitney si se compararon dos grupos y la prueba Kruskal wallis en la comparación de más de tres grupos, si las muestras no tuvieron distribución normal. Un valor $p < 0,05$ fue considerado como estadísticamente significativo. Los datos se analizaron mediante el programa Stata 11.0.

6. RESULTADOS

6.1 OBJETIVO ESPECÍFICO N°1:

DETERMINAR EL EFECTO DE LIGANDOS WNT EN LA LOCALIZACIÓN DE β -CATENINA EN CÉLULAS DE DISPLASIA ORAL.

6.1.1 Las células de displasia oral DOK presentan un aumento en la localización nuclear de β -catenina en relación a queratinocitos orales y células de carcinoma oral.

Se determinó la localización subcelular de β -catenina total y de β -catenina no fosforilada Ser33/37/Thr41 (transcripcionalmente funcional) a través de inmunofluorescencia en células OKF-6 (queratinocitos orales inmortalizados), DOK (displasia oral) y CAL-27 (carcinoma oral). Las células DOK presentaron principalmente localización nuclear de β -catenina total y no fosforilada, en comparación a las células OKF-6, que presentaron principalmente una localización en superficie celular, mientras que en células CAL-27, ésta fue mayoritariamente citoplasmática (**Figuras 5A, 6A**). Se realizó una cuantificación, determinando el número de células con localización nuclear positiva a través del programa Image J (3 experimentos independientes; 100 células por experimento). Las células DOK presentaron un 96% de localización nuclear de β -catenina total y un 92% de β -catenina no fosforilada, en comparación a las células OKF-6 y CAL-27 las cuales sólo presentaron un 8% y 31% de localización nuclear de la proteína

total respectivamente, y un 7% y un 29% de la proteína no fosforilada respectivamente (**Figuras 5B, 6B**). Además se realizó fraccionamiento subcelular, determinando un mayor enriquecimiento de β -catenina total y de β -catenina no fosforilada en fracciones nucleares de células DOK en comparación a las células OKF-6 y CAL-27 (**Figura 7A**). Complementariamente se realizó un Western Blot de extractos de proteínas totales para la detección de β -catenina total en células DOK, OKF-6 y CAL-27, observándose que las tres líneas celulares presentaron niveles similares de β -catenina total (**Figura 7B**).

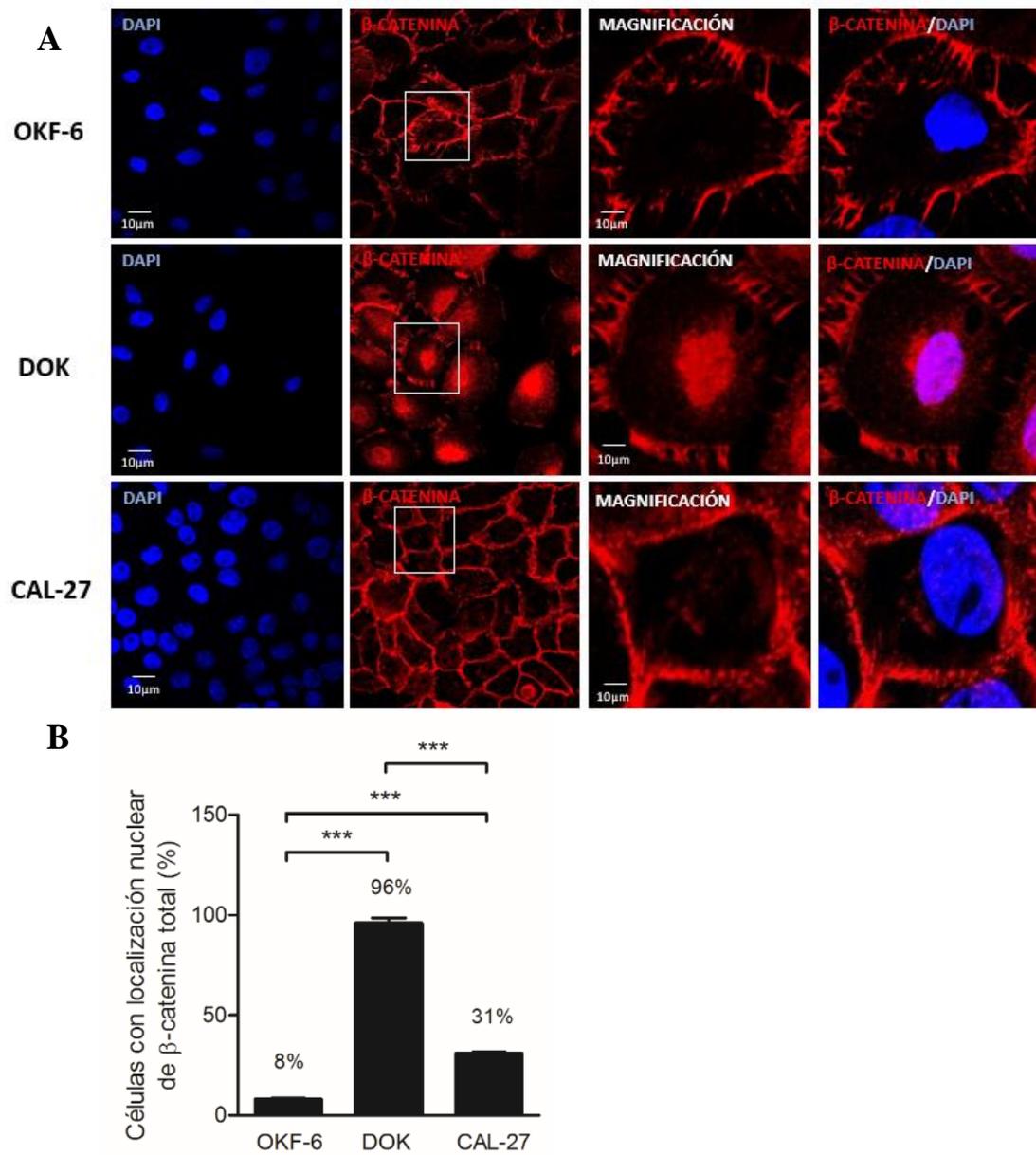


Figura 5. Localización subcelular de β-catenina total. (A) Inmunofluorescencia para β-catenina total en células DOK, OKF-6 y CAL-27 (En cada caso se presenta una imagen representativa de microscopía confocal capturada a 60X). (B) Promedio de células con localización nuclear de β-catenina total (cuantificación a través del programa Image J). El gráfico muestra el promedio ± el error estándar de 3 experimentos independientes (one-way ANOVA; *** = $p \leq 0.001$).

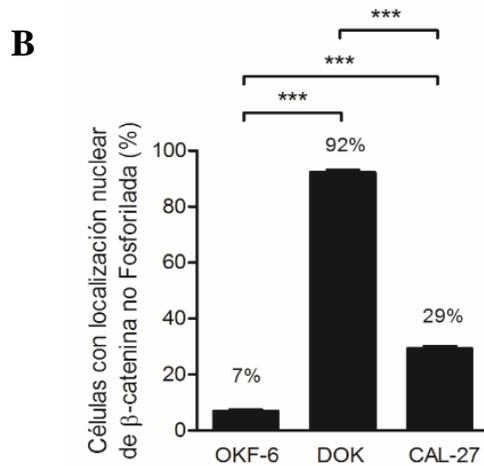
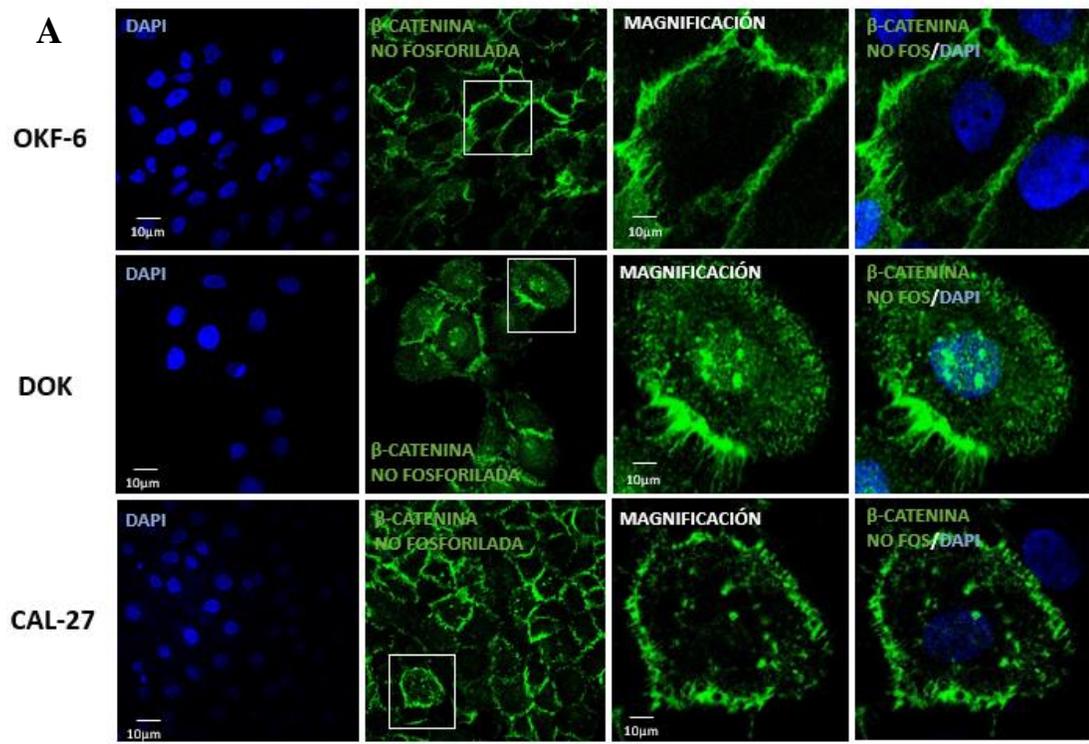


Figura 6. Localización subcelular de β -catenina no fosforilada. (A) Inmunofluorescencia para β -catenina no fosforilada en células DOK, OKF-6 y CAL-27 (En cada caso se presenta una imagen representativa de microscopía confocal capturada a 60X). (B) Promedio de células con localización nuclear de β -catenina no fosforilada (cuantificación a través del programa Image J). El gráfico muestra el promedio \pm el error estándar de 3 experimentos independientes (one-way ANOVA; *** = $p \leq 0.001$).

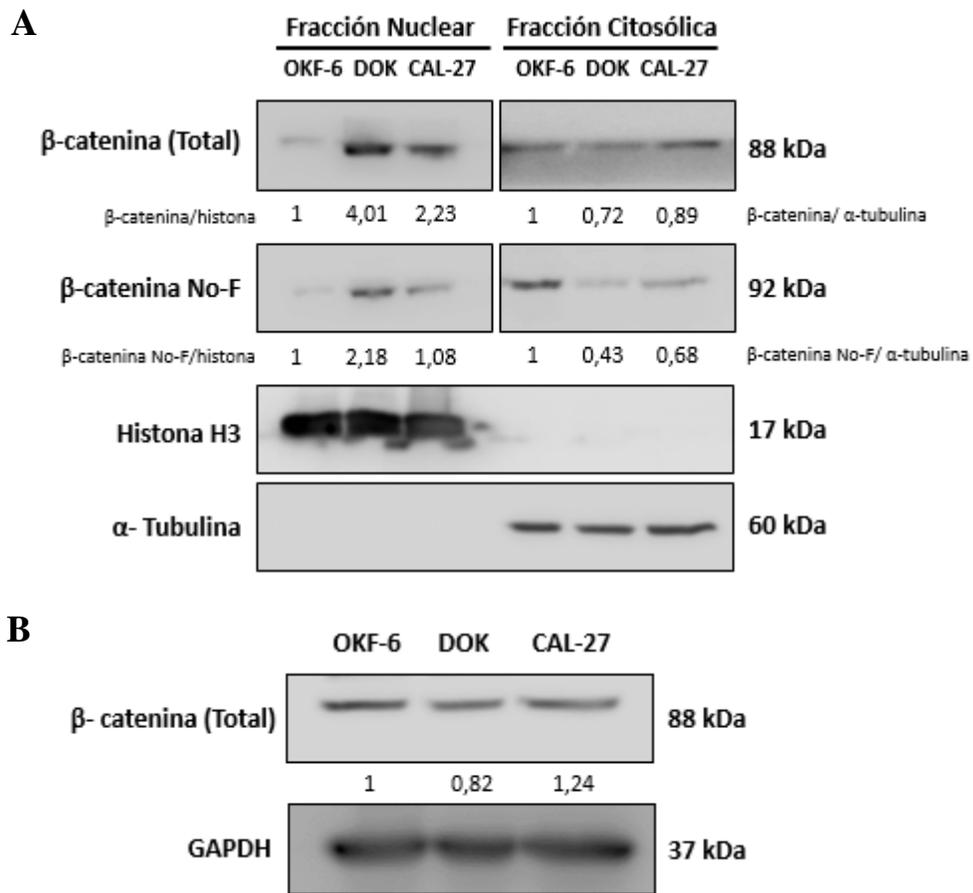


Figura 7. Detección de β-catenina. (A) Detección de β-catenina total y de β-catenina no fosforilada en fracciones nucleares y citoplasmáticas en células DOK, OKF-6 y CAL-27. Imagen representativa de dos experimentos independientes. (B) Detección de β-catenina total en células DOK, OKF-6 y CAL-27. Imagen representativa de dos experimentos independientes.

6.1.2 Las células displásicas orales secretan niveles más altos de Wnt 3a en relación con los queratinocitos orales.

Con el fin de determinar si la localización nuclear de β -catenina se debe a la secreción de ligando Wnt, las células DOK fueron tratadas con concentraciones crecientes del inhibidor de porcupine, C-59, un potente inhibidor de la palmitolación, secreción y actividad biológica de Wnt (Cheng et al. 2015; Herr and Basler 2012; Proffitt et al. 2013). Usando concentraciones crecientes del inhibidor C-59 (10 μ M, 30 μ M, 50 μ M) durante 72h, se obtuvieron los medios condicionados de células DOK para determinar los niveles proteicos de los ligandos Wnt 3a, Wnt 5a y Wnt 7b a través de Western Blot (**Figura 8A**). Los resultados mostraron niveles más altos de Wnt 3a en el medio condicionado de las células DOK no tratadas con el inhibidor de C-59 en comparación con las células tratadas en las diferentes concentraciones. Por el contrario, no se observaron cambios en los niveles de Wnt 5a y Wnt 7b en presencia del inhibidor (**Figura 8B**). Adicionalmente, se compararon los niveles proteicos de Wnt 3a en medios condicionados obtenidos de células OKF-6, DOK y CAL-27, observándose que las células DOK secretaron mayores niveles de Wnt3a en comparación a las células OKF-6 (**Figura 8C**). A su vez ambos tipos celulares secretaron niveles sustancialmente menores que las células CAL-27 (**Figura 8C**).

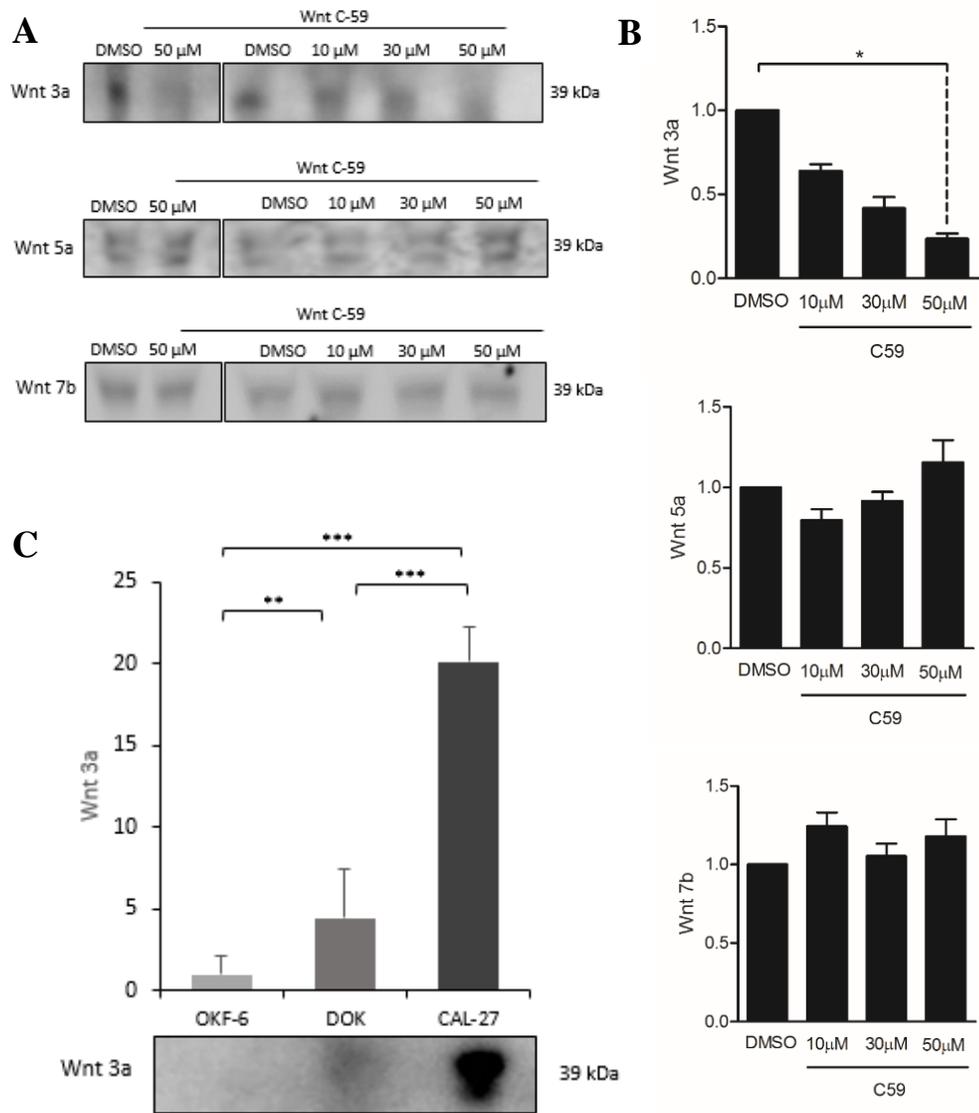


Figura 8. Presencia de ligandos Wnt en medio condicionado de células DOK. (A) Detección de Wnt 3a, Wnt 5a y Wnt 7b en medios condicionados de células DOK tratadas con el inhibidor C-59. (B) Cuantificación de los niveles de Wnt 3a, Wnt 5a y Wnt 7b en medios condicionados de células DOK tratadas con el inhibidor C-59 a través de western blot. Los gráficos muestran el promedio \pm el error estándar de 3 experimentos independientes (one-way ANOVA; * = $p \leq 0.05$). (C) Expresión de Wnt 3a en medios condicionados de células OKF-6, DOK y CAL-27. EL gráfico muestra el promedio \pm el error estándar de 3 experimentos independientes (one-way ANOVA; *** = $p \leq 0.001$; ** = $p \leq 0.01$).

