



**Identificación de Marcadores TRA-I-60 y SOX en Muestras de Células Madres
Cancerosas de Pacientes Diagnosticados con Cáncer Oral**

Diego Andres Bustos

20571629907

Karen Trujillo

20571626563

Santiago Sotto Cabrera

20571614687

Universidad Antonio Nariño

Programa de Odontología

Facultad de Odontología

Neiva, Colombia

2021

**Identificación de Marcadores TRA-1-60 y SOX en Muestras de Células Madres
Cancerosas de Pacientes Diagnosticados con Cáncer Oral**

Santiago Sotto Cabrera

Proyecto de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:
Odontólogo

Director (a) Temático:

Biólogo Celular Dr. Manuel García Flores

Director Metodológico (a):

Dra. Claudia Lorena García Rojas MSc

Línea de Investigación:

Promoción y Prevención en Salud Oral.

Universidad Antonio Nariño

Programa de Odontología

Facultad de Odontología

Neiva, Colombia

2021

NOTA DE ACEPTACIÓN

El trabajo de grado titulado

_____.

Cumple con los requisitos para optar

Al título de _____.

Firma del Tutor

Firma Jurado

Firma Jurado

Neiva 21 de octubre de 2021.

Contenido

Pág.

1. Preliminares	XV
2. Resumen	1
3. Abstract	2
4. Introducción	3
5. Antecedentes.....	Error! Bookmark not defined.
6. Planteamiento del problema	7
7. Justificación.....	8
8. Ojetivos	Error! Bookmark not defined.
8.1. Objetivo General	10
8.2. Objetivos Específicos	10
9. Marco teórico	11
9.1. Generalidades	11
9.2. Marcadores de Células Madre	14
9.2.1. <i>SOX</i>	14
9.2.2. <i>TRA</i>	15
10. Diseño metodológico	17
10.1. Tipo De Estudio.....	17
10.2. Población	17
10.2.1. <i>Muestra</i>	17
10.3. Criterios	17
10.3.1. <i>Criterios De Inclusión</i>	17
10.3.2. <i>Criterios de exclusión</i>	18
10.4. Descripción del procedimiento	18

10.5.	Análisis de los datos	19
10.6.	Aspectos éticos de la investigación	19
11.	Resultados.....	21
11.1.	Marcador SOX.....	21
11.1.1.	<i>Bien diferenciado</i>	21
11.1.2.	<i>Moderadamente diferenciado</i>	24
11.1.3.	<i>Pobrementemente diferenciado</i>	28
11.2.	Marcador TRA.....	31
11.2.1.	<i>Bien diferenciado</i>	31
11.2.2.	<i>Moderadamente diferenciado</i>	34
11.2.3.	<i>Pobrementemente diferenciado</i>	36
11.3.	Cuantificación de la fluorescencia.....	38
11.4.	Niveles de marcadores y correlación	41
12.	Conclusiones.....	44
13.	Anexos.....	Error! Bookmark not defined.
14.	Referencias Bibliográficas	47

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Carcinoma de células escamosas.....	13
Figura 2. Estructura tridimensional Marcador SOX	15
Figura 3. Marcación para el anticuerpo SOX en carcinoma escamo celular BD 3596 C1-C2 FIT.....	22
Figura 4. Marcación para el anticuerpo SOX en carcinoma escamo celular BD 3596 C1-C2 DSRED	23
Figura 5 Marcación para el anticuerpo SOX en carcinoma escamo celular BD 3596 C3 FIT- DSRED	24
Figura 6. Marcación para el anticuerpo SOX en carcinoma escamo celular MD, 2223 C1-C2 DSRED	25
Figura 7. Marcación para el anticuerpo SOX en carcinoma escamo celular MD- SOX 2223 FIT- C1-C2	26
Figura 8. Marcación para el anticuerpo SOX en carcinoma escamo celular MD- SOX 2223 C3 FIT- DSRED MD	27
Figura 9. Marcación para el anticuerpo SOX en carcinoma escamo celular PD 3074- C1-C2 DSRED.....	28
Figura 10. Marcación para el anticuerpo SOX en carcinoma escamo celular PD- SOX 3074 FIT- C1-C2 ...	29
Figura 11. Marcación para el anticuerpo SOX en carcinoma escamo celular PD, 3074 C3 FIT- DSRED	30
Figura 12. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular 3596 BD, C1-C2 FITC	31
Figura 13. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular BD, 3596 C1-C2 DSRED	32
Figura 14. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular BD, 3596 C3 DSRED-FITC	33
Figura 15. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular MD-1975, C1-C2 DSRED	34
Figura 16. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular MD-1975, C3 DSRED-FITC	35
Figura 17. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular PD 6718, C1-C2 FITC	36
Figura 18. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular PD 6718, C1-C2 DSRED	37
Figura 19. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular PD 6718, C3 DSRED-FITC	38
Figura 20. Cuantificación de la fluorescencia mediante plots.	40
Figura 21 . Niveles de difeenciaació en estadios	41

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Resultados prueba Bartlett's	42
Tabla 2. Comparación grupos 1 y 3	42
Tabla 3. Comparación grupos 2 y 3	43

1. Preliminares

(Dedicatoria)

*A mis padres Javier Mauricio Sotto y
Carolina maría cabrera que los amo con todo
mi corazón, que, gracias a su esfuerzo,
hicieron posible este meta.*

*A Dios, mi mayor motor, por darme la fuerza
y perseverancia para culminar este proyecto.*

Agradecimientos

Quiero agradecer como primera medida a nuestro asesor temático el Dr. Manuel García Flórez y a la Dra. Claudia Lorena García Rojas, por su valioso acompañamiento en el desarrollo de este proyecto, por su alta competencia y conocimiento en nuestra materia de investigación, por su dedicación y comprensión y por creer en este proceso. Además, a mis compañeros Karen Trujillo y Diego Bustos por su apoyo económico ya que con ellos hicimos posible este tema de investigación

A la Universidad Antonio Nariño y a todos los profesores que hicieron parte de este proceso de formación y largo camino.

2. Resumen

Introducción: Los marcadores biológicos, “son alteraciones celulares, bioquímicas o moleculares que se pueden medir y evaluar objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. **Objetivo:** Identificar marcadores TRA-I-60 y SOX en células madre cancerígenas de pacientes diagnosticados con cáncer oral. **Materiales y Métodos:** Corresponde a una investigación de tipo experimental, por el método de Inmunofluorescencia, Los cortes de 5 µm serán desparafinados de forma rutinaria y posteriormente rehidratados. se realizará la recuperación antigénica en tampón 10 mm citrato buffer, Ph 6.0 durante 15 minutos en olla de presión eléctrica. las láminas se incubarán en H₂O₂ 1% por 15 minutos, para bloquear la peroxidasa endógena. En seguida se usará BSA 3% por una hora para bloquear la unión inespecífica. Las secciones se dejarán en incubación durante la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondientes (antiTral-60, antiSOX2), en una dilución 1:100 en BSA 1%. **Resultados:** La intensidad de la fluorescencia, mostro una aparente diferencia entre el grupo bien diferenciado (BD) y los otros dos grupos (PD Y MD). **Conclusiones:** se determinaron 3 tipos de grado histológico en la muestra; el cáncer escamocelular bien diferenciado, moderadamente diferenciado y pobremente diferenciado; identificando una mayor cantidad de núcleos en el carcinoma escamocelular Bien diferenciado.

Palabras clave: Carcinoma Escamocelular, SOX, TRA -1-60, ANOVA,

3. Abstract

Introduction: Biological markers, "are cellular, biochemical or molecular alterations that can be objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes or pharmacological responses to a therapeutic intervention.

Objective: To identify TRA-I-60 and SOX markers in cancer stem cells from patients diagnosed with oral cancer. **Materials and Methods:** It corresponds to an experimental type research, by Immunofluorescence method. 5 µm slices will be routinely deparaffinized and then rehydrated. antigenic recovery will be performed in 10 mm citrate buffer, Ph 6.0 for 15 minutes in an electric pressure cooker. the slides will be incubated in H₂O₂ 1% for 15 minutes, to block endogenous peroxidase. Then 3% BSA will be used for one hour to block nonspecific binding. The sections will be incubated overnight at 4°C with the corresponding primary antibody (antiTral-60, antiSOX2) at a 1:100 dilution in 1% BSA.

Results: The fluorescence intensity showed an apparent difference between the well differentiated group (BD) and the other two groups (PD and MD). **Conclusions:** 3 types of histological grade were determined in the sample; well differentiated, moderately differentiated and poorly differentiated squamous cell carcinoma; identifying a greater number of nuclei in the well differentiated squamous cell carcinoma.

Key words: Squamous cell carcinoma, SOX, TRA -1-60, ANOVA.

4. Introducción

La Clasificación Internacional de Enfermedades de la Organización Mundial de la Salud (OMS) define el cáncer oral como la neoplasia originada en los labios, cavidad oral, orofaringe, nasofaringe e hipofaringe. Esta misma organización, calcula la incidencia mundial del cáncer de labio y de cavidad bucal desde 4 casos por 100.000 habitantes, hasta 20 casos por 100.000 habitantes en algunas regiones (OMS, 2019)

El cáncer oral puede ser el resultado de una lesión primaria u originarse desde otra lesión tumoral distante o adyacente que conduzca a neoplasias malignas en las estructuras y tejidos de la cavidad bucal (metástasis). Todos los tipos de cáncer en la cavidad oral y la orofaringe se conocen como cáncer oral o cáncer de boca; entre ellos se encuentra el cáncer epitelial (especialmente células escamosas), cáncer de glándulas salivales, cáncer de tejidos blandos, cáncer hematolinfoide y carcinoma odontogénico; el carcinoma de células escamosas (SCC) constituye > 90% de todos los cánceres orales.

El proceso carcinogénico es complejo: intervienen genes y proteínas reguladoras del proceso neoplásico, desde división y proliferación celular, hasta destrucción tisular e invasión metastásica.

Algunos de estos genes y proteínas (marcadores biológicos) involucrados en estas fases, pueden ser útiles como marcadores de la patología y pueden orientar el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del Cáncer.

Los marcadores biológicos, “son alteraciones celulares, bioquímicas o moleculares que se pueden medir y evaluar objetivamente como un indicador de procesos biológicos

normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica; el siguiente proyecto tiene como objetivo determinar los índices de proliferación celular para establecer correlaciones con los estadios de cáncer escamocelular de cavidad oral bien diferenciado, moderadamente diferenciado y pobremente diferenciado.

5. Antecedentes

Esta Küstner (2019), realizó un estudio de caracterización de marcadores, con miras a poder realizar mejores diagnósticos de las lesiones precancerosas. Este término orienta hacia el potencial o riesgo de malignización (más o menos elevado) de la lesión en cuestión. Sin embargo, los datos que aportan el examen clínico y el estudio histopatológico rutinario no son totalmente satisfactorios. Por esta razón, numerosos investigadores estudian la posibilidad de emplear, de una forma selectiva, otros exámenes más específicos, que permitan valorar las alteraciones celulares (Chimenos K, 2014).

