
Arquitectura tisular y expresión de proteínas
estructurales, mitocondriales y vinculadas al
metabolismo energético en carcinoma oral de
células escamosas (COCE) visualizadas
mediante metodologías basadas en
fluorescencia en combinación con Microscopía
Láser Confocal (MLC)

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

Área Biología- subárea- Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Ciencias. Universidad de la República

Tutor: Dr. Miguel Arocena

Co-tutor: Dr. Ronell Bologna

Cátedra de Patología Molecular

Facultad de Odontología

Universidad de la República

Estefanía Silveyra Flores

Uruguay, Agosto 2023.

1.- AGRADECIMIENTOS

A Dios por acompañarme siempre e iluminar mi vida.

A mis padres Imelda y Washington por su amor y apoyo incondicional.

A mis hermanos queridos Claudina y Pablo, por sus consejos, apoyo, y por ser mi sostén para seguir adelante.

A Miguel Arocena por aceptar ser mi tutor, por haberme guiado en todo momento y confiar en mí, por enseñarme y ayudarme en la realización de mi tesis.

A Ronell Bologna por aceptar ser mi co-tutor, por abrirme las puertas del laboratorio y confiar en mí y por enseñarme y ayudarme en la realización de mi tesis.

A mis compañeras Estefanía Sicco y Mariana Suárez y a mis compañeros del laboratorio por todos los momentos lindos compartidos.

A Gabi Vigil, Vane Pereira y Cele Sánchez, por su cariño y amistad, y por enseñarme las tareas del laboratorio.

A las técnicas en Anatomía Patológica por su ayuda, y a todas las personas lindas que conocí en la Facultad de Odontología.

A mis amigas y amigos por su amistad y apoyo.

Al tribunal por aceptar evaluar mi tesis, por sus aportes y correcciones.

A Eduardo Santi, Ceci Vázquez y Paola Garlo por su apoyo y sus palabras de aliento.

A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), Programas Grupos CSIC 2018 e Iniciación a la Investigación 2019, Fondo Santander Facultad de Odontología y Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) por financiar y apoyar nuestro proyecto.

2.- ÍNDICE

1.- AGRADECIMIENTOS.....pág.1

2.- ÍNDICE.....pág.2

3.- ABREVIATURAS.....pág.4

4.- RESUMEN.....pág.6

5.- INTRODUCCIÓN.....pág.8

5.1.- Carcinoma oral de células escamosas (COCE).....pág.8

5.2.- Características clínicas y localización del COCEpág.8

5.3.- Patogénesis del COCEpág.9

5.4.- Factores de riesgo asociados al COCE.....pág.10

5.5.- Prevención y tratamiento en el COCE.....pág.12

5.6.- Patrones morfológicos de invasión en el COCE.....pág.12

5.7.- Uso de la Microscopía Láser Confocal (MLC) para la visualización de la morfología celular y arquitectura tisular.....pág.14

5.8.- Uso de la Aglutinina de germen de Trigo (WGA) para la visualización de la arquitectura tisular y morfología celular.....pág.14

5.9.- Expresión de proteínas estructurales.....pág.15

6.-Expresión de proteínas vinculadas al metabolismo energético.....pág.16

6.1.- Técnica de amplificación de señal de tiramida o TSA.....pág.17

7.- HIPÓTESIS.....pág.19

8.- OBJETIVOS.....pág.19

8.1.- Objetivo general.....pág.19

8.2.- Objetivos específicos.....pág.19

9.- MATERIALES Y MÉTODOS.....pág.20

9.1.- Muestras de tejido.....pág.20

9.2.- Diseño de estudio.....pág.20

9.3.- Estandarización de la Técnica de TSA acoplada a la IHQ (TSA-IHQ), WGA y Microscopía Láser Confocal (MLC).....	pág.21
10.- RESULTADOS.....	pág.26
10.1.- Fig.1) Patrón de tinción de WGA fluorescente en mucosa oral normal y en COCE.....	pág.31
10.2.- Fig.2) Patrón de tinción de WGA fluorescente y de E-cadherina en mucosa oral normal y en COCE.....	pág.32
10.3.- Fig.3) Patrón de tinción de WGA fluorescente y de β -actina en mucosa oral normal y en COCE.....	pág.34
10.4.-Fig.4) Patrón de tinción de WGA fluorescente y de Syndecan-1 en mucosa oral normal y en COCE.....	pág.36
10.5.- Fig.5) Patrón de tinción WGA fluorescente y de Glut-1 en mucosa oral normal y en COCE.....	pág.38
10.6.- Fig.6) Patrón de tinción de TOM-20, Glut-1 y WGA fluorescente en mucosa oral normal y en COCE.....	pág.40
10.7.- Fig.7) Patrón de tinción de WGA fluorescente en regiones invasivas de COCE.....	pág.43
10.8.- Fig.8) Patrones de tinción de citoqueratinas, Vimentina y Ki-67 en regiones invasivas de COCE.....	pág.45
10.9.- Fig.9.-Patrones de tinción de E-cadherina y de WGA fluorescente en regiones invasivas de COCE.....	pág.46
10.10.- Fig.10) Patrones de tinción de β -actina y de WGA fluorescente en regiones invasivas de COCE.....	pág.47
10.11.- Fig. 11) Patrones de tinción de Syndecan-1 y de WGA fluorescente en regiones invasivas de COCE.....	pág.48
11.- DISCUSIÓN.....	pág.49
12.- CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS.....	pág.58
13.- BIBLIOGRAFÍA.....	pág.59
14.-APÉNDICE.....	pág.71

3.- ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AJCC: American Joint Committee on Cancer (Comité Conjunto Americano sobre el Cáncer)

ATP: Adenosín Trifosfato

COCE: **C**arcinoma **O**ral de **C**élulas **E**scamosas

CCE: **C**arcinoma de **C**élulas **E**scamosas

CK: Citoqueratinas

DAB: 3,3' Diaminobenzidina

E-cadherina: Cadherina Epitelial

EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition (Transición Epitelio-Mesénquima)

FFPE: **F**ormalin-**F**ixed, **P**araffin-**E**MBEDDED (fijados en formalina y embebidos en parafina)

H-E: **H**ematoxilina-**E**osina

HRP: Horseradish Peroxidase (peroxidasa de rábano)

IARC: **I**nternational **A**gency for **R**esearch on **C**ancer (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer)

ICC: **I**nvasión **C**elular **C**olectiva

IHQ: Inmunohistoquímica

IIBCE: Instituto de Investigaciones **B**iológicas **C**lemente **E**stable

NIC: **N**eoplasia **I**ntraepitelial **C**ervical

MLC: **M**icroscopía **L**áser **C**onfocal

OMS: **O**rganización **M**undial de la **S**alud

OXPHOS: Oxidative Phosphorylation (Fosforilación Oxidativa)

PBS: **Phosphate Buffered Saline** (Buffer Fosfato Salino)

RNC: **Registro Nacional de Cáncer**

SDC-1: **Syndecan-1**

T.amb: temperatura ambiente

TGF β -1: **Transforming Growth Factor β 1** (Factor de crecimiento transformante beta 1)

TIF: **Tumor Invasion Front** (Frente de Invasión Tumoral)

TNM: **Tumor- Nódulo- Metástasis**

TOM-20: **Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 20** (Translocasa de la membrana mitocondrial externa 20)

TSA: **Tyramide Signal Amplification** (Amplificación de señal de tiramida)

UICC: **Union for International Cancer Control** (Unión Internacional Contra el Cáncer)

VPH: **Virus del Papiloma Humano**

WGA: **Wheat Germen Agglutinin** (Aglutinina de Germen de Trigo)

WHO: **World Health Organization** (Organización Mundial de la Salud)

4.- RESUMEN

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es la neoplasia epitelial maligna más frecuente que afecta la cavidad oral (90%). Se considera un problema grave de salud pública debido a su alta tasa de incidencia y mortalidad tanto a nivel mundial como en Uruguay. La arquitectura tisular y la morfología celular sufren profundas alteraciones durante la progresión del cáncer y son marcadores importantes de su progresión y evolución. Otra consideración importante que puede contribuir en la evaluación de los cambios que se producen durante la progresión maligna es conocer la expresión de proteínas estructurales, así como también de proteínas vinculadas al metabolismo energético. Por lo tanto, nuestro objetivo general consistió en visualizar de forma precisa la arquitectura tisular y morfología celular en COCE en simultáneo con la expresión de proteínas estructurales, mitocondriales y vinculadas con el metabolismo energético utilizando metodologías que combinan inmunohistoquímica (IHQ) convencional con fluorescencia y Microscopía Láser Confocal (MLC) que permitan contribuir en la detección temprana de los cambios que se producen durante la progresión maligna. Por lo tanto, se evaluó el uso de conjugados de aglutinina de germen de trigo (WGA) fluorescentes como marcadores de la arquitectura tisular y morfología celular en muestras de tejido en COCE y en mucosa oral normal (control) en simultáneo con el sistema de amplificación de señal de tiramida (TSA) acoplado a la IHQ para el análisis de los diferentes patrones de tinción de las proteínas E-cadherina, β -actina y Syndecan-1 como marcadores estructurales y GLUT-1 y TOM-20 como marcadores vinculados con el metabolismo energético. Se decidió estudiar la expresión de dichas proteínas en particular, dado que en células de mucosa oral normal se registró un patrón característico de expresión de las proteínas estructurales, E-cadherina y Syndecan-1 membranosos y β -actina cortical, por lo que se pretendía evaluar si en la arquitectura tisular tumoral podían evidenciarse cambios en la localización de estas proteínas. En el caso de las proteínas vinculadas al metabolismo energético se analizó la expresión de la proteína GLUT-1 (marcador del metabolismo glucolítico) en combinación con la proteína TOM-20 (marcador mitocondrial y del metabolismo mitocondrial oxidativo) para examinar su patrón de expresión y eventualmente la coexistencia de diferentes compartimentos metabólicos en COCE que puedan contribuir a la comprensión del comportamiento biológico de este tumor. Nuestros resultados revelaron que la pérdida de tinción de WGA en los límites celulares observada en las capas más basales del epitelio tumoral con un mayor metabolismo mitocondrial oxidativo (mayor expresión de TOM-20), así como también en los grupos de células tumorales invasivas con una morfología más migratoria, era paralela al cambio de expresión de la periferia al citoplasma de las proteínas E-cadherina, β -actina y Syndecan-

1, lo que sugiere que los patrones de tinción de WGA son indicativos del grado de cohesión celular en COCE. Por lo tanto, los cambios en la cohesión celular en estas diferentes etapas, podrían ser la base de la invasión inicial en el estroma y posteriormente la diseminación de las células tumorales dentro del estroma. El uso de la tinción con WGA, en combinación con el sistema de TSA acoplada a la IHQ de proteínas estructurales y vinculadas con el metabolismo energético visualizadas mediante MLC, constituyen herramientas potencialmente útiles para el estudio de la arquitectura tisular y caracterización de los cambios que se producen durante la progresión del COCE. Como futuras perspectivas, será necesario profundizar estos estudios para definir los posibles usos de la tinción con WGA fluorescente en combinación con la MLC en la evaluación histopatológica del COCE.

Palabras clave: COCE, WGA, TSA, MLC.

5.- INTRODUCCIÓN

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es la neoplasia epitelial maligna más frecuente (90%) que afecta la cavidad oral (Kale y Angadi, 2019). A nivel mundial, representa entre el sexto al octavo cáncer más común dentro de todas las neoplasias malignas y en algunas regiones, como en el caso de India, se lo ha clasificado como la tercera neoplasia maligna más frecuente debido a los hábitos ampliamente prevalentes de mascar tabaco y nuez de areca (Kale y Angadi, 2019; Markopoulos, 2012).

El cáncer oral se considera un problema grave de salud pública, debido a su alta tasa de incidencia y de mortalidad en varios países (REDECAN, 2021). Según datos proporcionados por la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC) y la Organización mundial de la salud (WHO), fueron diagnosticados más de 375.000 nuevos casos de cáncer de labio y de cavidad oral en todo el mundo y casi 180.000 muertes en 2020. Resultando en una tasa de incidencia de 4.1 casos y de 1.9 muertes cada 100.000 habitantes, con una tasa de incidencia mayor en hombres que en mujeres (6.0 casos por 100.000 hombres y 2.3 casos por 100.000 mujeres) (IARC/WHO, 2020). En nuestro país, según datos publicados en mayo del año 2022 por el Registro Nacional de Cáncer (RNC) en Uruguay, se diagnosticaron un total de 1510 casos de cáncer buco-faríngeo entre los años 2014-2018, con una tasa de incidencia y de mortalidad mayor en hombres que en mujeres (tasa de incidencia: 9.90 casos por 100.000 hombres y 2.59 casos por 100.000 mujeres; tasa de mortalidad en hombres: 6.46 y 1.25 en mujeres) (RNC,2022).

5.1.- Carcinoma oral de células escamosas (COCE)

El COCE se caracteriza por ser un tumor maligno, que se origina del epitelio escamoso estratificado de la mucosa oral, con grados variables de diferenciación histológica (IARC/WHO, 2022) y frecuentes recidivas locorregionales, que en más del 60% de los casos metastatizan a los ganglios linfáticos cervicales (Silva et al., 2019; Kale y Angadi, 2019).

5.2.- Características clínicas y localización del COCE

Los pacientes con COCE pueden ser completamente asintomáticos, particularmente en las etapas iniciales de la enfermedad, donde suele presentarse como una lesión roja (eritroplasia) y/o blanca (leucoplasia) (Markopoulos, 2012), mientras que, en las etapas más avanzadas, generalmente se manifiesta como una úlcera con márgenes exofíticos

fisurados o elevados asociados con dolor, alteración de la sensibilidad, restricción del movimiento de la lengua o deglución (IARC/WHO, 2022).

Se presenta en diversas localizaciones, siendo las más frecuentes el labio, los bordes laterales de la lengua y el suelo de la cavidad bucal. La incidencia del COCE aumenta con la edad con un predominio en pacientes adultos masculinos entre la quinta y sexta década de vida (Rivera y Venegas, 2014; Cosetti-Olivera et al., 2019).

5.3.- Patogénesis del COCE

En general el COCE, así como también otros tipos de cáncer, surgen de la acumulación de cambios genéticos y anomalías epigenéticas en genes regulatorios clave denominados protooncogenes y genes supresores tumorales, por el cual las células cancerosas adquieren un conjunto común de propiedades denominadas hallmarks (signos distintivos) del cáncer que incluyen: (1) Proliferación sostenida, (2) escape a las señales supresoras de crecimiento, (3) resistencia a la muerte celular, (4) inmortalidad replicativa, (5) inducción de angiogénesis, (6) activación de invasión y metástasis, (7) evasión de la respuesta inmune antitumoral, (8) reprogramación del metabolismo energético, (9) Inestabilidad genómica e (10) Inflamación promotora tumoral, lo que da como resultado fenotipos que facilitan el desarrollo del cáncer (López y Seoane, 2019; Hanahan y Weinberg, 2000).

Estudios de secuenciación a gran escala han definido el panorama mutacional para el COCE con mutaciones somáticas observadas en varios genes, incluidos TP53, CDKN2A, HRAS, CASP8, PIK3CA, PTEN, FAT1 (IARC/WHO, 2022), TGFBR2, CDH1 (Andl et al., 2014), entre otros (IARC/WHO, 2022).

En el caso de la predisposición genética heredada a COCE la evidencia es limitada. Sin embargo, la mayor susceptibilidad se encuentra en personas con síndromes hereditarios, incluido el síndrome de Li-Fraumeni, anemia de Fanconi, disqueratosis congénita, síndrome de Bloom, síndrome de Lynch y xeroderma pigmentoso (IARC/WHO, 2022).

Las mutaciones en el ADN pueden ocurrir espontáneamente, en especial por oxidación de radicales libres y/o secundarias a la exposición de determinados agentes mutágenos o carcinógenos, siendo el hábito de fumar tabaco y el consumo de alcohol los dos factores de riesgo más importantes de esta patología, que al actuar sinérgicamente aumentan el riesgo de desarrollar cáncer oral en más de un 80% (Cruz et al., 2016).

5.4.- Factores de riesgo asociados al COCE

- Hábito de fumar tabaco:

El efecto dañino del tabaco sobre la mucosa bucal se debe a que el tabaco contiene alrededor de 60 agentes carcinógenos (López y Seoane, 2019) que pueden depositarse en la mucosa con efecto genotóxico, entre los que se destacan la nicotina, el arsénico, el alquitrán, el metanol, el amonio, el cadmio, el monóxido de carbono, el formaldehído, el butano, el cianuro de hidrógeno y nitrosaminas específicas del producto manufacturado. Además de la acción de los carcinógenos, la exposición al calor mantenido por la combustión del tabaco puede agravar las lesiones de la mucosa bucal. Por lo tanto, el hábito de fumar puede provocar el desarrollo del cáncer oral ya sea que se utilice en forma de cigarrillos, cigarros, pipa, mascado, aspirado o por fumar invertido (Cruz et al.,2016).

- Consumo de alcohol:

Los efectos carcinogénicos del alcohol etílico se producen de diversas maneras: actúa como factor químico irritativo local, provoca una disminución del índice inmunitario, facilita la absorción de otras sustancias cancerígenas por su efecto cáustico sobre la mucosa bucal e induce el aumento del estrés oxidativo con producción de radicales libres causantes de lesiones oxidativas en el ADN (Cruz et al., 2016).

A su vez, el etanol puede metabolizarse mediante la acción del citocromo P450 2E1 en acetaldehído, el cual es un carcinógeno que interfiere con la síntesis y reparación del ADN contribuyendo al desarrollo del cáncer (Seitz y Stickel, 2007).

- Consumo de nuez de areca:

La nuez de areca es la semilla de la fruta de areca de la palmera tropical *areca catechu*, que crece en la mayor parte del sur de Asia, gran parte de las regiones tropicales de la cuenca del Pacífico y partes del este de África. Es el ingrediente principal del betel quid (BQ), que es consumido principalmente en las poblaciones de India y Taiwán donde es considerado uno de los principales factores de riesgo asociado al cáncer oral (Warnakulasuriya & Chen, 2022; IARC/WHO,2022).

Su consumo está asociado principalmente al efecto estimulante, que se debe al contenido de arecolina (el principal compuesto activo de estas semillas), que actúa

sobre el sistema nervioso central y aumenta la respiración. De esta manera, los consumidores suelen sentirse con más energía, vigor y en estado de alerta, favoreciendo el aprendizaje y la realización de actividades físicas. Sin embargo, la arecolina fue clasificada como agente cancerígeno para los humanos según la IARC, dado que induce roturas en las cadenas de ADN, formación de micronúcleos, aberraciones cromosómicas e intercambios de cromátidas hermanas en células primarias y cultivadas humanas, favoreciendo el desarrollo del cáncer oral (Warnakulasuriya & Chen, 2022).

- Infecciones Virales:

En relación con las infecciones virales, se ha detectado ADN del virus del papiloma humano (VPH) con mayor frecuencia en los COCE de la orofaringe (35,6%), que a nivel bucal (23,5 %) (Cruz et al., 2016). La transmisión de este virus a la cavidad oral se realiza a través del contacto orogenital u oroanal durante la práctica de sexo oral y puede transmitirse incluso en ausencia de síntomas o signos de infección. Presenta un tropismo específico por los epitelios poliestratificados escamosos, como el de la mucosa oral, donde provoca trastornos hiperplásicos epiteliales, tanto benignos como malignos. Los VPH de bajo riesgo, como el 6, 11, 13 y 32, están implicados en la etiopatogenia de diferentes lesiones orales hiperplásicas benignas (papiloma, condiloma e hiperplasia epitelial multifocal). Los VPH de alto riesgo, como el 16 y el 18, son los que provocan lesiones epiteliales que pueden progresar a un carcinoma de células escamosas preferentemente en la parte posterior de la cavidad oral (zona orofaríngea). El mecanismo oncogénico de los VPH de alto riesgo involucra a las proteínas E6 y E7, que permiten la amplificación del genoma vírico en las capas epiteliales superiores de la mucosa oral. La proteína E6 actúa uniéndose y degradando a la proteína supresora tumoral p53 y a proteínas de señalización, y activando a la telomerasa. La proteína E7 se une y degrada a la proteína supresora tumoral del retinoblastoma (pRB), contribuyendo a la progresión de la proliferación celular maligna e induciendo inestabilidad genómica. Es importante aclarar que los carcinomas orales de células escamosas VPH (+) difieren de los carcinomas convencionales VPH (-) asociados al consumo de tabaco y alcohol, en que presentan mejores tasas de supervivencia en 5 años probablemente porque responden mejor al tratamiento, aparecen en poblaciones más jóvenes (menores de 50 años), histopatológicamente son más indiferenciados y suelen estar relacionados con comportamientos sexuales sin protección (López y Seoane, 2019).

5.5.- Prevención y tratamiento en el COCE

La promoción de prácticas sexuales seguras y la vacunación profiláctica para el VPH en ambos sexos, son las opciones preventivas actuales para prevenir la infección oral por VPH y sus posibles consecuencias carcinomatosas (López y Seoane, 2019).

En el caso de los COCE convencionales, se pueden prevenir con la eliminación de los estilos de vida como el hábito de fumar y el consumo de alcohol (Cruz et al., 2016).

En el caso de los COCE asociados al mascado de la nuez de areca sobre todo en países donde es una práctica habitual, se pueden prevenir evitando su consumo (IARC/WHO, 2022).

Por otra parte, cuando son detectados en los estadios tempranos de la enfermedad, más del 80% de los pacientes pueden ser curados (González, 2019). Sin embargo, la mayoría de los COCE se diagnostican tardíamente (estadios III o IV del sistema de estadificación TNM: Tumor-Nódulo-Metástasis), y a pesar de las estrategias terapéuticas disponibles en la actualidad, que incluyen la extirpación del tejido maligno y la combinación de radioterapia y quimioterapia, la tasa de supervivencia general a cinco años es solo del 50 %, en gran parte debido a una mala respuesta a la terapia y altas tasas de recurrencia (Rivera y Venegas, 2014).

5.6.- Patrones morfológicos de invasión en el COCE

A nivel histológico este tumor avanza frecuentemente desde una progresiva desorganización del epitelio (displasia) hasta la formación de un carcinoma *in situ*, estadio pre-invasivo en el que las células tumorales aún están confinadas al epitelio, sin llegar a atravesar la lámina basal que lo separa del tejido conjuntivo subyacente (Izumo, 2011). En una etapa posterior, las células tumorales atraviesan la lámina basal y se infiltran en el tejido conjuntivo, dando lugar a un carcinoma de células escamosas invasivo. En esta etapa se puede subdividir al carcinoma oral en dos grandes regiones, una región central y el frente de invasión “TIF” (Tumor Invasion Front).

El “TIF” es la zona del carcinoma con mayor profundidad de invasión, donde residen presumiblemente las células tumorales más agresivas, las cuales interaccionan con los tejidos subyacentes. Es considerado uno de los factores pronóstico más relevantes para predecir el comportamiento biológico del COCE y por ende que determinará la supervivencia del paciente (Cortegoso et al., 2017). El “TIF” puede adoptar distintos patrones morfológicos que se consideran importantes para evaluar la gravedad de la invasión, puede ser de tipo expansivo o infiltrativo y se clasifican en cuatro grados.

Patrón de invasión:

Grado 1: A) Bordes expansivos bien definidos o zonas de “empuje” amplio del tumor.

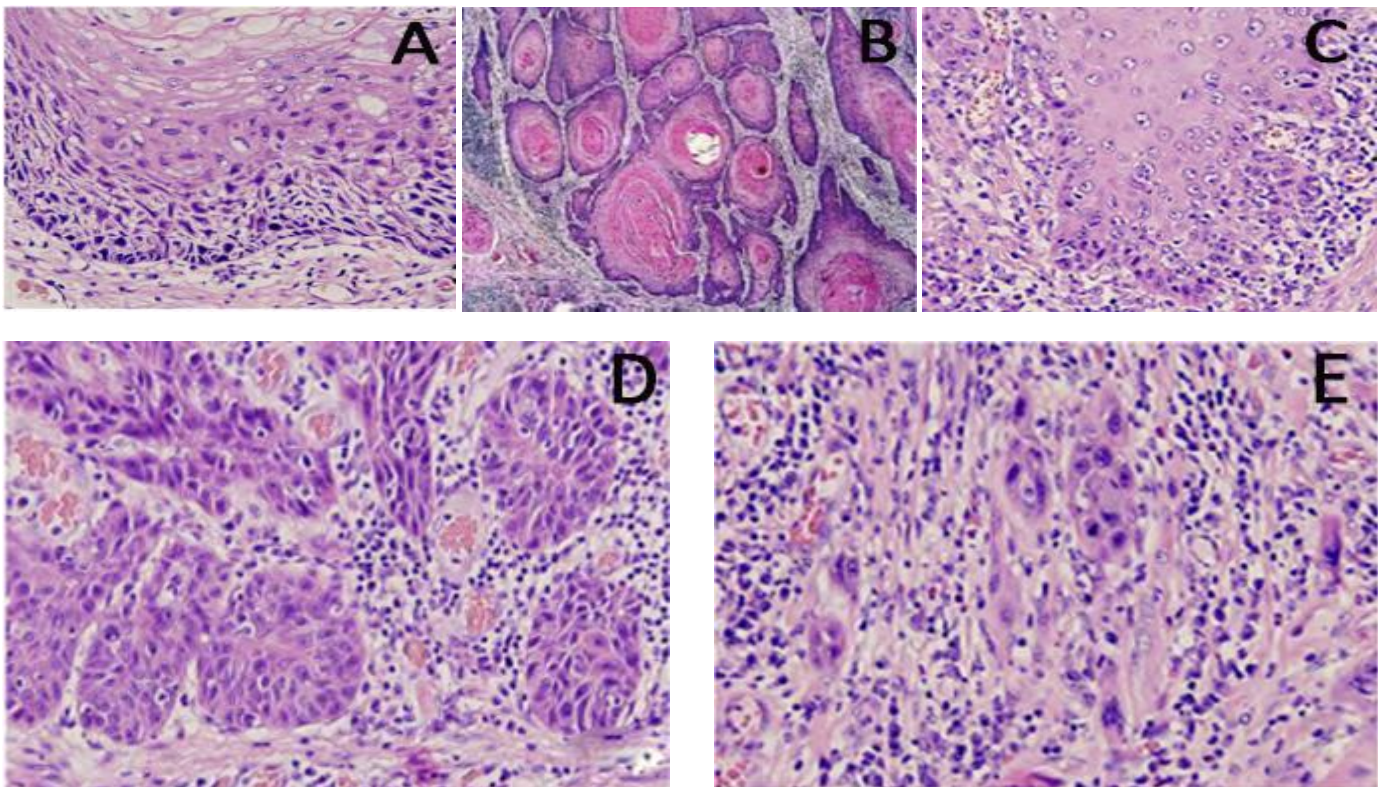
B) Islotes de células tumorales con amplios frentes de invasión.

Grado 2: C) Infiltración en cordones o hebras sólidas.

Grado 3: D) Márgenes constituidos por pequeños grupos formados por nidos o cordones de células infiltrantes.

Grado 4: E) El frente de invasión muestra marcada disociación en pequeños grupos celulares formando nidos pequeños o incluso en células aisladas (Spiro et al., 1999; López y Seoane, 2019; Dissanayaka et al., 2012).

La prognosis es significativamente peor en los casos de los tumores de crecimiento infiltrativo (grados 3 y 4) ya que se asocian a una mayor incidencia de metástasis ganglionares y a distancia y, por ende, a una disminución de la supervivencia (López y Seoane, 2019; Dissanayaka et al., 2012). Por lo tanto, resulta fundamental poder visualizar de forma precisa la arquitectura del tejido tumoral y morfología celular durante la progresión del COCE de manera de poder identificar de forma temprana los cambios que se producen durante su crecimiento y avance progresivo sobre los tejidos vecinos.



Diferentes patrones de invasión: A) Carcinoma epidermoide bien diferenciado de lengua. Grado 1, patrón de borde expansivo. B) Borde de empuje amplio en islas, c) Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado de lengua. Grado 2, invasión en cordones sólidos. D) Carcinoma epidermoide bien diferenciado de suelo de boca. Grado 3, infiltración en nidos y cordones de más de 15 células. E) Carcinoma epidermoide pobremente diferenciado de lengua. Grado 4, infiltración formando nidos pequeños de menos de 15 células o como células dispersas (HE, 20x) (Extraído de López y Seoane, 2019 y Dissanayaka et al., 2012).

5.7.- Uso de la Microscopía Láser Confocal (MLC) para la visualización de la morfología celular y arquitectura tisular.

La microscopía de luz es una de las herramientas más importantes para visualizar anomalías en la arquitectura del tejido y la morfología celular en el estudio de la patobiología del cáncer oral (Liu & Xu, 2019). Sin embargo, es posible que los cambios en una etapa temprana no se detecten debido al poder de resolución limitado del Microscopio Óptico convencional (Sawant et al., 2019). Por lo tanto, la Microscopía Láser Confocal (MLC) resulta ser una herramienta prometedora, dado que en este tipo de microscopios las imágenes se forman excitando la muestra secuencialmente punto por punto con luz láser y en el camino de la luz emitida hacia el detector o fotomultiplicador se interpone una apertura confocal denominada “*pinhole*” que remueve el paso de la luz procedente de los planos de la muestra que están fuera de foco (Liddle, 2012), obteniéndose imágenes con mayor contraste y resolución y, por ende, más precisas, lo que resulta fundamental para un mejor análisis de la estructura del tejido tumoral (Liu & Xu, 2019).

Otras de las ventajas del MLC es que permite distinguir señales en el eje z, al generar cortes (*slices*) ópticos de fino espesor y realizar reconstrucciones 3D por métodos computacionales, al combinar los datos provenientes de lotes (*stacks*) de imágenes (Liddle, 2012). Además, permite realizar experimentos de colocalización que dependen para su evaluación de imágenes de alta calidad y resolución, que posteriormente deberán ser validadas por diferentes métodos estadísticos (Bolte y Cordelières, 2006).

Por lo tanto, explorar el uso de la MLC en el contexto del COCE puede hacer importantes contribuciones hacia la comprensión de la patobiología de este tumor (Reddy et al., 2013; Ali et al., 2021; Ramani et al., 2022).

5.8.- Uso de la Aglutinina de Germen de Trigo (WGA) para la visualización de la arquitectura tisular y morfología celular.

Además de la microscopía de alta resolución, el uso de marcadores que permitan visualizar claramente la arquitectura tisular será una característica importante para obtener una descripción estructural detallada del COCE a nivel tisular.

En este aspecto uno de los marcadores que ha sido utilizado con mayor frecuencia para la visualización de la arquitectura tisular y morfología celular ha sido la aglutinina de germen de trigo o Wheat Germ Agglutinin (WGA), (Pena et al. 1981; Capaldi et al. 1984; Di Iorio y Cotrufo 1985; Thoss y Roth 1977; Söderström 1987).