6.1.3 La localización nuclear de β -catenina y la expresión de genes diana requieren de la secreción de Wnt en células de displasia oral.

Las células DOK fueron tratadas con concentraciones crecientes del inhibidor, C-59, (10 μ M, 30 μ M, 50 μ M) durante 72h y posteriormente se analizó la localización subcelular (superficie, citoplasma, núcleo) de β -catenina total. Se observó que la mayor concentración del inhibidor (50 μ M) causó una pérdida en la localización nuclear de β -catenina a las 72h (**Figura 9A**), experimento del cual se cuantificó el número de células con localización nuclear positiva a través del programa Image J (3 experimentos independientes; 100 células por experimento). Las células tratadas con el inhibidor C-59 a una concentración de 50 μ M, presentaron un menor número de células con localización nuclear de β -catenina (58%), en comparación con las células tratadas con DMSO que presentaron un 94% de localización nuclear de la proteína (**Figura 9B**). Por otro lado, utilizando estas mismas condiciones, se determinaron los niveles de β -catenina total y β -catenina no fosforilada, además de proteínas diana de la vía de Wnt/ β -catenina, como Ciclina D1 y Survivina, a través de western blot (**Figura 10A**). De esta forma, se observaron cambios significativos en los niveles proteicos de β -catenina no fosforilada, Ciclina D1 y Survivina, los cuales disminuyeron a una mayor concentración de C-59 en comparación con las células DOK tratadas con DMSO (**Figura 10B**). Estas observaciones fueron además apoyadas a nivel de ARNm, ya que tanto Ciclina D1, como Survivina

presentaron una disminución en sus niveles bajo la condición con C-59 a 30 μ M y 10 μ M respectivamente, según lo observado a través de RT-qPCR (**Figura 10C**).

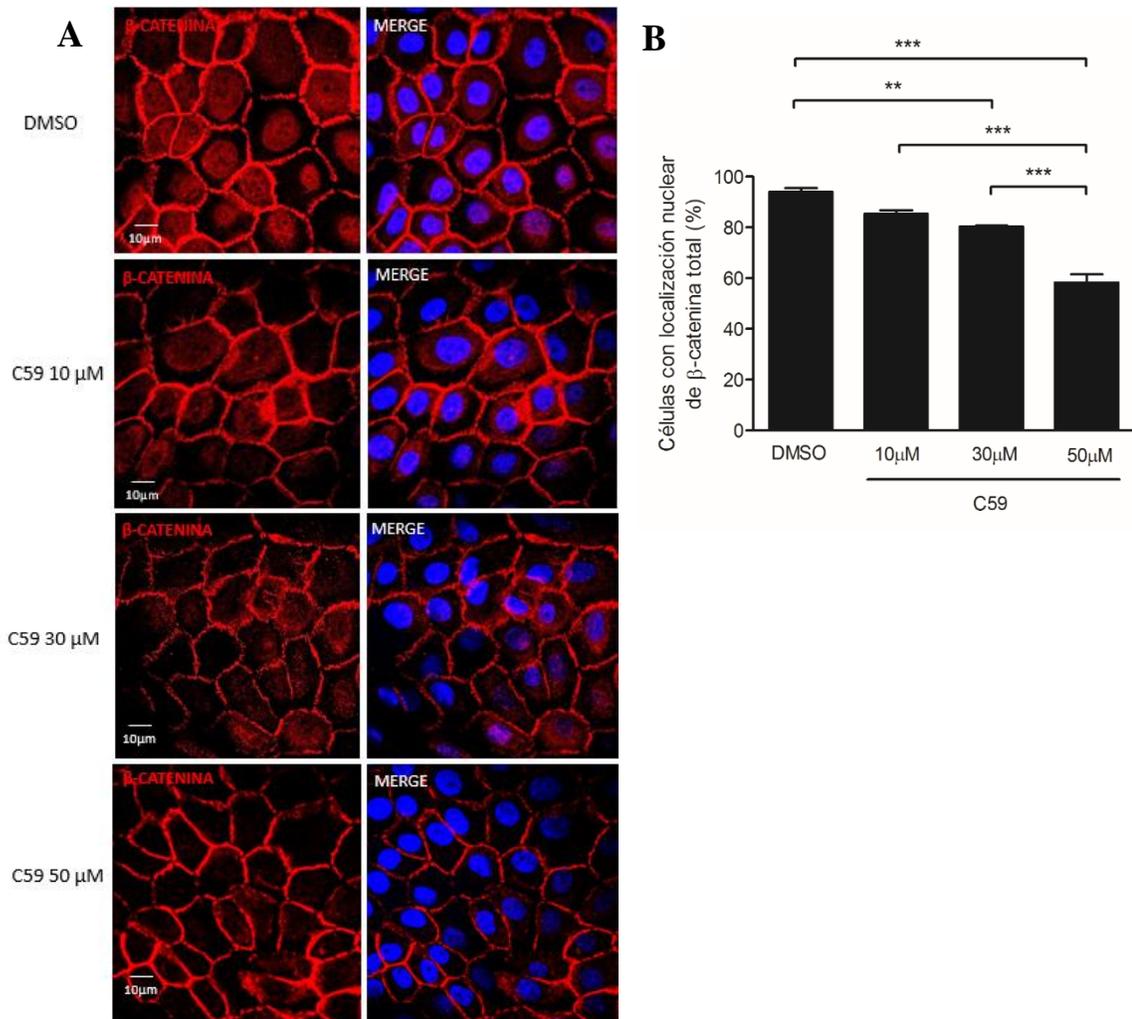


Figura 9. Uso del inhibidor C-59 en células DOK (A) Localización subcelular de β -catenina total en células DOK tratadas con C-59 (en cada caso se presenta una imagen representativa de microscopía confocal capturada a 60X). **(B)** Promedio de células con localización nuclear de β -catenina total para las condiciones tratadas y no tratadas con C-59, a distintas concentraciones (cuantificación a través del programa Image J). El gráfico muestra el promedio \pm el error estándar de 3 experimentos independientes (one-way ANOVA; *** = $p \leq 0.001$; ** = $p \leq 0.01$).

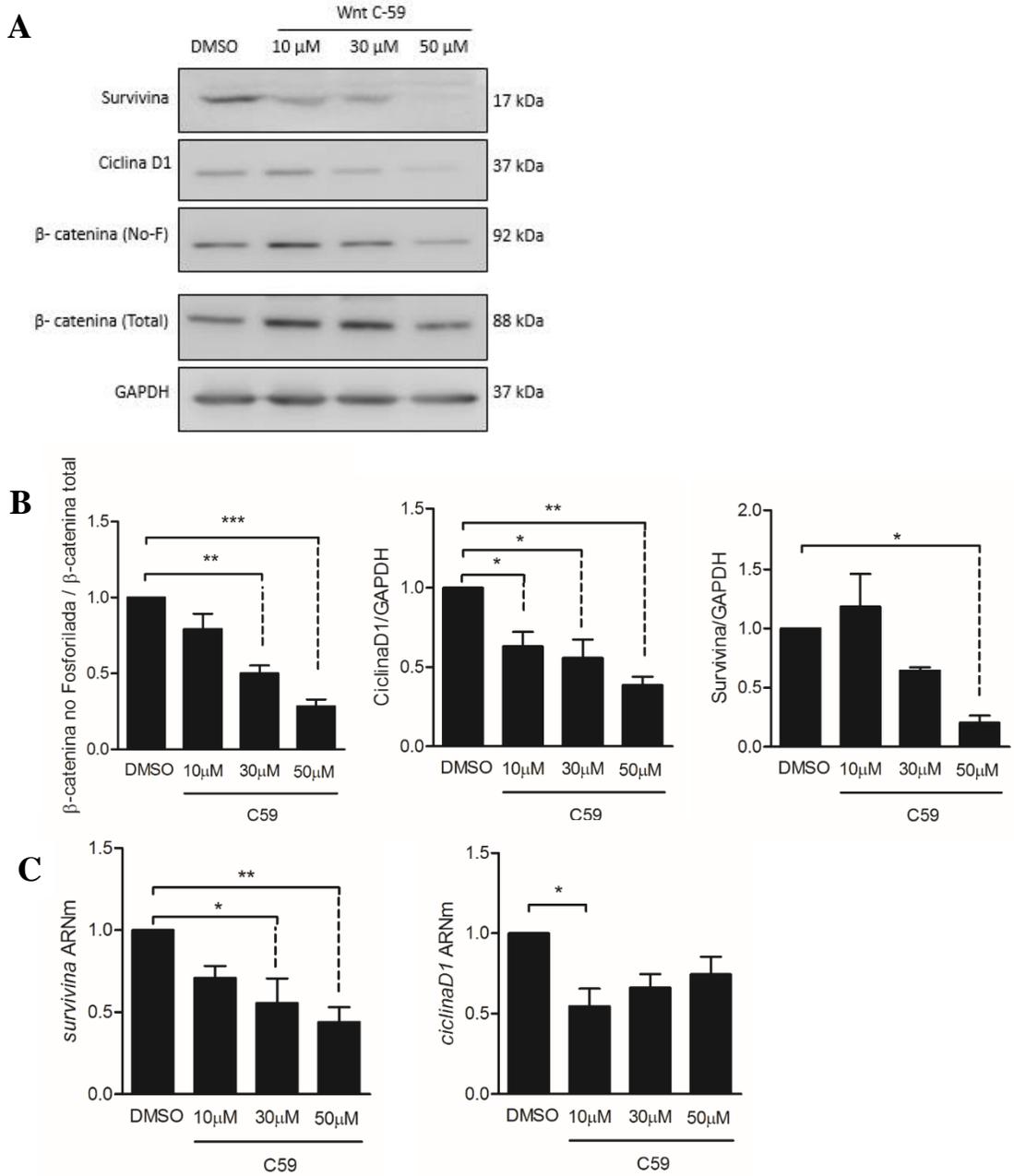


Figura 10. Expresión de Survivina y Ciclina D1 en células DOK tratadas con C-59. (A-B) Niveles proteicos de β -catenina no fosforilada, Ciclina D1 y Survivina en células DOK tratadas con C-59 a distintas concentraciones mediante western blot. (C) Análisis mediante RT- qPCR, para los niveles de ARNm de Survivina y Ciclina D1, después del tratamiento con C-59. Los gráficos muestran el promedio \pm el error estándar de 3 experimentos independientes (one-way ANOVA; *** = $p \leq 0.001$; ** = $p \leq 0.01$; * = $p \leq 0.05$).

6.1.4 El ligando Wnt derivado de células de displasia oral induce la transcripción dependiente de β -catenina en queratinocitos orales.

Teniendo en cuenta los resultados anteriormente señalados, se planteó un experimento en donde las células OKF-6 fueron expuestas por 24h al medio condicionado de células DOK, de manera de evaluar por inmunofluorescencia la localización subcelular de β -catenina. Los resultados mostraron que un porcentaje sustancialmente mayor de células expuestas al medio condicionado presentan localización nuclear de β -catenina, en comparación con las células OKF-6 expuestas al medio control (**Figura 11A**). Las células se cuantificaron determinando el número de células con localización nuclear positiva a través del programa Image J (3 experimentos independientes, 50 células por experimento). La cuantificación indicó que el número de células positivas con localización nuclear de β -catenina aumentó significativamente frente al tratamiento con medio condicionado de DOK (50%), en comparación con la condición medio control (12%) (**Figura 11B**).

Por otro lado, para evaluar si los cambios en la localización nuclear de β -catenina se correlacionaban con cambios en su actividad transcripcional, se realizaron ensayos TCF/Lef en células OKF-6 tratadas con medio condicionado de células DOK. Para ello las células OKF-6 fueron tranfectadas con plasmidios pTOP-FLASH (gen de la luciferasa precedida por 3 sitios de unión a TCF/Lef en tándem) o pFOP-FLASH (vector control, sitios de unión a TCF/Lef mutados) descritos previamente (van de Wetering et al. 1997)

y luego fueron tratadas con medio condicionado de células DOK durante 24h, para efectuar los ensayos de actividad reportera de TCF/Lef. Con este ensayo, se observó un aumento en la actividad luciferasa en células OKF-6 expuestas al medio condicionado de células DOK durante 24h, en comparación a las células OKF-6 expuestas al medio control (**Figura 11C**).

Finalmente, para determinar si la actividad transcripcional de β -catenina inducida por el medio condicionado de células DOK en células OKF-6 (**Figura 11C**) depende de la secreción de ligandos Wnt derivados de células DOK, se recurrió nuevamente al inhibidor C-59. Específicamente, células OKF-6 fueron expuestas a medios condicionados obtenidos de células DOK tratadas con el inhibidor C-59 o DMSO (control). En paralelo, las células OKF-6 también fueron expuestas al inhibidor C-59 o DMSO, y se utilizaron sus medios condicionados como control. De esta forma, se observó que el tratamiento de células OKF-6 con medio condicionado de células DOK expuestas a DMSO, aumenta la actividad luciferasa, mientras que el medio condicionado de células DOK expuestas a C-59 no fue capaz de aumentar la actividad luciferasa en células OKF-6 (**Figura 12**). Importantemente, como control el medio condicionado derivado de células OKF-6 tuvo una disminución marginal en su estimulación sobre la actividad luciferasa, cuando estas células fueron expuestas a C-59 (**Figura 12**).

Para descartar que estos efectos sean asociados al uso de líneas celulares, se usaron queratinocitos orales provenientes de cultivos primarios de donantes sanos, en los cuales

primeramente se realizó una caracterización por inmunofluorescencia para determinar su inmunofenotipo epitelial, evaluando la expresión de citoqueratina, E-cadherina, β -catenina no fosforilada y vimentina. Sólo los queratinocitos orales mostraron expresión de citoqueratina, E-cadherina y β -catenina no fosforilada, en comparación con los fibroblastos orales, que solo mostraron expresión de vimentina (**Figura 13**). Posteriormente, los queratinocitos orales de cultivo primario se trataron con medio condicionado de células DOK durante 24h para determinar la localización subcelular de β -catenina. Los queratinocitos orales tratados con medio condicionado de células DOK mostraron principalmente localización nuclear de β -catenina en comparación con los queratinocitos no tratados (**Figura 14**).