Para Toro & Cortes (2015), la capacidad de autorrenovación y la diferenciación son características de las células madre que varían entre los diferentes tipos celulares según el tejido en el que residen y el microambiente circundante. En estos procesos intervienen inhibidores del ciclo celular, genes implicados en reordenamientos cromosómicos, proteínas de desarrollo esenciales y vías de señalización específicas. La autorrenovación está regulada por diferentes mecanismos, siendo los más importantes las vías Wnt, Notch y Hedgehog, y los factores BMI – 1, p16^{Ink4a}, ARF, NANOG, OCT3 / 4, SOX2, HOXB4 y sus parálogos (Acevedo T & Cortés M, 2015).

Al igual que Badcock (2014), las células del carcinoma embrionario humano (CE) son las células madre de los teratocarcinomas y son componentes clave de los tumores de células germinales (TCG), se expresan en varios antígenos de glicoproteínas de alto peso molecular que se regulan negativamente tras la diferenciación. Uno de estos antígenos, definido por el anticuerpo monoclonal TRA-1-60, puede detectarse en el suero de pacientes con TCG y proporciona un complemento útil a los marcadores séricos

establecidos de gonadotropina coriónica humana y alfa-fetoproteína, especialmente en aquellos pacientes sin niveles elevados de suero humano. gonadotropina coriónica o alfa-fetoproteína. Para examinar la relación del antígeno definido por TRA-1-60 con antígenos similares definidos por otros anticuerpos monoclonales, hemos llevado a cabo análisis comparativos de inmunoprecipitación y transferencia Western de líneas celulares derivadas de GCT humanos con anticuerpos monoclonales TRA-1-60, TRA-1-81, GCTM2 y K21 (Badcock, Pigott, & Andrews, 2014)

6. Planteamiento del problema

El cáncer de cavidad oral es uno de los tipos de cáncer de cabeza y cuello más comunes que se presentan. Para hablar del cáncer, es necesario aclarar la presentación de éste como una enfermedad en el cuerpo humano. Aparece cuando existe un daño en el ADN, lo que implica que las células no pueden seguir cumpliendo sus funciones de crecimiento, desarrollo, formación y división.

Este daño que se presenta en el DNA puede ser heredado por los padres y producido a su vez por agentes “carcinógenos” o por ambas cosas. Los factores externos podría ser los responsables del 90% de los cánceres. La mitad de estos se producen principalmente por el tabaquismo, el alcoholismo, el sobrepeso o la inactividad física.

Una vez pronunciado el COCE las alteraciones morfológicas, también conocidas como desordenes altamente malignos (DPM) desarrollan un potencial maligno sobre el carcinoma, por lo cual es importante aclarar el papel de las células madre en esta neoplasia, para así poder conocer la influencia de éstas en la diferenciación y progresión del cáncer oral.

El cáncer oral tiene una etiología multifactorial y por lo tanto queremos investigar ¿cuál es el nivel de expresión de los marcadores TRA-1-60 y SOX en la diferenciación y progresión de las células progenitoras en el desarrollo del cáncer oral? Saber si la expresión de estas células está relacionada con la agresividad del tumor para clasificarlo; bien diferenciado, moderadamente diferenciado, pobremente diferenciado.

7. Justificación

El cáncer oral incluye carcinoma de células escamosas orales (OSCC), cabeza y cuello. El OSCC, es un cáncer altamente heterogéneo genéticamente, es la sexta neoplasia maligna más importante, con una prevalencia mundial anual de 275.000 casos. El OSCC puede recidivar incluso después de décadas de cirugía, radiación, quimioterapia y terapia dirigida. Los factores de riesgo identificados para este tipo de cáncer incluyen masticar tabaco a largo plazo, fumar tabaco e ingerir bebidas alcohólicas. Es por eso por lo que la identificación de los mecanismos responsables de la OSCC es un tema de suma importancia para desarrollar tratamientos más efectivos y mejorar la tasa de supervivencia de los pacientes que sufren esta enfermedad (HERZUMA, 2020).

Estudios previos han demostrado que algunas proteínas se expresan como marcadores putativos de CSC en muestras tumorales y líneas celulares de OSCC. Por lo tanto, estos marcadores podrían utilizarse para detectar y enfocar CSCs en el tumor OSCC. (SEOM, 2020). Hay múltiples marcadores en las células madre que juegan un papel clave en la OSCC. Además, estos marcadores están asociados con otros marcadores o vías que conducen a la displasia epitelial. Por lo tanto, se necesitan más estudios para investigar estos marcadores.

El avance en oncología molecular ha mejorado el conocimiento de la tumorigénesis; sin embargo, la utilización práctica de estos marcadores genéticos en el diagnóstico de displasia oral sigue sin resolverse. Aunque se han estudiado muchas moléculas como marcadores intermedios, ninguna de ellas se ha utilizado con fines diagnósticos en la práctica clínica habitual. Hay estudios limitados que investigan la correlación de los marcadores genéticos en el nivel molecular con los índices clínicos y los resultados.

Por lo tanto, se necesitan más estudios para promover estos marcadores para que puedan ser utilizados rutinariamente con mayor sensibilidad, previsibilidad y reproducibilidad.

8. Objetivos

8.1. Objetivo General

Identificar marcadores TRA-I-60 y SOX en células madre cancerígenas de pacientes diagnosticados con cáncer oral.

8.2. Objetivos Específicos

- Identificar las células madre en las muestras de cáncer oral.
- Medir los niveles de expresión de los marcadores, TRA-I-60 y SOX en las células madre.
- Correlacionar los niveles de expresión en las muestras que tuvieron células madre.
- Establecer niveles de marcadores en las muestras de células madre.

9. Marco teórico

9.1. Generalidades

El cáncer es uno de los problemas que más aqueja a la salud pública. A su vez es una patología que constituye un gran reto en la investigación biomédica. A pesar de los grandes avances logrados hasta el presente, tanto en lo concerniente a los mecanismos moleculares implicados en su origen y evolución, como en el desarrollo de nuevos tratamientos más específicos y efectivos, esta enfermedad todavía no se ha logrado controlar plenamente (OMS, 2021).

Dentro de esta realidad se sigue investigando y hoy resaltan los estudios con las células madre, las cuales han abierto nuevas posibilidades al confirmarse que estas células, en su forma malignizada, constituyen una subpoblación del conjunto de todas las células que forman un tumor canceroso.

En este sentido, la presentación del marco teórico estará enfocada en poder establecer unos antecedentes que muestren el estado del arte sobre este tema en cuanto investigación se refiere. En primer lugar, el estudio de Mohajertehran Et Al (2018) realiza unas disertaciones sobre los panoramas en los cuales se encuentra el COCE, a su vez pone en manifiesto la promesa de los marcadores TRA-I-60 y SOX en las células madre que se encuentran en diagnóstico, así como el tratamiento de la displasia epitelial y el carcinoma de células escamosas orales (Mohajertehran, Sahebkar, & Zare, 2018).

En el caso del cáncer oral, se presenta como el carcinoma oral de células escamosas, también conocido como COCE. Este cáncer es el que más se presenta en la cavidad oral, tanto así que la Organización Mundial de la Salud, (2005) la define como una neoplasia epitelial invasiva con diferentes grados de diferenciación escamosa y propensa metastatizar hacia los ganglios linfáticos en un estado temprano, teniendo presencia constante entre los 50 y 60 años de vida.

La presencia de este cáncer sobre la salud pública ha instaurado que se atienda el caso de manera más rigurosa, ya que cantidad de casos han aumentado en esta última década y se esperan, según estudio de la Fuente, J.; Muñoz, P.; Patrón, C.; Rojas, H.; Ramírez, M.; & Acosta, L. (2014) que para el 2020 se presenten 15 millones de nuevos casos.

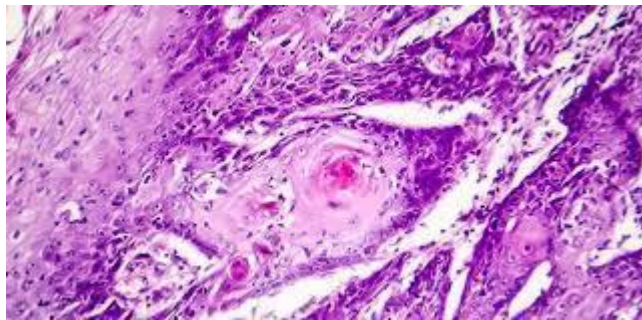
Por tal motivo es importante resaltar esta problemática en el campo de la salud bucal, ya que este cáncer puede tener factores de riesgo que actúan como factores carcinógenos. Así mismo el COCE puede presentarse por lesiones o algunas condiciones precancerosas. Es de importancia poder resaltar que los hábitos alimenticios, las bebidas y el consumo de tabaco hacen que el cáncer se presente como una secuencia de mutaciones, también del intercambio de entre varios carcinógenos y promotores.

Una vez pronunciado el COCE las alteraciones morfológicas, también conocidas como desordenes altamente malignos (DPM) desarrollan un potencial maligno sobre el carcinoma, por lo cual es importante aclarar el papel de las células madre en esta neoplasia, para así poder conocer la influencia de éstas en la diferenciación y progresión del cáncer oral.

Esto se debe a que los estudios que se han venido realizando para tratar de salvar la vida de los pacientes que sufren de esta enfermedad le han apostado a método más efectivos, sin embargo esto se puede saber gracias a los procesos que se lleven a cabo: las capacidades diagnosticadas de los pacientes, la eficacia de los tratamientos que a su vez tienen una dependencia de las estrategias terapéuticas, así como del riesgo de recaída, el tiempo del diagnóstico y la metástasis de ganglios linfáticos. (Patel, Atul S, & Jashwantbhai S, 2014)

El carcinoma de células escamosas

Figura 1. Carcinoma de células escamosas



Nota. Carcinoma oral de células escamosas (Shutterstock), Oreamuno (2017)

Es la entidad maligna de mayor frecuencia en la región orofacial (alrededor del 90%), y aunque su incidencia es menor a la de otros tipos de cáncer, su importancia radica en su mortalidad y las secuelas físicas y psicológicas que origina. Puede presentarse como carcinoma *in situ* (no invasivo) o poseer características invasivas. Histológicamente los carcinomas invasivos son bien diferenciados, moderadamente diferenciados, poco diferenciados o indiferenciados (Sidrón A & Pérez M.L, 2015).

9.2. Marcadores de Células Madre

Los marcadores de células madre son productos de expresión génica que son únicos relacionadas con las células madre. Las células madre también se identifican como únicas ciertos marcadores (Fernández, Moreno, & Prósper, 2008).

