



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN  
CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**“Efectos de factores solubles secretados por células de  
carcinoma de la cavidad oral sobre células endoteliales  
humanas (HUVECs)”**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A :**

**Mtro. CÉSAR AUGUSTO ESQUIVEL CHIRINO**

**TUTOR: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS DE LA UNAM**

**COMITÉ TUTORAL: DR. HIGINIO ARZATE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA UNAM**

**DRA. PATRICIA TATO ZALDÍVAR  
FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNAM**

**México, D. F.**

**Marzo 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>5</b>
Cáncer.....	5
Cáncer Oral.....	6
Carcinoma de células escamosas .....	8
Características clínicas .....	9
Establecimiento de la metástasis .....	11
Biología endotelial.....	13
Fenotipo constitutivo del endotelio.....	13
Fenotipo activado del endotelio .....	14
Proceso inflamatorio .....	14
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>15</b>
<b>OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>15</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>15</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>17</b>
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>18</b>
<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>19</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
<b>DISCUSION .....</b>	<b>42</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>54</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>55</b>

## RESUMEN

---

### Resumen:

**Introducción:** El cáncer oral se manifiesta en una región del cuerpo que generalmente es accesible para un diagnóstico temprano, muchas lesiones no son diagnosticadas hasta etapas avanzadas. Por medio de un cultivo *in vitro* de células endoteliales humanas (HUVECs), se ha evaluado el efecto de factores solubles secretados por células de carcinoma de cavidad oral (SCC9, SCC15, SCC25). Las células de carcinoma con mayor capacidad invasiva (SCC15) secretan citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas y factores de crecimiento que alteran el fenotipo endotelial, promoviendo la expresión de ICAM1, VCAM1, Selectina-E, y un incremento en la capacidad de adherir de células tumorales. **Objetivos:** Evaluar cambios en la expresión de moléculas de adhesión, y análisis del perfil de expresión de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en respuesta a factores solubles derivados de carcinomas de células escamosas en células endoteliales humanas. **Material y Métodos:** Obtención de factores solubles derivados de carcinomas de células escamosas de lengua. Cultivos de células endoteliales humanas para realizar ensayos de citometría de flujo, western-blot y ELISA Multiplex. **Resultados:** Los factores solubles de las células SCC15 comparadas con los factores de SCC9, SCC25, contienen una mayor concentración de las citocinas pro-inflamatorias IL6, IL8,

quimiocinas IP10,RANTES, VEGF. También promueven un marcado incremento en la expresión de selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1 en las HUVECs, los factores solubles de SCC15 son capaces de activar a las células endoteliales con mayor potencia que los factores de SCC9 y SCC25. **Conclusión:** Los hallazgos fortalecen la idea que factores solubles de las células con mayor capacidad invasiva, secretan factores capaces de activar a células endoteliales humanas.

## ABSTRACT

---

### **Abstract:**

**Introduction:** Oral cancer is manifested in a body part that is generally accessible for early diagnosis, many injuries are not diagnosed until they are phased advanced. Early diagnosis is crucial to the survival rate if the lesions are detected when small, localized and treated. The early diagnosis through the identification of molecular targets can be determined through these markers if the cancer lesions may make an oral metastasis. **Objective:** The main goal of this study was to analyze the interactions between soluble factors of the oral squamous cell carcinoma, and the identification of cytokines secreted by tumor cells and study their effects on human endothelial cells.

**Methods:** Collection of soluble factors derived from oral squamous cell carcinoma. Cell cultures of human umbilical vein endothelial cells

(HUVECs), Flow cytometry, western-blot and ELISA. **Results:** The cells of the oral squamous cell carcinoma secreted factors capable of activate the endothelial cells with greater potency. Soluble factors contains significant amounts of the main pro-inflammatory cytokines (IL1A, IP10, RANTES) and growth factors (VEGF, FGF, IGF), cytokines can promote a marked increase in the expression of adhesion molecules E-selectin, VCAM-1 and ICAM-1 in human endothelial cells. **Conclusions:** The functional interactions between soluble factors of squamous carcinoma cells and endothelial cells that may be relevant in the final stages of the spread metastases and that these functional interactions may be mediated by pro-inflammatory cytokines and soluble factors such as TNF, IL6 and chemokines such as IL8. It is interesting to note that these products are known modulators of endothelial function.

## INTRODUCCIÓN

---

### CÁNCER

El cáncer, condición en la que las células de un organismo proliferan descontroladamente, es el resultado de un largo periodo de latencia durante el cual ocurren y se acumulan mutaciones que con el paso del tiempo, generan alteraciones en los mecanismos que regulan la diferenciación y la proliferación de las células afectadas (15,20). El cáncer representa un problema a nivel mundial, de acuerdo a los datos reportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) mencionan que más de 20 millones de personas viven con diagnóstico de cáncer, esto se observó principalmente en países en desarrollo. Se estima que para el año 2020 a nivel mundial se desarrollarán 15 millones de nuevos casos y habrá 10 millones de decesos debido a esta patología, este aumento en la cifra es debido al incremento en la edad y esperanza de vida en la población mundial, así como al incremento en la exposición a factores de riesgo (30).

El cáncer es una de las enfermedades que ha aumentado su incidencia en México y se ha convertido en un problema de salud pública, en el 2008 se reportaron en México 127, 000 nuevos casos de cáncer y 77, 700 muertes relacionadas.

Este aumento en la incidencia representa un problema de salud pública en nuestro país, no sólo por las graves manifestaciones clínicas y su alta letalidad, sino también por el aumento en la diversidad de factores de riesgo tanto individuales y ambientales con los que se le asocia (30,40).

## **CÁNCER ORAL**

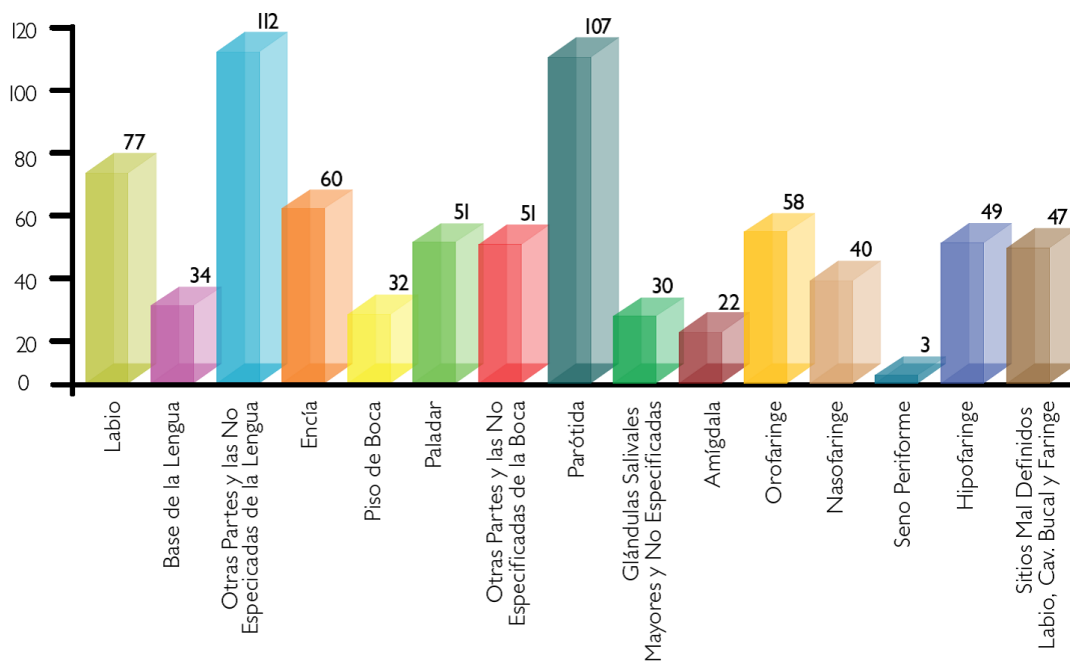
El cáncer oral es el sexto cáncer que más prevalece a nivel mundial, y el octavo en países subdesarrollados. Durante el año 2002 se diagnosticaron mundialmente 274,289 nuevos casos de cáncer oral y la mortalidad reportada en ese año fue de 127,459 casos (30,36); durante el 2008 se reportaron 263,020 nuevos casos de cáncer oral, con una mortalidad de 127, 654 personas (36). Los sitios anatómicos que comprende el cáncer de cabeza y cuello incluyen; *cavidad bucal, orofaringe, laringe y senos paranasales*. (3,40).

Las neoplasias malignas de la cabeza y el cuello representaron el 17.6%, es decir 108,064 casos de la totalidad de las neoplasias malignas reportadas en el Registro Histopatológico de las Neoplasias en México (RHNM) durante el año 2002 (15). La distribución de las Neoplasias Malignas de la cabeza y cuello de este registro se pueden observar en la **(Gráfica 1)**. Datos reportados por el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) de las Neoplasias Malignas de cabeza y cuello del 2000 al 2004, muestran que el sitio anatómico que más



predomina es la lengua, y la incidencia del cáncer oral se ha mantenido constante en los últimos años, con estas consideraciones se puede estimar una letalidad para el cáncer de la cavidad bucal de 62.4%.

La incidencia del cáncer oral es más frecuente en hombres que en mujeres, sin embargo el aumento del uso del tabaco y alcohol por parte de las mujeres, representa un aumento en la incidencia, el consumo de tabaco y alcohol permiten que esta incidencia se mantenga, debido a la importancia que tienen estos factores de riesgo en el desarrollo del cáncer oral (2-4).



**Gráfica 1. Distribución de las neoplasias de la cabeza y cuello durante el 2002.**

**Registro Histopatológico de las Neoplasias en México (RHNM).**

## **CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS**

La mayoría de los casos diagnosticados de cáncer oral corresponden a carcinomas de células escamosas, representando alrededor del 90% del cáncer oral, mientras que el 10% restante son melanomas, sarcomas, carcinomas de glándulas salivales menores y carcinomas metastásicos (5,6). El carcinoma de células escamosas de la cavidad bucal es una neoplasia epitelial maligna invasiva con diversos grados de diferenciación histológica, es de mal pronóstico, y desarrolla metástasis hacia a órganos distantes (7, 10, 12, 13).

Las personas que presentan carcinoma de células escamosas no presentan sintomatología en etapas tempranas, sin embargo en algunas personas se pueden presentar síntomas y hallazgos clínicos mínimos, así como también se pueden presentar lesiones premalignas como leucoplasias o eritroplasias y ulceraciones (14,16,36).

