



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE FARMACIA

**Análisis de los mecanismos protumorales
de la bacteria periodontal *Fusobacterium
nucleatum* sobre el crecimiento, transición
epitelio mesenquimal y la expresión de
marcadores inmunosupresores en línea
celular de carcinoma oral de células
escamosas**

Proyecto de tesis presentada a la Facultad de Farmacia para optar al título de
Magister en Bioquímica Clínica e Inmunología

Profesor guía y patrocinante

Dr. Estefanía Andrea Nova Lamperti
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Concepción, Chile.

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS	11
ÍNDICE DE FIGURAS	12
INDICE DE TABLAS	14
ABSTRACT	15
RESUMEN	16
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1.- Prevalencia mundial y generalidades del cáncer cabeza y cuello.....	17
1.2.- Etiopatogenia y conceptos generales de la Periodontitis	19
1.3.- Relación entre la periodontitis y el carcinoma oral de células escamosas.	23
1.4.- <i>Fusobacterium nucleatum</i> , características generales y aspectos que la proponen como bacteria oncogénica.	30
1.5.- <i>Fusobacterium nucleatum</i> y su rol en la progresión del carcinoma oral de células escamosas.	36
1.6.-Data Preliminar	47
2. PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	51
Pregunta de Investigación.....	52
3. HIPÓTESIS	53
4. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
OBJETIVO GENERAL	54
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	55
5.MATERIALES Y MÉTODOS	56
5.1.- Líneas celulares.....	56
5.2.- Cepa bacteriana.....	57
5.3.- Ensayo de Infección.....	58
5.4.- Visualización ingreso bacteria a la célula cancerígena	59
5.5.- Formación esferoides	60
5.6.- Análisis expresión marcadores asociados a ETM por qPCR	61
5.7.- Proteome Profile Array en células cancerígenas infectadas	63
5.8.- Análisis de los marcadores asociados a Inmunosupresión	65
5.9.- Análisis Estadístico	66
6. RESULTADOS	67
6.1.- Visualización ingreso bacteria a la célula cancerígena	67
6.2.- Análisis y medición de esferoides de células cancerígenas/ normales infectadas y no infectadas.....	70
6.3.- Análisis de la expresión de marcadores ETM en células cancerígenas/ normales infectadas y no infectadas por qPCR.....	78
6.3.- Análisis de la expresión de proteínas relacionadas a cáncer en células cancerígenas infectadas y no infectadas.....	82
6.4.- Análisis de la expresión de marcadores asociados a inmunosupresión en células cancerígenas/ normales infectadas y no infectadas.	90
7. DISCUSIÓN	98
8. CONCLUSIÓN	114
9. BIBLIOGRAFÍA	115
10.ANEXOS	126

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Esquema comparativo entre pieza dental con periodonto sano y pieza dental con periodontitis.	20
FIGURA 2. Esquema gráfico de la etiopatogenia de la Periodontitis.	22
FIGURA 3. Cuantificación de células mieloides CD11b+ y células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) en lesiones orales de ratones inducidos con óxido 4-nitroquinolina-1 (4NQO) infectados con <i>Porphyromonas gingivalis</i>	28
FIGURA 4. Rol de <i>Fusobacterium nucleatum</i> en biopelículas orales.	32
FIGURA 5. <i>Fusobacterium nucleatum</i> y células T CD8+ en metástasis hepáticas de cáncer colorrectal.	35
FIGURA 6. Capacidad proliferativa de células tumorales orales ante la infección por <i>F.n</i> por 4-36 h.	38
FIGURA 7. Formación de tumoresferas ante la presencia de <i>F.n</i> y posterior uso de Nisina.	39
FIGURA 8. Expresión de MMP9 e IL-8 en las células cancerosas infectadas con bacterias periodontales <i>in vitro</i>	41
FIGURA 9. Expresión de STAT3, MYC y ZEB1 en modelo de cáncer oral ante la infección de bacterias periodontales <i>in vitro</i>	42
FIGURA 10. Expresión de genes relacionados con p-EMT en el fenotipo epitelial (células HOC62) y en fenotipo EMT (células HOC313) ante la infección por <i>F.n</i>	44
FIGURA 11. Expresión de marcadores epiteliales asociados a EMT en secretoma cáncer y control.	49
FIGURA 12. Expresión de marcadores mesenquimales asociado a EMT en secretoma cáncer y control.	49
FIGURA 13. Expresión de proteínas asociadas con proliferación tumoral en OSCC, identificadas en el secretoma de pacientes con cáncer oral y controles sanos.	50
FIGURA 14. Ingreso y establecimiento de <i>F.n</i> dentro de la células del OSCC.	69
FIGURA 15. Fotografías esféricas formados a partir de células HSC3 infectadas y no infectadas con <i>F.n</i>	71
FIGURA 16. Comparación del área esféricas formados a partir de células HSC3 infectadas y no infectadas <i>F.n</i>	72
FIGURA 17. Comparación estadística área esféricas de células HSC3 infectadas y no infectadas entre día 3-10 post infección.	73
FIGURA 18. Fotografías esféricas formados a partir de células normales OKF6 infectadas y no infectadas <i>F.n</i>	75
FIGURA 19. Comparación del área de esféricas de células epiteliales normales OKF6 infectadas y no infectadas.	76
FIGURA 20. Comparación estadística área esféricas de células OKF6 infectadas y no infectadas entre día 6 y 10 post infección.	77
FIGURA 21. Expresión de marcadores asociados a EMT en células HSC3 ante la infección con <i>F.n</i>	79
FIGURA 22. Expresión de marcadores asociados a EMT en células OKF6 ante la infección con <i>F.n</i>	81
FIGURA 23. Lisado celular de células HSC3 infectadas y no infectadas con <i>F.n</i>	84
FIGURA 24. Sobrenadante de cultivo de células HSC3 infectadas y no infectadas con <i>F.n</i>	85
FIGURA 25. Mapa de calor expresión de proteínas lisado celular células HSC3 infectadas/no infectadas con <i>F.n</i>	88
FIGURA 26. Mapa de calor expresión de proteínas en sobrenadante de cultivo células HSC3 infectadas/no infectadas con <i>F.n</i>	89

FIGURA 27. Histograma representativo de la expresión de marcadores asociados a inmunosupresión en células HSC3.	91
FIGURA 28. DOTPLOT representativo de la expresión de GAL-9 en células HSC3 infectadas/ no infectadas.	92
FIGURA 29. Comparación expresión moléculas asociadas a inmunosupresión en células HSC3 infectadas y no infectadas con <i>F.n.</i>	93
FIGURA 30. Histograma representativo de la expresión de marcadores asociados a inmunosupresión en células OKF6.....	95
FIGURA 31. DOTPLOT representativo de la expresión de GAL-9 en células OKF6 infectadas/ no infectadas.	96
FIGURA 32. Comparación expresión moléculas asociadas a inmunosupresión en células OKF6 infectadas y no infectadas con <i>F.n.</i>	97

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Volumen tumoral en ratones inyectados con células UM-SCC-14A e infectados en medio control o en medios diferentes patógenos periodontales.	26
TABLA 2. Moléculas inmunosupresoras asociadas a OSCC.	46
TABLA 3. Péptidos Bacterianos y bacteria correspondiente identificados en el secretoma de cáncer OSCC y control.	48
TABLA 4. Marcadores asociados a Inmunosupresión en OSCC y sus correspondientes fluoróforos utilizados en el ensayo de fenotipo.	66
TABLA 5. Área de esferoides formados a partir de células HSC3 infectadas y no infectadas. ...	72
TABLA 6. Área de esferoides formados a partir de células OKF6 infectadas y no infectadas....	76
TABLA 7. Comparación estadística proteínas <i>Human XL Oncology Array</i> en lisado celular de células HSC3 infectadas y no infectadas con <i>F.n</i>	86
TABLA 8. Comparación estadística proteínas <i>Human XL Oncology Array</i> en sobrenadante de cultivo de células HSC3 infectadas y no infectadas con <i>F.n</i>	87

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common manifestation of oral cancer. It has been proposed that periodontal pathogens contribute to OSCC progression, and preliminary data from our laboratory has identified *Fusobacterium nucleatum* (*F.n*) and Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) markers in the secretome of biopsies from patients with OSCC in comparison with healthy biopsies from the oral cavity. However, the mechanisms modulated by the tumoral bacteriome in OSCC remains not fully understood. Oral cancer cells (HSC3) and normal epithelial cells (OKF6) were infected with *F.n* using a MOI of 100 to evaluate the effect of the bacteria on tumor growth, expression of EMT markers and immunomodulatory properties. After infection, we confirmed the presence of bacteria inside and surrounding the cancer cells by confocal microscopy. Then, a significant increment in the size of *F.n*-infected tumor spheroids was found at 3-, 6- and 10-days post-infection. Related to EMT markers, MMP-9 transcripts were significantly elevated in infected cells, whereas E-cadherin transcripts were significantly downregulated post infection. In addition, the Human XL Oncology array kit revealed that EMT proteins such as MMP-3, MMP-9 and FOXO1/FKHR, were upregulated and others like E-cadherine, ICAM-1, DLL-1 and ERB2 were downregulated after *F.n*-infection. Finally, the expression of Galectin-9 measured by flow cytometry was significantly increased in infected cells than control cancer cells. The periodontal bacterium *F.n* promotes tumor progression of OSCC through increased tumor growth, acquisition of EMT-associated markers and Galectin-9 upregulation.

RESUMEN

El carcinoma oral de células escamosas (OSCC) es la manifestación más común del cáncer oral. Se ha propuesto que los patógenos periodontales participan en la progresión del OSCC, y data preliminar de nuestro laboratorio identificó mayor presencia de marcadores de *Fusobacterium nucleatum* (*F.n*) y epitelio de transición mesenquimal (ETM) en el secretoma de biopsias de pacientes con OSCC comparado con el de biopsias de pacientes sanos. Sin embargo, los mecanismos modulados por el bacterioma tumoral en OSCC aún no están completamente dilucidados. Se infectaron células cancerosas orales (HSC3) y células epiteliales normales (OKF6) con *F.n* (MOI100), para evaluar el efecto de la bacteria en el crecimiento tumoral, expresión de marcadores ETM y propiedades inmunomoduladoras. Después de la infección, confirmamos la presencia de la bacteria dentro y alrededor de las células cancerosas mediante microscopía confocal. En primer lugar, se encontró un incremento significativo en el tamaño de los esferoides tumorales infectados con *F.n* a los 3, 6 y 10 días después de la infección. En relación con los marcadores de EMT, la expresión transcripcional de MMP-9 se elevó significativamente en las células infectadas, mientras que la de E-cadherina disminuyó significativamente después de la infección. Además, mediante el kit Human XL Oncology encontramos aumento en la expresión de proteínas ETM como MMP-3, MMP-9 y FOXO1/FKHR, y disminución de proteínas como ICAM- 1, DLL-1 y ERB2 posterior a la infección con *F.n*. Finalmente, la expresión de Galectina-9 evaluada por citometría de flujo aumentó significativamente en las células cancerosas infectadas. A partir de esta evidencia proponemos que la bacteria periodontal *F.n* promueve la progresión tumoral de OSCC a través de un mayor crecimiento tumoral, adquisición de marcadores asociados a ETM y la regulación positiva de galactina-9.

1. INTRODUCCIÓN

1.1.- Prevalencia mundial y generalidades del cáncer cabeza y cuello

El cáncer de cabeza y cuello abarca una variedad de tumores que se originan en la cavidad oral, hipofaringe, orofaringe, nasofaringe o laringe. Gran parte de ellos comienza en los tejidos húmedos que rodean boca, nariz y garganta (Centella-Gutiérrez & Dean-Ferrer, 2016). Tiene una incidencia de cercana al 4-5 %; representando la quinta neoplasia en la población mundial y séptima en cuanto a mortalidad. Anualmente se diagnostican unos 650.000 casos nuevos y alrededor de unos 350.000 fallecimientos por esta causa. Estos tumores presentan gran variabilidad geográfica. En el año 2018 se detectaron 890.000 casos nuevos y 450.000 muertes, representando el 3% de todos los cánceres (51.540 casos nuevos) y poco más del 1,5 % de todas las muertes por cáncer (10.030 muertes) en Estados Unidos (Chow, 2020).

En Chile, durante el 2020 se estima que hubo una incidencia de más de 800 casos nuevos de este cáncer y una mortalidad de más de 400 personas, siendo mayor su incidencia en hombres de entre 40 y 50 años de edad (DIPRECE, 2020). Dentro de las neoplasias malignas, el carcinoma oral de células escamosas (OSCC) representa el 90% de los casos, siendo el tipo histológico más frecuente (Vigneswaran & Williams, 2014). A pesar de que, con una detección temprana, las tasas de curación pueden ser del 50%, la mayoría de las

lesiones se diagnostican en una etapa tardía y tienen un pronóstico significativamente peor debido a la propagación local y regional, con una supervivencia que describe ser a los 5 años inferior al 16%. Pese a los avances en la gestión quirúrgica, quimioterapia y radioterapia estos resultados no han mejorado(Cancer Genome Atlas, 2015). La etiología del OSCC es multifactorial, dentro de sus agentes etiológicos principales encontramos el consumo de tabaco y alcohol, también se ha asociado la exposición al sol, enfermedades sistémicas, deficiencias metabólicas, lesiones orales premalignas, virus (VPH) y enfermedades de transmisión sexual(Maymone et al., 2019). Si bien estos son reconocidos como factores etiológicos primarios de la carcinogénesis escamosa oral, existe una tendencia preocupante en la incidencia y agresividad del cáncer oral en pacientes donde no sólo estos cumplirían un rol etiológico, lo que aumenta la posibilidad de que otros factores puedan tener un papel importante en la etiología y progresión del tumor. Desde ahí nace la propuesta de factores agravantes poco convencionales, como lo sería la Periodontitis(Ganly et al., 2019).

1.2.- Etiopatogenia y conceptos generales de la Periodontitis

La periodontitis se define como una enfermedad inflamatoria crónica multifactorial asociada a la formación de un *biofilm* disbiótico y caracterizada por la destrucción progresiva del aparato de soporte de los dientes (Papapanou et al., 2018). Esta enfermedad implica interacciones dinámicas complejas entre bacterias patógenas específicas, respuestas inmunitarias destructivas del hospedero y factores ambientales como el tabaquismo (Page, Offenbacher, Schroeder, Seymour, & Kornman, 1997). Sus características clínicas principales incluyen la pérdida de soporte del tejido periodontal, que se manifiesta a través de la pérdida de inserción clínica (CAL), la pérdida ósea alveolar evaluada radiográficamente, la presencia de bolsas periodontales y sangrado gingival (Papapanou et al., 2018) (**Figura 1**). La periodontitis es considerada un importante problema de salud pública debido a su alta prevalencia a nivel mundial y nacional. Mundialmente, cerca del 11% de la población tiene periodontitis (Frencken et al., 2017), lo que significa que casi 743 millones de personas padecen de la enfermedad. La principal consecuencia de la periodontitis es la pérdida dentaria, representando la mayor causa del edentulismo y disfunción masticatoria en la población adulta, lo que resulta en costos significativos en atención dental y provoca un impacto negativo en la calidad de vida y salud general de las personas.

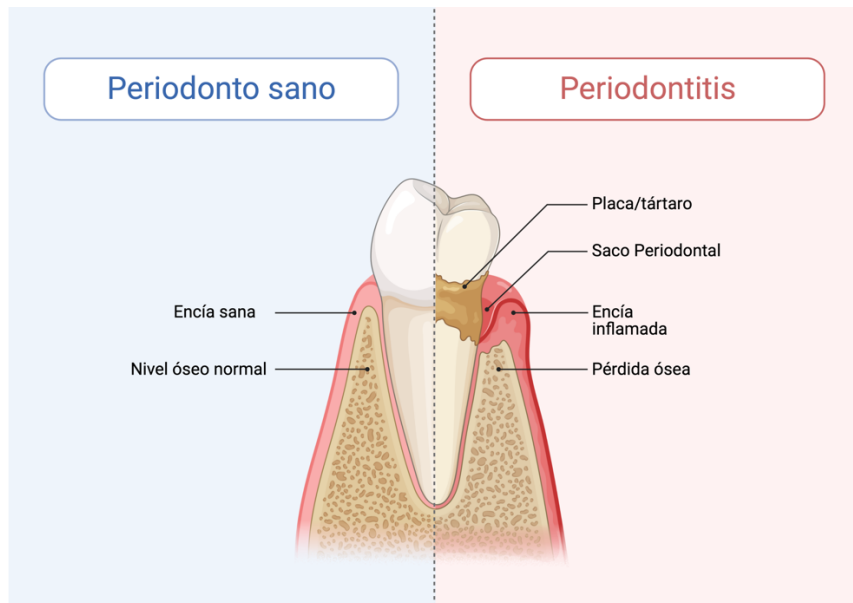


FIGURA 1. Esquema comparativo entre pieza dental con periodonto sano y pieza dental con periodontitis.

A. Periodonto y encía sana con nivel óseo normal. **B.** Periodonto enfermo, acumulación de placa, formación de saco periodontal, encía inflamada y pérdida ósea. (Elaboración propia)

Actualmente en la literatura se han propuesto cinco hipótesis principales para el inicio y patogénesis de la periodontitis, donde el modelo más aceptado es el de “sinergia polimicrobiana y disbiosis”, en esta sinergia polimicrobiana, diferentes miembros o combinaciones de genes específicos dentro de la comunidad cumplen diferentes roles para dar forma y estabilizar un microbioma patogénico que provoca el inicio de la enfermedad (Lamont, Koo, & Hajishengallis, 2018). La disbiosis del microbioma periodontal significa un cambio en la abundancia relativa de los componentes de la comunidad bacteriana en comparación con su abundancia en salud, lo que lleva a alteraciones en la interacción hospedero-microbios, suficientes para mediar una inflamación destructiva capaz de generar

pérdida ósea(Hajishengallis, 2014) (**Figura 2**). Uno de los requisitos básicos para que surja una comunidad potencialmente patógena implica la capacidad de ciertas especies, denominadas "patobiontes", para modular la respuesta del huésped de forma que evada la respuesta inmune e incline la balanza de la homeostasis a la disbiosis. Las bacterias patobiontes también elevan la virulencia de toda la comunidad microbiana a través de la comunicación interactiva con otros patógenos accesorios (Hajishengallis, 2014; Lamont et al., 2018).

Si bien las bacterias periodontales y la inflamación gingival sostenida son fundamentales para la progresión de la enfermedad periodontal dentro del desarrollo de un microbioma disbiótico, es importante de igual forma, la expresión de moléculas como: adhesinas, receptores afines, enzimas proteolíticas y estructuras / ligandos de superficie proinflamatorios, que en combinación con la inflamación gingival persistente actúan como factores de virulencia de la comunidad para sostener nutricionalmente una comunidad microbiana heterotípica y proinflamatoria que provoca una respuesta del huésped que no se resuelve y termina destruyendo los tejidos (Radaic & Kapila, 2021). Dentro del amplio rango de patógenos involucrados en la enfermedad periodontal; *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticolas* y *Fusobacterium nucleatum* se consideran patógenos predominantes(Lamont et al., 2018).

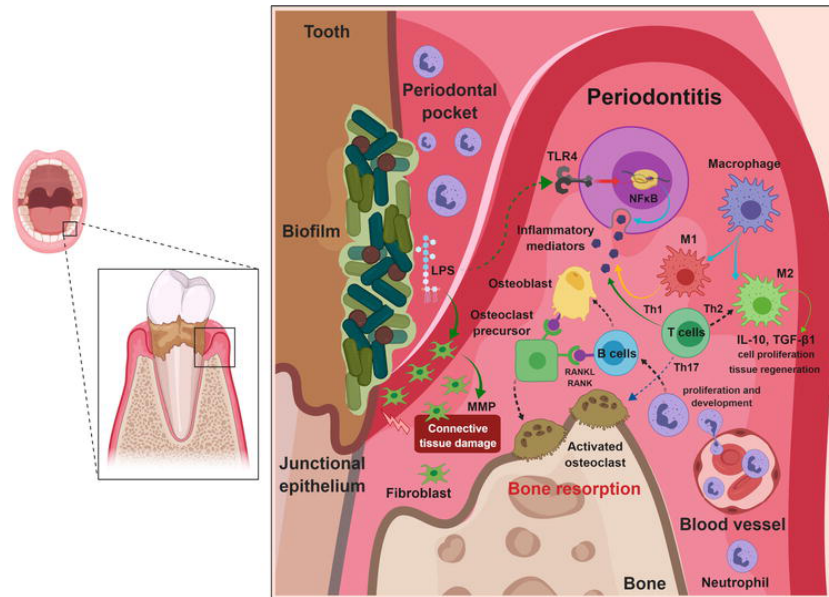


FIGURA 2. Esquema gráfico de la etiopatogenia de la Periodontitis.

Respuesta Inmune innata y adaptativa activada ante la presencia de un biofilm compuesto principalmente por bacterias patógenas. La persistencia de la respuesta inflamatoria, resulta en la destrucción de los tejidos del huésped. (*Extraído de Yussif N. M. A. et al., 2020*)

1.3.- Relación entre la periodontitis y el carcinoma oral de células escamosas.

Diversos estudios sugieren que la periodontitis está asociada con muchos tipos de enfermedades sistémicas, como la enfermedad coronaria(Pussinen et al., 2005), el accidente cerebrovascular(Mustapha, Debrey, Oladubu, & Ugarte, 2007), preeclampsia(Boggess et al., 2003), diabetes(Stanko & Izakovicova Holla, 2014) e inclusive con la COVID-19(Gupta et al., 2022), sin embargo su relación con el cáncer es aún controversial.

Uno de los primeros estudios en investigar esta asociación fue el de Yao y colaboradores el 2014, donde realizaron un metaanálisis basado en todos los datos publicados de casos y controles elegibles para evaluar la asociación entre la periodontitis y la susceptibilidad al cáncer oral. Sus resultados revelaron que los pacientes con periodontitis parecen tener un riesgo 2,66 veces mayor de cáncer oral(Yao, Zhou, Peng, Ji, & Liu, 2014). Posteriormente, un estudio de cohorte realizado el 2017 por Farquhar y colaboradores investigó el efecto de la mala higiene y probable periodontitis en el pronóstico de pacientes con cáncer de cabeza y cuello del estudio epidemiológico de cáncer de cabeza y cuello de la Universidad de Carolina del Norte (CHANCE), demostrando que la mala salud bucal afecta la supervivencia de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello y una buena higiene bucal, visitas anuales al dentista y el cepillado diario de los dientes, puede mejorar el pronóstico de esta patología(Farquhar et al., 2017).

El vínculo entre la periodontitis y el carcinoma oral de células escamosas (OSCC) se ha intentado explicar a través de mecanismos tanto microbianos como inmunológicos. Tal como se mencionó anteriormente, los cambios microbianos patológicos dentro del microbioma oral característicos de la periodontitis dan lugar a un aumento en la abundancia de patógenos periodontales clásicos como, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *F. nucleatum* y *T. forsythia*, dichas bacterias, a través estudios de secuenciación de ADN, se han observado en tumores orales, comparado con los sitios sanos, por lo que se propone que los niveles altos de patógenos periodontales pueden ser una potencial señal para la transición del OSCC(Hayes et al., 2018; Zhao et al., 2017).

Partiendo de los supuestos, que en la asociación entre la periodontitis y la progresión del OSCC jugarían un rol protagónico las bacterias periodontales, se han propuesto varios mecanismos para explicar cómo la carcinogénesis podría estar mediada por la disbiosis microbiana oral. Los patógenos periodontales pueden contribuir a la carcinogénesis en base a la ubicación de los tumores, como lo es comúnmente el borde lateral de la lengua(Elebyary, Barbour, Fine, Tenenbaum, & Glogauer, 2020). De acuerdo con la ubicación anatómica, esta área entra en contacto directo con la cara lingual de los molares mandibulares, sitios que se ha informado que tienen el índice más alto de acumulación de placa y gingivitis(Sreenivasan & Prasad, 2017). Por lo tanto, se puede inferir que la mucosa del borde lateral de la lengua está constantemente expuesta a los efectos dañinos y toxinas de las bacterias periodontales patógenas. Además, ciertas

especies bacterianas, como *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella Forsythia*, se han detectado en grandes cantidades tanto en las regiones subgingivales como en la lengua de los pacientes afectados periodontalmente (Tanner et al., 2006). En base a esta evidencia, es que se ha propuesto recientemente que la periodontitis es un posible factor contribuyente o un acelerador del desarrollo del cáncer oral, sin embargo los mecanismos por los cuales las bacterias ejercen este rol, aún no han sido dilucidados.

En este contexto, se ha estudiado que bacterias patobiontes, como las especies *Porphyromonas* y *Fusobacterium*, pueden aumentar la expresión de citoquinas y factores inflamatorios como IL-6, metaloproteinasas y TNF- α , lo que provoca inflamación crónica y alteraciones de diferentes vías moleculares responsables del metabolismo y la proliferación celular (Adi Binder Gallimidi, 2015; Pan, Xu, Tan, Lin, & Pan, 2014). Además, se ha visto que sustancias producidas por bacterias patógenas, como ROS, sulfuros y nitrosaminas, inducirían un daño genético protumoral (Piao et al., 2016).

Recientemente Kamarajan y colaboradores investigaron el papel específico de los patógenos periodontales *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *F. nucleatum*, en la progresión del OSCC mediante la medición de los efectos de dichos patógenos en la migración celular, invasión, diferenciación y la agresividad del tumor. Sus resultados demostraron que los tres patógenos periodontales mejoraron la migración, invasión, formación de tumoresferas y tumorigénesis de células de carcinoma de células escamosas orales (OSCC) *in vivo*, a diferencia de las

bacterias comensales orales que no afectaron la migración de células OSCC. Además, se demostró *in vivo* que los tumores de ratones infectados con los diferentes patógenos periodontales eran significativamente mayores en tamaños que los controles (**Tabla 1**)(Kamarajan et al., 2020).

	Control	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Treponema denticola</i>
Animal number	Tumor volume (mm ³)	Tumor volume (mm ³)	Tumor volume (mm ³)	Tumor volume (mm ³)
1	232.7	726	441.4	582.6
2	227.8	661.5	325.4	422.6
3	147.8	541	304.2	477.1
4	99.2	193.5	151	419.813
5	-	171.5	191.8	-
Mean Volume	176.8	458.7*	282.7*	475.5*

TABLA 1. Volumen tumoral en ratones inyectados con células UM-SCC-14A e infectados en medio control o en medios diferentes patógenos periodontales.

Tumores orales de ratones fueron infectados con *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* or *Fusobacterium nucleatum* a una MOI: 50 por 7 semanas. * $p < 0.05$ (Extraído de Kamarajan et al., 2020)

En términos de la contribución de la periodontitis a la progresión del cáncer, se ha informado que un patobionte periodontal clave, *Porphyromonas gingivalis*, es capaz de interrumpir la vigilancia inmunológica al activar la señalización de STAT3 mediante sus factores de virulencia Mf1 y FimA. Esto, a su vez, induce la generación de células supresoras dendríticas derivadas de mieloides inmunosupresoras (MDSC) a partir de monocitos, que ayudan a mantener la proliferación de células oncogénicas y promueven el escape inmunitario

disminuyendo los linfocitos citotóxicos/ aumentando los linfocitos T reguladores FOXP3+(Arjunan et al., 2018). Los patógenos asociados a la periodontitis también pueden interferir con la expresión de la vía de señalización de Notch, que desempeña un papel importante en el desarrollo de quimiorresistencia en las células tumorales(Woo et al., 2017).

Por otra parte, un estudio de Wen y colaboradores describió de manera *in vitro* que queratinocitos orales displásicos de origen humano (DOK) cuando son infectados con *P. gingivalis* inducen la expresión de quimioquinas como CCL2, CXCL2 y citoquinas IL-6 e IL-8, que reclutan células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs), relacionadas con la creación un microambiente inmunosupresor que favorece la progresión tumoral(Wen et al., 2020) (**Figura 3**).

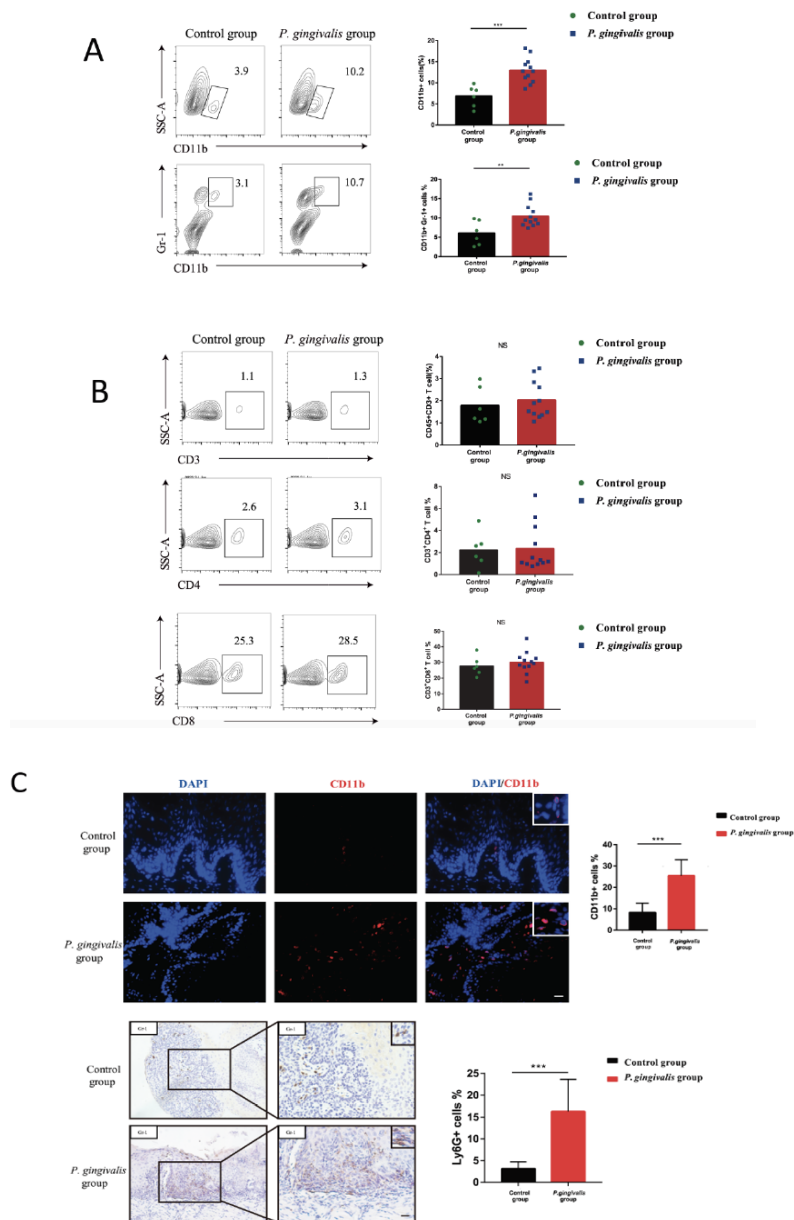


FIGURA 3. Cuantificación de células mieloides CD11b+ y células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) en lesiones orales de ratones inducidos con óxido 4-nitroquinolina-1 (4NQO) infectados con *Porphyromonas gingivalis*.