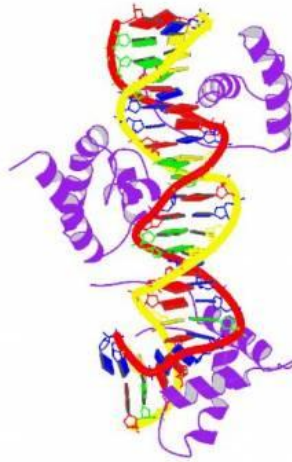
Los marcadores únicos de las células madre se sugieren a ser los componentes de una red reguladora básica de factores en las células madre embrionarias que son responsables de la autorrenovación, mantenimiento de estado indiferenciado y reprogramación de células adultas (Hernán & Dorticós B, 2004).

Similares a las células madre embrionarias, las células madre cancerosas en el cáncer de cavidad oral expresar muchas de estas proteínas básicas de la red reguladora (Alcalá P, Barrera P, & Castañeda Y, 2014)

9.2.1. SOX

SOX es un factor de transcripción de caja HMG relacionado con SRY de SOX familia de genes que juega un papel fundamental en el mantenimiento de ESC e inducir reprogramación celular [50]. SOX media en varias vías de transducción de señales como la proliferación celular, el tallo (p. Ej., Aumento de la autorrenovación), tumorigénesis, resistencia apoptótica, migración, invasión y resistencia a la quimioterapia, que contribuye tanto al desarrollo normal como a los procesos patológicos como el SCC (ROISMAN & SLAVUTSKY, 2014).

Figura 2. Estructura tridimensional Marcador SOX

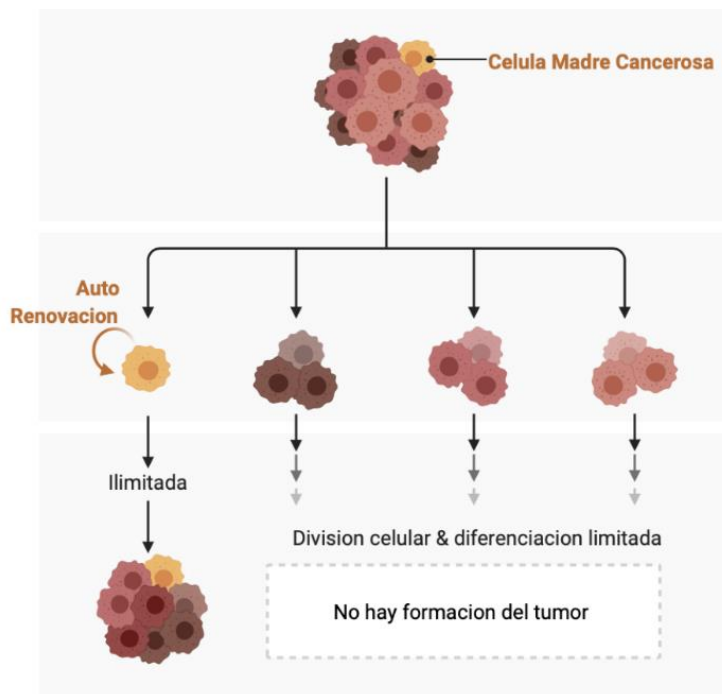


Fuente: <https://www.agenciasinc.es/Noticias/La-proteina-SOX2-posible-marcador-para-conocer-la-evolucion-y-la-eficacia-de-farmacos-en-sarcomas>.

9.2.2. TRA

TRA -1-60 es un epítipo de carbohidrato resistente a neuraminidasa expresado en podocalyxin-like 1, que pertenece a la familia de sialomucina relacionada con CD34, y se expresa en la superficie de células madre embrionarias humanas (ESC) y es pluripotente inducido células madre (células iPS), que se regulan a la baja a medida que se diferencian de células (Nakata, Saito, & Maruyama, 2019)

MARCADORES SOX2 Y TRA -60



Solamente las celulas madre cancerosas tienen la habilidad para formar tumores

10. Diseño metodológico

Es una investigación experimental porque se van a realizar parámetros cuantificables.

10.1. Tipo De Estudio

Esta investigación es de tipo experimental, en la cual se tienen diferentes grupos donde se comparan parámetros cuantificables.

10.2. Población

36 muestras de láminas en parafina que fueron recolectadas de pacientes diagnosticados con cáncer oral.

10.2.1. Muestra

Corresponde a 36 muestras de pacientes con cáncer oral.

10.3. Criterios

10.3.1. Criterios De Inclusión

Se seleccionaron los pacientes que fueron atendidos en el hospital universitario Hernando Moncaleano de Neiva con cáncer en cavidad oral como faringe, laringe, lengua, epiglotis en el año 2014-2016.

10.3.2. Criterios de exclusión

Todos los pacientes que no fueron diagnosticados con cáncer en cavidad oral. Se excluyeron también los pacientes con cáncer de labio ya que está relacionado con la exposición solar y otros factores.

10.4. Descripción del procedimiento

Las muestras que se van a utilizar en esta investigación fueron clasificadas de acuerdo con lineamientos internacionales, dados por el Dr. Fernando Bolaños, Patólogo Adscrito al Departamento de Patología del HUHMP

10.4.1. Toma de la muestra, procesamiento de la muestra

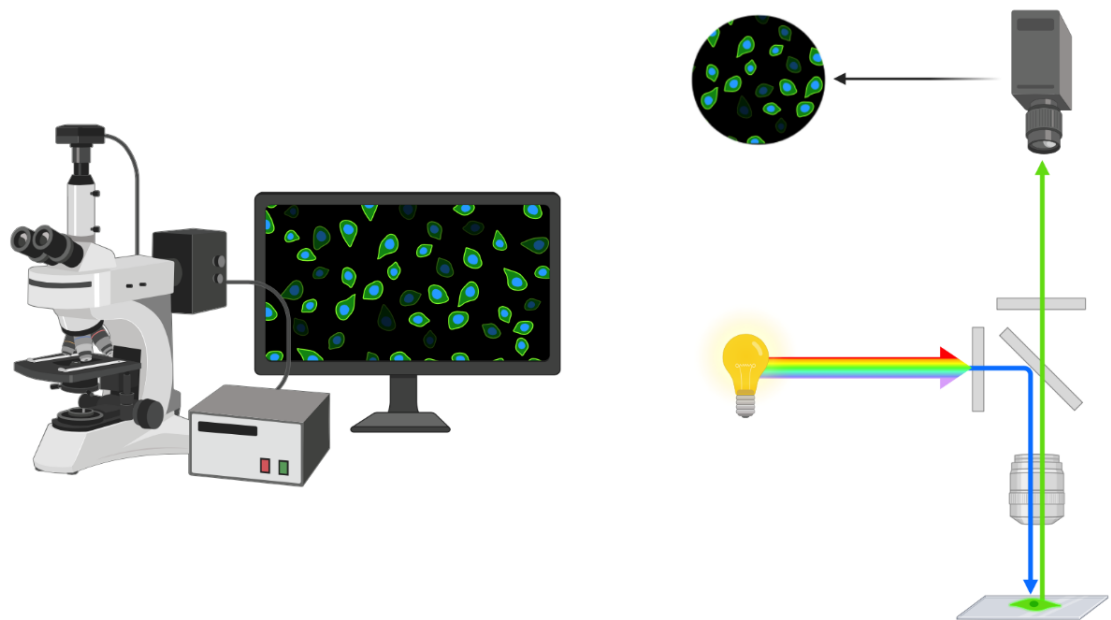
Los cortes de 5 μm serán desparafinados de forma rutinaria y posteriormente rehidratados. se realizará la recuperación antigénica en tampón 10 mm citrato buffer, Ph 6.0 durante 15 minutos en olla de presión eléctrica. las láminas se incubarán en H₂O₂ 1% por 15 minutos, para bloquear la peroxidasa endógena. En seguida se usará BSA 3% por una hora para bloquear la unión inespecífica. Las secciones se dejarán en incubación durante la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondientes (antiTral-60, antiSOX2), en una dilución 1:100 en BSA 1%.

Los controles negativos se van a incubar solamente con BSA 1% sin el anticuerpo secundario complementario. Se usará el anticuerpo secundario policlonal antimouse desarrollado en conejo, acoplado a la enzima HRP (peroxidasa de rábano). Las reacciones serán reveladas con el complejo revelador dako en visión. Para esto se hará una

combinación 1 ml de tampón sustrato con 1 gota (20ml) de cromógeno líquido dab (diaminobenzidina) (dakocytomation inc., carpenteria, ca, usa).

10.5. Análisis de los datos

La intensidad de las reacciones serán medidas en pixeles utilizando el programa Image J. Se compararán la expresión de los marcadores con el grupo de control de tejido sano. Se tendrán en cuenta las medidas de la intensidad en pixeles y se compararán diferencias entre los grupos utilizando un análisis de varianza.



10.6. Aspectos éticos de la investigación

Este estudio se clasifica en la categoría de investigación con riesgo mínimo: estudios prospectivos que emplean el registro de datos a través de procedimientos comunes consistentes en: exámenes físicos o psicológicos de diagnóstico o tratamientos rutinarios,

entre los que se consideran: pesar al sujeto, de conformidad con el artículo 47-48 (de la investigación en órganos, tejidos y sus derivados, productos y cadáveres de seres humanos) y del artículo 11 siendo esta investigación sin riesgo. Contemplado en la resolución 8430 de 1993. la realización de este trabajo está acorde con las normas rectoras de la investigación clínica vigente a nivel nacional e internacional, de la declaración de Helsinki de 1964 adaptada a su última enmienda en 2004.

Esta investigación ofrecerá nuevos datos sobre la participación de células progenitoras en la etiología del cáncer oral, área aun poco explorada que merece atención, por la gravedad de esta patología y su etiología multifactorial; el hospital universitario Hernando Moncaleano al brindarnos acceso a los datos de las historias clínicas y muestras de tejido en parafina, ya almacenadas nos brindará un banco de tejidos con gran información biológica latente que merece ser estudiada. Por otro lado, con este proyecto se plantea una integración importante de la investigación clínica y básica, será desarrollado por un grupo interdisciplinario que permitirá un trabajo desde varias ópticas. Además, la presentación en congresos y en publicaciones permitirá divulgación de los resultados aquí obtenidos.

Por tratarse de un estudio retrospectivo no se tendrá contacto en ningún momento con los pacientes, y todas las variables sociodemográficas y biológicas serán manejadas de forma ética y responsable, de acuerdo con los lineamientos contenidos en el acuerdo de confidencialidad.

11. Resultados

En esta etapa ya tenemos cortado el material para realizar los análisis histológicos, de las 36 muestras con los bloques de biopsias de pacientes con cáncer de cavidad oral se escogieron 20 muestras. De esas 36 muestras se excluyeron de los pacientes que no fueron diagnosticados con cáncer en cavidad oral y los pacientes con cáncer de labio ya que está relacionado con la exposición solar y otros factores.