Las características histológicas principales que se presentan por el carcinoma de células escamosas son la pérdida de la membrana basal, pérdida de la estructura del estrato basal, presencia de un mayor número de mitosis, cambios displásicos con presencia de pleomorfismo celular e invasión del tejido conjuntivo subyacente (22, 33).

**El carcinoma epidermoide puede clasificarse dentro de tres categorías:**

- Carcinoma bien diferenciado, que presenta una queratinización mayor del 75%.

- Carcinoma moderadamente bien diferenciado, que presenta una queratinización de 25 al 75%.

- Carcinoma poco o pobremente diferenciado, que presenta un 25% de queratinización.

El objetivo fundamental de clasificarlos de esta forma radica en determinar el estado clínico de la neoplasia y así poder establecer una mejor respuesta de tratamiento. Sin embargo no existe correlación entre el grado de diferenciación y el pronóstico del enfermo. (2)

## **CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS**

El carcinoma de células escamosas en etapas tempranas es por lo general asintomático, clínicamente se puede manifestar como: ulceración o erosión, leucoplasia, eritroplasia, induración y linfadenopatía.

La lesión precancerosa bucal más común es la leucoplasia, la cual representa más del 75% de estas lesiones, esta puede ser homogénea y no homogénea; la última presenta mayor riesgo de transformación maligna. Las leucoplasias homogéneas son más frecuentes y se presentan como una placa predominantemente blanca, plana o poco elevada; a veces manifiesta una disposición corrugada o forma un mosaico. La coloración puede ser en ocasiones amarillenta o grisácea (17,21,30) .

En etapas avanzadas de esta patología origina la metástasis que principalmente se presenta en ganglios linfáticos, submandibulares, cervicales y yugulares. La metástasis a distancia principalmente se disemina hacia los pulmones (37).

La falta de sintomatología de las lesiones precursoras retrasa la detección y el diagnóstico temprano, lo que explica la elevada detección en etapas tardías asociadas a la mortalidad del carcinoma de cavidad oral (38,39,40,42,43).

## **ESTABLECIMIENTO DE LA METÁSTASIS**

La metástasis representa la invasión de células tumorales en órganos blancos distintos al lugar de origen, y se presenta en estadios avanzados de la progresión del cáncer. Este evento depende de las características de las células tumorales y las del órgano blanco, y se lleva a cabo por múltiples pasos (36).

La progresión tumoral y la metástasis en particular requieren de una interacción coordinada de células tumorales y células del endotelio vascular. Las interacciones entre células cancerosas y células normales se dan a través de factores solubles y de sistemas de señalización que definen la comunicación entre estos dos tipos celulares.

Durante la progresión de un tumor hacia un estadio metastásico, éste presenta una interacción importante con el endotelio en tres ocasiones: durante la vascularización, en la intravasación y durante la adhesión y extravasación hacia el tejido que invadirá. Se ha reconocido que los factores solubles liberados por las células tumorales o por las células no tumorales que forman la neoplasia desempeñan un papel importante en la progresión tumoral (1,2,16,17).

En las etapas tempranas de las neoplasias, existe la pérdida de la adhesividad de células malignas del tumor primario, seguidas de la adhesión de las células tumorales a las células endoteliales de las vénulas de los órganos blanco. Posteriormente de la extravasación, hay invasión de matrices extracelulares (3,4,17,18).

Las células tumorales de los tumores primarios ingresan a los vasos linfáticos o al torrente sanguíneo, dependiendo de su localización anatómica. Dentro de la circulación, muchas células tumorales son erradicadas por fuerzas físicas ejercidas en ellas al pasar por la microvasculatura de órganos secundarios, y por acción de mecanismos inmunológicos de defensa del huésped. Además, una vez dentro del tejido blanco las células tumorales deben encontrar condiciones favorables para su sobrevivencia y proliferación (9,11).

Se ha reportado que las células tumorales secretan factores solubles capaces de modificar el fenotipo endotelial; y que, la exposición a estos factores incrementa en mayor o menor medida la capacidad endotelial para adherir células tumorales humanas. (29)

Por lo mencionado anteriormente a continuación se describen las características relacionadas con el endotelio.

### **Biología Endotelial**

El sistema vascular es un órgano, con una lámina basal que forma un límite físico entre los compartimientos intra y extravasculares. Las células endoteliales tienen una participación activa en la regulación de un gran número de procesos homeostáticos y patológicos, entre los que se encuentran: regulación del tono vascular, coagulación y angiogénesis (20,35). Se ha reportado que el endotelio de vénulas y vasos linfáticos desempeña un papel importante en la permeabilidad vascular en la diseminación y el paso de células tumorales (36).

### **Fenotipos Endoteliales**

A pesar de ser un tejido metabólicamente activo, el endotelio en un organismo adulto sano se considera en estado de reposo ya que presenta un recambio muy bajo, esto se denomina: *fenotipo constitutivo* (20,35,41). En esta condición, la membrana apical de las células endoteliales expone una muy baja cantidad de moléculas de adhesión intercelular, por lo que no hay adhesión de componentes celulares sanguíneos a las paredes de los vasos.

Existe otro fenotipo llamado: *fenotipo endotelial activado*; el cual es inducido por citocinas pro-inflamatorias. Cuando las células endoteliales son activadas por estas citocinas experimentan alteraciones funcionales que involucran respuestas inmediatas. Por ejemplo, algunas condiciones patológicas como la sepsis, están asociadas a una conversión del endotelio a un estado no constitutivo, activado (20). El *fenotipo activado* se caracteriza por la activación de la sintasa de óxido nítrico constitutiva; también va acompañado de cambios como el incremento en la expresión de moléculas de adhesión como selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1. Estos cambios permiten al endotelio participar en procesos de coagulación, reacción inflamatoria, proliferación celular. También se ha postulado que este fenotipo o variantes de él, participan en los procesos de metástasis.(2,18,)

## **PROCESO INFLAMATORIO**

Dentro del proceso de inflamación, un fenómeno bien estudiado es la *migración celular*, que es la entrada de neutrófilos y polimorfonucleares al sistema vascular. Esto involucra un mecanismo secuencial de reconocimiento, formación del contacto, y migración mediada por moléculas de adhesión, por ejemplo: ICAM, VCAM, selectinas E y P, integrinas, etc.



Se ha demostrado que algunas de estas moléculas de adhesión, como la selectina-E, no sólo están involucradas en la inflamación, sino también en la metástasis tumoral (18,19,31), como ocurre en algunos casos de cáncer de colon. La expresión de ICAM-1 también ha resultado ser un marcador asociado a un fenotipo invasivo.

## **HIPÓTESIS**

Las células de carcinomas de la células escamosas SCC9, SCC15 y SCC25 secretan factores solubles que alteran el fenotipo endotelial e inducen la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales humanas.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar los efectos de los factores solubles secretados por líneas de carcinoma de células escamosas, analizando sus efectos sobre células endoteliales humanas primarias.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtención de los factores solubles tumorales derivados de las líneas celulares SCC9, SCC15 y SCC25 de los carcinomas de células escamosas.
- Evaluar la capacidad de los factores solubles para inducir un fenotipo pro-adhesivo en células endoteliales humanas *in vitro* mediante un ensayo de adhesión.
- Caracterización de la composición proteica de los factores solubles derivados de las líneas de los carcinomas de células escamosas por medio de un ensayos de ELISA Multiplex orientado a la detección del perfil de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento asociados a inflamación.
- Analizar la expresión de las moléculas de adhesión ICAM, VCAM-1 y selectina-E en extractos proteicos totales de las células endoteliales estimuladas con los factores solubles tumorales empleando ensayo de inmunodetección tipo "western blot".
- Analizar la expresión de las moléculas de adhesión ICAM, y selectina-E presentes en la superficie de las células endoteliales estimuladas con los factores solubles tumorales empleando un ensayo de citofluorometría.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La incidencia y prevalencia del cáncer ha ido en aumento por lo que éste se ha convertido en un problema de salud pública. La metástasis es un proceso de las enfermedades oncológicas, dicho proceso es el que causa la muerte a las personas que la padecen. El cáncer oral representa el 12% de las neoplasias malignas de cabeza y cuello, de las cuales el 90% corresponden a carcinoma de células escamosas de la cavidad oral y su diagnóstico se realiza en etapas avanzadas en el 80% de los pacientes. Este diagnóstico tardío provoca que con frecuencia se presente metástasis, es decir las células metastásicas interaccionan con una gran variedad de células no tumorales. Entre las células que colaboran con el proceso metastásico se encuentran las células del endotelio vascular, se ha identificado que existe un evento que se lleva a cabo entre las células endoteliales y las células tumorales y se ha propuesto que existe una comunicación mediada por factores solubles que culmina con el establecimiento de contactos físicos (6,13,17,19). Mantovani y colaboradores han propuesto que el microambiente tumoral, desempeña un papel importante en la progresión tumoral, este microambiente asociado al tumor afecta el fenotipo de las células endoteliales asociadas a un tumor (1,2,3,9).

## **JUSTIFICACIÓN**

Es poco lo que se conoce sobre la contribución de los carcinomas escamosos de la cavidad oral a su microambiente tumoral, en particular se conoce poco acerca del estudio de los efectos del microambiente sobre las células endoteliales y el papel que desempeña durante la metástasis del cáncer oral.

Por lo que en este trabajo analizamos los efectos de los factores solubles derivados de carcinoma de lengua (SCCs) de diferentes estadios clínicos sobre cultivos primarios de células endoteliales humanas derivadas de la vena de cordón umbilical humano (HUVECs).

## METODOLOGÍA

---

### **Células endoteliales humanas (HUVECs)**

Se obtuvieron las células endoteliales derivadas de la vena del cordón umbilical humano de acuerdo al método descrito por Jaffe et. al, realizando una digestión enzimática con colagenasa tipo IV (SIGMA, St Louis Mo) al 0.02% por 15 min a 37°C. Las células crecieron en placas de cultivo (Costar, Cambridge, Ma). Para todos los experimentos las células se sembraron a una densidad de 50,000 cel/cm<sup>2</sup> obteniendo una confluencia del 50% al día siguiente, tiempo en el que se iniciaron todos los experimentos.