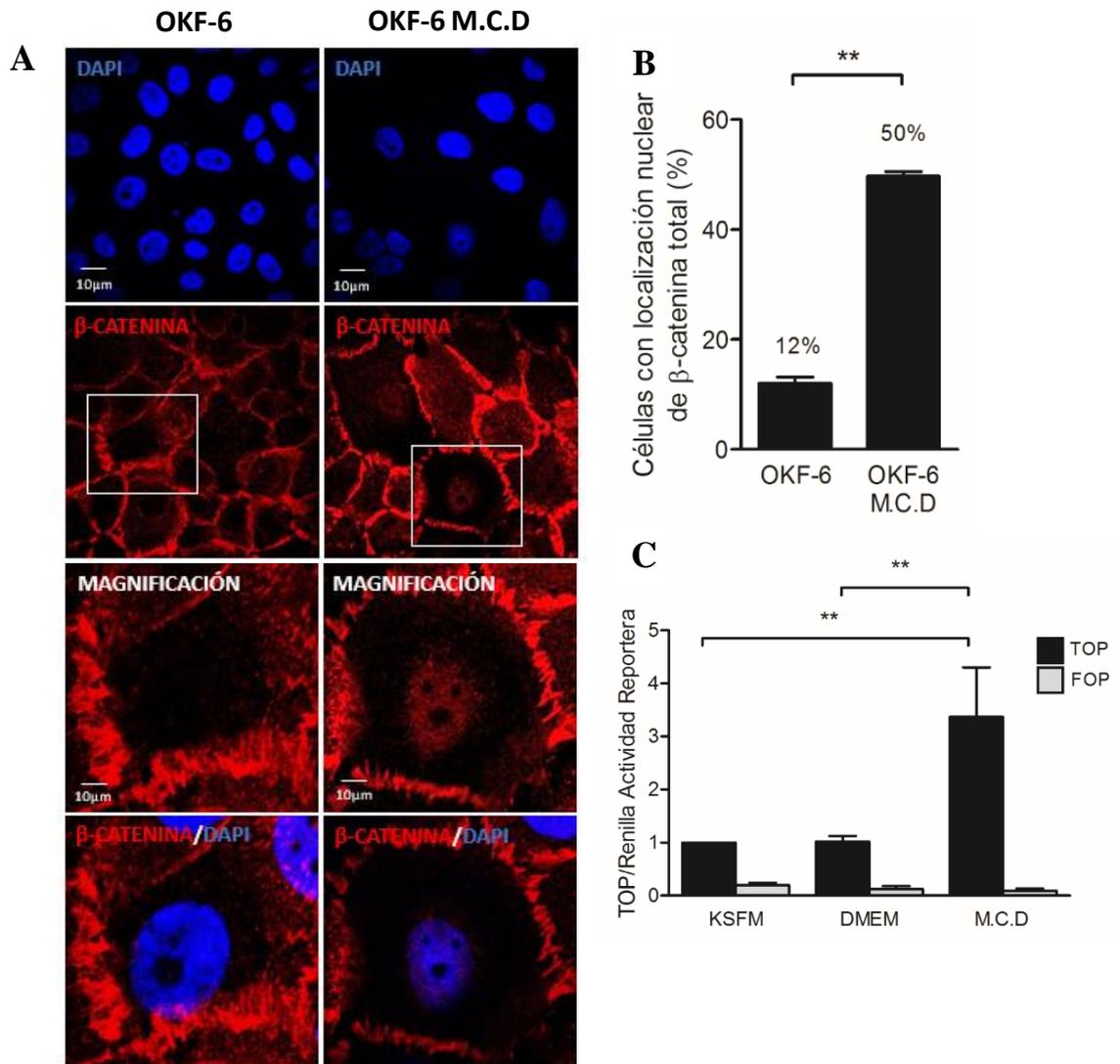


Figura 11. Localización y actividad transcripcional de β -catenina en queratinocitos orales tratados con medio condicionado de células DOK (A) Inmunofluorescencia de β -catenina total en células OKF-6 tratadas con medio condicionado de células DOK (M.C.D) durante 24h (en cada caso se presenta una imagen representativa de microscopía confocal capturada a 60X) (B) Promedio de células OKF-6 con localización nuclear de β -catenina total tratadas con M.C.D durante 24h (cuantificación a través del programa Image J). El gráfico muestra el promedio \pm el error estándar de 3 experimentos independientes (ttest; ** = $p \leq 0.01$). (C) Actividad transcripcional de β -catenina en células OKF-6 tratadas con M.C.D. El gráfico muestra el promedio \pm el error estándar de 3 experimentos independientes (one-way ANOVA ** = $p \leq 0.01$). KSFM = Medio de cultivo para queratinocitos. DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium. M.C.D = Medio condicionado de DOK.

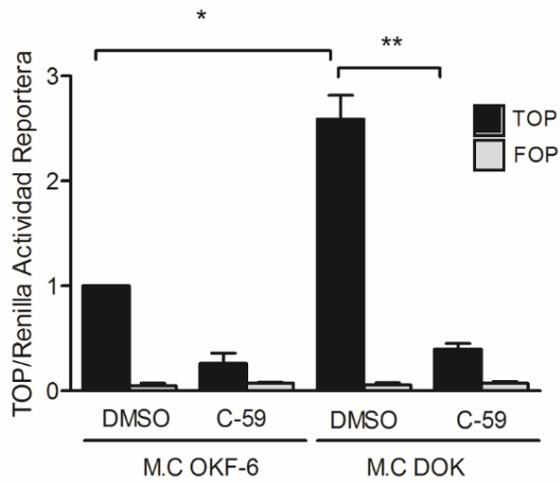


Figura 12. Actividad transcripcional de β -catenina en queratinocitos orales tratados con C-59 Actividad transcripcional de β -catenina en células OKF-6 tratadas ya sea con medio condicionado (M.C) de células OKF-6 (en presencia o ausencia del inhibidor C-59) y M.C de células DOK (en presencia o ausencia del inhibidor C-59). El gráfico muestra el promedio \pm el error estándar de 3 experimentos independientes (oneway ANOVA ** = $p \leq 0.01$, * = $p \leq 0.05$).

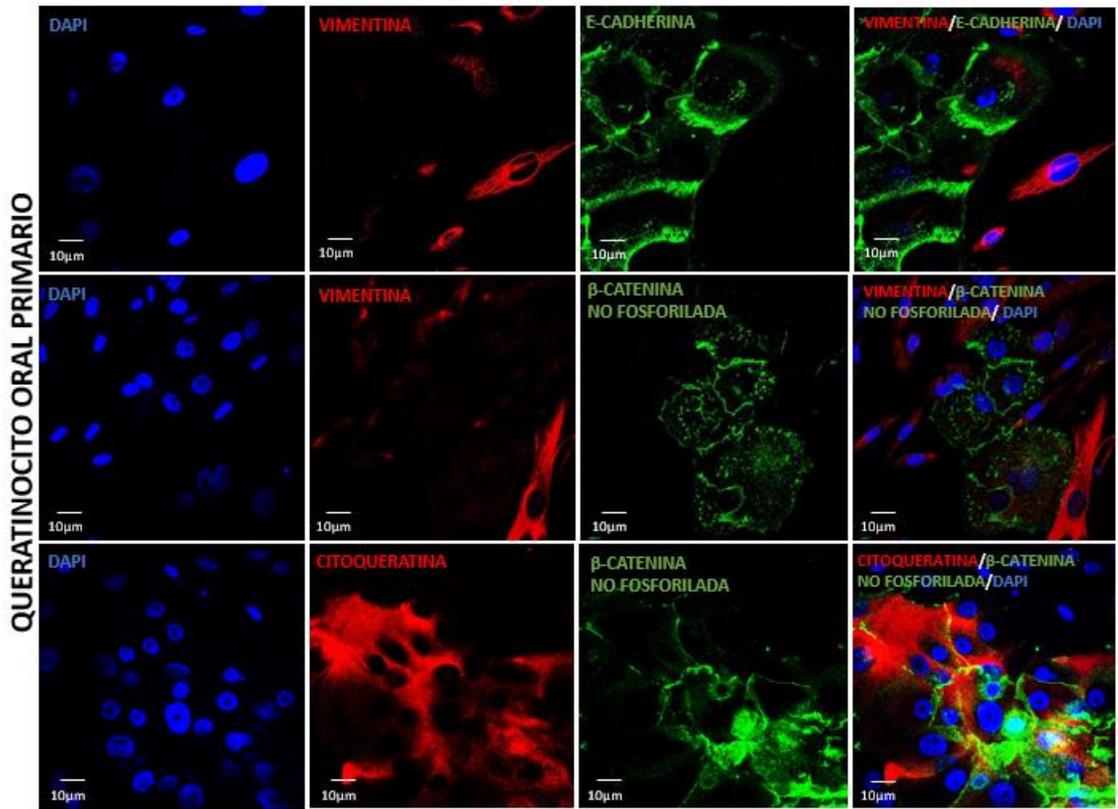


Figura 13. Caracterización de queratinocitos orales primarios. Inmunofluorescencia para Citoqueratina, β -catenina no fosforilada, E-cadherina y Vimentina en queratinocitos orales provenientes de cultivo primario. Se muestra una imagen representativa de cada caso mediante microscopía confocal capturada a 60X.

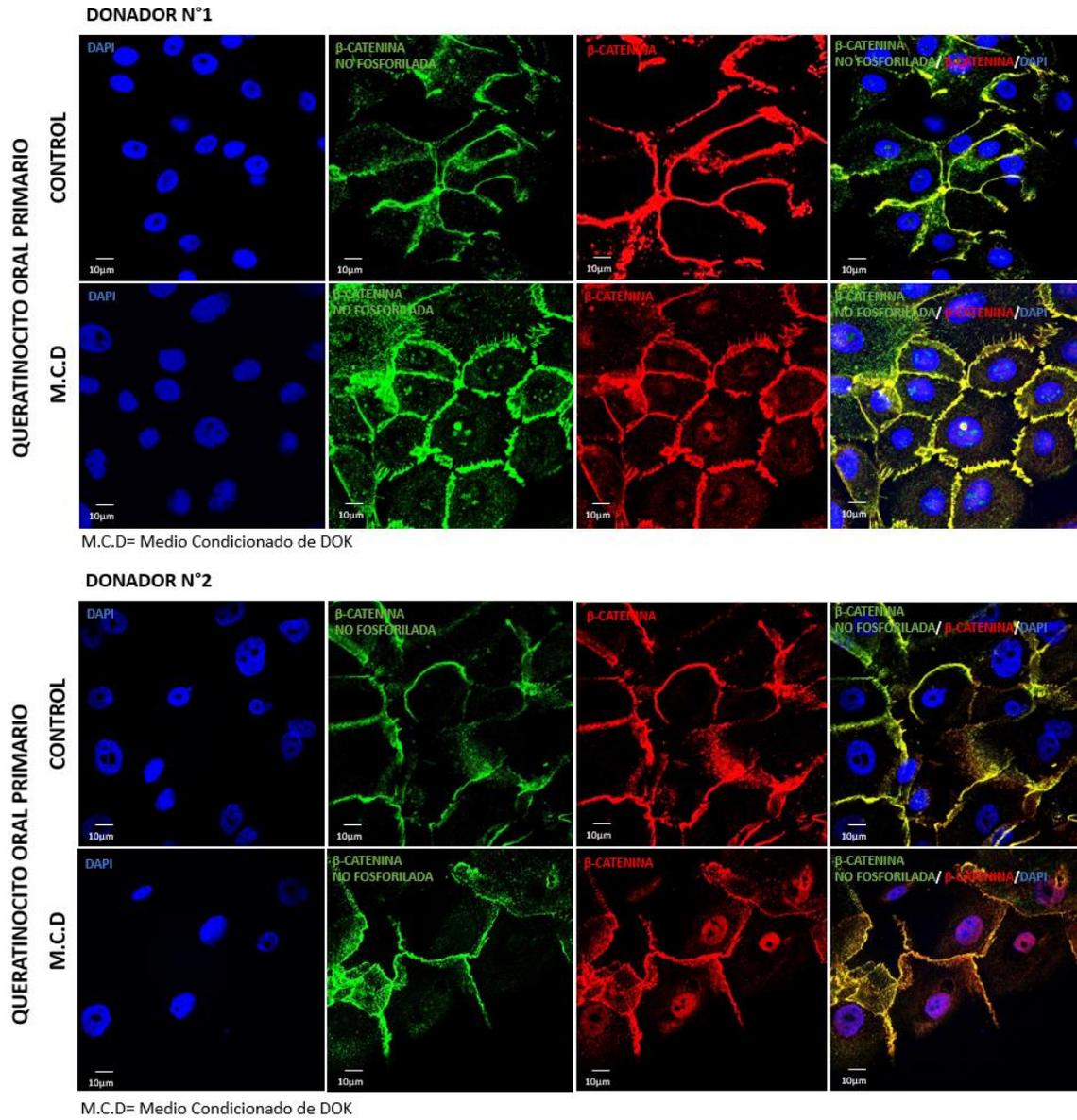


Figura 14. Localización de β -catenina en queratinocitos orales primarios tratados con medio condicionado de células DOK (M.C.D) Inmunofluorescencia para β -catenina no fosforilada y β -catenina total en queratinocitos orales primarios tratados con M.C.D durante 24 h Se muestra una imagen representativa de cada caso mediante microscopía confocal capturada a 60X

6.1.5 Biopsias de tejido con diagnóstico histopatológico de displasia oral severa muestran presencia nuclear de β -catenina, simultáneamente con un aumento en la expresión de Wnt 3a.

La localización subcelular de β -catenina (membrana, citoplasma, núcleo) y la expresión de Wnt3a se determinaron en 10 muestras diagnosticadas con displasia oral severa y 3 muestras de mucosa oral sana a través de inmunofluorescencia. Las muestras de displasia oral severa mostraron localización nuclear de β -catenina en conjunto con un aumento en la expresión de Wnt3a, en comparación con las muestras de mucosa oral sanas, donde se observó presencia membranosa de β -catenina, en conjunto con una expresión menor de Wnt3a (**Figura 15**).

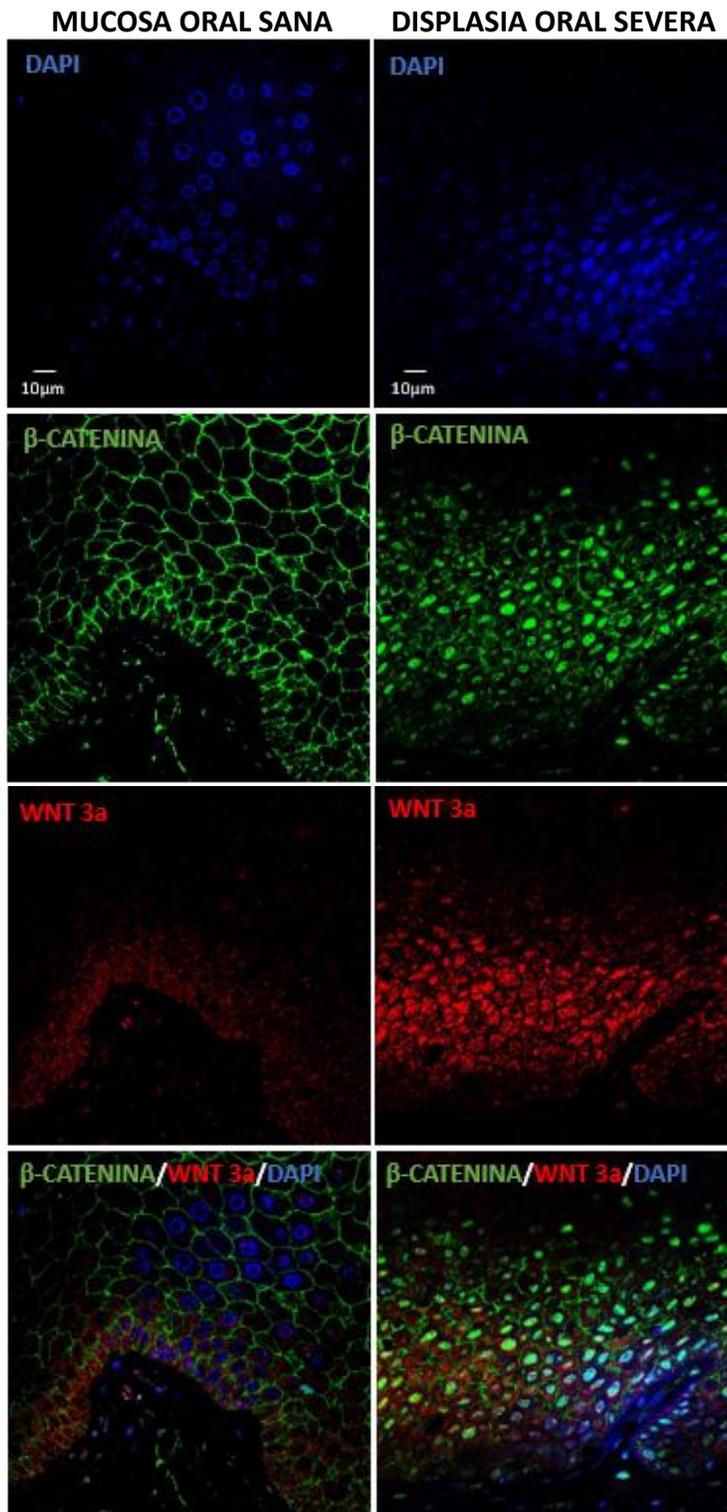


Figura 15. Inmunofluorescencia de β -catenina y Wnt3a. Localización de β -catenina y presencia de Wnt3a en biopsias de tejidos de displasia oral severa y mucosa oral sana. Se realizó inmunofluorescencia utilizando anticuerpo primario anti- β -catenina y anti-Wnt 3a. Se muestra una imagen representativa de cada caso, mediante microscopía confocal capturada a 60X.

6.1.6 CONCLUSIÓN OBJETIVO ESPECÍFICO N°1

En resumen, estos resultados demuestran que la localización nuclear de β -catenina, en conjunto con la expresión de proteínas y ARNm de genes dianas de la vía Wnt/ β -catenina, dependen de la secreción de ligando Wnt en células de displasia oral.

6.2 OBJETIVO ESPECÍFICO N°2:

ANALIZAR EL EFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE RAB5 EN LA LOCALIZACIÓN NUCLEAR DE β -CATENINA EN CÉLULAS DE DISPLASIA ORAL.

6.2.1 La expresión de una mutante inactiva de Rab5 inhibe la translocalización nuclear de β -catenina en células de displasia oral.

Primeramente, y para estimar los niveles basales de Rab5-GTP en nuestro modelo de estudio, se realizaron ensayos de precipitación por afinidad, utilizando la proteína de fusión GST-R5BD, en células OKF-6 y DOK, ambas en condiciones basales. De esta forma, se observaron mayores niveles de Rab5-GTP en células DOK, en comparación a las células OKF-6 (**Figura 16**). Con este antecedente, se procedió a analizar el efecto de la activación de Rab5 en la localización nuclear de β -catenina en células de displasia oral. Para eso, las células DOK fueron transfectadas con la mutante inactiva GFP-Rab5/S34N y paralelamente, como control, se realizó la transfección con un plasmidio que codifica para GFP, de manera que posteriormente se realizó inmunofluorescencia para evaluar la localización de β -catenina. Las células DOK transfectadas con GFP presentaron mayoritariamente localización nuclear de β -catenina, similar a lo observado en condiciones no tratadas (**Figura 5A**), mientras que las células transfectadas con GFP-Rab5/S34N, presentaron una disminución significativa en la localización nuclear de β -catenina (**Figura 17A**). Se realizó una cuantificación, determinando el número de

células con localización nuclear de β -catenina a través del programa Image J (3 experimentos independientes), determinando que el 93% de las células DOK transfectadas con GFP presentaron localización nuclear de β -catenina, en comparación a las células transfectadas con GFP-Rab5/S34N, donde se observó sólo un 11% de tinción nuclear de β -catenina (**Figura 17B**). Estos datos fueron además corroborados en ensayos de fraccionamiento subcelular, donde se observó un menor enriquecimiento de β -catenina total en fracciones nucleares de células DOK transfectadas con la mutante inactiva GFP-Rab5/S34N, en comparación a células DOK transfectadas con GFP (**Figura 18**), demostrando de esta forma que la activación de Rab5 es necesaria para la localización nuclear de β -catenina, y que por el contrario, la expresión de una mutante inactiva de Rab5 inhibe la translocalización nuclear de β -catenina en células de displasia oral. Paralelamente, se determinó si la actividad de Rab5 tiene efectos en la expresión de proteínas codificadas por genes diana de β -catenina, como Survivina y Ciclina D1, usando la estrategia de transfección. De esta forma, se observó una disminución parcial, pero significativa de los niveles proteicos de Survivina y Ciclina D1, cuando las células DOK fueron transfectadas con la mutante inactiva GFP-Rab5/S34N (**Figura 19A-B**).