De las 20 muestras se cortaron 120 láminas con tejido teñido con Hematoxilina y Eosina y Láminas en Blanco quedando listas para la realización de las reacciones de inmunofluorescencia para cuando tengamos los anticuerpos.

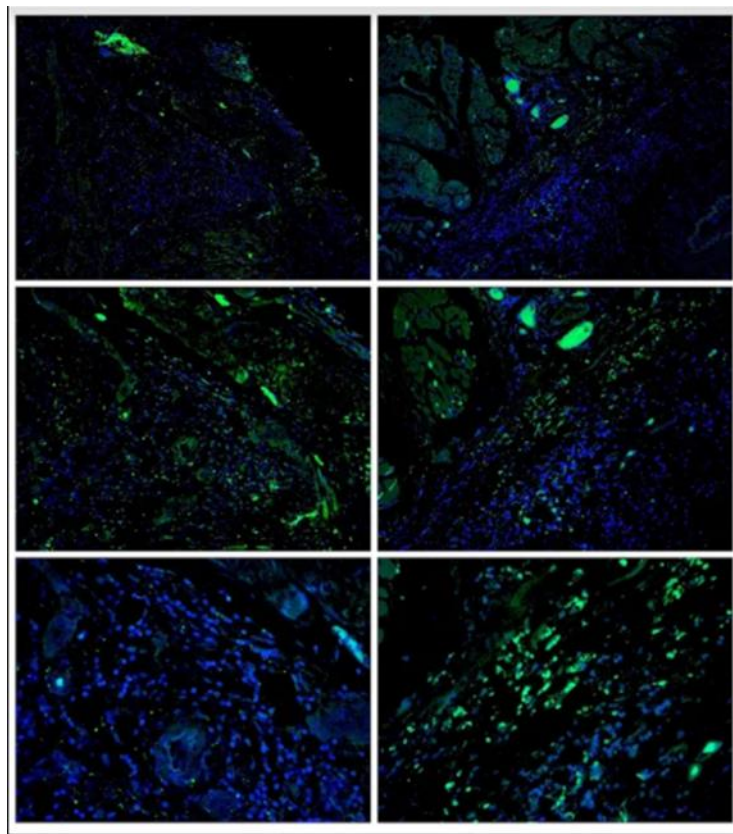
11.1. Marcador SOX

La marcación para el anticuerpo SOX en carcinoma escamo celular pobremente diferenciado

11.1.1. Bien diferenciado

En el estadio bien diferenciado fue posible identificar algunas perlas de queratina, totalmente desarrolladas densas y eosinofilias, rodeados por células en la región externa.

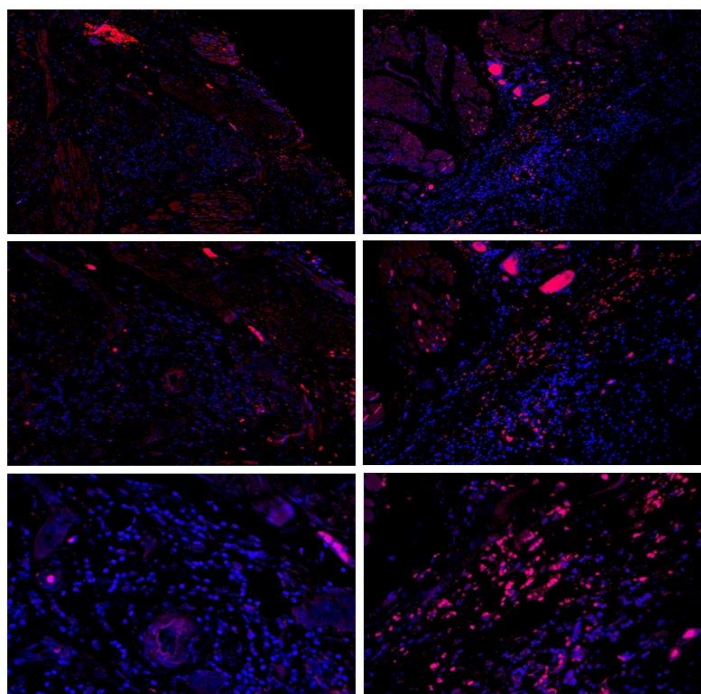
Figura 3. Marcación para el anticuerpo SOX en carcinoma escamo celular BD 3596 C1-C2 FIT



Fuente: Programa Image J

La figura 3 muestra la La marcación con Inmunofluorescencia de color verde de las células BD entre el campo C1-C2, de la plancha 3596.

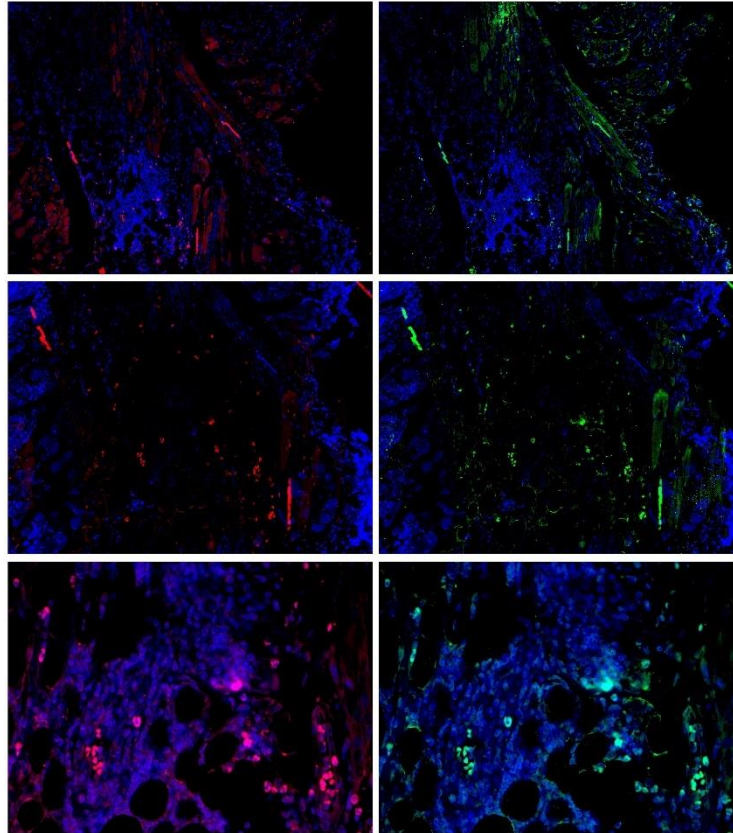
Figura 4. Marcación para el anticuerpo SOX en carcinoma escamo celular BD 3596 C1-C2 DSRED



Fuente: Programa Image J

La figura 4 muestra la marcación con Inmunofluorescencia de color rojo de las células BD entre el campo C1-C2, de la plancha 3596

Figura 5 Marcación para el anticuerpo SOX en carcinoma escamo celular BD 3596 C3 FIT- DSRED



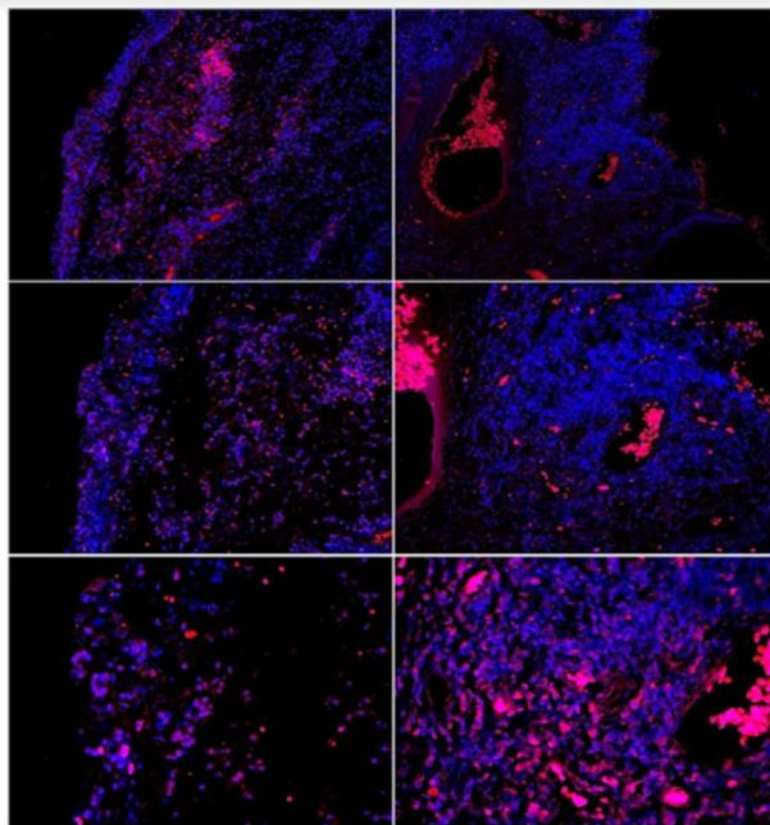
Fuente: Programa Image J

La figura 5 muestra la marcación con Inmunofluorescencia color rojo/verde de las células BD en el campo C3, de la plancha 3596

11.1.2. Moderadamente diferenciado

En el estadio moderadamente diferenciado se destaca la infiltración de células, probablemente neutrófilos, hacia la parte central los cuales comienzan a formar espacios entre la región central. La región periférica de la perla comienza a presentar infiltración celular

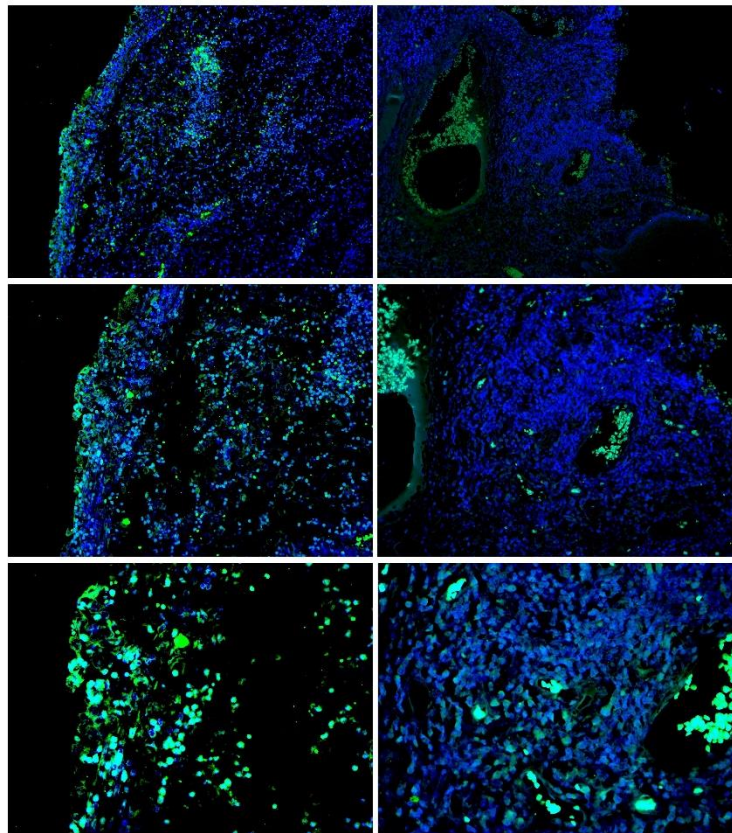
Figura 6. Marcación para el anticuerpo SOX en carcinoma escamo celular MD, 2223 C1-C2 DSRED