### **Líneas celulares obtenidas de ATCC: i) carcinoma de células escamosas SCC9, SCC15, SCC25; ii) mieloma humano U937; iii) queratinocitos HaCat.**

Las células se mantuvieron en medio de cultivo DMEM/F12 para SCCs, RPMI para U937 y DMEM para HaCaT (Gibco/BRL, Grand Island, NY) suplementado con 10% de SBF (In Vitro, Mex), 100 U/ml de Penicilina G, 0.25 • g/ml de Anfotericina B (Gibco/BRL, Grand Island, NY). El medio DMEM/F12 se suplemento además con 10ng/ml de factor de crecimiento epidermal (EGF) (SIGMA), y 1 • g/ml de hidrocortisona. Todos los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37°C y a una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> saturada de H<sub>2</sub>O.

Para la colección de los factores solubles secretados por las líneas celulares se empleó RPMI sin rojo de fenol (Microlabs SA de CV. Mex)

### **Obtención de los factores solubles derivados de las líneas celulares.**

Las células HacaT, SCC9, SCC15, SCC25, se incubaron durante 48 h con 25 ml de RPMI-1640, sin rojo fenol y libre de Suero Bovino Fetal (SBF). Se recolecto el medio donde crecieron las células y que contiene los factores solubles derivados de las células, después de recolectar este medio se centrifugó a 1500 g durante 15 min. El medio obtenido se esterilizo y se pasó por un filtro estéril de 0.20  $\mu\text{m}$  y se guardaron a 4°C hasta el momento de su uso. Se utilizaron 50  $\mu\text{l}$  de los factores solubles de cada línea celular para determinar el contenido de proteína por el *método de Bradford (BioRad, CA. EUA)*.

### **Marcaje de las células U937 con timidina tritiada para el ensayo de adhesión**

Las células U937 fueron cultivadas por 48 h en un medio suplementado con timidina tritiada, un isótopo radiactivo capaz de incorporarse al DNA. Al medir la radiación emitida por las células, es posible cuantificar indirectamente el porcentaje de estas células que se han adherido a la monocapa endotelial al

final del ensayo. Las células se mantuvieron por 48h en medio RPMI suplementado con 10% de SFB al que se le añadió 1  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$  de timidina tritiada (New England Nuclear, USA). Posteriormente, las células marcadas fueron recuperadas, lavadas dos veces con PBS y resuspendidas en medio M-199 suplementado para colocarlas en contacto con las células endoteliales.

### **Ensayo de Adhesión**

Las células endoteliales se dejaron crecer a confluencia en placas de 48 pozos ( $1\text{cm}^2/\text{pozo}$ ). Cuando las células llegaron a confluencia, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de TNF o de FST para su activación. El tratamiento de las células se llevó a cabo por 3 h a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera controlada con 100% de humedad relativa y 5% de  $\text{CO}_2$ . Al término de la incubación se retiraron los medios que contenían el TNF o los factores solubles tumorales de las monocapas endoteliales y las células endoteliales se colocaron en contacto con las células de mieloma humano U937 por 3 h más, para permitir la interacción con el endotelio. Las células U937 marcadas con timidina tritiada ( $1 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ ), se colocaron a una densidad de  $2\text{-}2.5 \times 10^5$  células U937/ $\text{cm}^2$ , que fue una cantidad suficiente para cubrir por completo la monocapa de células endoteliales.

Al término de este tiempo, los pozos se lavaron 3 veces con PBS  $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$  posteriormente cada pozo con la monocapa de células endoteliales y las U937 adheridas, fue lisado e hidrolizado con 500  $\mu\text{l}$  de NaOH 0.2N.

Después de 48 h esta solución alcalina se mezcló con 3  $\mu\text{l}$  de líquido de centelleo y la radiactividad incorporada se cuantificó en un contador de emisiones Beta (1600 PACKARD, USA).

Los ensayos de adhesión se realizaron con cuatro cultivos independientes y cada condición por triplicado. Los valores de CPM fueron reportados como porcentajes de adhesión tomando como 100% la radiactividad contenida en 250,000 células U937 que cubren la totalidad del pozo.

### **Composición proteica de los factores solubles (ELISA Multiplex)**

Para analizar la composición proteica de los factores solubles se aplicó la técnica de *ELISA Multiplex* (Biorad, Ca). Esta técnica emplea microesferas que tienen adheridos una variedad de anticuerpos para citocinas, quimiocinas o factores de crecimiento (*IL-1 ra, IL-1 beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, TNF, IFN-gamma, IP-10, RANTES, IL-8, Eotaxina, MCP-1, MIP-1 beta, MIP-1 alfa*), y (*G-CSF, GM-CSF, PDGF, FGF y VEGF*).



La concentración de las proteínas, se estimó mediante el uso de anticuerpos secundarios acoplados a un fluorocromo. El equipo es capaz de medir la concentración de diversas proteínas al mismo tiempo, para este proyecto se evaluaron específicamente 27 proteínas, para realizar el análisis se obtuvieron 50 µl de los factores solubles de las líneas SCC9, SCC15 y SCC25. Cada una de las 27 proteínas analizadas (*citocinas, factores de crecimiento y quimiocinas*) presentan un límite inferior y un límite superior de concentración que son detectados por el equipo, de acuerdo a estos valores se calculó la cantidad presente de cada proteína en los factores solubles derivados de los carcinomas orales.

### **Citometría de Flujo**

Las células endoteliales se crecieron a una confluencia del 70-80% en placas de cultivo de 12 pozos. Después de 6 h de tratamiento con los factores solubles las células se lavaron 3 veces con PBS, y se adiciono 1 ml de PBS con 2.5% de BSA, el anticuerpo selectina-E (1:800), y el anticuerpo ICAM-1 (1:500)(BD Pharmigen, EUA), se incubaron durante 30 min a 4°C, se lavaron los pozos 3 veces con PBS.

Se agregó Streptavidina-Ficoeritrina (Beckton Dickinson) (1:3000) con PBS-BSA durante 30 min a 4°C.

Se recolectaron las células en tubos, se centrifugaron a 1500g durante 5 min y se resuspendieron en 500 µl de PBS para realizar la lectura en el citómetro FACS Calibur (Beckton Dickinson, EUA), en el programa Cell Quest.

### **Inmunoensayo tipo Western Blot**

Se utilizaron 10 g de proteína total y fueron separadas en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) durante 3 h. Posteriormente, fueron transferidas a una membrana de PVDF toda la noche a 4 °C. Las membranas se incubaron 1 h. Se realizó la incubación toda la noche con los anticuerpos anti-ICAM-1, anti-VCAM-1 y selectina-E (Santa Cruz, Biotechnology) a una dilución de 1:1000. Posteriormente, se incubaron con los anticuerpos secundarios, anti conejo-HRP (1:15,000), anti ratón-HRP (1:10,000) durante 1 h. Se utilizó actina como control de cargado. La señal de quimioluminiscencia se obtuvo con el reactivo Super Signal West Pico (PIERCE, EUA).

## **Estadística**

Los experimentos de western blot, citometría de flujo y el análisis de las concentraciones de citocinas, se realizaron por triplicado y se obtuvieron los promedios, desviación, el error estándar y se aplicó la prueba *t* de student, ANOVA. El análisis estadístico se realizó con el programa Sigma Stat 10 (Chicago INC).

## RESULTADOS

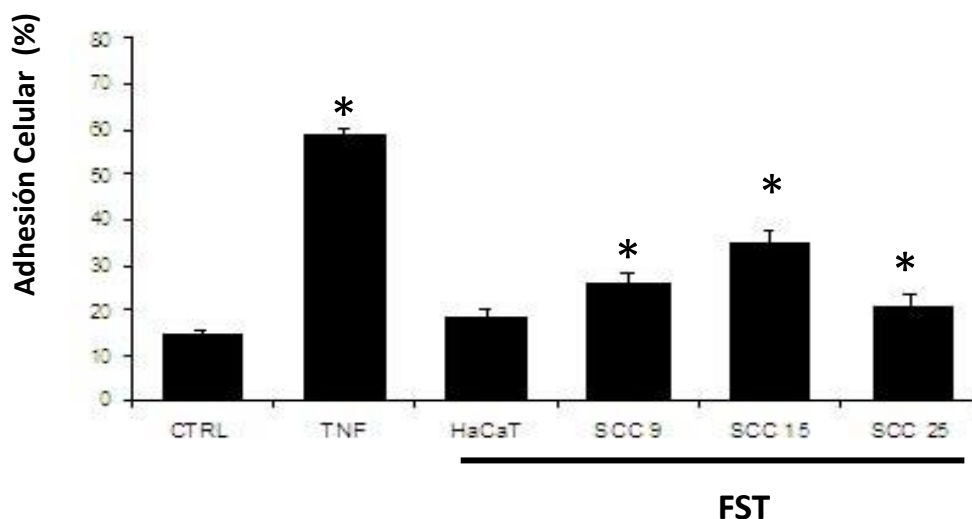
---

**Factores solubles secretados por las líneas de carcinomas de células escamosas inducen un fenotipo endotelial activado que se caracterizó por un incremento en la capacidad de adherir células del mieloma humano U937 en células endoteliales humanas primarias.**

Con el objetivo de evaluar la actividad biológica de los factores solubles secretados por las líneas de carcinomas orales se evaluó la adhesión *in vitro* de células U937 a las células endoteliales. Esta metodología estandarizada por nuestro grupo (19,27,31) se basa en la adhesión de células U937 con células endoteliales (HUVECs) previamente estimuladas con 10 µg de los factores solubles tumorales durante 3h y con TNF, y posteriormente se coincubaron con las células U937, al final de este tiempo la adhesión fue cuantificada después de que las células U937 no adheridas al endotelio fueron removidas con 2 lavados con solución de fosfatos. Como control positivo se utilizó TNF y como control negativo se utilizó a los factores solubles secretados por una línea de queratinocitos (HaCaT).