(A) Proporción de células mieloides CD11b+ y MDSC en lesiones orales de los grupos control e infectados (B) Proporción de células T CD3+, CD4+ y CD8+ en lesiones orales de los grupos control e infectados (C) Imágenes representativas de inmunofluorescencia y análisis de la expresión de CD11b en lesiones orales de los 2 grupos. *P < 0,05. ** P < 0,01. *** P < 0,001. (Extraído de Wen et al., 2020)

Asimismo, se ha notificado un aumento de las citoquinas inmunosupresoras, como IL-10, en los pacientes con periodontitis. Lewkowicz y colaboradores, reportaron que la interacción de neutrófilos con células T reguladoras estimuladas con lipopolisacárido de bacterias periodontales indujo una mayor producción de IL-10. Estos neutrófilos polimorfonucleares IL-10+ elevados se caracterizaron de manera similar entre los pacientes con OSCC, lo que propone posibles vínculos por los cuales la infección periodontal puede promover el OSCC a través de procesos de regulación de la respuesta inmune(Lewkowicz et al., 2016).

1.4.- *Fusobacterium nucleatum*, características generales y aspectos que la proponen como bacteria oncogénica.

Fusobacterium nucleatum es una bacteria cuyo principal nicho de colonización es la cavidad oral y es conocida por su rol en la patogénesis de la periodontitis, sin embargo, se ha demostrado que esta bacteria puede ingresar a la circulación sanguínea como resultado de una infección periodontal, migrando desde su sitio primario de colonización a otras partes del cuerpo (Temoin, Wu, Wu, Shoham, & Han, 2012). Por este motivo, se ha asociado con diversas enfermedades como, angina, abscesos pulmonares, otitis crónica (Didilescu et al., 2012), sinusitis, abscesos periamigdalinos, abscesos cerebrales (Han et al., 2003), enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn (Kostic, Xavier, & Gevers, 2014), abscesos ginecológicos, sepsis neonatal (Brook, 2013; X. Wang et al., 2013), síndrome de Lemierre, endocarditis infecciosa e incluso el cáncer (Gholizadeh, Eslami, & Kafil, 2017).

Fusobacterium nucleatum es una bacteria anaerobia estricta, sin fimbrias. El nombre *Fusobacterium* resulta de la forma que toma esta bacteria: "fusos", que significa huso y "*nucleatum*", proviene de la forma esférica que se asemeja a un núcleo que se obtiene al ser observada bajo el microscopio óptico y electrónico (Bolstad, Jensen, & Bakken, 1996). Su metabolismo se basa principalmente en los procesos de fermentación, en los que el principal producto es el ácido butírico. *F.n* parece ser una de las pocas bacterias anaerobias que pueden obtener energía también de los aminoácidos. Además, puede sobrevivir obteniendo la

energía solo de la degradación del L-glutamato(Gharbia & Shah, 1991; Shah, Gharbia, & Zhang, 1993). Esta característica metabólica confiere a *F.n* interesantes capacidades, que permiten a la bacteria adaptarse a ambientes diversos y difíciles como la cavidad oral, el intestino o inclusive el microambiente tumoral(Kapatral et al., 2002).

Es considerada un patógeno periodontal importante, y pareciera ser que la prevalencia de *F.n* aumenta con la gravedad de la enfermedad, la progresión de la inflamación o la profundidad del saco periodontal(Yang, Zhang, Li, Yang, & Shi, 2014). Esta bacteria gramnegativa oral, durante la periodontitis puede ingresar al tejido conectivo y aumentar la destrucción del tejido a través de proteasas, así como induciendo una amplia respuesta inflamatoria(Ji, Shin, Kim, & Choi, 2010). *F.n* puede inducir cambios significativos en la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune como, el ligando de quimiocina 20 (CCL20), la proteína de unión a calcio S100, antileucoproteasa derivada de piel (SKALP), IL-8, CXCL 5, factor de complemento 3 (C3), IL-32, amiloide sérico A (SAA) , proteína rica en prolina (SPRR) y CXCL1(Yin & Dale, 2007).

F.n tiene fuertes propiedades de coagregación, lo que le permite cumplir una función de apoyo estructural como organismo puente, conectando a los colonizadores primarios como *Streptococcus* a los colonizadores secundarios en gran parte anaeróbicos como lo son *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, permitiendo el establecimiento de un microbioma patógeno(Kolenbrander, Palmer, Periasamy, & Jakubovics, 2010). Presenta

amplia cantidad de adhesinas bacterianas como; Aid1, CmpA, Fap2, FomA, FadA y RadD que juegan un papel vital en la coagregación microbiana, mediando la invasión y facilitando la propagación de bacterias, son estas adhesinas las que le permiten coagregarse con casi todas las especies bacterianas que participan en la formación de placa oral (Groeger, Zhou, Ruf, & Meyle, 2022) (Figura 4).

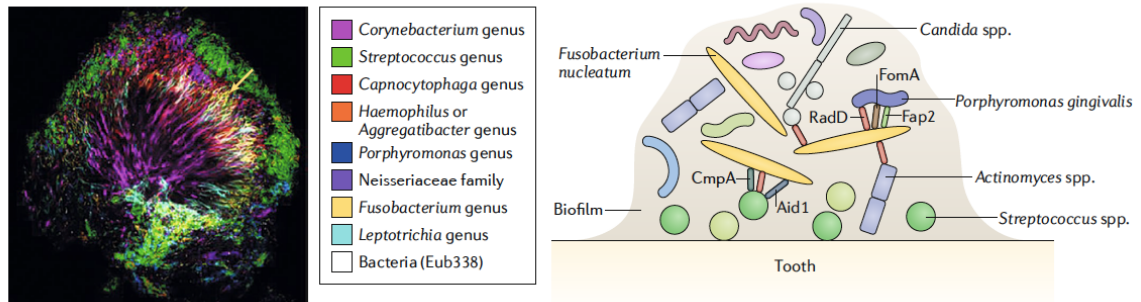


FIGURA 4. Rol de *Fusobacterium nucleatum* en biopelículas orales.

Panel izquierdo, visualización del *biofilm* oral a través de la formación de imágenes espectrales: hibridación in situ con fluorescencia (CLASI-FISH); panel derecho, esquematización que demuestra interacciones específicas donde *Fusobacterium nucleatum* funciona como un organismo puente que se adhiere primero a los colonizadores primarios de la superficie dental como *Streptococcus* spp y luego permite la adherencia de colonizadores tardíos como *Porphyromonas gingivalis* que complejizan la biopelícula. (Extraído de Brennan et al., 2018).

El vínculo entre *F.n* y el cáncer se ha estudiado ampliamente en el cáncer colorrectal. Estudios metagenómicos permitieron detectar la abundancia de este patógeno en pacientes con cáncer colorrectal, postulándolo como un patógeno de riesgo para dicha patología (Marongiu et al., 2021). Uno de los mecanismos que explica esta asociación, destaca el rol de FadA. La proteína FadA, es una adhesina, factor de virulencia característico de *F.n*, que se encuentra en la

superficie externa de la membrana bacteriana y es responsable de llevar a cabo una colonización eficiente. La adhesina fusobacteriana (FadA) es la única adhesina que se ha demostrado que se une a las células huésped y, hasta ahora, sigue siendo el factor de virulencia de *F.n* que mejor se ha caracterizado (Kolenbrander, 2011). Esta proteína a través de sus propiedades adhesivas contribuiría a la aparición de inflamación local especialmente en los intestinos. Uno de los receptores de FadA es la E-cadherina que se encuentra tanto en las células cancerosas como en las células sanas del colon (Mohri, 1997). La unión de FadA a la E-cadherina, permite que *F.n* invada las células epiteliales y posteriormente, la activación de β -cateninas, lo que conduce a una mayor expresión de proteínas proinflamatorias, factores de transcripción y oncogenes (Rubinstein et al., 2013).

Otro mecanismo por el cual *F.n* puede contribuir a la carcinogénesis es evadiendo las respuestas inmunes anticancerígenas, a través de Fap2. La proteína de activación de fibroblastos 2 (Fap2) es una hemaglutinina y adhesina sensible a galactosa que participa en la virulencia de *F.n* (Copenhagen-Glazer et al., 2015). Su función es crítica en la mediación y desarrollo del cáncer colorrectal, mediante la unión con acetilgalactosamina (Gal-GalNAc), que se sobreexpresa en metástasis humanas y adenocarcinoma colorrectal. Se demostró que la proteína Fap2 de *F.n* además, interactúa directamente con el receptor inmune de células T (TIGIT) expresado en células NK y linfocitos infiltrantes tumorales, provocando la inhibición de la citotoxicidad de las células natural killer (NK) y la actividad de

los linfocitos, por lo tanto, disminuye la capacidad del sistema inmune para atacar el cáncer(Gur et al., 2015). De esta forma, los principales factores de virulencia de la bacteria son los que le otorgan sus propiedades oncogénicas, por su parte FadA interactúa con las células endoteliales y las células epiteliales cancerígenas, mientras que Fap-2 se unirá a Gal-GalNAc sobreexpresada en carcinomas y a TIGIT expresado en las células inmune.

F.n también se ha asociado con una menor densidad de células T CD8+ y una mayor densidad de células derivadas de mieloides en el tejido de metástasis hepáticas en cáncer colorrectal. Las células supresoras derivadas de mieloides (CD11b+) pueden inhibir la proliferación de células T e inducir su apoptosis. Por lo tanto, la expresión de CD11b+ permite que el tumor crezca tranquilamente a través de su poderosa acción inmunosupresora, jugando un papel importante en la inducción de la progresión tumoral(Sakamoto et al., 2021)(**Figura 5**).

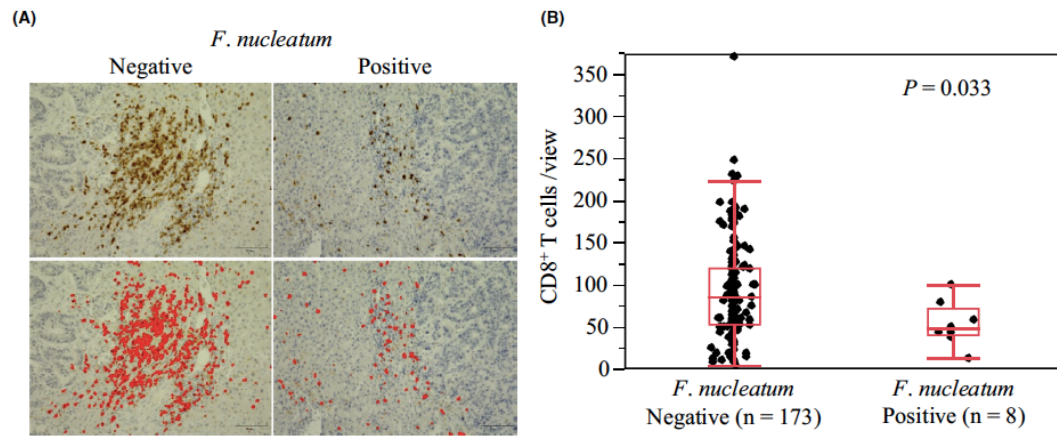


FIGURA 5. *Fusobacterium nucleatum* y células T CD8+ en metástasis hepáticas de cáncer colorrectal.

A. Tinción inmunohistoquímica de CD8 según la presencia o no de *F. nucleatum*. **B.** Densidad de células T CD8+ según la presencia o no de *F. nucleatum*. (Extraído de Sakamoto et al., 2020)

1.5.- *Fusobacterium nucleatum* y su rol en la progresión del carcinoma oral de células escamosas.

De igual forma, *F.n*, ha sido una de las principales bacterias periodontales asociadas por la literatura al desarrollo de patologías malignas bucales como lo es el carcinoma oral de células escamosas.

A nivel de la cavidad oral también se ha logrado detectar alta presencia de *F.n* en tejidos tumorales y saliva de pacientes con OSCC, en comparación a tejidos sanos(Al-Hebshi et al., 2017; Zhao et al., 2017). De acuerdo con un estudio de Bronzato y colaboradores las lesiones tumorales mostraron una abundancia de *F.n* un 6 % mayor que las lesiones no tumorales y una probabilidad 2,93 veces mayor de que *F.n* estuviera presente en las lesiones tumorales(Bronzato et al., 2020). Sin embargo, a pesar de los avances logrados en la detección de la bacteria en los tejidos tumorales a través de las técnicas metagenómicas, los mecanismos por los cuales *F.n* ejerce su el efecto en la transformación maligna o en la progresión oncogénica de las células cancerígenas orales sigue siendo desconocido. En este contexto, diversos autores han propuesto múltiples mecanismos protumorales para explicar su rol en el OSCC, entre ellos la capacidad de *F.n* de aumentar el crecimiento tumoral, a través de la alteración de la proliferación celular. Un estudio realizado por Geng y colaboradores descubrió que la infección por *F.n* promueve la capacidad proliferativa de las células del carcinoma oral (Tca8113) al causar daños en el ADN a través de la

vía Ku70/p53 (Geng, Zhang, Lu, Zhang, & Pan, 2020). Ku70 y p53 son conocidas como las principales proteínas involucradas en la regulación de la reparación de NHEJ (unión de extremos no homólogos) que desempeña un papel fundamental en la detección de rotura de doble hebra ADN (DSB)(Puebla-Osorio et al., 2014). Los resultados del estudio revelaron que ante la infección por *F.n* la expresión de Ku70 y p53 disminuyó sincrónicamente asociada a una mayor capacidad de proliferación celular en las células del carcinoma oral (**Figura 6**). La delección de Ku70 aumenta los daños subyacentes y limita por ende los mecanismos de respuesta a daño mediados por p53(Geng et al., 2020).

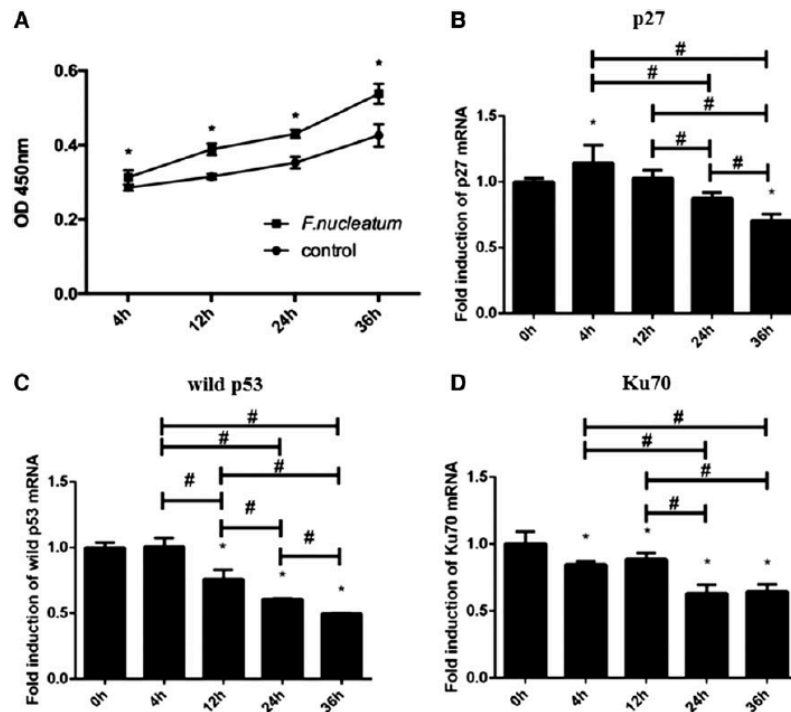


FIGURA 6. Capacidad proliferativa de células tumorales orales ante la infección por *F.n* por 4-36 h.

El efecto de la infección por *F.n* en la expresión ARNm de p27 (**B**), p53 wild (**C**) y Ku70 (**D**) evaluado por qPCR. Los datos se analizaron según la expresión génica relativa $2^{-\Delta\Delta C_t}$. *Diferencia significativa ($p < 0,05$) en comparación con el grupo control. #Diferencia significativa ($p < 0,05$) comparada entre los grupos evaluados. (Extraído de Gent et al., 2020)

Esto se apoya por los resultados previamente expuestos por Kamarajan y colaboradores, donde se evidenció que al someter a las células cancerígenas del OSCC (HSC3) a la infección por *F.n*, estas aumentaban la formación de esferoides tumorales, efecto que podría significativamente revertirse utilizando Nisina (péptido bacteriano producido por bacterias comensales) (**Figura 7**)(Kamarajan et al., 2020)

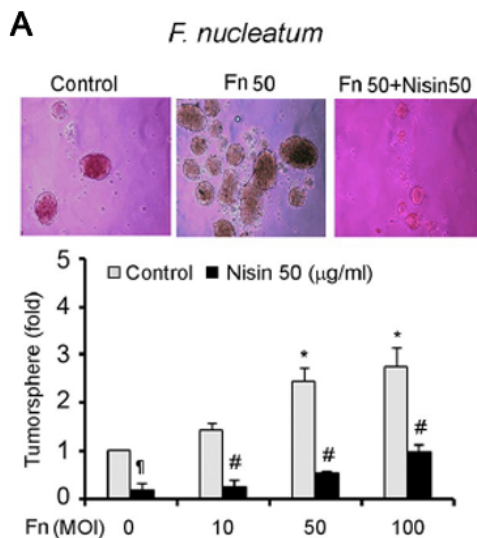


FIGURA 7. Formación de tumoresferas ante la presencia de *F.n* y posterior uso de Nisina.

A. *F.n* promueve la formación de esferas de células OSCC (HSC-3) y la nisina inhibe ese proceso. (Extraído de Kamarajan et al., 2020)

Uno de los mecanismos más descritos para entender el efecto protumoral de *F.n*, es la adquisición de un epitelio de transición mesenquimal (EMT), el cual se caracteriza por ser una alteración rápida y a menudo reversible del fenotipo de células epiteliales a mesenquimales con uniones célula-célula debilitadas y remodelación del citoesqueleto, evidenciado experimentalmente a través de la pérdida de proteínas clásicas epiteliales y la adquisición de marcadores mesenquimales. Este tipo de epitelio, al perder sus características clásicas, tiene un comportamiento más agresivo, resistente a la terapia y asociado a metástasis (Harrandah, Chukkapalli, Bhattacharyya, Progulske-Fox, & Chan, 2020; Neuzillet et al., 2021; Shao et al., 2021; Zhang et al., 2020).

Los resultados de estos estudios han sido diversos en apoyar el rol de la bacteria en la progresión del OSCC. Sin embargo, no existe unificación al momento de definir los marcadores a utilizar y su expresión para determinar la adquisición del fenotipo EMT. En un estudio de Harrandah y colaboradores las células de cáncer oral poliinfectadas con bacterias periodontales, sobreexpresaron MMP1, MMP9 e IL-8 (**Figura 8**). Además, la expresión de los marcadores de supervivencia celular MYC, JAK1 y STAT3 y de los marcadores de transición epitelial-mesenquimatosa ZEB1 y TGF- β , también se encontraron significativamente elevados (**Figura 9**). Aunque, las monoinfecciones mostraron que *F. n* por si sola, tenía efectos comparables o mayores que las cuatro bacterias periodontales juntas (**Figura 8 y 9**)(Harrandah et al., 2020)

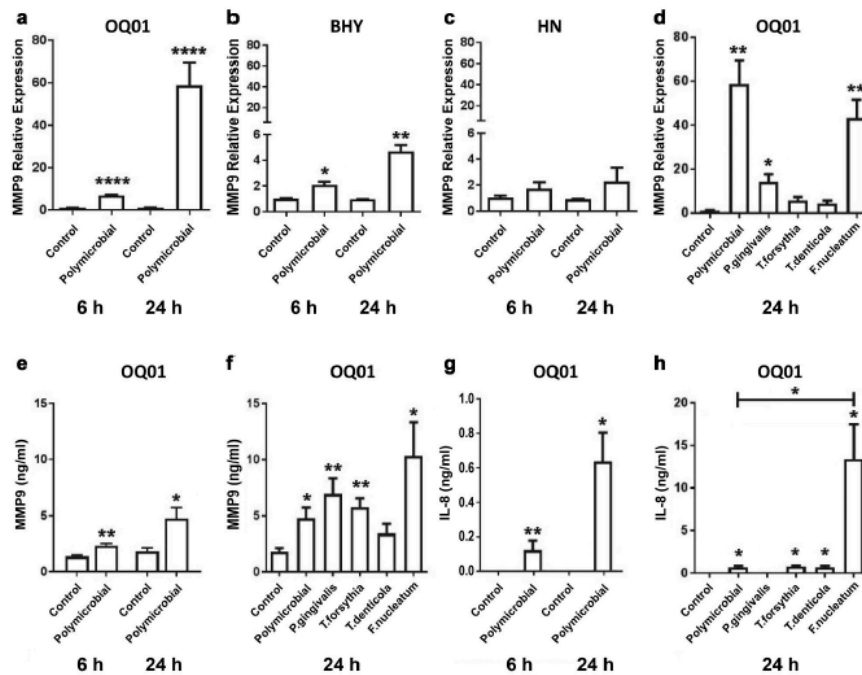


FIGURA 8. Expresión de MMP9 e IL-8 en las células cancerosas infectadas con bacterias periodontales *in vitro*.

(A-C) Expresión elevada MMP9 ARNm en OQ01 y BHY, pero no en HN, después de una infección polimicrobiana a las 6 y 24 h. (D) Aumento de la expresión de MMP9 en células OQ01 después de la infección única con *P. gingivalis* o *F. nucleatum*. (E) Aumento de la secreción de MMP9 en el sobrenadante del cultivo celular OQ01 después de la infección polimicrobiana a las 6 y 24 h. (F) Comparación de los efectos de las infecciones bacterianas individuales y la infección polimicrobiana en la secreción de MMP9 en el sobrenadante de células OQ01. (G) Secreción elevada de IL-8 en el sobrenadante de células OQ01 después de la infección polimicrobiana a las 6 y 24 h. (H) Comparación de los efectos de las infecciones bacterianas individuales y la infección polimicrobiana sobre la secreción de IL-8 en el sobrenadante de células OQ01. Todos los niveles de ARNm se determinaron mediante qRT-PCR. Los niveles de proteína IL-8 y MMP9 de sobrenadantes en cultivo se determinaron mediante ELISA. *, $p < 0,05$, **, $p < 0,005$, ***, $p < 0,0005$, ****, $p < 0,0001$. (Extraído de Harrandah et al., 2020)

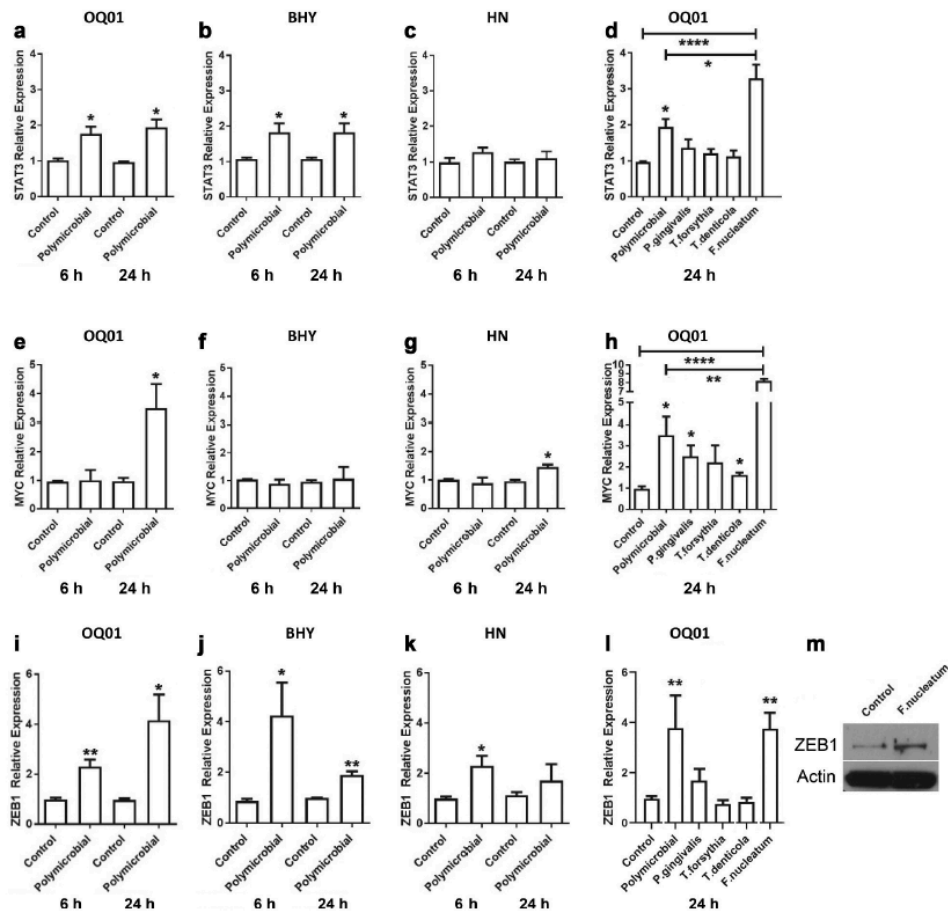


FIGURA 9. Expresión de STAT3, MYC y ZEB1 en modelo de cáncer oral ante la infección de bacterias periodontales *in vitro*.

(A-C) Aumento en la expresión ARNm de STAT3 después de la infección con cuatro bacterias periodontales combinadas (infección polimicrobiana) en líneas celulares de cáncer oral OQ01, BHY y HN a las 6 y 24 h. (D) El efecto de una sola infección bacteriana en el nivel de expresión de STAT3 en células OQ01 después de 24 h de infección. (E-G) Expresión de MYC ARNm significativamente elevada en OQ01 y HN, pero no en BHY, después de 24 h de infección polimicrobiana. (H) Comparación de los efectos de infecciones bacterianas individuales e infecciones polimicrobianas en la expresión de MYC en células OQ01 después de 24 h de infección. (I-K) Aumento de la expresión ARNm de ZEB1 después de la infección polimicrobiana en las tres líneas celulares de cáncer oral durante 6 y 24 h. (L) Aumento de la expresión de ZEB1 en células OQ01 después de una infección única con *F. nucleatum*. (M) Análisis por Western Blot de los niveles de proteína ZEB1 24 h después de la infección por *F.n* en células OQ01 infectadas y no infectadas. Todos los niveles de ARNm se determinaron mediante qRT-PCR. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$; ****, $p < 0,0001$. (Extraído de Harradah et al., 2020)

Por otro lado, un grupo de autores propone que el efecto de la bacteria en la adquisición del EMT estaría mediado por microARN(Zhang et al., 2020). Los micro-ARN (miRs) son pequeñas moléculas de ARN no codificantes que regulan la expresión génica de manera post-transcripcional. Ejercen su efecto generalmente mediante el silenciamiento o degradación de los ARNm, y están implicados en la regulación de varios procesos biológicos(Giner, 2016). En este contexto, se propone que la infección por *F.n* aumentaría la expresión de MIR4435-2HG, que se une específicamente a miR-296-5p para disminuir su nivel de expresión, debilitando la capacidad de miR-296-5p para silenciar su gen objetivo Akt2, que luego activaría la expresión de SNAI1 que contribuye a la transformación EMT en las células epiteliales orales infectadas(Zhang et al., 2020).

Igualmente, el 2021 Shao y colaboradores(Shao et al., 2021) examinó la transición mesenquimal parcial (p-EMT) mediada por *F.n* en células de carcinoma de células escamosas orales (OSCC), esto debido a que se propone que la capacidad de las células cancerosas de sufrir una transición mesenquimatosa epitelial parcial (p-EMT), en lugar de una EMT completa, indica un mayor riesgo de metástasis. Sus resultados mostraron que *F.n* aumentó la expresión de genes relacionados con p-EMT en células OSCC con fenotipo epitelial, pero no en las con fenotipo p-EMT o EMT, por lo tanto, se sugiere que la infección por esta bacteria puede convertir el fenotipo epitelial en p-EMT a través la alteración de la expresión génica en las células del carcinoma oral(Shao et al., 2021).