Fuente: Programa Image J

La figura 6 muestra la marcación con Inmunofluorescencia color rojo de las células MD en el campo C1-C2 de la plancha 2223

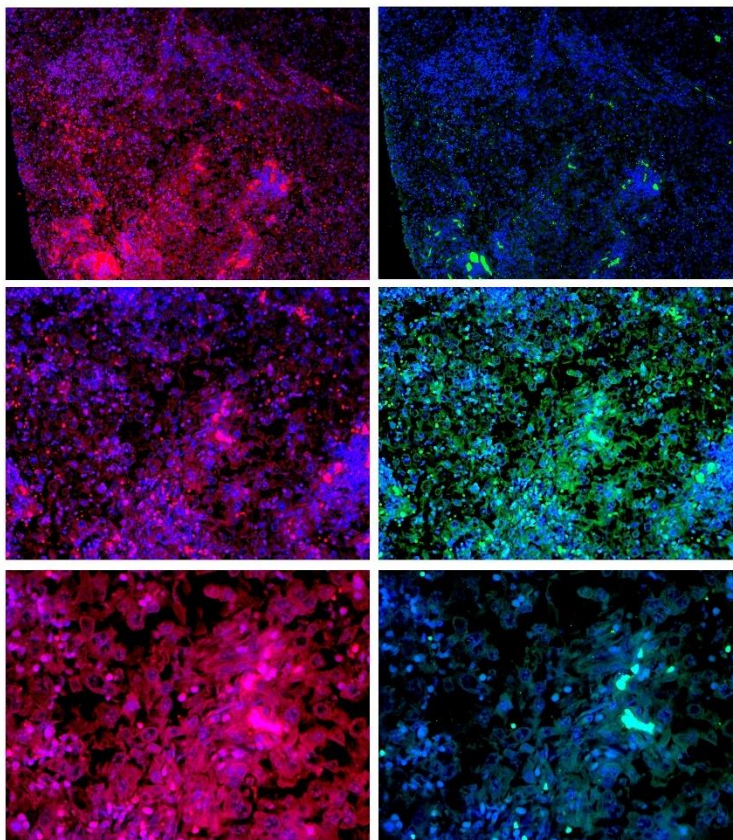
Figura 7. Marcación para el anticuerpo SOX en carcinoma escamo celular MD- **SOX 2223 FIT- C1-C2**



Fuente: Programa Image J

La figura 7 muestra la marcación con Inmunofluorescencia verde de las células MD en el campo C1-C2 de la plancha 2223

Figura 8. Marcación para el anticuerpo SOX en carcinoma escamo celular MD- **SOX 2223 C3 FIT- DSRED MD**



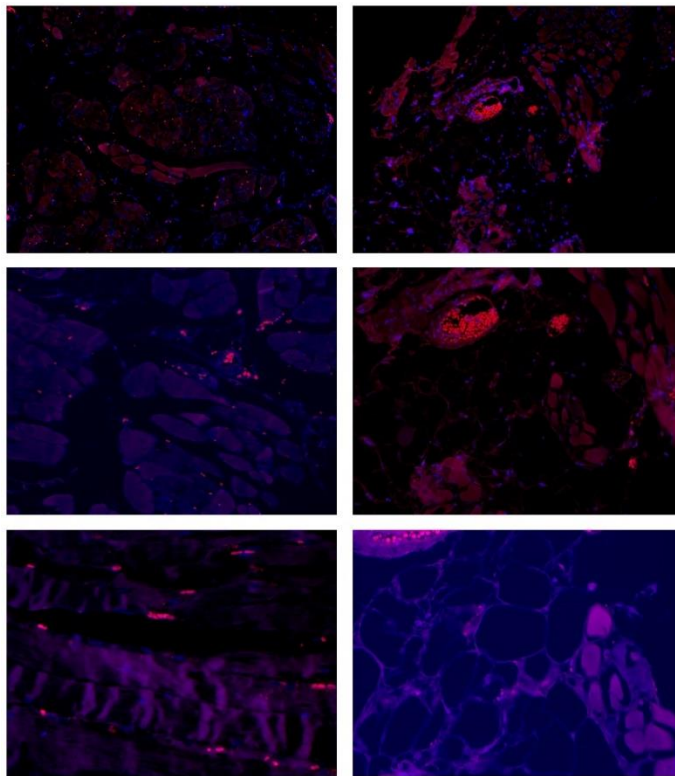
Fuente: Programa Image J

La figura 8 muestra la marcación con Inmunofluorescencia color rojo/verde de las células MD en el campo C3, de la plancha 3596

11.1.3. Pobremente diferenciado

Se destacan neutrófilos, células inflamatorias, linfocitos entre otros y el tejido se torna más basófilo, y su arquitectura se ha perdido totalmente.

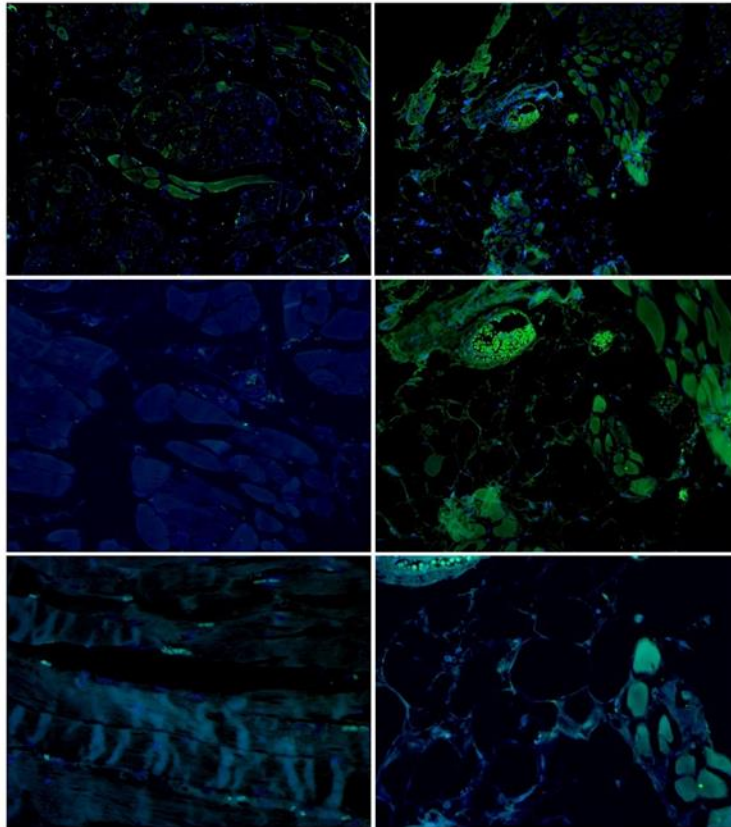
Figura 9. Marcación para el anticuerpo SOX en carcinoma escamo celular PD 3074- C1-C2 DSRED



Fuente: Programa Image J

La figura 9 muestra la marcación con Inmunofluorescencia color rojo de las células PD en el campo C1-C2, de la plancha 3074

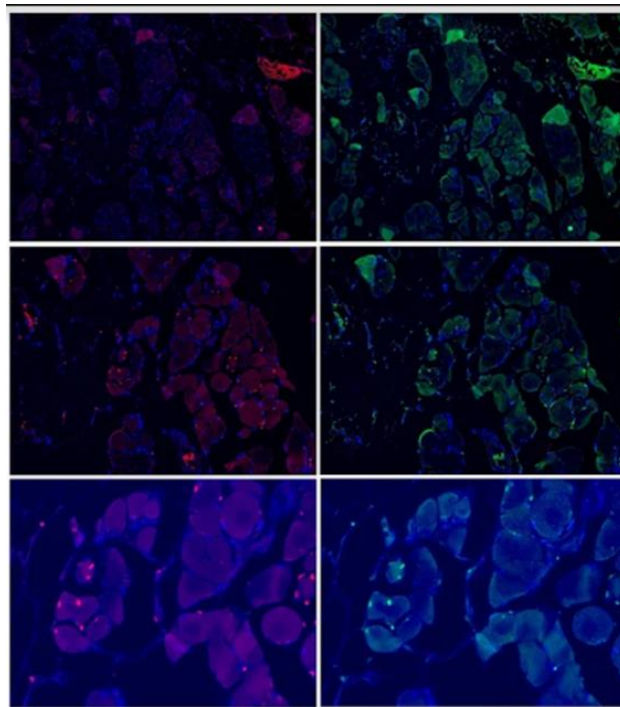
Figura 10. Marcación para el anticuerpo SOX en carcinoma escamo celular PD- SOX 3074 FIT- C1-C2



Fuente: Programa Image J

La figura 10 muestra la marcación con Inmunofluorescencia verde de las células PD en el campo C1-C2, de la plancha 3074

Figura 11. Marcación para el anticuerpo SOX en carcinoma escamo celular PD, 3074 **C3 FIT- DSRED**



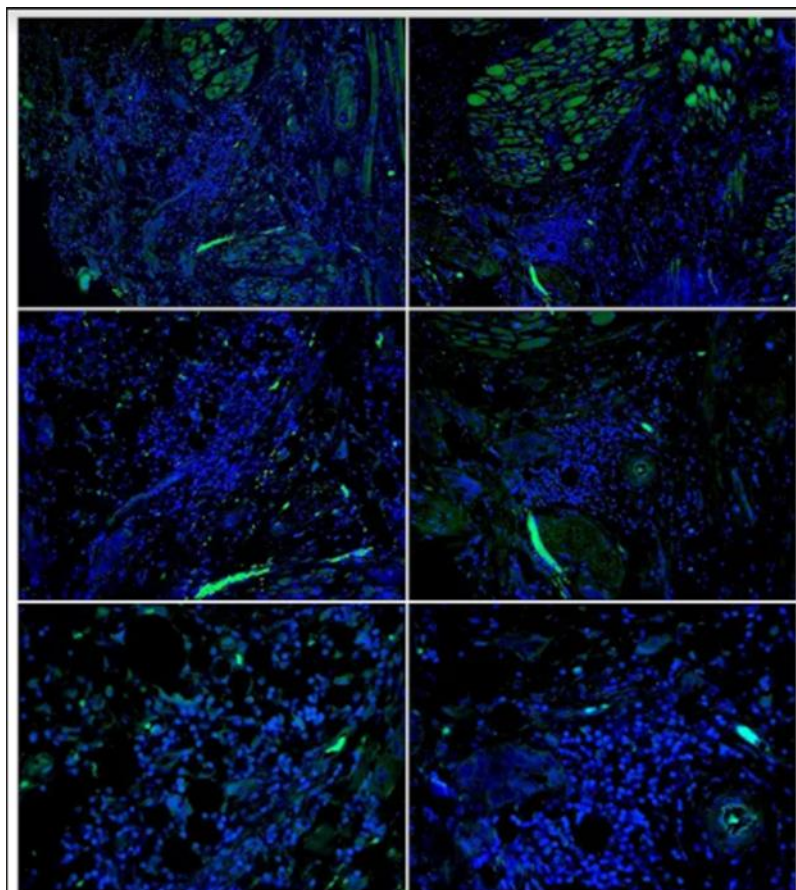
Fuente: Programa Image J

La figura 11 muestra la marcación con Inmunofluorescencia color rojo/verde de las células PD en el campo C3, de la plancha 3074