En los resultados podemos observar que el TNF incrementó la adhesión 3.1 veces con respecto a la adhesión basal, mientras que los factores solubles de las células HaCaT utilizadas como control negativo mostraron una adhesión semejante a la adhesión control. **(Figura 1)**

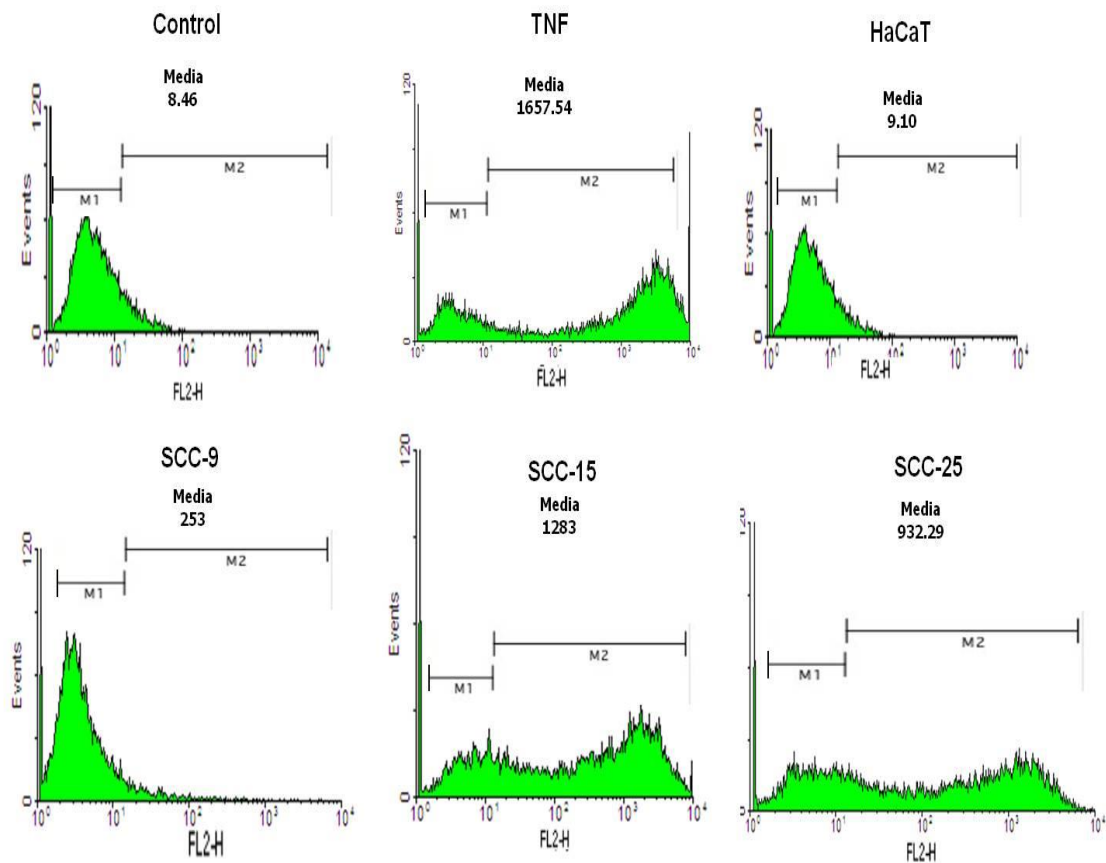
Los factores solubles tumorales secretados por las líneas SCC9 incrementaron la adhesión 0.7 veces, mientras que los de las células SCC15 aumentaron la adhesión celular 1.4 veces sobre la adhesión basal. Y para los factores solubles de las células SCC25 se incrementó la adhesión solo 0.4 veces. Estos resultados muestran que los factores solubles secretados por las líneas de carcinomas muestran diferentes potencias en la promoción de un fenotipo endotelial pro-adhesivo, y sugieren que los factores secretados por las células SCC15 presentan la mayor actividad biológica.



**Figura 1. Ensayo de adhesión de los factores solubles secretados por las líneas de carcinomas de células escamosas a HUVECs. Las células endoteliales fueron pre-tratadas durante 3 horas con 10ng/ml de TNF, con 20 µg/ml de proteína total de los diferentes factores solubles de las líneas, HaCaT , SCC-9, SCC-15 o SCC-25. Los resultados muestran el (promedio ± desviación estándar de tres experimentos de adhesión independientes y están expresados como el porcentaje de adhesión del total de células U937 adicionadas al ensayo de adhesión. Se muestra el error estándar. \* P < 0.05**

## **Expresión de selectina-E en la superficie de las células endoteliales en respuesta a factores solubles de las líneas de carcinomas de células escamosas.**

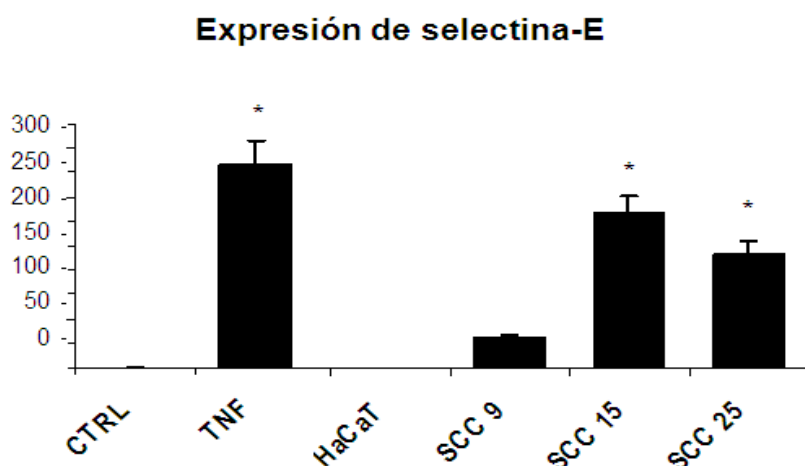
Habiendo observado aumentos significativos en la adhesión intercelular inducida por los factores solubles de las líneas de carcinomas orales, nuestro objetivo fue evaluar la expresión de selectina-E e ICAM-1, dos moléculas de adhesión intercelular cuya expresión en la superficie endotelial es un marcador del fenotipo endotelial activado por TNF. En los histogramas de citometría se observa la expresión en la superficie celular de selectina-E, en las células endoteliales pre-tratadas con los factores solubles de las líneas celulares **(Figura 2)**.



**Figura 2. Análisis de citofluorometría para evaluar la expresión de selectina-E en la superficie de células endoteliales tratadas con los factores solubles secretados por las líneas celulares de carcinomas de células escamosas.**

**A)** El eje X corresponde a la intensidad de fluorescencia a 540 nm representada como FL2-H en escala logarítmica. El eje de las Y corresponde al número de eventos registrados. En cada análisis se capturaron 10,000 eventos (células). La región M1 corresponde a la fluorescencia basal mientras que M2 corresponde a la fluorescencia después del tratamiento, en los histogramas se indican los valores de la intensidad promedio de fluorescencia (IPF) de M2. **B)** Índice de fluorescencia de la expresión de selectina-E en las células endoteliales en respuesta a los factores solubles derivados de los carcinomas orales. La intensidad media de fluorescencia de las condiciones experimentales se dividió entre la intensidad promedio de fluorescencia del control de cada grupo de experimentos. El histograma muestra el valor promedio de 3 experimentos independientes. Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos (\*) corresponden a la significancia estadística con un valor de  $p < 0.05$ .

Cuando las células se estimularon con TNF, la expresión de selectina E se incrementó más de 82 veces con respecto al control, con los factores solubles de SCC9 aumentó 12 veces (**Figura 2B**). Sin embargo, el máximo efecto se observó con la línea SCC15 que incremento 62 veces con respecto al control. Con los factores solubles de la línea SCC25 la expresión de selectina-E aumento 46 veces. En la línea HaCaT, la fluorescencia fue similar a la de células endoteliales sin estimular, indicativo de que los factores solubles por esta línea celular no son capaces de inducir activación endotelial. Con el fin de comparar los cambios en la expresión de selectina-E, en la (**Figura 2B**) se muestra un índice de la señal de fluorescencia asociada a la selectina-E.

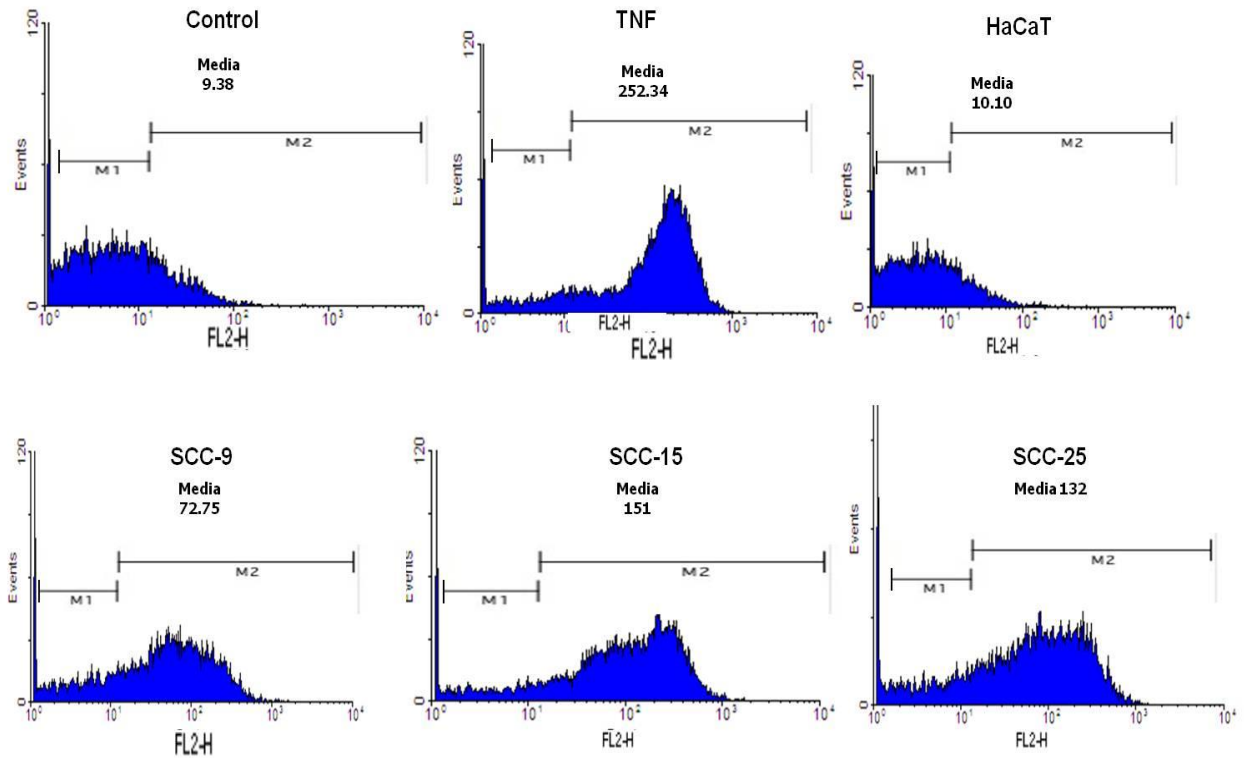


**Figura 2B.-Índice de fluorescencia de la expresión de selectina-E en las células endoteliales en respuesta a los factores solubles derivados de los carcinomas de células escamosas.** La intensidad media de fluorescencia de las condiciones experimentales se dividió entre la intensidad promedio de fluorescencia del control de cada grupo de experimentos. La gráfica muestra el promedio de 3 experimentos independientes.