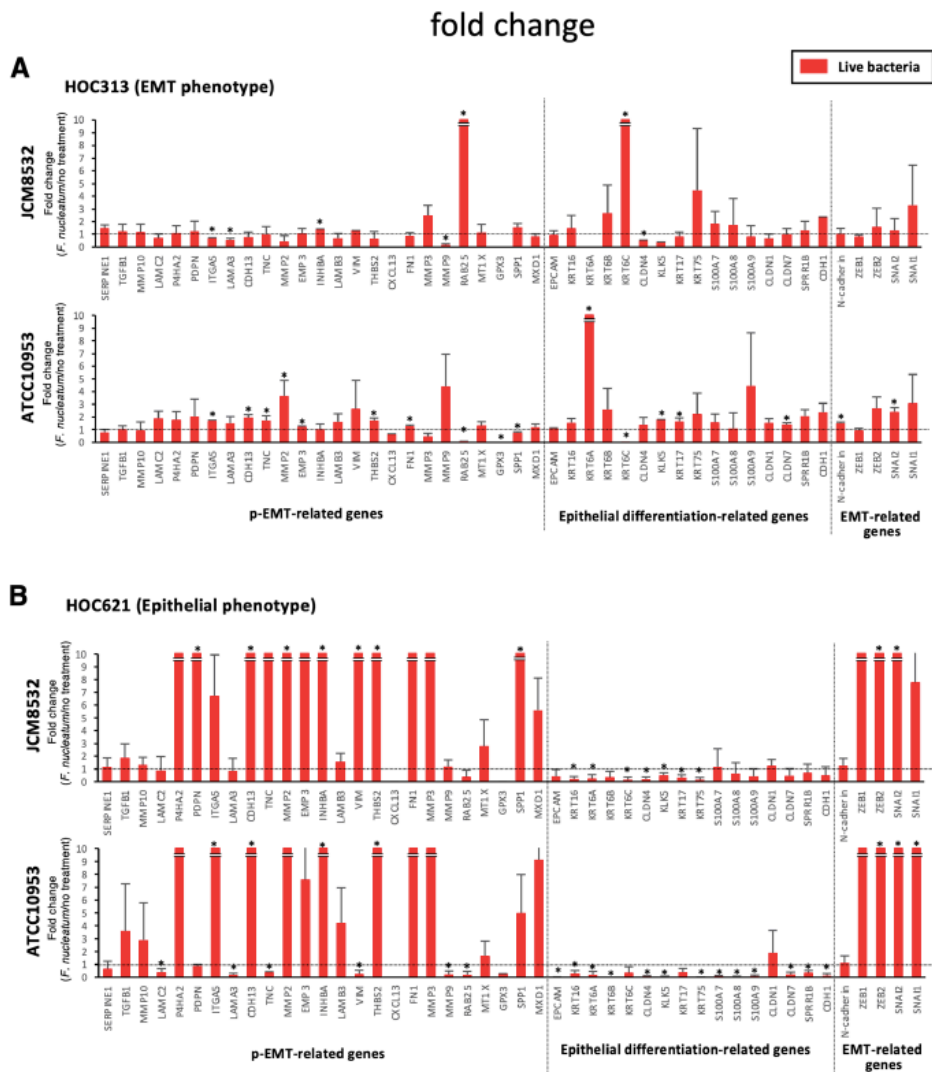


FIGURA 10. Expresión de genes relacionados con p-EMT en el fenotipo epitelial (células HOC621) y en fenotipo EMT (células HOC313) ante la infección por *F.n*.

Expresión de genes relacionados con la diferenciación epitelial, p-EMT y EMT en el fenotipo EMT, HOC313 (A) y fenotipo epitelial, HOC621 (B) La expresión génica se midió mediante RT-qPCR. (*) representa el valor P de < 0,05 en comparación con el control (sin tratamiento). *F.n* JCM8532 y ATCC10953, MOI = 10 (Extraído de Shao et al., 2021)

El efecto protumoral de *F. n* en OSCC desde el punto de vista de la evasión de la respuesta inmune, ha sido abordado por limitados estudios. Tan solo el 2021 un grupo de investigadores del Instituto Curie en Francia evaluó la asociación

entre *F.n* intratumoral y la expresión de diversos genes relacionados con la respuesta inmune. Los resultados mostraron que los tumores con cargas altas de *F.n* se asociaban a niveles bajos de ARN de macrófagos M2 (CD163), linfocitos CD4, fibroblastos (PDGFR β), TLR4, ligando OX40 (TNFSF4) y TNFRSF9, y niveles altos de TNFSF9 e IL-1 β , por lo que sugirieron que en OSCC *F.n* puede estar asociado con un microambiente tumoral "permissivo" e insensible a las señales proinflamatorias (Neuzillet et al., 2021).

Existen otras moléculas inmunosupresoras, donde el rol de la bacteria no ha sido estudiado, pero su presencia en el microambiente tumoral se ha asociado a pronóstico desfavorable clínico e histológico, peor estadio TNM e invasión ganglionar en OSCC y otros cánceres similares como el carcinoma escamoso de esófago (Zheng et al., 2020). Entre estas moléculas encontramos CD73 (Jeske et al., 2020; Ren, Yuan, Ji, & Zhang, 2016), CD39 (Duhon et al., 2018) (Zheng et al., 2020), el eje Tim3/Gal-9 (Ahmed & Shaikh, 2022; Dong et al., 2017), TIGIT/CD155 (X. Liu et al., 2021) y PD1/PDL1 (Dave, Ali, & Magalhaes, 2020; Wu et al., 2021), cuyos hallazgos se encuentran resumidos en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Moléculas Inmunosupresoras asociadas a OSCC			
Eje o Molécula	Mecanismo	Outcome en OSCC	Ref.
Tim3/Gal-9	↑ Expresión de Tim 3/Gal9. ↑ Muerte de células T citotóxicas, provocando el progreso de la enfermedad.	Peor estadio TNM, invasión linfático-vascular y pronóstico desfavorable.	(Ahmed et al., 2022)
	Supresión de la respuesta de células T CD8+. Bajo perfil de secreción de citoquinas.	Peor pronóstico y respuesta a tratamiento.	(Dong et al., 2017)
Tigit/ CD155	Células T TIGIT+CD4+ y TIGIT+CD8+ muestran un fenotipo disfuncional: ↓ Proliferación celular. ↓ Secreción de IL-2, TNF- α e IFN- γ . Células T TIGIT+CD4+ exhibieron función inhibitoria: ↑ Expresión de Foxp3. ↑ IL-10.	Peor estadio TNM, invasión ganglionar.	(Liu et al., 2020)
CD39	Células NK CD39+ intratumorales están comprometidas funcionalmente, muestran: ↓ Producción IFN- γ y granzima B. ↓ Frecuencia de Proliferación.	Mal Pronóstico.	(Zheng et al., 2020)
CD73	↓ Actividad y número de las células T intratumorales.	Mayor metástasis en los ganglios linfáticos, peor estadio T, clínico y grado de diferenciación.	(Ren et al., 2016) (Jeske et al., 2020)
PDI/PD1L	Aumento en la expresión de PDL-1 se correlaciona con: ↑ Infiltración de macrófagos asociados a tumor (TAM). ↑ Expresión de genes asociados a marcadores de EMT.	Mejora las propiedades agresivas e invasivas de los tumores en el microambiente tumoral, dificultando el pronóstico.	(Wu et al., 2021)

TABLA 2. Moléculas inmunosupresoras asociadas a OSCC.

Mecanismos que explican el efecto negativo en la progresión del OSCC, inducido por la presencia de estas moléculas inmunosupresoras (*Elaboración propia*).

1.6.-Data Preliminar

Nuestros hallazgos a partir del análisis del secretoma, obtenido de biopsias de pacientes diagnosticados con OSCC con un grado de diferenciación de leve a moderada y controles sanos reveló que las condiciones de secretoma de explantes de tejidos sanos y de cáncer oral comparten un total de 1.722 proteínas. En el caso de cáncer se identificaron 976 proteínas únicas para esta condición, así como también 933 proteínas identificadas solamente en la condición de control (secretoma explante tejido sano). Se realizó un análisis específico con el fin de identificar las proteínas bacterianas expresadas en el secretoma cáncer y control. El análisis reveló la presencia de 19 proteínas únicas en el secretoma de OSCC, de las cuales 17 eran de *Fusobacterium nucleatum*, 1 de *Streptococcus mitis* y 1 de *Agrobacterium tumefaciens*. Además, identificamos 4 proteínas únicas en el secretoma de control (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Corynebacterium coyleae*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus auricularis*) (**Tabla 3**). Por lo que se destaca la presencia casi exclusiva de *F.n* en el secretoma del OSCC, destacando la capacidad de esta bacteria de establecerse en el microambiente tumoral para ejercer un efecto aún no completamente conocido.

Condición	Bacteria	Total de Péptidos
Cáncer	<i>Fusobacterium Nucleatum</i>	537
	<i>Fusobacterium hwasookii ChDC</i>	99
	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	64
Control	<i>Aggregatibacter Actinomyces comitans</i>	64
	<i>Fusobacterium Nucleatum</i>	38
	<i>Streptococcus mitis</i>	30

TABLA 3. Péptidos Bacterianos y bacteria correspondiente identificados en el secretoma de cáncer OSCC y control.

Paralelamente el análisis de las proteínas totales presentes en el secretoma del OSCC reveló la expresión de marcadores asociados a la transformación de un fenotipo de epitelio de transición mesenquimal. Esto se evidencia a través de disminución significativa de marcadores epiteliales clásicos como E-cadherina, T-cadherina, Citoqueratina 3 y colágeno tipo alfa 1 (**Figura 11**) y el aumento significativo de marcadores mesenquimales en las metaloproteinasas MMP-9, MMP-10 y MMP-14, Fibronectina, Integrinas IGT β 4, IGT β 1 y IGTa6 (**Figura 12**) en cáncer comparado con la condición control. Además, en el secretoma de pacientes OSCC, se observó un aumento en defensinas y el receptor del factor de crecimiento epidermal (**Figura 13**), proteínas asociadas por la literatura (Hoppe et al., 2016), a la proliferación y crecimiento tumoral de OSCC.

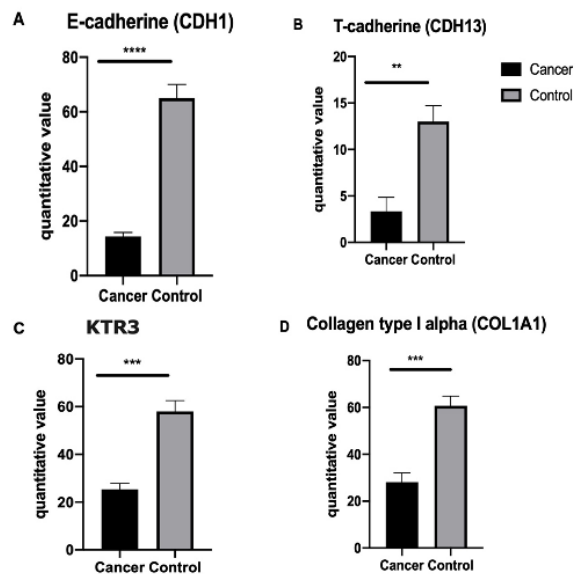


FIGURA 11. Expresión de marcadores epiteliales asociados a EMT en secretoma cáncer y control.

Disminución de E-cadherina (A), T-cadherina (B), Citoqueratina 13 (C) y Colágeno alfa-1 (D) en secretoma cáncer comparado al secretoma control. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$; ****, $p < 0,0001$ (Data propia).

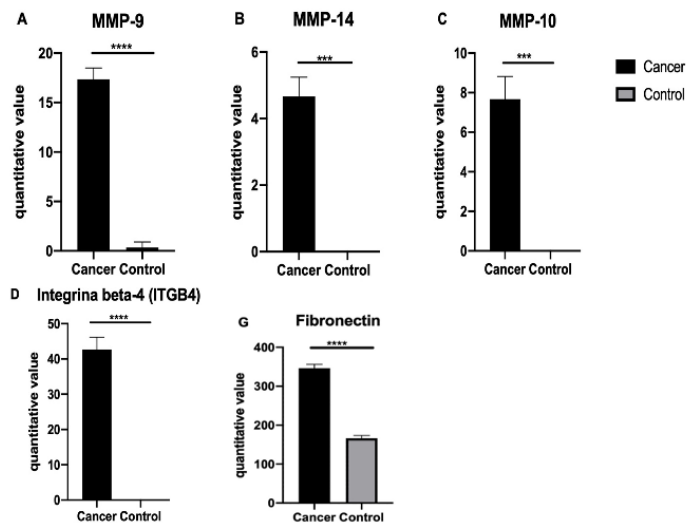


FIGURA 12. Expresión de marcadores mesenquimales asociado a EMT en secretoma cáncer y control.

Aumento en la expresión de MMP-9 (A), MMP-14(B), MMP-10(C), Integrina beta-4(D) y Fibronectina (G) en secretoma cáncer comparado con el control. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$; ****, $p < 0,0001$ (Data propia).

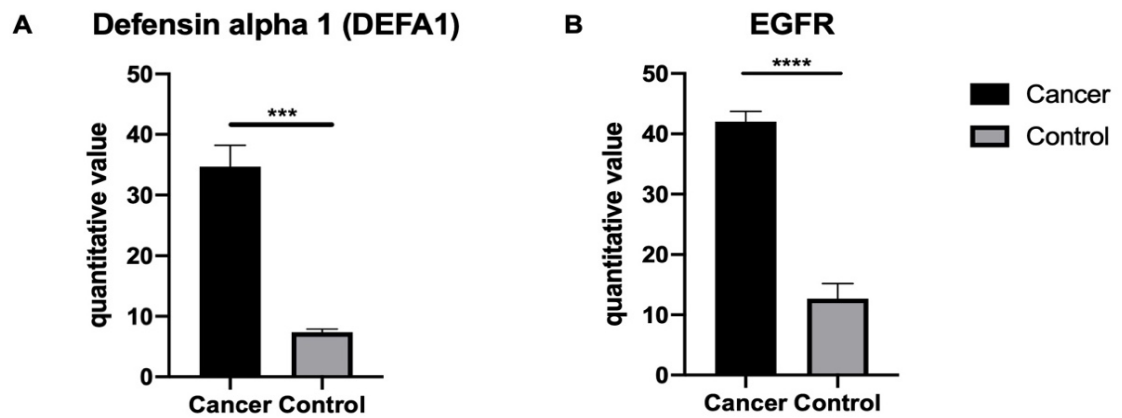


FIGURA 13. Expresión de proteínas asociadas con proliferación tumoral en OSCC, identificadas en el secretoma de pacientes con cáncer oral y controles sanos.

Aumento de defensina alpha 1 (**A**) y receptor del factor de crecimiento epidermal (**B**) en pacientes con cáncer versus pacientes control. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$; ****, $p < 0,0001$ (Data propia).

2. PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

La periodontitis constituye un problema de salud pública debido al alto porcentaje de personas que se ve afectado por esta patología. Tan sólo en Chile, según el último análisis de situación de Salud bucal, un 95% de la población mayor de 35 años tiene algún grado de Periodontitis y este porcentaje aumenta a 97% en los mayores de 65 años. Por su parte el cáncer oral ha aumentado notoriamente el último tiempo con incidencia de más de 800 casos nuevos y una mortalidad de más de 400 personas en 2020. Al ser ambas patologías altamente prevalentes y que comparten factores de riesgo, se ha detectado y propuesto una asociación entre ellas.

La asociación entre ambas enfermedades podría explicarse por el actuar de bacterias periodontales claves, que jugarían un rol protagónico no sólo en el establecimiento de la enfermedad periodontal, sino que también en la promoción de mecanismos protumorales que apoyan la progresión y transformación maligna de células cancerígenas en cáncer oral.

Una de las bacterias más caracterizadas en la literatura por presentar mecanismos protumorales es *Fusobacterium nucleatum*. Si bien esta bacteria, es conocida como una bacteria patógena periodontal, recientemente se ha asociado como una bacteria oncogénica. Sin embargo aún no existe aún pleno entendimiento de los mecanismos protumorales e inmunosupresores por los

cuales *F.n* ejerce su efecto en las células del OSCC para promover la progresión del cáncer.

Pregunta de Investigación

¿Cuáles son los mecanismos protumorales e inmunosupresores de *F.n* sobre las células del OSCC?

3. HIPÓTESIS

La bacteria Periodontal *Fusobacterium nucleatum* promueve el crecimiento tumoral, transformación hacia un epitelio de transición mesenquimal y la expresión de moléculas inmunosupresoras en las células tumorales escamosas orales.

4. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los mecanismos protumorales inducidos por *Fusobacterium nucleatum* sobre el crecimiento, transición epitelio mesenquimal y expresión de marcadores inmunosupresores en línea celular OSCC.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar el efecto *in vitro* de *Fusobacterium nucleatum* sobre crecimiento tumoral de línea de celular de carcinoma oral de células escamosas.
2. Evaluar la presencia de los marcadores asociados a un ETM en línea celular de carcinoma oral en presencia de *Fusobacterium nucleatum*.
3. Medir la expresión de moléculas inmunosupresoras en línea celular de carcinoma oral de células escamosas inducidas por la presencia de *Fusobacterium nucleatum*.

5.MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- Líneas celulares

Se utilizó la línea celular de carcinoma oral de células escamosas, HSC3, correspondiente a cáncer de lengua, metastásico, de paciente masculino de 63 años, obtenida desde el laboratorio del Dr. Wilfredo González de la Universidad de los Andes, Santiago, Chile. Esta línea celular se mantuvo en cultivo en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, penicilina y estreptomina (1:100), incubada a (37°C, 5% CO₂).

Como línea control se utilizaron células epiteliales normales (OKF6/TERT2), correspondientes a piso de boca, obtenidas desde la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción, Concepción, Chile. Estas células se mantuvieron en medio de keratinocitos libre de suero KFSM (GIBCO,Invitrogen) suplementado con Bovine pituitary extract (25mg/500ml), factor de crecimiento epidermal EGF (2.5ug/500ml), solución de cloruro de calcio 0,3M, penicilina y estreptomina(1:100) incubadas a 37 °C, 5 % de CO₂.

Ambas líneas celulares previo a su uso, se trataron de manera profiláctica con removedor de micoplasma (Mycoplasma removal agent), utilizando 10µl/ml de medio de cultivo, durante 24 horas.

5.2.- Cepa bacteriana

Se utilizó la bacteria periodontal *Fusobacterium nucleatum* (*F.n*) cepa 25586, obtenida desde la ATCC, la cual fue reconstituida desde el estado liofilizado, mediante caldo anaerobio (Anaerobe Basal Broth, CM0957, OXOID) y placas de Agar Anaerobio (Anaerobe Basal Agar, CM0972, OXOID) suplementado con 5% de sangre de cordero, incubada en cámara de anaerobiosis a 37 °C, 5 % de CO₂. La confirmación de su identificación se realizó por PCR en tiempo real utilizando primers específicos para la bacteria (F' GAGTTACAACCTTCCTATATTTGACCGA R' CAAACATTTTGATAATTCATCTGCAT).

5.3.- Ensayo de Infección

Para los ensayos de infección se utilizó la bacteria *F.n* en su fase de crecimiento exponencial, correspondiente a 36 horas de crecimiento y una OD de 0,35, según el análisis de nuestra curva de crecimiento. Las células cancerígenas y normales se colocaron en una proporción de 1×10^6 células/ml en tubos de citometría con sus respectivos medios DMEM y KSFM sin suplementación antibiótica. Estas células se enfrentaron a la bacteria *F.n* a una multiplicidad de infección (MOI) de 100 (435,5 μ l), luego se sometieron a centrifugación (1500rpm por 20 minutos) para asegurar el contacto entre la capa celular y la bacteria y se incubaron durante 90 min a 37 °C en CO₂ al 5 % para permitir la internalización de la bacteria. Como control se utilizaron células cancerígenas / normales en medio solo, sometidas a las mismas condiciones. Después de los 90 minutos, tanto células infectadas como no infectadas fueron cambiadas a medio DMEM o KSFM suplementado con Metronidazol (200ug/ml) y Gentamicina 300 ug/ml), para la eliminación de bacterias extracelulares.

5.4.- Visualización ingreso bacteria a la célula cancerígena

Para visualizar el proceso de infección *in vitro*, la bacteria *F.n* fue marcada previo al ensayo de infección de las células cancerígenas con el *Kit de proliferación de células CFSE CellTrace™, Invitrogen*. La molécula CFSE atraviesa con facilidad las membranas celulares, formando en el interior celular complejos covalentes con grupos amino de las proteínas u otras moléculas de la bacteria, que permiten la fluorescencia. Para esto la bacteria (MOI 100) y CFSE (5uM) se incubaron por separado durante 5 minutos, a 37°C en baño termo regulado protegidos de la luz, luego se juntaron para realizar la marcación, incubando 15 minutos a 37°C en baño termoregulado, nuevamente protegidos de luz. Para terminar la reacción se agregó 5ml de medio DMEM en frío y se centrifugó a 5000rpm durante 10 minutos.

Una vez realizada la infección, el ingreso de la bacteria a las células cancerígenas se confirmó mediante microscopio confocal *Spectra Leica Sp8* con módulo Super resolución por Lighting. La visualización de las células cancerígenas infectadas se logró cultivando una proporción de 10.000 células en 100 µl de medio DMEM por pocillo en una placa Cell View de fondo ultra transparente (*Greiner View one*), durante 6, 24 y 48 horas. El marcaje se realizó utilizando, HOECHST (0.1ug/ml) para el núcleo, Membran cellmask Deep red (0.3X) para la membrana celular, Mitotracker RedCMXRos (25nM) y TMRM (20nM) para mitocondrias y Ioduro de propideo (1X) para diferenciar células muertas. En cada uno de los tiempos de infección el marcaje se realizó por 15 minutos protegiendo

la placa de la luz a 37°C y luego se lavó con PBS, para agregar finalmente medio fresco antes de llevar al microscopio. Las fotos fueron adquiridas en condiciones óptimas de cultivo (37°C y 5% CO₂).

5.5.- Formación esferoides

El efecto de la bacteria *F.n* sobre el crecimiento tumoral de las células cancerígenas y normales, se estudió utilizando un modelo 3D denominado “esferoide o esfera tumoral”. Una tumoresfera es una formación esférica sólida desarrollada a partir de la proliferación y agregado de células cancerosas (Johnson, Chen, & Lo, 2013). El tamaño, que puede variar entre 50 micrómetros a 250 micrómetros, y se pueden usar para caracterizar la población de células madre/progenitoras del cáncer dentro de una población de células cancerosas cultivadas *in vitro* y dentro de tumores *in vivo* (J. C. Liu, Deng, Lehal, Kim, & Zacksenhaus, 2007). Se decidió utilizar el modelo de esferoide porque entrega información más precisa y fácil de analizar de la organización jerárquica del tumor.

Para la obtención de las tumoroesferas, posterior al ensayo de infección se colocaron 2500 células cancerígenas y normales infectadas/no infectadas en 100ul de medio DMEM/KSFM por pocillo en una placa ultra low cluster polystyrene de 96 pocillos, que evita la adherencia de las células en el fondo del pocillo. Esta placa se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos y luego se incubó durante 3 días.

La formación del esferoide se puede comprobar 3 días posteriores a la centrifugación, por lo tanto se realizaron mediciones microscópicas de 4 pocillos por condición, tanto al día 3, 6 y 10 del ensayo, utilizando un microscopio invertido(*Motic AE31*) asociado a cámara (software ProgRes®MF^{cool}) e Image J.

5.6.- Análisis expresión marcadores asociados a ETM por qPCR

Los marcadores asociados a ETM escogidos para evaluar la adquisición del ETM tanto en células cancerígenas como normales posterior a la infección con *F. n*, fueron MMP-9 y E-cadherina. MMP-9 es una de las proteasas clave para la degradación de la matriz extracelular y la membrana basal y juega un papel crucial en la aparición y desarrollo de tumores malignos, invasión y metástasis, el aumento en su expresión se asocia con la aparición de un ETM(Li et al., 2020). Por su parte la E-cadherina actúa como el principal determinante del fenotipo epitelial al influir en la polaridad celular y la integridad del tejido. La pérdida de E-cadherina se describe como un evento clave de la EMT, la disminución en su expresión, conduce a la pérdida de la adhesión célula a célula, permitiendo la separación de células individuales de la masa tumoral primaria y, por lo tanto, representa una característica importante en la progresión del carcinoma(Sommariva & Gagliano, 2020). Además, es importante mencionar, que, ambos marcadores fueron escogidos porque tanto su aumento como disminución se evidenció en el análisis del secretoma de pacientes OSCC y controles (**Data preliminar**).

El análisis de la expresión de estos marcadores, se realizó incubando una proporción de 3×10^5 células/ml durante 6 horas posteriores a la infección, en placas de 6 pocillos. Posteriormente, se recogió el lisado celular utilizando 600 μ l de reactivo TRIZOL (Invitrogen). La extracción del ARNm se realizó a través de columnas, utilizando el *Kit Direct-zol™ RNA Microprep*, (ZYMO RESEARCH). La expresión del ARNm de cada marcador, se midió a través de RT-qPCR de un solo paso, utilizando protocolo RT Promega; sonda *GoScript™ RT Mix for 1 - Steop RT-qPCR* (Promega), sonda *Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix* y el equipo *Applied Biosystem 7500 FAST Real Time PCR System* con protocolo de amplificación: 45°C por 15 minutos, 95°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 10 segundos y alineamiento/ extensión a 60°C por un minuto. Se utilizaron primers específicos diseñados para MMP-9 (F' GCCACTACTGTGCCTTTGAGTC; R' CCCTCAGAGAATCGCCAGTACT) y E-cadherine (F' GTCTGTCATGGAAGGTGCT; R' TACGACGTTAGCCTCGTTC) adquiridos desde IDT (*Integrated DNA Technologies*). Los cambios en los niveles de expresión se calcularon después de la normalización con el housekeeping RPLPO, utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Cq}$. Cada muestra se analizó por triplicado.

5.7.- Proteome Profile Array en células cancerígenas infectadas

Se realizó un análisis de la expresión de proteínas relacionadas a cáncer, que podrían estar inducidas por la bacteria *F.n* en las células cancerígenas, a través del “*Proteome profile Array™Human XL Oncology Array Kit*”. Este kit es una herramienta rápida, sensible y económica para detectar diferencias en proteínas entre condiciones. Permite determinar simultáneamente los niveles de expresión relativa de 84 proteínas humanas relacionadas al cáncer. Esta diseñado de forma que los anticuerpos de captura y control se encuentran por duplicado en membranas de nitrocelulosa, donde se incuba la muestra toda la noche, posteriormente la membrana se lava para eliminar el material no unido y luego se incuba con un cóctel de anticuerpos de detección biotinilados. Finalmente, se aplican estreptavidina-HRP y reactivos de detección quimioluminiscentes, para producir una señal en cada punto de captura correspondiente a la cantidad de proteína unida. El kit permite el uso de sobrenadante de cultivo, lisado celular, suero, plasma, leche humana, orina, saliva o lisado de tejido, en nuestro caso, al contar con 4 membranas de nitrocelulosa por kit, se decidió usar sobrenadante de cultivo y lisado celular de células cancerígenas infectadas/ no infectadas.

Para la obtención del sobrenadante se retiró directamente de los pocillos posterior a 24 horas de infección y se mantuvo a -20°C, hasta realizar el ensayo. El lisado celular se obtuvo utilizando buffer de lisis, compuesto de 2450 µl RIPA, 25µl Inhibidor de proteasas y 25 µl EDTA. A cada pocillo se aplicó 500µl de buffer de lisis, posterior a las 24 horas de infección. Cada muestra se pasó a tubos

ependorf y se centrifugó a 12.000 rpm por 5 minutos a 4°C, para eliminar debris celular y luego se mantuvo a -20°C.

La cuantificación de proteínas totales, tanto del lisado como sobrenadante se realizó por método BIORAD. Siguiendo las recomendaciones del fabricante, para este ensayo se utilizaron 500µl de sobrenadante tanto de células cancerígenas infectadas y no infectadas y 200ug de lisado celular de células cancerígenas infectadas (157 µl) y no infectadas (160 µl), en ambos casos se reconstituyó con buffer de lisis hasta llegar a un volumen final de 500µl.

Los datos se obtuvieron exponiendo las membranas de nitrocelulosa al revelador de membrana (*Li-Cor*), hasta obtener una imagen de alta calidad. Se crearon perfiles de densidad media de píxeles utilizando un escáner de modo de transmisión y un software de análisis de imágenes (IMAGE J). Los cambios en los niveles de expresión se calcularon después de la normalización con los genes de referencia indicados por el kit.

5.8.- Análisis de los marcadores asociados a Inmunosupresión

Los marcadores elegidos para analizar el cambio de fenotipo en las células cancerígenas/ normales inducido por la bacteria, fueron CD39, CD73, PDL1, GAL-9 y CD155, en base a lo reportado por la literatura en cuanto a su expresión y la de sus ligandos en las células del OSCC (**Tabla2**).

Para el análisis de estos marcadores, se infectaron una proporción de 1×10^6 células/ml de células cancerígenas/normales durante 24 horas. Tanto células infectadas cancerígenas/ normales infectadas y no infectadas se recuperaron luego de la infección, utilizando 600 μ l de tripsina 1X (*Tripsina ETM Express*), durante 8 minutos. Posteriormente, cada muestra se depositó en tubos eppendorf con 1ml de PBS, para centrifugar a 1500rpm por 5 minutos. Luego de la centrifugación se realizó el conteo de las células por condición, mediante tinción azul de tripán y cámara de Neubauer, para dejar una proporción de 200.000 a 500.000 células por marcador en tubos de citometría. Para realizar el marcaje se utilizaron anticuerpos para CD155(0,25 ug/mL), Galg-9(100ug/mL), PDL-1(100ug/mL), CD73(200ug/mL) y CD39(100ug/mL). Cada grupo de células, cancerígenas, normales, infectadas y no infectadas, se marcó por separado con un master mix (100 μ l PBS y 1 μ l de anticuerpo) de cada marcador seleccionado, durante 30 minutos a 4°C. Una vez transcurrido el tiempo se lavó con 1ml de PBS y se centrifugó(1500rpm) durante 5 minutos, dejando un volumen final de 200 μ l. Cada tubo de citometría asociado a un marcador/condición fue analizado en el

citómetro de flujo. Los datos obtenidos, se visualizaron y analizaron con el software Flowjo 10.8.2.

Marcador	Fluoróforo
CD39	FITC
CD73	Ax780
Gal-9	APC
CD155	Pac Blue
PDL1	PE/Cy7

TABLA 4. Marcadores asociados a Inmunosupresión en OSCC y sus correspondientes fluoróforos utilizados en el ensayo de fenotipo.

5.9.- Análisis Estadístico

Los datos obtenidos en cada uno de los experimentos fueron tabulados en el programa Excel, luego con el programa *GraphPad Prism*, se realizó el análisis de comparaciones gráficas de entre 2 variables mediante T-test con datos pareados y no pareados, o en el caso de más de 2 variables mediante Test Anova y Sidaks multiple comparisons test. La significancia fue considerada cuando el valor P fue menor a 0,05.