11.2. Marcador TRA

11.2.1. Bien diferenciado

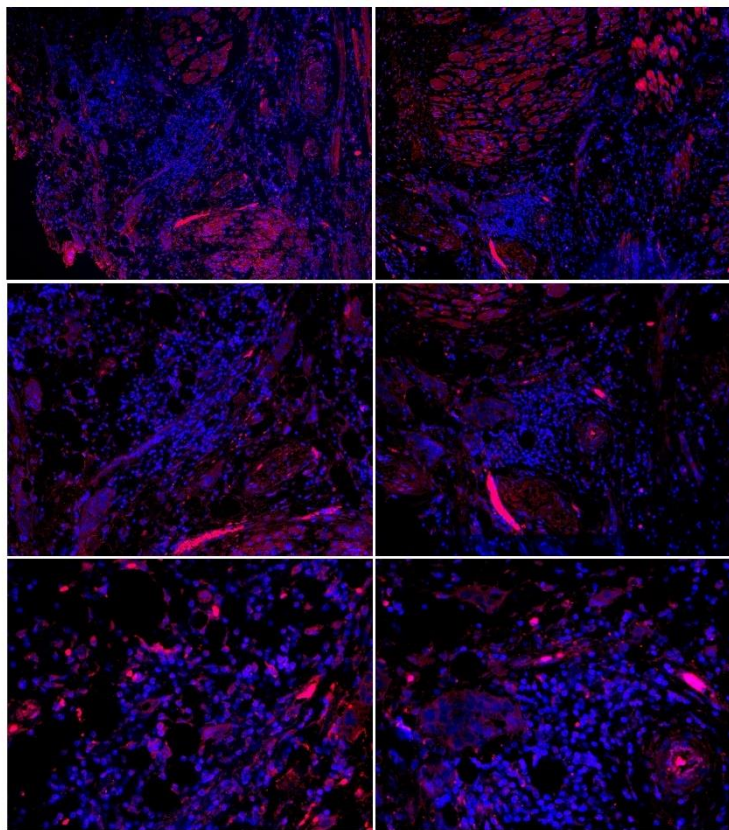
Figura 12. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular 3596 BD, C1-C2 FITC



Fuente: Programa Image J

La figura 12 muestra la marcación con Inmunofluorescencia de color verde de las células BD entre el campo C1-C2, de la plancha 3596 con el marcador TRA-I-60

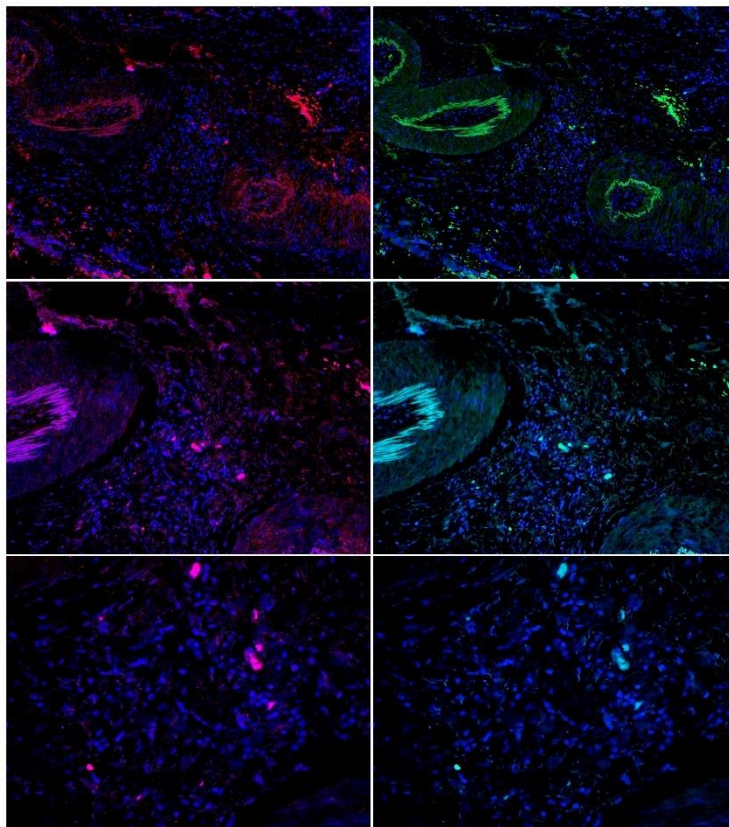
Figura 13. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular BD, 3596 C1-C2 DSRED



Fuente: Programa Image J

La figura 13 muestra la marcación con Inmunofluorescencia de color rojo de las células BD entre el campo C1-C2, de la plancha 3596 para el marcador TRA-I-60

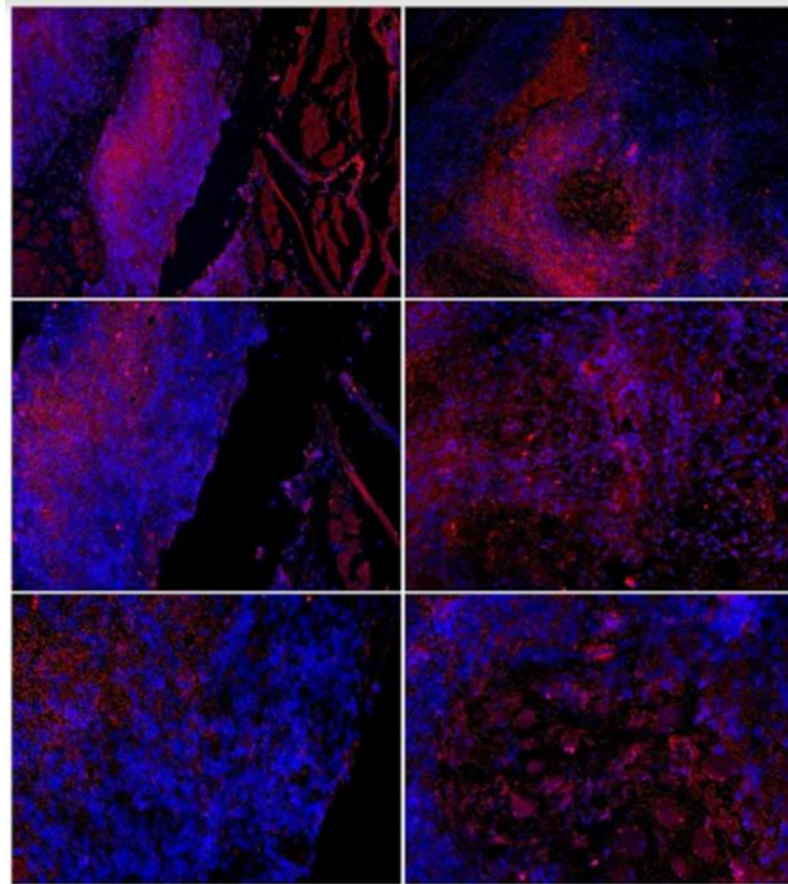
Figura 14. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular BD, 3596 C3 DSRED-FITC



La figura 14 muestra la marcación con Inmunofluorescencia color rojo/verde de las células BD en el campo C3, de la plancha 3596 con el marcador TRA-I-60

11.2.2. Moderadamente diferenciado

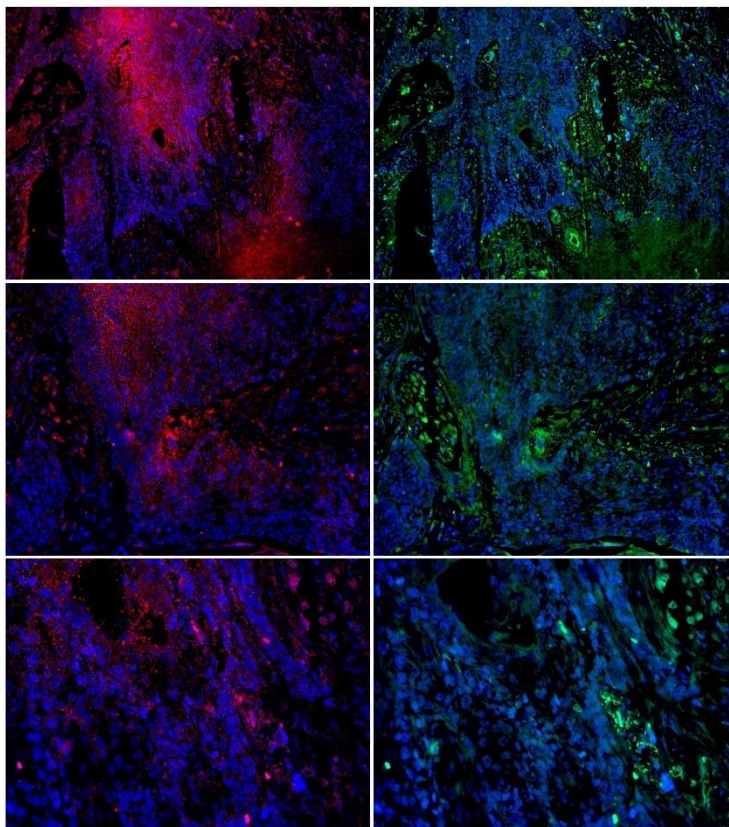
Figura 15. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular MD-1975, C1-C2 DSRED



Fuente: Programa Image J

La figura 15 muestra la marcación con Inmunofluorescencia de color rojo de las células MD entre el campo C1-C2, de la plancha 1975 para el marcador TRA-I-60

Figura 16. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular MD-1975, C3 DSRED-FITC