La WGA es una lectina de origen vegetal de aproximadamente 36 kDa que se encuentra mayoritariamente en el grano de trigo, y que tiene una alta afinidad por residuos de carbohidratos de ácido siálico y de N-acetilglucosamina. Entre sus diversas aplicaciones, se destaca como marcador de glicoproteínas de membrana en células vivas o fijadas, por lo que se la puede utilizar para teñir secciones de tejido o como marcador de bacterias gram+ (www.biotium.com). A nivel tisular, la WGA en combinación con la MLC, se la ha utilizado para visualizar los límites de las fibras en musculo esquelético (Kostrominova, 2011), así como para la visualización de la arquitectura del tejido cardíaco (Genet et al., 2012; Bensley et al., 2016), y tejido conectivo en huesos, tendones y ligamentos (Kostrominova, 2011). En el caso particular del estudio realizado por Genet y colaboradores, se observó que la arquitectura tisular alterada del tejido cardíaco especialmente en el nivel de adhesión célula-célula, produce un patrón de tinción de WGA alterado, lo que podría contribuir al estudio de la transición hacia la insuficiencia cardíaca (Genet et al., 2012). Sin embargo, en los últimos años, el uso de las lectinas junto con otras herramientas analíticas se han centrado principalmente en la caracterización de los cambios de glicosilación en glicoproteínas asociadas con diversas enfermedades en las que se incluye al cáncer oral (O'Connell et al., 2008; Baeten et al., 2018; Hashim et al., 2017; Mereiter et al., 2019) , y en la actualidad son muy pocos los estudios que utilizan a las lectinas como marcadores de la arquitectura tisular y morfología celular. Por lo tanto, en el presente estudio se evaluó el uso de la WGA no solo como marcador estructural del COCE a nivel tisular y celular, sino que también pueda contribuir en la detección de alteraciones durante la progresión maligna.

5.9.- Expresión de proteínas estructurales

Otra consideración importante para evaluar los cambios que se producen en la arquitectura tumoral es conocer la expresión de proteínas estructurales.

En el caso particular de **E-cadherina**, se caracteriza por ser una glicoproteína transmembrana dependiente de calcio de 120kDa que conecta las células epiteliales mediante interacciones homotípicas. Regula el crecimiento y la diferenciación de las células epiteliales y desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad estructural de los epitelios estratificados (Mehendiratta et al., 2014).

Varias investigaciones han demostrado que la reducción o pérdida de la expresión de E-cadherina es un evento frecuente en varios cánceres humanos, incluidos los cánceres orales y se ha asociado con parámetros como la agresividad del tumor y mayor potencial invasivo y metastásico (Santos García et al., 2005; Mehendiratta et al., 2014).

Por otra parte, la **β -actina** es una proteína estructural clave que forma parte del citoesqueleto celular. Se expresa en casi todas las células eucariotas y participa en diversas funciones como la división, la migración, la regulación de la expresión génica y el tránsito de vesículas (Suresha y Diaz, 2021). La organización del citoesqueleto de actina está estrechamente ligada a las uniones célula-célula en el epitelio proporcionando conectividad y fuerza (Trejo,2008), por lo que son fundamentales para mantener la estructura e integridad celular.

Se ha observado que, durante la progresión del cáncer, el citoesqueleto de actina sufre una serie de cambios que resultan en un desplazamiento de la actina y sus proteínas reguladoras desde la corteza hacia el citoplasma y finalmente hacia el borde de ataque de las células migratorias, por lo que son importantes indicadores de invasividad tumoral (Morris y Machesky, 2015).

Syndecan-1 (SDC-1) también denominado **CD138**, es un miembro de la familia de proteoglicanos transmembrana de heparán sulfato que se expresa principalmente en células epiteliales (Couchman JR,2021). Participa en procesos de adhesión célula-célula y célula-matriz y se considera una importante proteína de mantenimiento estructural junto con otras moléculas como los colágenos I, II, III, IV; fibronectina; trombospondina; y tenascina (González-González et al., 2014). Además, participa en la regulación de la proliferación celular, la migración y la organización del citoesqueleto al interactuar con diferentes factores de crecimiento, citoquinas y morfógenos (Yiannis et al., 2021). La pérdida de tinción de esta proteína en la membrana de células epiteliales en el COCE se asocia comúnmente con mayores niveles de invasión y metástasis y la acumulación de SDC-1 en el estroma posiblemente está asociada a la activación de factores de crecimiento de unión a heparina, que están implicados en la invasión y progresión tumoral (González-González et al., 2014).

6.- Expresión de proteínas vinculadas al metabolismo energético

Otra característica importante que puede contribuir a la comprensión del comportamiento biológico del COCE es la reprogramación metabólica que ocurre en las células tumorales. En este aspecto, se ha observado una mayor preferencia de las células tumorales por la glucólisis en lugar de la fosforilación oxidativa como método para producir energía incluso en presencia de oxígeno adecuado, fenómeno conocido como “Efecto Warburg” (Wang et al., 2022). La adicción por la glucólisis en una variedad de tumores malignos incluido en el COCE se evidencia por una mayor captación de glucosa y, en consecuencia, por un aumento de la expresión del transportador de glucosa 1 (GLUT-1) que en particular se lo ha asociado con mayor invasividad y mayor potencial

metastásico (Li et al., 2016; Botha et al., 2021). El **GLUT-1** se encuentra codificado por el gen *SLC2A1* en los seres humanos y se trata de una glicoproteína uniportadora, que actúa como facilitador de la difusión de glucosa a través de la membrana plasmática de las células de los mamíferos y pertenece a la familia de proteínas integrales de membrana llamadas transportadoras de glucosa (GLUT). Hasta la fecha, se han identificado 14 GLUT en humanos, siendo GLUT1, GLUT3 y GLUT4 los más comúnmente expresados en una amplia variedad de células (Mamun et al., 2020).

Aunque la mayoría de los estudios relacionados con el metabolismo del COCE sugieren que las células del carcinoma son principalmente glucolíticas, se ha reportado que existe heterogeneidad en el epitelio tumoral, siendo las regiones invasivas más oxidativas (Domingo-Vidal, et al., 2022; Sandulache et al., 2011; Curry et al., 2013). Por lo tanto, nos resultó interesante evaluar su contribución en la progresión del COCE. En este aspecto, uno de los marcadores que ha sido utilizado en varias investigaciones como marcador mitocondrial y del metabolismo mitocondrial oxidativo ha sido TOM-20 (Wurm et al., 2011; Guo Q. 2017; Park et al., 2019). La translocasa de la membrana mitocondrial externa 20 o **TOM-20** (Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 20) es una subunidad proteica clave del complejo TOM (Translocase of the Outer Mitochondrial Membrane) y su función es reconocer presecuencias específicas para llevar a cabo la importación de proteínas desde el citosol a la mitocondria de manera eficiente, lo cual es crucial para la biogénesis de las mitocondrias (Yano et al., 2004; Yano et al., 1998). Se ha observado en algunos tipos de cáncer, que las células tumorales que aumenta la expresión de TOM-20 están asociadas con una mayor proliferación, migración e invasión celular, además de prevenir la apoptosis y por ende promover la tumorigénesis (Weinberg et al., 2010; Park et al., 2019; Roche et al., 2020).

6.1.- Técnica de Amplificación de Señal de Tiramida o TSA

La técnica que hemos utilizado para visualizar las proteínas estructurales y las vinculadas al metabolismo energético es la denominada amplificación de señal de tiramida o TSA (Tyramide Signal Amplification). La ventaja de utilizar la TSA es que se puede integrar fácilmente a los protocolos de Inmunohistoquímica (IHQ) convencionales, siempre que se pueda introducir peroxidasa de rábano picante (HRP), pero en lugar de utilizar el cro-

-mógeno diaminobencidina (DAB) comúnmente utilizado como sustrato de la HRP para la detección del complejo antígeno-anticuerpo, se utiliza tiramida conjugada con un fluoróforo. En presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) la HRP convierte las moléculas de tiramida conjugada en radicales de tiramida de corta duración, que son muy reactivos y se unen rápidamente de forma covalente a residuos de tirosina en las proximidades del epítipo detectado, que podrán visualizarse posteriormente mediante MLC (Cell Signaling Technology, 2016; Roy et al., 2019). Varias investigaciones han reportado que este sistema de amplificación de señal fluorescente se está utilizando con éxito cada vez más en tejidos cancerosos fijados con formalina e incluidos en parafina (FFPE) en apoyo a la investigación oncológica (Cell Signaling Technology, 2016; Roy et al., 2019; Parra et al., 2010; Sun et al., 2022).

La posibilidad de utilizar el método TSA sobre muestras de tejidos FFPE resulta muy relevante dado que es la manera estándar de procesar y conservar muestras de tejido tumoral para el análisis patológico (Robertson et al., 2008). Sin embargo, existen varios desafíos: si bien la detección fluorescente es mucho más sensible que la tinción cromogénica (Koda et al., 2003) y por lo tanto se podrían detectar proteínas que estuvieran a muy baja concentración, una señal de fondo más alta podría reducir la especificidad. Por otra parte, este tipo de muestras FFPE pueden llegar a generar problemas de autofluorescencia, por lo tanto, resulta fundamental trabajar con sistemas de amplificación de señal de manera de aumentar la relación señal-ruido para visualizar la señal deseada, además del uso de diferentes softwares asociados con la visualización en microscopios confocales que puedan compensar y restar las señales superpuestas (Roy et al., 2019).

Por otra parte, otra de las ventajas de utilizar la TSA en combinación con la MLC es que al utilizar diferentes fluoróforos como marcadores para detectar las proteínas de interés, a diferencia de los sistemas cromogénicos comúnmente utilizados en Microscopía Óptica, se puede examinar la co-expresión de dos o más Antígenos simultáneamente en combinación con la MLC (Liu y Xu, 2019; Robertson et al., 2008). Además, como la deposición de tiramida está mediada por su unión covalente a residuos de tirosina en las proximidades del epítipo detectado, permite la eliminación mediada por calor de los pares de anticuerpos primarios y secundarios, al tiempo que preserva la señal de fluorescencia asociada con el antígeno. Esto facilita el uso secuencial de múltiples anticuerpos primarios de la misma especie, huésped o isotipo sin la preocupación de generar señales inespecíficas, algo que es difícil de lograr cuando no se utilizan estos sistemas de amplificación de señales, debido al número limitado de especies huésped disponibles (Cell Signaling Technology, 2016; Roy et al., 2019).

7.- HIPÓTESIS

La utilización de la MLC en combinación con la WGA y la técnica de TSA son herramientas potencialmente útiles que pueden contribuir a la caracterización detallada de los cambios que se producen durante la progresión del COCE.

8.- OBJETIVOS

8.1.- Objetivo general:

El objetivo general de este trabajo fue visualizar de forma precisa la arquitectura tisular y morfología celular en COCE, así como la expresión de proteínas estructurales, mitocondriales y vinculadas al metabolismo energético, mediante la utilización de metodologías basadas en fluorescencia en combinación con la MLC, que permitan contribuir al estudio de los cambios que se producen durante la progresión maligna.

8.2.- Objetivos específicos:

- 1) Evaluar el uso de **WGA** fluorescente como marcador de la arquitectura tisular y morfología celular en muestras de tejido FFPE provenientes de biopsias de pacientes con COCE y de mucosa oral normal.
- 2) Analizar la expresión de marcadores estructurales: **E-cadherina**, **β -actina** y **Syndecan-1**, en simultáneo con la tinción de **WGA** en muestras de tejido FFPE provenientes de biopsias de pacientes con COCE y de mucosa oral normal.
- 3) Analizar la expresión de **TOM-20** (marcador mitocondrial y del metabolismo mitocondrial oxidativo) y de **Glut-1** (marcador asociado al metabolismo glucolítico), en simultáneo con la tinción de **WGA** en muestras de tejido FFPE provenientes de biopsias de pacientes con COCE y de mucosa oral normal.
- 4) Poder correlacionar los resultados de los diferentes marcadores con la tinción de **WGA** con el objetivo de identificar regiones tumorales menos cohesivas y potencialmente más invasivas y agresivas.

9.- MATERIALES Y MÉTODOS

9.1. Muestras de tejido

Se utilizaron cortes histológicos de 5 μm de espesor de tejidos FFPE provenientes de biopsias de pacientes con diagnóstico histopatológico de COCE y de mucosa oral normal como control, obtenidos por la Cátedra de Patología Molecular de la Facultad de Odontología de la Universidad de la República (Montevideo, Uruguay), cuyo uso fue autorizado por el comité de ética de dicha Facultad (Expediente No. 091900–000108-19, aprobado el 25/07/2019).

De un total de $n= 30$ casos de COCE analizados mediante tinción con hematoxilina y eosina (H-E), fueron seleccionadas $n=10$ muestras de tejido correspondiente a COCE en algunas de las cuales se incluían regiones de interfase epitelio/estroma y en otros casos regiones invasivas de COCE dentro del estroma. Se excluyeron los casos con presencia de extensas áreas de necrosis y mala preservación estructural histológica, que pudiera impedir el procesamiento posterior de las muestras.

En el caso particular del control (mucosa oral normal) fueron analizadas $n= 9$ muestras mediante HE, de las cuales se seleccionaron 4 para su posterior análisis.

9.2. Diseño de estudio

Se realizó un estudio descriptivo, comparativo y observacional de la arquitectura tisular y morfología celular en muestras de tejido FFPE de COCE y de mucosa oral normal (control), mediante la tinción con conjugados de WGA fluorescente, así como también del patrón de expresión de las proteínas: E-cadherina, β -actina, Syndecan-1, GLUT-1 y TOM-20 mediante el sistema TSA-IHQ y posterior visualización por MLC con fines de investigación en COCE, que puedan servir de base para posteriores estudios que permitan proporcionar resultados reproducibles para su utilización en el laboratorio de Patología Molecular, contribuyendo en la detección temprana de los cambios que se producen durante la progresión maligna.

9.3. Estandarización de la Técnica de TSA acoplada a la IHQ (TSA-IHQ), WGA y Microscopía Láser Confocal (MLC).

- Técnica de IHQ basado en el método Estreptavidina - Biotina - Peroxidasa con algunas modificaciones.

Con el fin de evaluar la expresión de las proteínas estructurales (E-cadherina, β -actina y Syndecan-1) y de las proteínas vinculadas al metabolismo energético (GLUT-1 y TOM-20), se procedió a realizar la IHQ sobre las muestras de tejidos FFPE de 5 μ m de espesor montadas sobre portaobjetos de vidrio electrocargadas positivamente, provenientes de biopsias de pacientes con COCE y de mucosa oral normal, según el protocolo que se utiliza habitualmente en el laboratorio de Patología Molecular basado en el método Estreptavidina - Biotina - Peroxidasa con algunas modificaciones:

Primeramente, se fundió la parafina de las muestras FFPE en estufa durante 60 min a 60°C. Luego se desparafinizaron las muestras en xilol durante 20 minutos y se rehidrataron mediante una serie graduada de alcohol etílico (EtOH) al 100 %, 96 %, 80%,70%, 50% hasta agua destilada realizando 15 baños en cada una de las series. Posteriormente se procedió a realizar el desenmascaramiento antigénico mediante calor en horno de microondas incubando los portaobjetos en el reactivo recuperador Reveal Decloaker RTU (Biocare Medical, Pacheco, CA) durante 1 min y luego de 3 lavados con agua destilada, se bloquearon las peroxidases endógenas con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 0.9% durante 5 minutos. Después de 3 lavados con agua destilada, se montaron las láminas en los coverplates "portaláminas" y posteriormente se colocaron en los racks disponibles en el laboratorio. Se realizó un lavado con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X durante 5 minutos y luego se bloquearon las peroxidases endógenas nuevamente utilizando bloqueador de peroxidasa (Mouse/Rabbit Immuno detector Peroxidase Blocker Bio SB, Santa Barbara, CA) durante 25 minutos. Transcurrido ese tiempo, se realizaron 3 lavados con PBS 1X durante 5 minutos y finalmente se incubaron las muestras con los anticuerpos primarios : anti-E-cadherina (clon EP6, Biocare Medical), anti- β -actina (clon 13E5, Cell Signaling, Danvers, MA), anti-Syndecan-1 (CD138) (clon B-A38, Bio SB, Santa Bárbara, CA, EE. UU.), anti-GLUT-1 (clon SPM498, Biocare Medical) y anti-TOM-20 (clon D8T4N, Cell Signaling, Danvers, MA), durante 1 hora a temperatura ambiente (T. amb.), previa dilución 1: 100 de todos los anticuerpos con el diluyente Da Vinci Green Diluent, salvo para el anticuerpo anti-TOM-20 cuya dilución fue de 1:200. Además, se incubaron también para el análisis posterior de las muestras, previa dilución 1:100, durante 1 hora a T. amb, los

anticuerpos primarios: anti-panCK (clon AE1 / AE3, Biocare Medical), el cual reconoce citoqueratinas (CK) de amplio espectro de peso molecular. Por lo tanto, nos permitiría identificar grupos de células tumorales de estirpe epitelial, sobre todo en regiones invasivas dentro del estroma, incluso en aquellos carcinomas pobremente diferenciados con alta sensibilidad diagnóstica (Fuertes et al., 2013); anti-Ki-67 (clon MIB-1, DAKO, Carpinteria, CA), marcador de proliferación celular, el cual reconoce la proteína nuclear ki-67 que se expresa en células proliferantes (Bologna-Molina et al., 2013). Por lo que nos permitiría identificar las células más basales del epitelio en mucosa oral y en COCE ya que se esperaría un mayor índice de inmunotinción para esta proteína y por tanto mayor actividad proliferativa en estas células debido a que son las más inmaduras de los diferentes tipos celulares y retienen las características de las células progenitoras del epitelio oral (Ochoa Gómez et al, 2009); anti-vimentina (clon V9, Biocare Medical), de utilidad para la identificación del tejido mesenquimal en tejidos normales y neoplásicos, dado que reconoce la proteína vimentina que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto de las células de origen mesenquimal (Azumi y Battifora, 1987; Herrmann y Aebi, 2000). Además, la expresión de vimentina en células de COCE nos permitiría identificar células en estado de transición epitelio-mesénquima (TEM), fenómeno en el que células neoplásicas cambian de un fenotipo epitelial a un fenotipo mesenquimatoso, importante para promover la invasión tumoral (Gloushankova et al., 2017).

Luego de 3 lavados con PBS 1X para eliminar los anticuerpos primarios no reactivos, se agregó el anticuerpo secundario conjugado con Biotina (Mouse / Rabbit ImmunoDetector Biotin Link, Bio SB, Santa Barbara, CA) y se dejó actuar durante media hora a T. amb. Después de 3 lavados con PBS 1X durante 5 minutos, se añadió el complejo Estreptavidina conjugado a peroxidasa (Inmuno Detector Streptavidin Peroxidase, Bio SB, Santa Barbara, CA) y se dejó incubando durante media hora a T.amb.

- Detección de las proteínas de interés mediante el sistema de TSA acoplado al protocolo de IHQ.

A continuación, se realizaron 3 lavados con PBS 1X durante 5 minutos y finalmente las proteínas de interés se detectaron mediante la incubación de las muestras a T.amb. durante 10 min con tiramida conjugada al fluoróforo de cianina 3 (TSA Plus Cyanine 3 Kit, PerkinElmer, Waltham, MA), o tiramida conjugada al fluoróforo de fluoresceína (TSA Plus Fluorescein Kit, PerkinElmer, Waltham, MA), previa dilución 1:100 con el diluyente 1XPlus Amplification Diluent (PerkinElmer, Waltham, MA).

En algunos de los casos se realizó doble marcado de antígenos proteicos para el análisis de las muestras, por lo que para la detección del segundo antígeno proteico se eliminó el primer complejo de anticuerpos primario-secundario mediante calor en horno de microondas durante 1 minuto, sin que se afecte en principio la señal fluorescente del primer antígeno marcado con tiramida conjugada, dado que la unión de la tiramida con los residuos de tirosina del antígeno proteico es del tipo covalente. Posteriormente, luego de lavar las muestras con PBS y bloquear las peroxidasas endógenas como se mencionó anteriormente en el protocolo, se incubó el segundo anticuerpo primario anti-antígeno de interés durante 1h a T. amb. para luego continuar con el mismo procedimiento que se realizó luego de la incubación de los anticuerpos primarios.

En algunas muestras, se contratiñeron los núcleos con RedDot™2 Far-Red Nuclear Stain (Biotium, Fremont, CA) en rojo lejano para el análisis posterior.

- Detección de la arquitectura tisular y morfología celular con conjugados de WGA fluorescentes.

Después de 3 lavados con PBS 1X durante 5 min para eliminar la tiramida conjugada a fluoróforos no unida a los antígenos proteicos, se incubaron las muestras con conjugados de WGA fluorescentes: WGA CF®488A o WGA CF®640R (Biotium, Fremont, CA) durante 10 min a T. amb., previa dilución 1:400 con PBS.

Es importante aclarar que las muestras FFPE de 5µm de espesor se pueden teñir directamente con los conjugados de WGA fluorescente luego de desparafinizar y rehidratar las muestras sin los pasos previos de la IHQ (K.-O. Söderström 1987; Bensley et al.,2016).

- Visualización y adquisición de imágenes por MLC.

Después de la incubación con los conjugados de WGA se realizaron 3 lavados con PBS 1X, durante 5 min c/u y finalmente los portaobjetos se cubrieron con un cubreobjetos que fue sellado con esmalte de uñas para su posterior visualización y adquisición de imágenes mediante MLC (LSM ZEISS 800) disponible en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE).

Las imágenes obtenidas se adquirieron con objetivos: 20X (aire; AN=0,5), y 40X (aire; AN=0,95), utilizando las siguientes líneas de láseres (488, 561 y 640 nm), teniendo en cuenta que:

- La tiramida conjugada a fluoresceína emite señal en el verde con un máximo a 517nm cuando se excita a 494nm y que la tiramida conjugada a cianina 3 emite en el amarillo-anaranjado con un máximo a 570nm cuando se excita a 550nm.

- Los conjugados de WGA fluorescentes: WGA CF®488A emite señal de fluorescencia verde con un máximo a 515nm cuando se excita a 490nm y WGA CF®640R emite señal de fluorescencia en el rojo con un máximo a 662nm cuando se excita a 642nm.

- RedDot™2 Far-Red Nuclear Stain emite en el rojo lejano con un máximo de emisión a 694 nm cuando es excitado a 662nm.

- El tamaño de pinhole empleado fue el recomendado según las indicaciones del manual del microscopio de acuerdo a la longitud de excitación utilizada que corresponden a 1 unidad de Airy (1 AU), diámetro de pinhole óptimo para obtener una imagen confocal (ZEN 2 (black edition) Zeiss LSM 880 Operating Manual, 2014), por lo que en nuestro caso el diámetro de pinhole en μm utilizado de acuerdo a la longitud de onda de excitación sería:

- 488 nm: 34 μm

- 561 nm: 40 μm

- 640 nm: 45 μm

- La potencia e intensidad de incidencia de los láseres sobre la muestra, la ganancia de cada uno de los fotomultiplicadores (PMT) y los valores de offset fueron ajustados de manera de utilizar en la recolección de imágenes todo el rango dinámico (0-255) que poseen los detectores (8 bit) del equipo confocal utilizado. Procurando evitar la saturación que ocurre cuando la magnitud de la señal excede el rango dinámico disponible, utilizando para ello, las tablas de color disponibles en los programas de adquisición de imágenes, donde los valores de intensidad extremos se evidencian en colores diferenciales (azul=nivel 0, blanco=intermedio, rojo= nivel 255). De todas maneras, es importante aclarar que nuestros estudios no pretendían extraer de las imágenes información a nivel cuantitativo, sino observacional o cualitativo, evaluando diferencias de patrones de tinción de fluorescencia de las muestras de COCE con respecto a las muestras control (mucosa oral normal), por lo que la captura de algunos

de los valores de intensidad extremos en los canales de detección no resultaría crítico en nuestro caso.

- Se realizó un seccionamiento óptico o z-stack de las muestras correspondientes a las Figuras 1 al 4, de entre 9 a 14 planos a intervalos de 0,8 μm en base a un balance en un numero apropiado de planos en el stack (lo que implica una distancia pequeña entre planos consecutivos) pero que a su vez no implique un tiempo de adquisición de la imagen de forma prolongada, de manera de observar el patrón de tinción de WGA y de las proteínas estructurales (E-cadherina, β -actina y Syndecan-1) a lo largo del eje z, verificando si el patrón de tinción se mantenía en la membrana plasmática o en la región cortical en caso de la β -actina o en cambio se redistribuía hacia el citoplasma.

En el caso de la Figuras.6J se realizó un z-stack de 14 planos a intervalos de 0,8 μm de manera de observar el patrón de distribución mitocondrial a lo largo del eje z en cada célula y en las distintas regiones del tejido (desde las zonas del epitelio más cercanas al estroma a las zonas más lejanas).

Para las muestras correspondientes a las Figuras. 7E, F, G, H, K y L, se realizó un z-stack de entre 7 y 10 planos a intervalos de 0,8 μm para explorar el patrón de tinción de WGA a lo largo del eje z y en el caso de las muestras correspondientes a las Figuras. 9,10 y 11, se realizaron z-stack de entre 11 y 19 planos a intervalos de 0,8 μm de manera de observar el patrón de tinción de WGA y de las proteínas estructurales (E-cadherina, β -actina y Syndecan-1) a lo largo del eje z en las regiones invasivas de COCE.

Se tomaron imágenes con un formato de 1024 x 1024 píxeles originalmente, realizando recortes rectangulares manuales (crop), abarcando áreas similares en los casos en los que se analizó la distribución (patrón de tinción) de la misma proteína en mucosa oral normal y COCE.

Todas las imágenes obtenidas con el microscopio confocal así como también los stacks de imágenes fueron visualizadas y analizadas con el software libre de procesamiento de imágenes Image J/FIJI (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD, EUA), realizando ajustes de brillo y contraste en algunas de las imágenes de manera de obtener imágenes más claras. Posteriormente se almacenaron en formato de imagen de alta resolución (.tiff) para su posterior análisis comparativo.

10. - RESULTADOS

Para evaluar el uso de la WGA fluorescente como marcador de la arquitectura tisular y morfología celular en COCE y poder identificar alteraciones durante la progresión maligna, primeramente, co-teñimos muestras de tejido correspondiente a COCE y la mucosa oral normal (control) con el conjugado WGA CF[®]488A (señal en verde) en simultáneo con el anticuerpo primario anti-ki-67 y posterior visualización del complejo antígeno-anticuerpo mediante el método estreptavidina-biotina-peroxidasa en combinación con el sistema TSA Plus Cyanine 3 Kit (señal en amarillo).

En la **Figura.1**, se muestra el patrón de tinción de WGA fluorescente (señal en verde) en mucosa oral normal (A) y en COCE (B), visualizadas mediante MLC con objetivos de 20X y 40X.

La señal en verde de WGA fluorescente en el epitelio de la mucosa oral normal reveló un patrón altamente ordenado de las capas celulares, con límites celulares fuertemente teñidos y demarcados en todas las capas epiteliales (tanto a nivel basal como en las capas más externas), (Fig. 1A, C y E).

En el epitelio del COCE, se observaron los límites celulares fuertemente teñidos y demarcados en las capas más externas del epitelio mediante tinción con WGA fluorescente (Fig. 1B). Sin embargo, en las capas más basales, donde se encuentran las células positivas para ki-67 (señal en amarillo) (Fig.1F), se registró una señal más citoplasmática y difusa (Fig.1D), y en particular, los límites celulares no se lograron distinguir fácilmente al compararlas con el control (Figs.1C y E).

Posteriormente se analizó la expresión de los marcadores estructurales: E-cadherina, β -actina y Syndecan-1, en simultáneo con la tinción de WGA fluorescente en muestras de tejido FFPE provenientes de biopsias de pacientes con COCE y de mucosa oral normal.

Por lo tanto, co-teñimos las muestras de COCE y de mucosa oral normal (control) con WGA CF[®]488A (señal en verde) y con los anticuerpos primarios: anti- E-cadherina, β -actina y Syndecan-1 y posterior detección y visualización de las proteínas mediante el complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa en combinación con TSA Plus Cyanine 3 Kit (señal en amarillo).

En las **Figuras.2, 3 y 4**, se muestra el patrón de tinción de WGA fluorescente (señal en verde) en simultáneo con la expresión de las proteínas estructurales: E-cadherina, β -actina y Syndecan-1 (señal en amarillo) en mucosa oral normal y en COCE visualizadas mediante MLC con objetivo de 40X.

En la mucosa oral normal, la expresión de las proteínas E-cadherina, β -actina y Syndecan-1, revelaron un patrón de tinción similar al de WGA fluorescente, marcando claramente los límites celulares (Fig.2B vs Fig.2A y Fig. 2F vs Fig. 2E), (Fig.3B vs Fig.3A y Fig. 3F vs Fig. 3E) y (Fig. 4B vs Fig. 4A y Fig.4F vs Fig. 4E).

En el epitelio del COCE, sin embargo, la tinción con WGA fluorescente se observó difusa en las capas basales, acompañada de un marcado aumento de expresión citoplasmática de las proteínas E-cadherina, β -actina y Syndecan-1, respectivamente (Fig.2C vs Fig. 2D y Fig. 2G vs Fig. 2H), (Fig.3C vs Fig. 3D y Fig. 3G vs Fig.3H) y (Fig.4C vs Fig. 4D y Fig.4G vs Fig.4H).

A continuación, se analizó la expresión de marcadores vinculados con el metabolismo energético: GLUT-1 y TOM-20, en simultáneo con la tinción de WGA en muestras de tejido FFPE provenientes de biopsias de pacientes con COCE y de mucosa oral normal.

Por lo tanto, primeramente, co-teñimos las muestras de COCE y de mucosa oral normal (control) con WGA CF[®]488A (señal en verde) y con el anticuerpo primario: anti- GLUT-1 y posterior detección y visualización de la proteína mediante el complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa en combinación con TSA Plus Cyanine 3 Kit (señal en amarillo).

En la **Figura.5**, se muestra el patrón de tinción de WGA fluorescente (señal en verde) en simultáneo con la expresión de la proteína GLUT-1 (señal en amarillo) en mucosa oral normal y en COCE visualizadas mediante MLC con objetivo de 20X.

En la mucosa oral normal, la expresión de GLUT-1 reveló un patrón de tinción localizado preferentemente en la membrana plasmática de las células de las capas más basales del epitelio (Figura.5 A, C y E).

En el epitelio de COCE, la expresión de GLUT-1 se localizó en la membrana de las células al igual que en la mucosa oral normal, pero su expresión se extendió a todas las capas epiteliales, tanto a nivel basal como a las capas más externas (Figura. 5 B, D y F). Lo cual se correlaciona con lo observado en otras investigaciones (Qamar et al., 2019; Usman et al., 2019).

Luego, co-teñimos las muestras de COCE y de mucosa oral normal (control) con WGA CF[®]640R (señal en rojo), en conjunto con el anticuerpo anti-GLUT-1 y anti-TOM-20 y posterior detección y visualización de las proteínas mediante el complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa en combinación con TSA Plus Cyanine 3 Kit (señal en amarillo) para detectar la proteína GLUT-1 y con TSA Plus Fluorescein kit (señal en verde) para detectar la proteína TOM-20.

En la **Figura.6**, se muestra el patrón de tinción de TOM-20 (señal en verde), WGA (señal en rojo) y de GLUT-1 (señal en amarillo) en mucosa oral normal (Fig.6 A, C, E y G) y en COCE (Fig.6 B, D, F y H), visualizadas mediante MLC con objetivo de 20X.