Estos resultados sugieren, no solamente un efecto potencial de la activación de Rab5 en la localización subcelular de β -catenina, sino también, la posible participación de esta GTPasa en la actividad transcripcional de β -catenina en células de displasia oral.

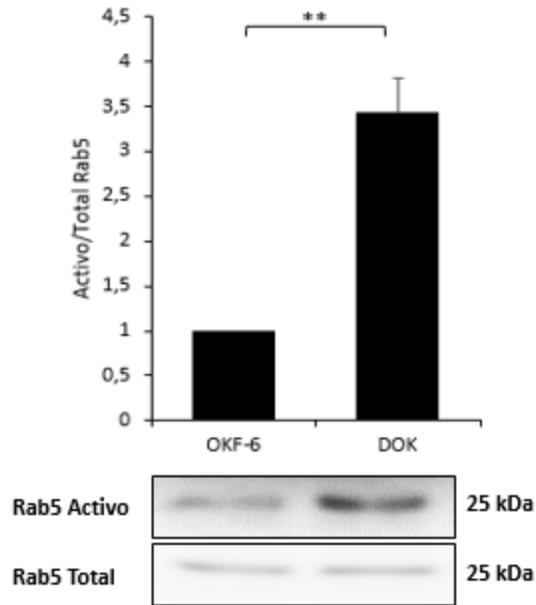


Figura 16. Actividad de Rab5 en células de displasia oral. Se realizó una precipitación por afinidad utilizando la proteína de fusión GST-R5BD para obtener la fracción activa de Rab5 (Rab5-GTP) en células OKF-6 y DOK. Los datos graficados corresponden a la normalización de la razón de Rab5-GTP/Rab5-Total, la cual fue obtenida mediante análisis densitométrico. Se presenta una imagen representativa de Western blot. El gráfico muestra el promedio \pm el error estándar de 4 experimentos independientes (ttest; ** = $p \leq 0.01$).

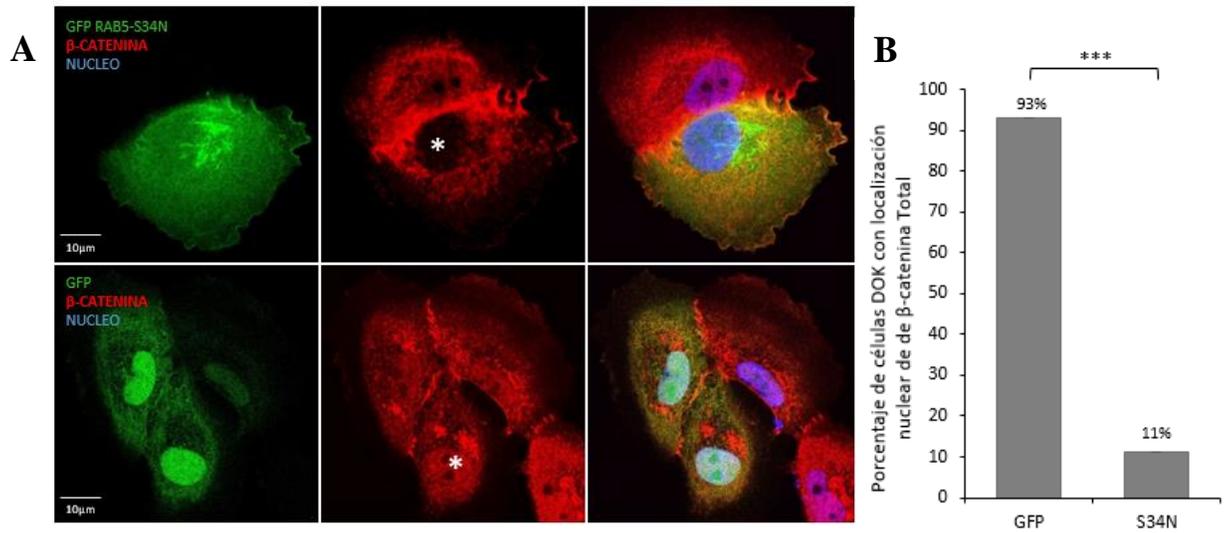


Figura 17. Efecto de la activación de Rab5 en la localización nuclear de β-catenina (A) Las células DOK fueron transfectadas con un vector de expresión para la proteína GFP y GFP-Rab5/S34N, posteriormente se realizó inmunofluorescencia, utilizando anticuerpo primario anti-β-catenina. Las imágenes fueron capturadas a 60X mediante microscopía confocal. Las células transfectadas fueron estudiadas utilizando como referencia la marca verde (GFP) para el cuerpo celular, y posteriormente la marca roja para establecer cambios en la localización nuclear de β-catenina. Los asteriscos indican la posición del núcleo. **(B)** Promedio de células transfectadas con el plasmidio GFP-Rab5/S34N y GFP que presentan localización nuclear de β-catenina total (cuantificación a través del programa Image J). El gráfico muestra el promedio ± el error estándar de 3 experimentos independientes (t-test; *** = $p \leq 0.001$)

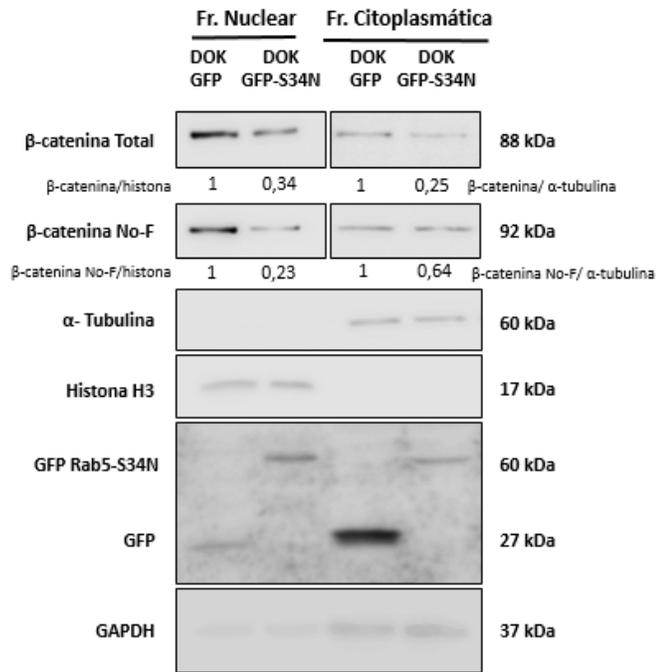


Figura 18. Detección de β-catenina en fracciones subcelulares. Detección de β-catenina total y de β-catenina no fosforilada en fracciones nucleares y citoplasmáticas en células DOK transfectadas con el plasmidio GFP-Rab5/S34N o con el plasmidio GFP. Para el western blot se usaron anticuerpos específicos contra β-catenina total y de β-catenina no fosforilada, α-tubulina (marcador citosólico), histona H3 (marcador nuclear) y GFP (control de transfección). La imagen es representativa de 2 experimentos independientes.

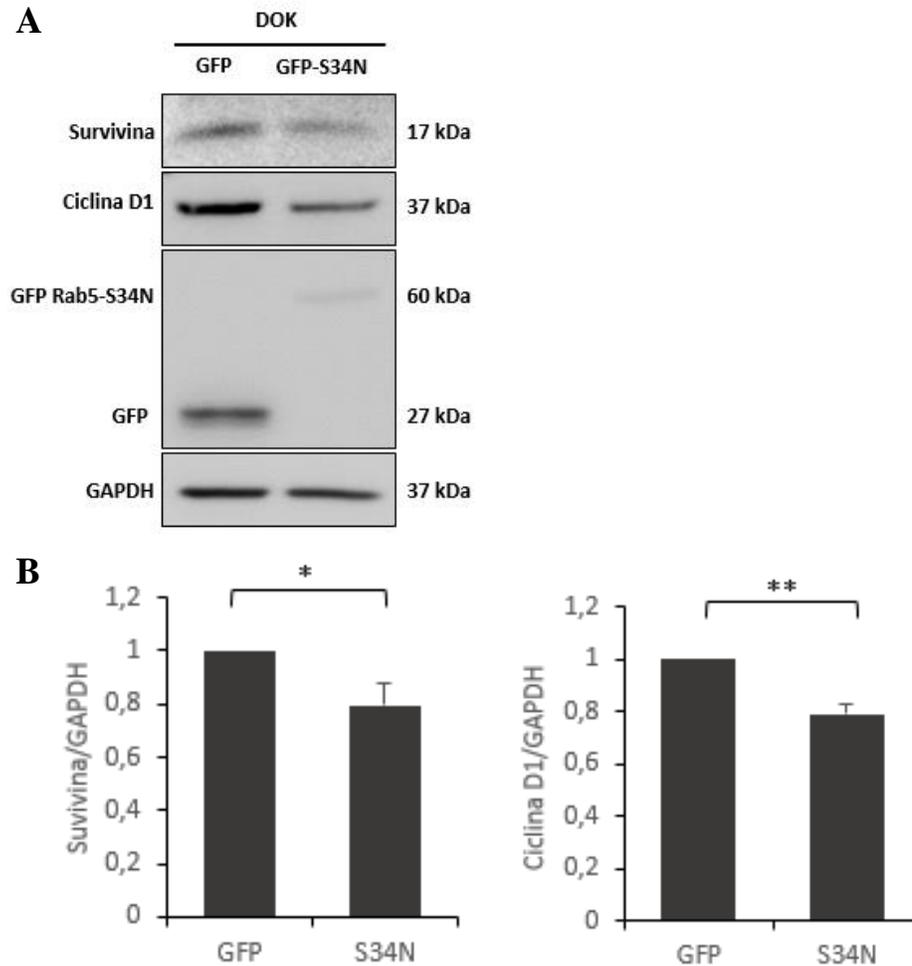


Figura 19. Efecto de la actividad de Rab5 en la expresión de Survivina y Ciclina D1. Células DOK fueron transfectadas con los plasmidios GFP o GFP-Rab5/S34N, y los extractos celulares fueron obtenidos y analizados por Western blot. **(A)** Imágenes representativas de Western blot para los niveles de Survivina y Ciclina D1 en células DOK transfectadas con el plasmidio GFP-Rab5/S34N y en células DOK transfectadas con el plasmidio GFP. **(B)** Los gráficos muestran el promedio \pm el error estándar de 3 experimentos independientes (ttest; * = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$).

6.2.2 La expresión de una mutante inactiva de Rab5 disminuye la actividad transcripcional de β -catenina en células OKF-6 tratadas con medio condicionado de células DOK.

Las células OKF-6 fueron co-transfectadas con los plasmidios pTOP-FLASH o pFOP-FLASH y además con la mutante inactiva GFP-Rab5/S34N o GFP, y posteriormente fueron expuestas al medio condicionado de células DOK, para inducir translocación nuclear y actividad de β -catenina. Después de 24h se realizaron ensayos de actividad reportera de TCF/Lef. Los resultados muestran una disminución significativa de aproximadamente un 20% de la actividad luciferasa inducida por medio condicionado de células DOK en células OKF-6 transfectadas con GFP-Rab5/S34N, en comparación con células transfectadas con GFP. Lo anterior sugiere, que la transfección con la mutante inactiva de Rab5 disminuye la actividad transcripcional de β -catenina en células OKF-6 tratadas con el medio condicionado de células DOK (3 experimentos independientes) **(Figura 20).**

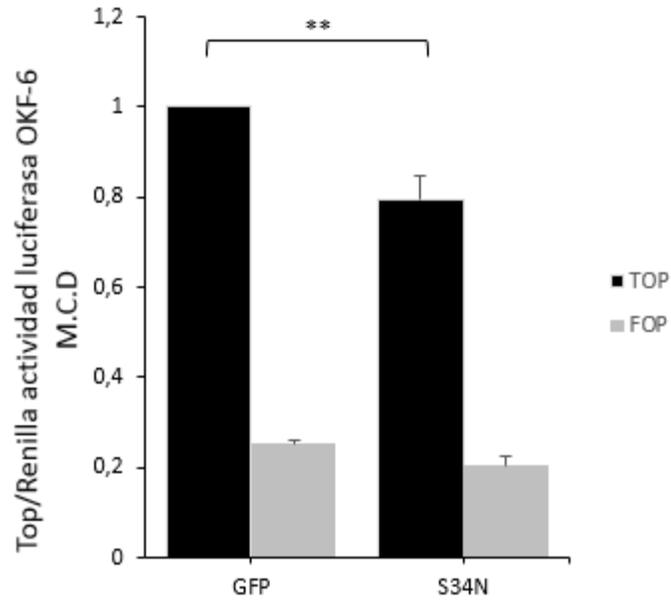


Figura 20. Efecto de la activación de Rab5 en la actividad transcripcional de β -catenina. Medición de la actividad de la luciferasa en células OKF-6 tratadas con medio condicionado de células DOK (M.C.D), utilizando el plasmidio pTOP-FLASH o pFOP-FLASH en células transfectadas con el plasmidio GFP-Rab5/S43N o plasmidio GFP. El gráfico muestra el promedio \pm el error estándar de 3 experimentos independientes (ttest; ** = $p \leq 0.01$).

6.2.3 CONCLUSIÓN OBJETIVO ESPECÍFICO N°2

En resumen, estos resultados en conjunto, demuestran que la expresión de una mutante inactiva de Rab5 inhibe la translocalización nuclear de β -catenina en células de displasia oral y disminuye la actividad de β -catenina en queratinocitos orales tratados con medio condicionado de células DOK, demostrando la participación de esta GTPasa en la señalización de Wnt/ β -catenina.

6.3 OBJETIVO ESPECÍFICO N°3:

DETERMINAR SI LA ACTIVIDAD DE RAB5 ES NECESARIA PARA EL RECLUTAMIENTO DE COMPONENTES DEL COMPLEJO DE DESTRUCCIÓN DE β -CATENINA HACIA ENDOSOMAS TEMPRANOS EN CÉLULAS DE DISPLASIA ORAL.

6.3.1 La actividad de Rab5 es necesaria para el reclutamiento de componentes del complejo de destrucción de β -catenina en endosomas tempranos.

Para evaluar el requerimiento de la actividad de Rab5 en el secuestro de los componentes del complejo de destrucción de β -catenina en endosomas tempranos se usaron células DOK transfectadas con la mutante inactiva de Rab5. Específicamente, se realizaron análisis de co-localización de la proteína EEA1, principal efector de Rab5 (Grosshans et al. 2006), con componentes del complejo de destrucción de β -catenina tales como, GSK-3 β , Axina, APC y el ligando Wnt 3a a través de inmunofluorescencia en células DOK transfectadas con la mutante inactiva GFP-Rab5/S34N, o transfectadas con el plasmidio que codifica para GFP. El análisis de co-localización fue realizado sólo en células verdes (transfectadas), estimando el coeficiente de Manders, valor que indica el porcentaje de la señal roja (GSK-3 β , Axina, APC o Wnt3) que se encuentra solapada con la señal verde (EEA1) en un área de 20 μm^2 . Las imágenes fueron deconvolucionadas antes de su análisis.

Los resultados demuestran que las células DOK transfectadas con el vector control (GFP) tienen mayor co-localización de GSK-3 β con EEA1, en comparación a las células DOK transfectadas con la mutante inactiva GFP-Rab5/S34N, en las cuales hubo un disminución significativa en la co-localización de ambas proteínas (**Figuras 21A, 21B** coeficiente de Manders en las imágenes magnificadas; 3 experimentos independientes).