**Expresión de ICAM-1 en la superficie de las células endoteliales en respuesta a los factores solubles de las líneas de carcinomas de células escamosas.**

En el caso de la expresión de ICAM-1 en respuesta a los mismos tratamientos mencionados en la **(Figura 3A)**. Las células endoteliales sin estimular mostraron una expresión de ICAM-1 que aumentó 31 veces respecto al control cuando las células se estimularon con TNF



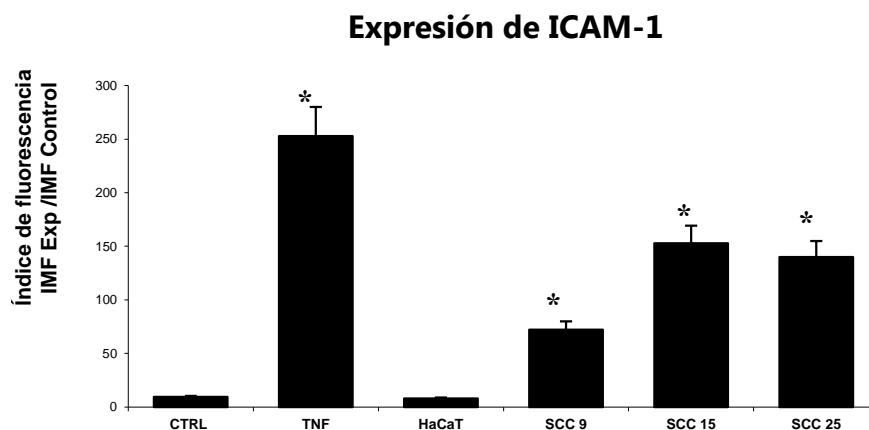
**Figura 3.- Análisis de citofluorimetría para evaluar la expresión de ICAM-1, en la superficie de células endoteliales tratadas con los factores solubles secretados por las líneas celulares de carcinomas de células escamosas. A)** El eje X corresponde a la intensidad de fluorescencia a 540 nm representada como FL2-H en escala logarítmica. El eje de las Y corresponde al número de eventos registrados. En cada análisis se capturaron 10,000 eventos (células).

La región M1 corresponde a la fluorescencia basal mientras que M2 corresponde a la fluorescencia después del tratamiento, en los histogramas se indican los valores de la intensidad promedio de fluorescencia (IPF) de M2.

**B)** Índice de fluorescencia de la expresión de ICAM-1 en las células endoteliales en respuesta a los factores solubles derivados de los carcinomas orales. La intensidad media de fluorescencia de las condiciones experimentales se dividió entre la intensidad promedio de fluorescencia del control de cada grupo de experimentos. El histograma muestra el valor promedio de 3 experimentos independientes. Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos (\*) significancia estadística con un valor de  $p < 0.05$ .

Los factores solubles de SCC9 incrementaron la expresión de ICAM-1 7 veces y el máximo incremento de la expresión de ICAM-1 en la superficie celular se observó con la línea SCC-15 que incremento 19 veces con respecto al control.

Los factores solubles de la línea SCC25 incrementan el promedio de la fluorescencia 16 veces. En el caso de los factores solubles de la línea HaCaT expresan valores de ICAM-1 similares a los obtenidos con las células endoteliales sin estimular (**Figura 3B**).

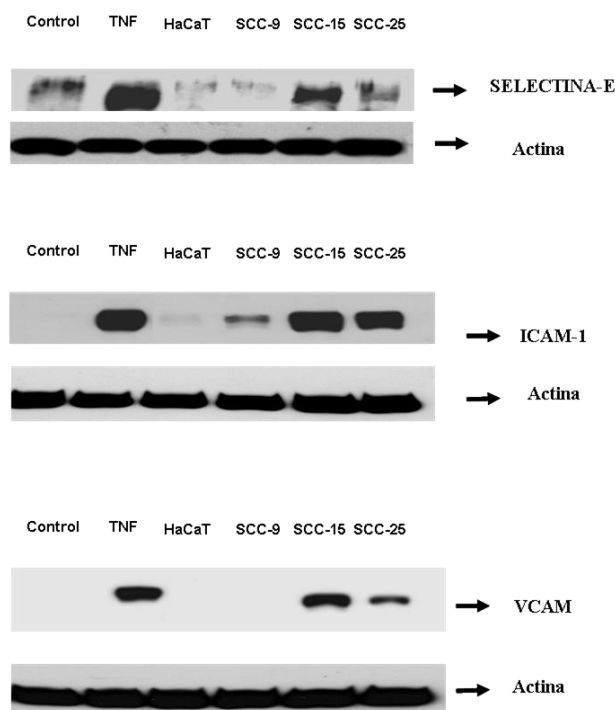


**Figura 3B.-Índice de fluorescencia de la expresión de ICAM-1 en las células endoteliales en respuesta a los factores solubles derivados de los carcinomas orales.**

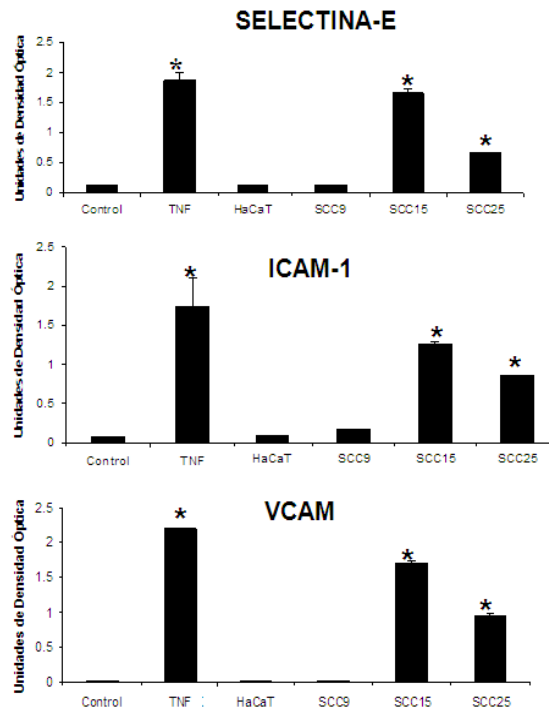
La intensidad media de fluorescencia de las condiciones experimentales se dividió entre la intensidad promedio de fluorescencia del control de cada grupo de experimentos. La gráfica muestra el promedio de 3 experimentos independientes.

**Western blot para valorar cambios en la expresión de selectina-E, ICAM-1, VCAM-1 inducida por los factores solubles de las líneas de carcinomas de células escamosas sobre las células endoteliales.**

Una vez que se evaluaron los factores solubles de las líneas de los carcinomas orales sobre la expresión en la superficie de las células endoteliales de las moléculas de adhesión por citometría de flujo, el siguiente objetivo fue evaluar cambios en la expresión total de las moléculas de adhesión selectina-E, ICAM-1, VCAM-1. (**Figura 4**).



**Figura 4.-Western-blot de la expresión de Selectina-E (A), ICAM-1 (B), VCAM-1 (C), en respuesta a los factores solubles derivados de los carcinomas de células escamosas sobre las células endoteliales humanas (HUVECs).**



**Figura 5.-Western-blot de la expresión de Selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1 en células endoteliales humanas (HUVECs) tratadas con los factores solubles secretados por las líneas celulares de carcinoma de células escamosas.** El panel de la izquierda presenta imágenes de inmuno-ensayos tipo western representativos para cada molécula de adhesión, en la parte inferior de cada una de ellas se muestra la imagen del inmuno-ensayo tipo western contra actina como control de carga. El panel de la derecha corresponde a los valores promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes, en todos los casos la señal de cada molécula de adhesión fue normalizada con la señal de actina correspondiente. Los asteriscos (\*) significancia estadística con un valor de  $p < 0.05$ .

### **Expresión Selectina E:**

Con TNF se observó un aumento con respecto al control de 20 veces. Con los factores solubles de la línea SCC9 no se observó ningún cambio, mientras que con los factores solubles de la línea SSC15 se observó un aumento de 16 veces, por último los factores solubles de la línea SSC25 produjeron un aumento de 5 veces. **(Figura 5)**

### **Expresión ICAM-1:**

Con TNF se observó un aumento de 20 veces, mientras que los factores solubles de la línea SCC9 no produjeron ningún cambio. Con los factores solubles de la línea SSC15 se observó un aumento en la expresión de ICAM-1 de 19 veces y para los factores solubles de la línea SSC25 se observó un aumento de 16 veces para ICAM-1. **(Figura 5)**

### **Expresión VCAM-1:**

Con TNF se observó un aumento con respecto al control 18 veces, igual que para ICAM-1 los factores de la línea SCC9 no se observó ningún cambio. Con los factores solubles de la línea SSC15 se observó un aumento en la expresión de VCAM-1 de 14 veces. Mientras que para la línea SSC25 se observó un aumento de 11 para VCAM. **(Figura 5)**

Estímulo	Selectina-E		ICAM-1	
	<i>CITOMETRÍA</i>	<i>WESTERN</i>	<i>CITOMETRÍA</i>	<i>WESTERN</i>
<b>TNF</b>	82	20	31	20
<b>SCC9</b>	12	1	7	2
<b>SCC15</b>	62	16	19	19
<b>SCC25</b>	46	5	17	16

**Tabla 1.** Comparación de veces de incremento en la expresión de moléculas de adhesión valorada por citometría (proteínas en la superficie de la célula) o por western blot (contenido celular total de proteínas).

Los factores solubles derivados de la línea (HaCaT) no incrementaron el nivel de expresión de ninguna de las tres moléculas de adhesión.