La figura 6J. muestra otro campo de COCE, en el cual se observa, al igual que en el control (figura.6I), el patrón de tinción con TOM-20 y WGA visualizadas mediante MLC con objetivo de 20X. Las figs. 6L y N muestran el mismo campo de la fig.6J separada en canales correspondientes a las señales de distintos colores para apreciar mejor el patrón de tinción con TOM-20 y WGA en COCE. Las figs.6 K y M muestran el mismo campo de la fig.6I, con el patrón de tinción para TOM-20 y WGA respectivamente en mucosa oral normal (control).

En las capas más basales del epitelio en COCE se observó una población de células tumorales ricas en mitocondrias y presumiblemente con un mayor metabolismo mitocondrial oxidativo, dado que es la zona de mayor tinción para TOM-20 (Figs.6 B, D, F). Este mismo fenotipo de fosforilación oxidativa (OXPHO) mitocondrial se observó en las células epiteliales de las capas basales de la mucosa oral normal (Figs.6 A, C, E). Sin embargo, se registró un mayor número de células positivas para TOM-20 en el epitelio del COCE en comparación con el epitelio oral normal (Fig.6B vs Fig.6A, Fig. 6F vs Fig.6E, Fig.6J vs Fig.6I y Fig.6L vs Fig.6K). A su vez, el patrón de distribución mitocondrial de las células más basales del epitelio en COCE tendía a ocupar el citoplasma celular (Figs.6J y L) en contraposición a las células de las capas más externas del epitelio en COCE que fueron positivas para TOM-20, en donde las mitocondrias en su mayoría estaban más agrupadas en la zona perinuclear (Fig.6L). Luego de evaluar el uso de la WGA fluorescente como marcador de la arquitectura tisular junto con el análisis de la expresión de marcadores estructurales y de proteínas vinculadas al metabolismo energético en COCE, se procedió a analizar a la WGA como marcador de la arquitectura tisular en regiones de invasión tumoral en COCE junto con la expresión de los marcadores estructurales: E-cadherina, β -actina y Syndecan-1.

Por lo tanto, primeramente, co-teñimos regiones de invasión tumoral dentro del estroma con WGA CF[®]640R (señal original en rojo, que posteriormente se cambió al LUT verde para una mejor visualización de la imagen, Figs.7B y D) junto con los anticuerpos primarios: anti-pan-citoqueratina (CK) (AE1/AE3) y anti-vimentina y posterior detección y visualización de las proteínas mediante el complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa en combinación con TSA Plus Cyanine 3 Kit (señal en amarillo) para visualizar la proteína citoqueratina y TSA Plus Fluorescein kit (señal en verde) para visualizar la proteína vimentina.

La tinción con pan-CK (AE1/AE3) (marcador de estirpe epitelial) en la **Figura.7A**, muestra un patrón de invasión en islotes y cordones de finas hebras de células infiltrantes de tamaño variable que se puede distinguir dentro del estroma circundante revelado mediante la tinción con vimentina (marcador del tejido conectivo mesenquimal). En dicha figura se puede identificar posibles “brotes tumorales” de tamaño variable que se pueden distinguir también en la figura.7C.

Los “brotes tumorales” consisten en células epiteliales tumorales únicas aisladas o células tumorales en pequeños grupos (hasta 5 células) que se ven principalmente a una distancia variable del frente de invasión dispersos dentro del estroma, y se consideran marcadores pronósticos histopatológicos potenciales de metástasis en numerosos cánceres, incluido en el COCE (Almangush et al., 2014; Berg & Schaeffer, 2018; Kale & Angadi, 2019; Lugli et al., 2021).

La tinción con WGA fluorescente (pseudoseñal en verde) simultánea a la tinción con pan-CK y vimentina marcó tanto los grupos de células tumorales como el compartimento estromal circundante, pero también permitió visualizar las formas de las células epiteliales dentro de los grupos tumorales, distinguiéndolas de las células estromales adyacentes (Figuras.7B y 7D). En algunos grupos de células tumorales la demarcación de los límites celulares por tinción con WGA fluorescente fue particularmente nítida Figuras.7F, 7H (señal en verde) y 7J (pseudoseñal en verde) visualizadas simultáneamente mediante tinción con pan-CK (Figuras.7E, 7G y 7I, respectivamente).

En la **Figura.8**, se muestran el patrón de tinción con pan-CK, Vimentina y ki-67, en regiones de invasión tumoral en COCE.

A continuación, co-teñimos las regiones de invasión en islotes y cordones de células infiltrantes indicadas en la Figura.7A, que incluía a los posibles “brotes tumorales”, con los anticuerpos primarios anti-pan-CK y anti-vimentina y posterior detección del complejo antígeno-anticuerpo mediante el sistema estreptavidina-biotina-peroxidasa en combinación con TSA Plus Cyanine 3 Kit (señal en amarillo), para detectar la proteína citoqueratina (CK), y con TSA Plus Fluorescein kit (señal en verde) para detectar la proteína vimentina. Se pudo observar que los grupos de células tumorales co-expresaban citoqueratinas y vimentina respectivamente (Figuras. 8A y 8B), mientras que una región con un patrón de invasión en cordones más expansivos representado en la (Figura. 8C) co- expresó una señal de vimentina mucho más baja (Figura.8D).

Por otra parte, la co-tinción con el anticuerpo anti-vimentina y ki-67 y posterior detección de las proteínas con el complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa, en

combinación con TSA Plus Cyanine 3 Kit para la detección de vimentina (señal en amarillo) y con TSA Plus Fluorescein kit (señal en verde) para la detección de ki-67 en regiones de invasión tumoral, reveló células grandes positivas para vimentina con morfología epitelial que coexpresaban ki-67 (Figuras 8E). La Figura. 8F, muestra el mismo campo tomado en (E) con tinción de vimentina (señal en amarillo) y Far-Red Nuclear Stain (señal en rojo), confirmando la señal nuclear del marcador de proliferación celular ki-67, como se ha observado en otras investigaciones (Bologna-Molina et al., 2013).

Luego se procedió a analizar la expresión de los marcadores estructurales: E-cadherina, β -actina y Syndecan-1 en simultáneo con la tinción de WGA en regiones de invasión tumoral en COCE. Por lo tanto, co-teñimos diversas regiones de invasión tumoral con WGA CF[®]488A (señal en verde) en simultáneo con los anticuerpos primarios anti-E-cadherina, β -actina y Syndecan-1 y posterior detección y visualización de las proteínas estructurales mediante el complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa en combinación con TSA Plus Cyanine 3 Kit (señal en amarillo).

En las **Figuras. 9, 10 y 11**, se muestran los patrones de tinción de E-cadherina, β -actina y Syndecan-1 (señal en amarillo) y WGA (señal en verde) en regiones de invasión tumoral en COCE.

En algunas regiones invasivas de COCE se observaron grupos de células tumorales con tinción de E-cadherina, β -actina y Syndecan-1 localizadas preferentemente en la zona membranosa, similar al patrón de tinción de WGA fluorescente (Figuras.9A vs 9B, 10A vs 10B y 11A vs 11B). Por el contrario, en otras regiones se observaron ejemplos frecuentes de células que adquirirían una morfología fusiforme (más alargada) o con la formación de prolongaciones citoplasmáticas, en las cuales se registraba una tinción citoplasmática prominente de las proteínas estructurales E-cadherina, β -actina y Syndecan-1, que se correlacionaba a su vez, con una marcada disminución de la tinción de WGA en los límites celulares (Figs.9C y 9E vs 9D y 9F, Figs.10C y 10E vs 10D y 10F y Fig.11C vs 11D).

10.1.- Fig.1) Patrón de tinción de WGA fluorescente en mucosa oral normal y en COCE

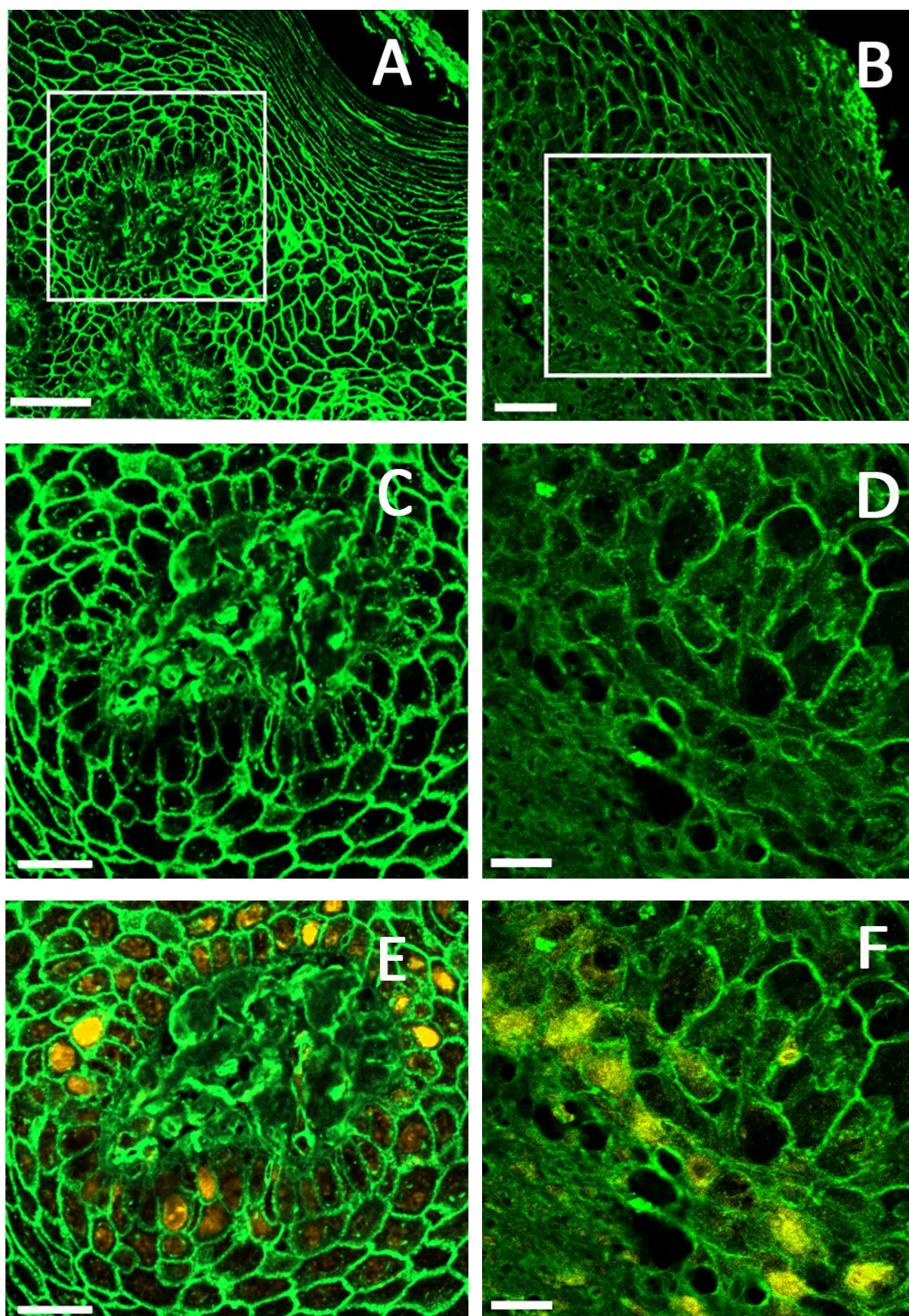


Figura 1. Patrón de tinción de WGA fluorescente en mucosa oral normal (A) y en COCE (B), con un objetivo 20X. En (C) y (D) se muestra la imagen ampliada de las regiones marcadas con recuadros en blanco de las figuras A y B con un objetivo de 40X para apreciar mejor el patrón de tinción con WGA en las regiones más basales del epitelio en mucosa oral normal (C) y COCE (D). Las figuras (E) y (F) muestran el mismo campo registrado en las figuras C y D, con la expresión de Ki-67 (señal en amarillo) en simultáneo con la tinción de WGA fluorescente (señal en verde). Barras de escala: Figs. A y B: 50 μ m., Figs. C, D, E y F: 20 μ m.

10.2.- Fig.2) Patrón de tinción de WGA fluorescente y de E-cadherina en mucosa oral normal y en COCE.

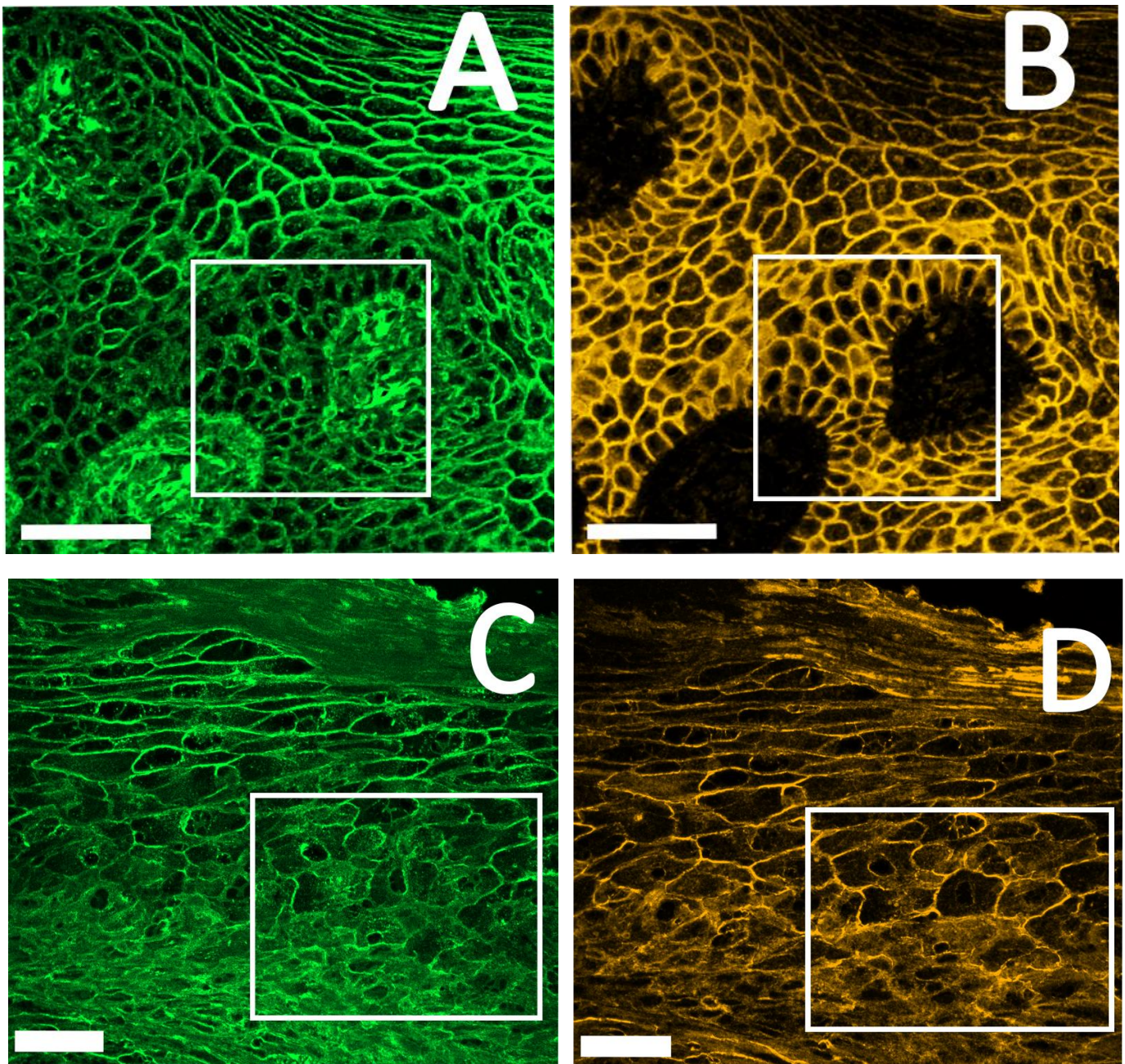


Figura 2. Patrón de tinción en mucosa oral normal (A y B muestra el mismo campo) y en COCE (C y D muestra el mismo campo) con un objetivo 40X. Las Figs. A y C, muestran el patrón de tinción con WGA fluorescente (señal en verde), y las Figs. B y D, muestran el patrón de tinción de E-cadherina (señal en amarillo). Barras de escala: 50 μ m.

Continuación fig.2) Patrón de tinción de WGA fluorescente y de E-cadherina en mucosa oral normal y en COCE.

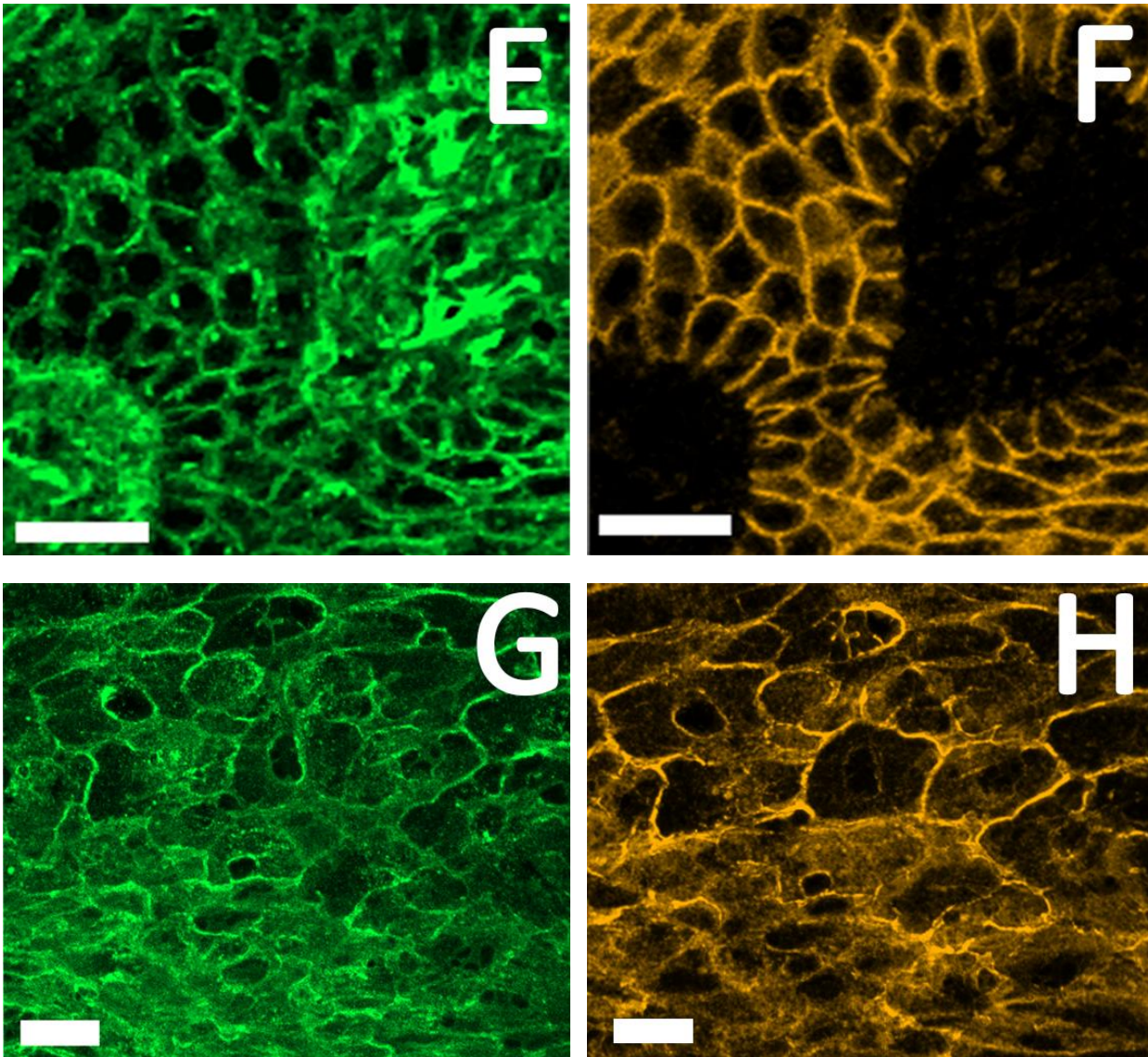


Figura 2. En (G) y (H) se muestra la imagen de los recuadros en blanco ampliada de las figuras C y D para apreciar mejor el patrón de tinción con WGA de la figura C y de E-cadherina de la figura D en las regiones más basales del epitelio en COCE. Barras de escala: 20 μ m.

Las figuras (E) y (F) muestran las imágenes ampliadas de los recuadros en blanco de las figuras A y B de la mucosa oral normal a modo de control. Barras de escala: 20 μ m.

10.3.- Fig.3) Patrón de tinción de WGA fluorescente y de β -actina en mucosa oral normal y en COCE.

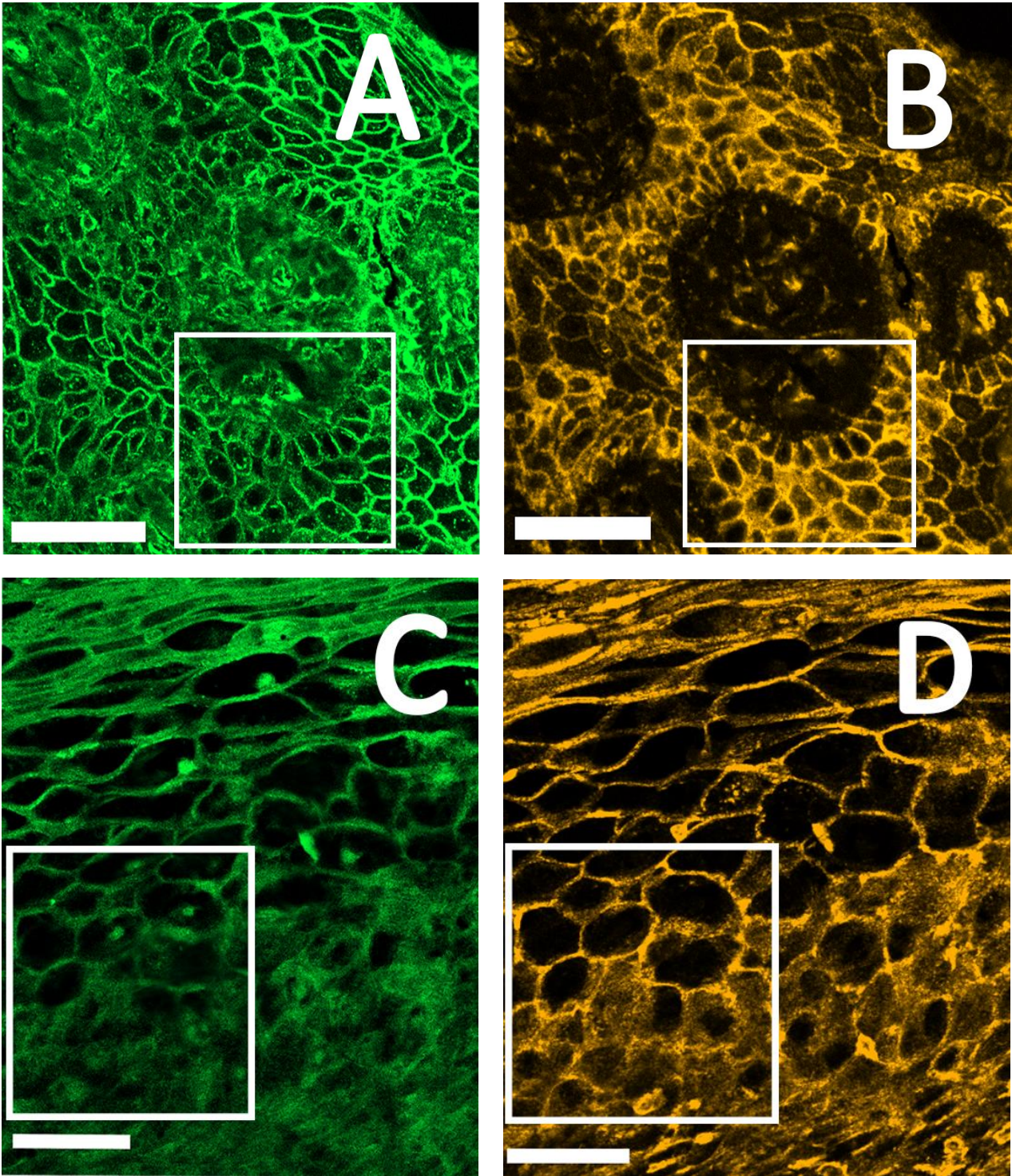


Figura 3. Patrón de tinción en mucosa oral normal (A y B muestra el mismo campo) y en COCE (C y D muestra el mismo campo) con un objetivo 40X. Las Figs. A y C, muestran el patrón de tinción con WGA fluorescente (señal en verde), y las Figs. B y D, muestran el patrón de tinción de β -actina (señal en amarillo). Barras de escala: 50 μ m.

Continuación fig.3) Patrón de tinción de WGA fluorescente y de β -actina en mucosa oral normal y en COCE.

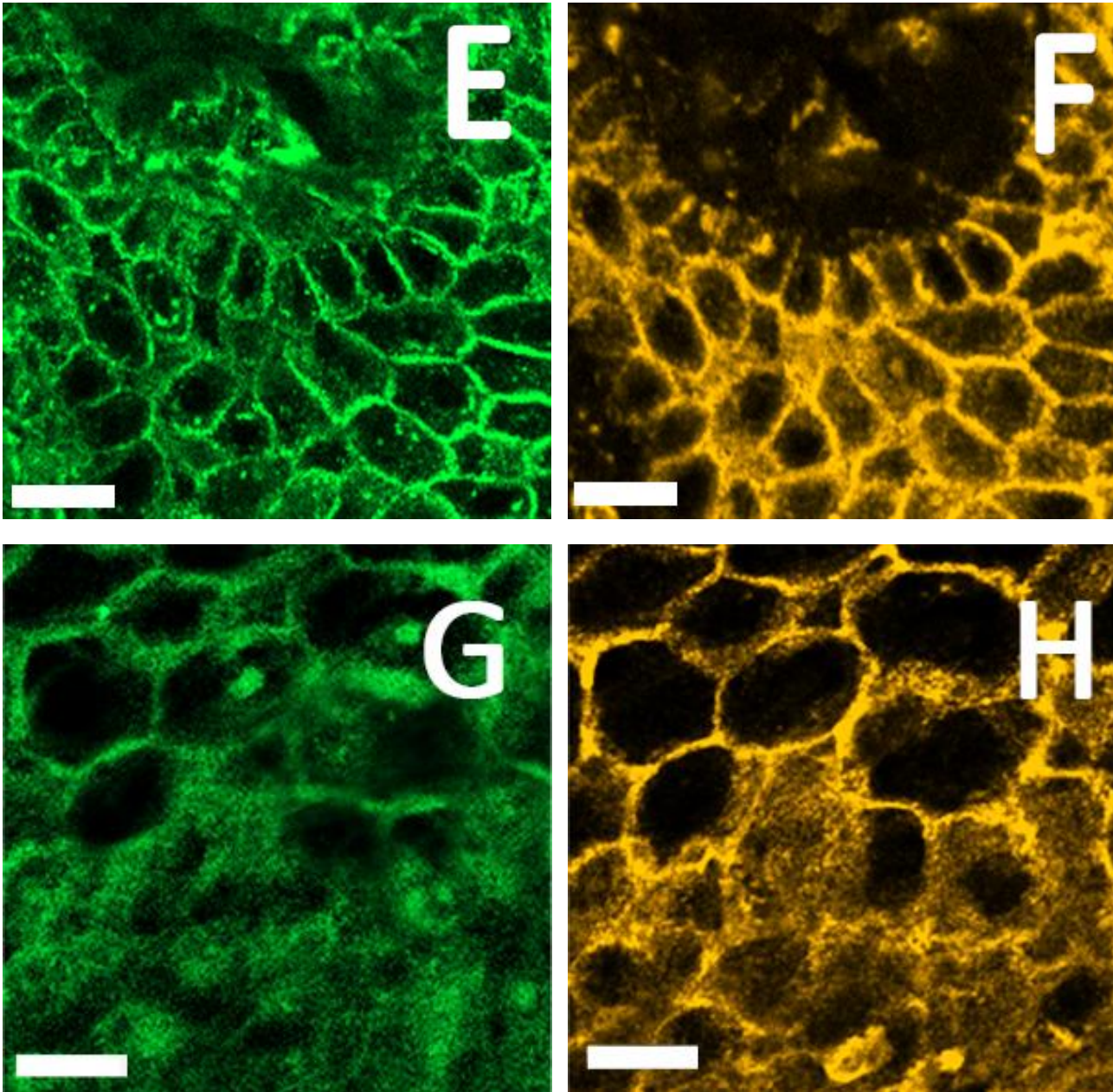


Figura 3. En (G) y (H) se muestra la imagen de los recuadros en blanco ampliada de las figuras C y D para apreciar mejor el patrón de tinción con WGA de la figura C y de β - actina de la figura D en las regiones más basales del epitelio en COCE. Barras de escala: 20 μ m

Las figuras (E) y (F) muestran las imágenes ampliadas de los recuadros en blanco de las figuras A y B de la mucosa oral normal a modo de control. Barras de escala: 20 μ m.

10.4.- Fig.4) Patrón de tinción de WGA fluorescente y de Syndecan-1 en mucosa oral normal y en COCE.

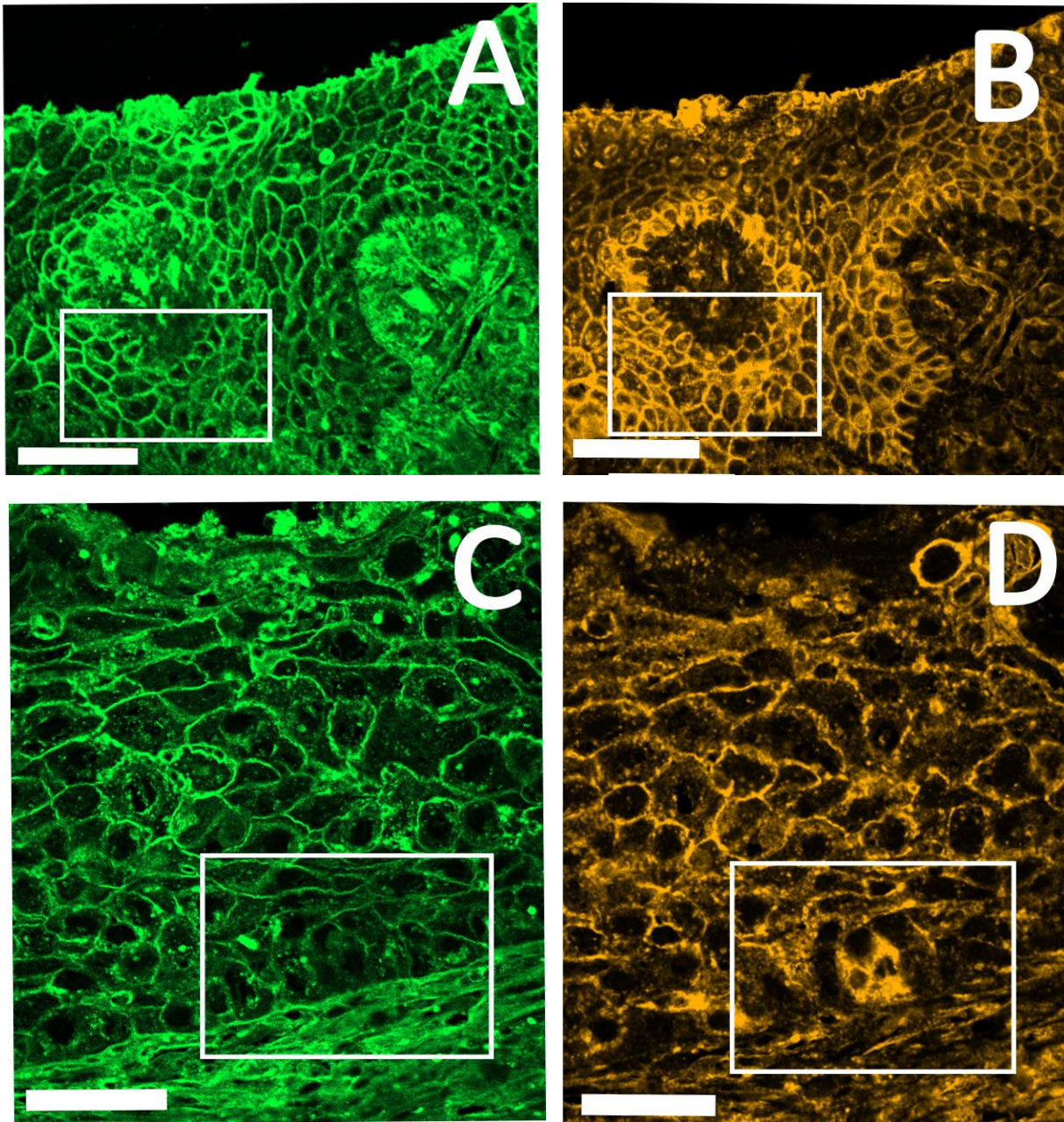


Figura 4. Patrón de tinción en mucosa oral normal (A y B muestra el mismo campo) y en COCE (C y D muestra el mismo campo) con un objetivo 40X. Las Figs. A y C, muestran el patrón de tinción con WGA fluorescente (señal en verde), y las Figs. B y D, muestran el patrón de tinción de Syndecan-1 (señal en amarillo). Barras de escala: 50 μ m.