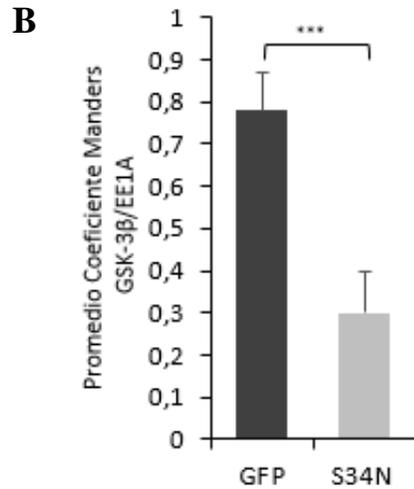
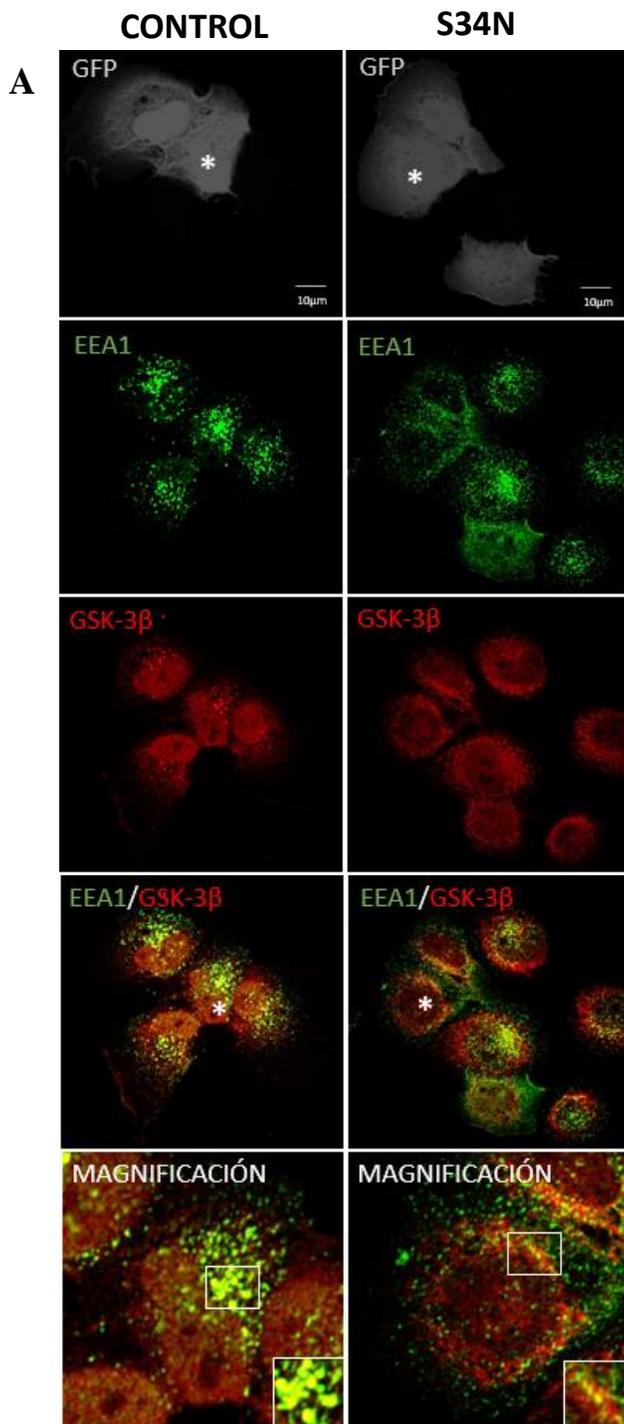


Figura 21. Co-localización de GSK-3β con EEA1 en células de displasia oral. Las células DOK fueron transfectadas con un vector de expresión para la proteína de fusión GFP (Control) y la mutante inactiva GFP-Rab5/S34N, luego las células fueron analizadas por microscopía confocal a un aumento de 60X. **(A)** Se muestran imágenes representativas en cada caso. **(B)** Se muestran los datos numéricos del promedio del coeficiente de Manders correspondiente a la señal de GSK-3β solapada sobre EEA1. El gráfico muestra el promedio \pm el error estándar de 3 experimentos independientes, estudiando al menos 20 imágenes en cada uno. (Mann Whitney; *** = $p \leq 0.001$).

Para confirmar los hallazgos con GSK-3 β , se incluyó la localización de otros componentes del complejo de destrucción. Resultados similares fueron los obtenidos al analizar la co-localización de Axina con EEA1, en donde se observa una menor co-localización de estas proteínas cuando las células DOK fueron transfectadas con la mutante inactiva GFP-Rab5/S34N en relación con la condición transfectada con GFP (**Figuras 22A, 22B** coeficiente de Manders en las imágenes magnificadas; 3 experimentos independientes). De igual forma, al analizar la co-localización de APC con EEA1 se observa una disminución en la co-localización de ambas proteínas en presencia de la mutante inactiva de Rab5 (**Figuras 23A, 23B** coeficiente de Manders en las imágenes magnificadas; 3 experimentos independientes). Si bien se observa una tendencia en la disminución en la co-localización de Wnt3a con EEA1 en células de displasia oral transfectadas con GFP-Rab5/S34N, estos resultados no arrojaron datos significativos, sin embargo, sorprendentemente, se puede observar una disminución de Wnt3a en el citoplasma cuando las células DOK expresan la mutante inactiva GFP-Rab5/S34N (**Figuras 24A, 24B** coeficiente de Manders en las imágenes magnificadas; 3 experimentos independientes).

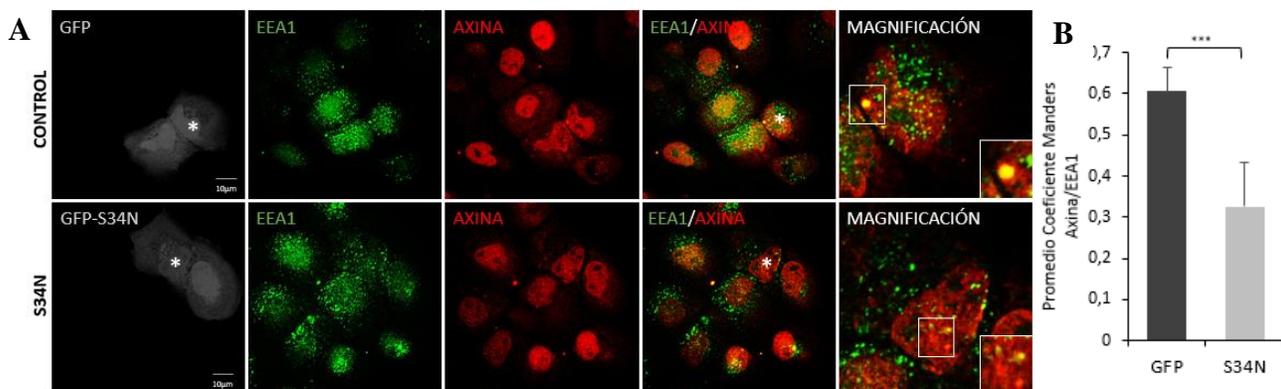


Figura 22. Co-localización de Axina con EEA1 en células de displasia oral. Las células DOK fueron transfectadas con un vector de expresión para la proteína de fusión GFP (Control) y la mutante inactiva GFP-Rab5/S34N, luego las células fueron analizadas por microscopía confocal de inmunofluorescencia a un aumento de 60X. **(A)** Se muestran imágenes representativas en cada caso. **(B)** Se muestran los datos numéricos del promedio del coeficiente de Manders correspondiente a la señal de Axina solapada sobre EEA1. El gráfico muestra el promedio \pm el error estándar de 3 experimentos independientes, estudiando al menos 20 imágenes en cada uno. (Mann Whitney; *** = $p \leq 0.001$).

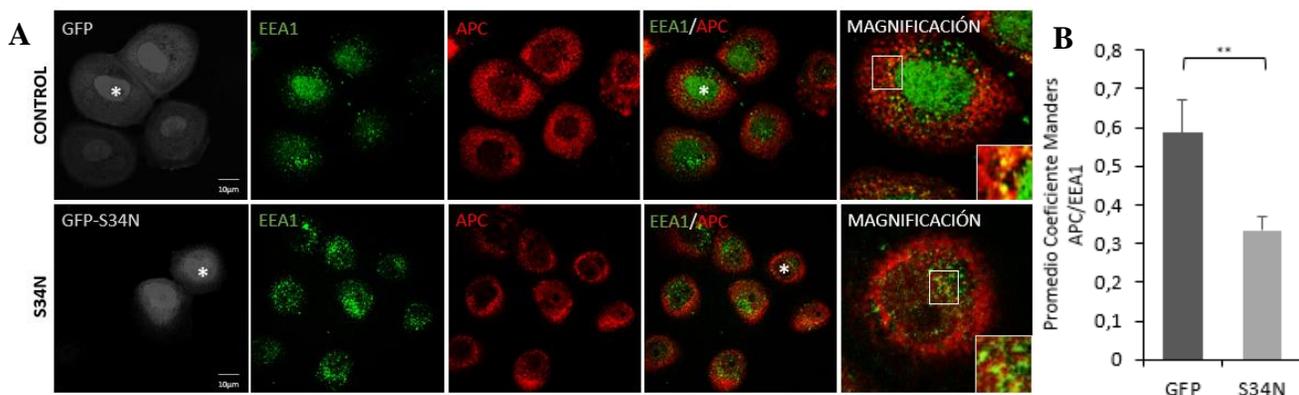


Figura 23. Co-localización de APC con EEA1 en células de displasia oral. Las células DOK fueron transfectadas con un vector de expresión para la proteína de fusión GFP (Control) y la mutante inactiva GFP-Rab5/S34N, luego las células fueron analizadas por microscopía confocal de inmunofluorescencia a un aumento de 60X. **(A)** Se muestran imágenes representativas en cada caso. **(B)** Se muestran los datos numéricos del promedio del coeficiente de Manders correspondiente a la señal de APC solapada sobre EEA1. El gráfico muestra el promedio \pm el error estándar de 3 experimentos independientes, estudiando al menos 20 imágenes en cada uno. (Mann Whitney; ** = $p \leq 0.01$).

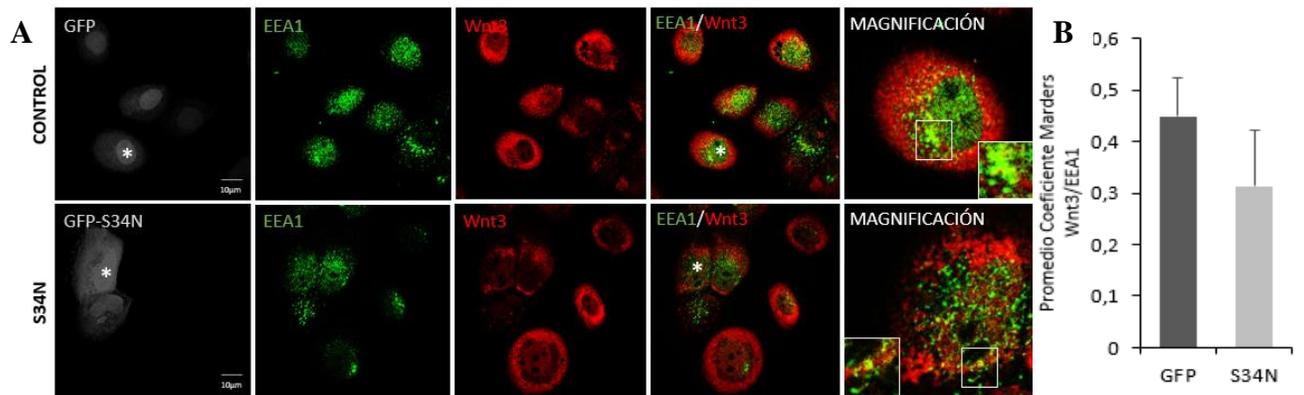


Figura 24. Co-localización de Wnt3 con EEA1 en células de displasia oral. Las células DOK fueron transfectadas con un vector de expresión para la proteína de fusión GFP (Control) y la mutante inactiva GFP-Rab5/S34N, luego las células fueron analizadas por microscopía confocal de inmunofluorescencia a un aumento de 60X. **(A)** Se muestran imágenes representativas en cada caso. **(B)** Se muestran los datos numéricos del promedio del coeficiente de Manders correspondiente a la señal de Wnt3 solapada sobre EEA1. El gráfico muestra el promedio \pm el error estándar de 3 experimentos independientes, estudiando al menos 20 imágenes en cada uno.

6.3.2 CONCLUSIÓN OBJETIVO ESPECÍFICO N°3

En resumen, estos resultados en conjunto, demuestran que la actividad de Rab5 promueve el reclutamiento de componentes del complejo de destrucción de β -catenina hacia endosomas tempranos y de esta forma el complejo se encuentra secuestrado dentro del endosoma no pudiendo fosforilar a β -catenina, facilitando de esta forma su translocación al núcleo en células de displasia oral.

6.4 OBJETIVO ESPECÍFICO N°4:

EVALUAR LA LOCALIZACIÓN ENDOSOMAL DE GSK-3 β EN BIOPSIAS DE DISPLASIA ORAL CON PRESENCIA NUCLEAR DE β -CATENINA

6.4.1 Las células de tejidos diagnosticados con displasia oral severa presentan un aumento en el reclutamiento de GSK-3 β en endosomas tempranos.

Los resultados obtenidos anteriormente (objetivos 2 y 3) indican que el complejo de destrucción de β -catenina es secuestrado en endosomas tempranos, y que Rab5 es importante para este proceso en células de displasia oral. Para validar estos hallazgos obtenidos a nivel *in vitro*, en muestras *ex vivo*, se realizó un análisis de co-localización de la proteína GSK-3 β con EEA1 través de inmunofluorescencia en biopsias con diagnóstico histopatológico de displasia oral severa con el criterio de que presentan localización nuclear de β -catenina en más de dos tercios de su epitelio, como control, se usaron biopsias de mucosa oral sana. Se analizó la co-localización de las proteínas en 50 células por tejido estudiado, la cual se estimó utilizando el coeficiente de Manders, valor que indica el porcentaje de la señal roja (GSK-3 β) que se encuentra solapada con la señal verde (EEA1) en un área de 20 μm^2 . Por su parte, se determinó la localización subcelular de β -catenina a través de inmunofluorescencia en tejidos de displasia oral y mucosa oral sana. En concordancia con lo publicado anteriormente por nosotros (Reyes et al. 2015), los tejidos

con displasia oral severa presentaron mayoritariamente presencia nuclear de β -catenina en más de dos tercios de su epitelio en comparación a tejidos de mucosa oral sana, en donde se observó principalmente presencia membranosa de la proteína, sin presentar localización nuclear (**Figura 25A**). Importantemente, en la misma zona de los tejidos de displasia oral severa, en donde se detectó presencia nuclear de β -catenina, se determinó la co-localización de GSK-3 β con EEA1, y de igual manera se realizó el mismo procedimiento con tejidos de mucosa oral sana, mostrándose una imagen representativa de cada análisis (**Figura 25B**). Posteriormente se analizaron 50 células por tejido, determinando que las células de tejidos de displasia oral severa presentan un aumento en la co-localización de GSK-3 β con EEA1, en comparación a las células de mucosa oral sana, en las cuales hubo una menor co-localización de ambas proteínas. Además se puede observar que las vesículas positivas para EEA1 (endosomas tempranos) que presentan co-localización con GSK-3 β , se encuentran principalmente en el citoplasma en células de displasia oral severa, en comparación a células de mucosa oral sana, en donde las vesículas positivas para EEA1 se encuentran principalmente hacia la periferia celular (**Figura 26A**). Además se puede observar que el tamaño de las partículas EEA1 positivas está más incrementado en células de displasia oral severa lo cual es concordante con estudios previos que muestran que el aumento de la activación de Rab5 causa un incremento en el tamaño de estas estructuras (Misra et al. 2012; Stenmark 2009) en comparación a células de tejidos de mucosa oral sana (**Figura 26A**).

El análisis de co-localización fue realizado estimando el coeficiente de Manders, valor que indica el porcentaje de la señal roja (GSK-3 β) que se encuentra solapada con la señal verde (EEA1). Los resultados demuestran que las células de displasia oral tienen mayor co-localización de GSK-3 β con EEA1, en comparación a las células de mucosa oral sana, en las cuales hubo una disminución significativa en la co-localización de ambas proteínas (**Figuras 26B**; coeficiente de Manders en las imágenes magnificadas; 3 experimentos independientes).