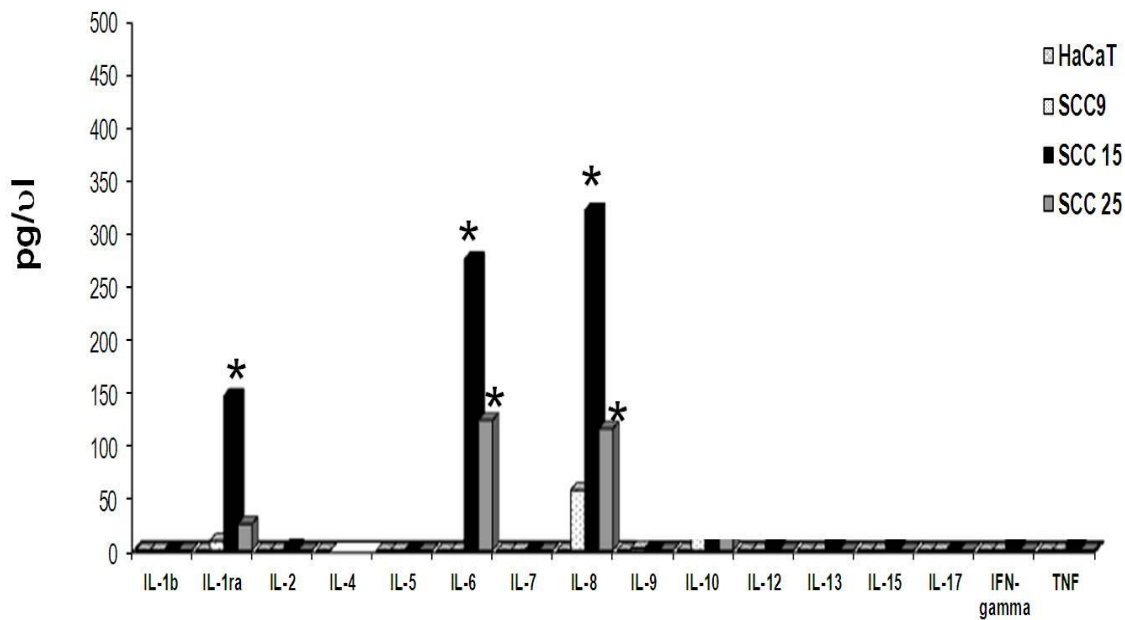
Los resultados muestran que en respuesta a TNF y a los factores solubles de la línea del estadio más avanzado SSC15, hay un aumento en el contenido total de las tres moléculas de adhesión. Los resultados muestran una clara correlación con los resultados de citometría y de adhesión ratificando que los factores derivados de los factores solubles de la línea de carcinoma oral SSC15 son capaces de inducir efectos semejantes al TNF.

## **Perfil bioquímico presente en los factores solubles de las líneas de carcinomas de células escamosas (SCCs).**

Una vez que identificamos la actividad biológica de los factores solubles derivados de los carcinomas orales, el siguiente objetivo fue evaluar la composición de los factores proteicos solubles presentes en las líneas de carcinomas de células escamosas (SCCs), para lo cual utilizamos el sistema Bio-Plex system (BIO-RAD, CA), que permite la identificación por ensayo de ELISA de citocinas, quimiocinas, y factores de crecimiento todas ellas asociadas al proceso inflamatorio (como se describe en material y métodos).

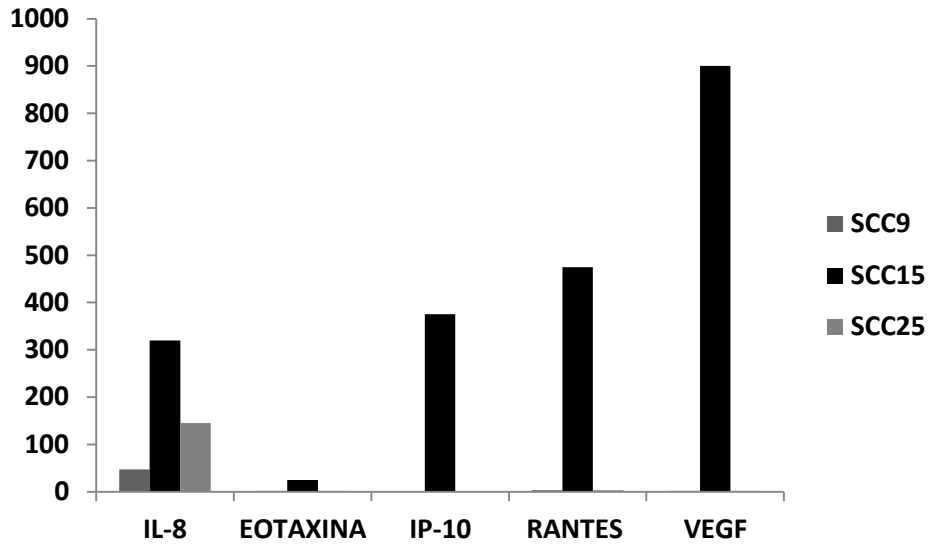
En los resultados podemos observar que los factores solubles secretados por las 3 líneas solo se detectó la presencia de: IL-1ra, IL-6, IL8. En los factores solubles de las células control (HaCaT) no detectamos ninguna de las moléculas evaluadas. La abundancia más baja de las proteínas analizadas se encontró en los factores solubles de SCC9. La mayor cantidad de estas proteínas se encontró en los factores solubles de la línea SCC15, mientras que se encontró un nivel intermedio en los factores solubles de las células SCC25 **(Figura 6).**





**Figura 6.- Presencia de citocinas pro-inflamatorias en los factores solubles secretados por las líneas celulares de carcinomas de células escamosas.** Se cuantificaron 50  $\mu$ l del medio condicionado por las líneas de carcinoma epidermoide oral SCC-9, SCC-15, SCC25 de lengua y de la línea HaCaT, utilizada como control. Las muestras se evaluaron en el sistema Bio-plex (Biorad) como se indica en materiales y métodos.

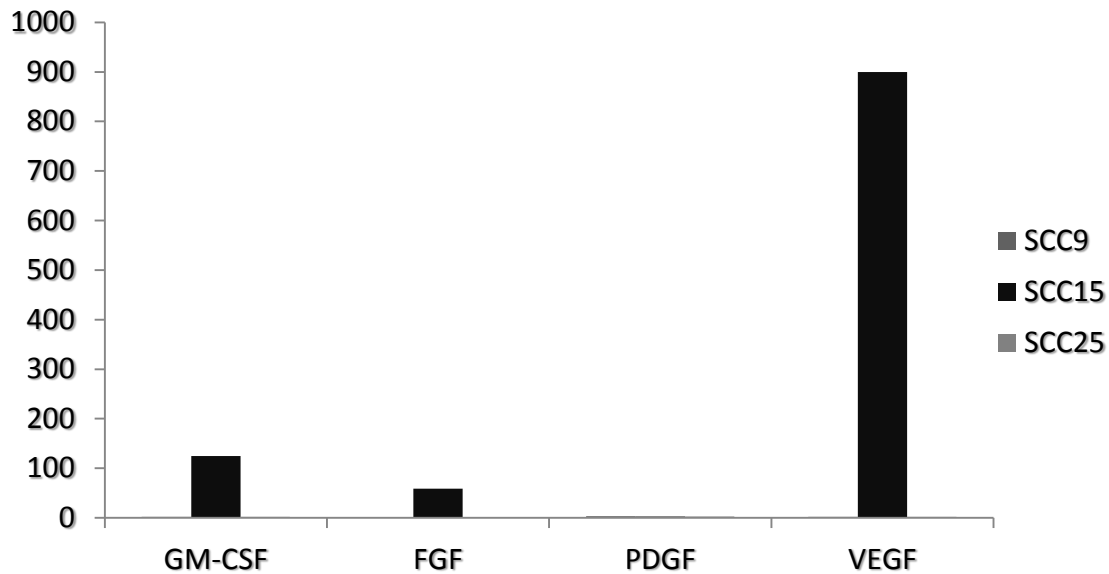
El análisis de las quimiocinas indica la presencia elevada de GM-CSF, RANTES, IP-10 en los factores solubles de la línea SCC-9, SCC-15 y SCC25 a diferencia de la línea HaCaT que se utilizó como control. Los factores de crecimiento indican la presencia elevada de VEGF en los factores solubles de SCC-9, SCC-15 y SCC-25 a diferencia de los factores solubles de la línea utilizada como control (HaCaT). No se encontraron incrementos en la expresión de los factores PDGF y FGF. **(Figura 7)**



**Figura 7.- Presencia de quimiocinas en los factores solubles secretados por las líneas celulares de carcinomas de células escamosas.** Se cuantificaron 50  $\mu$ l del medio condicionado por las líneas de carcinoma de células escamosas SCC-9, SCC-15, SCC25 de lengua y de la línea HaCaT, utilizada como control. Las muestras se evaluaron en el sistema Bio-plex (Biorad) como se indica en materiales y métodos.

Estos resultados indican que entre los factores solubles secretados por las líneas SCCs, están presentes citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento. Es interesante notar que esta combinación de productos son secretados en mayor cantidad en los factores solubles de la línea SCC15 que tiene la mayor actividad biológica sobre las células endoteliales.

En contraste, la línea de queratinocitos (HaCaT) carece de estos factores entre sus productos secretados y esto correlaciona con la falta de actividad biológica sobre las células endoteliales.



**Figura 8.- Presencia de factores de crecimiento en los factores solubles secretados por las líneas celulares de carcinomas de células escamosas.** Se cuantificaron 50  $\mu$ l del medio condicionado por las líneas de carcinoma de células escamosas oral SCC-9, SCC-15, SCC25 de lengua y de la línea HaCaT, utilizada como control. Las muestras se evaluaron en el sistema Bio-plex (Biorad) como se indica en materiales y métodos.

## DISCUSIÓN

---

Nuestro grupo ha estudiado el cambio de un fenotipo endotelial de reposo a uno activado en respuesta a factores solubles secretados por células tumorales. Estos estudios incluyen factores solubles de leucemias (EUHE, Eusebia), cáncer cervicouterino (HeLa) y cáncer de glándula mamaria (MCF-7, ZR). En todos los casos se han empleado cultivos primarios de células endoteliales humanas, lo que ha permitido generar un modelo in vitro para estudiar este microambiente tumoral. Este modelo se basa en la inducción de un fenotipo endotelial pro-adhesivo al que se asocia la expresión de las moléculas de adhesión selectina-E, ICAM-1, VCAM dependiente de la activación del sistema NF- $\kappa$ B. Estos efectos se consideran esenciales en la fase de adhesión y extravasación durante la reacción inflamatoria y nuestro grupo ha propuesto que esta secuencia de eventos se reproduce en la metástasis. (19,27,31).