Continuación fig.4) Patrón de tinción de WGA fluorescente y de Syndecan-1 en mucosa oral normal y en COCE.

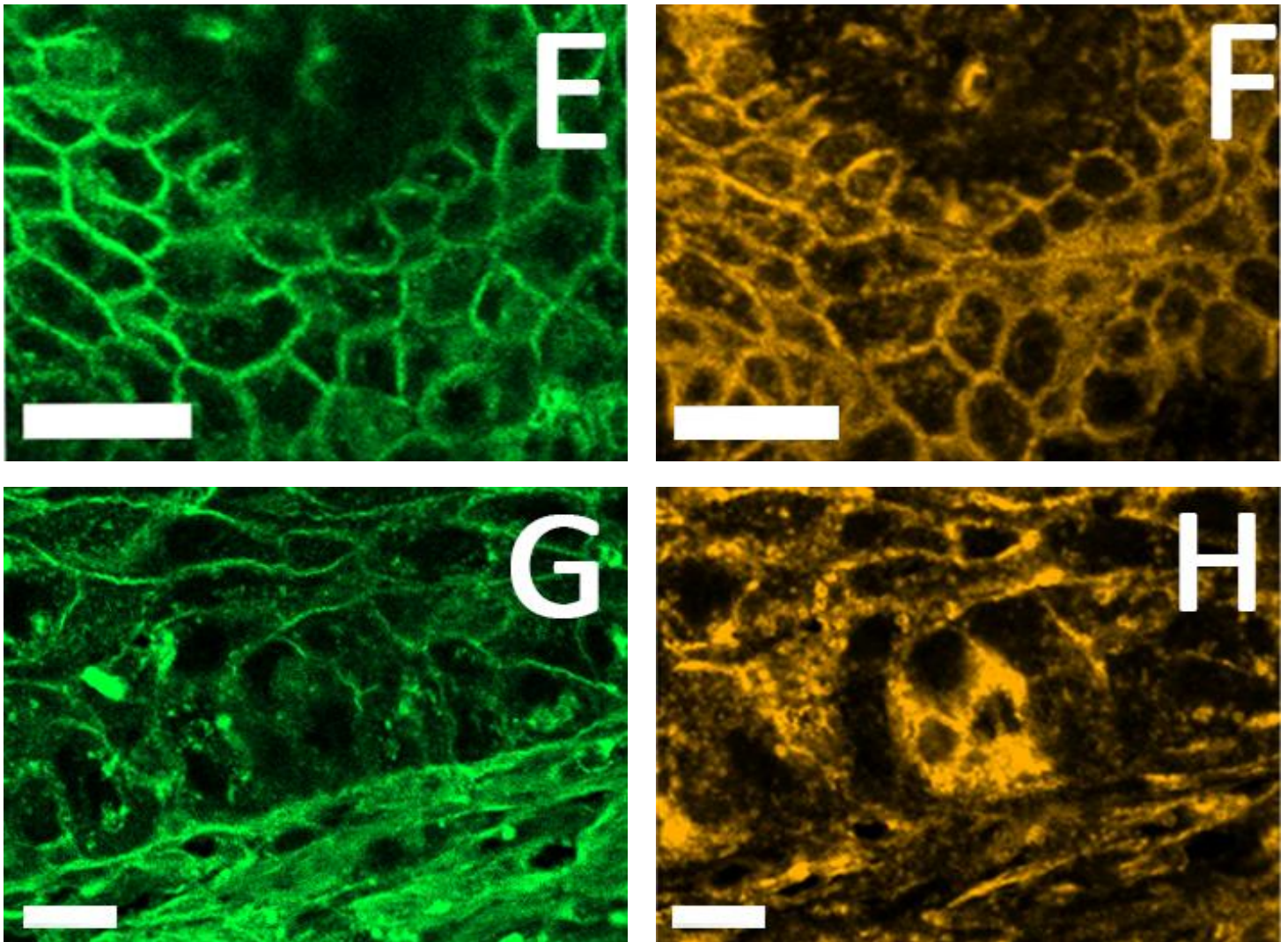


Figura 4. En (G) y (H) se muestra la imagen de los recuadros en blanco ampliada de las figuras C y D para apreciar mejor el patrón de tinción con WGA de la figura C y de Syndecan-1 de la figura D en las regiones más basales del epitelio en COCE. Barras de escala: 20 μ m.

Las figuras (E) y (F) muestran las imágenes ampliadas de los recuadros en blanco de las figuras A y B de la mucosa oral normal a modo de control. Barras de escala: 20 μ m.

10.5.- Fig.5) Patrón de tinción de WGA fluorescente y de GLUT-1 en mucosa oral normal y en COCE.

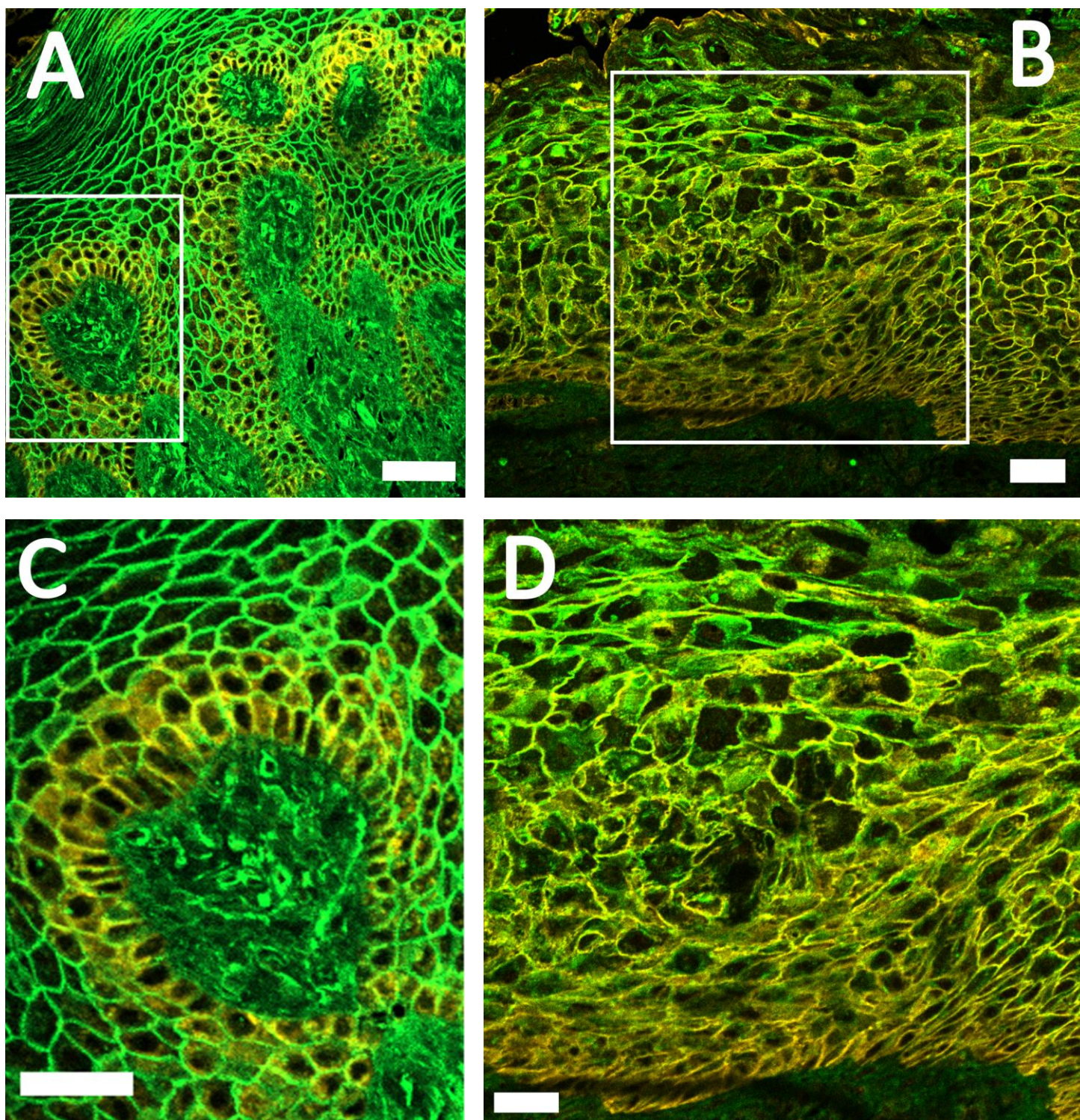


Figura 5. Patrones de tinción de GLUT-1 (señal en amarillo) y WGA (señal en verde) en simultáneo, en mucosa oral normal (A) y en COCE (B), con objetivo de 20x. Barras de escala: 50 μ m.

Las figs. C y D muestran las imágenes ampliadas de los recuadros en blanco de las figuras A y B respectivamente, para apreciar mejor el patrón de tinción con GLUT-1 y WGA. Barras de escala: 30 μ m.

Continuación fig.5) Patrón de tinción de WGA fluorescente y de GLUT-1

en mucosa oral normal y en COCE.

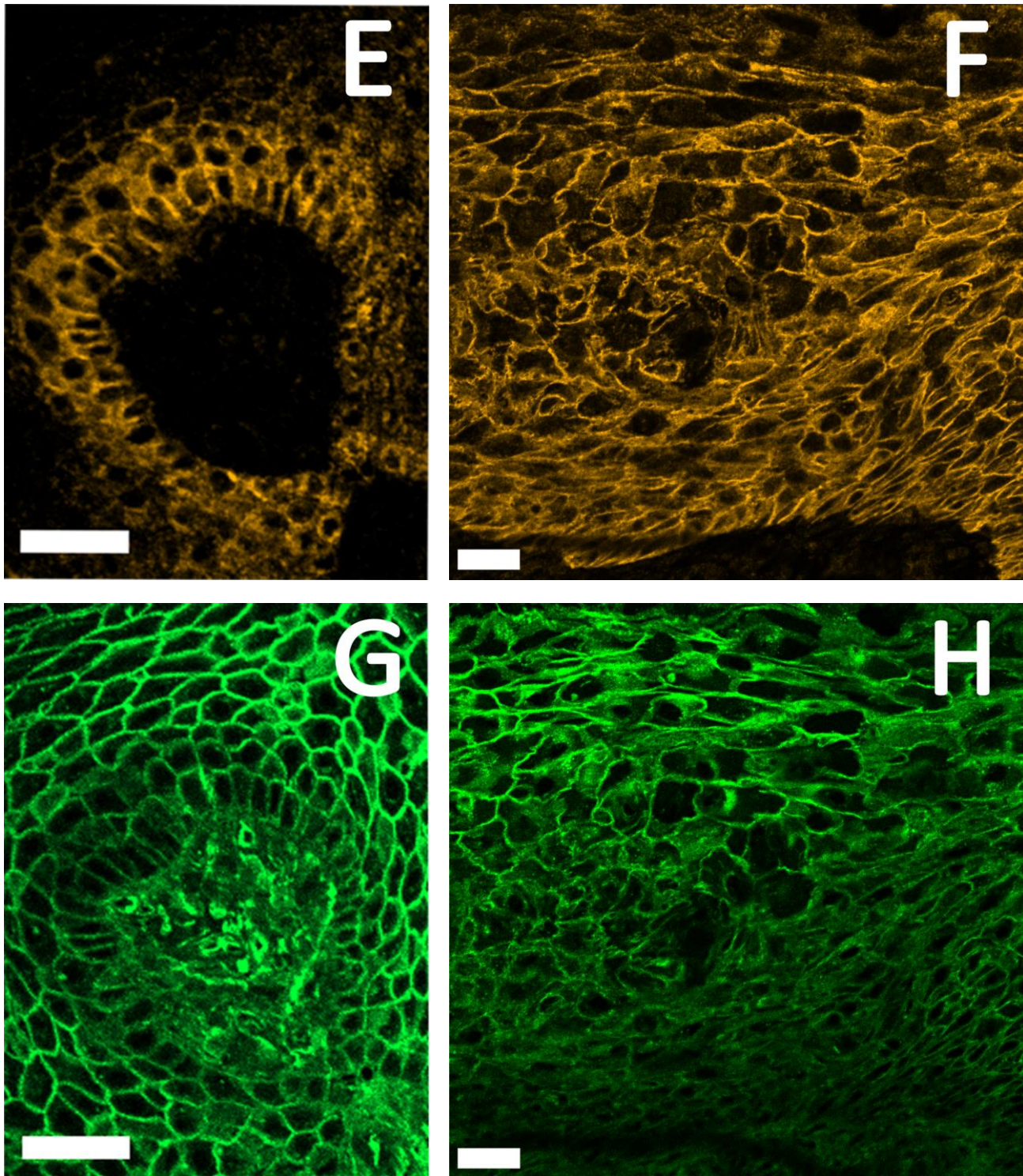


Figura 5. Patrones de tinción de GLUT-1 (señal en amarillo) y de WGA (señal en verde) en mucosa oral normal (E y G) y en COCE (F y H), con objetivo de 20x. Barras de escala: 30 μ m.

Las figs. E y G muestran el mismo campo de la fig.5C separada en canales correspondientes a las señales de distintos colores, para apreciar mejor el patrón de tinción con GLUT-1 y WGA en mucosa oral normal, y las figs. F y H muestran el mismo campo de la fig.5D separada en canales correspondientes a las señales de distintos colores, para apreciar mejor el patrón de tinción con GLUT-1 y WGA en COCE.

10.6.- Fig.6) Patrón de tinción de TOM-20, GLUT-1 y WGA fluorescente en mucosa oral normal y en COCE.

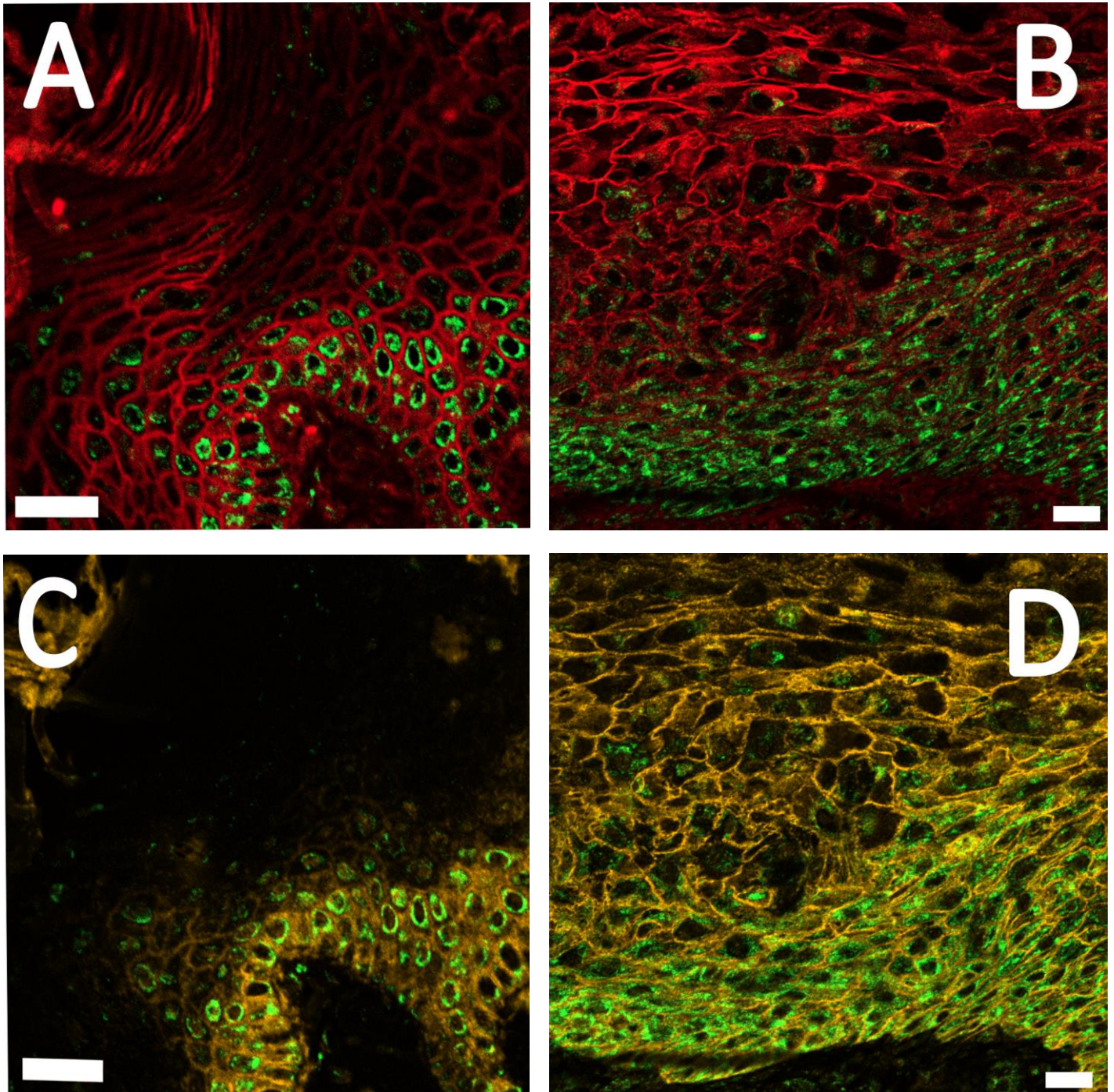


Figura 6. Patrones de tinción de TOM-20 (señal en verde), WGA (señal en rojo) y de GLUT-1 (señal en amarillo) en mucosa oral normal (A y C) y en COCE (B y D), con objetivo de 20x. Barras de escala: 30 μ m.

Las figs. B y D muestran el mismo campo de la fig.5D en COCE registrándose simultáneamente el patrón de tinción de WGA y de TOM-20 en la figura.B, y GLUT-1 y TOM-20 en la figura.D.

A modo de control se muestran las figs. A y C (mismo campo) en mucosa oral normal, registrándose simultáneamente el patrón de tinción de WGA y de TOM-20 en la figura.A, y GLUT-1 y TOM-20 en la figura.C.

Continuación fig.6) Patrón de tinción de TOM-20 y WGA fluorescente en mucosa oral normal y en COCE.

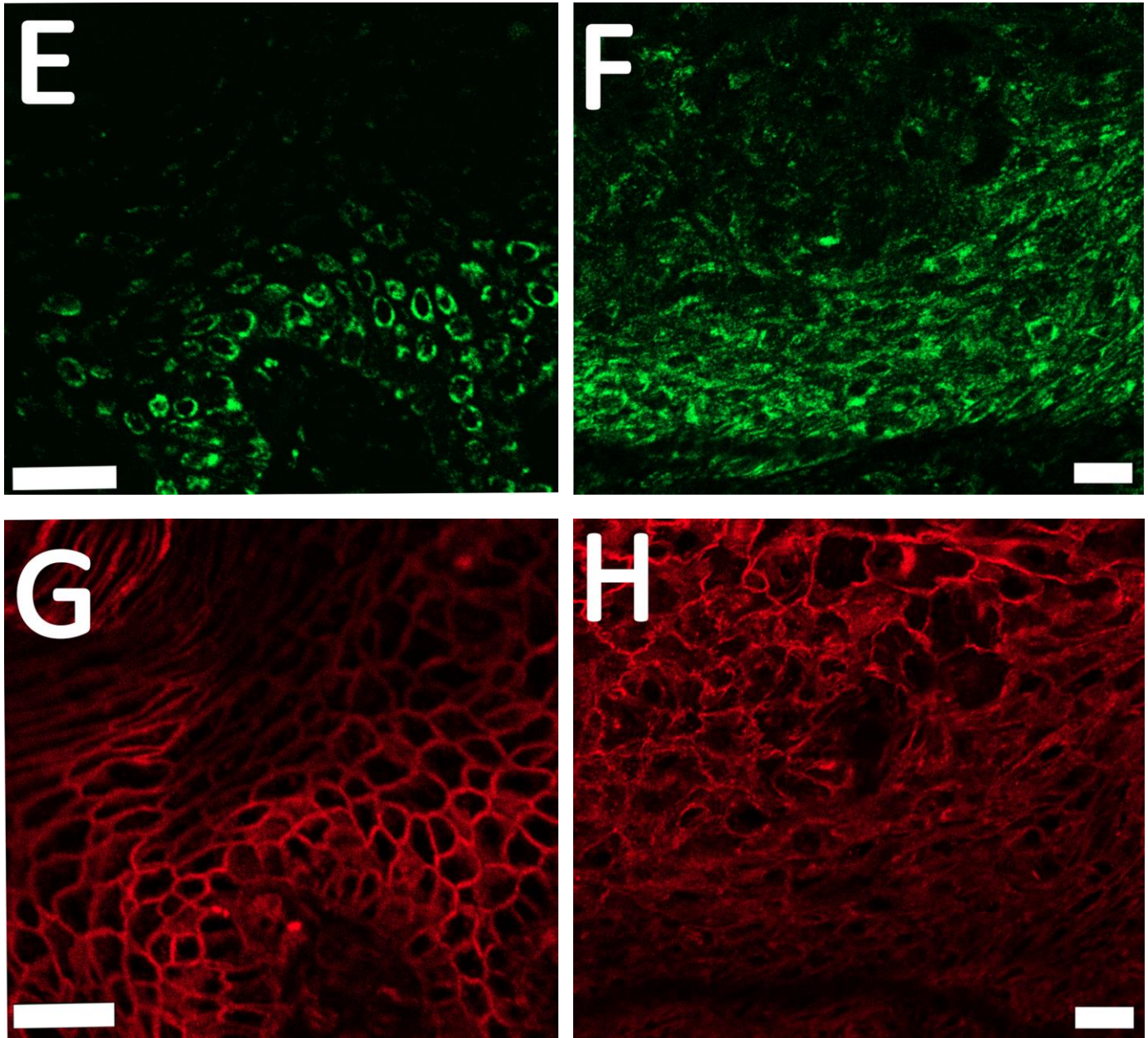


Figura 6. Patrones de tinción de TOM-20 (señal en verde) y WGA (señal en rojo) en mucosa oral normal (fig. E y G) y en COCE (fig. F y H), con objetivo de 20x. Barra de escala: 30 μ m.

Las figs. F y H muestran el mismo campo de la fig.6B separada en canales correspondientes a las señales de distintos colores, para apreciar mejor el patrón de tinción con TOM-20 y WGA en COCE.

Las figs. E y G muestran el mismo campo de la fig.6A separada en canales correspondientes a las señales de distintos colores, para apreciar mejor el patrón de tinción con TOM-20 y WGA en mucosa oral normal (control).

Continuación fig.6.- Patrón de tinción de TOM-20 y de WGA fluorescente en mucosa oral normal y en COCE.

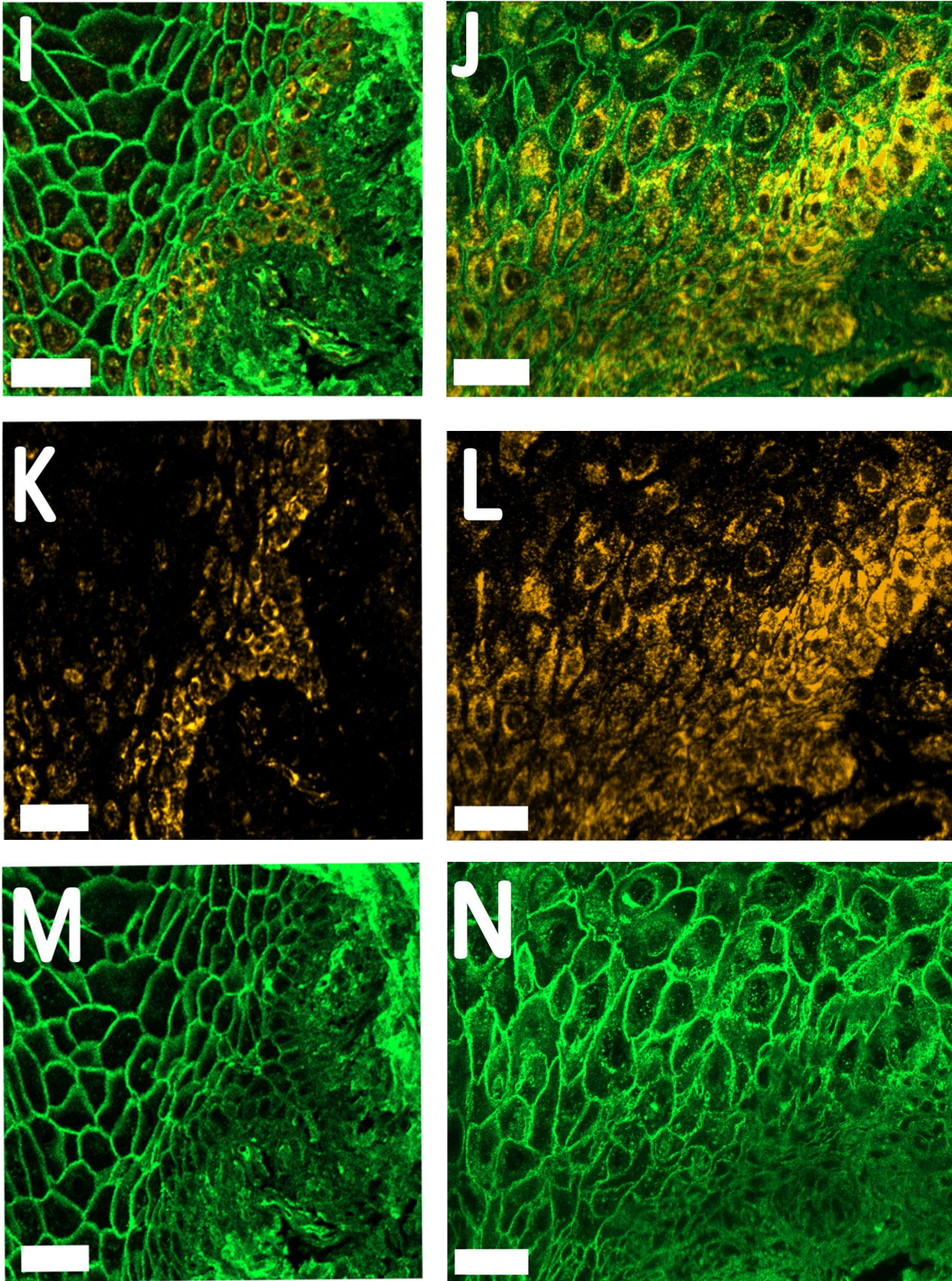


Figura 6. Patrones de tinción de TOM-20 (señal en amarillo) y WGA (señal en verde) en mucosa oral normal (I) y en COCE (J), con objetivo de 20x. Barras de escala: 30µm. Las figs. L y N muestran el mismo campo de la fig. J separada en canales correspondientes a las señales de distintos colores, para apreciar mejor el patrón de tinción con TOM-20 y WGA en COCE. Las figs. K y M muestran el mismo campo de la fig. I separada en canales correspondientes a las señales de distintos colores, para apreciar mejor el patrón de tinción con TOM-20 y WGA en mucosa oral normal (control).

10.7.- Fig.7) Patrón de tinción de WGA fluorescente en regiones invasivas de COCE.