6. RESULTADOS

6.1.- Visualización ingreso bacteria a la célula cancerígena

En cada uno de los tiempos en los que se desarrolló la infección de las células del OSCC (6, 24 y 48 horas), se comprobó el ingreso de *Fusobacterium nucleatum* a las células mediante microscopía confocal de super resolución. Desde las 6 horas de infección, que fue el primer tiempo analizado, pudimos observar como *F.n* ingresa a la célula cancerígenas y se establece en las cercanías del núcleo. En este tiempo se utilizó el yoduro de propideo para identificar células o bacterias muertas y comprobamos que la bacteria al ingresar a las células se mantiene viva y no ocasiona la muerte de la célula HSC3. Por otro lado, en relación a cambios morfológicos observados en las células del OSCC, ante el ingreso de la bacteria, pudimos observar que a las 6 horas no se identifican grandes cambios, las células mantienen su configuración de monocapa y mantienen sus uniones intercelulares (**Figura 14-A**). Igualmente, a las 24 horas, observamos el establecimiento de la bacteria en el microambiente tumoral, ya sea dentro o rodeando la célula cancerígena. En esta ocasión, se incluyó MITOTracker RedCMX Ros como marcaje de mitocondrias, para fines estéticos y se omitió la marcación con yoduro de propideo. Durante este tiempo si se observaron mayores cambios morfológicos en las células del OSCC asociadas al ingreso de la bacteria. A diferencia a lo observado a las 6 horas, las

células empiezan a perder su configuración normal de célula epitelial, pasando a una forma más redondeada, asociado a una pérdida de la configuración clásica de monocapa y de las uniones entre células (**Figura 14-B**). Finalmente a las 48 horas, observamos que se mantiene la presencia de *F.n* en las células del HSC3, ya sea en el interior o rodeando las células. Esta vez se utilizó como marcaje de mitocondrias TMRM (indicador de potencial de membrana mitocondrial) y se evidenciaron mayores cambios morfológico, asociados a una alteración de la arquitectura de monocapa y de las uniones intracelulares. Además, identificamos que las células pierden su estructura alargada, pasando a una configuración más redonda (**Figura 14-C**).

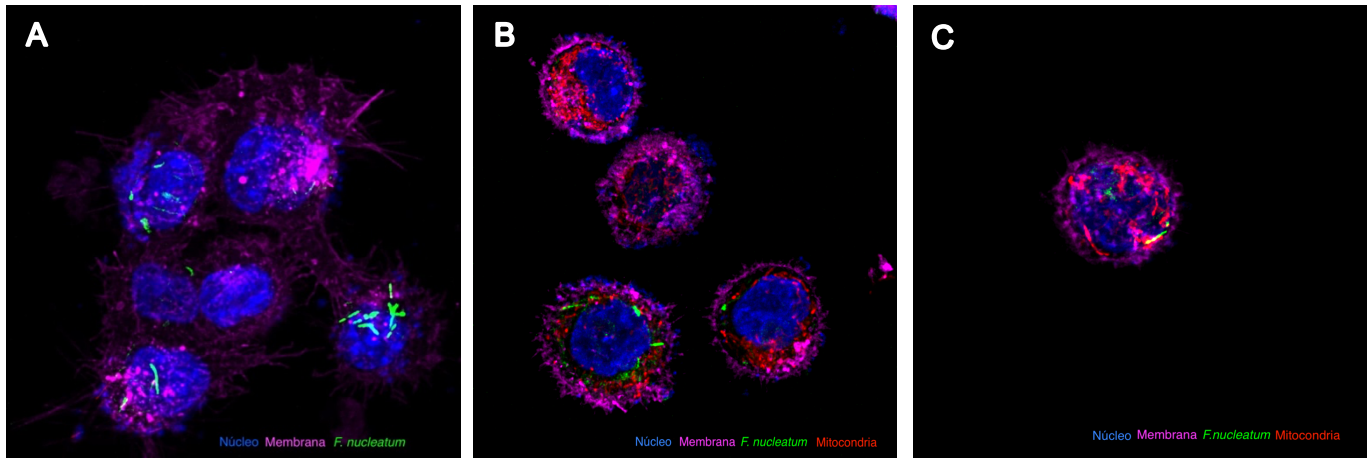


FIGURA 14. Ingreso y establecimiento de *F.n* dentro de la células del OSCC.

Imagen obtenida a las 6 horas (A), 24 (B) y 48 (C) de la infección de las células HSC3 con la bacteria *F.n*. Se utilizó (A-C) HOECHST (tinción azul) para el núcleo, Membran cell mask deep red (tinción magenta) para la membrana, CFSE (tinción verde) para la bacteria *F.n*, (A) Ioduro de propideo (tinción roja) para células y bacterias muertas, (B) Mitotracker RedCMXRos (tinción roja) para mitocondrias y (C) TMRM (tinción roja) como indicador de potencial de membrana mitocondrial. Imágenes se obtuvieron con microscopio confocal Espectra Leica Sp8 con módulo superresolución por lighting, a 37°C y 5%CO₂. Objetivo 63x de inmersión en aceite 1.4 de apertura numérica del lente.

Objetivo 1

Analizar el efecto *in vitro* de *Fusobacterium nucleatum* sobre crecimiento tumoral de línea de celular de carcinoma oral de células escamosas.

6.2.- Análisis y medición de esferoides de células cancerígenas/ normales infectadas y no infectadas.

El efecto de la bacteria *F. n* sobre las células cancerígenas se evaluó utilizando el modelo de esferoide o esfera tumoral. La confirmación de la formación del esferoide, se comprobó visualmente 3 días posteriores a la infección. La observación microscópica de los esferoides reveló que aquellos formados a partir de células infectadas, eran mayores en tamaño y existían mayores agrupaciones celulares o posibles nuevas esferas tumorales, que en aquellos formados a partir de células no infectadas, en todos los días evaluados (**Figura 15**). Al realizar las mediciones de los esferoides (**Tabla 5**), en cada uno de los días analizados, evidenciamos que aquellos esferoides formados a partir de células infectadas eran significativamente ($p < 0,05$) mayores en área que aquellos formados a partir de células no infectadas (**Figura 16**). Esta tendencia se manifiesta desde el día 3, es decir el primer día de formación del esferoide, y va en aumento hasta el día 10 posterior a la infección (**Figura 17**).

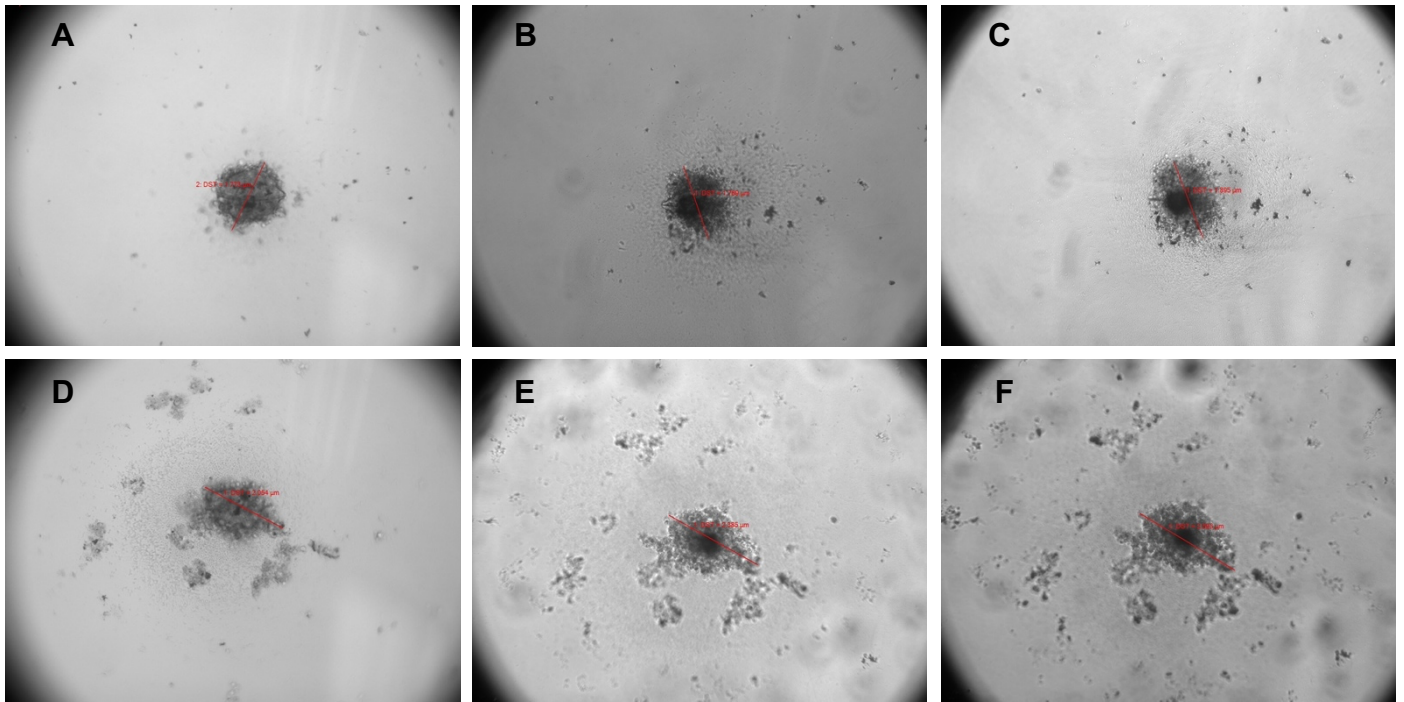


FIGURA 15. Fotografías esferoides formados a partir de células HSC3 infectadas y no infectadas con *F.n.*

(**A-C**) Fotografías de esferoides formados a partir de células HSC3 no infectadas, (**A**) al día 3 DST=1.773 μ m, (**B**) día 6 DST= 1.789 μ m y (**C**) día 10 DST= 1.895 μ m. (**D-F**) Fotografías de esferoides formados a partir de células HSC3 infectadas (**D**) al día 3 DST= 2.054 μ m, (**E**) día 6 DST= 2.385 μ m y (**F**) día 10 DST= 2.593 μ m. Imágenes fueron obtenidas desde un microscopio invertido asociado (Motic AE31) a cámara en aumento 10x.

	Día 3	Día 6	Día 10
HSC3 <i>F.n</i> +	3,425 μm	5,334 μm	5,658 μm
	3,31 μm	4,236 μm	5,445 μm
	3,277 μm	4,124 μm	4,338 μm
	2,667 μm	3,837 μm	4,134 μm
HSC3 <i>F.n</i> -	2,352 μm	3,333 μm	3,264 μm
	2,229 μm	2,447 μm	3,177 μm
	2,15 μm	2,431 μm	3,058 μm
	2,041 μm	2,094 μm	2,475 μm

TABLA 5. Área de esferoides formados a partir de células HSC3 infectadas y no infectadas.

Mediciones realizadas a los esferoides de células infectadas y no infectadas con *F.n* al día 3, 6 y 10 post infección, a través del programa IMAGE J.

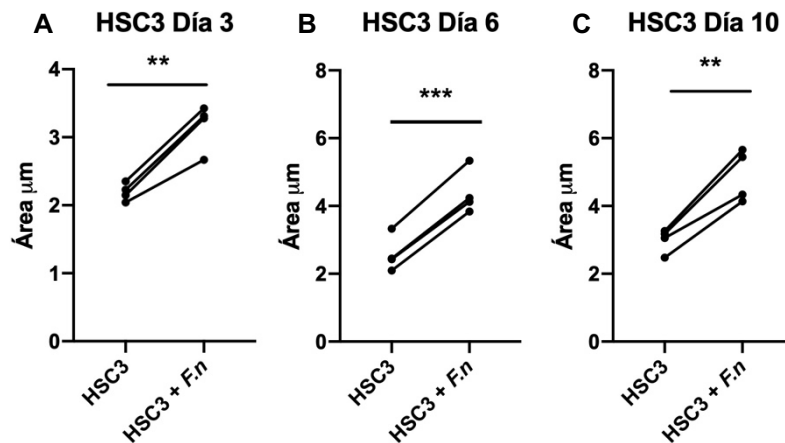


FIGURA 16. Comparación del área esferoides formados a partir de células HSC3 infectadas y no infectadas *F.n*.

(A-C) Fotografías de esferoides formados a partir de células HSC3 no infectadas, (A) al día 3 DST=1.773 μm , (B) día 6 DST= 1.789 μm y (C) día 10 DST= 1.895 μm . (D-F) Fotografías de esferoides formados a partir de células HSC3 infectadas (D) al día 3 DST= 2.054 μm , (E) día 6 DST= 2.385 μm y (F) día 10 DST= 2.593 μm . Fotografías fueron obtenidas desde un microscopio invertido asociado (Motic AE31) a cámara en aumento 10x.

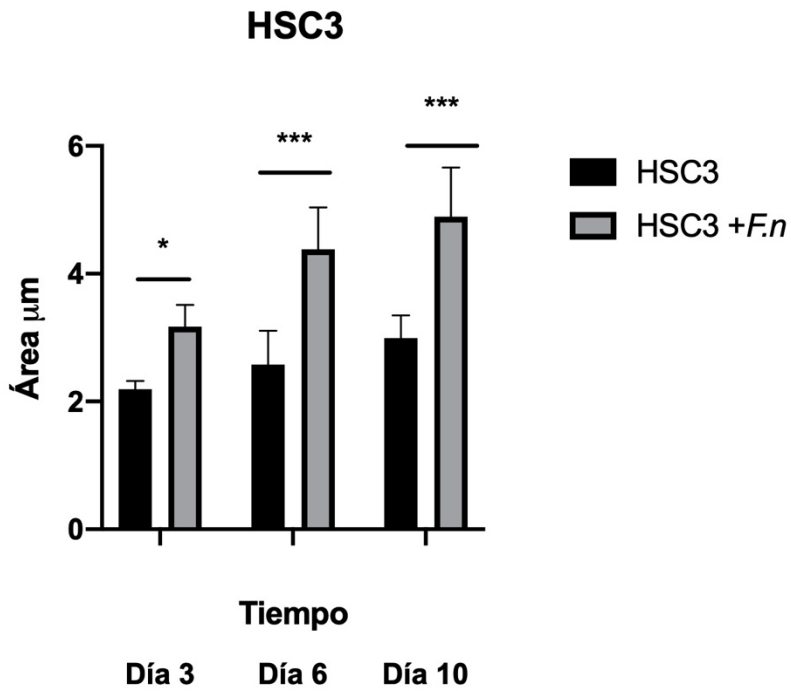


FIGURA 17. Comparación estadística área esferoides de células HSC3 infectadas y no infectadas entre día 3-10 post infección.

Comparación a través de test ANOVA de las áreas de los esferoides formados a partir de células infectadas y no infectadas con *F.n* durante el día 3, 6 y 10 postinfección. (Test ANOVA, Valor p: * <0.05 ; ** <0.01 ; **** $<0,0001$)

En el caso de las células epiteliales normales (OKF6) se confirmó visualmente la formación de los esferoides al día 6 posterior a la infección y esta estructura continuó modelando y compactando su forma hasta el día 10. La observación microscópica de los esferoides reveló que aquellos formados a partir de células infectadas, eran visiblemente mayores en tamaño, que aquellos formados a partir de células no infectadas en todos los 2 días evaluados (**Figura 18**). Al realizar las mediciones de los esferoides (**Tabla 6**), evidenciamos que al día 6 post infección, los esferoides de células normales infectadas, eran significativamente mayores ($p < 0,05$) que los formados a partir de células no infectadas. En el día 10 post infección, no se observó una diferencia significativa entre el área de los esferoides de células infectadas y no infectadas, sin embargo se mantiene la tendencia que aquellos procedentes de células normales infectadas, son mayores en área que los procedentes de células no infectadas (**Figura 19-20**).

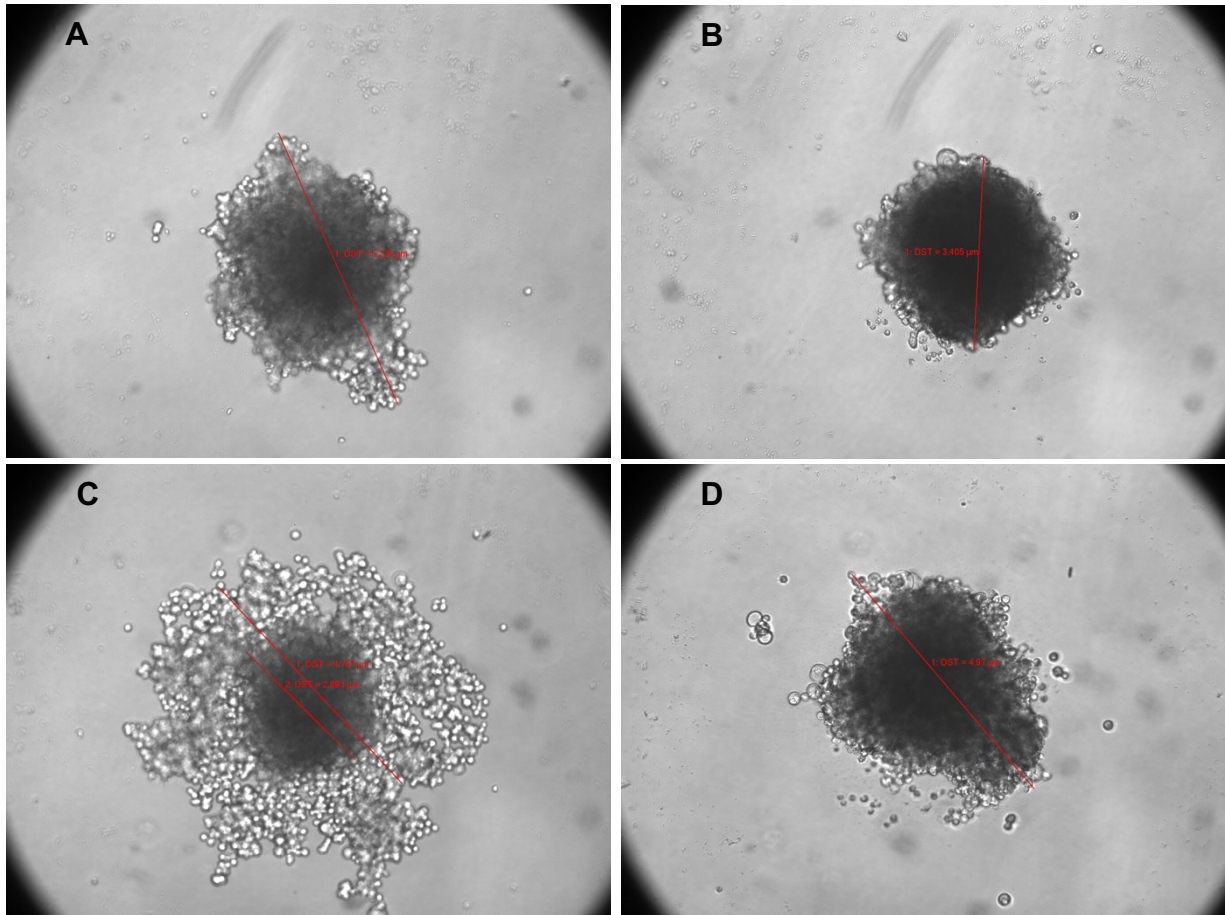


FIGURA 18. Fotografías esferoides formados a partir de células normales OKF6 infectadas y no infectadas *F.n.*

(**A-B**) Fotografías de esferoides formados a partir de células no infectadas, (**A**) al día 6 DST=5.235 μ m y (**B**) día 10 DST= 3.405 μ m. (**C-D**) Fotografías de esferoides formados a partir de células OKF6 infectadas (**C**) al día 6 DST= 4.757 μ m y (**D**) día 10 DST= 4.95 μ m. Imágenes fueron obtenidas desde un microscopio invertido asociado (Motic AE31) a cámara en aumento 10x.

	Día 6	Día 10
OKF6 <i>F.n</i> +	25,998 μm	13,57 μm
	28,274 μm	34,2 μm
	21,889 μm	8,90 μm
OKF6 <i>F.n</i> -	12,323 μm	9,789 μm
	12,824 μm	7,68 μm
	14,592 μm	11,45 μm

TABLA 6. Área de esferoides formados a partir de células OKF6 infectadas y no infectadas.

Mediciones realizadas a los esferoides de células normales infectadas y no infectadas con *F.n* al día 6 y 10 post infección, a través del programa IMAGEJ.

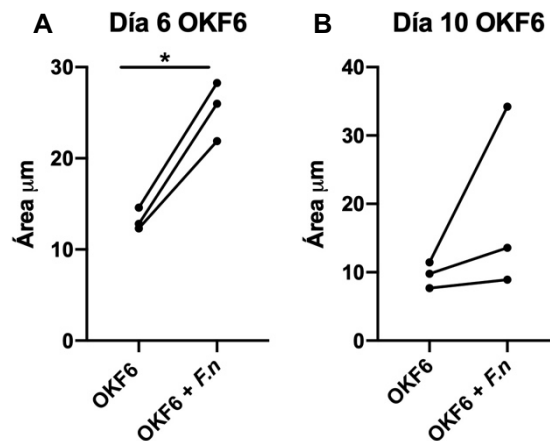


FIGURA 19. Comparación del área de esferoides de células epiteliales normales OKF6 infectadas y no infectadas.

Comparación estadística mediante T test con datos pareados entre las áreas de los esferoides obtenidos a partir de células OKF6 infectadas con *F.n* y no infectadas, al día 6(A) y al día 10(B) post infección. (T test, Valor p: * <0.05 ; ** <0.01 ; *** $<0,001$).

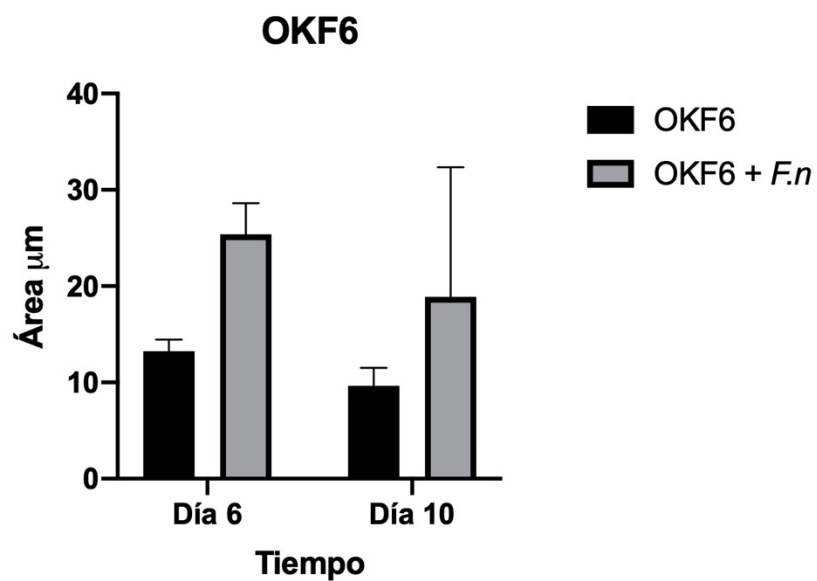


FIGURA 20. Comparación estadística área esferoides de células OKF6 infectadas y no infectadas entre día 6 y 10 post infección

Comparación a través de test ANOVA de las áreas de los esferoides formados a partir de células infectadas y no infectadas con *F.n* durante el día 6 y 10 postinfección. (Test ANOVA, Valor p: * <0.05 ; ** <0.01 ; **** $<0,0001$)

Objetivo 2

Evaluar la presencia de los marcadores asociados a un ETM en línea celular de carcinoma oral en presencia de *Fusobacterium nucleatum*.

6.3.- Análisis de la expresión de marcadores ETM en células cancerígenas/ normales infectadas y no infectadas por qPCR.

La expresión de los marcadores asociados en ETM, se evaluó mediante RT-qPCR. Los marcadores elegidos fueron MMP-9 y E-cadherina, en base a lo reportado en la literatura y lo encontrado en el secretoma de pacientes con OSCC. Con respecto a las células cancerígenas, los resultados revelaron que existe un aumento significativo a las 6 horas ($p < 0,05$) de MMP-9 ARNm en aquellas células que fueron infectadas con *F.n* en comparación a aquellas células no infectadas (**Figura 21-A**).

Por otra parte, en cuanto a E-cadherina, se encontró una disminución significativa ($p < 0,05$) de este marcador en las células cancerígenas infectadas con *F.n* posterior a las 6 horas (**Figura 21-B**).

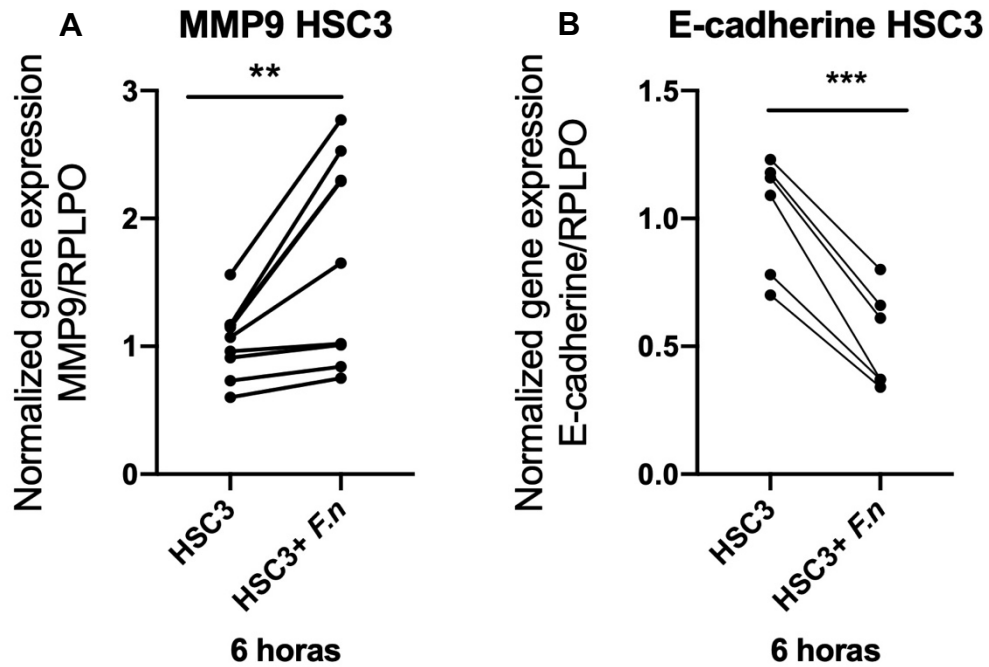


FIGURA 21. Expresión de marcadores asociados a ETM en células HSC3 ante la infección con *F.n*

Comparación estadística mediante T test de datos pareados, de la expresión relativa de MMP-9 (ARNm) y E-cadherine (ARNm) en células HSC3 infectadas y no infectadas con *F.n* a las 6 horas (**A y B**). Cambios en la expresión de los marcadores en las células cancerígenas se calcularon después de la normalización con el housekeeping RPLPO, utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Cq}$. Cada muestra se analizó por triplicado. (T test, Valor p: * <0.05 ; ** <0.01 ; *** $<0,001$).

Igualmente, se evaluó la expresión de los marcadores MMP-9 y E-cadherina, asociados a ETM, en células epiteliales normales (OKF6) en respuesta a la infección con *F.n.* Los resultados revelaron un aumento significativo ($p < 0,05$) de MMP-9 (ARNm) en las células OKF6 infectadas posterior a las 6 horas (**Figura 22-A**).

En relación a la expresión de E-cadherina en las células OKF6 ante la infección con *F.n.*, no se evidenciaron cambios significativos en la expresión de este marcador (**Figura 22-B**).

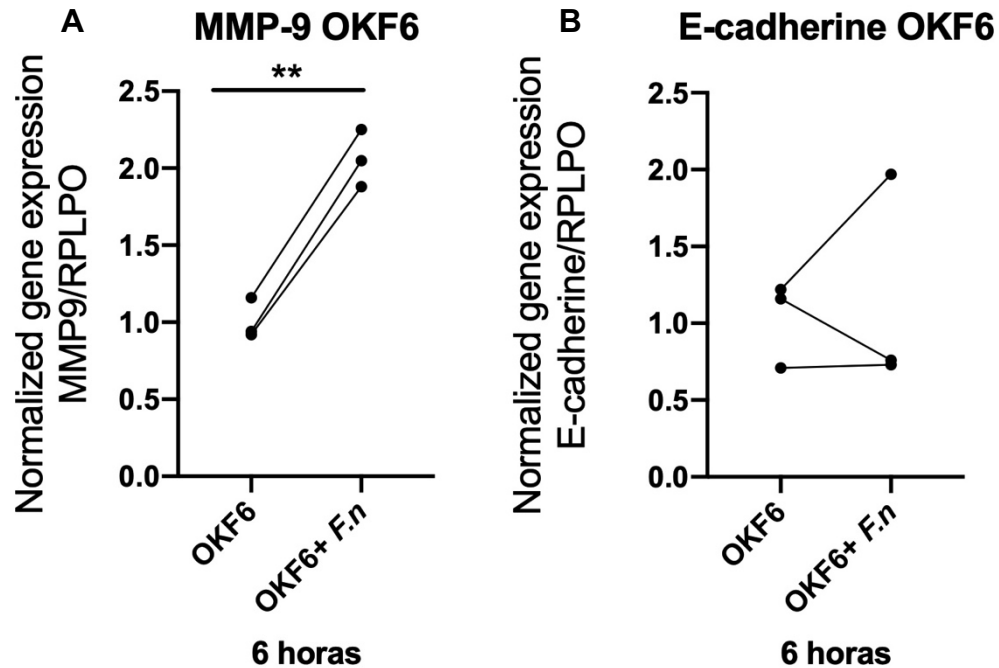


FIGURA 22. Expresión de marcadores asociados a ETM en células OKF6 ante la infección con *F.n.*

Comparación estadística mediante T test de datos pareados, de la expresión relativa de MMP-9(ARNm) y E-cadherina (ARNm) en células OKF6 infectadas y no infectadas con *F.n* a las 6 horas (**A y B**). Cambios en la expresión de los marcadores en las células cancerígenas se calcularon después de la normalización con el housekeeping RPLPO, utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Cq}$. Cada muestra se analizó por triplicado. (T test, Valor p: * <0.05 ; ** <0.01 ; *** $<0,001$).

6.3.- Análisis de la expresión de proteínas relacionadas a cáncer en células cancerígenas infectadas y no infectadas.