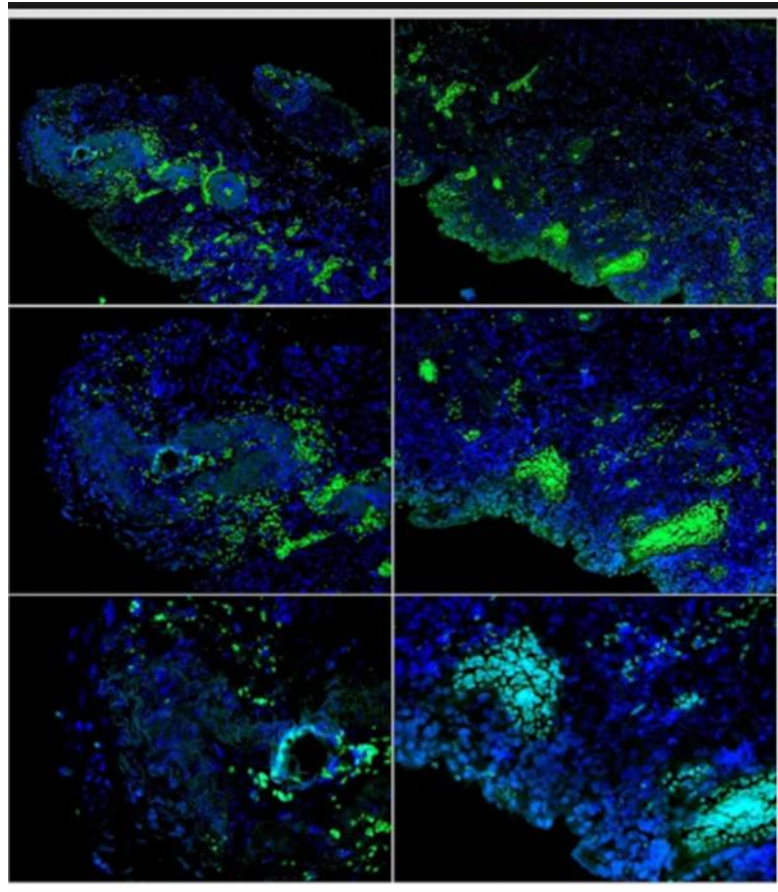


Fuente: Programa Image J

La figura 16 muestra la marcación con Inmunofluorescencia color rojo/verde de las células MD en el campo C3, de la plancha 1975 con el marcador TRA-I-60

11.2.3. Pobrementemente diferenciado

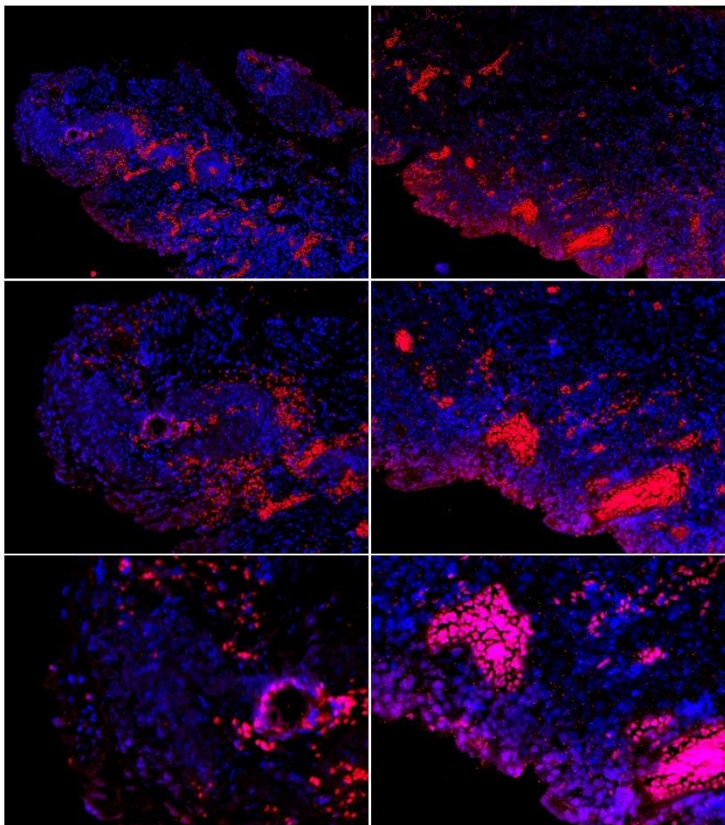
Figura 17. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular PD 6718, C1-C2 FITC



Fuente: Programa Image J

La figura 17 muestra la marcación con Inmunofluorescencia verde de las células PD en el campo C1-C2, de la plancha 6718 con el marcador TRA-I-60

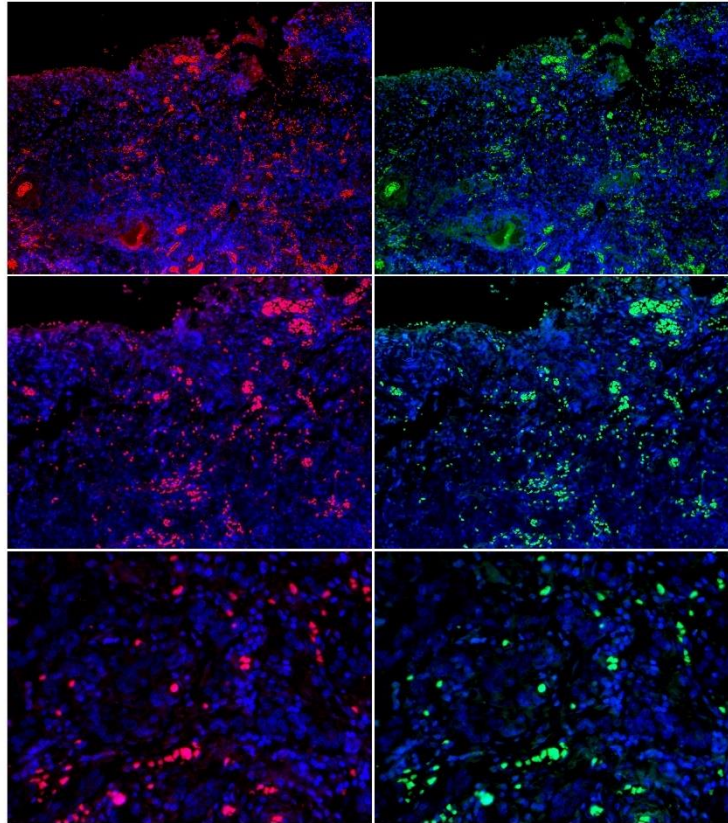
Figura 18. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular PD 6718, C1-C2 DSRED



Fuente: Programa Image J

La figura 18 muestra la marcación con Inmunofluorescencia color rojo de las células PD en el campo C1-C2, de la plancha 6718 con el marcador TRA-I-60

Figura 19. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular PD 6718, C3 DSRED-FITC



Fuente: Programa Image J

La figura 19 muestra la marcación con Inmunofluorescencia color rojo/verde de las células PD en el campo C3, de la plancha 6718 con el marcador TRA-I-60

11.3. Cuantificación de la fluorescencia

Por tratarse de material proveniente de biopsias de pacientes previamente fijadas con formol, incluidas en parafina y sometidas a desnaturalización de las proteínas, es difícil obtener una buena extracción de estas para realizar técnicas más precisas como el Western Blotting que requieren un preparado fresco y preservado con inhibidores de proteasas para tener buenos resultados. Por esta razón se cuantifico la fluorescencia

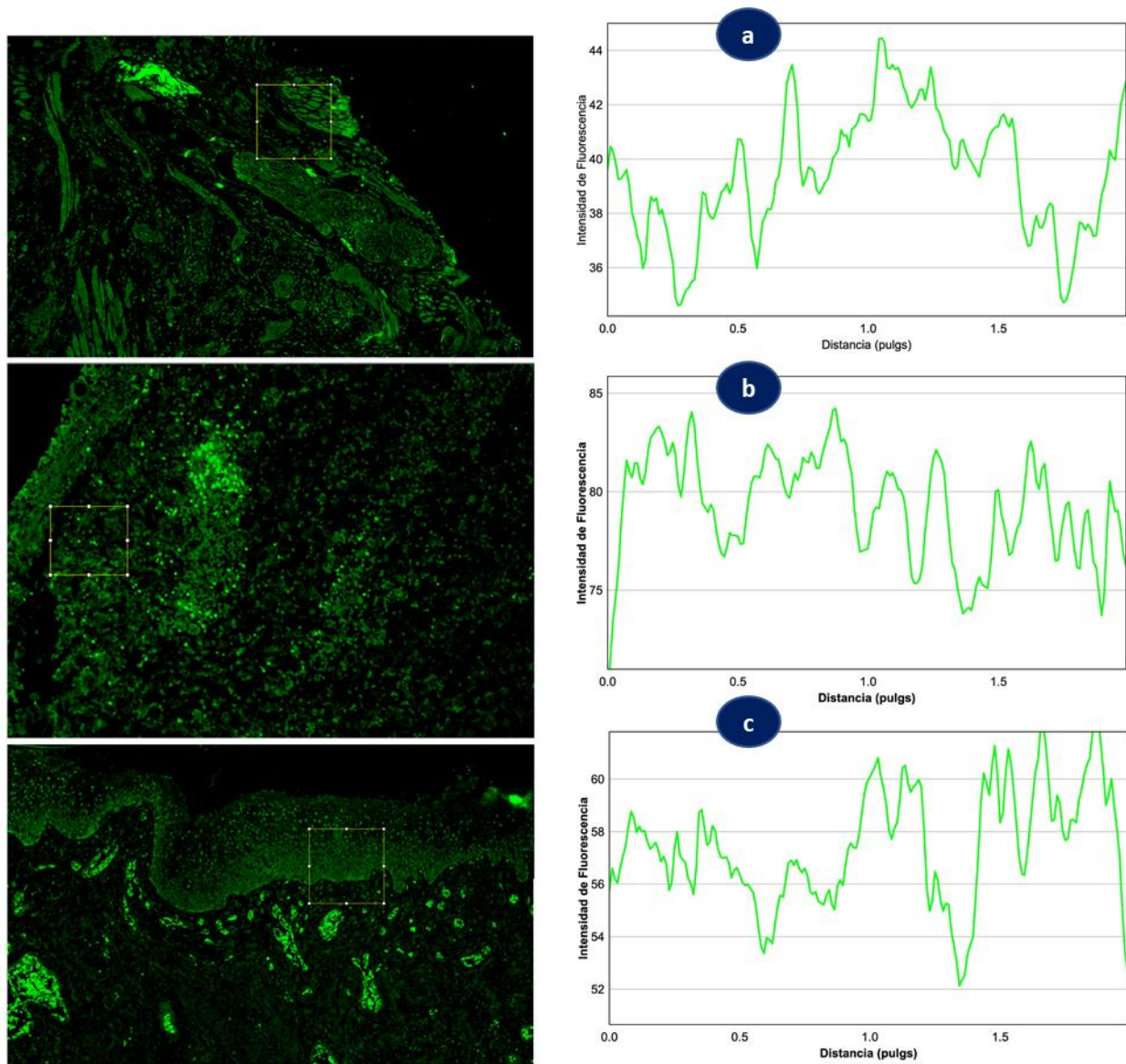
obtenida previamente con la marcación específica de la proteína SOX, cuyo anticuerpo se usó en el canal verde (FITC).