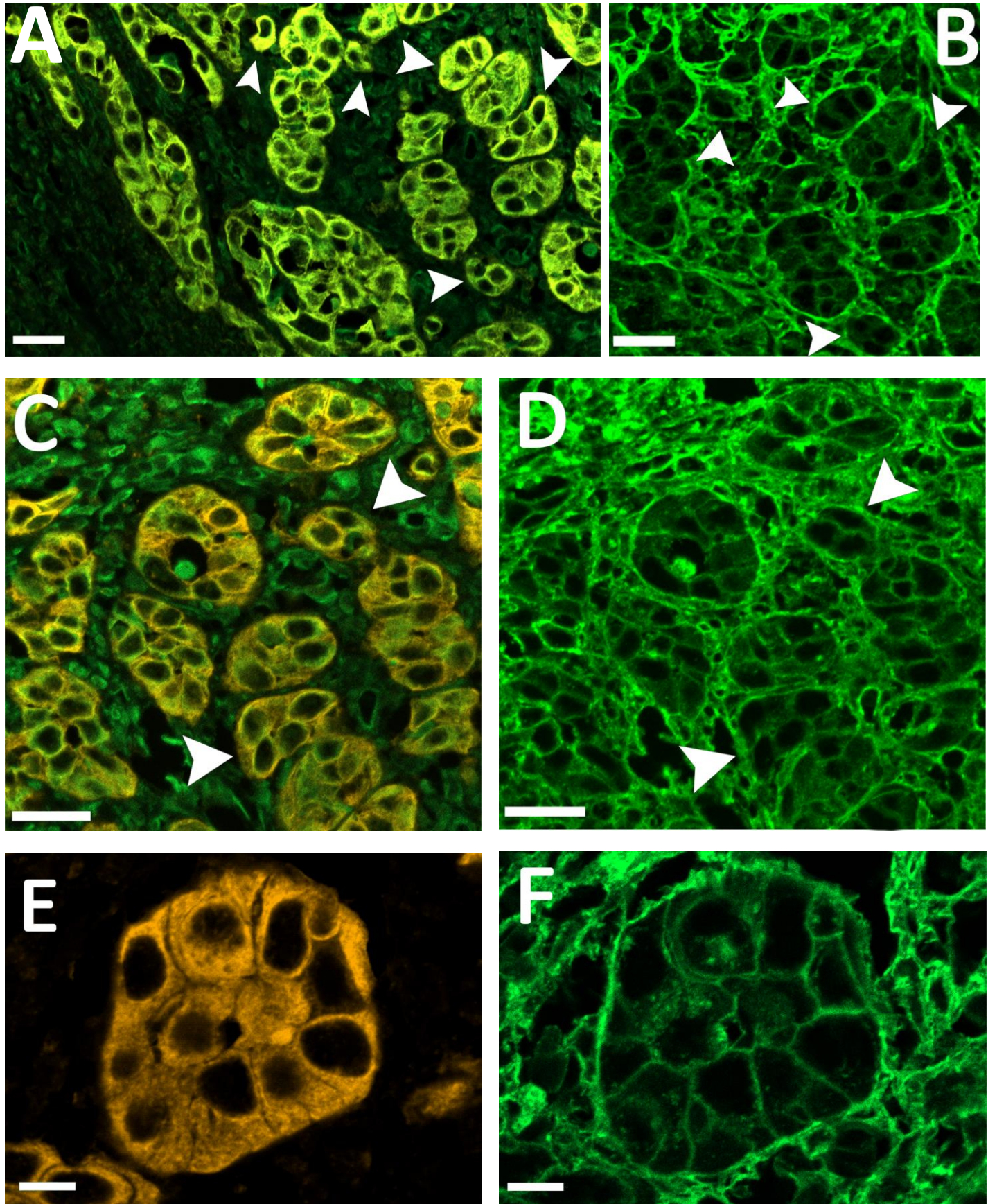


Figura 7. Patrón de tinción de WGA fluorescente (Figs. B, D: pseudoseñal en verde y Fig.F: señal en verde) y expresión de pan-CK (señal en amarillo) en simultáneo con vimentina (señal en verde) Figs. A y C en regiones de invasión tumoral en COCE. La Fig.en (A) tomada con un objetivo de 40X, muestra el frente de invasión tumoral proyectándose hacia la esquina inferior derecha infiltrándose en cordones de finas hebras e islotes tumorales revelado mediante tinción con pan-CK (marcador de estirpe epitelial) sobre el tejido conjuntivo marcado con vimentina. Las puntas de flecha indican posibles brotes tumorales. En (B) se muestra la zona de islotes y posibles brotes registrados en (A) con tinción de WGA fluorescente tomado con un objetivo de 40X. En (C) se muestran islotes tumorales y algunos de los posibles brotes registrados en (A) con un objetivo de 40X revelados mediante tinción con pan-CK en simultáneo con vimentina. En (D) se muestra el mismo campo tomado en (C) con tinción de WGA fluorescente y con un objetivo de 40X. En E y F se muestra un islote con tinción de WGA con limites celulares bien demarcados (F) en simultáneo con pan-CK (E). Barras de escala, A, B, C y D: 30 μ m y E y F: 10 μ m. **43**

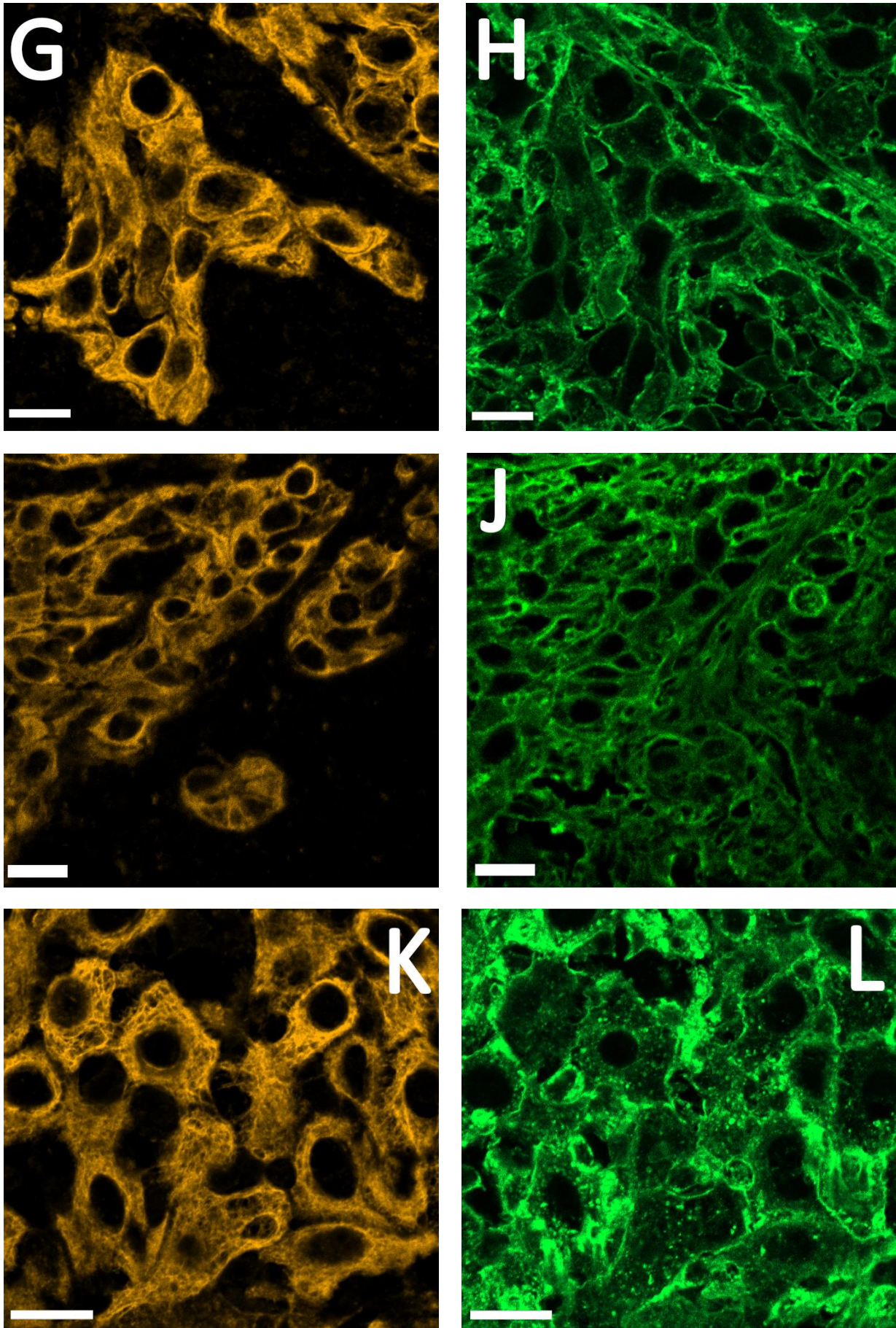


Figura 7. Patrones de tinción con pan-CK (señal en amarillo) y WGA fluorescente (Figs. H y L: señal en verde y Fig. J: pseudoseñal en verde), en regiones invasivas de COCE. (G) y (H) muestran un islote irregular con tinción de pan-CK y WGA, respectivamente, con límites celulares teñidos y demarcados con un aumento de 40X. (I) y (J) muestran un cordón de células tumorales con tinción de pan-CK y WGA respectivamente, con un aumento de 40X., donde también se pueden distinguir los límites celulares. (K) y (L) muestran una población de células tumorales con tinción de pan-CK y WGA respectivamente, con un aumento de 40X., donde los límites celulares se observan menos nítidos. Barras de escala: G y H: 20µm, I y J: 15 µm y K y L: 20 µm.

10.8.- Fig.8) Patrones de tinción con pan-CK, Vimentina y Ki-67 en regiones invasivas de COCE.

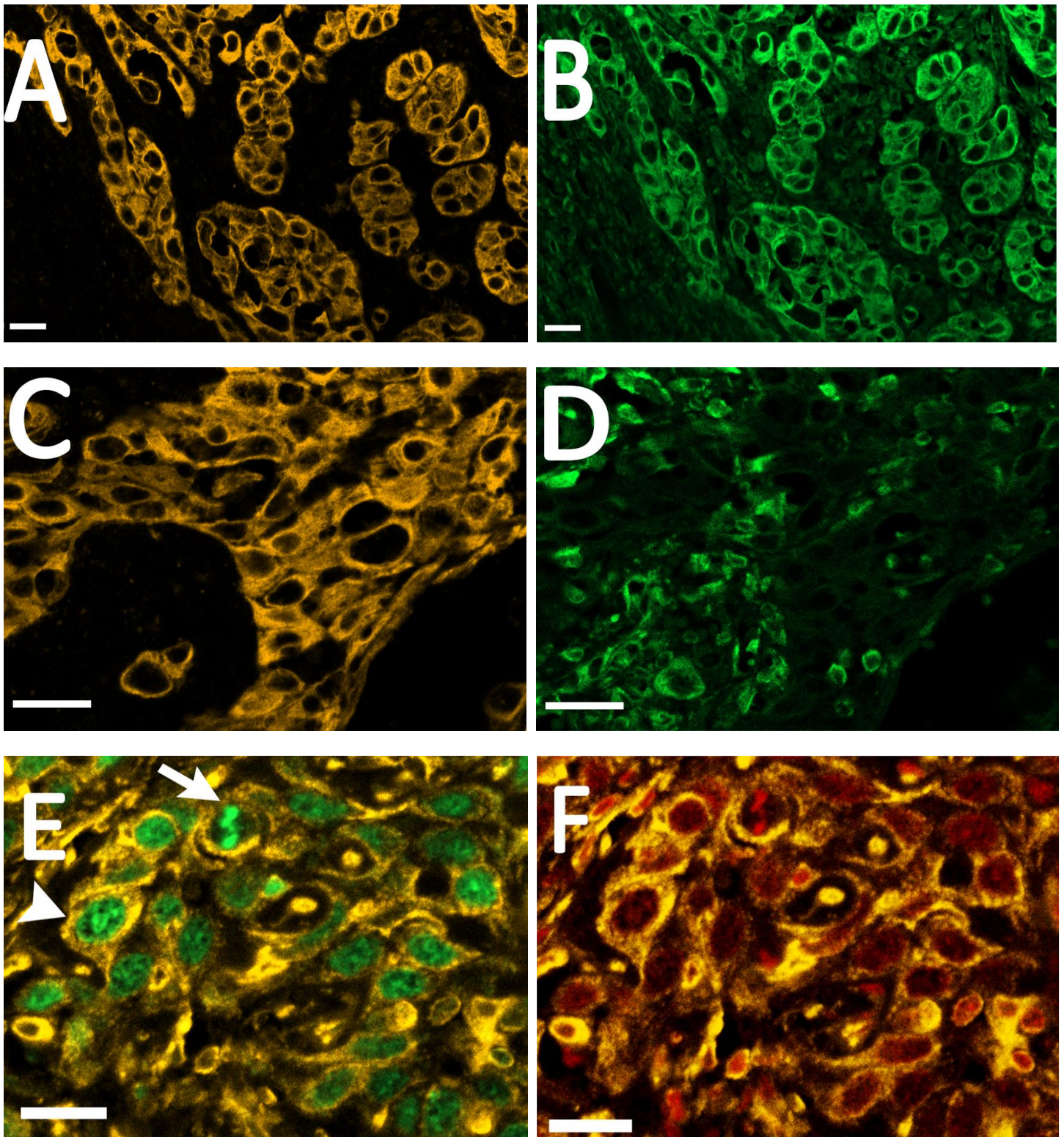


Figura 8. Patrones de tinción con pan-CK, vimentina y Ki-67 en regiones invasivas de COCE. (A) y (B) muestran el mismo campo tomado en la Figura. 7A, con tinción de pan-CK (señal en amarillo) y vimentina(señal en verde), respectivamente, con un aumento de 40X. (C) y (D) muestran un patrón de invasión en cordones más expansivos con tinción de pan-CK (señal en amarillo) y vimentina (señal en verde), respectivamente, con un aumento de 40X. (E) Muestran un grupo de células tumorales con tinción de vimentina (señal en amarillo) y ki-67 (señal en verde), con un aumento de 40X. (F) muestra el mismo campo tomado en (E) con tinción de vimentina (señal en amarillo) y Far-Red Nuclear Stain (señal en rojo), con un aumento de 40X. La punta de flecha en (E) muestra una célula grande con morfología epitelial, positiva para vimentina y Ki-67. La flecha en (E) muestran otra célula epitelial positiva para vimentina y Ki-67 en metafase. Barras de escala: A, B, C, D: 30 μ m y E y F: 20 μ m.

10.9.- Fig.9.-Patrones de tinción de E-cadherina y de WGA fluorescente en regiones invasivas de COCE.

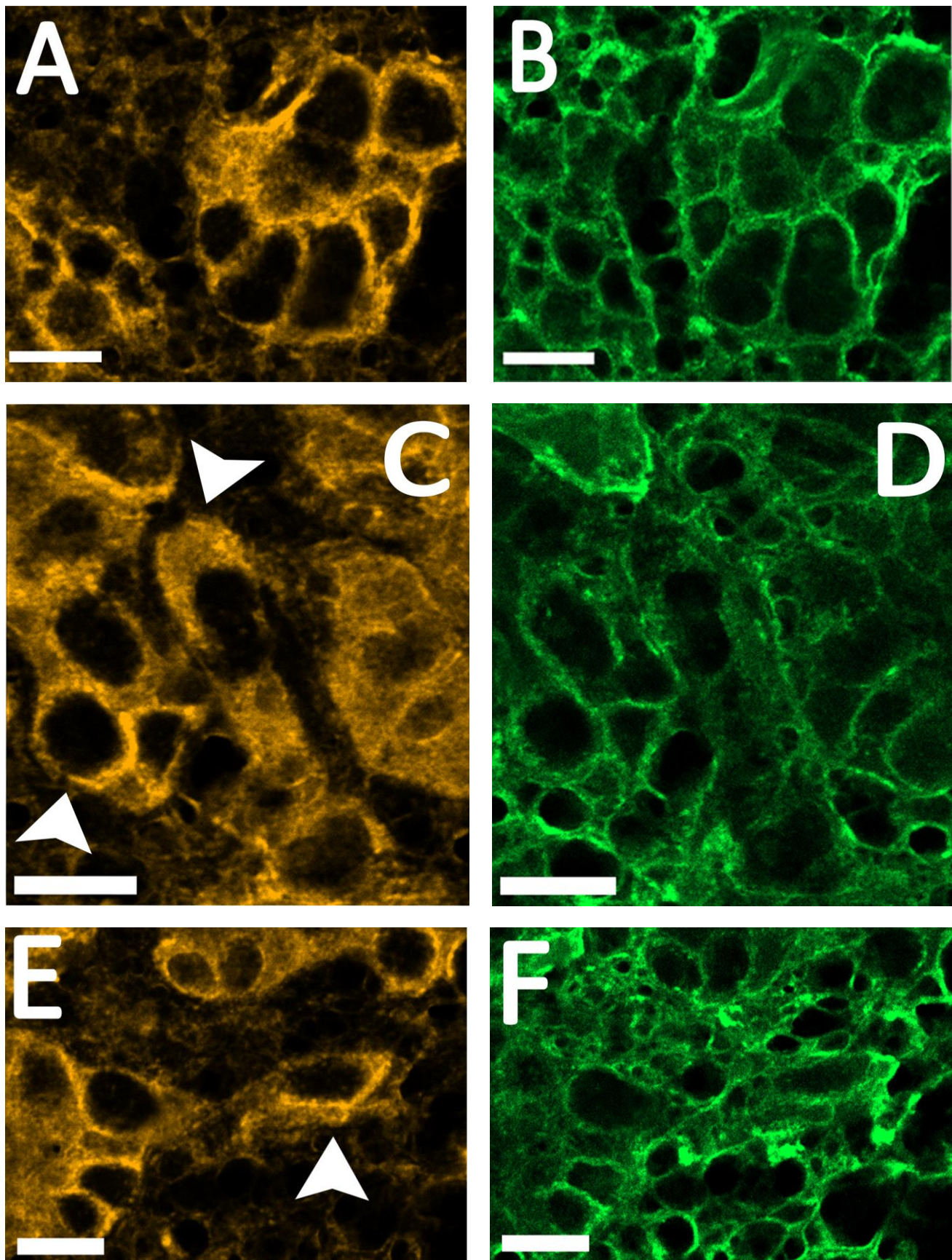


Figura 9. Patrones de tinción de WGA (señal en verde) y de E-cadherina (señal en amarillo) en regiones invasivas de COCE, con objetivo de 40X. (A) (B), (C) (D) y (E) (F): muestran el mismo campo con tinción de E-cadherina y WGA respectivamente. Las flechas marcan células con morfología alargada con expresión de E-cadherina citoplasmática. Barras de escala: 20 μ m.

10.10.- Fig.10.- Patrones de tinción de β -actina y de WGA fluorescente en regiones invasivas de COCE.

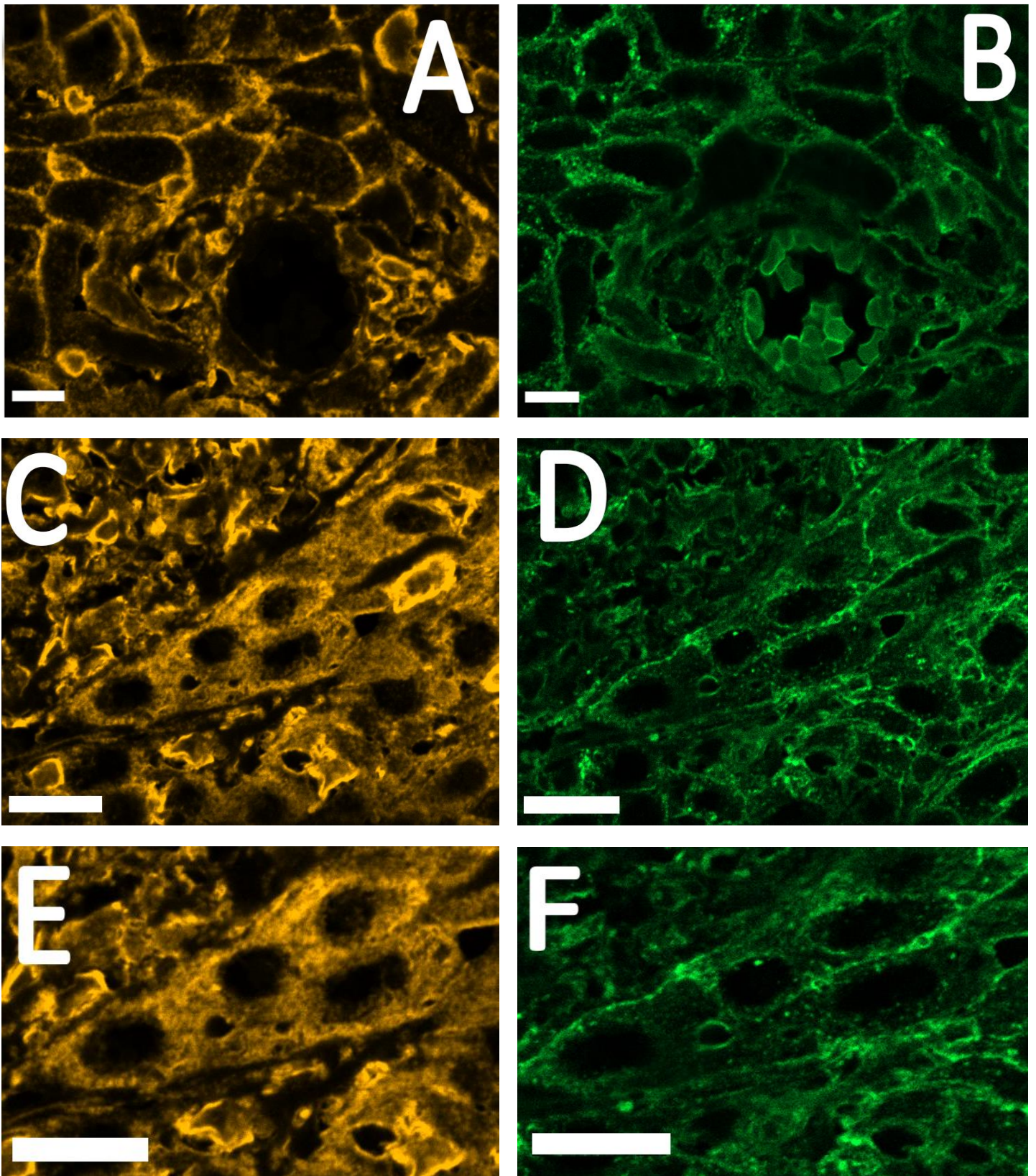


Figura 10. Patrones de tinción de WGA (señal en verde) y de β -actina (señal en amarillo) en regiones invasivas de COCE, con objetivo de 40X. (A) (B), (C) (D) y (E) (F): muestran el mismo campo con tinción de β -actina y WGA respectivamente. Las figs. E y F muestran células con morfología alargada y expresión de β -actina citoplasmática con WGA disminuida en los límites celulares. Barras de escala: 20 μ m.

10.11.- Fig.11.- Patrones de tinción de Syndecan-1 y de WGA fluorescente en regiones invasivas de COCE.

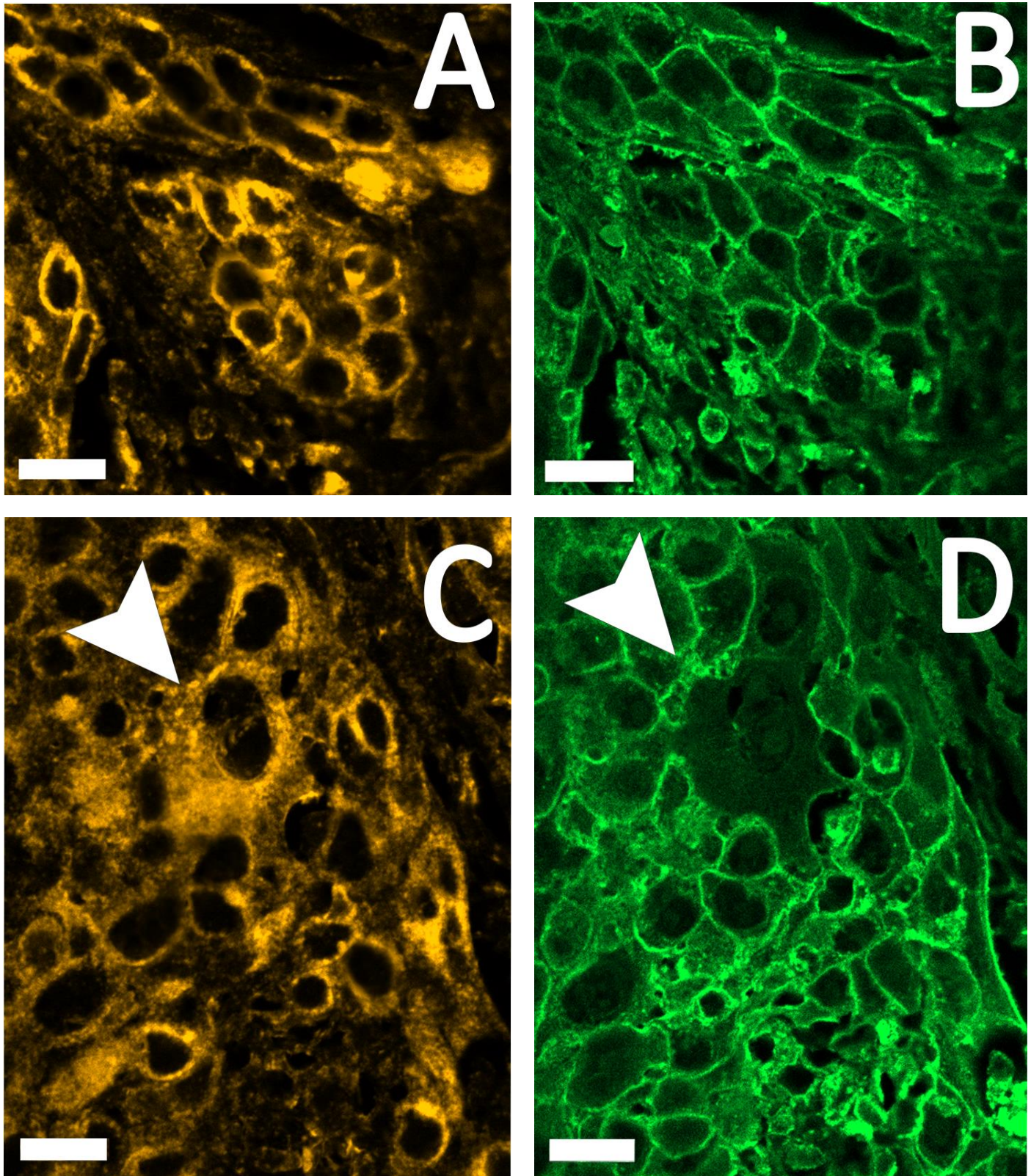


Figura 11. Patrones de tinción de WGA (señal en verde) y de Syndecan-1 (señal en amarillo) en regiones invasivas de COCE, con objetivo de 40X. (A) (B) y (C) (D): muestran el mismo campo con tinción de Syndecan-1 y WGA respectivamente. Las puntas de flecha muestran células epiteliales con prolongaciones citoplasmáticas con Syndecan-1 distribuido en el citoplasma (C) y WGA disminuida en los límites celulares (D). Barras de escala: 20 μ m.

11.- DISCUSIÓN

En este estudio hemos utilizado conjugados de WGA fluorescentes y el sistema de TSA para la detección de proteínas estructurales y vinculadas con el metabolismo energético visualizadas mediante MLC, que permitan contribuir en la detección de los cambios que se producen durante la progresión del COCE. Por lo tanto, para poder identificar alteraciones durante la progresión maligna, primeramente, evaluamos el patrón de tinción de WGA fluorescente sobre el epitelio de la mucosa oral normal, y según nuestros resultados fue posible observar un patrón altamente ordenado de las capas celulares, con límites celulares fuertemente teñidos y demarcados en todas las capas epiteliales (tanto a nivel basal como en las capas más externas), (Fig.1A, C y E). Este mismo patrón de tinción se registró en una investigación realizada sobre epitelio laríngeo normal humano mediante análisis histoquímicos con WGA (Tsambaos et al., 1998).

En el epitelio del COCE, también fue posible observar los límites celulares fuertemente teñidos y demarcados mediante tinción con WGA fluorescente, sobre todo en las capas más externas del epitelio, (Fig.1B). Sin embargo, en las capas más basales, donde se encuentran las células positivas para Ki-67 (Fig.1F), se registró una señal más citoplasmática y difusa (Fig.1D), y en particular, los límites celulares no se lograron distinguir fácilmente al compararlas con el control (Figs.1C y E). Nuestros resultados son similares a los obtenidos en la investigación realizada por Tsambaos y colaboradores., 1998, en el que fueron analizadas muestras FFPE de carcinomas de células escamosas (CCE) de laringe utilizando un panel de cinco lectinas biotiniladas que incluían a la WGA y luego de la incubación con complejos avidina- biotina-peroxidasa y posterior detección con el cromógeno DAB, se observó una señal de intensidad moderada a fuerte de WGA localizada en la membrana plasmática de los queratinocitos en los CCE de laringe bien diferenciados (grados 1 y 2 de malignidad), comparables con el patrón de tinción de las capas más externas del epitelio en COCE observado en nuestros resultados. Sin embargo, en la tinción con WGA en los CCE de laringe menos diferenciados (grado 3 de malignidad), la señal de la membrana plasmática de los queratinocitos tumorales con WGA estaba reducida o ausente, similar al patrón de tinción con WGA que se registró en las capas más basales del epitelio en COCE observado en nuestros resultados. Este mismo patrón de tinción con WGA (menor intensidad de señal membranosa) se observó también en muestras FFPE de tejidos neoplásicos intraepiteliales de cuello uterino (NIC) de alto grado de malignidad (Grado3) (Lim et al., 2020). Por lo tanto, una menor intensidad de señal membranosa de WGA en las células de las capas más basales del epitelio en COCE, podría ser indicativo de una subpoblación celular con mayor capacidad invasiva y por ende potencialmente más agresivas en comparación con las células de las

capas más externas del epitelio. Resulta interesante destacar la similitud de nuestros resultados en relación con el patrón de tinción de WGA con los obtenidos en muestras FFPE de CCE de laringe y de NIC, dado que ambas neoplasias al igual que el COCE surgen en el epitelio escamoso y, por tanto, podrían estar compartiendo alteraciones similares durante la progresión maligna.

Por otra parte, si bien se han asociado los cambios de tinción de WGA con alteraciones en la expresión de carbohidratos presentes en glicoproteínas de las membranas plasmáticas de las células malignas (Lim et al., 2020; Baeten et al., 2018), y son varias las investigaciones en las que se reporta el uso de WGA marcadas con fluorescencia aplicadas tópicamente como método de tamizaje para distinguir áreas cancerosas y displásicas de tejidos sanos *in vivo* con alta sensibilidad y especificidad, tanto en la cavidad oral (Baeten et al., 2018; Johnson et al., 2019), como en la zona esofágica (Bird-Lieberman et al., 2012), colorrectal (Kuo et al., 2016) y cuello uterino (Lim et al., 2020), no se conocen estudios actualmente hasta donde sabemos, que demuestren *in situ* de forma precisa el uso de la WGA como marcador estructural en muestras FFPE en COCE; ni tampoco estudios donde se analice su patrón de tinción en conjunto con la expresión de diversas proteínas estructurales involucradas en mantener la estructura e integridad celular (Tsambaos et al., 1998). Por lo tanto, nos pareció interesante investigar el patrón de expresión de las proteínas estructurales: E-cadherina, β -actina y Syndecan-1 en simultáneo con WGA en muestras de tejido FFPE en COCE y de mucosa oral normal, que pudieran contribuir en la evaluación de los cambios que se producen en la arquitectura tumoral, dado que varias características de las células neoplásicas como adhesión reducida y el aumento de la invasividad y motilidad, están determinados en gran medida por alteraciones en glicoproteínas de las membranas plasmáticas (Tsambaos et al., 1998). Según nuestros resultados, fue posible observar que una fuerte o moderada tinción de WGA en los límites celulares de las capas más externas del epitelio en COCE se correlacionaba con una expresión localizada en la membrana plasmática celular de las proteínas estructurales: E-cadherina, β -actina y Syndecan-1 (Figs.2C y D, 3C y D, 4 C y D), mientras que la pérdida de tinción de WGA en los límites celulares observada en las capas más basales del epitelio era paralela al cambio de expresión de la periferia al citoplasma de las proteínas E-cadherina (Figs.2G y H), β -actina (Figs.3G y H) y Syndecan-1 (Figs. 4.G y H). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que una fuerte o moderada tinción de WGA en los límites celulares podría ser indicativo de una importante presencia de complejos de adhesión célula-célula en estas regiones, y, por lo tanto, altos niveles de cohesión tisular. Por el contrario, la pérdida de tinción de WGA en los límites celulares acompañada de una tinción citoplásmica difusa, podría estar indicando niveles

reducidos de adhesión celular, y, por lo tanto, la presencia de áreas de menor cohesión tisular, sugestivo de una población celular con mayor grado de invasividad y motilidad. En apoyo a esta interpretación, este mismo patrón de tinción con WGA (pérdida de tinción membranosa acompañada de tinción citoplasmática) se ha observado también en tejido cardíaco de ratones en condiciones de deterioro de la cohesión tisular por deficiencia en EphrinB1, un importante regulador de la adhesión celular (Genet et al., 2012). Por otra parte, se ha reportado que entre las principales proteínas de superficie unidas por WGA en neutrófilos y macrófagos humanos, se encuentran las proteínas de adhesión célula-célula LFA-1, HMac-1 y gp150,95 (Christiansen y Skubitz, 1988). En las células endoteliales, WGA interactúa fuertemente con CD31, una de las principales proteínas de adhesión célula-célula en el endotelio (Pedicini et al., 2018). En el hongo unicelular *Dictyostelium discoideum*, WGA se une a las proteínas de adhesión célula-célula responsables de la formación de agregados multicelulares (Saxe III & Sussman, 1982). Por lo tanto, la WGA podría ser una herramienta potencial no solo como marcador de la arquitectura tisular y morfología celular en COCE, sino que también nos permitiría evaluar indirectamente en caso de observarse una señal más difusa, la pérdida de localización membranosa de proteínas vinculadas a la adhesión celular en muestras FFPE durante la progresión maligna. Las ventajas de utilizar conjugados de WGA fluorescentes es que son abundantes, dado que la WGA se extrae mayoritariamente del grano de trigo, lo que las hace relativamente baratas de producir, son fáciles de purificar y resulta ser un procedimiento de marcaje mucho más rápido y sencillo de realizar en comparación con la inmunohistoquímica de proteínas (Bird-Liberman et al., 2012).