Se evaluó la expresión de 84 proteínas relacionadas a cáncer en el lisado celular y sobrenadante de cultivo de células cancerígenas HSC3 luego de 24 horas de infección con la bacteria *F.n* a través del kit “*Proteome profile Array™ Human XL Oncology Array*”. En el lisado celular se expresaron y analizaron 26 proteínas (**Figura 23**), mientras que en el sobrenadante de cultivo celular, se expresaron y analizaron 13 proteínas (**Figura 24**). Entre las proteínas que se expresan significativamente ($p < 0,05$) al alza en el lisado de las células HSC3 infectadas encontramos: FOXO1/FKHR, MMP-3, MMP-9 y SerpinE1 (**Figura 25, Tabla 7**), además se encontró tendencia al alza en la expresión de proteínas como CXCL8 (IL-8), Amphiregulin, Galactina 3, GM-CSF, Progranulina y Cathepsina D (**Figura 25**). Al mismo tiempo se evidenció una disminución significativa ($p < 0,05$) en las células HSC3 posterior a la infección, de proteínas como: Survivin, ERB2, ICAM-1, DLL-1 y E-cadherine (**Figura 25, Tabla 7**), también se observó tendencia a la disminución en proteínas, como FGF basic y Enolase (**Figura 25**) en el lisado de las células cancerígenas infectadas. Si bien se evidenció la expresión de proteínas como: Cap G, U-plasminogen activator, Cathepsina B, Cathepsina S, EpCam/Trop, Axl, Serpin B5, Dkk1 y EGFR, no se observaron diferencias significativas entre la condición infectada y no infectada (**Figura 25, Tabla 7**).

En el caso del análisis de proteínas expresadas en el sobrenadante de cultivo, encontramos un aumento significativo ($p < 0,05$) de Progranulina, GM-CSF, Cathepsina S, Serpin B5/Maspin y EGFR en el sobrenadante de células HSC3 infectadas(**Figura 26, Tabla 8**). Además se encontró tendencia al aumento de proteínas como: Amphiregulin, U-plasminogen activator, MMP-3, Cathepsina P y Dkk 1 (**Figura 26**). Por otra parte se observó disminución en la expresión de la proteína Serpin E1/PAI-1 en el sobrenadante de células infectadas comparado con células no infectadas (**Figura 26**). Proteínas como: CXCL (IL-8) y Axl1 no evidenciaron cambios significativos en su expresión tanto en células infectadas y no infectadas (**Figura 26**).

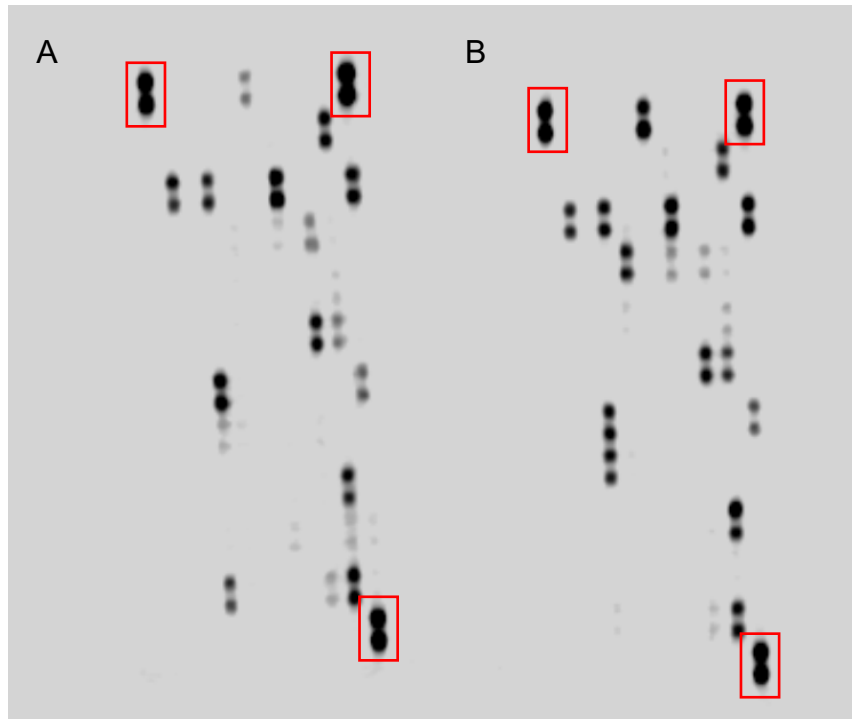


FIGURA 23. Lisado celular de células HSC3 infectadas y no infectadas con *F.n.*

Se corrieron 200 μ g de lisado celular obtenido en cada membrana. **A.** Expresión de proteínas en lisado de células HSC3 que no fueron infectadas con *F.n.* **B.** Expresión de proteínas en lisado de células HSC3 infectadas durante 24 horas con *F.n.* Los datos que se muestran son de una exposición de 15 minutos a una máquina de revelado de membrana (Li-Cor). Con demarcación roja se encuentran indicados los spots de referencia del kit.

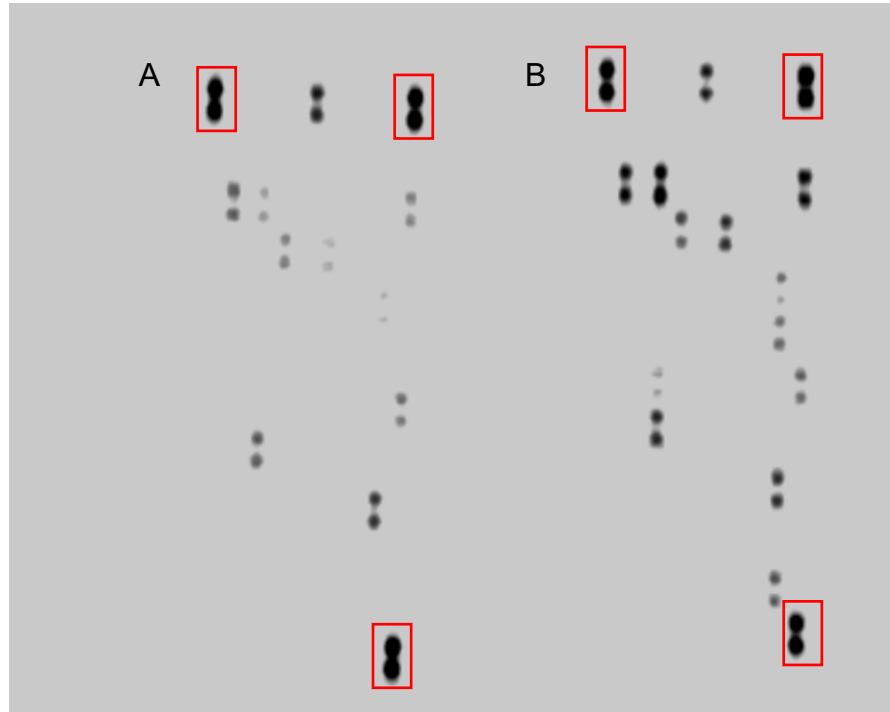


FIGURA 24. Sobrenadante de cultivo de células HSC3 infectadas y no infectadas con *F.n*

Se corrieron 500µl de sobrenadante de cultivo en cada membrana. **A.** Expresión de proteínas en lisado de células HSC3 que no fueron infectadas con *F. n.* **B.** Expresión de proteínas en lisado de células HSC3 infectadas durante 24 horas con *F. n.* Los datos que se muestran son de una exposición de 15 minutos a una máquina de revelado de membrana (Li-Cor). Con demarcación roja se encuentran indicados los spots de referencia del kit.

HSC3 vs HSC3 + <i>F.n</i>	Mean Diff	95,00% CI of diff	Significant?	Summary	Adjusted P Value
ERB2	0,5705	0,3242 to 0,8168	Yes	****	<0,0001
ICAM-1	0,7395	0,4932 to 0,9858	Yes	****	<0,0001
DLL-1	0,9325	0,6862 to 1,179	Yes	****	<0,0001
E-cadherine	0,7685	0,5222 to 1,015	Yes	****	<0,0001
		-0,4913 to			
CXCL8 (IL-8)	-0,2450	0,001335	No	ns	0,0524
Cap G	0,06750	-0,1788 to 0,3138	No	ns	>0,9999
Amphiregulin	-0,08800	-0,3343 to 0,1583	No	ns	0,9989
Galactin 3	-0,1140	-0,3603 to 0,1323	No	ns	0,9674
Progranulin	-0,04800	-0,2943 to 0,1983	No	ns	>0,9999
U plasmigen activator	0,03450	-0,2118 to 0,2808	No	ns	>0,9999
Cathepsina B	-0,01450	-0,2608 to 0,2318	No	ns	>0,9999
Enolase	0,1000	-0,1463 to 0,3463	No	ns	0,9931
GM-CSF	-0,2030	-0,4493 to 0,04334	No	ns	0,2041
Cathepsina D	-0,1170	-0,3633 to 0,1293	No	ns	0,9573
Cathepsina S	0,007500	-0,2388 to 0,2538	No	ns	>0,9999
EpCam/Trop	-0,006000	-0,2523 to 0,2403	No	ns	>0,9999
Axl	0,01050	-0,2358 to 0,2568	No	ns	>0,9999
Serpin B5	0,02950	-0,2168 to 0,2758	No	ns	>0,9999
Dkk-1	-0,04450	-0,2908 to 0,2018	No	ns	>0,9999
EGFR	0,01350	-0,2328 to 0,2598	No	ns	>0,9999
FGF basic	0,1615	-0,08484 to 0,4078	No	ns	0,5789
Survivin	0,2590	0,01266 to 0,5053	Yes	*	0,0322
Serpin E1	-0,3185	-0,5648 to -0,07216	Yes	**	0,0037
MMP-3	-0,5175	-0,7638 to -0,2712	Yes	****	<0,0001
MMP-9	-0,6340	-0,8803 to -0,3877	Yes	****	<0,0001
FOXO/FKHR	-0,6430	-0,8893 to -0,3967	Yes	****	<0,0001

TABLA 7. Comparación estadística proteínas *Human XL Oncology Array* en lisado celular de células HSC3 infectadas y no infectadas con *F.n*

Comparación estadística mediante Test de Sidak's y comparaciones múltiples de 26 proteínas expresadas en lisado celular de células HSC3 infectadas y no infectadas con la bacteria *F.n*. (Test de Sidak's, Valor p: *<0.05; **<0.01; ***<0,001).

	Mean Diff	95,00% CI of diff	Significant?	Summary	Adjusted P Value
DKK	-0,1712	-0,3828 to 0,04038	No	ns	0,1697
Amphiregulin	-0,1768	-0,3883 to 0,03479	No	ns	0,1441
Progranulina	-0,3306	-0,5421 to -0,1190	Yes	**	0,0014
Uplasminogen activator	-0,1677	-0,3792 to 0,04391	No	ns	0,1879
GM-CSF	-0,2500	-0,4616 to -0,03846	Yes	*	0,0152
MMP-3	-0,1004	-0,3119 to 0,1112	No	ns	0,8131
Cathepsin p	-0,1819	-0,3935 to 0,02965	No	ns	0,1237
CXCL 8 (IL-8)	0,07733	-0,1342 to 0,2889	No	ns	0,9627
AXL	0,008222	-0,2033 to 0,2198	No	ns	>0,9999
Serpin E1/PAI-1	0,1018	-0,1097 to 0,3134	No	ns	0,7992
Serpin B5/Maspin	-0,5535	-0,7651 to -0,3419	Yes	****	<0,0001
EGFR	-0,8665	-1,078 to -0,6549	Yes	****	<0,0001
Cathepsin S	-0,8440	-1,056 to -0,6324	Yes	****	<0,0001

TABLA 8. Comparación estadística proteínas *Human XL Oncology Array* en sobrenadante de cultivo de células HSC3 infectadas y no infectadas con *F.n.*

Comparación estadística mediante Test de Sidak's y comparaciones múltiples de 13 proteínas expresadas en sobrenadante de cultivo de células HSC3 infectadas y no infectadas con la bacteria *F.n.* (Test de Sidak's, Valor p: *<0.05; **<0.01; ***<0,001).

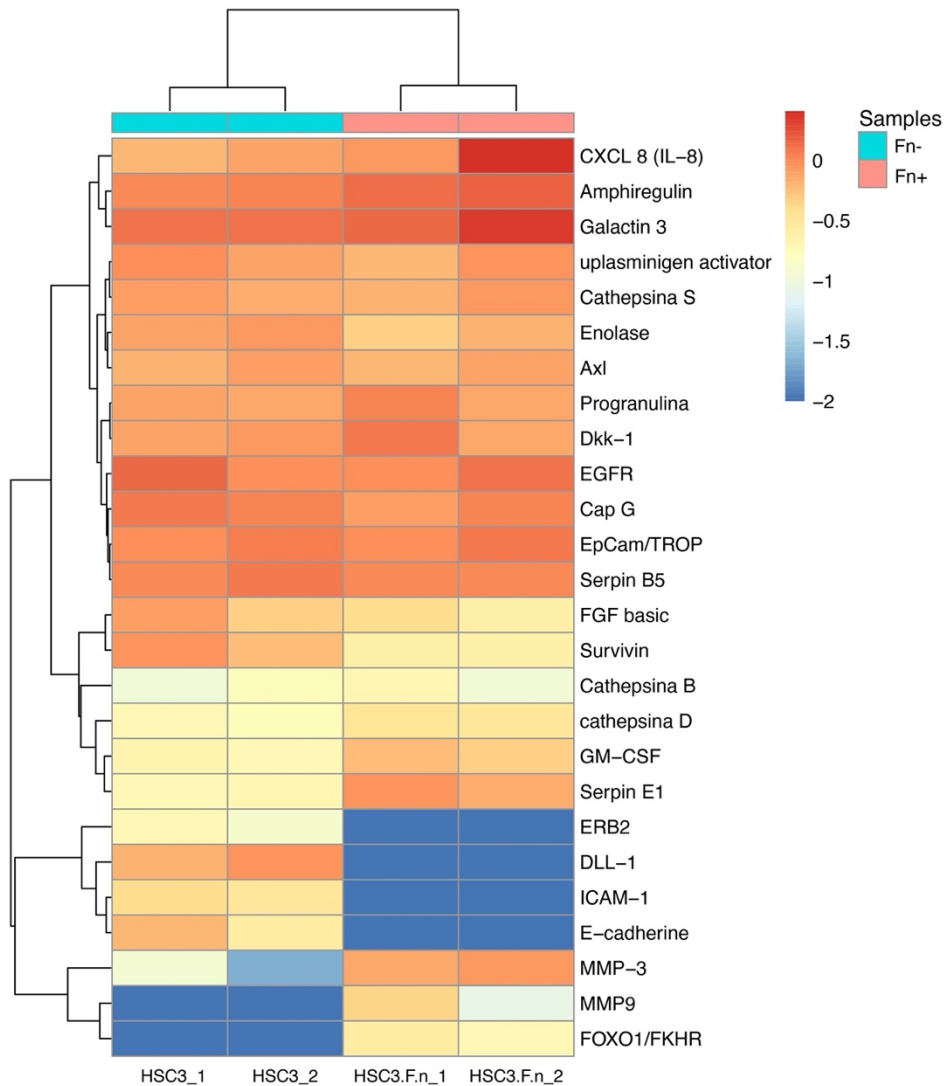


FIGURA 25. Mapa de calor expresión de proteínas lisado celular células HSC3 infectadas/no infectadas con *F.n*

Expresión de 26 proteínas en lisado celular de células HSC3 infectadas (rosado) y no infectadas (celeste) con *F.n*, representada a través de un mapa de calor. La intensidad en la expresión de cada proteína se ve representada por el color azul (menor expresión) al color rojo (mayor expresión).

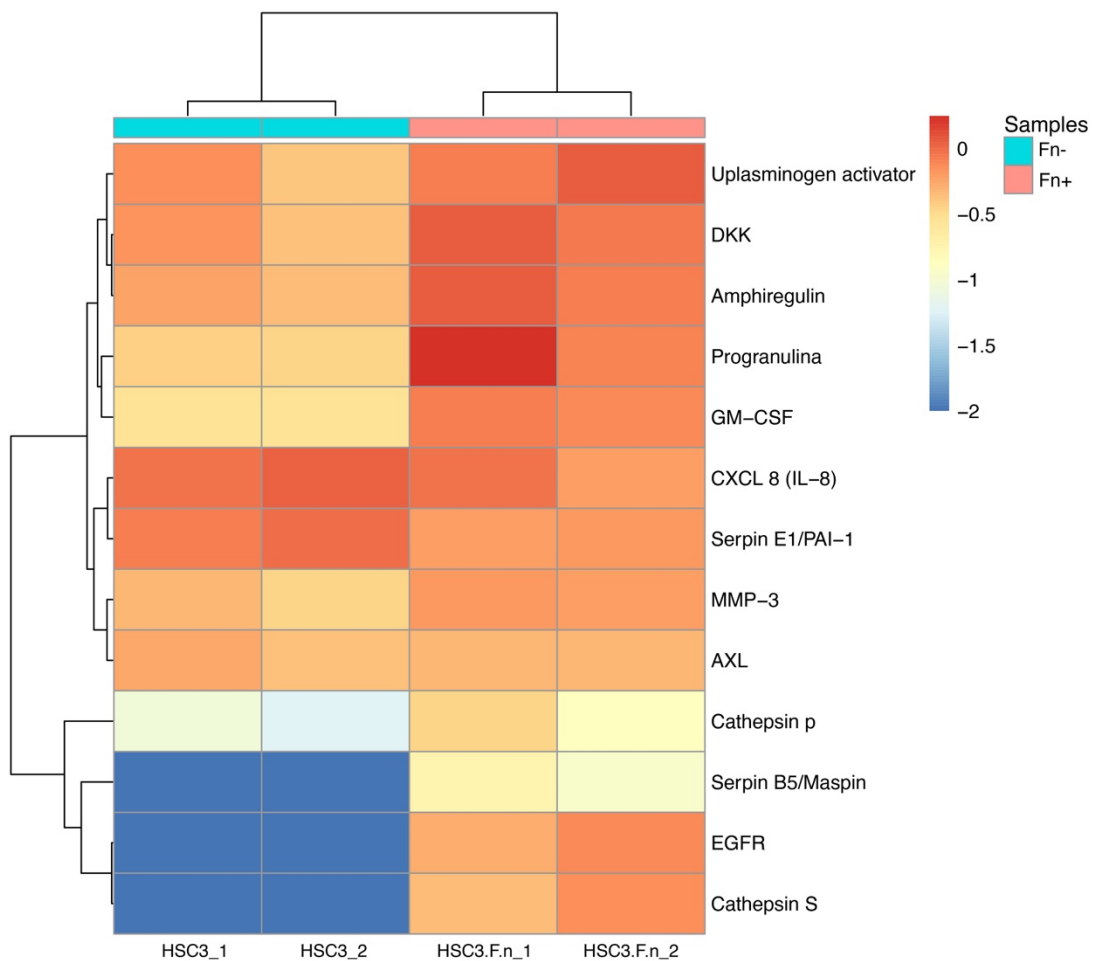


FIGURA 26. Mapa de calor expresión de proteínas en sobrenadante de cultivo células HSC3 infectadas/no infectadas con *F.n*

Expresión de 13 proteínas en sobrenadante de cultivo de células HSC3 infectadas (rosado) y no infectadas (celeste) con *F.n*, representada a través de un mapa de calor. La intensidad en la expresión de cada proteína se ve representada por el color azul (menor expresión) al color rojo (mayor expresión).

Objetivo 3

Medir la expresión de moléculas inmunosupresoras en línea celular de carcinoma oral de células escamosas inducidas por la presencia de *Fusobacterium nucleatum*.

6.4.- Análisis de la expresión de marcadores asociados a inmunosupresión en células cancerígenas/ normales infectadas y no infectadas.

La expresión de marcadores asociados a inmunosupresión en células cancerígenas, se midió por citometría de flujo 24 horas después de la infección con la bacteria *F.n.* Encontramos que las células HSC3 presentan de por sí, una expresión total de CD73, CD155 y PDL-1 (**Figura 27 B, C y D**), no variando entre la condición infectada y no infectada (**Figura 29 B, D y E**). Al contrario, se evidenció que las células HSC3 no expresan CD39 (**Figura 27-A**) y que esta no se ve inducida por la presencia de la bacteria (**Figura 29-A**). Sin embargo, en relación al marcador GAL-9, se observó una expresión diferencial entre células HSC3 infectadas y no infectadas (**Figura 28**). Los resultados del análisis revelaron que las células HSC3 posterior a ser infectadas expresan significativamente ($p < 0,05$) en mayor porcentaje el marcador Gal-9 (**Figura 29-C**).

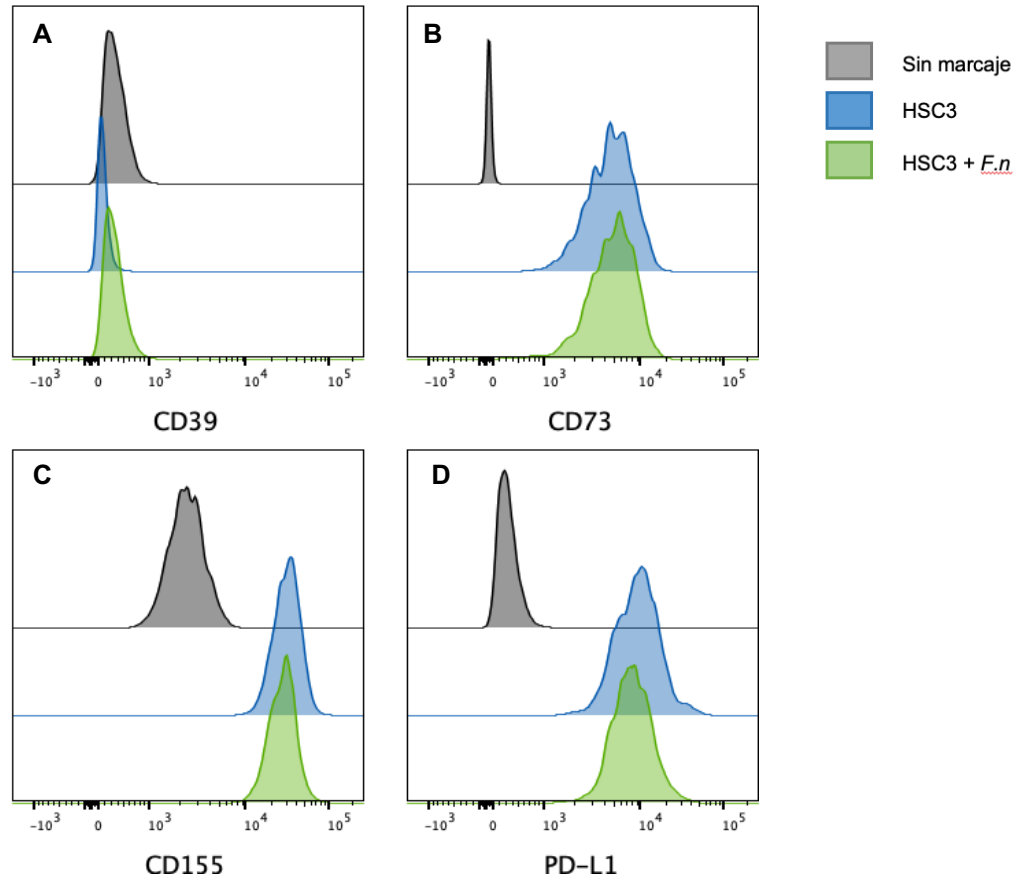


FIGURA 27. Histograma representativo de la expresión de marcadores asociados a inmunosupresión en células HSC3.

Expresión de marcadores asociados a Inmunosupresión: CD39(A), CD73(B), CD155(C) y PD-L1(D) en células cancerígenas HSC3 infectadas y no infectadas durante 24 horas con *F.n* (MOI 100), evaluada mediante citometría de flujo. En color verde se representa la condición infectada, azul la condición no infectada y en gris, el control sin marcaje. El análisis de los datos se realizó mediante el programa FlowJo.

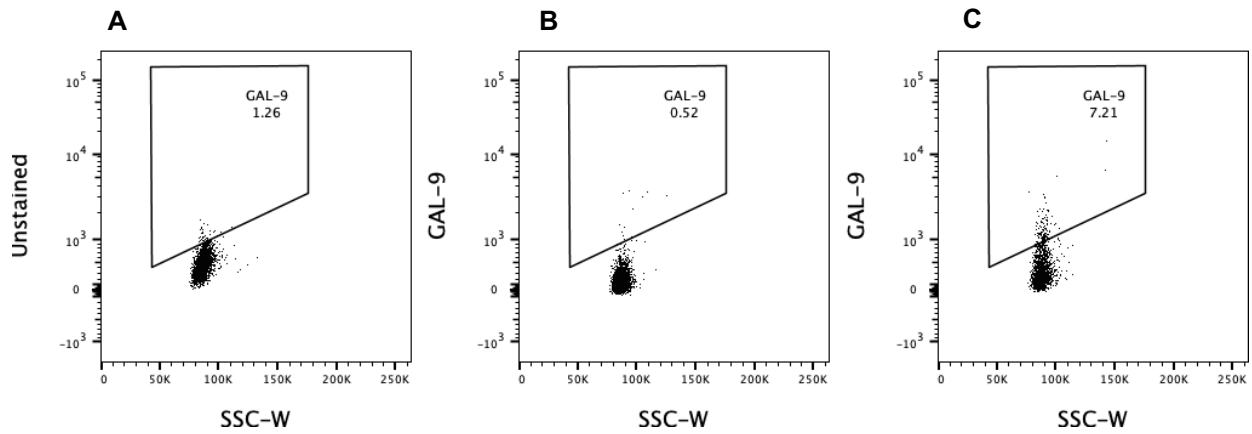


FIGURA 28. DOTPLOT representativo de la expresión de GAL-9 en células HSC3 infectadas/ no infectadas.

Expresión de Galactina 9 en control sin marcaje (A), células infectadas con *F.n* (MOI 100)(B) y células no infectadas(C), evaluado mediante citometría de flujo. El análisis de los datos se realizó a través del software FlowJo.

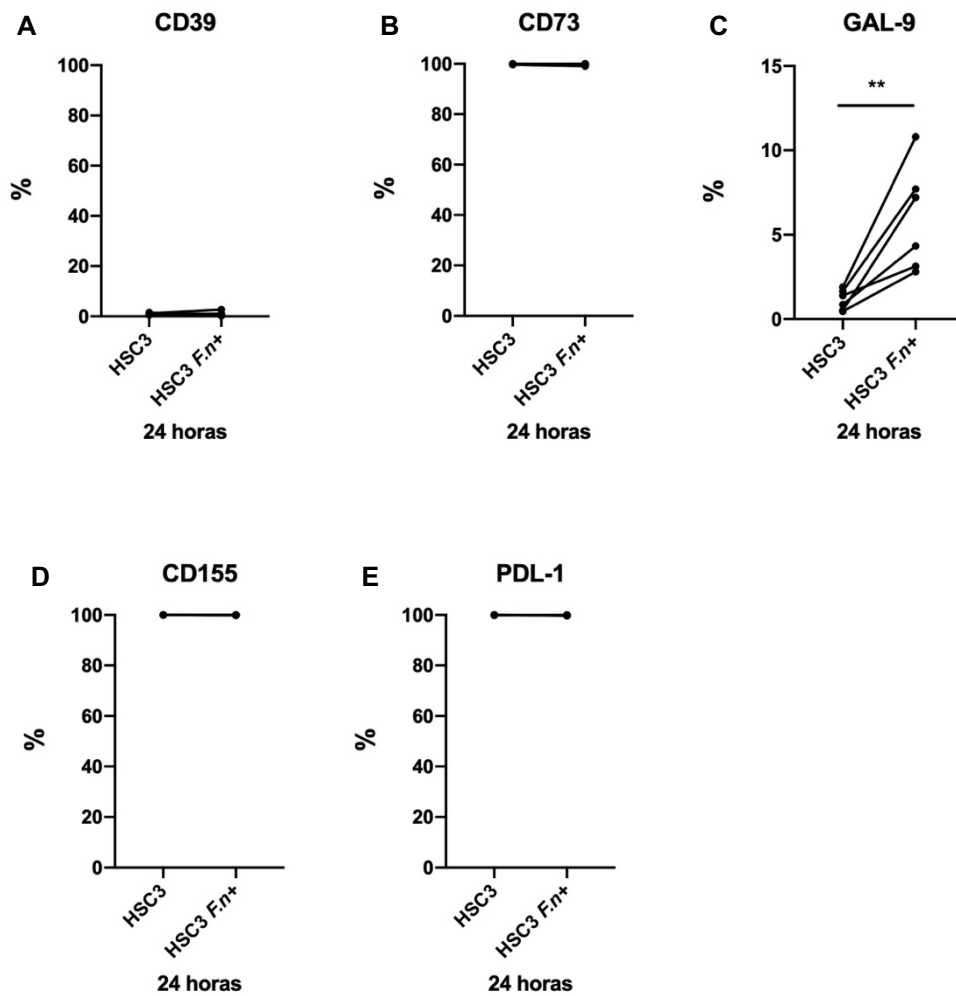


FIGURA 29. Comparación expresión moléculas asociadas a inmunosupresión en células HSC3 infectadas y no infectadas con *F.n.*

Comparación estadística mediante T test de la expresión medida en porcentaje de CD39 (A), CD73 (B), Gal-9 (C), CD155 (D) y PDL-1 (E) en células HSC3 infectadas durante 24 horas con *F.n.*(MOI 100) y no infectadas. (T test, Valor p: *<0.05; **<0.01; ***<0,001).

Asimismo, se midió la expresión de moléculas asociadas a inmunosupresión en células epiteliales normales (OKF6) luego de ser infectadas por 24 horas con la bacteria *F.n.* Igualmente se encontró que las células OKF6, presentan una expresión total de los marcadores CD73, CD155 y PDL-1 (**Figura 30 B, C y D**), por lo que su expresión no varía ante la presencia de la bacteria (**Figura 32 B, D y E**). Por otro lado, en relación al marcador CD39 se observó que no existe expresión por parte de las OKF6 (**Figura 30-A**) y su expresión no se ve inducida por la presencia de *F.n* (**Figura 32-A**). A diferencia de las células HSC3 no encontramos diferencias significativas en la expresión de Gal-9 entre la condición infectada y no infectada (**Figura 32-C**).