En este trabajo se aplicó el mismo modelo a factores solubles secretados por las líneas de carcinomas orales con el fin de verificar que la presencia de factores solubles tumorales capaces de activar el endotelio normal es común a diferentes tipos de carcinomas metastásicos.

Confirmamos que el porcentaje de adhesión de células U937 en las células endoteliales tratadas con factores solubles tumorales de 3 carcinomas de lengua diferentes (**Fig. 1**), incrementan la adhesión celular y la expresión de moléculas de adhesión celular en forma diferencial.

### **Composición bioquímica de los factores solubles tumorales**

Esto podría deberse a que poseen una composición bioquímica distinta presentes en los factores solubles que secretan estas líneas de carcinomas de la cavidad oral. Con el objetivo de verificar estas diferencias realizamos un ensayo de ELISA Multiplex de las diferentes mezclas de los factores solubles tumorales (**Figura 2**) verificando que los factores solubles derivados de las líneas SCC15 que presentaron la mayor actividad biológica en adhesión y expresión de moléculas de adhesión presenta las mayores concentraciones de citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas y factores de crecimiento.

Resulta interesante mencionar que los factores solubles secretados por las células SCC9 y HaCaT no presentaron cantidades significativas de estas proteínas. Si bien, el análisis por ELISA Multiplex solo se limitó a 27 proteínas podría pensarse que las proteínas identificadas (VEGF, GM-CSF, IL-1ra, IL6, IL8, IP10, RANTES), desempeñan un papel importante en la activación de las células endoteliales.

En un estudio paralelo Montés Sánchez identificó una composición de factores solubles muy semejante en la mezcla de factores solubles derivados de líneas de cáncer de mama **(31)**. La importancia de estos factores en la activación endotelial está siendo evaluada reconstituyendo la mezcla con citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento recombinantes, depletando las mezclas de factores solubles tumorales de cada una de estas proteínas por medio de anticuerpos monoclonales específicos.

## **Citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en cáncer**

Sólo 7 de las 27 proteínas analizadas se encontraron en cantidades significativas entre los factores solubles tumorales.

### **VEGF:**

Un hallazgo inesperado fue la abundante presencia de la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) en las 3 líneas de carcinomas orales. Considerando que en células normales la expresión de VEGF es dependiente de una condición de hipoxia, resulta sorprendente la producción de VEGF por las líneas tumorales ya que ocurrió a una concentración parcial de oxígeno de 20% indicando en las 3 líneas celulares indicativo de una alteración de la expresión de VEGF. En cáncer la secreción constitutiva de VEGF independiente de una condición hipoxica favorece la angiogenesis tumoral y su crecimiento en un contexto clínico y es un marcador de mal pronóstico.(4)

### **GM-CSF**

La participación de GM-CSF en cáncer es compleja, ya que parece requerir de la presencia de otras citocinas como IL-4 e IL-6, además existen reportes antagonicos de su participación en la tumorigenesis. Por ejemplo, la coexpresión de GM-CSF e interleucina 12, inhiben la respuesta inmune y al ser

sobreexpresados en células de melanoma murino B16, disminuyendo por completo la capacidad tumorigenica de ratones singenicos C57B/6. En contraste se ha descrito que la línea epitelial de mama de crecimiento benigno MCF7-A secreta factores capaces de inducir la sobreexpresión de IL6 y GM-CSF en la línea tumoral de cáncer de mama R2T1AS que se asocia a una mayor tasa de crecimiento y a una mayor capacidad tumorigénica *in vivo*.

Más aún, la exposición continúa de GM-CSF más IL-4 de células mesenquimales de médula ósea humana, resultó en un incremento en la transformación morfológica y una mayor tasa de crecimiento tanto *in vitro* como *in vivo* de las células mesenquimales, indicando la inducción de un fenotipo transformado.

Considerando que los reportes previos indican que la participación de GM-CSF requiere de otras citocinas, es interesante notar que en los casos de carcinomas orales analizados son secretados junto con IL6. Queda por definir si las células endoteliales empleadas en este trabajo expresan receptores para GM-CSF y por tanto si esta citocina puede estar contribuyendo a la activación endotelial observada.



## **IL-1ra**

Se ha reportado que la forma soluble del receptor a IL-1 podría servir como un antagonista funcional de la IL-1, la presencia de esta proteína resulta controversial, dado que al atrapar IL-1 tendría un efecto antiinflamatorio reduciendo la adhesión de las células agregadas por células tumorales y su extravasación, considerando este escenario podría proponerse que las células tumorales no solo producen factores pro-inflamatorios a través de la liberación de factores solubles tumorales, si no que pueden regular el proceso inflamatorio. (11,18)

## **IL6**

Solamente los factores solubles de la líneas SCC15 de carcinoma oral presentaron IL6; si bien sólo representa el 4% de los factores identificados en el multiplex esta cantidad podría ser relevante en la actividad biológica de los factores solubles de SCC15. La IL-6 se reconoce como un inductor clásico de los estados de inflamación crónica y puede promover la activación del endotelio vascular.

También se ha reportado que IL-6 es producida por tumores que desarrollan metástasis hacia el hígado, como el caso de cáncer de colon y cáncer de glándula mamaria. La actividad de esta citocina en los factores solubles tumorales podría verse potenciada por la presencia de otros factores co-secretados por las células. (8,28)

## **IL8**

La sobreexpresión de IL-8 en cáncer colorectal favorece un incremento en la tumorigenesis y metástasis, este incremento se debe a que IL-8 se asocia a la sobreexpresión de MMP-2 y MMP-9 (16). La actividad de estas metaloproteasas se ha identificado en procesos de remodelación tisular fisiológicos como cicatrización normal, pero también participan en la remodelación tisular asociada a procesos patológicos incluso en la invasión (17). También en melanomas se ha identificado que IL-8 actúa como un factor angiogénico y favorece también la mitosis. (8)

Por lo anterior la IL-8 se ha postulado como un potencial blanco terapéutico.

En particular se ha buscado interferir con IL8 con el propósito de disminuir la progresión tumoral, una alternativa que se ha desarrollado es el uso de un anticuerpo anti-IL-8 en ratones desnudos con cáncer de hígado. Los resultados muestran que la administración de anticuerpos neutralizantes anti-IL8 disminuyó de manera significativa el crecimiento tumoral, más aun es interesante notar que esta disminución se asocia a una menor expresión de MMP-2 y MMP-9. Algo semejante se observó utilizando el mismo en el tratamiento de melanoma experimental observándose una disminución en la angiogénesis.(8)

En nuestros resultados encontramos incrementos de IL-8 en los factores solubles de las líneas SCC9 y SCC15, en otros estudios de nuestro grupo se reportó expresión de IL-8 en los factores solubles de cáncer de mama. Esto indica que IL-8 podría ser utilizado como un marcador asociado a la progresión tumoral, independientemente del tipo tumoral. En los pacientes donde se identificara la producción de IL-8 el uso de anticuerpos neutralizantes que interfirieran con su señalización podría servir como una alternativa terapéutica.

## **IP10**

IP10 es una proteína inducida por interferón; se ha reportado que esta proteína inhibe la proliferación y metástasis en tumores. En un estudio se reporta que la expresión elevada de IP10 en pacientes en etapas II y III de cáncer colorectal correlacionan con el desarrollo de metástasis y con un pobre pronóstico. La detección de IP10 podría ser utilizado como un marcador pronóstico de etapas II y III en pacientes con cáncer colorectal. Esto ha llevado a proponer que IP10 podría ser utilizado como un marcador pronóstico de etapas II y III en pacientes con cáncer colorectal.(37)

## **RANTES**

Es una quimiocina que pertenece a la clase CC, lo que la distingue de IL8 que pertenece a la clase CXC. La expresión de RANTES en células tumorales se ha asociado con la tumorigénesis y coincide con nuestro hallazgo de RANTES por los productos secretados por la línea SCC15. La presencia de RANTES en el microambiente tumoral puede ser un microatrayente para las células tumorales. Desde este punto de vista es interesante considerar que las células endoteliales asociadas al tumor, al ser estimuladas con MIF1a pueden liberar RANTES. (8)

En un estudio donde se evaluó la expresión de RANTES y su receptor CCR5 en 60 pacientes con metástasis de cáncer gástrico; se identificaron niveles de expresión elevados, en donde se concluye que RANTES y su receptor pueden contribuir a la metástasis del cáncer gástrico al promover las respuestas TH1 y TH2. Al comparar una variedad de marcadores biológicos en un grupo de biopsias de cáncer de glándula mamaria, RANTES fue el único marcador presente en todas las biopsias. (41)

### **Cambios en la cantidad total y en la expresión en la superficie celular de moléculas de adhesión.**

El western blot se realiza en extractos totales de células endoteliales y se refleja por lo tanto en el contenido total de las moléculas de adhesión analizadas, mientras que la citometría refleja la cantidad de estas moléculas presentes en la superficie de las células. Al comparar los incrementos de expresión de las moléculas de adhesión evaluadas por western o por citometría se pueden observar discrepancias. Los incrementos por citometría en la expresión de selectina-E y de ICAM-1 (**Figura 4,5**) son menores a los incrementos en la señal de los westerns (**Figura 6,7**).

Esta diferencia podría explicarse considerando que la citometría solo valora la proteína presente en la membrana celular y que por tanto depende del recambio de membrana y del tráfico vesicular.

En la **Tabla 1** se muestran grandes discrepancias para la expresión de selectina E al comparar el número de veces de incremento en los experimentos realizados por citometría o por western, mientras para ICAM-1 los valores son muy semejantes. Estos datos sugieren que para ICAM-1 los estímulos no solo incrementan el contenido total de proteína, además de que mantienen grandes diferencias entre las proteínas presentes en la membrana celular y la que se encuentra en compartimientos celulares.

En el caso de ICAM-1 la concordancia entre los valores obtenidos por citometría y por western sugieren que toda la proteína sintetizada de *novo* aparece en la superficie o bien, que a pesar de su sobreexpresión la proporción de proteína en la membrana y la de compartimientos intracelulares se mantiene constante.

## **Importancia de ICAM en cáncer**

Por otro lado, se ha demostrado que moléculas de adhesión, como la selectina-E, no sólo están involucradas en procesos de inflamación, sino también en la metástasis tumoral, como ocurre en algunos casos de cáncer de colon y la expresión de ICAM-1 también ha resultado ser un marcador asociado a un fenotipo invasivo (5, 17,12).