En relación al análisis de la expresión de los marcadores vinculados al metabolismo energético en simultáneo con la tinción de WGA, fue posible observar sobre el epitelio de la mucosa oral normal un patrón de tinción con GLUT-1 preferentemente localizado en la membrana plasmática de las células de las capas más basales del epitelio (Fig. 5A, C, E y G). Similares resultados se han observado en una investigación realizada sobre muestras de mucosa oral normal mediante análisis Inmunohistoquímico de la proteína GLUT-1 (Ganvir et al., 2017). El confinamiento de la expresión de la proteína GLUT-1 únicamente en las capas basales y la falta de expresión de la misma en las células más diferenciadas podría indicar que la expresión de GLUT-1 estaría siendo regulada por la diferenciación de los queratinocitos, al igual que se observó en epidermis humana normal (Gherzi et al., 1992), donde se demostró posteriormente sobre epidermis humana reconstituida en cultivo que las condiciones de cultivo que causaban la diferenciación celular reducían la expresión de GLUT-1, mientras que las condiciones que minimizaban la diferenciación o la estratificación de los queratinocitos mejoraban

la expresión de la proteína (Gherzi et al., 1992). En el epitelio del COCE, por el contrario, la expresión de GLUT-1 se extendió a todas las capas epiteliales tanto a nivel basal como en las capas más externas (Fig.5B, D y F). Este patrón de expresión de GLUT-1 se ha observado en varios carcinomas incluido en el COCE y es un indicador de mal pronóstico (Qamar et al., 2019; Usman et al., 2019). Se ha reportado que tanto el aumento de la Intensidad de expresión, como un mayor porcentaje de células positivas para GLUT-1 son parámetros que se relacionan con el aumento de la captación de glucosa para su utilización en la glucólisis, como método preferencial de las células tumorales para producir energía y poder llevar a cabo una rápida división celular en un entorno que no es ideal desde un punto de vista fisiológico, dado que generalmente suele ser hipóxico y acidificado (Qamar et al., 2019; Wang et al., 2022). Sin embargo, en las capas más basales del epitelio en COCE próximo al estroma pudimos observar una población de células tumorales ricas en mitocondrias y presumiblemente con un mayor metabolismo mitocondrial oxidativo dado que es la zona de mayor tinción para TOM-20 (Fig.6 B, D y F). Por lo tanto, parecen existir 2 poblaciones metabólicamente diferentes en COCE, lo cual se correlaciona con lo observado por Domingo-Vidal y colaboradores, et al., 2022 y con los estudios de Curry et al., 2013; sobre muestras de cánceres del tracto aerodigestivos (cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC)), mediante estudios *in vitro*, *in vivo* e *in situ*. En este aspecto sería interesante evaluar más marcadores vinculados con el metabolismo oxidativo y glucolítico para estudiar en conjunto con estudios *in vitro* la existencia de acoplamiento metabólico entre las dos poblaciones celulares, así como hay estudios donde se ha reportado la posible existencia de compartimentación metabólica entre estroma y tumor en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (Curry et al., 2013; Domingo-Vidal et al., 2022). Este mismo fenotipo de fosforilación oxidativa (OXPHOS) mitocondrial se observó en las células epiteliales de las capas basales de la mucosa oral normal (Fig.6 A, C y E), lo que sugiere que las células epiteliales de las capas más basales del epitelio en COCE podrían estar compartiendo necesidades metabólicas similares a las células de las capas basales de la mucosa oral normal con mayor capacidad proliferativa, lo cual se ha reportado en otras investigaciones (Moreno-Sánchez et al., 2007). Sin embargo, parece haber un mayor número de células positivas para TOM-20 en el epitelio del COCE en comparación con el epitelio oral normal (Fig.6B vs Fig.6A, Fig. 6F vs Fig.6E, Fig.6J vs Fig.6I y Fig.6L vs Fig.6K). Nuestros resultados se han observado en algunos tipos de cánceres y tanto el aumento de la intensidad de expresión como el mayor número de células positivas para TOM-20 se han relacionado con aumento del metabolismo mitocondrial oxidativo, aumento de la proliferación, migración e invasión de células tumorales (Park et al., 2019; Guo Q. 2017). En el caso particular del cáncer colorrectal, se ha reportado que durante la invasión local el aumen-

- to de la expresión de TOM-20 está asociado con un mayor tráfico de mitocondrias energéticamente activas en el borde invasivo donde proporcionan un aumento repentino de ATP local necesario para alterar el citoesqueleto de las células requeridas para la motilidad e invasión celular (Park et al., 2019). Similares resultados se han observado en células de cáncer de páncreas cultivadas *in vitro* tratadas con el factor de crecimiento transformante β -1 (TGF β -1), donde se detectó un aumento de la masa mitocondrial durante el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT) inducida por la exposición al factor TGF β -1, necesario para promover la invasión tumoral y la metástasis en varios tipos de cáncer (Guo Q. 2017). En nuestro estudio, la pérdida de cohesión celular en las capas basales del epitelio en COCE representada por la pérdida de expresión de WGA en los límites celulares acompañada de una tinción citoplásmica difusa (que serían menos cohesivas y potencialmente más invasivas y agresivas en esta región) (Fig.6H vs Fig.6G y Fig.6N vs Fig.6M), se correlaciona con el aumento de la masa mitocondrial y, por ende, en principio, con el metabolismo mitocondrial oxidativo, a través del aumento de la expresión de TOM-20 (Fig.6F vs Fig.6E y Fig.6L vs Fig.6K). Por lo tanto, nuestros resultados podrían estar indicando una población celular con mayor grado de invasividad y motilidad similar a lo observado en cáncer colorrectal y páncreas mediante estudios *in vitro*. A su vez, el patrón de distribución mitocondrial de las células más basales tendía a ocupar el citoplasma celular en contraposición a las células de las capas más externas del epitelio en COCE que fueron positivas para TOM-20, en donde las mitocondrias en su mayoría estaban agrupadas o más acotadas a la zona perinuclear (Fig.6L). Este patrón de distribución mitocondrial perinuclear se lo ha observado en otros tipos de cáncer mediante estudios *in vitro* y se lo ha asociado con la exposición de las células tumorales a condiciones de hipoxia, reducción de la proliferación, migración e invasión celular en contraposición a la distribución citoplasmática mitocondrial, que se ha relacionado con mayor invasividad y motilidad celular (Park et al., 2019; Caino et al., 2015; Thomas et al., 2017). Por lo tanto, nuestros resultados indican que existe heterogeneidad metabólica en el COCE y que el sistema de OXPHOS mitocondrial podría contribuir al metabolismo glucolítico, como se ha reportado en otros tipos de cáncer (Sandulache et al., 2011; Mudassar et al., 2020; Scheid et al., 2021) promoviendo la invasión celular.

En regiones de invasión tumoral en el estroma, visualizado en algunos casos con tinción de vimentina, señal en verde, en Figs. (7A y C), se pueden distinguir grupos de células tumorales de tamaño variable mediante tinción con pan-CK (señal en amarillo) que eran fácilmente discernibles del estroma (Figs. 7A, C, E, G, I y K). La tinción con WGA simultánea marca tanto los grupos de células tumorales como el compartimento estromal circundante, pero permite visualizar claramente las formas de las células epi-

-teliales dentro de los grupos tumorales distinguiéndolas de las células estromales adyacentes (Figs.7B, D, F, H, J y L) y en algunos grupos de tumores, la demarcación de los límites celulares por tinción con WGA fue particularmente nítida (Figs.7F y H). Por lo tanto, la tinción con WGA podría ser de gran utilidad en la visualización de los diferentes patrones morfológicos de invasión tumoral, los cuales son considerados uno de los factores pronóstico más relevantes para evaluar la gravedad de la invasión, y por ende que determinará la supervivencia del paciente (Cortegoso et al., 2017). Por otra parte, se podría considerar el uso de la WGA para la detección de los llamados “brotes tumorales”. Estos consisten en células epiteliales tumorales únicas aisladas o células tumorales en pequeños grupos (hasta 5 células) que se ven principalmente a una distancia variable del frente de invasión dispersos dentro del estroma, y se consideran marcadores pronósticos histopatológicos potenciales de metástasis en numerosos cánceres, incluido en el COCE (Almangush et al., 2014; Berg & Schaeffer, 2018; Kale & Angadi, 2019; Lugli et al., 2021). Independientemente del escenario clínico o el tipo de tumor, se asocia un mayor número de brotes tumorales con una disminución de la supervivencia (Lugli et al., 2021). La detección y cuantificación de los brotes tumorales se realiza principalmente mediante tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y alternativamente se puede realizar mediante inmunohistoquímica con pancitoqueratinas (CK), en situaciones en las que la tinción H&E no permite distinguir claramente los brotes del estroma circundante, como en los casos de una reacción inflamatoria prominente o una reacción desmoplásica (Mitrovic et al., 2012). Sin embargo, la ventaja de utilizar WGA frente a la inmunohistoquímica con pan-CK es que es un procedimiento mucho más sencillo y rápido de realizar. Por otra parte, se ha planteado en varias investigaciones que los brotes tumorales podrían estar compuestos por células sometidas al proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT) (Kale & Angadi 2019; Mohtasham et al., 2021), y de hecho, en algunos casos, se ha registrado tanto en el frente tumoral invasivo como también en los brotes tumorales en muestras de cáncer colorrectal, así como también en muestras de COCE, un estado de transición llamado EMT “parcial”, en que las células coexpresan tanto marcadores epiteliales como mesenquimales (Grigore et al., 2016; Lugli et al., 2021), indicativo de una subpoblación celular con mayor motilidad e invasión celular, pero que aún conservan algunas características epiteliales. En nuestro trabajo se observaron resultados similares, dado que tanto el frente tumoral como los posibles brotes tumorales coexpresaron pan-CK (un marcador epitelial) y vimentina (un marcador mesenquimatoso), (Figs.8 A y B). Este mismo estado de EMT “parcial” se visualizó también en otras regiones de invasión tumoral en COCE, como las observadas en las Figs. 8 E y F, donde se registraban con frecuencia células con morfología epitelial que coexpresaban tanto Ki-67 como vimentina, consistentes con la adquisición de propieda-

-des mesenquimales, al mismo tiempo que conservan características epiteliales y su actividad proliferativa. Sin embargo, el patrón de invasión en cordones más expansivos registrado en la fig.8C reveló una fuerte expresión de pan-citoqueratinas, pero una disminuida expresión de vimentina, lo que podría considerarse como indicio de una subpoblación de células tumorales con mayor identidad epitelial y posiblemente con menor motilidad y capacidad de establecer metástasis y por ende menos agresiva (Lopez y Seoane, 2019; Dissanayaka et al., 2012). Histomorfológicamente, los “brotes tumorales” se asocian principalmente con el llamado “patrón de crecimiento infiltrante”, que se caracteriza por un patrón constituido por pequeños grupos (nidios o islotes) o cordones de células infiltrantes en el estroma (Kale & Angadi, 2019; Lugli et al., 2021), lo que coincide con nuestros resultados dado que los posibles brotes tumorales se registraron mayormente en el patrón de invasión del tipo infiltrativo (grado 3) (Fig. 8A). Por otra parte, si bien la tinción con WGA nos permitió visualizar las formas de las células epiteliales dentro de los grupos tumorales, así como también el compartimento estromal circundante, los brotes tumorales constituidos por células epiteliales únicas aisladas podrían ser difíciles de identificar al confundirse con componentes del estroma, por lo que sería de gran utilidad, en estos casos, el uso de la tinción con pan-CK (Fig.8A). Sin embargo, se ha reportado que la invasión de una sola célula suele ser un evento poco común, y la brotación tumoral parece estar reflejada predominantemente por la migración colectiva de células tumorales (Bronsert et al., 2014; Prall et al., 2005). Además, la utilización de la MLC en combinación con los diferentes métodos de tinción fluorescentes (WGA o pan-CK) en la detección de brotes tumorales nos permitiría distinguir señales en el eje z, y, por lo tanto, realizar reconstrucciones 3D por métodos computacionales (Liddle,2012), lo que resultaría una herramienta fundamental para identificar con mayor precisión los posibles brotes tumorales en contraposición a las secciones histológicas 2D estudiadas en la Microscopia Óptica Convencional.

Es importante aclarar, que aunque existen varias investigaciones que respaldan a la “brotación tumoral” como valor pronóstico potencial de metástasis, aún no ha sido incluida en los sistemas de clasificación de tumores más recientes de TNM (2017) y OMS (2019) para predecir el comportamiento del COCE, así como también en otros tipos de cánceres, en gran parte debido a la falta de sistemas de puntuación “scoring” y de una metodología de tinción estandarizada para la validación de este biomarcador (Berg y Schaeffer, 2018; Lugli et al., 2021; Togni et al., 2022). Sin embargo, en los carcinomas colorrectales, la brotación tumoral ya ha sido calificada como un “factor pronóstico adicional” e incluido en el sistema de clasificación TNM de la UICC/AJCC de 2017 (Brierley et al., 2017).

Por otra parte, en otras regiones invasivas de COCE dentro del estroma hemos observado grupos de células tumorales con tinción de WGA bien definida en los límites celulares (Figs. 9B, 10B y 11B) que se correlacionaba con un patrón de expresión membranoso de las proteínas estructurales: E-cadherina, β -actina y Syndecan-1 (Figs. 9A, 10A y 11A respectivamente), lo que podría estar indicando grupos de células tumorales con mayores niveles de adhesión celular y por ende más cohesivas. Este tipo de migración o “invasión celular colectiva” (ICC) en el que células mantienen sus contactos a través de la expresión membranosa de proteínas de adhesión e invaden sus tejidos circundantes en forma de grupos celulares y agregados se ha observado en varios tipos de carcinomas, como en el de mama, pulmón, próstata y colon, así como también en carcinomas orales de células escamosas (Gloushankova et al., 2017; Wicki et al., 2006; Etemad-Moghadam y Alaeddini 2015; Friedl et al., 2012). Por el contrario, en otros grupos tumorales se observaron ejemplos frecuentes de células que adquirirían una morfología fusiforme (más alargada) o con la formación de protrusiones citoplasmáticas, en las cuales se registró una tinción citoplasmática prominente de las proteínas estructurales: E-cadherina (Figs.9C y E), β -actina (Figs.10 C y E) y Syndecan-1(Figs.11C), que se correlacionaba a su vez , con una marcada disminución de la tinción con WGA en los límites celulares (Figs.9D, 9F; 10D, 10F y 11D), lo que podría estar indicando en este caso, células tumorales con menores niveles de adhesión celular, y por ende, menos cohesivas, sugestivo de una población celular con mayor grado de motilidad. De acuerdo con esta interpretación, se ha reportado que los cambios de expresión de E-cadherina membranosa a citoplasmática, junto con adquisición de una morfología fusiforme o alargada de las células epiteliales, son características distintivas de las etapas más avanzadas del proceso de EMT observado en varios tipos de cáncer (Grigore et al., 2016; Lugli et al., 2021). Durante este proceso las células epiteliales pierden la localización membranosa del marcador epitelial E-cadherina, así como también disminuyen la expresión de otros marcadores epiteliales como cateninas y citoqueratinas, al tiempo que aumentan la expresión de uno o más marcadores mesenquimales, como vimentina, N-cadherina, o fibronectina. Estos cambios conducen a la pérdida de polaridad celular y cohesión intercelular, para adoptar un fenotipo migratorio mesenquimatoso similar a fibroblastos, con mayor motilidad celular necesaria para la invasión (Grigore et al., 2016; Enderle-Ammour et al., 2017).

El citoesqueleto de actina está estrechamente ligado a las uniones célula-célula en el epitelio manteniendo la estructura e integridad celular (Trejo, 2008), por lo que una disminución de E-cadherina membranosa puede resultar en la translocación citoplasmática de β -actina a medida que avanza la EMT. De hecho, se ha reportado que, durante este proceso, las células epiteliales a medida que pierden la expresión de E-ca-

-dherina membranosa sufren una serie de cambios en el citoesqueleto de actina que resulta en un desplazamiento de la actina y sus proteínas reguladoras desde la corteza hacia el citoplasma de las células migratorias (Morris y Machesky, 2015; Leggett et al., 2021).

Por otra parte, el cambio de expresión de Syndecan-1 membranoso a citoplasmático asociado con morfologías celulares fusiformes o con prolongaciones citoplasmáticas es otra característica observada en las etapas más avanzadas durante el proceso de EMT en varios carcinomas (Kim et al., 2015; Couchman, 2021). Nuestros resultados son consistentes con la cohesión celular variable observada en grupos de células tumorales invasivas, las cuales son sometidas a múltiples estados durante la invasión, adoptando diferentes patrones que posicionan a la ICC y a la EMT en cada extremo y uno o varios fenotipos intermedios o también llamados EMT "parciales" o "incompletos", cuyo número sigue siendo un tema de debate (Grigore et al., 2016; Leggett et al., 2021). Tanto la EMT como la ICC tienen sus ventajas durante la promoción de la invasión y la metástasis. Por un lado, la EMT aumenta la motilidad celular y facilita el paso a través de varias barreras, mientras que la ICC permite un "comportamiento de clones mixtos" a través del cual las células heterogéneas contribuyen al proceso de migración a través de diferentes características, como la resistencia a la apoptosis, división rápida, etc. (Etemad-Moghadam y Alaeddini, 2017). Además, en la ICC el desarrollo de micrometástasis es menos desafiante dado que las células ubicadas más centralmente en los grupos tumorales estarían más protegidas contra los efectos destructivos de la respuesta inmune del huésped y al acceso de la actividad de los medicamentos (Etemad-Moghadam y Alaeddini, 2017; 2015).

Por lo tanto, nuestros resultados en base al análisis de los patrones de tinción de proteínas estructurales y de proteínas vinculadas al metabolismo energético en combinación con WGA, sugieren que los patrones de tinción de WGA son indicativos del grado de cohesión celular en el COCE, que disminuye en las capas más basales del epitelio oral en las cuales parece haber un mayor metabolismo mitocondrial oxidativo, y luego, en los grupos de células tumorales invasivas con una morfología más migratoria. Los cambios en la cohesión celular en estas diferentes etapas, podrían ser la base de la invasión inicial en el estroma y luego la posterior diseminación de las células tumorales dentro del estroma.

El uso de la tinción con WGA, en combinación con la tinción de TSA acoplada a la IHQ de proteínas estructurales y de proteínas vinculadas al metabolismo energético visualizadas mediante MLC, constituyen herramientas potencialmente útiles para el estudio de la arquitectura y caracterización de los cambios que se producen durante la progresión del COCE.

Se necesitarán más estudios para definir los posibles usos de la tinción con WGA fluorescente en combinación con la MLC, que puedan proporcionar las bases necesarias para su aplicación en la labor histopatológica clínica del COCE. En particular, sería conveniente continuar con el análisis de la expresión de diversos marcadores (estructurales, del metabolismo energético y otros), en combinación con la tinción de WGA en regiones de COCE donde se incluya la interfase epitelio/estroma y regiones de invasión tumoral dentro del estroma, que permitan contribuir en la identificación de subpoblaciones tumorales potencialmente agresivas.

Cabe mencionar que parte de los resultados de esta Maestría dieron lugar a una publicación en la revista "Cells" titulada como "Tissue architecture of oral squamous cell carcinoma visualized by staining patterns of wheat germ agglutinin and structural proteins using confocal microscopy" (que se incluye en el apéndice), por lo que esperamos pueda aportar avances a la biología de la carcinogénesis de este tumor de alta incidencia en la salud pública. (<https://doi.org/10.3390/cells10092466>).

13.- BIBLIOGRAFÍA

Almangush, A., Salo, T., Hagstrom, J. & Leivo, I. (2014). Tumour budding in head and neck squamous cell carcinoma - a systematic review. *Histopathology* 65, 587–594.

Ali, A., Soares, A. B., Eymael, D., & Magalhaes, M. (2021). Expression of invadopodia markers can identify oral lesions with a high risk of malignant transformation. *The journal of pathology. Clinical research.* 7(1): 61–74. <https://doi.org/10.1002/cjp2.182>.

Andl, T., Le Bras, G. F., Richards, N. F., Allison, G. L., Loomans, H. A., Washington, M. K., Revetta, F., Lee, R. K., Taylor, C., Moses, H. L., & Andl, C. D. (2014). Concerted loss of TGF β -mediated proliferation control and E-cadherin disrupts epithelial homeostasis and causes oral squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis.* 35(11): 2602–2610. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu194>.

Azumi, N., Battifora, H. (1987). The distribution of vimentin and keratin in epithelial and nonepithelial neoplasms. A comprehensive immunohistochemical study on formalin- and alcohol-fixed tumors. *Am J Clin Pathol.* 88, 286-96.

Baeten, J., Johnson, A., Sunny, S., Suresh, A., Birur, P., Uma K., Kademani, D. (2018). Chairside molecular imaging of aberrant glycosylation in subjects with suspicious oral lesions using fluorescently labeled wheat germ agglutinin. *Head & neck.* 40(2): 292–301. <https://doi.org/10.1002/hed.24943>.

Bensley, J., De Matteo, R., Harding, R., Black, M. (2016). Three-dimensional direct measurement of cardiomyocyte volume, nuclearity, and ploidy in thick histological sections. *Sci Rep* 6: 23756. <https://doi.org/10.1038/srep23756>.

Berg, KB. & Schaeffer, DF. (2018). Tumor budding as a standardized parameter in gastrointestinal carcinomas: more than just the colon. *Mod. Pathol.* 31, 862–872.

Biotium, Glowing products for science (2022). Disponible en: <https://biotium.com/product/wheat-germ-agglutinin-wga-cf-dye-conjugates/>.

Bird-Lieberman, E., Neves, A., Lao-Sirieix, P., O'Donovan, M., Novelli, M., Lovat, L., Eng, W., Mahal, L., Brindle, K., Fitzgerald, R. (2012). Molecular imaging using fluorescent lectins permits rapid endoscopic identification of dysplasia in Barrett's esophagus. *Nat Med.*18: 315–321. <https://doi.org/10.1038/nm.2616>.

Bologna-Molina, R., Mosqueda-Taylor, A., Molina-Frecher, N., Mori-Estevez, A. D., & Sánchez-Acuña, G. (2013). Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*. 18(2): e174–e179. <https://doi.org/10.4317/medoral.18573>.

Bolte, S. y Cordelières, FP. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc.* 224(Pt 3):213-232. doi:10.1111/j.1365-2818.2006.01706. x.

Botha, H., Farah, C. S., Koo, K., Cirillo, N., McCullough, M., Paolini, R., & Celentano, A. (2021). The Role of Glucose Transporters in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Biomolecules*. 11(8):1070. <https://doi.org/10.3390/biom11081070>

Brierley, JD., Gospodarowicz, MK. & Wittekind, C. (2017). TNM Classification of Malignant Tumours. 8th edn. Wiley Blackwell.

Bronsert, P., Enderle-Ammour, K., Bader, M., Timme, S., Kuehs, M., Csanadi, A., Kayser, G., Kohler, I., Bausch, D., Hoepfner, J., Hopt, U. T., Keck, T., Stickeler, E., Passlick, B., Schilling, O., Reiss, C. P., Vashist, Y., Brabletz, T., Berger, J., Lotz, J., Olesch, J., Werner, M., Wellner, U. F. (2014). Cancer cell invasion and EMT marker expression: a three-dimensional study of the human cancer-host interface. *The Journal of pathology*.234(3):410–422. <https://doi.org/10.1002/path.4416>.

Caino, M., Ghosh, J., Chae, Y., Vaira, V., Rivadeneira, D., Favarsani, A., Rampini, P., Kossenkov, A., Aird, K., Zhang, R., Webster, M., Weeraratna, A., Bosari, S., Languino, L., and Altieri, D. (2015). PI3K therapy reprograms mitochondrial trafficking to fuel tumor cell invasion. *PNAS*.28(112): 8638–8643. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500722112>.

Capaldi, MJ., Dunn, MJ., Sewry, CA., Dubowitz, V. (1984). Altered binding of Ricinus communis I lectin by muscle membranes in Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol Sci*. 63(1):129-41. doi: 10.1016/0022-510x (84)90114-x.

Cell Signaling Technology. (2016). Fluorescent Multiplex Immunohistochemistry with Tyramide Signal Amplification. Disponible en: <https://www.cellsignal.com/learn-and-support/protocols/protocol-fluorescent-multiplex-ihc>.

Christiansen, NP., & Skubitz, K M. (1988). Identification of the major lectin-binding surface proteins of human neutrophils and alveolar macrophages. *Blood*. 71(6):1624–1632. <https://doi.org/10.1182/blood.v71.6.1624.1624>.

- Cortegoso, A., Laureano, NK., Silva, A., Danilevicz, CK., Magnusson, AS., Visioli, F., Rados, PV.** (2017). Cell proliferation markers at the invasive tumor front of oral squamous cell carcinoma: comparative analysis in relation to clinicopathological parameters of patients. *Journal of applied oral science: revista FOB*, 25(3), 318–323. doi.org/10.1590/1678-7757-2016-0238.
- Cosetti-Olivera ML., Cunha ARD., Prass TS., Martins MAT., Hugo FN., Martins MD.** (2019). Mortality due to oral and oropharyngeal cancer in Uruguay from 1997 to 2014. *J Appl Oral Sci.* 28;28: e20190166. doi: 10.1590/1678-7757-2019-0166.
- Couchman JR.** (2021). Syndecan-1 (CD138), Carcinomas and EMT. *International journal of molecular sciences.* 22(8): 4227. <https://doi.org/10.3390/ijms22084227>.
- Cruz, P., Peña, A., Batista, K., Soca, P.** (2016). Factores de riesgo de cáncer bucal. ARTÍCULO DE REVISIÓN. *Revista Cubana de Estomatol.* 53(3):128-145.
- Curry JM, Tuluc M, Whitaker-Menezes D, Ames JA, Anantharaman A, Butera A, Leiby B, Cognetti DM, Sotgia F, Lisanti MP, Martinez-Outschoorn UE** (2013). Cancer metabolism, stemness and tumor recurrence: MCT1 and MCT4 are functional biomarkers of metabolic symbiosis in head and neck cancer. *Cell Cycle.*12(9):1371-84. doi: 10.4161/cc.24092. PMID: 23574725; PMCID: PMC3674065.
- Di Iorio, G. y Cotrufo, R.** (1985). ConA and WGA receptors in rat skeletal muscles. Changes in density, distribution and composition following denervation. *J Neurol Sci.* 67(1):105-114. doi:10.1016/0022-510x (85)90026-7.
- Dissanayaka, WL., Pitiyage, G., Kumarasiri, PV., Liyanage, RL., Dias, KD., Tilakaratne, WM.** (2012). Clinical and histopathologic parameters in survival of oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 113(4):518-525. doi: 10.1016/j.oooo.2011.11.001.
- Domingo-Vidal, M., Whitaker-Menezes, D., Mollaei, M., Lin, Z., Tuluc, M., Philp, N., Johnson, J. M., Zhan, T., Curry, J., & Martinez-Outschoorn, U.** (2022). Monocarboxylate Transporter 4 in Cancer-Associated Fibroblasts Is a Driver of Aggressiveness in Aerodigestive Tract Cancers. *Frontiers in oncology.* 12: 906494. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.906494>.
- Enderle-Ammour, K., Bader, M., Ahrens, T. D., Franke, K., Timme, S., Csanadi, A., Hoepfner, J., Kulemann, B., Maurer, J., Reiss, P., Schilling, O., Keck, T., Brabletz, T., Stickeler, E., Werner, M., Wellner, UF., & Bronsert, P.** (2017). Form follows function: Morphological and immunohistological insights into epithelial–mesenchymal transition

characteristics of tumor buds. *Tumor Biology*. 39(5): 101042831770550.
<https://doi.org/10.1177/1010428317705501>.

Etemad-Moghadam, S., & Alaeddini, M. (2015). Invasion phenotypes of oral squamous cell carcinoma. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology: AIMM*. 23(8): e12–e16. <https://doi.org/10.1097/PAI.000000000000184>.

Etemad-Moghadam, S., & Alaeddini, M. (2017). Pattern of invasion in squamous cell carcinomas of the lower lip and oral cavity. *Journal of oral biology and craniofacial research*. 7(3):167–170. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2017.04.005>.

Friedl, P., Locker, J., Sahai, E., Segal, J. (2012). Classifying collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol*. 14: 777–783. <https://doi.org/10.1038/ncb2548>.

Fuertes, L., Santonja, C., Kutzner, H., y Requenaa L. (2013). Inmunohistoquímica en dermatopatología: revisión de los anticuerpos utilizados con mayor frecuencia (parte i). *Actas Dermosifiliogr*. 104(2):99-127.

Ganvir, SM., Bamane, SA., Katkade, SP., Khobragade, PG., Hazarey, VP., Gosavi, SR. (2017). Depth of invasion and GLUT-1 as risk predictors in oral squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study. *Translational Research in Oral Oncology*. 2: 1–10. doi:10.1177/2057178X16689690.

Genet, G., Guilbeau-Frugier, C., Honton, B., Dague, E., Schneider, MD., Coatrieux, C., Calise, D., Cardin, C., Nieto, C., Payré, B., Dubroca, C., Marck, P., Heymes, C., Dubrac, A., Arvanitis, D., Despas, F., Altié, MF., Seguelas, MH., Delisle, MB., Davy, A., Sénard, JM., Pathak, A., Galés, C. (2012) Ephrin-B1 is a novel specific component of the lateral membrane of the cardiomyocyte and is essential for the stability of cardiac tissue architecture cohesion. *Circ Res*. 110(5):688-700. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.262451. 2012.

Gherzi, R., Melioli, G., De Luca, M., D'Agostino, A., Distefano, G., Guastella, M., D'Anna, F., Franzi, A., Cancedda, R. (1992). "HepG2/erythroid/brain" type glucose transporter (GLUT1) is highly expressed in human epidermis: Keratinocyte differentiation affects glut1 levels in reconstituted epidermis. *JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY*. 150 (3):463-474. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041500306>.