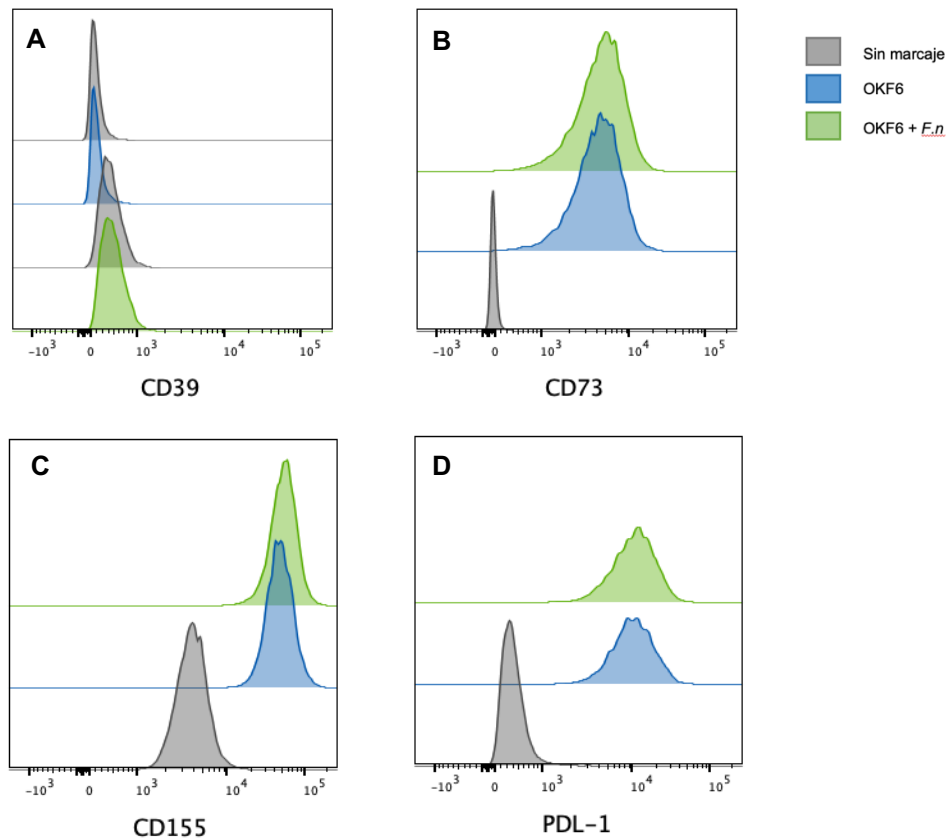


FIGURA 30. Histograma representativo de la expresión de marcadores asociados a inmunosupresión en células OKF6.

Expresión de marcadores asociados a Inmunosupresión: CD39(A), CD73(B), CD155(C) y PD-L1(D) en células epiteliales normales OKF6 infectadas y no infectadas durante 24 horas con *F.n* (MOI 100), evaluada mediante citometría de flujo. En color verde se representa la condición infectada, azul la condición no infectada y en gris, el control sin marcaje. El análisis de los datos se realizó a través del programa FlowJo.

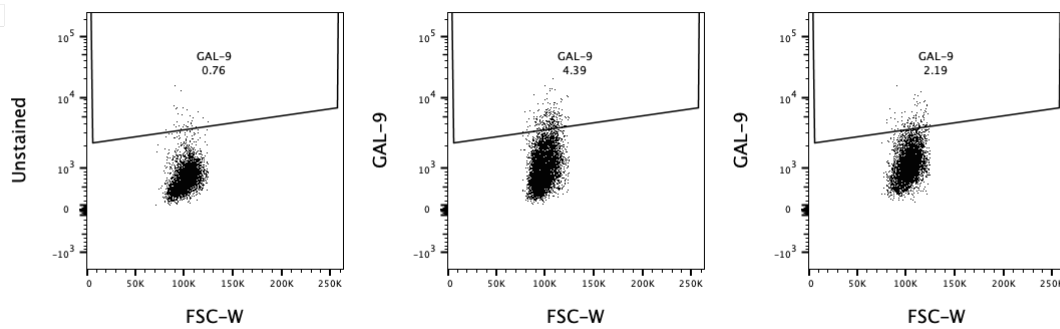


FIGURA 31. DOTPLOT representativo de la expresión de GAL-9 en células OKF6 infectadas/ no infectadas.

Expresión de Galactina 9 en control sin marcaje (A), células no infectadas (B) y células infectadas con *F.n* (MOI 100)(C), evaluado mediante citometría de flujo. El análisis de los datos se realizó a través del software FlowJo.

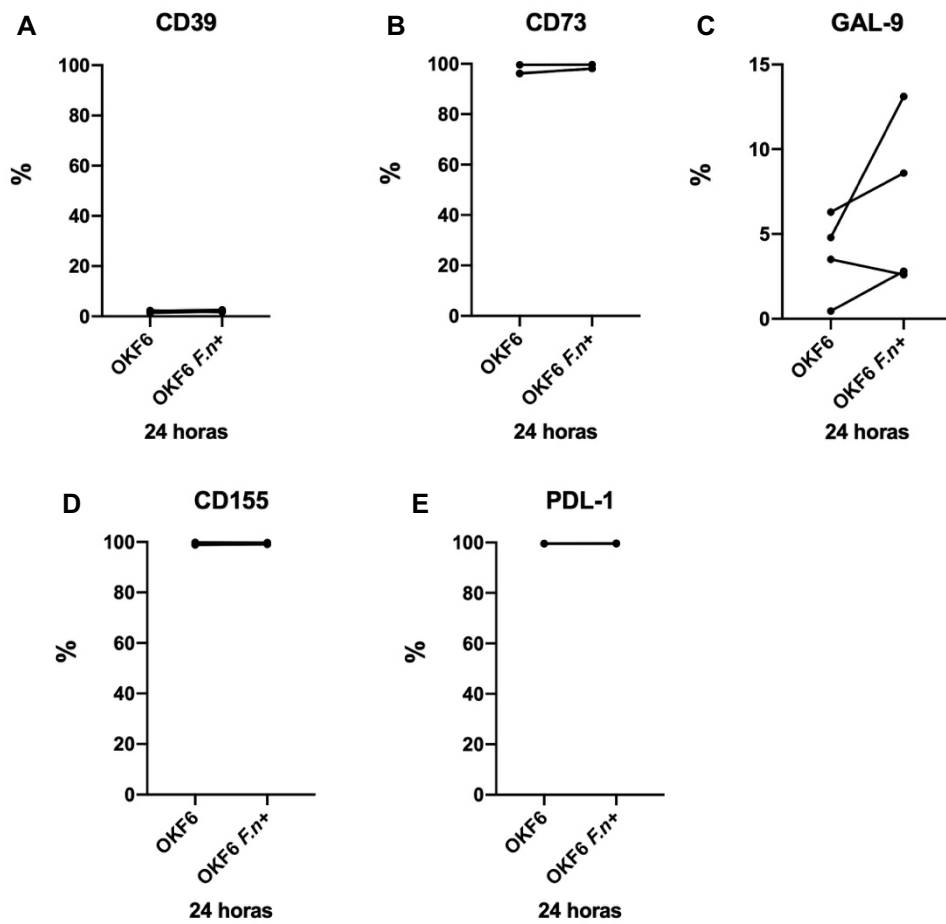


FIGURA 32. Comparación expresión moléculas asociadas a inmunosupresión en células OKF6 infectadas y no infectadas con *F.n.*

Comparación estadística mediante T test de la expresión medida en porcentaje de CD39 (A), CD73 (B), Gal-9 (C), CD155 (D) y PDL-1 (E) en células OKF6 infectadas durante 24 horas con *F.n.*(MOI 100) y no infectadas. (T test, Valor p: * <0.05 ; ** <0.01 ; *** $<0,001$).

7. DISCUSIÓN

El objetivo principal de esta investigación fue caracterizar los mecanismos protumorales por los cuales la bacteria periodontal *Fusobacterium nucleatum* ejerce su efecto en las células del carcinoma oral de células escamosas, con el fin de entender la posible asociación entre la periodontitis y la progresión del OSCC.

La elección de investigar esta bacteria no fue al azar y se basa en el análisis de nuestra data anterior, que reveló alta y exclusiva presencia de *F.n* en el secretoma de pacientes con OSCC, no observada en el secretoma control. Estudios previos basados en técnicas de secuenciación, han reportado igualmente la presencia de *F.n* en las biopsias de pacientes diagnosticados con OSCC, en comparación a controles sanos(Decsi et al., 2019; Zhao et al., 2017). Inclusive, un estudio de Chang y colaboradores, reportó que *Fusobacterium nucleatum* se encuentra también significativamente abundante en lesiones precancerosas y que *F.n* y *P. gingivales* son las bacterias más predominantes en las lesiones de OSCC, postulando que por razones aun no conocidas, serían las bacterias que mejor se adaptan al microambiente tumoral y ejercen un efecto clave en este(Chang et al., 2019).

F.n es una bacteria periodontal, cuyo nicho principal es la boca y que se caracteriza por encontrarse en alta abundancia tanto en salud oral y en enfermedades periodontales como la gingivitis y la periodontitis (Abusleme,

Hoare, Hong, & Diaz, 2021). Si bien esta especie es conocida por su papel organizador de la arquitectura en las biopelículas orales a través de la expresión de múltiples adhesinas, dirigiendo las relaciones espaciales entre especies colonizadoras tempranas y posteriores (Kolenbrander et al., 2010), últimamente se ha propuesto que la importancia de *F.n* en la formación de las biopelículas orales es debido a la capacidad de establecer múltiples interacciones metabólicas con otros miembros de la comunidad, lo que le permite servir de anclaje y mantenerse altamente abundante en diversas condiciones y ambientes (Sakanaka et al., 2022). En relación a la presencia de *F.n* en el microambiente tumoral, es sabido que tiene preferencia por los péptidos y aminoácidos y produce butirato y amoníaco como productos finales de las vías de fermentación, a partir principalmente del glutamato y la lisina (Anand, Kaur, & Mande, 2016; Bolstad et al., 1996). Se ha reportado que las células del OSCC, presentan transportadores de glutamato y que en efecto son productoras de este (Cetindis et al., 2016; Park et al., 2007). A partir de esto, suponemos que *Fusobacterium* se aprovecha de estos productos metabólicos que le otorga la célula cancerígena, para activar vías metabólicas que le permitan utilizar estos nutrientes y sobrevivir dentro del tumor.

Por otra parte, nuestros hallazgos a través de microscopia confocal, nos permitieron confirmar que *F.n* ingresa a la célula del OSCC y hasta 6 horas posteriores a la infección, se mantiene viva, por lo tanto reafirmamos que esta bacteria es capaz de entrar a la célula cancerígena y establecerse dentro del

microambiente tumoral, que es donde va a ejercer su efecto. Con respecto al ingreso de la bacteria a la célula, las interacciones entre *F.n* y células cancerígenas se han estudiado más en extensión en cáncer colorectal. En este contexto se conoce que la unión entre la adhesina FadA de *F.n* y la E-cadherina epitelial de la célula cancerígena puede permitir la unión de la bacteria (Rubinstein et al., 2013). Sin embargo, la E-cadherina se expresa en muchos tipos de células y como veremos más adelante, sus niveles de expresión en displasia y neoplasia pueden variar. Por lo tanto, se proponen mecanismos adicionales, que explican esta interacción entre *F.n* y las células cancerígenas. En el colon, se sugiere que Fap2, proteína específica de *F.n*, media y permite la unión a través de GalNAc, que se expresa en niveles altos en las células cancerígenas del cáncer colorectal (Abed et al., 2016).

Una vez dentro de la célula tumoral, *Fusobacterium nucleatum* promueve distintos mecanismos que la llevan a participar en la progresión del carcinoma oral de células escamosas. En esta investigación nos enfocamos en 3 de ellos; aumento del crecimiento tumoral, adquisición de un ETM y expresión de marcadores asociados a inmunosupresión.

En cuanto al efecto de *F.n* sobre el crecimiento tumoral, nuestros resultados obtenidos a través de la visualización de esferoides, revelaron que aquellos esferoides que se formaron a partir de células infectadas con la bacteria, superaron en tamaño a aquellos obtenidos a partir de células no infectadas, en cada uno de los días donde se realizaron las mediciones. Estos hallazgos se

apoyan por lo estudiado recientemente por Kamarajan y colaboradores, donde demostró que tanto *F.n* y otros patógenos periodontales mejoraron significativamente la formación de tumoresferas formadas a partir de células del OSCC y que el tratamiento con nisina ZP, un probiótico en base a bacterias comensales, bloqueó significativamente la formación de tumoresferas potenciada por los patógenos periodontales. En su estudio además agregan que esta mejora en la formación de esferas tumorales provocada por las bacterias patógenas es dependiente de la vía de señalización integrina/FAK(Kamarajan et al., 2020).

Asimismo, ensayos *in vivo* han demostrado el efecto que tiene *F.n* sobre el crecimiento tumoral. Gallidimi el 2015 observó que al infectar ratones con bacterias patógenas, como *F.n*, las lesiones tumorales que presentaban eran de mayor tamaño, en mayor número y significativamente más invasivas(Adi Binder Gallimidi, 2015).

Este aumento en el crecimiento tumoral, podría estar asociado a una alteración en la proliferación de las células tumorales. Un estudio de Geng y colaboradores reportó que la infección por *F.n* en células del carcinoma oral promueve su capacidad proliferativa, al causar daños en el ADN a través de la vía Ku70/p53, proteínas importantes involucradas en mecanismos de detección de daños al ADN (Geng et al., 2020).

Igualmente, es importante recalcar que se encontraron resultados asociados al aumento de la proliferación celular de las células OSCC en la proteómica del secretoma de pacientes con cáncer oral. Tal como se mencionó previamente, se

observó un aumento en defensinas y del receptor del factor de crecimiento epidermal en el secretoma cancerígeno comparado al control. En este contexto, Hoppe y colaboradores propusieron de manera experimental en 2016 que las defensinas son posibles ligandos del receptor del factor de crecimiento epidérmico y que ante la infección con patógenos periodontales, la expresión de estos péptidos antibacterianos aumenta, uniéndose al receptor y finalmente promoviendo la proliferación de las células de la carcinogénesis oral (Hoppe et al., 2016).

Llama la atención lo encontrado en las células epiteliales normales, donde observamos formación del esferoide recién 6 días posterior a la infección, los cuales en tamaño superaron a los esferoides de células cancerígenas. No obstante, se mantuvo la tendencia que aquellos esferoides formados a partir de células epiteliales infectadas, fueron mayores en tamaño que aquellos que se obtuvieron de células no infectadas. Al respecto, no existe evidencia específica que asocie el efecto de *F.n* en la proliferación de células epiteliales normales, sin embargo se conoce que la proteína Fad A de la bacteria presenta alta afinidad por la E-cadherina presente en las células epiteliales (Rubinstein et al., 2013). Esta E-cadherina se encuentra presente en los tejidos orales normales y es críticamente necesaria para el mantenimiento de las uniones adherentes entre las células epiteliales (Ye, Nadkarni, & Hunter, 2006). La unión de la proteína Fad A de *Fusobacterium nucleatum* y la E-cadherina de las células epiteliales, permite que *F.n* invada las células epiteliales y la activación de la vía de señalización por

β -cateninas que regula la proliferación celular y la expresión de oncogenes (Rubinstein et al., 2013).

Otro mecanismo evaluado en este estudio fue la capacidad que tiene la bacteria *F. nucleatum* de promover que tanto células cancerígenas como células normales, adquieran marcadores asociados a un ETM. Particularmente evaluamos a través de qPCR la expresión de MMP-9 y E-cadherina, ambos marcadores clásicos asociados a ETM (Pastushenko & Blanpain, 2019) y que cuya expresión encontramos en el secretoma de pacientes con OSCC.

En células cancerígenas, la expresión de MMP-9 (ARNm) aumentó significativamente a las 6 horas posteriores a la infección con la bacteria. Otros autores han reportado el aumento de MMP-9 en las células de OSCC, inducido ante la infección por *F.nucleatum*. En un estudio de Harrandah y colaboradores observaron un aumento de MMP-1 y MMP-9 en las células de cáncer oral, ante la poliinfección con distintas bacterias periodontales, pero que al infectar sólo con *F.n*, los efectos eran comparables e incluso mayores (Harrandah et al., 2020).

El aumento de la expresión de MMP-9 se ha vinculado ampliamente con la adquisición de un ETM, ya que es capaz de degradar proteínas de la matriz extracelular y de cortar específicamente el dominio extracelular en la superficie de ciertas proteínas celulares y liberarlas de la membrana plasmática (Misko, Ferguson, & Notterpek, 2002), asociado a su capacidad de degradar el colágeno tipo IV de la membrana basal (Li et al., 2020). Durante el desarrollo del tumor, la

destrucción de la membrana basal suele ser un paso esencial para que los tumores logren invasión y metástasis(Farina & Mackay, 2014).

En relación al marcador E-cadherina, observamos que las células cancerígenas infectadas con la bacteria disminuyen considerablemente la expresión a las 6 horas de ocurrido el contacto con la bacteria. Al respecto, Zhang y colaboradores reportó una disminución de E-cadherina en líneas celulares de carcinoma oral de células escamosas asociado a la infección con esta bacteria, además observaron que la E-cadherina se distribuyó principalmente en la membrana celular en células no infectadas como componente de los complejos de unión adherente, mientras que apareció desorganizada y puntiforme en el citoplasma de las células infectadas con *F.n* (Zhang et al., 2020).

La pérdida de E-cadherina se describe como un evento clave en la adquisición del EMT tanto *in vivo* como en algunas líneas celulares de cáncer. La baja en su expresión, conduce a una disminución de la adhesión célula a célula, permitiendo la separación de células individuales de la masa tumoral primaria y, por lo tanto, representa una característica importante en la progresión del carcinoma(Sommariva & Gagliano, 2020).

Resulta interesante destacar los resultados encontrados en las células epiteliales normales (OKF6), donde igualmente encontramos un aumento de MMP-9 (ARNm) y una disminución en la expresión de E-cadherina (ARNm) a 6 horas de infección. Dentro de este marco, se ha descrito la adquisición de marcadores de EMT en células epiteliales normales. Lee y colaboradores, el 2017 reportó que

células epiteliales extraídas desde encía de pacientes sanos, ante la infección prolongada con otro patógeno periodontal (*p. gingivalis*) expresaron moléculas clásicas del ETM, como Vimentina, MMP-2, MMP-7, MMP-9 y pérdida de E-cadherine, proceso iniciado por la fosforilación de GSK3b y la consecuente expresión de los factores de transcripción clásicos de ETM Snail/Slug (J. Lee et al., 2017).

Como complemento, evaluamos la expresión de estos dos marcadores en el lisado y sobrenadante de células cancerígenas infectadas durante 24 horas con la bacteria *F.n*, a través de un ensayo tipo array (*Proteome profile ArrayTMHuman XL Oncology Array*).

La ejecución de un ensayo tipo *array* nos permitió el análisis de diversas proteínas relacionadas a cáncer, que pudieran ver alterada su expresión ante la infección con *Fusobacterium nucleatum*. Dentro de las proteínas que alteraron su expresión encontramos los marcadores ETM; MMP-9 y E-cadherine, donde observamos en el lisado de las células cancerígenas infectadas, un aumento por sobre el control en la expresión de MMP-9 y una pérdida en la expresión de E-cadherine. Otra proteína posiblemente relacionada a la adquisición de un ETM, que observamos aumentada en el lisado y sobrenadante de las células cancerígenas infectadas, fue MMP-3. Al igual que MMP-9, MMP-3 se ha asociado como un factor importante en el desarrollo del cáncer (Agha-Hosseini, Mirzaii-Dizgah, Mahboobi, Shirazian, & Harirchi, 2015), debido a la capacidad que tiene de descomponer muchos componentes de la matriz extracelular, como

proteoglicanos, fibronectina, laminina y colágeno tipo III, IV, permitiendo la migración e invasión de las células tumorales (Nosratzehi, Alijani, & Moodi, 2017). La adquisición de un epitelio de transición mesenquimal es uno de los principales mecanismos con los que se ha asociado *F.n* a la progresión del carcinoma oral de células escamosas, tanto por la expresión de sus marcadores, como por el aumento en la expresión de genes relacionados a la adquisición de este epitelio. Un estudio reciente de Shao y colaboradores, demostró que *F.n* aumentó la expresión de genes relacionados con la adquisición de un epitelio de transición parcial (p-EMT) en células OSCC con fenotipo epitelial, proponiendo que la infección por esta bacteria puede convertir el fenotipo epitelial en p-EMT a través la alteración de la expresión génica en las células del carcinoma oral, el cual presenta incluso más propiedades agresivas, invasivas y de metástasis que un EMT total (Shao et al., 2021).

La adquisición de un EMT, inducido por la presencia de *F.n*, no sólo se ha reportado en cáncer oral, si no también en cáncer colorrectal. Estudios *in vitro* demostraron que cuando las células del cáncer colorectal eran cocultivadas con la bacteria, desencadenaron características similares a EMT a través de la vía de señalización IL-6/STAT 3 (Q. Wang, Yu, Yue, & Liu, 2020). Inclusive se ha descrito que la bacteria es capaz de acelerar la progresión de la colitis asociada a cáncer mediante la adquisición de un EMT (Yu, Kim, & Park, 2020).

La gran variedad de proteínas relacionadas a cáncer disponibles a ser evaluadas mediante el array, nos permitió encontrar otras proteínas que vieron alterada su

expresión ante la infección con *F.n* y que podrían apoyar su rol en la progresión del OSCC.

Una de las proteínas que su expresión en las células del HSC3 desapareció posterior a la infección es DLL-1. Esta proteína pertenece a la vía de señalización Notch-DLL1, cuya estimulación en cáncer se ha asociado a mayores respuestas de memoria y de células T efectoras específicas contra el antígeno tumoral, mayor infiltración de células T en el microambiente tumoral, disminución de células Treg y de la angiogénesis sin aumentar el potencial tumorigénico de las células cancerosas. Por lo que el bloqueo de esta vía, mediante la disminución de sus ligandos, tendría un efecto negativo en la eficacia de la respuesta inmune antitumoral (Biktasova et al., 2015).

Observamos también una sobreexpresión de la proteína Serpin E1, asociada a la infección con *F.nucleatum*. Serpin E1, también conocido como inhibidor del activador del plasminógeno-1, actúa en diversas patologías como la trombosis y la fibrosis mediante la inhibición de los activadores del plasminógeno de tipo uroquinasa y los activadores del plasminógeno de tipo tisular (Sillen & Declerck, 2021). Múltiples células, como endoteliales, macrófagos, adipositos, incluidas las células tumorales y del estroma, producen Serpin E1 (Kubala & DeClerck, 2019). Su rol protumoral se ha estudiado en cáncer gástrico, donde a través de análisis bioinformáticos, se evidenció que la sobreexpresión de Serpin E1 se relaciona con metástasis agresiva y mal pronóstico en pacientes con cáncer gástrico avanzado (X. Liu et al., 2018; Suh et al., 2015).

Por otro lado, en el sobrenadante de cultivo de las células HSC3, encontramos un aumento de proteínas como la Cathepsina S posterior a la infección. La catepsina S es un miembro de la familia de cisteínas lisosomales que puede degradar elementos de la MEC como laminina, fibronectina, elastina y algunos tipos de colágeno. Desempeña numerosas funciones en distintos procesos tumorigénicos, como la angiogénesis, metástasis y apoptosis (Tsai, Lee, Dah-Tsyr Chang, & Huang, 2014). Por esta razón es que se ha reportado que los inhibidores de la catepsina S podrían ser útiles para prevenir o retrasar la metástasis del cáncer, esta característica incluso se comprobó en cáncer oral, donde la inhibición de Cathepsina S utilizando sulforafano, disminuyó la migración de las células del OSCC (Chang et al., 2019).

Una proteína encontrada sobreexpresada en el sobrenadante de las células HSC3 infectadas que tiene un rol controversial dentro del cáncer fue GM-CSF. El factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) es una glicoproteína conocida por su papel en la mielopoyesis promoviendo la generación de neutrófilos polimorfonucleares, monocitos, macrófagos y células dendríticas a partir de células progenitoras hematopoyéticas (Zhan, Lew, & Chopin, 2019). Su rol en la respuesta inmune antitumoral es controversial. Por un lado, GM-CSF puede mejorar la producción de neutrófilos, reclutar macrófagos del fenotipo M1 supresor de tumores, convertir las células dendríticas al fenotipo proinflamatorio con mejores capacidades de presentación de antígenos a las células T citotóxica y mejorar la función de las células T efectoras

anticancerígenas. Sin embargo, al mismo tiempo tiene el potencial de convertir los neutrófilos en células supresoras derivadas de mieloides patogénicas que promueven el cáncer, reclutar macrófagos al fenotipo M2 promotor de tumores e inducir la parición de células T reguladoras. El fenotipo que adopte dependerá de diversos factores, como el tipo de cáncer, pronóstico y la expresión de células inmune en el microambiente tumoral (Kumar, Taghi Khani, Sanchez Ortiz, & Swaminathan, 2022).

Finalmente evidenciamos tanto en el sobrenadante de cultivo de las células HSC3 infectadas como en la data del secretoma de pacientes con OSCC, una sobreexpresión de EGFR. El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es una proteína tirosina quinasa receptora que desempeña un papel importante en la regulación de la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células epiteliales, así como en los tumores de origen epitelial(Chen, Cohen, & Grandis, 2010). Se ha reportado una alta expresión de EGFR en más del 90% de los canceres de cabeza y cuello(Laimer et al., 2007). La activación de esta vía se asocia con un fenotipo de células cancerosas, inhibición de la apoptosis, establecimiento de la angiogénesis, mayor potencial metastásico y por ende con un pronóstico desfavorable para el paciente portador de la enfermedad(X. X. Lv et al., 2020).

El último mecanismo por el cual *F.n* apoyaría la progresión del OSCC, revisado por en este estudio, fue la capacidad de inducir en las células cancerígenas la expresión de marcadores asociados a inmunosupresión, que promuevan el

escape inmunológico. En este sentido, los resultados de nuestros ensayos de infección tanto en células cancerígenas como normales, nos revelaron que existe de por sí una expresión total de marcadores como CD73, CD155 y PDL-1 en estas células, independiente de la presencia o no de la bacteria. La alta expresión de CD73, CD155 y PDL1 en las células del OSCC ha sido reportada (Dave et al., 2020; Mao et al., 2021; Ren et al., 2016) y la presencia de estos marcadores se ha asociado con peor estadio TNM, mayor grado de indiferenciación, invasión ganglionar y por ende un pronóstico desfavorable para el paciente (Jeske et al., 2020; X. Liu et al., 2021; Wu et al., 2021). Si bien nuestros resultados demostraron que *F.n* no cumpliría un rol en la expresión de estos marcadores, debido a que las células cancerígenas presentan una expresión total de estos, debemos recordar que la línea celular utilizada en este estudio, fue la línea HSC3 que corresponde a cáncer de lengua con alto grado de agresividad y en estado cancerígeno avanzado, es por esto que es probable que estas células ya expresan estos marcadores asociados a inmunosupresión. Resultaría interesante comprobar la expresión de estos marcadores posterior a una infección con *F.n* en una línea celular que represente un estadio inicial de la carcinogénesis oral.

Asimismo, llama la atención la expresión total de los marcadores CD73, CD155 y PDL-1 en las células epiteliales normales independiente de la infección con *F.nucleatum*. La expresión de estos marcadores en células epiteliales orales ha sido reportada por estudios previos, generalmente asociada a estímulos

inflamatorios. Particularmente se ha evidenciado la expresión de CD73 en células del epitelio oral y fibroblastos orales (Hashikawa et al., 2003; J. S. Lee, Chowdhury, Roberts, & Yilmaz, 2020). CD73 parece ser un determinante importante de la homeostasis extracelular para mantener el estado fisiológico de las células epiteliales frente a potentes moléculas de señalización de peligro, como lo serían los patógenos periodontales (J. S. Lee et al., 2020).

También se ha observado la presencia de CD155 en células epiteliales normales (Shen et al., 2017). Su expresión varía según el origen del tejido (Nandi et al., 2022) y es capaz de interactuar con nectinas (moléculas de adhesión celular), contribuyendo así sustancialmente a el establecimiento de uniones adherentes entre células epiteliales. Debido a su capacidad adhesiva, CD155 participa en procesos como la movilidad, migración y proliferación celular (Maier et al., 2007).

Por otra parte, otra molécula que ha demostrado su expresión tanto en células normales de la mucosa oral, lesiones premalignas y cancerígenas es PDL-1 (Dave et al., 2020). La proteína PDL-1 es ligando de la proteína 1 de muerte celular programada (PD-1) y se encuentra en la superficie celular de las células epiteliales y células presentadoras de antígenos (Ritprajak & Azuma, 2015). Se ha detectado su presencia en keratinocitos orales humanos de cultivo primario y puede aumentar su expresión tras la estimulación con IFN- γ , TNF- α o IL-1 β . (Youngnak-Piboonratanakit et al., 2004).

A pesar de las evidencias anteriores relacionadas a la expresión de moléculas inmunosupresoras en células cancerígenas y normales inducidas por la infección de la bacteria, nuestros resultados revelaron que uno de los marcadores elegidos si aumentaba su expresión posterior a la infección con *F.n.* Detectamos un aumento significativo de Galactina 9, asociado a la infección con la bacteria en células cancerígenas. Un estudio de Muniz y colaboradores, evaluó la expresión de distintas galactinas y metaloproteinasas en lesiones potencialmente malignas y de OSCC, evidenciando que Gal-9 fue significativamente mayor en pacientes con OSCC que en otros grupos, proponiendo además que permitiría la diferenciación entre lesiones potencialmente malignas y malignas(Muniz et al., 2015). La galectina-9 presenta propiedades antineoplásicas y regula varias funciones celulares, como la adhesión celular, la proliferación celular y la apoptosis(Elola, Wolfenstein-Todel, Troncoso, Vasta, & Rabinovich, 2007). A pesar de sus propiedades antitumorales, también se ha asociado con efectos inmunorreguladores que pueden favorecer el escape inmunológico, permite la expansión periférica de las células Treg a través de la vía de activación de TGF- β (K. Lv, Zhang, Zhang, Zhong, & Suo, 2013). Además, la unión a su ligando TIM-3 presente en la superficie de células Th1 induce la apoptosis en esta célula, lo que contribuye al establecimiento de un entorno inmunológico que suprime la respuesta inmune tumoral y que por lo tanto favorece el crecimiento del tumor(Dong et al., 2017). Es por esta razón que la expresión de este marcador generalmente se ha asociado a peor respuesta a tratamiento, invasión linfático-

ganglionar y pronóstico desfavorable para los pacientes con OSCC(Ahmed & Shaikh, 2022; Muniz et al., 2015).