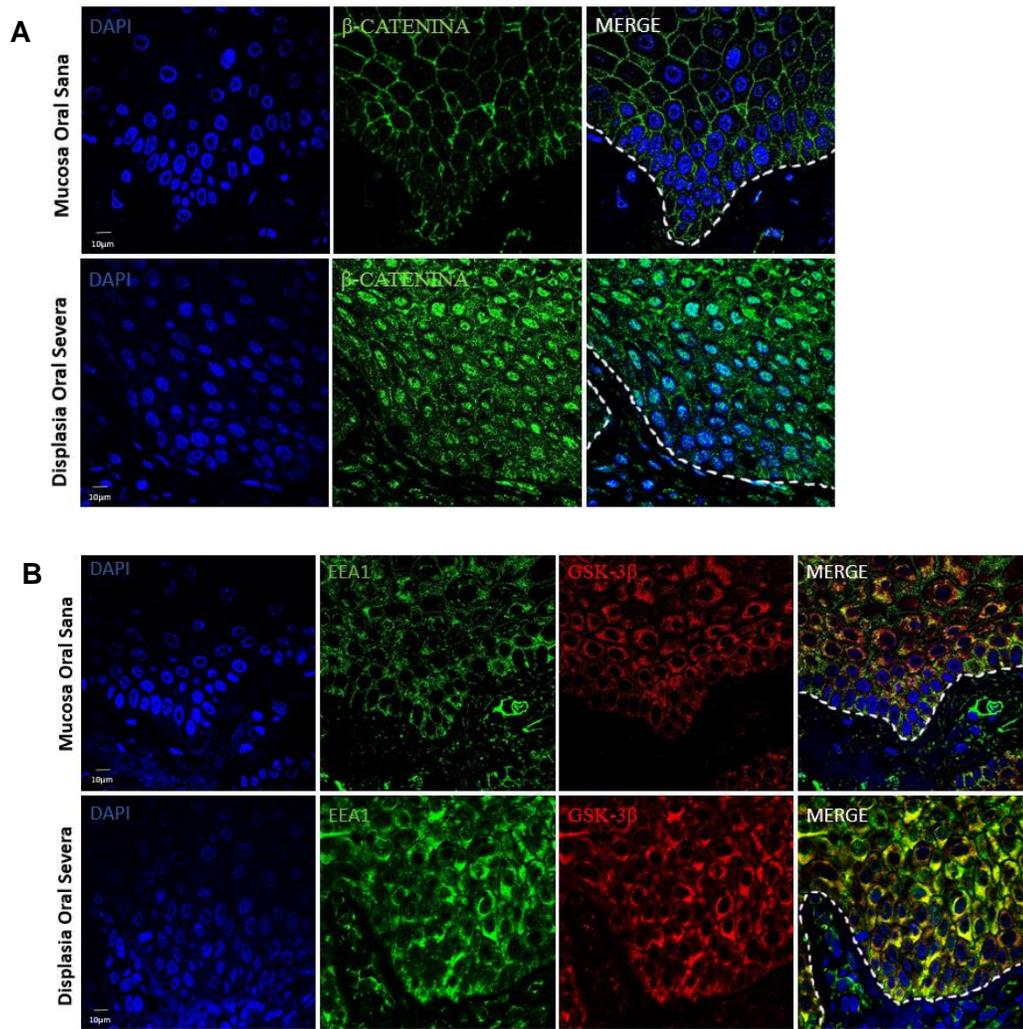
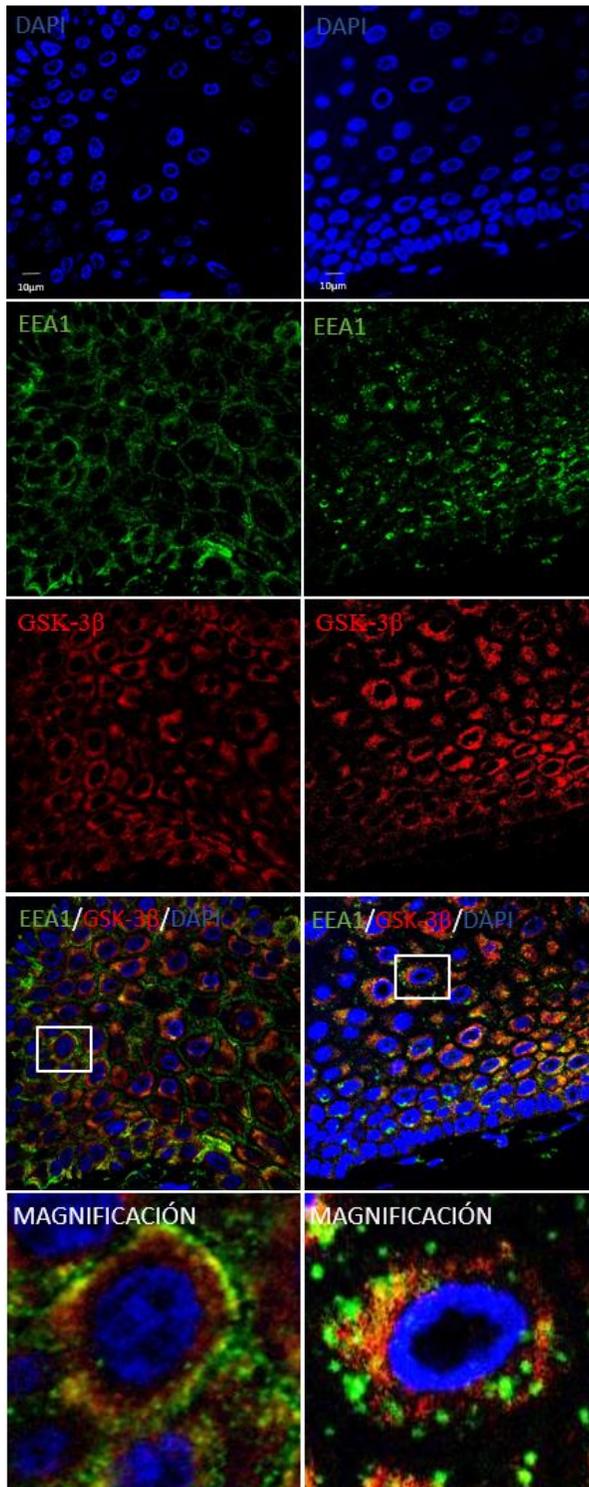


Figura 25. Inmunofluorescencia en tejidos con displasia oral severa y mucosa oral sana. (A) Inmunofluorescencia de β -catenina total en corte de tejido de biopsia correspondiente a displasia oral severa y mucosa sana **(B)** Inmunofluorescencia de EEA1 y GSK-3 β en corte de tejido de biopsia correspondiente a displasia oral severa y mucosa oral sana.

A MUCOSA ORAL SANA DISPLASIA ORAL SEVERA



B

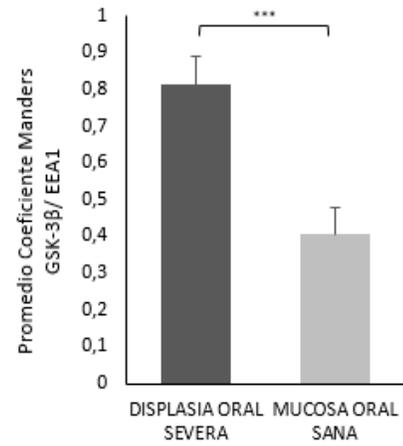


Figura 26. Co-localización de GSK-3β y EEA1 en tejidos con displasia oral severa y mucosa oral sana a través de inmunofluorescencia. (A) Imagen representativa del análisis de co-localización de EEA1 y GSK-3β en corte de tejido de biopsia correspondiente a displasia oral severa y mucosa sana. Microscopía confocal a un aumento de 100X. El último panel corresponde a una magnificación del cuadrado indicado en cada condición. (B) Promedio del coeficiente de Manders correspondiente a la señal de GSK-3β solapada sobre EEA1. Los gráficos muestran el promedio ± el error estándar de 3 experimentos independientes, estudiando al menos 50 células en cada uno. (Mann Whitney; *** = $p \leq 0.001$).

6.4.2 CONCLUSIÓN OBJETIVO ESPECÍFICO N°4

En resumen, estos resultados confirman la relación entre la actividad de Rab5, el reclutamiento de GSK-3 β en endosomas tempranos y la acumulación nuclear de β -catenina en tejidos de displasia oral.

7. DISCUSIÓN

7.1 ACTIVACIÓN DE LA VÍA WNT/ β -CATENINA EN DISPLASIA ORAL

La activación aberrante de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina está involucrada en el desarrollo de muchos tumores (Johnson and Rajamannan 2006; Logan and Nusse 2004; Luo et al. 2007; Reya and Clevers 2005); sin embargo, el papel que desempeña en el proceso de carcinogénesis oral aún no está comprendido. El objetivo de esta tesis fue determinar si la translocación nuclear de β -catenina en displasia oral depende de la activación de Rab5 y del reclutamiento del complejo de destrucción hacia endosomas tempranos. Existe información limitada sobre la contribución de la vía Wnt canónica en el desarrollo de la displasia oral, situación que se debe, en parte, a la falta de modelos celulares *in vitro*. Nuestro grupo ha establecido previamente que existe una mayor acumulación nuclear de β -catenina en biopsias de displasia oral a través de inmunohistoquímica, en comparación a mucosa oral sana en donde la expresión de la proteína fue exclusivamente membranosa, mientras que en carcinoma oral, se observó principalmente localización citoplasmática (Reyes et al. 2015). Estos datos son consistentes con los reportados previamente en la literatura, donde se observa presencia nuclear de β -catenina en displasia oral (Alvarado et al. 2011; Ishida et al. 2007; Kaur et al. 2013; Sato et al. 2002), mientras que se ha documentado un aumento en la localización citoplasmática y una limitada acumulación nuclear de β -catenina en biopsias de carcinoma

oral (Lo Muzio et al. 2009; Lyakhovitsky et al. 2004). Sin embargo, estos hallazgos aún no han sido validados en modelos *in vitro*.

Aquí demostramos por primera vez *in vitro*, mediante aproximaciones de inmunofluorescencia y fraccionamiento subcelular, una mayor presencia nuclear de β -catenina total y β -catenina no fosforilada en células de displasia oral (DOK), en comparación a queratinocitos orales no tumorales (OKF-6), en donde hubo presencia membranosa de la proteína, mientras que en células de carcinoma oral (CAL-27) la proteína se ubicó predominantemente en el citoplasma. Estos resultados son consistentes con lo que informamos previamente en las biopsias de pacientes, reafirmando de esta forma la presencia nuclear de β -catenina en displasia oral, sin embargo, el mecanismo por el cual β -catenina se transloca al núcleo, todavía se desconoce.

Se sabe que la acumulación citoplasmática y la posterior translocación nuclear de β -catenina pueden ser el resultado de la activación de la vía de señalización Wnt canónica debido a mutaciones en algunos de sus componentes, sin embargo, mutaciones en componentes de esta vía, como APC, Axina y β -catenina son raras en el proceso de carcinogénesis oral (Gasparoni et al. 2002; Iwai et al. 2005; Tsuchiya et al. 2004; Yeh et al. 2003), lo cual sugiere, que mutaciones en estos genes no estarían asociados con la acumulación nuclear de β -catenina en displasia oral.

Alternativamente, la activación aberrante de la vía Wnt/ β -catenina por sobreproducción de ligandos Wnt, podría explicar la activación y la consecuente

translocación nuclear de β -catenina en displasia oral. Las proteínas Wnt son una familia de moléculas secretadas de 40 kDa, ricas en cisteína, y que desempeñan funciones esenciales en muchos procesos celulares (Tanaka et al. 2002; Willert et al. 2003; Willert and Nusse 2012). Se ha demostrado con anterioridad, que la activación anormal de la vía Wnt mediada por ligandos está involucrada en varios tipos de cáncer (Benhaj et al. 2006; He et al. 2015; Howe and Brown 2004; Pukrop et al. 2006; Weeraratna et al. 2002), incluyendo el cáncer oral, en donde se ha reportado una sobreexpresión de ligandos Wnt en biopsias de pacientes a través de inmunohistoquímica. Específicamente, se demostró una sobreexpresión de Wnt 3a y β -catenina en cáncer oral, determinando una acumulación citoplasmática de ambas proteínas en el frente invasivo de biopsias de carcinoma oral, a través de inmunohistoquímica, situación que sugiere que Wnt 3a desempeña un papel en la invasión y en la transformación epitelio-mesénquima en cáncer oral (Uraguchi et al. 2004). Interesantemente, en este estudio no se observó presencia nuclear de β -catenina. Posteriormente, se reportaron observaciones similares, donde se investigó la expresión de Wnt3a en biopsias de pacientes con carcinoma oral y mucosa oral sana, determinando una sobreexpresión de este ligando en muestras de carcinoma oral en comparación con mucosa oral sana (Andrade Filho et al. 2011; Sogabe et al. 2008). Con respecto a la expresión de Wnt 3a en displasia oral, la evidencia en la literatura es escasa, en donde un estudio descubrió una mayor expresión membranosa de Wnt 3a en biopsias de displasia oral con presencia nuclear de β -catenina a través de inmunohistoquímica (Ishida et al. 2007). Otros

ligandos Wnt también han sido estudiados en este contexto, por ejemplo, la expresión de Wnt 5a aumentó con el grado de displasia oral, en donde su mayor expresión fue observada en muestras de carcinoma oral. Importantemente, Wnt 5a no fue detectada en mucosa oral sana (Prgomet et al. 2017; Prgomet et al. 2015). Por último, la expresión del ligando Wnt 7b también ha sido estudiada en muestras de carcinoma oral de células escamosas, determinando que la sobreexpresión de este ligando activa la vía Wnt/ β -catenina, contribuyendo a la proliferación e invasión celular (Shiah et al. 2014).

Sobre la base de estos resultados, investigamos *in vitro* el papel de los ligandos Wnt en la localización nuclear de la β -catenina en células de displasia oral DOK mediante el uso del inhibidor C-59, el cual inhibe la secreción de ligandos Wnt (Cheng et al. 2015; Proffitt et al. 2013). Para aclarar si las células DOK secretan efectivamente ligandos Wnt, lo que podría explicar la activación de la vía Wnt en estas células, se evaluó la expresión de los ligandos Wnt 3a, Wnt 5a y Wnt 7b en el medio condicionado de células DOK, en presencia y ausencia del inhibidor C-59. Los resultados revelaron una expresión más baja de Wnt 3a en presencia del inhibidor, demostrando de esta manera que el medio condicionado de las células DOK está enriquecido en Wnt 3a, lo que podría estar activando la vía Wnt en células de displasia oral. No hubo cambios en la expresión de los otros ligandos Wnt estudiados. Paralelamente, también se determinó la expresión de Wnt 3a en medios condicionados de células DOK, OKF-6 y CAL-27, demostrando una mayor expresión de Wnt3a en medios condicionados de células de displasia oral, en comparación

con medios condicionados de queratinocitos orales no tumorales. Por otro lado, las células CAL-27 mostraron una mayor expresión de Wnt3a en su medio condicionado, en comparación con el medio condicionado de las células DOK, situación concordante con lo reportado en la literatura en muestras de pacientes a través de inmunohistoquímica (Andrade Filho et al. 2011; Uraguchi et al. 2004). Sin embargo, en tejidos de carcinoma oral sólo se ha observado una acumulación citoplasmática de β -catenina, fenómeno que ha sido explicado como causa del silenciamiento epigenético de genes inhibidores de Wnt en las muestras de cáncer estudiadas, provocando una activación de la señalización de Wnt mediada por Wnt 3a y así la acumulación citoplasmática de β -catenina (Andrade Filho et al. 2011; Pannone et al. 2010; Sogabe et al. 2008). No obstante lo anterior, la limitada presencia nuclear de β -catenina, en conjunto con una sobreexpresión de Wnt3a no ha sido abordada detalladamente.

En nuestro estudio, mostramos una disminución en la localización nuclear de β -catenina a través de inmunofluorescencia, así como menores niveles proteicos de β -catenina no fosforilada, survivina y ciclina D1 a concentraciones crecientes del inhibidor C-59. Sorpresivamente, survivina y ciclina D1 disminuyeron no sólo sus niveles de proteína en presencia de C-59, sino también los niveles de ARNm, lo que indica que su expresión podría ser una consecuencia de la activación de la vía Wnt/ β -catenina mediada por ligando Wnt. Survivina es un inhibidor de la apoptosis, el cual está sobreexpresado en la mayoría de los tumores; y más aún, se le ha atribuido un papel como

potencial marcador temprano de la transformación maligna en lesiones orales potencialmente malignas, donde el 94% de las muestras de displasia oral que progresaron a carcinoma expresaron survivina (Lo Muzio et al. 2003). Otros estudios apoyan estas observaciones, en donde hay una mayor expresión de survivina durante la progresión de la displasia oral a cáncer, lo que indica que la expresión de esta proteína puede ser un evento temprano en el inicio y en la progresión de la carcinogénesis oral (Deo and Deshmukh 2017; Negi et al. 2015).

Para demostrar que la localización nuclear de β -catenina está mediada por la secreción de ligandos Wnt, se expusieron células OKF-6 y queratinocitos orales primarios derivados de mucosa oral sana, al medio condicionado de células DOK. Los resultados mostraron que las células OKF-6 expuestas al medio condicionado de las células DOK no sólo presentaron una mayor localización nuclear de β -catenina, sino que también hubo mayor actividad de TCF/Lef a través de ensayos reporteros, lo cual podría revelar un papel del ligando Wnt en la localización nuclear y la actividad transcripcional de β -catenina. Para demostrar esto, las células OKF-6 fueron expuestas al medio condicionado de las células DOK tratadas con el inhibidor C-59, demostrando una menor actividad transcripcional de β -catenina en esta condición. Nuestros resultados *in vitro* son concordantes con lo que se ha demostrado en reportes aislados a través de inmunohistoquímica en muestras de displasia oral, por esta razón evaluamos simultáneamente la expresión de Wnt 3a y β -catenina en biopsias de displasia oral severa

y mucosa oral sana mediante inmunofluorescencia, en donde nuestros resultados demostraron un aumento en la expresión de Wnt 3a en displasias orales severas con presencia nuclear de β -catenina, en comparación con las biopsias de mucosa oral sana.