Gloushankova, NA., Rubtsova, SN., & Zhitnyak, IY. (2017). Cadherin-mediated cell-cell interactions in normal and cancer cells. *Tissue barriers*. 5(3): e1356900. <https://doi.org/10.1080/21688370.2017.1356900>.

González-González, R., Molina-Frechero, N., Damian-Matsumura, P., Bologna-Molina, R. (2014). Molecular markers of cell adhesion in ameloblastomas. An update. *Medicina*

oral, patología oral y cirugía bucal. 19(1), e8–e14.

<https://doi.org/10.4317/medoral.19071>.

González, M. (2019). Perfil del Carcinoma Oral de Células Escamosas en el Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología-UdelaR, período 1982-2015. Maestría en Ciencias Odontológicas. Universidad de la República. Montevideo-Uruguay.

Grigore, A., Jolly, M., Jia, D., Farach-Carson, M., & Levine, H. (2016). Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT. *Journal Of Clinical Medicine*. 5(5): 51. doi: 10.3390/jcm5050051.

Guo Q. (2017). Changes in mitochondrial function during EMT induced by TGF β -1 in pancreatic cancer. *Oncology letters*.13(3):1575–1580. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5613>.

Hashim, O. H., Jayapalan, J. J., Lee, C. S. (2017). Lectins: an effective tool for screening of potential cancer biomarkers. *PeerJ*, 5, e3784. <https://doi.org/10.7717/peerj.3784>.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)

Instituto Nacional del Cáncer (NIH). (2022). <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/neoplasia-intraepitelial-cervical>.

International Agency for research on Cancer (IARC). (2020). The GLOBAL CANCER OBSERVATORY. World Health Organization. Lip, oral cavity. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/1-Lip-oral-cavity-fact-sheet.pdf>.

International Agency for Research on Cancer (IARC). 2022. WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 9. Disponible en: <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/52>.

Izumo T. (2011). Oral premalignant lesions: from the pathological viewpoint. *International journal of clinical oncology*. 16(1):15–26. <https://doi.org/10.1007/s10147-010-0169-z>.

Johnson, A., Baeten, J., Patel, K., Killian, M., Sunny, S., Suresh, A., Uma, K., Birur, P., Kuriakose, M., Kademani, D. (2019). Evaluation of a Lectin-Based Imaging System for the Chairside Detection of Oral Dysplasia and Malignancy. *Journal of oral and maxillofacial surgery: official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 77(9): 1941–1951. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2019.03.012>.

Kale, AD and Angadi PV. (2019) Tumor budding is a potential histopathological marker in the prognosis of oral squamous cell carcinoma: Current status and future prospects. *J Oral Maxillofac Pathol.* 23(3):318-323. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP_331_19.

Kim, SY., Choi, EJ., Yun, JA., Jung, ES., Oh, ST., Kim, JG., Kang, WK., & Lee, SH. (2015). Syndecan-1 expression is associated with tumor size and EGFR expression in colorectal carcinoma: a clinicopathological study of 230 cases. *International journal of medical sciences.* 12(2):92–99. <https://doi.org/10.7150/ijms.10497>.

Koda, T., Aosasa, M., Asaoka, H., Nakaba, H., Matsuda, H. (2003). Application of tyramide signal amplification for detection of N-glycolylneuraminic acid in human hepatocellular carcinoma. *International journal of clinical oncology,* 8(5): 317–321. <https://doi.org/10.1007/s10147-003-0346-4>.

Kostrominova TY. (2011). Application of WGA lectin staining for visualization of the connective tissue in skeletal muscle, bone, and ligament/tendon studies. *Microsc Res Tech.* 74(1):18-22. doi: 10.1002/jemt.20865.

Kuo, JC., Ibrahim, AE., Dawson, S., Parashar, D., Howat, W. J., Guttula, K., Miller, R., Fearnhead, N. S., Winton, D. J., Neves, A. A., Brindle, K. M. (2016). Detection of colorectal dysplasia using fluorescently labelled lectins. *Scientific reports.* 6: 24231. <https://doi.org/10.1038/srep24231>.

Leggett, SE., Hruska, AM., Guo, M., & Wong, IY. (2021). The epithelial-mesenchymal transition and the cytoskeleton in bioengineered systems. *Cell communication and signaling: CCS.* 19(1): 32. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00713-2>.

Liddle Río, P. (2012). Localización del Daño Genético: Modulación por la Estructura y Dinámica Nuclear. (TESIS DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS. OPCIÓN GENÉTICA. Departamento de Genética Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

Li, CX., Sun, JL., Gong, ZC., Lin, ZQ., Liu, H. (2016). Prognostic value of GLUT-1 expression in oral squamous cell carcinoma: A prisma-compliant meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 95(45): e5324. doi: 10.1097/MD.0000000000005324.

Lim, AW., Neves, AA., Lam Shang Leen, S., Lao-Sirieix, P., Bird-Lieberman, E., Singh, N., Sheaff, M., Hollingworth, T., Brindle, K., Sasieni, P. (2020). Lectins in Cervical Screening. *Cancers.*12(7): 1928.doi.org/10.3390/cancers12071928.

Liu, Y. y Xu, J. (2019). High-resolution microscopy for imaging cancer pathobiology. *Current pathobiology reports.* 7(3): 85–96. <https://doi.org/10.1007/s40139-019-00201-w>.

- López Jornet, P., Seoane Lestón, J.** (2019). CÁNCER ORAL PARA DENTISTAS. Primera Edición. Fundación Dental Española. 1-198.
- Lugli, A., Zlobec, I., Berger, MD., Kirsch, R., Nagtegaal, ID.** (2021). Tumour budding in solid cancers. *Nat Rev Clin Oncol*.18: 101–115. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0422-y>.
- Mamun, A.A., Hayashi, H., Yamamura, A., Nayeem, J., Sato, M.** (2020). Hypoxia induces the translocation of glucose transporter 1 to the plasma membrane in vascular endothelial cells. *J Physiol Sci*. 70: 44. <https://doi.org/10.1186/s12576-020-00773-y>.
- Manual Microscopio Confocal LSM880 Operating Manual** (2014). ZEN 2 (black edition). Disponible en: <https://www.biotech.cornell.edu/sites/default/files/2020/06/LSM880%20Operating%20Manual.pdf>
- Markopoulos A. K.** (2012). Current aspects on oral squamous cell carcinoma. *The open dentistry journal*. 6: 126–130. <https://doi.org/10.2174/1874210601206010126>.
- Mehendiratta, M., Solomon, MC., Boaz, K., Guddattu, V., Mohindra, A.** (2014). Clinico-pathological correlation of E-cadherin expression at the invasive tumor front of Indian oral squamous cell carcinomas: An immunohistochemical study. *J Oral Maxillofac Pathol*. 18(2):217-22. doi: 10.4103/0973-029X.140753.
- Mereiter, S., Balman, M., Campos, D., Gomes, J., Reis, C.** (2019). Glycosylation in the Era of Cancer-Targeted Therapy: Where Are We Heading? *Cancer Cell* 36. Elsevier Inc.
- Mohtasham, N., Ghazi, N., Anvari, K., Mohajertehran, F., Organji, T., & Shahabinejad, M.** (2021). Evaluation of the Relationship Between the Invasive Front of Oral Squamous Cell Carcinoma and Clinicopathological Parameters. *Iranian journal of pathology*, 16(3), 316–324. <https://doi.org/10.30699/IJP.2021.520522.2541>.
- Moreno-Sánchez R., Rodríguez-Enríquez S., Marín-Hernández A., Saavedra E.** (2007). Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J*. 274:1393-418; PMID:17302740; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05686.x>.
- Morris HT, Machesky LM.** (2015). Actin cytoskeletal control during epithelial to mesenchymal transition: focus on the pancreas and intestinal tract. *Br J Cancer*.112(4):613-20. doi: 10.1038/bjc.2014.658.
- Mudassar, F., Shen, H., O'Neill, G., & Hau, E.** (2020). Targeting tumor hypoxia and mitochondrial metabolism with anti-parasitic drugs to improve radiation response in high-grade gliomas. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*. 39(1):208. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01724-6>.

- O'Connell, K., Doran, P., Gannon, J., Ohlendieck, K.** (2008). Lectin-based proteomic profiling of aged skeletal muscle: Decreased pyruvate kinase isozyme M1 exhibits drastically increased levels of N-glycosylation. *European Journal of Cell Biology*. 87: 793–805.
- Ochoa Gómez, L.S., Martínez, E.M., Bustillo, J.A** (2009). Estudio comparativo de la expresión inmunohistoquímica del Ki-67 en los ameloblastomas unicuístico y sólido. *Univ Odontol*. 2009 Jul-Dic; 28(61): 67-73.
- Park, SH., Lee, AR., Choi, K., Joung, S., Yoon, JB., Kim, S.** (2019). TOMM20 as a potential therapeutic target of colorectal cancer. *BMB Rep*. 52(12):712-717. doi: 10.5483/BMBRep.
- Parra, ER., Jiang, M., Solis, L., Mino, B., Laberiano, C., Hernandez, S., Gite, S., Verma, A., Tetzlaff, M., Haymaker, C., Tamegnon, A., Rodriguez-Canales, J., Hoyd, C., Bernachez, C., Wistuba, I.** (2020). Procedural Requirements and Recommendations for Multiplex Immunofluorescence Tyramide Signal Amplification Assays to Support Translational Oncology Studies. *Cancers (Basel)*.12(2):255. doi: 10.3390/cancers12020255.
- Pedicini, L., Miteva, KT., Hawley, V., Gaunt, H.J., Appleby, HL., Cubbon, RM., Marszalek, K., Kearney, MT., Beech, DJ., Mckeown, L.** (2018). Homotypic endothelial nanotubes induced by wheat germ agglutinin and thrombin. *Sci Rep* 8: 7569. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25853-3>.
- Pena, SD., Gordon, BB., Karpati, G., Carpenter, S.** (1981). Lectin histochemistry of human skeletal muscle. *J Histochem Cytochem*. 29(4):542-546. doi:10.1177/29.4.6166659.
- Prall, F., Nizze, H., & Barten, M.** (2005). Tumour budding as prognostic factor in stage I/II colorectal carcinoma. *Histopathology*. 47(1): 17–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2005.02161.x>
- Qamar, S., Fatima, S., Rehman, A., Khokhar, M. A., Mustafa, Z., & Awan, N.** (2019). Glucose Transporter 1 Overexpression in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan: JCPSP*. 29(8):724–727. <https://doi.org/10.29271/jcpsp.2019.08.724>.
- Ramani, R. S., Tan, I., Bussau, L., Angel, C. M., McCullough, M., & Yap, T.** (2022). Confocal microscopy in oral cancer and oral potentially malignant disorders: A systematic review. *Oral diseases*, 10.1111/odi.14291. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/odi.14291>

- Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN)** (2021). ESTIMACIONES DE LA INCIDENCIA DEL CÁNCER EN ESPAÑA, 2021.
<https://redecana.org/storage/documents/b05bfad2-4b48-4519-9f56-6aad911e80b0.pdf>.
- Reddy, S. P., Ramani, P., & Nainani, P.** (2013). Confocal microscopy and exfoliative cytology. *Journal of oral and maxillofacial pathology*. JOMFP. 17(2):217–221.
<https://doi.org/10.4103/0973-029X.119746>.
- Registro Nacional del Cáncer (RNC)**. (2022). Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer. Situación Epidemiológica del Uruguay en relación al Cáncer Mayo-2022; 1–55.
- Rivera C, Venegas B.** (2014). Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). *Oncol Lett*. 8(1):7-11. doi: 10.3892/ol.2014.2103.
- Robertson, D., Savage, K., Reis-Filho, JS., Isacke, CM.** (2008). Multiple immunofluorescence labelling of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue. *BMC Cell Biol*. 9:13. doi: 10.1186/1471-2121-9-13.
- Roche, M. E., Lin, Z., Whitaker-Menezes, D., Zhan, T., Szuhai, K., Bovee, J. V. M. G., Abraham, J. A., Jiang, W., Martinez-Outschoorn, U., & Basu-Mallick, A.** (2020). Translocase of the outer mitochondrial membrane complex subunit 20 (TOMM20) facilitates cancer aggressiveness and therapeutic resistance in chondrosarcoma. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*. 1866(12): 165962.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165962>.
- Roy, S., Axelrod, HD., Valkenburg, KC., Amend, S., Pienta, KJ.** (2019). Optimization of prostate cancer cell detection using multiplex tyramide signal amplification. *J Cell Biochem*. 120(4):4804-4812. doi: 10.1002/jcb.28016.
- Sandulache, VC., Ow, TJ., Pickering, CR., Frederick, MJ., Zhou, G., Fokt, I., Davis-Malesevich, M., Priebe, W., Myers, JN.** (2011). Glucose, not glutamine, is the dominant energy source required for proliferation and survival of head and neck squamous carcinoma cells. *Cancer*.117(13):2926-38. doi: 10.1002/cncr.25868.
- Santos García, Antonio., Abad Hernández, M. Mar., Fonseca Sánchez, Emilio., Gonzalez, Roberto., Galindo Villardón, Purificación., Cruz Hernández, Juan Jesús., Bullón Sopelana, Agustín.** (2006). Expresión de E-cadherina, laminina y colágeno IV en la evolución de displasia a carcinoma epidermoide oral. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*. 11(2), 100-105.

- Sawant, S., Dongre, H., Kanojia, D., Jamghare, S., Borges, A., Vaidya, M.** (2019). Role of Electron Microscopy in Early Detection of Altered Epithelium During Experimental Oral Carcinogenesis. *Microsc Microanal.* 25(6):1367-1375. doi:10.1017/S1431927619000229
- Saxell, CL. & Sussman, M.** (1982). Induction of stage-specific cell cohesion in D. discoideum by a plasma-membrane-associated moiety reactive with wheat germ agglutinin. *Cell*, 29(3): 755-759. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90437-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90437-8)
- Seitz, H. K., & Stickel, F.** (2007). Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nature reviews. Cancer*, 7(8), 599–612. <https://doi.org/10.1038/nrc2191>.
- Silva Servato, JP., Ueira Vieira, C., De Faria, PR., Cardoso, SV., Loyola, AM.** (2019). The importance of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine as prognostic markers for oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 48(10):967-975. doi: 10.1111/jop.12942.
- Scheid, A.D., Beadnell, T.C. & Welch, D.R.** (2021). Roles of mitochondria in the hallmarks of metastasis. *Br J Cancer* (124): 124–135. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01125-8>.
- Söderström, KO.** (1987). Lectin binding to collagen strands in histologic tissue sections. *Histochemistry.* 87(6):557-560. doi:10.1007/BF00492470.
- Spiro, RH., Guillaumondegui, O., Paulino, AF., Huvos, AG.** (1999). Pattern of invasion and margin assessment in patients with oral tongue cancer. *Head Neck.* 21(5):408-413. doi:10.1002/(sici)1097-0347(199908)21:5<408::aid-hed5>3.0.co;2-e.
- Sun, B., Laberiano-Fernández, C., Salazar-Alejo, R., Zhang, J., Solorzano Rendon, JL., Lee, J., Solis Soto, LM., Wistuba, II., Parra, ER.** (2022). Impact of Region-of-Interest Size on Immune Profiling Using Multiplex Immunofluorescence Tyramide Signal Amplification for Paraffin-Embedded Tumor Tissues. *Pathobiology.* 24:1-12. doi: 10.1159/000523751.
- Suresh, R., Diaz, RJ.** (2021) The remodelling of actin composition as a hallmark of cancer. *Transl Oncol.*14(6):101051. doi: 10.1016/j.tranon.2021.101051.
- Thomas, L. W., Staples, O., Turmaine, M., & Ashcroft, M.** (2017). CHCHD4 Regulates Intracellular Oxygenation and Perinuclear Distribution of Mitochondria. *Frontiers in oncology*, 7: 71. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00071>.

- Thoss, K. y Roth, J.** (1977). The use of fluorescein isothiocyanate labelled lectins for immuno-histological demonstration of saccharides. III. Studies by use of *Ricinus communis* lectin and wheat germ agglutinin. *Exp Pathol (Jena)*. 14(3-4):215-219. doi:10.1016/s0014-4908(77)80069-0.
- Togni, L., Caponio, V., Zerman, N., Troiano, G., Zhurakivska, K., Lo Muzio, L., Balercia, A., Mascitti, M., & Santarelli, A.** (2022). The Emerging Impact of Tumor Budding in Oral Squamous Cell Carcinoma: Main Issues and Clinical Relevance of a New Prognostic Marker. *Cancers*, 14(15): 3571. <https://doi.org/10.3390/cancers14153571>.
- Trejo, A.** (2008). Cadherina-Cadherina: mecanismo de adhesión. Laboratorio de reproducción animal asistida. Depto de Biología de la reproducción. UAM-I. *ContactoS* (68): 30–33.
- Tsambaos, D., Pasmatzis, E., Manolopoulos, L., Kapranos, N., Goumas, P., Adamopoulos, G.** (1998). Lectin histochemistry of laryngeal squamous cell carcinomas. *Otolaryngology head and neck surgery*. 118(6): 886–891. doi:10.1016/S0194-5998(98)70292-X.
- Usman, K., Alam, S., Salman, F., Khan, M., Khattak, M., Saleem, A., Khan, Z.** (2019) COMPARISON OF GLUT-1 EXPRESSION IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA WITH NORMAL MUCOSA. *Pak J Pathol*. 30 (2): 52-56.
- Wang, Y., Zhang, X., Wang, S., Li, Z., Hu, X., Yang, X., Song, Y., Jing, Y., Hu, Q., Ni, Y.** (2022). Identification of Metabolism-Associated Biomarkers for Early and Precise Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Biomolecules*. 12(3): 400. <https://doi.org/10.3390/biom12030400>.
- Warnakulasuriya, S., & Chen, T. H. H.** (2022). Areca Nut and Oral Cancer: Evidence from Studies Conducted in Humans. *Journal of dental research*, 101(10), 1139–1146. <https://doi.org/10.1177/00220345221092751>
- Weinberg, F., Hamanaka, R., Wheaton, WW., Weinberg, S., Joseph, J., Lopez, M., Kalyanaraman, B., Mutlu, GM., Budinger, GR., Chandel, NS.** (2010). Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(19):8788-93. doi: 10.1073/pnas.1003428107.
- Wicki A, Lehembre F, Wick N, Hantusch B, Kerjaschki D, Christofori G.** (2006) Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: Podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell*.9(4):261-72. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.03.010>. PMID:16616332.

Wurm, CA., Neumann, D., Lauterbach, MA., Harke, B., Egner, A., Hell, SW., Jakobs, S. (2011). Nanoscale distribution of mitochondrial import receptor Tom20 is adjusted to cellular conditions and exhibits an inner-cellular gradient. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(33):13546-51. doi: 10.1073/pnas.1107553108.

Yano, M., Kanazawa, M., Terada, K., Takeya, M., Hoogenraad, N., Mori, M. (1998). Functional analysis of human mitochondrial receptor Tom20 for protein import into mitochondria. *J Biol Chem.* 273(41):26844-51. doi: 10.1074/jbc.273.41.26844.

Yano, M., Terada, K., Mori, M. (2004). Mitochondrial import receptors Tom20 and Tom22 have chaperone-like activity. *J Biol Chem.*279(11):10808-13. doi: 10.1074/jbc.M311710200.

Yiannis, C., Mascolo, M., Mignogna, MD., Varricchio, S., Natella, V., De Rosa, G., Lo Giudice, R., Galletti, C., Paolini, R., Celentano, A. (2021). Expression Profile of Stemness Markers CD138, Nestin and Alpha-SMA in Ameloblastic Tumours. *Int J Environ Res Public Health.*18(8):3899. doi: 10.3390/ijerph18083899.

Article

The Tissue Architecture of Oral Squamous Cell Carcinoma Visualized by Staining Patterns of Wheat Germ Agglutinin and Structural Proteins Using Confocal Microscopy

Estefania Silveyra ¹, Ronell Bologna-Molina ^{1,*} , Rogelio González-González ²  and Miguel Arocena ^{3,4,*} 

¹ Molecular Pathology, School of Dentistry Universidad de la República (UDELAR), Las Heras 1925, Montevideo 14600, Uruguay; esilveyra@iibce.edu.uy

² Department of Research, School of Dentistry, Universidad Juárez del Estado de Durango, Durango 34070, Mexico; rogelio.gonzalez@ujed.mx

³ Biochemistry and Biophysics, School of Dentistry Universidad de la República (UDELAR), Las Heras 1925, Montevideo 14600, Uruguay

⁴ Genomics Department, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Montevideo 11600, Uruguay

* Correspondence: ronellbologna@odon.edu.uy (R.B.-M.); m.arocena.sutz@gmail.com or marocen@fcien.edu.uy (M.A.)



Citation: Silveyra, E.; Bologna-Molina, R.; González-González, R.; Arocena, M. The Tissue Architecture of Oral Squamous Cell Carcinoma Visualized by Staining Patterns of Wheat Germ Agglutinin and Structural Proteins Using Confocal Microscopy. *Cells* **2021**, *10*, 2466. <https://doi.org/10.3390/cells10092466>

Academic Editor: Kazuhito Satomura

Received: 30 July 2021

Accepted: 15 September 2021

Published: 18 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Objectives: Tissue architecture and cell morphology suffer profound alterations during oral cancer and are important markers for its progression and outcome. For precise visualization of tissue architecture in oral cancer, we used confocal microscopy to examine the staining pattern of wheat germ agglutinin, a lectin that binds membrane glycoproteins, and the staining patterns of structural proteins. Materials and Methods: Paraffin sections of oral squamous cell carcinoma were stained with fluorescently labeled wheat germ agglutinin and with antibodies against structural proteins, which were revealed by immunohistochemistry with tyramide signal amplification. Results: Membrane localization of wheat germ agglutinin was markedly decreased in the basal layers and in regions of tumor invasion, accompanied by cytoplasmic redistribution of E-cadherin, β -actin and syndecan-1. Wheat germ agglutinin staining clearly identified tumor clusters within the surrounding stroma, and tumor cells with elongated morphology. Conclusions: Our results suggest that the wheat germ agglutinin staining pattern is indicative of the degree of cell cohesion in oral squamous cell carcinoma, which decreases in basal layers and invasive tumor clusters with more migratory morphologies. Wheat germ agglutinin staining in combination with confocal microscopy could constitute, therefore, a valuable tool for the study of tissue architecture in oral cancer.

Keywords: oral squamous cell carcinoma; wheat germ agglutinin; tyramide signal amplification; tissue architecture

1. Introduction

Tumor growth and its progressive taking over of neighboring tissues impose drastic alterations in tissue architecture, which have prognostic value in many types of cancers [1,2], including oral squamous cell carcinoma (OSCC). Invasion patterns in OSCC, for instance, can be classified as a wide pushing border, infiltrating cell islets, thin infiltrating cords or individual infiltrating cells [3], with the last two patterns being associated with worse prognoses [4]. Therefore, refining our understanding of OSCC tissue architecture is likely to have an important clinical impact.

High resolution microscopy, such as confocal microscopy, can help to overcome the limitations of conventional bright-field microscopy in the analysis of tumor tissue structure [5], and studies which explore its uses in the context of OSCC can make significant contributions towards understanding the pathobiology of this tumor [6]. In addition to confocal microscopy, the use of markers that permit visualizing tissue architecture clearly

will be an important feature of studies that seek to obtain detailed structural descriptions of OSCC at the tissue level. Wheat germ agglutinin (WGA) is a plant lectin with high affinity for N-acetylglucosamine and sialic acid [7], which can bind to multiple membrane glycoproteins containing these monosaccharides in their varying carbohydrate moieties, and in particular it can bind to cell adhesion molecules [8–10]. Fluorescently labeled WGA has been used as a powerful stain for tissue architecture in combination with confocal microscopy [11,12]. In particular, altered tissue architecture, especially at the level of cell–cell adhesion, produces a clearly altered pattern of WGA staining [11]. Another important consideration for studies of tumor architecture with high resolution microscopy is the frequently mentioned difficulty of performing immunofluorescence staining in formalin-fixed, paraffin embedded (FFPE) thin sections [13], which is relevant given the prevalence of archival FFPE tumor samples, but this can be circumvented, for example, by the use of signal amplification techniques such as tyramide signal amplification (TSA), which generates covalently bound fluorophores in very close proximity to the detected epitope [14].

In this study, we have used confocal microscopy, in combination with fluorescently labeled WGA and immunohistochemistry with TSA, for fluorescent staining of structural proteins, to visualize tissue architecture in FFPE thin sections obtained from archival OSCC tumor samples. We have observed alterations in the staining patterns of WGA and structural proteins consistent with loss of cell cohesion in the basal layers of the oral mucosa, and in regions of tumor projections towards the underlying stroma, accompanied by changes in cell morphology suggestive of a migratory phenotype. Additionally, WGA staining readily allows to distinguish clusters of invasive tumor cells from the surrounding stroma. Our results therefore show the usefulness of WGA staining for the study of OSCC tissue architecture which, in combination with immunohistochemistry accompanied by TSA for fluorescent staining of structural proteins, and the use of confocal microscopy, permits clear visualization of the changes in tissue cohesion and cell morphology as tumor invasion progresses.

2. Materials and Methods

2.1. Tissue Samples

FFPE tissue samples of normal oral mucosa ($n = 3$) and OSCC ($n = 5$) from the archives of the Molecular Pathology area of the School of Dentistry, Universidad de la República (Uruguay) were used.

2.2. Immunohistochemistry and Confocal Microscopy

After deparaffinization, 5 μm sections were heat retrieved with Reveal Decloaker solution (Biocare Medical, Pacheco, CA, USA) and endogenous peroxidases were blocked with 0.9% hydrogen peroxide for 5 min. Sections were incubated with either of the following primary antibodies in 1:100 dilution: pan-cytokeratin (clone AE1/AE3, Biocare Medical), Ki-67 antibody (clone MIB-1, DAKO, Carpinteria, CA, USA), E-cadherin antibody (clone EP6, Biocare Medical), β -actin antibody (clone 13E5, Cell Signaling, Danvers, MA, USA), syndecan-1 (CD138) antibody (clone B-A38, Bio SB, Santa Barbara, CA, USA) and vimentin antibody (clone V9, Biocare Medical). After primary antibody incubation, sections were incubated with a biotinylated secondary antibody followed by a streptavidin–horseradish peroxidase complex (Mouse/Rabbit ImmunoDetector Biotin Link, Bio SB, Santa Barbara, CA, USA). Next, sections were incubated for 10 min with CY3 or fluorescein labeled tyramide (TSA Plus Cyanine 3 Kit or TSA Plus Fluorescein Kit, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), washed with phosphate buffered saline (PBS) and incubated with either CF[®]488A conjugated WGA or CF[®]640R conjugated WGA (Biotium, Fremont, CA, USA) at 1:400 dilution for 20 min. Alternatively, 5 μm sections can be stained directly with fluorescently labeled WGA without the previous immunohistochemistry steps [12]. For double antibody labeling, the first primary–secondary antibody complex was removed by heat retrieval and the procedure was repeated for the second primary antibody. In some slides, nuclei were counterstained by

RedDot™ Far-Red Nuclear Stain (Biotium). Sections were visualized with a Zeiss LSM 800 confocal microscope, and images were acquired with 20× and 40× objectives.

3. Results

Fluorescently labeled WGA staining of normal oral mucosa reveals a highly ordered pattern of cell layers, with cell boundaries strongly stained and sharply demarcated (Figure 1A), including the Ki-67 positive cells of the basal layer (Figure 1A, inset). In OSCC, clearly demarcated cell boundaries can be observed in the more external layers of the oral mucosa by WGA staining (Figure 1B), but the staining becomes more cytoplasmic and diffuse in the basal layers, where Ki-67 positive cells are found (Figure 1B, inset), and in particular, cell boundaries are not easily distinguished.

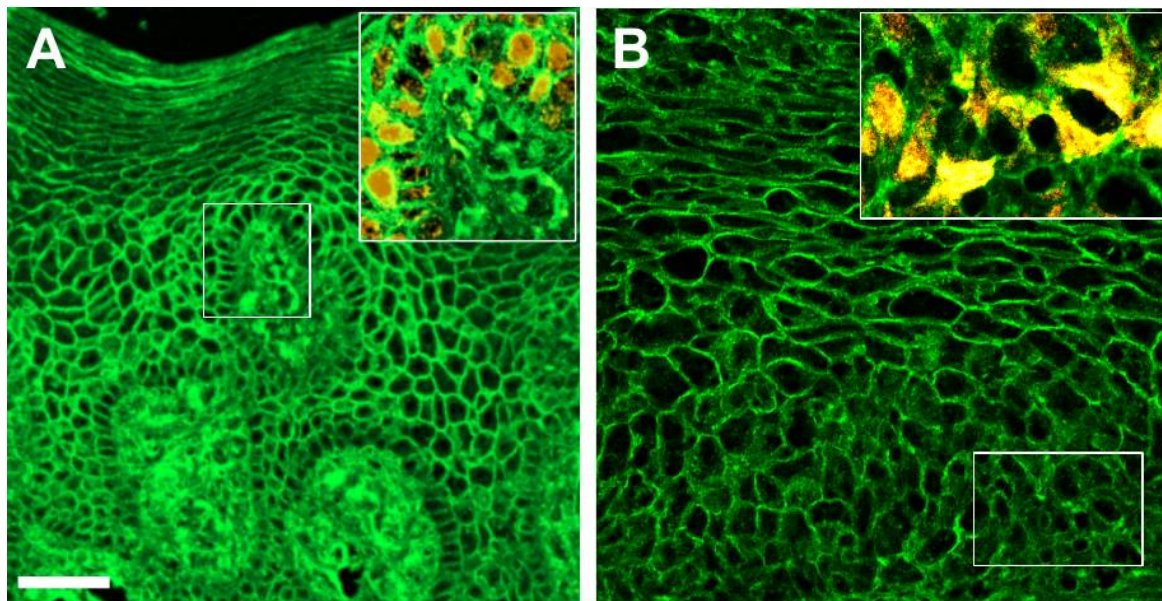


Figure 1. WGA staining pattern (green) in normal oral mucosa (A) and in OSCC mucosa (B), with a 20× objective. Insets show the regions marked with white rectangles observed with a 40× objective, displaying Ki-67 staining (yellow) in addition to WGA staining. Scale bar: 50 μm.

In regions of tumor invasion into the stroma, tumoral cell clusters of varying size could be clearly distinguished from the surrounding stroma by pan-cytokeratin staining (Figure 2A,C). Simultaneous WGA staining marked both tumor clusters and the surrounding stromal compartment, but it also allowed us to clearly visualize epithelial cell shapes within the tumor clusters, thereby distinguishing them from the adjacent stromal cells (Figure 2B). In some tumor clusters, the demarcation of cell boundaries by WGA staining was particularly sharp (Figure 2D). Interestingly, tumor clusters could be seen to co-express pan-cytokeratin and vimentin (Figure 3A,B), and large vimentin positive cells with epithelial shape in areas of tumor invasion can also be seen to co-express Ki-67 (Figure 3C,D).