A partir de las evidencias expuestas, resulta relevante destacar el rol de la bacteria periodontal *F.n* en el contexto del OSCC. Primero debido a la alta presencia que logra por sobre otras bacterias en el microambiente tumoral, donde es capaz de establecerse, ingresar a la célula cancerígena y ejercer su efecto. Este efecto pareciera ser que beneficiaría la progresión del OSCC a estadios de peor pronóstico o más avanzados.

Al respecto, hacer hincapie que los cambios en el microbioma oral, asociados a la presencia de ciertas bacterias, generan un impacto en el pronóstico de enfermedades malignas prevalentes, por lo que resulta importante establecer medidas de prevención, asociadas al cuidado de la salud periodontal, tanto en pacientes sanos como en pacientes con OSCC y de esta manera contribuir a un mejor pronóstico, respuesta a tratamiento y por lo tanto una mejor calidad de vida para los enfermos.

8. CONCLUSIÓN

Sobre la base de las ideas expuestas identificamos que *Fusobacterium nucleatum* ejerce un efecto sobre las células del OSCC. En primer lugar resaltar que esta bacteria mantiene una alta presencia en el OSCC y es capaz de ingresar a la célula cancerígena, donde lleva a cabo distintas funciones. Uno de los mecanismos en los que participa *F.n*, es promoviendo el crecimiento tumoral, lo cual dimensionamos a través de la medición de esferoides de células cancerígenas y normales. Por otro lado, mediante el análisis de marcadores asociados a ETM, reportados por la literatura y encontrados en nuestra data de secretoma de pacientes con OSCC, observamos que la bacteria es capaz de inducir la expresión de MMP-9 y disminuir la expresión de E-cadherina, lo cual se asocia con la adquisición de un ETM. Además de la expresión de estos marcadores, a través de la ejecución de un ensayo tipo array, encontramos la expresión de distintas proteínas relacionadas a cáncer que alteraron su expresión a favor de la progresión del OSCC, posterior a la infección con *F.n*. Finalmente evidenciamos la expresión del marcador Gal-9, asociado a inmunosupresión, en las células cancerígenas luego de la estar en contacto con la bacteria. A partir de estos resultados sugerimos que *F.n* participa en la progresión del OSCC, aumentando el crecimiento tumoral, promoviendo un ETM y la expresión de Gal-9 asociado a inmunosupresión.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abed, J., Emgard, J. E., Zamir, G., Faroja, M., Almogy, G., Grenov, A., . . . Bachrach, G. (2016). Fap2 Mediates *Fusobacterium nucleatum* Colorectal Adenocarcinoma Enrichment by Binding to Tumor-Expressed Gal-GalNAc. *Cell Host Microbe*, 20(2), 215-225. doi:10.1016/j.chom.2016.07.006
- Abusleme, L., Hoare, A., Hong, B. Y., & Diaz, P. I. (2021). Microbial signatures of health, gingivitis, and periodontitis. *Periodontol 2000*, 86(1), 57-78. doi:10.1111/prd.12362
- Adi Binder Gallimidi, S. F., Brurya Revach, Raanan Bulvik, Alina Maliutina, Ariel M. Rubinstein, Gabriel Nussbaum, Michael Elkin. (2015). Periodontal pathogens *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* promote tumor progression in an oral-specific chemical carcinogenesis model. *Oncotarget*, vol 6.
- Agha-Hosseini, F., Mirzaii-Dizgah, I., Mahboobi, N., Shirazian, S., & Harirchi, I. (2015). Serum and Saliva MMP-3 in Patients with OLP and Oral SCC. *J Contemp Dent Pract*, 16(2), 107-111. doi:10.5005/jp-journals-10024-1645
- Ahmed, S., & Shaikh, F. (2022). Increased Tim-3 and Gal-9 expression are related to poor prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Research Square PREPRINT (Version 1)*. doi:10.21203/rs.3.rs-1418045/v1
- Al-Hebshi, N. N., Nasher, A. T., Maryoud, M. Y., Homeida, H. E., Chen, T., Idris, A. M., & Johnson, N. W. (2017). Inflammatory bacteriome featuring *Fusobacterium nucleatum* and *Pseudomonas aeruginosa* identified in association with oral squamous cell carcinoma. *Sci Rep*, 7(1), 1834. doi:10.1038/s41598-017-02079-3
- Anand, S., Kaur, H., & Mande, S. S. (2016). Comparative In silico Analysis of Butyrate Production Pathways in Gut Commensals and Pathogens. *Front Microbiol*, 7, 1945. doi:10.3389/fmicb.2016.01945
- Arjunan, P., Meghil, M. M., Pi, W., Xu, J., Lang, L., El-Awady, A., . . . Cutler, C. W. (2018). Oral Pathobiont Activates Anti-Apoptotic Pathway, Promoting both Immune Suppression and Oncogenic Cell Proliferation. *Sci Rep*, 8(1), 16607. doi:10.1038/s41598-018-35126-8
- Biktasova, A. K., Dudimah, D. F., Uzhachenko, R. V., Park, K., Akhter, A., Arasada, R. R., . . . Dikov, M. M. (2015). Multivalent Forms of the Notch Ligand DLL-1 Enhance Antitumor T-cell Immunity in Lung Cancer and Improve Efficacy of EGFR-Targeted Therapy. *Cancer Res*, 75(22), 4728-4741. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1154
- Boggess, K. A., Lieff, S., Murtha, A. P., Moss, K., Beck, J., & Offenbacher, S. (2003). Maternal periodontal disease is associated with an increased risk

- for preeclampsia. *Obstet Gynecol*, 101(2), 227-231. doi:10.1016/s0029-7844(02)02314-1
- Bolstad, A. I., Jensen, H. B., & Bakken, V. (1996). Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin Microbiol Rev*, 9(1), 55-71. doi:10.1128/CMR.9.1.55
- Bronzato, J. D., Bomfim, R. A., Edwards, D. H., Crouch, D., Hector, M. P., & Gomes, B. (2020). Detection of *Fusobacterium* in oral and head and neck cancer samples: A systematic review and meta-analysis. *Arch Oral Biol*, 112, 104669. doi:10.1016/j.archoralbio.2020.104669
- Brook, I. (2013). Fusobacterial infections in children. *Curr Infect Dis Rep*, 15(3), 288-294. doi:10.1007/s11908-013-0340-6
- Cancer Genome Atlas, N. (2015). Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*, 517(7536), 576-582. doi:10.1038/nature14129
- Centella-Gutiérrez, C., & Dean-Ferrer, A. (2016). Aportaciones de la cirugía guiada por ordenador y navegación en oncología de cabeza y cuello. Una revisión bibliográfica sistemática y actualización. *Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial*, 38(3), 136-142. doi:10.1016/j.maxilo.2015.01.001
- Cetindis, M., Biegner, T., Munz, A., Teriete, P., Reinert, S., & Grimm, M. (2016). Glutaminolysis and carcinogenesis of oral squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 273(2), 495-503. doi:10.1007/s00405-015-3543-7
- Chang, C., Geng, F., Shi, X., Li, Y., Zhang, X., Zhao, X., & Pan, Y. (2019). The prevalence rate of periodontal pathogens and its association with oral squamous cell carcinoma. *Appl Microbiol Biotechnol*, 103(3), 1393-1404. doi:10.1007/s00253-018-9475-6
- Chen, L. F., Cohen, E. E., & Grandis, J. R. (2010). New strategies in head and neck cancer: understanding resistance to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Clin Cancer Res*, 16(9), 2489-2495. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2318
- Chow, L. Q. M. (2020). Head and Neck Cancer. *N Engl J Med*, 382(1), 60-72. doi:10.1056/NEJMra1715715
- Copenhagen-Glazer, S., Sol, A., Abed, J., Naor, R., Zhang, X., Han, Y. W., & Bachrach, G. (2015). Fap2 of *Fusobacterium nucleatum* is a galactose-inhibitable adhesin involved in coaggregation, cell adhesion, and preterm birth. *Infect Immun*, 83(3), 1104-1113. doi:10.1128/IAI.02838-14
- Dave, K., Ali, A., & Magalhaes, M. (2020). Increased expression of PD-1 and PD-L1 in oral lesions progressing to oral squamous cell carcinoma: a pilot study. *Sci Rep*, 10(1), 9705. doi:10.1038/s41598-020-66257-6
- Decsi, G., Soki, J., Pap, B., Dobra, G., Harmati, M., Korondi, S., . . . Buzas, K. (2019). Chicken or the Egg: Microbial Alterations in Biopsy Samples of Patients with Oral Potentially Malignant Disorders. *Pathol Oncol Res*, 25(3), 1023-1033. doi:10.1007/s12253-018-0457-x

- Didilescu, A. C., Rusu, D., Anghel, A., Nica, L., Ilescu, A., Greabu, M., . . . Stratul, S. I. (2012). Investigation of six selected bacterial species in endo-periodontal lesions. *Int Endod J*, 45(3), 282-293. doi:10.1111/j.1365-2591.2011.01974.x
- DIPRECE, M. (2020). Cáncer y otros tumores. Retrieved from <https://diprece.minsal.cl/programas-de-salud/cancer-y-otros-tumores/>
- Dong, J., Cheng, L., Zhao, M., Pan, X., Feng, Z., & Wang, D. (2017). Tim-3-expressing macrophages are functionally suppressed and expanded in oral squamous cell carcinoma due to virus-induced Gal-9 expression. *Tumour Biol*, 39(5), 1010428317701651. doi:10.1177/1010428317701651
- Duhen, T., Duhen, R., Montler, R., Moses, J., Moudgil, T., de Miranda, N. F., . . . Weinberg, A. D. (2018). Co-expression of CD39 and CD103 identifies tumor-reactive CD8 T cells in human solid tumors. *Nat Commun*, 9(1), 2724. doi:10.1038/s41467-018-05072-0
- Elebyary, O., Barbour, A., Fine, N., Tenenbaum, H. C., & Glogauer, M. (2020). The Crossroads of Periodontitis and Oral Squamous Cell Carcinoma: Immune Implications and Tumor Promoting Capacities. *Front Oral Health*, 1, 584705. doi:10.3389/froh.2020.584705
- Elola, M. T., Wolfenstein-Todel, C., Troncoso, M. F., Vasta, G. R., & Rabinovich, G. A. (2007). Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. *Cell Mol Life Sci*, 64(13), 1679-1700. doi:10.1007/s00018-007-7044-8
- Farina, A. R., & Mackay, A. R. (2014). Gelatinase B/MMP-9 in Tumour Pathogenesis and Progression. *Cancers (Basel)*, 6(1), 240-296. doi:10.3390/cancers6010240
- Farquhar, D. R., Divaris, K., Mazul, A. L., Weissler, M. C., Zevallos, J. P., & Olshan, A. F. (2017). Poor oral health affects survival in head and neck cancer. *Oral Oncol*, 73, 111-117. doi:10.1016/j.oraloncology.2017.08.009
- Frencken, J. E., Sharma, P., Stenhouse, L., Green, D., Lavery, D., & Dietrich, T. (2017). Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis - a comprehensive review. *J Clin Periodontol*, 44 Suppl 18, S94-S105. doi:10.1111/jcpe.12677
- Ganly, I., Yang, L., Giese, R. A., Hao, Y., Nossa, C. W., Morris, L. G. T., . . . Pei, Z. (2019). Periodontal pathogens are a risk factor of oral cavity squamous cell carcinoma, independent of tobacco and alcohol and human papillomavirus. *Int J Cancer*, 145(3), 775-784. doi:10.1002/ijc.32152
- Geng, F., Zhang, Y., Lu, Z., Zhang, S., & Pan, Y. (2020). Fusobacterium nucleatum Caused DNA Damage and Promoted Cell Proliferation by the Ku70/p53 Pathway in Oral Cancer Cells. *DNA Cell Biol*, 39(1), 144-151. doi:10.1089/dna.2019.5064
- Gharbia, S. E., & Shah, H. N. (1991). Pathways of glutamate catabolism among Fusobacterium species. *J Gen Microbiol*, 137(5), 1201-1206. doi:10.1099/00221287-137-5-1201

- Gholizadeh, P., Eslami, H., & Kafil, H. S. (2017). Carcinogenesis mechanisms of *Fusobacterium nucleatum*. *Biomed Pharmacother*, 89, 918-925. doi:10.1016/j.biopha.2017.02.102
- Giner, M., Montoya, M.J., Vázquez, M.A., Miranda, C., Miranda, M.J., & Pérez-Cano, R. (2016). ¿Qué son los microARNs?: posibles biomarcadores y dianas terapéuticas en la enfermedad osteoporótica. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 8, 40-44.
- Groeger, S., Zhou, Y., Ruf, S., & Meyle, J. (2022). Pathogenic Mechanisms of *Fusobacterium nucleatum* on Oral Epithelial Cells. *Front Oral Health*, 3, 831607. doi:10.3389/froh.2022.831607
- Gupta, S., Mohindra, R., Singla, M., Khera, S., Sahni, V., Kanta, P., . . . Raisanen, I. (2022). The clinical association between Periodontitis and COVID-19. *Clin Oral Investig*, 26(2), 1361-1374. doi:10.1007/s00784-021-04111-3
- Gur, C., Ibrahim, Y., Isaacson, B., Yamin, R., Abed, J., Gamliel, M., . . . Mandelboim, O. (2015). Binding of the Fap2 protein of *Fusobacterium nucleatum* to human inhibitory receptor TIGIT protects tumors from immune cell attack. *Immunity*, 42(2), 344-355. doi:10.1016/j.immuni.2015.01.010
- Hajishengallis, G. (2014). Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol*, 35(1), 3-11. doi:10.1016/j.it.2013.09.001
- Han, X. Y., Weinberg, J. S., Prabhu, S. S., Hassenbusch, S. J., Fuller, G. N., Tarrand, J. J., & Kontoyiannis, D. P. (2003). Fusobacterial brain abscess: a review of five cases and an analysis of possible pathogenesis. *J Neurosurg*, 99(4), 693-700. doi:10.3171/jns.2003.99.4.0693
- Harrandah, A. M., Chukkapalli, S. S., Bhattacharyya, I., Progulsk-Fox, A., & Chan, E. K. L. (2020). Fusobacteria modulate oral carcinogenesis and promote cancer progression. *J Oral Microbiol*, 13(1), 1849493. doi:10.1080/20002297.2020.1849493
- Hashikawa, T., Takedachi, M., Terakura, M., Saho, T., Yamada, S., Thompson, L. F., . . . Murakami, S. (2003). Involvement of CD73 (ecto-5'-nucleotidase) in adenosine generation by human gingival fibroblasts. *J Dent Res*, 82(11), 888-892. doi:10.1177/154405910308201108
- Hayes, R. B., Ahn, J., Fan, X., Peters, B. A., Ma, Y., Yang, L., . . . Pei, Z. (2018). Association of Oral Microbiome With Risk for Incident Head and Neck Squamous Cell Cancer. *JAMA Oncol*, 4(3), 358-365. doi:10.1001/jamaoncol.2017.4777
- Hoppe, T., Kraus, D., Novak, N., Probstmeier, R., Frentzen, M., Wenghoefer, M., . . . Winter, J. (2016). Oral pathogens change proliferation properties of oral tumor cells by affecting gene expression of human defensins. *Tumour Biol*, 37(10), 13789-13798. doi:10.1007/s13277-016-5281-x
- Jeske, S. S., Schuler, P. J., Doescher, J., Theodoraki, M. N., Laban, S., Brunner, C., . . . Wigand, M. C. (2020). Age-related changes in T lymphocytes of

- patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Immun Ageing*, 17, 3. doi:10.1186/s12979-020-0174-7
- Ji, S., Shin, J. E., Kim, Y. C., & Choi, Y. (2010). Intracellular degradation of *Fusobacterium nucleatum* in human gingival epithelial cells. *Mol Cells*, 30(6), 519-526. doi:10.1007/s10059-010-0142-8
- Johnson, S., Chen, H., & Lo, P. K. (2013). In vitro Tumorsphere Formation Assays. *Bio Protoc*, 3(3). doi:10.21769/bioprotoc.325
- Kamarajan, P., Ateia, I., Shin, J. M., Fenno, J. C., Le, C., Zhan, L., . . . Kapila, Y. L. (2020). Periodontal pathogens promote cancer aggressivity via TLR/MyD88 triggered activation of Integrin/FAK signaling that is therapeutically reversible by a probiotic bacteriocin. *PLoS Pathog*, 16(10), e1008881. doi:10.1371/journal.ppat.1008881
- Kapatral, V., Anderson, I., Ivanova, N., Reznik, G., Los, T., Lykidis, A., . . . Overbeek, R. (2002). Genome sequence and analysis of the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* strain ATCC 25586. *J Bacteriol*, 184(7), 2005-2018. doi:10.1128/JB.184.7.2005-2018.2002
- Kolenbrander, P. E. (2011). Oral microbial communities: genomic inquiry and interspecies communication. . *American Society for Microbiology Press*.
- Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J., Jr., Periasamy, S., & Jakubovics, N. S. (2010). Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol*, 8(7), 471-480. doi:10.1038/nrmicro2381
- Kostic, A. D., Xavier, R. J., & Gevers, D. (2014). The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology*, 146(6), 1489-1499. doi:10.1053/j.gastro.2014.02.009
- Kubala, M. H., & DeClerck, Y. A. (2019). The plasminogen activator inhibitor-1 paradox in cancer: a mechanistic understanding. *Cancer Metastasis Rev*, 38(3), 483-492. doi:10.1007/s10555-019-09806-4
- Kumar, A., Taghi Khani, A., Sanchez Ortiz, A., & Swaminathan, S. (2022). GM-CSF: A Double-Edged Sword in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*, 13, 901277. doi:10.3389/fimmu.2022.901277
- Laimer, K., Spizzo, G., Gastl, G., Obrist, P., Brunhuber, T., Fong, D., . . . Norer, B. (2007). High EGFR expression predicts poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: a TMA-based immunohistochemical analysis. *Oral Oncol*, 43(2), 193-198. doi:10.1016/j.oraloncology.2006.02.009
- Lamont, R. J., Koo, H., & Hajishengallis, G. (2018). The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol*, 16(12), 745-759. doi:10.1038/s41579-018-0089-x
- Lee, J., Roberts, J. S., Atanasova, K. R., Chowdhury, N., Han, K., & Yilmaz, O. (2017). Human Primary Epithelial Cells Acquire an Epithelial-Mesenchymal-Transition Phenotype during Long-Term Infection by the Oral Opportunistic Pathogen, *Porphyromonas gingivalis*. *Front Cell Infect Microbiol*, 7, 493. doi:10.3389/fcimb.2017.00493

- Lee, J. S., Chowdhury, N., Roberts, J. S., & Yilmaz, O. (2020). Host surface ectonucleotidase-CD73 and the opportunistic pathogen, *Porphyromonas gingivalis*, cross-modulation underlies a new homeostatic mechanism for chronic bacterial survival in human epithelial cells. *Virulence*, *11*(1), 414-429. doi:10.1080/21505594.2020.1763061
- Lewkowicz, N., Mycko, M. P., Przygodzka, P., Cwiklinska, H., Cichalewska, M., Matysiak, M., . . . Lewkowicz, P. (2016). Induction of human IL-10-producing neutrophils by LPS-stimulated Treg cells and IL-10. *Mucosal Immunol*, *9*(2), 364-378. doi:10.1038/mi.2015.66
- Li, Y., He, J., Wang, F., Wang, X., Yang, F., Zhao, C., . . . Li, T. (2020). Role of MMP-9 in epithelial-mesenchymal transition of thyroid cancer. *World J Surg Oncol*, *18*(1), 181. doi:10.1186/s12957-020-01958-w
- Liu, J. C., Deng, T., Lehal, R. S., Kim, J., & Zacksenhaus, E. (2007). Identification of tumorsphere- and tumor-initiating cells in HER2/Neu-induced mammary tumors. *Cancer Res*, *67*(18), 8671-8681. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1486
- Liu, X., Li, Q., Zhou, Y., He, X., Fang, J., Lu, H., . . . Wang, Z. (2021). Dysfunctional role of elevated TIGIT expression on T cells in oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Dis*, *27*(7), 1667-1677. doi:10.1111/odi.13703
- Liu, X., Wu, J., Zhang, D., Bing, Z., Tian, J., Ni, M., . . . Liu, S. (2018). Identification of Potential Key Genes Associated With the Pathogenesis and Prognosis of Gastric Cancer Based on Integrated Bioinformatics Analysis. *Front Genet*, *9*, 265. doi:10.3389/fgene.2018.00265
- Lv, K., Zhang, Y., Zhang, M., Zhong, M., & Suo, Q. (2013). Galectin-9 promotes TGF-beta1-dependent induction of regulatory T cells via the TGF-beta/Smad signaling pathway. *Mol Med Rep*, *7*(1), 205-210. doi:10.3892/mmr.2012.1125
- Lv, X. X., Zheng, X. Y., Yu, J. J., Ma, H. R., Hua, C., & Gao, R. T. (2020). EGFR enhances the stemness and progression of oral cancer through inhibiting autophagic degradation of SOX2. *Cancer Med*, *9*(3), 1131-1140. doi:10.1002/cam4.2772
- Maier, M. K., Seth, S., Czeloth, N., Qiu, Q., Ravens, I., Kremmer, E., . . . Bernhardt, G. (2007). The adhesion receptor CD155 determines the magnitude of humoral immune responses against orally ingested antigens. *Eur J Immunol*, *37*(8), 2214-2225. doi:10.1002/eji.200737072
- Mao, L., Xiao, Y., Yang, Q. C., Yang, S. C., Yang, L. L., & Sun, Z. J. (2021). TIGIT/CD155 blockade enhances anti-PD-L1 therapy in head and neck squamous cell carcinoma by targeting myeloid-derived suppressor cells. *Oral Oncol*, *121*, 105472. doi:10.1016/j.oraloncology.2021.105472
- Marongiu, L., Landry, J. J. M., Rausch, T., Abba, M. L., Delecluse, S., Delecluse, H. J., & Allgayer, H. (2021). Metagenomic analysis of primary colorectal carcinomas and their metastases identifies potential microbial risk factors. *Mol Oncol*, *15*(12), 3363-3384. doi:10.1002/1878-0261.13070

- Maymone, M. B. C., Greer, R. O., Kesecker, J., Sahitya, P. C., Burdine, L. K., Cheng, A. D., . . . Vashi, N. A. (2019). Premalignant and malignant oral mucosal lesions: Clinical and pathological findings. *J Am Acad Dermatol*, *81*(1), 59-71. doi:10.1016/j.jaad.2018.09.060
- Misko, A., Ferguson, T., & Notterpek, L. (2002). Matrix metalloproteinase mediated degradation of basement membrane proteins in Trembler J neuropathy nerves. *J Neurochem*, *83*(4), 885-894. doi:10.1046/j.1471-4159.2002.01200.x
- Mohri, Y. (1997). Prognostic significance of E-cadherin expression in human colorectal cancer tissue. *Surg Today*, *27*(7), 606-612. doi:10.1007/BF02388215
- Muniz, J. M., Bibiano Borges, C. R., Beghini, M., de Araujo, M. S., Miranda Alves, P., de Lima, L. M., . . . Rodrigues, D. B. (2015). Galectin-9 as an important marker in the differential diagnosis between oral squamous cell carcinoma, oral leukoplakia and oral lichen planus. *Immunobiology*, *220*(8), 1006-1011. doi:10.1016/j.imbio.2015.04.004
- Mustapha, I. Z., Debrey, S., Oladubu, M., & Ugarte, R. (2007). Markers of systemic bacterial exposure in periodontal disease and cardiovascular disease risk: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*, *78*(12), 2289-2302. doi:10.1902/jop.2007.070140
- Nandi, S. S., Gohil, T., Sawant, S. A., Lambe, U. P., Ghosh, S., & Jana, S. (2022). CD155: A Key Receptor Playing Diversified Roles. *Curr Mol Med*, *22*(7), 594-607. doi:10.2174/1566524021666210910112906
- Neuzillet, C., Marchais, M., Vacher, S., Hilmi, M., Schnitzler, A., Meseure, D., . . . Bieche, I. (2021). Prognostic value of intratumoral *Fusobacterium nucleatum* and association with immune-related gene expression in oral squamous cell carcinoma patients. *Sci Rep*, *11*(1), 7870. doi:10.1038/s41598-021-86816-9
- Nosratzahi, T., Alijani, E., & Moodi, M. (2017). Salivary MMP-1, MMP-2, MMP-3 and MMP-13 Levels in Patients with Oral Lichen Planus and Squamous Cell Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*, *18*(7), 1947-1951. doi:10.22034/APJCP.2017.18.7.1947
- Page, R. C., Offenbacher, S., Schroeder, H. E., Seymour, G. J., & Kornman, K. S. (1997). Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000*, *14*, 216-248. doi:10.1111/j.1600-0757.1997.tb00199.x
- Pan, C., Xu, X., Tan, L., Lin, L., & Pan, Y. (2014). The effects of *Porphyromonas gingivalis* on the cell cycle progression of human gingival epithelial cells. *Oral Dis*, *20*(1), 100-108. doi:10.1111/odi.12081
- Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., . . . Tonetti, M. S. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*, *45* Suppl 20, S162-S170. doi:10.1111/jcpe.12946

- Park, S. Y., Lee, S. A., Han, I. H., Yoo, B. C., Lee, S. H., Park, J. Y., . . . Choi, S. W. (2007). Clinical significance of metabotropic glutamate receptor 5 expression in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, *17*(1), 81-87. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17143482>
- Pastushenko, I., & Blanpain, C. (2019). EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends Cell Biol*, *29*(3), 212-226. doi:10.1016/j.tcb.2018.12.001
- Piao, J. Y., Lee, H. G., Kim, S. J., Kim, D. H., Han, H. J., Ngo, H. K., . . . Surh, Y. J. (2016). Helicobacter pylori Activates IL-6-STAT3 Signaling in Human Gastric Cancer Cells: Potential Roles for Reactive Oxygen Species. *Helicobacter*, *21*(5), 405-416. doi:10.1111/hel.12298
- Puebla-Osorio, N., Kim, J., Ojeda, S., Zhang, H., Tavana, O., Li, S., . . . Zhu, C. (2014). A novel Ku70 function in colorectal homeostasis separate from nonhomologous end joining. *Oncogene*, *33*(21), 2748-2757. doi:10.1038/onc.2013.234
- Pussinen, P. J., Nyssonen, K., Alfthan, G., Salonen, R., Laukkanen, J. A., & Salonen, J. T. (2005). Serum antibody levels to Actinobacillus actinomycetemcomitans predict the risk for coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *25*(4), 833-838. doi:10.1161/01.ATV.0000157982.69663.59
- Radaic, A., & Kapila, Y. L. (2021). The oralome and its dysbiosis: New insights into oral microbiome-host interactions. *Comput Struct Biotechnol J*, *19*, 1335-1360. doi:10.1016/j.csbj.2021.02.010
- Ren, Z. H., Yuan, Y. X., Ji, T., & Zhang, C. P. (2016). CD73 as a novel marker for poor prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*, *12*(1), 556-562. doi:10.3892/ol.2016.4652
- Ritprajak, P., & Azuma, M. (2015). Intrinsic and extrinsic control of expression of the immunoregulatory molecule PD-L1 in epithelial cells and squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, *51*(3), 221-228. doi:10.1016/j.oraloncology.2014.11.014
- Rubinstein, M. R., Wang, X., Liu, W., Hao, Y., Cai, G., & Han, Y. W. (2013). Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/beta-catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe*, *14*(2), 195-206. doi:10.1016/j.chom.2013.07.012
- Sakamoto, Y., Mima, K., Ishimoto, T., Ogata, Y., Imai, K., Miyamoto, Y., . . . Baba, H. (2021). Relationship between Fusobacterium nucleatum and antitumor immunity in colorectal cancer liver metastasis. *Cancer Sci*, *112*(11), 4470-4477. doi:10.1111/cas.15126
- Sakanaka, A., Kuboniwa, M., Shimma, S., Alghamdi, S. A., Mayumi, S., Lamont, R. J., . . . Amano, A. (2022). Fusobacterium nucleatum Metabolically Integrates Commensals and Pathogens in Oral Biofilms. *mSystems*, *7*(4), e0017022. doi:10.1128/msystems.00170-22
- Shah, H. N., Gharbia, S. E., & Zhang, M. I. (1993). Measurement of electrical bioimpedance for studying utilization of amino acids and peptides by

- Porphyromonas gingivalis, Fusobacterium nucleatum, and Treponema denticola. *Clin Infect Dis*, 16 Suppl 4, S404-407. doi:10.1093/clinids/16.supplement_4.s404
- Shao, W., Fujiwara, N., Mouri, Y., Kisoda, S., Yoshida, K., Yoshida, K., . . . Kudo, Y. (2021). Conversion from epithelial to partial-EMT phenotype by Fusobacterium nucleatum infection promotes invasion of oral cancer cells. *Sci Rep*, 11(1), 14943. doi:10.1038/s41598-021-94384-1
- Shen, L., Chen, C. Y., Huang, D., Wang, R., Zhang, M., Qian, L., . . . Chen, Z. W. (2017). Pathogenic Events in a Nonhuman Primate Model of Oral Poliovirus Infection Leading to Paralytic Poliomyelitis. *J Virol*, 91(14). doi:10.1128/JVI.02310-16
- Sillen, M., & Declerck, P. J. (2021). A Narrative Review on Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Its (Patho)Physiological Role: To Target or Not to Target? *Int J Mol Sci*, 22(5). doi:10.3390/ijms22052721
- Sommariva, M., & Gagliano, N. (2020). E-Cadherin in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Multifaceted Actor during EMT. *Cells*, 9(4). doi:10.3390/cells9041040
- Sreenivasan, P. K., & Prasad, K. V. V. (2017). Distribution of dental plaque and gingivitis within the dental arches. *J Int Med Res*, 45(5), 1585-1596. doi:10.1177/0300060517705476
- Stanko, P., & Izakovicova Holla, L. (2014). Bidirectional association between diabetes mellitus and inflammatory periodontal disease. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 158(1), 35-38. doi:10.5507/bp.2014.005
- Suh, Y. S., Yu, J., Kim, B. C., Choi, B., Han, T. S., Ahn, H. S., . . . Yang, H. K. (2015). Overexpression of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Advanced Gastric Cancer with Aggressive Lymph Node Metastasis. *Cancer Res Treat*, 47(4), 718-726. doi:10.4143/crt.2014.064
- Tanner, A. C., Paster, B. J., Lu, S. C., Kanasi, E., Kent, R., Jr., Van Dyke, T., & Sonis, S. T. (2006). Subgingival and tongue microbiota during early periodontitis. *J Dent Res*, 85(4), 318-323. doi:10.1177/154405910608500407
- Temoin, S., Wu, K. L., Wu, V., Shoham, M., & Han, Y. W. (2012). Signal peptide of FadA adhesin from Fusobacterium nucleatum plays a novel structural role by modulating the filament's length and width. *FEBS Lett*, 586(1), 1-6. doi:10.1016/j.febslet.2011.10.047
- Tsai, J. Y., Lee, M. J., Dah-Tsyr Chang, M., & Huang, H. (2014). The effect of catalase on migration and invasion of lung cancer cells by regulating the activities of cathepsin S, L, and K. *Exp Cell Res*, 323(1), 28-40. doi:10.1016/j.yexcr.2014.02.014
- Vigneswaran, N., & Williams, M. D. (2014). Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*, 26(2), 123-141. doi:10.1016/j.coms.2014.01.001