7.2 ROL DE RAB5 Y EL TRÁFICO ENDOCÍTICO EN LA LOCALIZACIÓN NUCLEAR DE β -CATENINA EN DISPLASIA ORAL.

Una vez que demostramos que existe sobreexpresión de Wnt 3a en conjunto con una mayor presencia nuclear de β -catenina en displasia oral, averiguamos el posible mecanismo implicado en la translocación nuclear de la proteína. Es conocido que la formación del signalosoma endosomal inducido por la señalización de Wnt, es el paso clave que precede a la inhibición de GSK-3 β (Metcalf and Bienz 2011). Liu et al., y Nusse et al., demostraron por primera vez que LRP6 se internaliza desde la membrana plasmática por un mecanismo dependiente del ligando Wnt, activando de esta forma la señalización Wnt/ β -catenina. Por otro lado, se ha observado que la activación de Wnt lleva a la inhibición de GSK-3 β mediante la internalización del complejo de destrucción de β -catenina, evento necesario para señalización de Wnt (Bilic et al. 2007; Blitzer and Nusse 2006; Taelman et al. 2010; Yamamoto et al. 2006). Taelman, et al., propusieron un nuevo modelo de inhibición de GSK-3 β , demostrando que los receptores de Wnt activados reclutan a Axina y GSK-3 β , la cual fosforila la cola citoplasmática de LRP6, formando

una estructura llamada “LRP6 signalosoma” la cual contiene agregados de LRP6 fosforilado, Frizzled, Dvl, Axina y GSK-3 β , y que esta estructura se internaliza desde la membrana plasmática, 15 minutos después de la adición de Wnt en células HEK 293 (Taelman et al. 2010). Los resultados de estos investigadores llevaron a la postulación de un nuevo modelo en el que GSK-3 β es secuestrado dentro de endosomas multivesiculares (o endosomas tardíos) desencadenados por activación de los receptores Frizzled y LRP6, sin embargo, no se ha demostrado que este mecanismo sea parte del proceso de una enfermedad. Esta tesis propone que los componentes del complejo de destrucción de β -catenina se reclutan en endosomas tempranos (compartimiento previo a la maduración hacia endosomas tardíos), de esta forma β -catenina no puede ser fosforilada, posteriormente se estabiliza en el citoplasma y se transloca al núcleo en células de displasia oral. Es importante señalar que hasta la fecha no se ha reportado información acerca del estado de la activación de Rab5 ni de ninguna otra Rab asociada al tráfico endocítico en displasia oral, lo cual nos podría indicar un posible rol de ésta u otra GTPasa en diversos eventos asociados al desarrollo de la displasia oral, como por ejemplo, la translocación nuclear de β -catenina. Para comprobar esto, demostramos por primera vez que existe una mayor activación de Rab5, en células DOK en comparación a células OKF-6. Concordante con lo anterior, la transfección de una mutante inactiva de Rab5 en células DOK disminuyó la localización nuclear y los niveles proteicos de β -catenina en células de displasia oral, indicando la relevancia de la actividad de Rab5 en la localización

nuclear de β -catenina. Por otro lado, mediante análisis de co-localización de proteínas del complejo de destrucción con EEA1, un potente efector de Rab5 y marcador de endosomas tempranos, demostramos que GSK-3 β , APC y Axina disminuyen su co-localización con EEA1 en células DOK transfectadas con la mutante inactiva de Rab5. Por otro lado, los resultados obtenidos con Axina fueron interesantes, ya que ésta se encontró presente en los núcleos de células de displasia oral, así como también en agregados en punta. Previamente se ha reportado la localización nuclear de Axina, de hecho, se ha detectado en el núcleo de células intestinales normales y cancerosas (Liu et al. 2016; Nakajima et al. 2003; Salahshor and Woodgett 2005; Taniguchi et al. 2002), sugiriéndose que axina puede actuar como una chaperona molecular regulando la distribución nuclear-citoplasmática de β -catenina, aunque no existen reportes de estas funciones en displasia oral (Cong and Varmus 2004). Es conocido que axina facilita el ensamblaje del complejo de destrucción cuando no existe señalización de Wnt, y la expresión de axina se describe como “en puntos” que se localizan a lo largo del citoplasma en un estado no estimulado, y que esos puntos co-localizan con β -catenina y APC durante la formación del complejo de destrucción (Song et al. 2014; Wang et al. 2016). Sin embargo, en presencia de Wnt, axina facilita la señalización actuando como un andamio para la formación del signalosoma, promoviendo la fosforilación de LRP6 después de la estimulación con Wnt, lo que da como resultado la estabilización de β -catenina y su posterior translocación nuclear, es así como Wang et al., demostraron que la exposición de Wnt induce la

relocalización de axina desde el citoplasma a la membrana plasmática promoviendo su unión a la cola fosforilada de LRP6 y que agregados de axina en la membrana pueden representar los sitios del complejo de destrucción (Wang et al. 2016). Interesantemente, en nuestras muestras observamos grandes agregados de axina co-localizando con EEA1, aunque si bien la forma de estos agregados no representan típicas formaciones vesiculares, es probable que estos agregados representen sitios del complejo de destrucción reclutado en endosomas tempranos. Sin embargo, como la información en la literatura es sumamente limitada, experimentos adicionales son necesarios para demostrar este cuestionamiento. Para finalizar nuestros objetivos, demostramos co-localización de GSK-3 β con EEA1 en biopsias de displasia oral severa en comparación a mucosas orales sanas, este resultado confirma lo demostrado *in vitro* a través de células de displasia oral, esta vez en tejidos de pacientes con displasia oral.

En base a lo señalado anteriormente, nosotros proponemos que la translocación nuclear de β -catenina en displasia oral se debe a la activación de la vía mediada por Wnt 3a y que ésto provocaría la internalización de los componentes del complejo de destrucción en endosomas tempranos. De esta forma β -catenina no puede ser fosforilada y se transloca al núcleo (Figura 27). Por lo tanto, en esta tesis se demuestra por primera vez que el secuestro de componentes del complejo de destrucción de β -catenina en endosomas tempranos provoca la translocación nuclear de β -catenina en displasia oral.

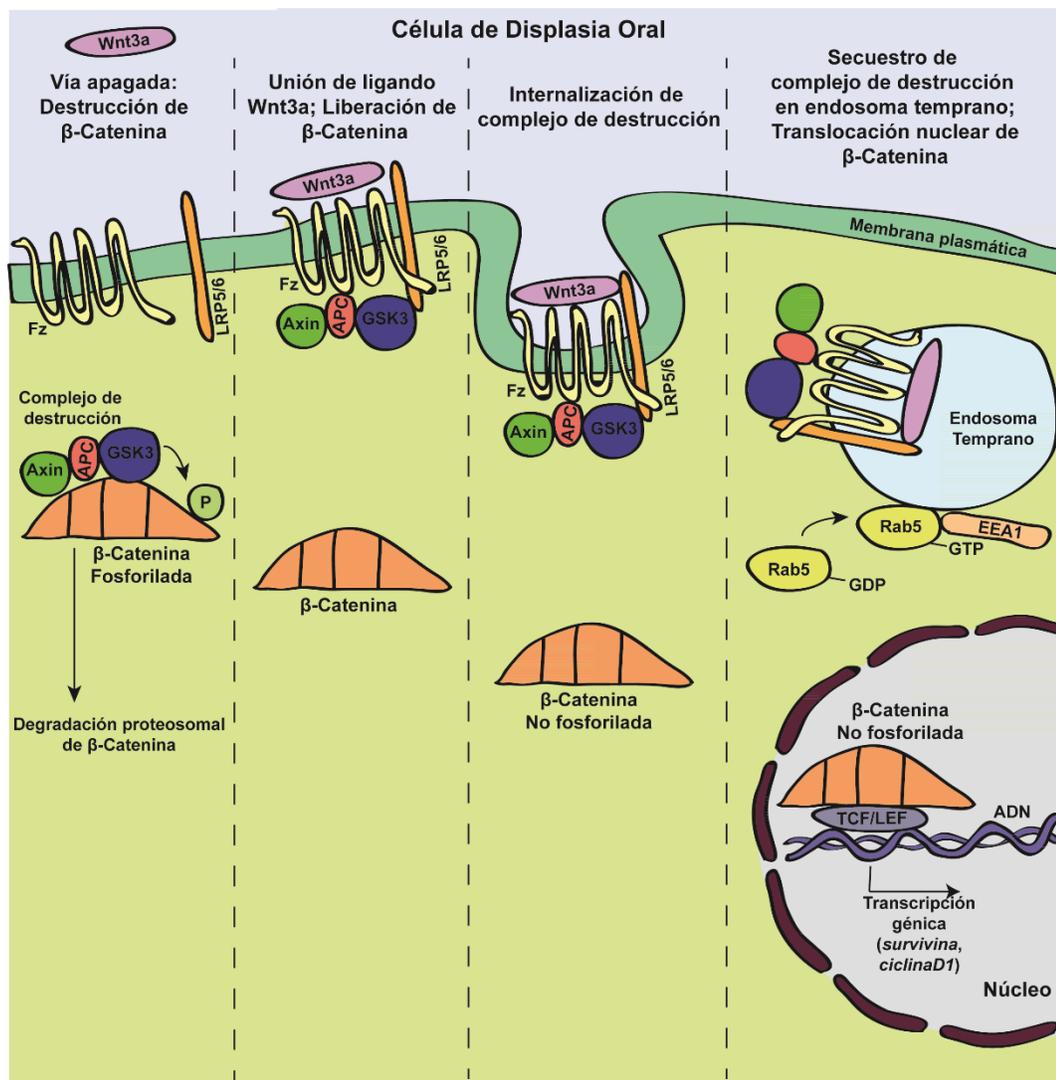


Figura 27. Modelo propuesto de la activación de la vía Wnt/ β -catenina y la posterior translocación nuclear de β -catenina en displasia oral.

8. CONCLUSIONES

- 1.** La localización nuclear de β -catenina, en conjunto con la expresión de proteínas y ARNm de genes dianas de la vía Wnt/ β -catenina, como Survivina y Ciclina D1, están asociados a la secreción de ligando Wnt 3a en células de displasia oral.
- 2.** La expresión de una mutante inactiva de Rab5 inhibe la translocalización nuclear de β -catenina en células de displasia oral, demostrando la participación de esta GTPasa en la señalización de Wnt/ β -catenina.
- 3.** La actividad de Rab5 promueve el reclutamiento de componentes del complejo de destrucción de β -catenina hacia endosomas tempranos, facilitando de esta forma su translocación nuclear en células de displasia oral.
- 4.** Existe una relación entre la actividad de Rab5, el reclutamiento de GSK-3 β en endosomas tempranos y la acumulación nuclear de β -catenina en tejidos de displasia oral.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado CG, Maruyama S, Cheng J, Ida-Yonemochi H, Kobayashi T, Yamazaki M, Takagi R, Saku T. 2011. Nuclear translocation of beta-catenin synchronized with loss of e-cadherin in oral epithelial dysplasia with a characteristic two-phase appearance. *Histopathology*. 59(2):283-291.
- Andrade Filho P, Letra A, Cramer A, Prasad J, Garlet G, Vieira A, Ferris R, Menezes R. 2011. Insights from studies with oral cleft genes suggest associations between wnt-pathway genes and risk of oral cancer. *J dent res*. p. 740-746.
- Angiero F, Berenzi A, Benetti A, Rossi E, Del Sordo R, Sidoni A, Stefani M, Dessy E. 2008. Expression of p16, p53 and ki-67 proteins in the progression of epithelial dysplasia of the oral cavity. *Anticancer Res*. 28(5a):2535-2539.
- Basnaker M, Sp S, Bnvs S. 2014. Cyclin d1 gene expression in oral mucosa of tobacco chewers"- an immunohistochemical study. *J Clin Diagn Res*. 8(5):Zc70-75.
- Benhaj K, Akcali KC, Ozturk M. 2006. Redundant expression of canonical wnt ligands in human breast cancer cell lines. *Oncol Rep*. 15(3):701-707.
- Bian YS, Osterheld MC, Bosman FT, Fontollet C, Benhattar J. 2000. Nuclear accumulation of beta-catenin is a common and early event during neoplastic progression of barrett esophagus. *Am J Clin Pathol*. 114(4):583-590.
- Bilic J, Huang YL, Davidson G, Zimmermann T, Cruciat CM, Bienz M, Niehrs C. 2007. Wnt induces Irp6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent Irp6 phosphorylation. *Science*. 316(5831):1619-1622.
- Blitzer JT, Nusse R. 2006. A critical role for endocytosis in wnt signaling. *BMC Cell Biol*. 7:28.
- Bucci C, Parton RG, Mather IH, Stunnenberg H, Simons K, Hoflack B, Zerial M. 1992. The small gtpase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell*. 70(5):715-728.
- Chang SE, Foster S, Betts D, Marnock WE. 1992. Dok, a cell line established from human dysplastic oral mucosa, shows a partially transformed non-malignant phenotype. *Int J Cancer*. 52(6):896-902.
- Cheng Y, Phoon YP, Jin X, Chong SY, Ip JC, Wong BW, Lung ML. 2015. Wnt-c59 arrests stemness and suppresses growth of nasopharyngeal carcinoma in mice by inhibiting the wnt pathway in the tumor microenvironment. *Oncotarget*. 6(16):14428-14439.
- Cong F, Varmus H. 2004. Nuclear-cytoplasmic shuttling of axin regulates subcellular localization of beta-catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(9):2882-2887.
- da Silva SD, Marchi FA, Xu B, Bijian K, Alobaid F, Mlynarek A, Rogatto SR, Hier M, Kowalski LP, Alaoui-Jamali MA. 2015. Predominant rab-gtpase amplicons contributing to oral squamous cell carcinoma progression to metastasis. *Oncotarget*. 6(26):21950-21963.
- Deo PN, Deshmukh R. 2017. Expression of survivin in dysplasia and different grades of oral squamous cell carcinoma: <http://dxdoi.org/101177/2057178X17710147>.

- Diaz J, Mendoza P, Ortiz R, Diaz N, Leyton L, Stupack D, Quest AF, Torres VA. 2014. Rab5 is required in metastatic cancer cells for caveolin-1-enhanced rac1 activation, migration and invasion. *J Cell Sci.* 127(Pt 11):2401-2406.
- Dickson MA, Hahn WC, Ino Y, Ronfard V, Wu JY, Weinberg RA, Louis DN, Li FP, Rheinwald JG. 2000. Human keratinocytes that express htert and also bypass a p16(ink4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. *Mol Cell Biol.* 20(4):1436-1447.
- Dobrowolski R, De Robertis EM. 2012. Endocytic control of growth factor signalling: Multivesicular bodies as signalling organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13(1):53-60.
- Dost F, Le Cao K, Ford PJ, Ades C, Farah CS. 2014. Malignant transformation of oral epithelial dysplasia: A real-world evaluation of histopathologic grading. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 117(3):343-352.
- Fleskens S, Slootweg P. 2009. Grading systems in head and neck dysplasia: Their prognostic value, weaknesses and utility. *Head Neck Oncol.* 1:11.
- Fronie A, Bunget A, Afrem E, Preotescu LL, Corlan Puscu D, Streba L, Mogoanta L, Dumitrescu D. 2013. Squamous cell carcinoma of the oral cavity: Clinical and pathological aspects. *Rom J Morphol Embryol.* 54(2):343-348.
- Gasparoni A, Chaves A, Fonzi L, Johnson GK, Schneider GB, Squier CA. 2002. Subcellular localization of beta-catenin in malignant cell lines and squamous cell carcinomas of the oral cavity. *J Oral Pathol Med.* 31(7):385-394.
- Gioanni J, Fischel JL, Lambert JC, Demard F, Mazeau C, Zanghellini E, Ettore F, Formento P, Chauvel P, Lalanne CM et al. 1988. Two new human tumor cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue: Establishment, characterization and response to cytotoxic treatment. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 24(9):1445-1455.
- Gonzalez-Moles MA, Ruiz-Avila I, Gil-Montoya JA, Esteban F, Bravo M. 2010. Analysis of ki-67 expression in oral squamous cell carcinoma: Why ki-67 is not a prognostic indicator. *Oral Oncol.* 46(7):525-530.
- Gonzalez-Moles MA, Ruiz-Avila I, Rodriguez-Archilla A, Martinez-Lara I. 2000. Suprabasal expression of ki-67 antigen as a marker for the presence and severity of oral epithelial dysplasia. *Head Neck.* 22(7):658-661.
- Grosshans BL, Ortiz D, Novick P. 2006. Rabs and their effectors: Achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(32):11821-11827.
- Hagemann AI, Kurz J, Kauffeld S, Chen Q, Reeves PM, Weber S, Schindler S, Davidson G, Kirchhausen T, Scholpp S. 2014. In vivo analysis of formation and endocytosis of the wnt/beta-catenin signaling complex in zebrafish embryos. *J Cell Sci.* 127(Pt 18):3970-3982.
- He S, Lu Y, Liu X, Huang X, Keller ET, Qian CN, Zhang J. 2015. Wnt3a: Functions and implications in cancer. *Chin j cancer.*
- Herr P, Basler K. 2012. Porcupine-mediated lipidation is required for wnt recognition by wls. *Dev Biol.* 361(2):392-402.
- Howe LR, Brown AM. 2004. Wnt signaling and breast cancer. *Cancer Biol Ther.* 3(1):36-41.

- Huang Liu R, Chen SP, Lu TM, Tsai WY, Tsai CH, Yang CC, Tzeng YM. 2014. Selective apoptotic cell death effects of oral cancer cells treated with destruxin b. *BMC Complement Altern Med.* 14(1):207.
- Ishida K, Ito S, Wada N, Deguchi H, Hata T, Hosoda M, Nohno T. 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. Mutations of the *apc*, *beta-catenin*, and *axin 1* genes and cytoplasmic accumulation of beta-catenin in oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 131(12):773-782.
- Johnson IR, Parkinson-Lawrence EJ, Keegan H, Spillane CD, Barry-O'Crowley J, Watson WR, Selemidis S, Butler LM, O'Leary JJ, Brooks DA. 2015. Endosomal gene expression: A new indicator for prostate cancer patient prognosis? *Oncotarget.* 6(35):37919-37929.
- Johnson ML, Rajamannan N. 2006. Diseases of wnt signaling. *Rev Endocr Metab Disord.* 7(1-2):41-49.
- Kaur J, Sawhney M, DattaGupta S, Shukla NK, Srivastava A, Walfish PG, Ralhan R. 2013. Clinical significance of altered expression of beta-catenin and e-cadherin in oral dysplasia and cancer: Potential link with *alcam* expression. *PLoS One.* 8(6):e67361.
- Kelloff GJ, Sigman CC. 2007. Assessing intraepithelial neoplasia and drug safety in cancer-preventive drug development. *Nat Rev Cancer.* 7(7):508-518.
- Khalil S, Tan GA, Giri DD, Zhou XK, Howe LR. 2012. Activation status of wnt/ β -catenin signaling in normal and neoplastic breast tissues: Relationship to *her2/neu* expression in human and mouse. *Plos one.*
- Kikuchi A, Yamamoto H. 2007. Regulation of wnt signalling by receptor-mediated endocytosis. *J Biochem.* 141(4):443-451.
- Kimelman D, Xu W. 2006. Beta-catenin destruction complex: Insights and questions from a structural perspective. *Oncogene.* 25(57):7482-7491.
- Kurokawa H, Zhang M, Matsumoto S, Yamashita Y, Tanaka T, Tomoyose T, Takano H, Funaki K, Fukuyama H, Takahashi T et al. 2005. The relationship of the histologic grade at the deep invasive front and the expression of *ki-67* antigen and *p53* protein in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 34(10):602-607.
- Lanzetti L. 2012. A novel function of *rab5* in mitosis. *Small GTPases.* 3(3):168-172.
- Leelahavanichkul K, Gutkind JS. 2013. Oral and pharyngeal epithelial keratinocyte culture. *Methods Mol Biol.* 945:67-79.
- Liu B, Su Y, Li T, Yuan W, Mo X, Li H, He Q, Ma D, Han W. 2015. *Cmtm7* knockdown increases tumorigenicity of human non-small cell lung cancer cells and *egfr-akt* signaling by reducing *rab5* activation. *Oncotarget.* 6(38):41092-41107.
- Liu H, Mastriani E, Yan ZQ, Yin SY, Zeng Z, Wang H, Li QH, Liu HY, Wang X, Bao HX et al. 2016. *Sox7* co-regulates wnt/ β -catenin signaling with *axin-2*: Both expressed at low levels in breast cancer. *Sci rep.*
- Lo Muzio L, Lo Russo L, Falaschini S, Ciavarella D, Pentenero M, Arduino P, Favia G, Maiorano E, Rubini C, Pieramici T et al. 2009. Beta- and gamma-catenin expression in oral dysplasia. *Oral Oncol.* 45(6):501-504.