Todos los cambios observados sugieren un fenotipo similar al que se denomina como "fenotipo endotelial activado" que induce el TNF y que participa en la reacción inflamatoria. Queda por ratificar, que el cambio fenotípico inducido por los factores solubles derivados de un carcinoma oral, también requiere de la activación del sistema NF- $\kappa$ B.

## CONCLUSIONES

---

En las mezclas de factores solubles derivados de las células SCC15 se encontraron cantidades significativas de las principales citocinas pro-inflamatorias IL6, IL8, IL1ra, quimiocinas (RANTES- IP10) y el factor de crecimiento (VEGF).

Las células de carcinoma epidermoide SCC15 secretan factores capaces de "activar" a las células endoteliales con mayor potencia que los factores derivados de células de carcinoma epidermoide de lengua del estadio III SCC9 y SCC25.

Se observó un incremento en la exposición superficial y en la expresión de moléculas de adhesión intercelular como selectina-E e ICAM-1.

El aumento en la expresión de moléculas de adhesión inducida por los factores de células de carcinoma epidermoide son muy semejantes a los efectos que induce el TNF.



## REFERENCIAS

---

1. **Ann F. Chambers, Alan C. Groom, Iand McDonald.** Dissemination and growth cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews* 2002 Vol 2: 563-571
2. **Alby, L., and R. Auerbach.** 1984. Differential adhesion of tumor cells to capillary endothelial cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**:5739-43
3. **Balkwill, F., and A. Mantovani.** 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* **357**:539-45.
4. **Baldewijns MM, van Vlodrop IJ, Vermeulen PB, Soetekouw PM, van Engeland M, de Bruïne AP.** VHL and HIF signalling in renal cell carcinogenesis. *J Pathol.* 2010 Jun;221(2):125-38
5. **Bibhu R. Das, Jatin K. Nagpal.** Understanding the biology of oral cancer. *Med Sci Monit*, 2002, 8 (11): 258-267.
6. **Brigitta M.N Brinkan, David T. Wong.** Disease mechanism and biomarkers of oral squamous cell carcinoma. *Current Opinion in Oncology*, 2006 18:228-233.
7. **Bsoul SA, Huber MA, Terezhalmly GT.** Squamous Cell Carcinoma of the Oral Tissues : A comprehensive review for oral health care providers. *J. Contemp Dent Pract.* 2005;6: 1-16.
8. **Cao Z, Xu X, Luo X, Li L, Huang B, Li X, Tao D, Hu J, Gong J. J Huazhong** Role of RANTES and its receptor in gastric cancer metastasis. *Univ Sci Technolog Med Sci.* 2011 Jun;31(3):342-7. Epub 2011 Jun 14.
9. **Colotta, F., P. Allavena, A. Sica, C. Garlanda, and A. Mantovani.** 2009. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* **30**:1073-81.
10. **Charles J. Lin, BA, Jennifer R. Grandis, Thomas E.** Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: established models and rationale for selection. *Head Neck* 29: 2007;163-188.
11. **Chen Z, Colon I, Ortiz N, Callister M, Dong G, Pegram MY, Arosarena O, Strome S, Nicholson JC, Van Waes C.** Effects of interleukin-1alpha, interleukin-1 receptor antagonist, and neutralizing antibody on proinflammatory cytokine expression by human squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res.* 1998 Aug 15;58(16):3668-76
12. **Crispian Scully, Stephen Porter.** Oral Cancer. *BMJ* 2000 Vol 321 July 97-102.
13. **Daisuke Sano, Jeffrey N. Myers.** Metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Cancer Metastasis Rev* (2007) 26:645-662
14. **Das, B. R., and J. K. Nagpal.** 2002. Understanding the biology of oral cancer. *Med Sci Monit* **8**:RA258-67.
15. **DGE. SSA.** Registro Histopatológico de las Neoplasias en México (RHNM), 2002.
16. **D.T.W Wong, R. Todd, T.Tsuji, RB. Donoff.** Molecular biology of human oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1996, Vol 7(4):319-398
17. **Huang S, Mills L, Mian B, Tellez C, McCarty M, Yang XD, Gudas JM, Bar-Eli M.** Fully humanized neutralizing antibodies to interleukin-8 (ABX-IL8) inhibit angiogenesis, tumor growth, and metastasis of human melanoma. *Am J Pathol.* 2002 Jul;161(1):125-34

18. **Edeline J, Vigneau C, Patard JJ, Rioux-Leclercq N.** [Signalling pathways in renal-cell carcinoma: from the molecular biology to the future therapy]. *Bull Cancer*. 2010;97:5-15.
19. **Estrada-Bernal, A., C. Mendoza-Milla, J. L. Ventura-Gallegos, L. N. Lopez-Bojorquez, E. Miranda-Peralta, F. Arechavaleta-Velasco, F. Vadillo-Ortega, L. Sanchez-Sanchez, and A. Zentella-Dehesa.** 2003. NF-kappaB dependent activation of human endothelial cells treated with soluble products derived from human lymphomas. *Cancer Lett* 191:239-48.
20. **Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin D.M,** *Globocan Cancer Statistics, 2002.* Ca Cancer J Clin 2005,55:74-10
21. **Friberg E, Orsini N, Mantzoros CS, Wolk A.** Diabetes mellitus and risk of endometrial cancer: a meta-analysis. *Diabetologia*. 2007 Jul;50(7):1365-74
22. **Goldstein David P., C. Irish Jonathan.** Head and neck squamous carcinoma cell carcinoma in the young patient. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery* 2005, 13:207-211.
23. **Jiang Z, Xu Y, Cai S.** CXCL10 expression and prognostic significance in stage II and III colorectal cancer. *Mol Biol Rep*. 2010 Jul;37(6):3029-36
24. **H K Williams.** Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. *J Clin Pathol* 2000;53:165-172
25. **Kamada, H., Y. Tsutsumi, T. Kihira, S. Tsunoda, Y. Yamamoto, and T. Mayumi.** 2000. In vitro remodeling of tumor vascular endothelial cells using conditioned medium from various tumor cells and their sensitivity to TNF-alpha. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **268**:809-813.
26. **Kulbe H, Chakravarty P, Leinster DA, Charles KA, Kwong J, Thompson RG, Gallagher WM, Galletta L, Salako MA, Smyth JF, Hagemann T, Brennan DJ, Bowtell DD, Balkwill FR.** A dynamic inflammatory cytokine network in the human ovarian cancer microenvironment. *Cancer Res*. 2011
27. **Lopez-Bojorquez, L. N., F. Arechavaleta-Velasco, F. Vadillo-Ortega, D. Montes-Sanchez, J. L. Ventura-Gallegos, and A. Zentella-Dehesa.** 2004. NF-kappaB translocation and endothelial cell activation is potentiated by macrophage-released signals co-secreted with TNF-alpha and IL-1beta. *Inflamm Res* **53**:567-75.
28. **McConkey DJ, Bar-Eli M.** Fully human anti-interleukin 8 antibody inhibits tumor growth in orthotopic bladder cancer xenografts via down-regulation of matrix metalloproteases and nuclear factor-kappaB. *Clin Cancer Res*. 2003 Aug 1;9(8):3167-75
29. **McLean MH, Murray GI, Stewart KN, Norrie G, Mayer C, Hold GL, Thomson J, El-Omar EM.** The inflammatory microenvironment in colorectal neoplasia. *PLoS One*. 2011 Jan 7;6(1):e15366
30. **Mohar A, Frias Mendivil M, SÚchil-Bernal L, Mora Macías T, De la Garza JG.** Epidemiología descriptiva en el Instituto Nacional de Cancerología de México. 1997;39:253-258.
31. **Montes-Sanchez, D., J. L. Ventura, I. Mitre, S. Frias, L. Michan, A. Espejel-Nunez, F. Vadillo-Ortega, and A. Zentella.** 2009. Glycosylated VCAM-1 isoforms revealed in 2D western blots of HUVECs treated with tumoral soluble factors of breast cancer cells. *BMC Chem Biol* **9**:7

32. **Oh, P., Y. Li, J. Y. Yu, K. M. Krasinska, L. A. Carver, J. E. Testa, and J. E. Schnitzer.** 2004. Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy. *Nature*
33. **Prince, S., and B. M. Bailey.** 1999. Squamous carcinoma of the tongue: review. *Br J Oral Maxillofac Surg* **37**:164-74.
34. **Rajkumar T, Shirley S, Raja UM, Ramakrishnan SA.** Identification and validation of genes involved in gastric tumorigenesis. *Cancer Cell Int.* 2010 Nov 24;10:45
35. **Risau, W.** 1995. Differentiation of endothelium. *FASEB J* **9**:926-33.
36. **Rizo Ríos Pedro, Sierra Colindres María Isabel, Vázquez Piñon Gabriela, Marcos Cano Guadiana, Abelardo Meneses García, Alejandro Mohar.** Registro Hospitalario de Cáncer: Compendio de Cáncer 2000– 2004 *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*, Vol 2, Núm 3, Septiembre 2007: 203-287.
37. **Salsman VS, Chow KK, Shaffer DR, Li XN, Gerken C, Perlaky L.** Crosstalk between medulloblastoma cells and endothelium triggers a strong chemotactic signal recruiting T lymphocytes to the tumor microenvironment. *PLoS One.* 2011;6(5):e20267
38. **S. Prince, B.M.W Bailey.** Squamous carcinoma of tongue: Review. *British Journal Of Oral and Maxillofacial Surgery.* 1999 Vol 37. 164-174.
39. **Timar, J., O. Csuka, E. Remenar, G. Repassy, and M. Kasler.** 2005. Progression of head and neck squamous cell cancer. *Cancer Metastasis Rev* **24**:107-27.
40. **Tirado Laura, Granados García Martín.** Epidemiología y Etiología del Cáncer de la Cabeza y el Cuello. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*, Vol 2, Núm 1, Marzo 2007: 9-17.
41. **Utoguchi, N.H. Makimoto, Y. Wakai, Y. Tsutsumi, S. Nakagawa, and T. Mayumi.** 1996. Effect of tumour cell-conditioned medium on endothelial macromolecular permeability and its correlation with collagen. *British Journal of Cancer* **73**:24-28.
42. **Williams, H. K.** 2000. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. *Mol Pathol* **53**:165-72.
43. **Wong, D. T., R. Todd, T. Tsuji, and R. B. Donoff.** 1996. Molecular biology of human oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med* **7**:319-28.
44. **Zakrzewska J. Fortnightly.** Review Oral Cancer. *BMJ.* 1999; 318: 1051-1054