- Wang, Q., Yu, C., Yue, C., & Liu, X. (2020). Fusobacterium nucleatum produces cancer stem cell characteristics via EMT-resembling variations. *Int J Clin Exp Pathol*, 13(7), 1819-1828. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32782710>
- Wang, X., Buhimschi, C. S., Temoin, S., Bhandari, V., Han, Y. W., & Buhimschi, I. A. (2013). Comparative microbial analysis of paired amniotic fluid and cord blood from pregnancies complicated by preterm birth and early-onset neonatal sepsis. *PLoS One*, 8(2), e56131. doi:10.1371/journal.pone.0056131
- Wen, L., Mu, W., Lu, H., Wang, X., Fang, J., Jia, Y., . . . Cheng, B. (2020). Porphyromonas gingivalis Promotes Oral Squamous Cell Carcinoma Progression in an Immune Microenvironment. *J Dent Res*, 99(6), 666-675. doi:10.1177/0022034520909312
- Woo, B. H., Kim, D. J., Choi, J. I., Kim, S. J., Park, B. S., Song, J. M., . . . Park, H. R. (2017). Oral cancer cells sustainedly infected with Porphyromonas gingivalis exhibit resistance to Taxol and have higher metastatic potential. *Oncotarget*, 8(29), 46981-46992. doi:10.18632/oncotarget.16550
- Wu, T., Tang, C., Tao, R., Yong, X., Jiang, Q., & Feng, C. (2021). PD-L1-Mediated Immunosuppression in Oral Squamous Cell Carcinoma: Relationship With Macrophage Infiltration and Epithelial to Mesenchymal Transition Markers. *Front Immunol*, 12, 693881. doi:10.3389/fimmu.2021.693881
- Yang, N. Y., Zhang, Q., Li, J. L., Yang, S. H., & Shi, Q. (2014). Progression of periodontal inflammation in adolescents is associated with increased number of Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Tannerella forsythensis, and Fusobacterium nucleatum. *Int J Paediatr Dent*, 24(3), 226-233. doi:10.1111/ipd.12065
- Yao, Q. W., Zhou, D. S., Peng, H. J., Ji, P., & Liu, D. S. (2014). Association of periodontal disease with oral cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol*, 35(7), 7073-7077. doi:10.1007/s13277-014-1951-8
- Ye, P., Nadkarni, M. A., & Hunter, N. (2006). Regulation of E-cadherin and TGF-beta3 expression by CD24 in cultured oral epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 349(1), 229-235. doi:10.1016/j.bbrc.2006.08.033
- Yin, L., & Dale, B. A. (2007). Activation of protective responses in oral epithelial cells by Fusobacterium nucleatum and human beta-defensin-2. *J Med Microbiol*, 56(Pt 7), 976-987. doi:10.1099/jmm.0.47198-0
- Youngnak-Piboonratanakit, P., Tsushima, F., Otsuki, N., Igarashi, H., Machida, U., Iwai, H., . . . Azuma, M. (2004). The expression of B7-H1 on keratinocytes in chronic inflammatory mucocutaneous disease and its regulatory role. *Immunol Lett*, 94(3), 215-222. doi:10.1016/j.imlet.2004.05.007
- Yu, M. R., Kim, H. J., & Park, H. R. (2020). Fusobacterium nucleatum Accelerates the Progression of Colitis-Associated Colorectal Cancer by Promoting EMT. *Cancers (Basel)*, 12(10). doi:10.3390/cancers12102728

- Zhan, Y., Lew, A. M., & Chopin, M. (2019). The Pleiotropic Effects of the GM-CSF Rheostat on Myeloid Cell Differentiation and Function: More Than a Numbers Game. *Front Immunol*, 10, 2679. doi:10.3389/fimmu.2019.02679
- Zhang, S., Li, C., Liu, J., Geng, F., Shi, X., Li, Q., . . . Pan, Y. (2020). *Fusobacterium nucleatum* promotes epithelial-mesenchymal transition through regulation of the lncRNA MIR4435-2HG/miR-296-5p/Akt2/SNAI1 signaling pathway. *FEBS J*, 287(18), 4032-4047. doi:10.1111/febs.15233
- Zhao, H., Chu, M., Huang, Z., Yang, X., Ran, S., Hu, B., . . . Liang, J. (2017). Variations in oral microbiota associated with oral cancer. *Sci Rep*, 7(1), 11773. doi:10.1038/s41598-017-11779-9
- Zheng, Y., Li, Y., Tang, B., Zhao, Q., Wang, D., Liu, Y., . . . Huang, L. (2020). IL-6-induced CD39 expression on tumor-infiltrating NK cells predicts poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*, 69(11), 2371-2380. doi:10.1007/s00262-020-02629-1

10.ANEXOS



Universidad de Concepción
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo
Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad

CEBB 888-2021

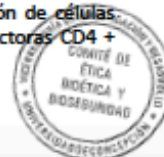
Concepción, abril de 2021.

CERTIFICADO

El Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Concepción ha revisado el **PROYECTO N° 1211480** titulado *"STUDY OF THE METABOLIC REPROGRAMING OF EFFECTOR CD4+T CELLS BY MITOCHONDRIA TRANSFER IN ORAL CANCER AND ITS EFFECT UPON T HELPER AND T-DEPENDENT B CELL RESPONSES."*, postulado al **CONCURSO FONDECYT REGULAR 2021** por la **DRA. ESTEFANIA ANDREA NOVA LAMPERTI**, Investigadora Responsable, académica adscrita al Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, y ha comprobado que cumple con las normas y procedimientos éticos, bioéticos y de bioseguridad establecidos nacional e internacionalmente para investigación científica que contempla manipulación de material biológico de origen humano (sangre) y sus residuos, tanto biológicos como químicos, como así también el debido tratamiento de datos de salud humana.

El objetivo general del proyecto propuesto es Identificar el mecanismo mediado por mitocondrias por el cual el tumor del cáncer oral induce una reprogramación metabólica en los linfocitos T y cómo este cambio afecta la respuesta de éstas células.

El desarrollo metodológico del **PROYECTO N° 1211480** detalla de manera rigurosa la ejecución de las actividades descritas en 05 (cinco) objetivos específicos. Inicialmente buscará 1) caracterizar el perfil proteómico asociado con la señalización mitocondrial en la célula tumoral primaria, secretoma derivado de línea celular y de biopsia de pacientes con cáncer oral y controles sanos, para luego 2) identificar el mecanismo principal del tráfico extracelular de mitocondrias desde secretomas de pacientes con cáncer oral y controles sanos, a los efectores T de las células auxiliares. En un tercer objetivo, 3) se propone determinar la reprogramación metabólica de los efectores T de las células auxiliares por el secretoma de pacientes con cáncer oral y controles sanos en presencia o ausencia de mitocondrias, y 4) determinar la reprogramación metabólica de los efectores T de las células auxiliares por el secretoma de pacientes con cáncer oral y controles sanos en presencia o ausencia de mitocondrias. 5) Finalmente, propone analizar la activación de células B, la diferenciación de células plasmáticas y la producción de anticuerpos en co-cultivos entre Células B y células T efectoras CD4 + previamente tratadas con secretoma de pacientes con cáncer oral y controles sanos.



Barrio Universitario s/n,
Edificio Farmacia



Universidad de Concepción
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo
Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad

La participación de cada sujeto -un grupo de 40 individuos, mayores de 18, años diagnosticados con cáncer de cabeza y cuello y controles sanos (n=40 individuos), mayores de 18 años y sin diagnóstico de ningún tipo de cáncer que requieran cirugía oral para tratamientos dentales- estará basada en el proceso de Consentimiento Informado, que será documentado conforme modelo presentado a este Comité institucional, y regularmente firmado.

Los pacientes con cáncer oral y controles sanos, serán reclutados desde la Unidad de Anatomía Patológica y Unidad de Consultas y Procedimientos Odontológicos del Hospital "Las Higueras", de Talcahuano, por la Dra. Milly Yañez, quién les dará a conocer las bases y los fundamentos de este estudio.

Los individuos sanos también serán reclutados desde el Centro de Salud Familiar de Penco por la Dra. Lorena Nova, quién por su parte, también les dará a conocer las bases y los fundamentos de este estudio.

Toda la información y los resultados de los estudios enmarcados en el **PROYECTO Nº 1211480**, serán custodiados por la Investigadora Responsable, Dra. Estefanía Andrea Nova Lamperti.

La ejecución de las actividades descritas en el proyecto en pauta asegura que no vulnera los derechos y la dignidad de los participantes en el estudio, garantizando la autonomía, la libertad, la voluntariedad y la privacidad de los mismos, presentando para ello los métodos de protección que aseguran la confidencialidad de los datos de investigación y de custodia estricta de la información obtenida, observando todas las características formales y necesarias para su validez.

Todos los aspectos del trabajo metodológico, se encuentran detalladamente descritos en la propuesta del proyecto y las actividades serán realizadas por el personal científico, profesional y de apoyo del Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción y de las instituciones asociadas. El equipo de investigadores de la Universidad de Concepción cuenta con la calificación y destrezas necesarias para llevar a buen término los diferentes ensayos que se tiene contemplado, bajo la rigurosa aplicación de protocolos de trabajo establecidos y de carácter rutinario en las respectivas dependencias de nuestra casa de estudios superiores. Por tanto, si bien se utilizará material biológico y químico para los estudios previstos en la propuesta, su respectiva manipulación estará bajo los cuidados adecuados y necesarios, así como también observando las normas pertinentes.

El tratamiento y disposición de los residuos biológicos y químicos generados en el desarrollo del presente proyecto, dentro del Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, estarán regulados por MATPEL - Plan de Manejo de Sustancias y Residuos Peligrosos de la Vicerrectoría de Asuntos Económicos y Administrativos (2005), y conforme a las indicaciones del Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados (2018), normas formalizadas por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica – CONICYT y adoptado por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo – ANID del Ministerio de Ciencia, Tecnología, Conocimiento e Innovación del Gobierno de Chile.





Universidad de Concepción
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo
Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad

Considerando que el PROYECTO N° 1211480 titulado "STUDY OF THE METABOLIC REPROGRAMING OF EFFECTOR CD4+T CELLS BY MITOCHONDRIA TRANSFER IN ORAL CANCER AND ITS EFFECT UPON T HELPER AND T-DEPENDENT B CELL RESPONSES.", postulado al CONCURSO FONDECYT REGULAR 2021 por la DRA. ESTEFANIA ANDREA NOVA LAMPERTI, cumple con la Ley N° 20.380, sobre Protección de Animales, con el Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados (CONICYT-FONDECYT, 2018), adoptado por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo - ANID, con el Reglamento de Manejo de Residuos Peligrosos de la Vicerrectoría de Asuntos Económicos y Administrativos de la Universidad de Concepción y su respectivo Plan de Manejo de Sustancias y Residuos Peligrosos (MATPEL), así también con los principios y normas obligatorias delineadas con base en la Declaración de Singapur sobre la Integridad en la Investigación (2010) para investigadores de proyectos CONICYT, (conforme lo establecido por la Res. Exenta N° 157, del 24 de enero de 2013) y no muestra elementos que puedan transgredir las normas y principios éticos rectores de nuestra Institución Universitaria, este Comité resuelve aprobarlo, confiriendo el presente Certificado.

DRA. M. ANDREA RODRÍGUEZ TASTETS
PRESIDENTA

COMITÉ DE ÉTICA, BIOÉTICA Y BIOSEGURIDAD
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN



Barrio Universitario s/n,
Edificio Empreudec
Fono (56-41) 2204302
Casilla 160 C – Correo 3, secrevrid@udec.cl
Concepción, Chile



Este documento ha sido firmado electrónicamente por:
Merla Andrea Rodríguez Tastets - am.drea@udec.cl -
Certificado por E-Sign S.A. en conformidad a la Ley 19.799

NÚMERO DE FOLIO:

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

INFORMACIÓN.

Título del Estudio: ESTUDIO DE LA REPROGRAMACIÓN METABÓLICA DE CÉLULAS T HELPER EN LA RESPUESTA ANTI-TUMORAL EN PACIENTES CON CÁNCER ORAL.

PROYECTO N° 1211480 - CONCURSO FONDECYT REGULAR 2020.

EQUIPO DE INVESTIGACIÓN E INSTITUCIONES PARTICIPANTES

- 1.- Investigador Responsable: Dra. Estefanía Nova Lamperti, PhD (Bioquímico).
- 2.- Co-Investigador Interno: Dr. Andy Pérez, PhD (Químico).
- 3.- Co-Investigador Externo: Dra. Patricia Luz, PhD (Ing. Biotecnología).
- 4.- Odontólogo Patólogo: Dra. Milly Yañez (Cirujano dentista - Patólogo).
- 5.- Odontólogo: Dra. María Lorena Nova (Cirujano dentista).
- 6.- Bioquímico de Laboratorio Clínico: Dra. Liliana Lamperti, PhD (Bioquímico)
- 7.- Estudiante tesista: Camilo Cabrera (estudiante tesista de bioquímica).
- 8.- Estudiante tesista: Bárbara Antilef (estudiante tesista de bioquímica).
- 9.- Estudiante tesista: Romina Quiroga (estudiante tesista de bioquímica).
- 10.- Estudiante tesista: Sergio Sanhueza (estudiante tesista de bioquímica).
- 11.- Estudiante tesista: Camila Muñoz (estudiante tesista de Magíster).
- 12.- Investigador Asociado: Mauricio Hernandez, MSc (Bioquímico)

CENTROS DE INVESTIGACIÓN:

1, 7, 8, 9, 10 & 11 Laboratorio de Inmunología Molecular & Translacional, Departamento Bioquímica Clínica e Inmunología, Facultad de Farmacia. Universidad de Concepción. 2 Departamento de Análisis Instrumental, Facultad de Farmacia. Universidad de Concepción. 3 Centro de Investigación Biomédica, Universidad de los Andes. 4 Unidad Anatomía Patológica y Unidad de Consultas y Procedimientos Odontológicos, Hospital "Las Higueras", Talcahuano. 5 Centro de Salud Familiar de Penco. 6 Laboratorio clínico-genético PreveGen. 12 Instituto Melisa

Contacto Investigador Responsable:

Dra. Estefanía Nova Lamperti, Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción. Teléfono +56 41-2203167, e-mail: enova@udec.cl.



Versión y fecha de Protocolo: Versión 2, marzo 2021.

Centro Investigación: Dpto. Bioquímica Clínica e Inmunología. Facultad Farmacia, Universidad de Concepción.

Investigador responsable: Dra. Estefanía Nova Lamperti.

Iniciales del participante: _____

1

Introducción.

El presente estudio pretende determinar cómo el ambiente tumoral reprograma metabólicamente a los linfocitos T por medio de la transferencia de mitocondrias y cómo este cambio afecta la participación de estas células en la respuesta de defensa frente al cáncer. Dentro del sistema inmune, los linfocitos T nos ayudan a defendernos de agentes patógenos. Lamentablemente, el cáncer modifica la funcionalidad de estas células, lo que afecta el ataque del sistema inmune hacia el cáncer. Entender qué tipo de cambios metabólicos genera el cáncer en estas células y cómo este cambio afecta la función de los linfocitos, nos ayudaría a proponer nuevas herramientas terapéuticas para prevenir el desarrollo del tumor.

Objetivo del estudio.

Identificar el mecanismo mediado por mitocondrias por el cual el tumor del cáncer oral induce una reprogramación metabólica en los linfocitos T y cómo este cambio afecta la funcionalidad de éstas células.

Fundamento de la Investigación.

Publicaciones científicas recientes de nuestro equipo de trabajo, han determinado la presencia distintiva de células T con fenotipo regulador y con baja respuesta efectora en tumores de pacientes con cáncer oral. Es relevante comprender cómo se induce este desbalance dentro de la respuesta inmune, por lo que realizamos un análisis de las proteínas presentes en el ambiente de los tumores y observamos una gran cantidad de proteínas mitocondriales. Se ha reportado que la transferencia de mitocondrias induce una reprogramación negativa, por lo que analizaremos si la transferencia de mitocondrias es la responsable de este desbalance y cambios en las respuesta.

Diseño del Estudio

Participarán en el estudio un grupo de 40 individuos mayores de 18 años diagnosticados con cáncer de cabeza y cuello. Para controles sanos se utilizarán 40 individuos mayores de 18 años sin diagnóstico de ningún tipo de cáncer que requieran cirugía oral para tratamientos dentales.

Los pacientes con cáncer oral y controles sanos, serán reclutados desde la Unidad de Anatomía Patológica y Unidad de Consultas y Procedimientos Odontológicos del Hospital "Las Higueras", de Talcahuano, por la Dra. Milly Yañez, quién les dará a conocer las bases y los fundamentos de este estudio.

Los individuos sanos también serán reclutados desde el Centro de Salud Familiar de Penco por la Dra. Lorena Nova, quién les dará a conocer las bases y los fundamentos de este estudio.



Versión y fecha de Protocolo: Versión 2, marzo 2021.

Centro Investigación: Dpto. Bioquímica Clínica e Inmunología, Facultad Farmacia, Universidad de Concepción.

Investigador responsable: Dra. Estefanía Nova Lamperti.

Iniciales del participante: _____

Participación y retiro del paciente

Se invita a Ud. a participar de manera libre y voluntaria de este estudio.

Si decide participar debe saber que todos sus datos personales, datos de ficha clínica y consentimiento informado que estén relacionados con este estudio, serán mantenidos bajo custodia por parte del Investigador Responsable. Su aceptación, será condicionada a la firma de este documento.

Ud. tiene el derecho de no autorizar la investigación y para ello basta que no firme la parte final de este documento. También puede dejar de participar cuando lo desee en cualquier momento, sin que ello importe responsabilidad, sanción o pérdida de beneficio alguno en su atención en salud. Si decide dejar de participar, se solicita que informe al Investigador Responsable, Dra. Estefanía Nova Lamperti por correo electrónico para que sus datos sean excluidos del estudio.

Si acepta participar y es paciente diagnosticado con cáncer, se le solicita:

1. su autorización de acceso a datos clínicos que constan en su ficha clínica, siendo sólo datos que tengan estricta relación con su enfermedad y el estado del cáncer,
2. su autorización para la toma de una muestra de sangre, procedimiento a ser realizado por un profesional enfermero del Hospital o del Centro de Salud, en una sola ocasión a todos los participantes del estudio,
3. autorización para la recolección de sus tejidos orales obtenidos mediante procedimientos quirúrgicos que serán realizados por la Dra. Milly Yañez y Dra. Lorena Nova.
4. su autorización para la toma de una muestra de saliva, procedimiento a ser realizado por un profesional enfermero del Hospital o del Centro de Salud, en una sola ocasión a todos los participantes del estudio.

Toma de muestra

En pacientes se obtendrán muestras de sangre y tejido.

Previo a la cirugía para la obtención del tejido oral se tomará una muestra de sangre de 10mL (4 cucharadas de té) en el laboratorio del "Hospital Las Higueras" con la orden de la patóloga Dra. Milly Yañez.

El tejido canceroso (tamaño de una lenteja) será extirpado por el médico tratante, el tejido será llevado a la Unidad de Anatomía Patológica del "Hospital Las Higueras" y la Dra. Milly Yañez separará el tejido para hacer la investigación (zona sana y zona cancerosa) de acuerdo a la guía clínica del Hospital.

Una vez que el patólogo nos entregue la muestra, ésta será llevada a la Universidad de Concepción, bajo un estricto cumplimiento de medidas de bioseguridad y será procesada por el equipo de investigación.

El material biológico de estas muestras en las instalaciones de la Universidad de Concepción será eliminado, cuando corresponda, según las normas de MATPEL Plan de Manejo de Residuos y Sustancias Peligrosas, establecidas por esta Institución Académica.

Versión y fecha de Protocolo: Versión 2, marzo 2021.

Centro Investigación: Dpto. Bioquímica Clínica e Inmunología. Facultad Farmacia, Universidad de Concepción.

Investigador responsable: Dra. Estefanía Nova Lamperti.

Iniciales del participante: _____



Andrés Rodríguez
3

En individuos sanos se obtendrán muestras de sangre y tejido.

Los individuos sanos serán consentidos previo a su cirugía dental tanto en la Unidad de Anatomía Patológica del Hospital Higuera por la patóloga Dra. Milly Yañez, como en el Centro de Salud Familiar de Penco por la Dra. Lorena Nova. A los individuos sanos que no se les pueda tomar la muestra de sangre en los respectivos establecimientos del Servicio de Salud Talcahuano, serán citados al Laboratorio Clínico PreveGen (Chacabuco 558, Concepción) para su toma de muestra de sangre de 10mL (4 cucharadas de té), la cual será trasladada a la Universidad de Concepción por el equipo investigador. Las muestras de tejido de pacientes con cáncer oral en parafina, se utilizarán sólo con fines de investigación y ensayos preliminares para la identificación de las moléculas que usa el tumor para llamar a las células T reguladoras. El tejido dental (tamaño de una lenteja) será colectado posterior a cada cirugía, por el equipo investigador para su posterior transporte a la Universidad de Concepción bajo riguroso cumplimiento de medidas de bioseguridad reguladas y será procesada por el equipo de investigación. El material biológico remanente a la separación de células será eliminado según las normas establecidas por la misma Universidad (MATPEL).

Toma de muestras de saliva.

La saliva de pacientes e individuos controles será colectada el día de firma del consentimiento informado. Para esto, se abrirá el tubo Salivette¹ y se extraerá la torunda². Luego, se introducirá la torunda en la boca del participante, el cual deberá mover la mandíbula durante 60 segundos para estimular la salivación³. Luego, la torunda impregnada de saliva será de vuelta en el tubo Salivette⁴. Las muestras serán rotuladas indicando el código del paciente y fecha correspondiente. Los datos personales del pacientes sólo serán conocidos por el investigador responsable. Los tubos serán transportados a la Universidad de Concepción bajo riguroso cumplimiento de medidas de bioseguridad reguladas. El material biológico remanente a la separación de células será eliminado según las normas establecidas por la misma Universidad (MATPEL).



Duración Esperada

Su participación será el tiempo necesario para la toma de muestra de sangre y de la intervención quirúrgica en su boca.

La investigación tendrá una duración aproximada de 5 años en total. El reclutamiento será desde los meses de abril 2021 a abril 2026 para pacientes y controles. Sus resultados se entregarán en abril del 2026.

Beneficios

Su participación en esta investigación científica, permitirá obtener datos que posibiliten determinar nuevos mecanismo de regulación en cáncer oral y cómo estas células participan en el desarrollo del cáncer.

Este estudio no tiene beneficio económico contemplado para los participantes. Sin embargo, al terminar el estudio se realizará una presentación de los resultados dirigida a todos los participantes, para dar a conocer los logros más relevantes del proyecto.

Riesgos derivados de su participación

Sangre: El procedimiento para la toma de muestra de sangre se realizará por una enfermera con sistema de tubos llenados al vacío y aguja estéril, por punción en la vena de su brazo. Los riesgos potenciales o molestias en el procedimiento corresponden a las propias de una toma de muestra, en donde en algunos casos Ud. podrá sentir un pequeño ardor al momento de la punción. Al finalizar la extracción de la sangre, en algunos casos Ud. podrá tener un pequeño sangrado que cesará a los pocos minutos y casualmente se pueden producir un pequeño moretón que desaparecerá a los pocos días. Ud. será atendido por la enfermera, dentro de las 48 horas, si tiene molestias a causa de la punción venosa. No existe riesgo identificado para la salud, ya que en este estudio no se administrará ningún medicamento o realizará algún procedimiento que pueda significar riesgo para usted.

Tejidos: La recolección de tejidos será posterior a las cirugías orales y conllevan riesgos del procedimiento quirúrgico, los cuales se presentan independientemente de la realización de este estudio.

En el caso de los tejidos sanos, se utilizarán tejidos obtenidos posterior a procedimiento odontológico y en ningún caso se realizará un procedimiento extraordinario para la obtención de tejidos para este estudio. La recolección de tejidos será posterior a las cirugías orales y conllevan riesgos del procedimiento quirúrgico, los cuales se presentan independientemente de la realización de este estudio.

Saliva: No existe mayor riesgo, sólo puede sentir una pequeña molestia por la presencia del algodón en la boca.

Versión y fecha de Protocolo: Versión 2, marzo 2021.

Centro Investigación: Dpto. Bioquímica Clínica e Inmunología, Facultad Farmacia, Universidad de Concepción.

Investigador responsable: Dra. Estefanía Nova Lamperti.

Iniciales del participante: _____



Confidencialidad

Este estudio es totalmente confidencial, es decir, no se utilizarán datos personales de los pacientes ni de los sujetos controles. En el caso de los pacientes, sólo se accederá a datos de la ficha clínica relacionados estrictamente a la enfermedad y esto lo realizará su médico tratante y el patólogo asociado. El investigador responsable velará por la confidencialidad de los datos, manteniendo los datos clínicos en lugar privado, en una planilla Excel en el computador del investigador principal en la Facultad de Farmacia, donde su identificación personal será reemplazada por un código numérico interno (Folio) que sólo conocerá el investigador responsable. Todas las muestras serán procesadas con este código y nunca aparecerá su nombre mencionado en presentaciones de estos resultados en congresos o en publicaciones. Este estudio, para ser iniciado, deberá tener la aprobación del Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad de la Universidad de Concepción y Comité Ético Científico del Servicio de Salud Talcahuano.

Comunicación de los datos a los pacientes

Los datos obtenidos en este estudio serán utilizados solamente para efectos del estudio y difusión científica, ya sea en congresos o publicaciones. En ningún caso sus datos personales serán expuestos en la presentación de resultados.

Seguros

No existe mayor riesgo en la toma de muestra de sangre ni en la utilización del tejido desechado, por lo cual no se considerará ningún tipo de seguros asociados al estudio.

PREGUNTAS.

Si tiene preguntas, dudas o requiere información adicional sobre su participación en el estudio, puede comunicarse con el Investigador Responsable, Dra. Estefanía Nova Lamperti, al o al correo electrónico enova@udec.cl. También puede comunicarse con el Dra. Andrea Rodríguez, Presidente del Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad de la Universidad de Concepción, al teléfono +56 41-2204302 o con la Sra. Marcela Cortés, Presidente del Comité Ético Científico del Servicio de Salud Talcahuano, ubicado en Avenida Colón, 3030, Talcahuano, al teléfono +56 41-2722150.

Si Ud. acepta participar del estudio titulado "ESTUDIO DE LA REPROGRAMACIÓN METABÓLICA DE CÉLULAS T HELPER EN LA RESPUESTA ANTI-TUMORAL EN PACIENTES CON CÁNCER ORAL", ruego firmar el Acta de Consentimiento que sigue.

Versión y fecha de Protocolo: Versión 2, marzo 2021.

Centro Investigación: Dpto. Bioquímica Clínica e Inmunología, Facultad Farmacia, Universidad de Concepción.

Investigador responsable: Dra. Estefanía Nova Lamperti.

Iniciales del participante: _____



Andrea Rodríguez
6

Acta de Consentimiento

Título del Estudio: "ESTUDIO DE LA REPROGRAMACIÓN METABÓLICA DE CÉLULAS T HELPER EN LA RESPUESTA ANTI-TUMORAL EN PACIENTES CON CÁNCER ORAL"

1. Confirmando que leí y entendí toda la información detallada en el folleto informativo que explica el estudio y tuve la oportunidad de hacer todas las preguntas necesarias.
2. Autorizo y doy mi consentimiento para una toma de muestra de sangre de 10mL (equivalente a 4 cucharadas de té) y el uso del tejido de mi procedimiento quirúrgico odontológico.
3. Entiendo y estoy de acuerdo, que se estudiarán varios parámetros relacionados con el proceso del desarrollo del cáncer y el sistema inmune desde el material obtenido de mis muestras.
4. Entiendo que mi participación es libre y voluntaria y que puedo retirarme cuando quiera del estudio, dando aviso al investigador principal para excluir mis datos.
5. Entiendo que los datos de mi ficha clínica relacionados con el estudio, deberán ser revisados por el Investigador Responsable y los odontólogos indicados para este estudio, únicamente por motivos científicos, por lo que acepto y doy mi autorización para que ellos tengan acceso a este historial médico.
6. Estoy de acuerdo con informar mi participación en este estudio a mi médico tratante.
7. Estoy de acuerdo con ser parte de este estudio y entiendo, autorizo y acepto que mis muestras pueden ser guardadas y usadas para investigaciones, parte de este estudio.

Fecha ___/___/___

Nombre del Paciente/Participante

Firma Paciente/Participante

Nombre del
Investigador responsable

Firma Investigador Responsable

Nombre Director del Centro
o delegado/ Ministro de Fe

Director del Centro o delegado/
Ministro de Fe

Versión y fecha de Protocolo: Versión 2, marzo 2021.

Centro Investigación: Dpto. Bioquímica Clínica e Inmunología. Facultad Farmacia, Universidad de Concepción.

Investigador responsable: Dra. Estefanía Nova Lamperti.

Iniciales del participante: _____