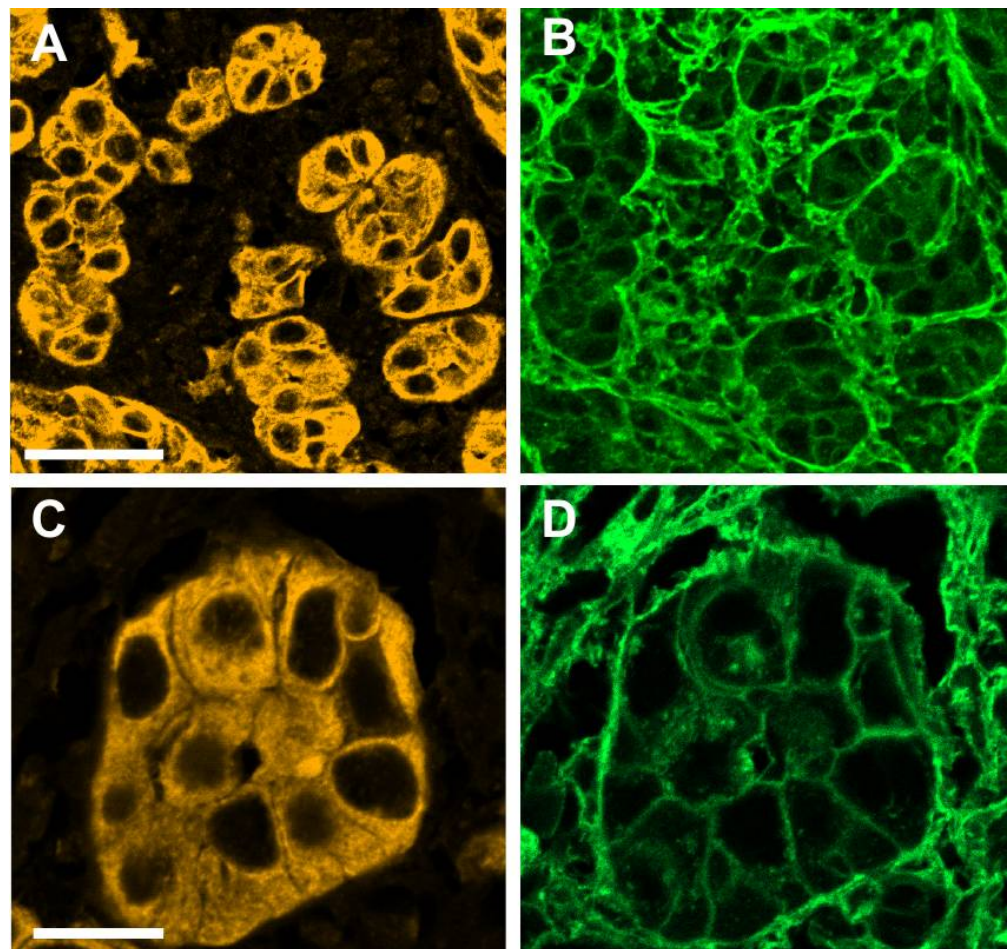


Figure 2. Pan-cytokeratin (yellow) and WGA staining (green) patterns in invasive regions of OSCC. (A,B) show the same field with pan-cytokeratin and WGA staining, respectively, with a 20 \times objective. (C,D) show the same field, with pan-cytokeratin and WGA staining, respectively, with a 40 \times objective. Scale bars: (A) 50 μ m; (B) 20 μ m.

Next, we co-stained normal oral mucosa and OSCC mucosa with WGA and structural proteins. In normal oral mucosa, the proteins E-cadherin, β -actin and syndecan-1 display similar staining patterns to that of WGA, clearly marking cell boundaries (Figure 4A,C,E, respectively; see also Supplementary Figure S1). In OSCC mucosa, however, the diffuse WGA staining observed in the basal layers is accompanied by marked increases in cytoplasmic E-cadherin, β -actin and syndecan-1, and also by a blurring of cell boundaries not seen in normal oral mucosa (Figure 4B,D,F, respectively, and insets in each figure). Moreover, in regions of tumor invasion, tumoral cell clusters with diffuse WGA staining at cell boundaries and large amounts of cytoplasmic E-cadherin, β -actin and syndecan-1 can be observed (Figure 5), a pattern that was not observed in normal oral mucosa at the same magnification (Supplementary Figure S1). Interestingly, tumor cells with large amounts of cytoplasmic E-cadherin, β -actin and syndecan-1 frequently switch from a polygonal cell shape to a highly elongated shape, suggestive of increased migratory capacity, and this elongated morphology can also be seen against the surrounding stroma by WGA staining (arrows in Figure 5).

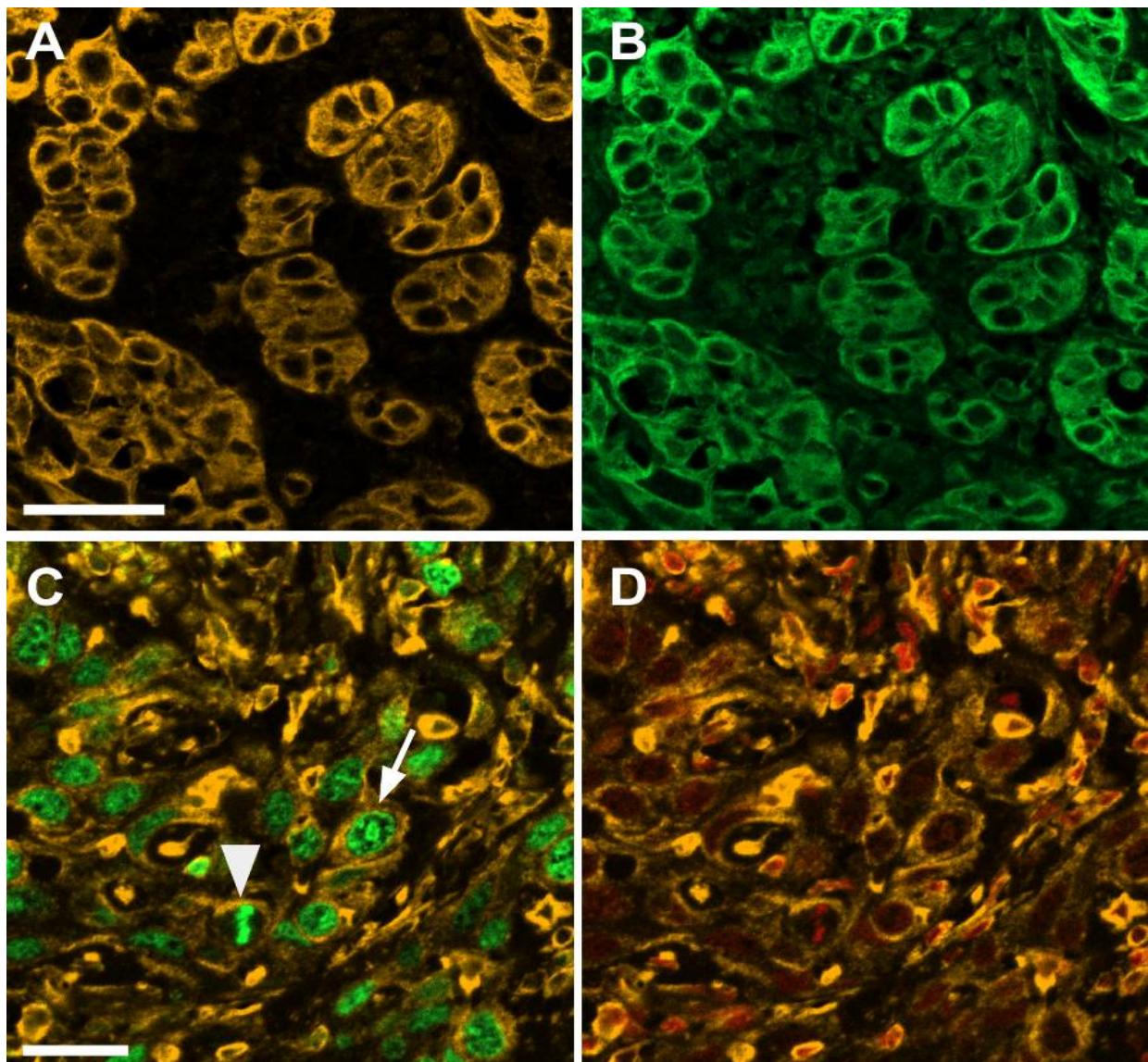


Figure 3. Pan-cytokeratin, vimentin and Ki-67 staining patterns in invasive regions of OSCC. (A,B) show the same field with pan-cytokeratin (yellow) and vimentin (green) staining, respectively, with a 20× objective. (C,D) show the same field with vimentin (yellow) and Ki-67 (green) or Far-Red Nuclear Stain (red) staining, respectively, with a 40× objective. The arrow in (C) shows a large cell with epithelial morphology positive for vimentin and Ki-67. The arrowhead in (C) shows a large cell positive for vimentin and Ki-67 in metaphase. Scale bars: (A) 50 μm; (C) 20 μm.

Our observations of WGA staining patterns in OSCC show that loss of WGA staining at cell boundaries is frequently accompanied by E-cadherin, β -actin and syndecan-1 relocalization from the cell periphery to the cytoplasm. E-cadherin and β -actin play fundamental roles in cell–cell adhesion, and syndecan-1 is highly involved in this process as well. Decreased expression of these proteins at cell boundaries in the basal layers of OSCC mucosa and in regions of tumor invasion suggests that loss of cell cohesion occurs in these tumor areas. The simultaneous transition from a WGA staining pattern marking cell boundaries sharply to a more diffuse staining pattern could also, thereby, constitute an indication of loss of cell cohesion.

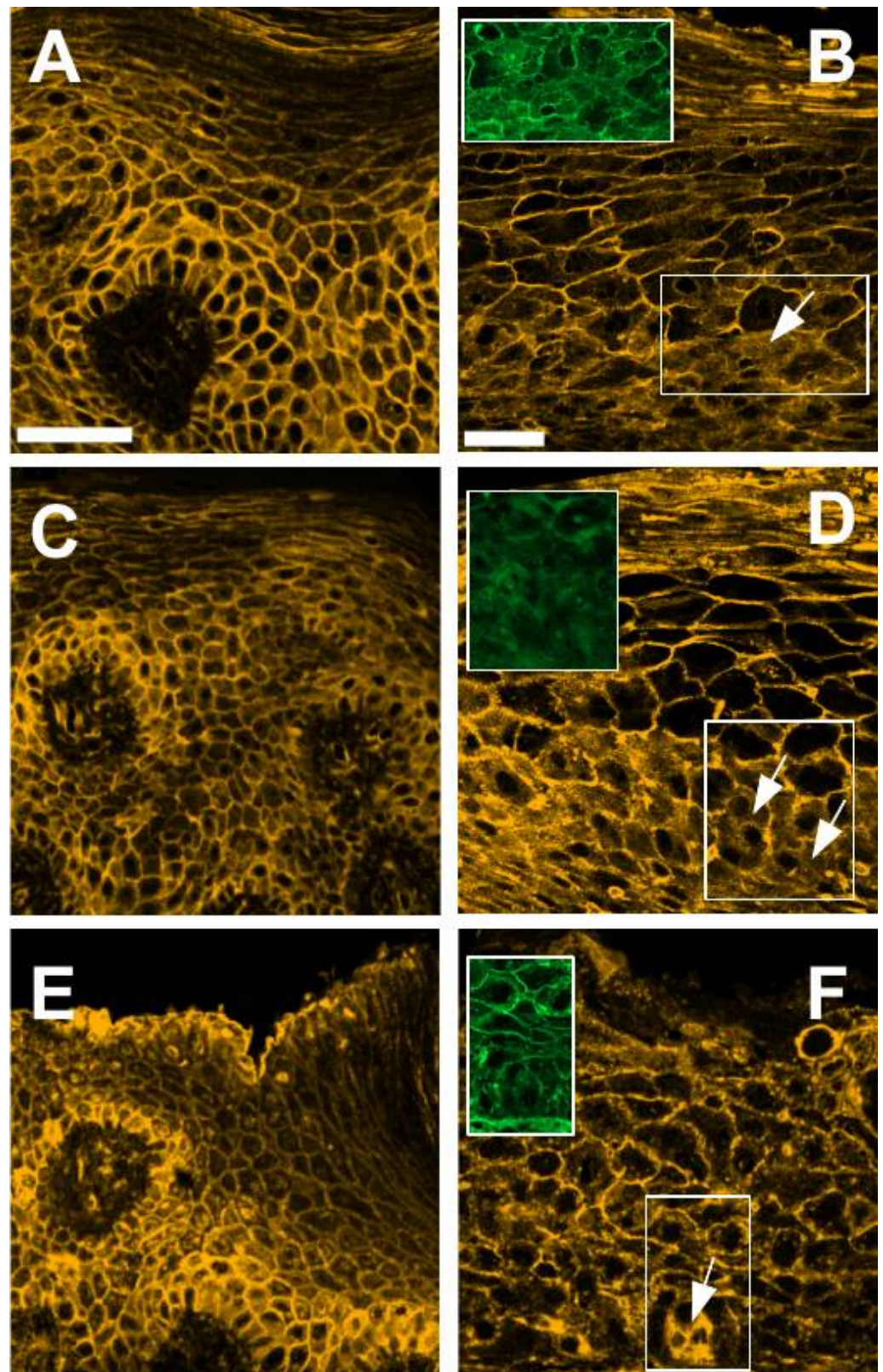


Figure 4. E-cadherin, β -actin and syndecan-1 staining patterns (yellow) in normal oral mucosa (A,C,E) and in OSCC mucosa (B,D,F), respectively, with a 40 \times objective. (B,D,F) were taken more zoomed in than (A,C,E). Insets in (B,D,F) show the regions marked with white rectangles in the basal layer of OSCC mucosa, displaying WGA (green) staining. Arrows show regions with marked cytoplasmic staining and diffuse cell borders. Scale bars: (A,C,E) 50 μ m; (B,D,F) 50 μ m.

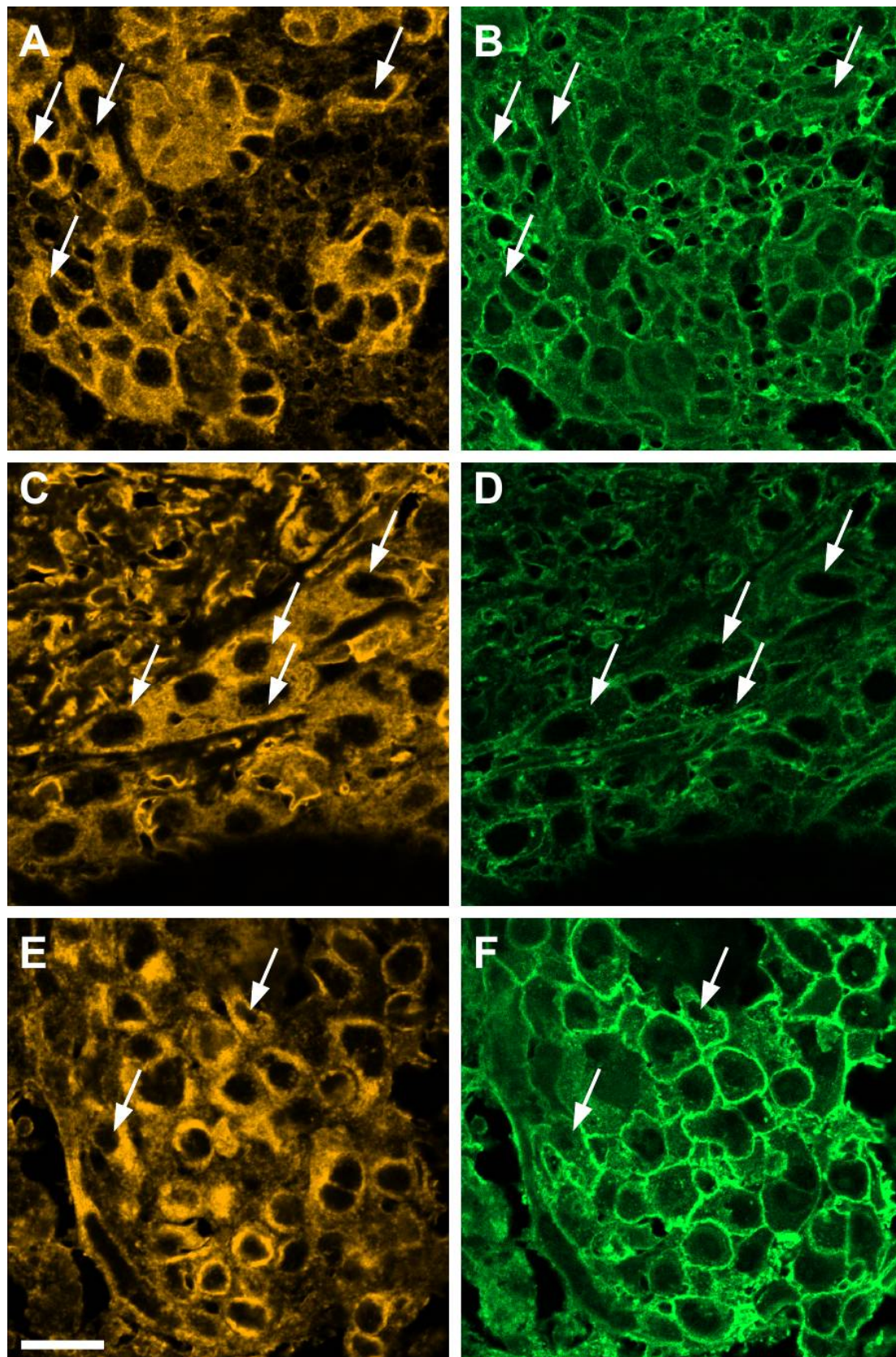


Figure 5. E-cadherin, β -actin and syndecan-1 staining patterns (yellow) in invasive regions of OSCC, with a 40 \times objective. (A,B): same field with E-cadherin and WGA (green) staining, respectively. (C,D): same field with β -actin and WGA staining, respectively. (E,F): same field with syndecan-1 and WGA staining, respectively. Arrows mark cells with highly elongated morphology and abundant cytoplasmic E-cadherin (A), β -actin (B) or syndecan-1 (E). Scale bar: 20 μ m.

4. Discussion

In this study, we used fluorescently labeled WGA in combination with TSA staining of structural proteins and confocal microscopy to visualize tissue architecture in FFPE thin sections of OSCC. WGA staining sharply marks the cell boundaries in the more external layers, whereas it becomes diffuse in the basal layers, paralleling a switch from periphery to cytoplasm in the distribution of the structural proteins E-cadherin, β -actin and syndecan-1. WGA staining allows to distinguish clearly between tumor cell clusters and the surrounding stroma in regions of tumor invasion. Diffuse WGA staining in tumor cell clusters is accompanied by marked cytoplasmic redistribution of E-cadherin, β -actin and syndecan-1 and by marked changes in cell morphology from polygonal to elongated.

WGA binds to glycoproteins in the cell membrane, and particularly to proteins involved in cell–cell adhesion: among the main surface proteins bound by WGA in macrophages and neutrophils is the cell–cell adhesion protein LFA-1 [8]. In endothelial cells, WGA interacts strongly with CD31, one of the main cell–cell adhesion proteins in the endothelium [9]. In the slime mold *Dictyostelium discoideum*, WGA binds to the cell–cell adhesion proteins responsible for the formation of multicellular aggregates [10]. Our results show that strong WGA staining at cell boundaries parallels membrane localization of E-cadherin, whereas loss of WGA staining at the cell surface is paralleled by loss of E-cadherin membrane localization. Taken together, these results suggest that a strong WGA signal at cell boundaries indicates an important presence of cell–cell adhesion complexes in these regions, and therefore high levels of tissue cohesion. Conversely, loss of WGA staining at cell boundaries, accompanied by diffuse cytoplasmic staining, could indicate diminished levels of cell–cell adhesion, and therefore decreased tissue cohesion. In support of this interpretation, mice deficient in Ephrin-B1, an important regulator of cell adhesion, show a marked shift from peripheral to cytoplasmic WGA staining pattern in conditions of tissue cohesion impairment [11]. Staining with biotinylated or horseradish peroxidase-conjugated WGA and visualization by bright-field microscopy of normal oral mucosa shows a similar pattern of strong staining at cell boundaries to the one reported here [15,16]. Interestingly, staining with biotinylated lectins in OSCC showed increased cytoplasmic staining and decreased membrane staining in invasive regions, in agreement with our results [17].

In regions of tumor invasion, we observed tumor cell clusters of varying sizes and patterns of WGA staining, which were readily discernible from the surrounding stroma. The presence of tumor buds, defined as individual cells or clusters of up to four cells, correlates with higher probability of metastasis in OSCC, and in many other cancers [18]. Scoring of tumor buds is done mainly by hematoxylin and eosin (H&E) staining. Alternatively, scoring can be done by cytokeratin immunohistochemistry, in situations when H&E staining does not allow to clearly distinguish buds from the surrounding stroma, such as when high levels of inflammation are present, or the tumor has a desmoplastic reaction [19]. Fluorescently labeled WGA staining is a simpler and faster procedure than cytokeratin immunohistochemistry, which warrants further investigation into its potential use for tumor bud scoring.

Cells in invasive tumor clusters shift E-cadherin localization from membranous to cytoplasmic and acquire a more elongated, spindle-like morphology [20]. These changes are indicative of a process of epithelial to mesenchymal transition (EMT), found in aggressive carcinomas such as OSCC [21], which in invasive tumor clusters has been proposed to lead to an intermediate epithelial/mesenchymal phenotype, associated with patterns of collective cell migration rather than generalized, individual tumoral cell migration and dissemination [22]. Consistent with these results, we have also observed remarkable E-cadherin cytoplasmic staining in cells from tumor clusters, and frequent examples of cells shifting from a polygonal to an elongated morphology, accompanied by a marked decrease of WGA staining at cell boundaries. We detected prominent cytoplasmic β -actin staining in cells from tumor clusters as well, associated with elongated cell morphologies, and a shift from cortical to cytoplasmic actin is another feature of EMT [23]. Loss of polygonal

cell morphologies was also observed in tumor cells with strong cytoplasmic syndecan-1 expression, and cytoplasmic redistribution of syndecan has been linked with increased tumor invasiveness [24]. Our results showing co-expression of vimentin and pan-cytokeratin and co-expression of vimentin and Ki-67 in tumor clusters are also consistent with the acquisition of mesenchymal properties, while still retaining epithelial characteristics and the proliferative activity found in OSCC invasive regions with high numbers of tumor clusters [25].

Interestingly as well, we have observed tumoral cell clusters with well-defined WGA staining at cell boundaries (Figure 2D), whereas other clusters show a much more diffuse WGA staining pattern, marked by prominent cytoplasmic E-cadherin, β -actin and syndecan-1 staining (Figure 5). These results are consistent with variable cell cohesion in tumor clusters of OSCC, which has been reported in other cancers and might be linked to different stages in the process of EMT, which is also consistent with the observation of an invasion pattern spectrum in OSCC, with some tumor cells being more advanced in the transition towards a mesenchymal phenotype than others [20,26]. It is also important to consider that the tumor–stroma ratio is an important parameter with prognostic value in OSCC [27], and as WGA staining readily allows one to distinguish between tumor clusters and surrounding stroma, it could be applied to quantify this variable as well.

Therefore, our results analyzing WGA and structural proteins staining patterns suggest that changes in cell cohesion occur at different stages of OSCC progression—first in the basal layers of the oral mucosa and then in invasive regions, where tumoral cell clusters are found. Changes in cell cohesion at these different stages might underlie first the initial invasion into the stroma and then the further dissemination of tumor cells within the stroma.

5. Conclusions

In summary, the use of WGA staining, in combination with TSA staining of structural proteins and confocal microscopy, constitutes a valuable tool for the study of OSCC tissue architecture. Further studies will be needed to define possible uses of fluorescent WGA staining in combination with confocal microscopy in the histopathological assessment of OSCC.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells10092466/s1>. Figure S1: E-cadherin, β -actin and syndecan-1 staining patterns (yellow) in normal oral mucosa; 40 \times objective. (A) and (B): same field with E-cadherin and WGA (green) staining, respectively. (C,D): same field with β -actin and WGA staining, respectively. (E,F): same field with syndecan-1 and WGA staining, respectively. Scale bars: (A–D) 20 μ m; (E,F) 20 μ m.

Author Contributions: Conception of the study: E.S., R.B.-M. and M.A.; data collection and analysis: all authors; writing of initial manuscript drafts: M.A.; editing of the manuscript: E.S., R.B.-M. and R.G.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was funded by Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), Universidad de la República, programs Grupos CSIC 2018 and Iniciación a la Investigación 2019; Fondo Santander Facultad de Odontología; Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA); and Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We are grateful to Andrés Di Paolo (IIBCE) for assistance with confocal microscopy.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Guarino, M.; Rubino, B.; Ballabio, G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology* **2007**, *39*, 305–318. [[CrossRef](#)]
2. Watanabe, S.; Watanabe, R.; Oton-Leite, A.F.; Alencar Rde, C.; Oliveira, J.C.; Leles, C.R.; Batista, A.C.; Mendonça, E.F. Analysis of cell proliferation and pattern of invasion in oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Sci.* **2010**, *52*, 417–424. [[CrossRef](#)]
3. Rivera, C.; Venegas, B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). *Oncol. Lett.* **2014**, *8*, 7–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Dissanayaka, W.L.; Pitiyage, G.; Kumarasiri, P.V.; Liyanage, R.L.; Dias, K.D.; Tilakaratne, W.M. Clinical and histopathologic parameters in survival of oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* **2012**, *113*, 518–525. [[CrossRef](#)]
5. Liu, Y.; Xu, J. High-Resolution Microscopy for Imaging Cancer Pathobiology. *Curr. Pathobiol. Rep.* **2019**, *7*, 85–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Ali, A.; Soares, A.B.; Eymael, D.; Magalhaes, M. Expression of invadopodia markers can identify oral lesions with a high risk of malignant transformation. *J. Pathol. Clin. Res.* **2021**, *7*, 61–74. [[CrossRef](#)]
7. Xie, Y.; Sheng, Y.; Li, Q.; Ju, S.; Reyes, J.; Lebrilla, C.B. Determination of the glycoprotein specificity of lectins on cell membranes through oxidative proteomics. *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 9501–9512. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Christiansen, N.P.; Skubitz, K.M. Identification of the major lectin-binding surface proteins of human neutrophils and alveolar macrophages. *Blood* **1988**, *71*, 1624–1632. [[CrossRef](#)]
9. Pedicini, L.; Miteva, K.T.; Hawley, V.; Gaunt, H.J.; Appleby, H.L.; Cubbon, R.M.; Marszalek, K.; Kearney, M.T.; Beech, D.J.; McKeown, L. Homotypic endothelial nanotubes induced by wheat germ agglutinin and thrombin. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 7569. [[CrossRef](#)]
10. Saxe, C.L.; Sussman, M. Induction of stage-specific cell cohesion in *D. discoideum* by a plasma-membrane-associated moiety reactive with wheat germ agglutinin. *Cell* **1982**, *29*, 755–759. [[CrossRef](#)]
11. Genet, G.; Guilbeau-Frugier, C.; Honton, B.; Dague, E.; Schneider, M.; Coatrieux, C.; Calise, D.; Cardin, C.; Nieto, C.; Bruno, P.; et al. Ephrin-B1 Is a Novel Specific Component of the Lateral Membrane of the Cardiomyocyte and Is Essential for the Stability of Cardiac Tissue Architecture Cohesion. *Circ. Res.* **2012**, *110*, 688–700. [[CrossRef](#)]
12. Bensley, J.G.; De Matteo, R.; Harding, R.; Black, M.J. Three-dimensional direct measurement of cardiomyocyte volume, nuclearity, and ploidy in thick histological sections. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 23756. [[CrossRef](#)]
13. Robertson, D.; Savage, K.; Reis-Filho, J.S.; Isacke, C.M. Multiple immunofluorescence labelling of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue. *BMC Cell Biol.* **2008**, *9*, 13. [[CrossRef](#)]
14. Stack, E.C.; Wang, C.; Roman, K.A.; Hoyt, C.C. Multiplexed immunohistochemistry, imaging, and quantitation: A review, with an assessment of Tyramide signal amplification, multispectral imaging and multiplex analysis. *Methods* **2014**, *70*, 46–58. [[CrossRef](#)]
15. Tsambaos, D.; Pasmatzis, E.; Manolopoulos, L.; Kapranos, N.; Goumas, P.; Adamopoulos, G. Lectin histochemistry of laryngeal squamous cell carcinomas. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* **1998**, *118*, 886–891. [[CrossRef](#)]
16. Maruyama, M.; Onodera, K.; Ooya, K. A histopathological and lectin-histochemical study of the lining epithelium in postoperative maxillary cysts. *Oral Dis.* **2002**, *8*, 241–248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Toto, P.D.; Gargiulo, A.W. Lectin binding to oral squamous carcinoma. *Cancer Detect. Prev.* **1985**, *8*, 161–168.
18. Kale, A.D.; Angadi, P.V. Tumor budding is a potential histopathological marker in the prognosis of oral squamous cell carcinoma: Current status and future prospects. *J. Oral Maxillofac. Pathol. JOMFP* **2019**, *23*, 318–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Mitrovic, B.; Schaeffer, D.F.; Riddell, R.H.; Kirsch, R. Tumor budding in colorectal carcinoma: Time to take notice. *Mod. Pathol.* **2012**, *25*, 1315–1325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Enderle-Ammour, K.; Bader, M.; Ahrens, T.D.; Franke, K.; Timme, S.; Csanadi, A.; Hoepfner, J.; Kulemann, B.; Maurer, J.; Reiss, P.; et al. Form follows function: Morphological and immunohistological insights into epithelial-mesenchymal transition characteristics of tumor buds. *Tumour. Biol.* **2017**, *39*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. González-González, R.; Ortiz-Sarabia, G.; Molina-Frechero, N.; Salas-Pacheco, J.M.; Salas-Pacheco, S.M.; Lavallo-Carrasco, J.; López-Verdín, S.; Tremillo-Maldonado, O.; Bologna-Molina, R. Epithelial-Mesenchymal Transition Associated with Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: A Review. *Cancers* **2021**, *13*, 3027. [[CrossRef](#)]
22. Grigore, A.D.; Jolly, M.K.; Jia, D.; Farach-Carson, M.C.; Levine, H. Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT. *J. Clin. Med.* **2016**, *5*, 51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Morris, H.T.; Machesky, L.M. Actin cytoskeletal control during epithelial to mesenchymal transition: Focus on the pancreas and intestinal tract. *Br. J. Cancer* **2015**, *112*, 613–620. [[CrossRef](#)]
24. Couchman, J.R. Syndecan-1 (CD138), Carcinomas and EMT. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4227. [[CrossRef](#)]
25. Marangon, H., Jr.; Leão, P.L.R.; Melo, V.V.M.; Caixeta, Â.B.; Souza, P.E.A.; de Aguiar, M.C.F.; Horta, M.C.R. Cell proliferation is associated with intensity of tumor budding in oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* **2018**, *47*, 128–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

-
26. Etemad-Moghadam, S.; Alaeddini, M. Invasion phenotypes of oral squamous cell carcinoma. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **2015**, *23*, e12–e16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 27. Mascitti, M.; Zhurakivska, K.; Togni, L.; Caponio, V.; Almangush, A.; Balercia, P.; Balercia, A.; Rubini, C.; Lo Muzio, L.; Santarelli, A.; et al. Addition of the tumour-stroma ratio to the 8th edition American Joint Committee on Cancer staging system improves survival prediction for patients with oral tongue squamous cell carcinoma. *Histopathology* **2020**, *77*, 810–822. [[CrossRef](#)]