- Lo Muzio L, Pannone G, Leonardi R, Staibano S, Mignogna MD, De Rosa G, Kudo Y, Takata T, Altieri DC. 2003. Survivin, a potential early predictor of tumor progression in the oral mucosa. *J Dent Res.* 82(11):923-928.
- Logan CY, Nusse R. 2004. The wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20:781-810.
- Luo J, Chen J, Deng ZL, Luo X, Song WX, Sharff KA, Tang N, Haydon RC, Luu HH, He TC. 2007. Wnt signaling and human diseases: What are the therapeutic implications? *Lab Invest.* 87(2):97-103.
- Lyakhovitsky A, Barzilai A, Fogel M, Trau H, Huszar M. 2004. Expression of e-cadherin and beta-catenin in cutaneous squamous cell carcinoma and its precursors. *Am J Dermatopathol.* 26(5):372-378.
- MacDonald BT, He X. 2012. Frizzled and lrp5/6 receptors for wnt/beta-catenin signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4(12).
- Martinez C, Hernandez M, Martinez B, Adorno D. 2016. [frequency of oral squamous cell carcinoma and oral epithelial dysplasia in oral and oropharyngeal mucosa in chile]. *Rev Med Chil.* 144(2):169-174.
- Mauro A, Lipari L, Leone A, Tortorici S, Burruano F, Provenzano S, Gerbino A, Buscemi M. 2010. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in normal and pathological human oral mucosa. *Folia Histochem Cytobiol.* 48(4):555-563.
- Mendoza P, Diaz J, Silva P, Torres VA. 2014. Rab5 activation as a tumor cell migration switch. *Small gtpases.* United States.
- Mendoza P, Ortiz R, Diaz J, Quest AF, Leyton L, Stupack D, Torres VA. 2013. Rab5 activation promotes focal adhesion disassembly, migration and invasiveness in tumor cells. *J Cell Sci.* 126(Pt 17):3835-3847.
- Metcalfe C, Bienz M. 2011. Inhibition of gsk3 by wnt signalling--two contrasting models. *J Cell Sci.* 124(Pt 21):3537-3544.
- Miaczynska M, Pelkmans L, Zerial M. 2004. Not just a sink: Endosomes in control of signal transduction. *Curr Opin Cell Biol.* 16(4):400-406.
- Mishra R. 2012. Biomarkers of oral premalignant epithelial lesions for clinical application. *Oral Oncol.* 48(7):578-584.
- Misra A, Pandey C, Sze SK, Thanabalu T. 2012. Hypoxia activated egfr signaling induces epithelial to mesenchymal transition (emt). *PLoS One.* 7(11):e49766.
- Nakajima M, Fukuchi M, Miyazaki T, Masuda N, Kato H, Kuwano H. 2003. Reduced expression of axin correlates with tumour progression of oesophageal squamous cell carcinoma. *Br j cancer.* p. 1734-1739.
- Nasser W, Flechtenmacher C, Holzinger D, Hofele C, Bosch FX. 2011. Aberrant expression of p53, p16ink4a and ki-67 as basic biomarker for malignant progression of oral leukoplakias. *J Oral Pathol Med.* 40(8):629-635.
- Negi A, Puri A, Gupta R, Nangia R, Sachdeva A, Mittal M. 2015. Comparison of immunohistochemical expression of antiapoptotic protein survivin in normal oral mucosa, oral leukoplakia, and oral squamous cell carcinoma. *Patholog Res Int.* 2015:840739.

- Neville BW, Day TA. 2002. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin.* 52(4):195-215.
- Nusse R. 2012. Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4(5).
- Ochoa-Hernandez AB, Juarez-Vazquez CI, Rosales-Reynoso MA, Barros-Nunez P. 2012. [wnt-beta-catenin signaling pathway and its relationship with cancer]. *Cir Cir.* 80(4):389-398.
- Pannone G, Bufo P, Santoro A, Franco R, Aquino G, Longo F, Botti G, Serpico R, Cafarelli B, Abbruzzese A et al. 2010. Wnt pathway in oral cancer: Epigenetic inactivation of wnt-inhibitors. *Oncol Rep.* 24(4):1035-1041.
- Polanska H, Raudenska M, Gumulec J, Sztalmachova M, Adam V, Kizek R, Masarik M. 2014. Clinical significance of head and neck squamous cell cancer biomarkers. *Oral Oncol.* 50(3):168-177.
- Prgomet Z, Andersson T, Lindberg P. 2017. Higher expression of wnt5a protein in oral squamous cell carcinoma compared with dysplasia and oral mucosa with a normal appearance. *Eur J Oral Sci.* 125(4):237-246.
- Prgomet Z, Axelsson L, Lindberg P, Andersson T. 2015. Migration and invasion of oral squamous carcinoma cells is promoted by wnt5a, a regulator of cancer progression. *J Oral Pathol Med.* 44(10):776-784.
- Proffitt KD, Madan B, Ke Z, Pendharkar V, Ding L, Lee MA, Hannoush RN, Virshup DM. 2013. Pharmacological inhibition of the wnt acyltransferase porcn prevents growth of wnt-driven mammary cancer.
- Pukrop T, Klemm F, Hagemann T, Gradl D, Schulz M, Siemes S, Trumper L, Binder C. 2006. Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(14):5454-5459.
- Ramakrishna A, Shreedhar B, Narayan T, Mohanty L, Shenoy S, Jamadar S. 2013. Cyclin d1 an early biomarker in oral carcinogenesis. *J Oral Maxillofac Pathol.* 17(3):351-357.
- Ramasubramanian A, Ramani P, Sherlin HJ, Premkumar P, Natesan A, Thiruvengadam C. 2013. Immunohistochemical evaluation of oral epithelial dysplasia using cyclin-d1, p27 and p63 expression as predictors of malignant transformation. *J Nat Sci Biol Med.* 4(2):349-358.
- Renkonen J, Wolff H, Paavonen T. 2002. Expression of cyclo-oxygenase-2 in human tongue carcinoma and its precursor lesions. *Virchows Arch.* 440(6):594-597.
- Reya T, Clevers H. 2005. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature.* 434(7035):843-850.
- Reyes M, Rojas-Alcayaga G, Maturana A, Aitken JP, Rojas C, Ortega AV. 2015. Increased nuclear beta-catenin expression in oral potentially malignant lesions: A marker of epithelial dysplasia. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 20(5):e540-546.
- Riera P, Martinez B. 2005. [morbidity and mortality for oral and pharyngeal cancer in chile]. *Rev Med Chil.* 133(5):555-563.
- Rojas-Alcayaga G, Brignardello R, Espinoza I, Franco ME, Lobos N, Ortega-Pinto AV. 2010. Oral malignant tumours: A report on 728 cases in chile. *Acta Odontol Latinoam.* 23(2):136-142.
- Salahshor S, Woodgett JR. 2005. The links between axin and carcinogenesis. *J Clin Pathol.* 58(3):225-236.
- Sato K, Okazaki Y, Tonogi M, Tanaka Y, Yamane GY. 2002. Expression of beta-catenin in rat oral epithelial dysplasia induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Oral Oncol.* 38(8):772-778.

- Seabra MC, Wasmeier C. 2004. Controlling the location and activation of rab gtpases. *Curr Opin Cell Biol.* 16(4):451-457.
- Shiah SG, Hsiao JR, Chang WM, Chen YW, Jin YT, Wong TY, Huang JS, Tsai ST, Hsu YM, Chou ST et al. 2014. Downregulated mir329 and mir410 promote the proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma by targeting wnt-7b. *Cancer Res.* 74(24):7560-7572.
- Shibata M, Kodani I, Osaki M, Araki K, Adachi H, Ryoke K, Ito H. 2005. Cyclo-oxygenase-1 and -2 expression in human oral mucosa, dysplasias and squamous cell carcinomas and their pathological significance. *Oral Oncol.* 41(3):304-312.
- Silva P, Mendoza P, Rivas S, Diaz J, Moraga C, Quest AF, Torres VA. 2016. Hypoxia promotes rab5 activation, leading to tumor cell migration, invasion and metastasis. *Oncotarget.* 7(20):29548-29562.
- Silva P, Soto N, Diaz J, Mendoza P, Diaz N, Quest AF, Torres VA. 2015. Down-regulation of rab5 decreases characteristics associated with maintenance of cell transformation. *Biochem Biophys Res Commun.* 464(2):642-646.
- Simonsen A, Wurmser AE, Emr SD, Stenmark H. 2001. The role of phosphoinositides in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol.* 13(4):485-492.
- Sogabe Y, Suzuki H, Toyota M, Ogi K, Imai T, Nojima M, Sasaki Y, Hiratsuka H, Tokino T. 2008. Epigenetic inactivation of sfrp genes in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 32(6):1253-1261.
- Somsel Rodman J, Wandinger-Ness A. 2000. Rab gtpases coordinate endocytosis. *J Cell Sci.* 113 Pt 2:183-192.
- Song X, Wang S, Li L. 2014. New insights into the regulation of axin function in canonical wnt signaling pathway. *Protein cell.* p. 186-193.
- Speight PM. 2007. Update on oral epithelial dysplasia and progression to cancer. *Head neck pathol.* p. 61-66.
- Stenmark H. 2009. Rab gtpases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 10(8):513-525.
- Stenmark H, Parton RG, Steele-Mortimer O, Lutcke A, Gruenberg J, Zerial M. 1994. Inhibition of rab5 gtpase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *Embo j.* 13(6):1287-1296.
- Sun GY, Wu JX, Wu JS, Pan YT, Jin R. 2012. Caveolin-1, e-cadherin and beta-catenin in gastric carcinoma, precancerous tissues and chronic non-atrophic gastritis. *Chin J Cancer Res.* 24(1):23-28.
- Taelman VF, Dobrowolski R, Plouhinec JL, Fuentealba LC, Vorwald PP, Gumper I, Sabatini DD, De Robertis EM. 2010. Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell.* 143(7):1136-1148.
- Tanaka K, Kitagawa Y, Kadowaki T. 2002. Drosophila segment polarity gene product porcupine stimulates the posttranslational n-glycosylation of wingless in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 277(15):12816-12823.
- Taniguchi K, Roberts LR, Aderca IN, Dong X, Qian C, Murphy LM, Nagorney DM, Burgart LJ, Roche PC, Smith DI et al. 2002. Mutational spectrum of beta-catenin, axin1, and axin2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene.* 21(31):4863-4871.

- Torres VA, Mielgo A, Barbero S, Hsiao R, Wilkins JA, Stupack DG. 2010. Rab5 mediates caspase-8-promoted cell motility and metastasis. *Mol Biol Cell*. 21(2):369-376.
- Torres VA, Mielgo A, Barila D, Anderson DH, Stupack D. 2008. Caspase 8 promotes peripheral localization and activation of rab5. *J Biol Chem*. 283(52):36280-36289.
- Torres VA, Stupack DG. 2011. Rab5 in the regulation of cell motility and invasion. *Curr Protein Pept Sci*. 12(1):43-51.
- Tsuchiya R, Yamamoto G, Nagoshi Y, Aida T, Irie T, Tachikawa T. 2004. Expression of adenomatous polyposis coli (apc) in tumorigenesis of human oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 40(9):932-940.
- Tzeng HT, Wang YC. 2016. Rab-mediated vesicle trafficking in cancer. *J Biomed Sci*. 23(1):70.
- Uraguchi M, Morikawa M, Shirakawa M, Sanada K, Imai K. 2004. Activation of wnt family expression and signaling in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *J Dent Res*. 83(4):327-332.
- Valenta T, Hausmann G, Basler K. 2012. The many faces and functions of beta-catenin. *Embo j*. 31(12):2714-2736.
- van de Wetering M, Cavallo R, Dooijes D, van Beest M, van Es J, Loureiro J, Ypma A, Hursh D, Jones T, Bejsovec A et al. 1997. Armadillo coactivates transcription driven by the product of the drosophila segment polarity gene dtcf. *Cell*. 88(6):789-799.
- van der Waal I. 2014. Oral potentially malignant disorders: Is malignant transformation predictable and preventable? *Med oral patol oral cir bucal*. p. e386-390.
- Wang Z, Tacchelly-Benites O, Yang E, Ahmed Y. 2016. Dual roles for membrane association of drosophila axin in wnt signaling. *Plos genet*.
- Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. 2007. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*. 36(10):575-580.
- Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. 2008. Oral epithelial dysplasia classification systems: Predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med*. 37(3):127-133.
- Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G, Rosenblatt K, Duray P, Bittner M, Trent JM. 2002. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell*. 1(3):279-288.
- Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR, 3rd, Nusse R. 2003. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*. 423(6938):448-452.
- Willert K, Nusse R. 2012. Wnt proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 4(9):a007864.
- Yamamoto H, Komekado H, Kikuchi A. 2006. Caveolin is necessary for wnt-3a-dependent internalization of lrp6 and accumulation of beta-catenin. *Dev Cell*. 11(2):213-223.
- Yang PS, Yin PH, Tseng LM, Yang CH, Hsu CY, Lee MY, Horng CF, Chi CW. 2011. Rab5a is associated with axillary lymph node metastasis in breast cancer patients. *Cancer Sci*. 102(12):2172-2178.
- Yeh KT, Chang JG, Lin TH, Wang YF, Chang JY, Shih MC, Lin CC. 2003. Correlation between protein expression and epigenetic and mutation changes of wnt pathway-related genes in oral cancer. *Int J Oncol*. 23(4):1001-1007.

Yu MH, Luo Y, Qin SL, Zhong M. 2015. Increased expression of rab5a predicts metastasis and poor prognosis in colorectal cancer patients. *Int J Clin Exp Pathol.* 8(6):6974-6980.

10. ANEXO



ACTA N° 2018/03

PROTOCOLO DE ESTUDIO N°2018/04

1. Acta de Aprobación de Proyecto, titulado: "Papel de la GTPasa endosomal Rab5 en la actividad transcripcional de β -catenina en displasia oral".
2. Miembros del Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile participantes en la aprobación del Proyecto:

Dr. Eduardo Fernández
Presidente CEC

Dr. Marco Comejo
Miembro permanente CEC

Dra. Viviana Toro
Miembro alterno CEC

Sr. Roberto La Rosa
Miembro permanente CEC

Dra. Patricia Hernández
Miembro permanente CEC

Sra. Rebeca Galarce
Miembro permanente CEC

Dr. Juan Estay
Miembro permanente CEC

Dr. José Suazo
Miembro Alterno CEC

Dr. Ignacio Araya
Miembro Alterno CEC

3. Fecha de Aprobación: 03-07-2018
4. Título completo del proyecto: "Papel de la GTPasa endosomal Rab5 en la actividad transcripcional de β -catenina en displasia oral".
5. Investigador responsable: Montserrat Reyes Rojas
6. Institución Patrocinante: Universidad de Chile, Facultad de Odontología, Departamento de Patología y Medicina Oral.
7. Documentación Revisada:

- Proyecto y resumen
- Currículo del investigador responsable y coinvestigadores
- Nómina de los coinvestigadores y colaboradores directos de la investigación.
- Resumen Ejecutivo
- Carta de apoyo Directora de Departamento
- Carta de apoyo Jefa servicio
- Carta de Compromiso de IP
- Carta de intención de IP
- Declaración de conflicto de interés
- Consentimiento informado

8. Fundamentación de la aprobación

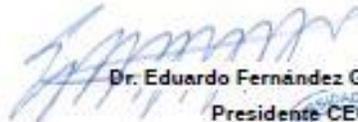
Este proyecto es aprobado luego que se realizaran las siguientes modificaciones en relación a los aspectos sugeridos por CEC:

RESPECTO A ASPECTOS ÉTICOS:

Eliminar la frase: Proyecto revisado y aprobado por el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y los datos del CEC al inicio del consentimiento debido a que induce la firma del voluntario.

El apartado "Aclaraciones" debe ir posterior a la explicación del proyecto.

En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, ha aprobado el Proyecto, titulado "Papel de la GTPasa endosomal Rab5 en la actividad transcripcional de β -catenina en displasia oral".


Dr. Eduardo Fernández G.
Presidente CEC



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
COMITÉ DE ETICA

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