Para tal fin se capturaron imágenes en el aumento de 10X y posteriormente fueron analizadas en el programa FIJI (<https://imagej.net/software/fiji/>) de libre distribución. Se resalto el brillo y contraste para eliminar el fondo (background) con fluorescencia inespecífica. Una vez las tres imágenes fueron procesadas, se seleccionó.

Enseguida en la opción análisis del programa se usó el plugin ROI (región de interés) para seleccionar un área de 2 pulgadas cuadradas representativas del tejido en cada lamina, enseguida se usó el plug in Plot Profile, que me muestra la intensidad de la Fluorescencia en el área seleccionada. Las figuras de los diferentes estadios tuvieron la misma área de selección de una región representativa del tejido y fueron sometidas al mismo análisis.

Los plots y las imágenes seleccionadas fueron agrupadas y organizadas en el programa Photoshop para su presentación final de acuerdo a como se indica en la figura 20.

Figura 20. Cuantificación de la fluorescencia mediante plots.

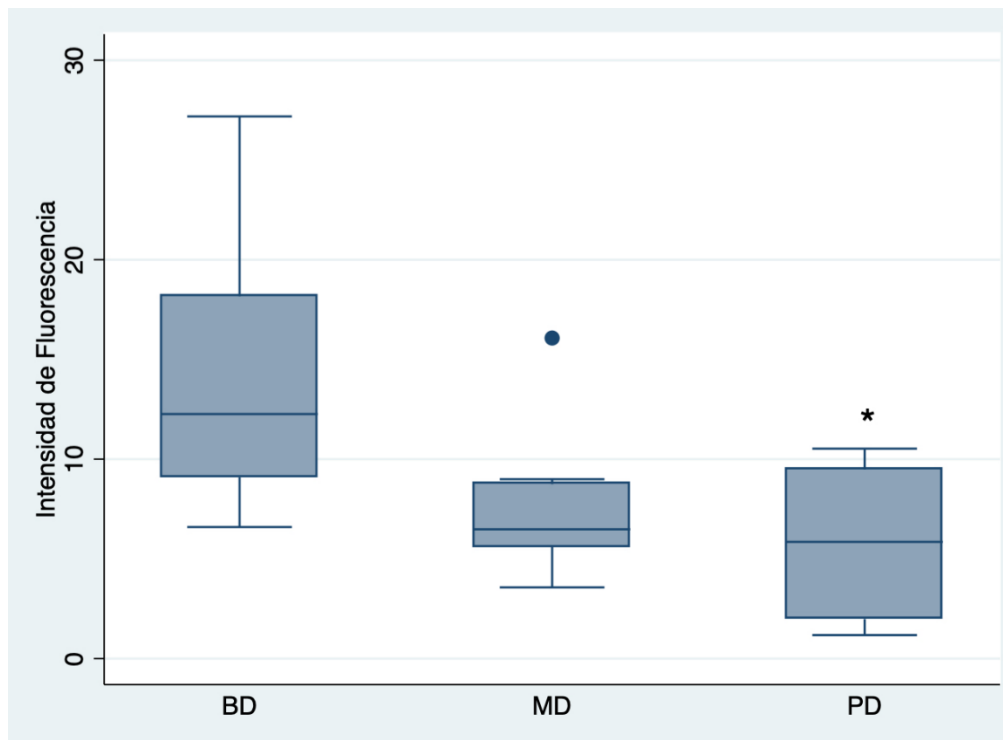


Fuente: Programa Image J

Con respecto a la figura 20, la imagen (a) muestra las células Bien diferenciado (BD), la imagen (b) moderadamente diferenciado (MD) y la imagen (c) pobremente diferenciado.

11.4. Niveles de marcadores y correlación

Figura 21 . Niveles de diferenciación en estadios



Fuente: Programa Image J

Para ver si existían diferencias estadísticas entre la intensidad de la fluorescencia de los diferentes grados del carcinoma de cavidad oral, Bien diferenciado (BD), Moderadamente diferenciado (MD) y Pobremente Diferenciado (PD), significativos se usó la prueba de ANOVA. Como variable cuantitativa se tomó intensidad de la fluorescencia, la cual mostro una aparente diferencia entre el grupo bien diferenciado y los otros dos grupos.

Al realizar la prueba de Bartlett's, para analizar si la muestra cumplía con los supuestos para realizar la prueba de ANOVA, encontramos un valor de

(0.028), indicando que las varianzas no cumplen esos supuestos de homogeneidad como se indica en el análisis realizado mediante programa SPP (Versión 14), el cual indica:

Tabla 1. Resultados prueba Bartlett's

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	455.007794	2	227.503897	9.59	0.0005
Within groups	782.575178	33	23.7143993		
<hr/>					
Total	1237.58297	35	35.3595135		
Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 7.1584$ Prob> $\chi^2 = 0.028$					

Fuente: Programa SSP 14

De acuerdo con los resultados anteriores; se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis donde se comparan la suma de rangos, y se compararon las diferencias específicas entre los grupos, arrojando los siguientes resultados:

Tabla 2. Comparación grupos 1 y 3

```
7 . kwallis INTFLUORESC if GRUPO==1| GRUPO==3, by(GRUPO)
Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test
```

GRUPO	Obs	Rank Sum
1	12	200.00
3	12	100.00

```
chi-squared = 8.333 with 1 d.f.
probability = 0.0039

chi-squared with ties = 8.333 with 1 d.f.
probability = 0.0039
```

Fuente: Programa SSP 14

De acuerdo con este resultado el valor de p es $< 0,05$, por lo tanto, la mediana difiere entre los grupos de estudio, con un nivel de significancia de 0.0039, que no cumple con criterios de homogeneidad para los estadios BD Y MD.

Por lo tanto, al realizar la prueba para los grupos 2 y 3, se determinó un valor $< p$, indicando una mayor homogeneidad en sus medianas, por lo tanto, con los grupos 2 y 3, hay una mayor relación para BD Y PD.

Tabla 3. Comparación grupos 2 y 3

GRUPO	Obs	Rank Sum
2	12	156.00
3	12	144.00

chi-squared = 0.120 with 1 d.f.
probability = 0.7290

chi-squared with ties = 0.120 with 1 d.f.
probability = 0.7290

9 .

Fuente: Programa SSP 14

12. Discusiones

De acuerdo con Grimm Et Al (2020), los factores de transcripción de la familia SOX, juegan un papel importante en la progresión del cáncer, incluida la tumorigénesis, los cambios en el microambiente del tumor y la metástasis; se compone de más de 20 miembros que median en la unión del ADN, por el dominio HMG y tienen funciones reguladoras en el desarrollo, la decisión del destino celular y la diferenciación; especialmente el marcador SOX2, está marcadamente regulado al alza en células resistentes a la quimioterapia (Grimm, Bauer, Wise, Krüger, & Wehland, 2020).

Estos estudios coinciden por los realizados por García y Campuzano (2021), los cuales concluyeron que el marcador tipo SOX se relaciona con un peor pronóstico producto de la diferenciación en su estadio; de igual forma el autor indica que en el caso del marcador TRA-I-60, está asociado a la identificación de estadios en el inicio y desarrollo del cáncer escamocelular.

13. Conclusiones

La marcación con Inmunofluorescencia evidencio los núcleos en los grupos experimentales de grado histológico de cáncer escamo celular bien diferenciado, moderadamente diferenciado y pobremente diferenciado; de acuerdo a esto se identificó una mayor cantidad de núcleos en el carcinoma escamocelular Bien diferenciado.

El análisis mediante intensidad de la fluorescencia, mostro una aparente diferencia entre el grupo bien diferenciado y los otros dos grupos.

Al realizar la prueba de Bartlett's, para analizar si la muestra cumplía con los supuestos para realizar la prueba de ANOVA, encontramos un valor de (0.028), indicando que las varianzas no cumplen esos supuestos de homogeneidad.

14. Recomendaciones

Se debe contar un número suficiente de células y se debe tener en cuenta la heterogeneidad del tumor, con el fin de tener un mayor espectro en el análisis.

Ampliar los estudios a poblaciones muestrales de mayor tamaño, con el fin de tener un amplio análisis experimental

15. Referencias Bibliográficas

- Acevedo T, P. A., & Cortés M, M. M. (2015). *Stem cells: general aspects, biological and molecular events*. Medellín: Scielo.
- Alcalá P, D., Barrera P, M., & Castañeda Y, R. (2014). *Células madre cancerígenas: conceptos actuales*. México D.F.: Medigraphic.
- Badcock, G., Pigott, C., & Andrews, J. G. (2014). *The human embryonal carcinoma marker antigen TRA-1-60 is a sialylated keratan sulfate proteoglycan*. New York.
- Chimenos K, E. C. (2014). *Riesgo de cáncer oral y marcadores moleculares*. Barcelona (España): Scielo.
- Fernández, A., Moreno, J., & Prósper, F. (2008). *Regeneration of the ocular surface: stem cells and reconstructive techniques*. Pamplona (España): scielo.
- Hernán, R., & Dorticós B, E. (2004). *Medicina regenerativa. Células madre embrionarias y adultas*. Habana (Cuba): Scielo.
- HERZUMA. (2020). *Programa Científico SEOM*. Barcelona (España): HERZUMA.
- Mohajertehran, F., Sahebkar, A., & Zare, R. (2018). *The promise of stem cell markers in the diagnosis and therapy of epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma*. Mashhad (Iran): Pubmed.
- Nakata, K., Saito, K., & Maruyama, S. (2019). *Identification of TRA-1-60-positive cells as a potent refractory population in follicular lymphomas*. Okayama, Japan: El sevier.
- OMS. (18 de Junio de 2019). *OMS*. Recuperado el 3 de Septiembre de 2020, de OMS: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/oral-health#:~:text=El%20c%C3%A1ncer%20bucal%20abarca%20los,casos%20por%20100%20000%20personas>.
- OMS. (12 de Septiembre de 2021). Obtenido de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Patel, S., Atul S, K., & Jashwantbhai S, M. (2014). *Cancer stem cells and stemness markers in oral squamous cell carcinomas*. Gujarat (India): Pubmed.
- ROISMAN, A., & SLAVUTSKY, I. (2014). *Expresión del marcador de Transcripción SOX11*. Buenos Aires (Argentina): CONICET.

Sidrón A, M., & Pérez M.L, .. S. (2015). *Oral cancer: Genetics, prevention, diagnosis and treatment. Literature review*. Madrid (españa): Scielo.org.