

Estado de la publicación: El preprint ha sido publicado como artículo en una revista
DOI del artículo publicado: <https://doi.org/10.18273/saluduis.55.e:23020>

Caracterización de Marcadores de Células Madre TumORAles en Cáncer Escamocelular de Cavidad Oral

Manuel Garcia, Marisol Campuzano

<https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.1848>

Enviado en: 2021-02-11

Postado en: 2021-02-18 (versión 1)

(AAAA-MM-DD)

Caracterización de Marcadores de Células Madre TumORAles en Cáncer Escamocelular de Cavidad Oral

Marisol Campuzano Castellanos, Investigadora Laboratorio de Biología Celular, Facultad de Salud, Universidad Surcolombiana marisol.campuzano@usco.edu.co
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9731-9103>

Manuel García Flórez, Profesor Titular, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Salud, Universidad Surcolombiana, e-mail: garcia@usco.edu.co
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5168-3102>

Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Salud, Universidad Surcolombiana,

Correspondencia: Manuel García Flórez
garcia@usco.edu.co
Laboratorio de Biología Celular
Calle 9 # 14-03
Neiva, Huila
Colombia

RESUMEN

El cancer escamocelular de cavidad oral es una patología con bajas tasas de sobrevivencia para los pacientes que lo padecen. Se plantea que esto puede ser consecuencia de su recurrencia y resistencia al tratamiento.

Se ha planteado que las células tumorales progenitoras por sus propiedades de auto renovación, iniciación tumoral, migración y metástasis pueden ser las responsables de la manutención y renovación del tumor.

Sin embargo, aun no existe un consenso sobre la verdadera participación de estas células y su identificación y caracterización es aun un reto experimental.

En este estudio se lograron identificar *in situ*, mediante microscopia de fluorescencia, diferentes marcadores de células tumorales progenitoras: *Tumour-Related Antigen [TRA]-1-60*, *Stage-Specific Embryonic Antigen-4 [SSEA-4]*, SOX2, NANOG y OCT4,

La presencia de estos marcadores sugiere la participación de las células progenitoras tumorales en la evolución de este tipo de cáncer, lo que abre nuevas vías terapéuticas para el posible tratamiento de este tumor con el fin de mejorar el pronostico, tasa de sobrevivencia y calidad de vida del paciente.

Palabras Clave: Carcinoma Escamocelular de Cabeza y Cuello, Células Tumorales Progenitoras, Biomarcadores Tumorales.

Tumor stem cells markers characterization in squamous cell carcinoma of oral cavity

Abstract

Squamous cell cancer of the oral cavity is a pathology with low survival rates for patients who suffer from it. It is suggested that this may be a consequence of its recurrence and resistance to treatment. It has been suggested that progenitor tumor cells due to their self-renewal, tumor initiation, migration and metastasis properties may be responsible for the maintenance and renewal of the tumor. However, there is still no consensus on the true participation of these cells and their identification and characterization is still an experimental challenge. In this study, it was possible to identify in situ, using fluorescence microscopy, different markers of progenitor tumor cells: Tumour-Related Antigen [TRA] -1-60, Stage-Specific Embryonic Antigen-4 [SSEA-4], SOX2, NANOG and OCT4, The presence of these markers suggests the participation of tumor progenitor cells in the evolution of this type of cancer, which opens up new therapeutic avenues for the possible treatment of this tumor in order to improve prognosis, survival rate and quality of life of the patient

Key words: Squamous Cell Carcinoma of Head and Neck, Embryonal Carcinoma Stem Cells, Biomarkers, Tumor

INTRODUCCION

A pesar de las extensas investigaciones, la tasa de sobrevivencia en pacientes con cáncer escamocelular de cavidad oral (CECO) no se ha modificado en los últimos 40 años. (1). Es así como, en un periodo calculado de 5 años, la tasa de sobrevivencia es del 40% de los pacientes con cáncer escamocelular en estadio avanzado y con recurrencia local (2). Varios factores han sido relacionados con la recurrencia y con el peor pronóstico de este cáncer, a nivel histopatológico los tumores pobremente diferenciados presentan mayor tendencia a resurgir (3), a nivel molecular se ha encontrado la sobreexpresión del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) en tumores avanzados y pobremente diferenciados (4). Incluso, las oncoproteínas E6 y E7 del Virus del Papiloma Humano pueden estar implicadas (5).

Otra hipótesis de la recurrencia local de este tipo de cáncer recae en la participación de las células tumorales progenitoras (del inglés: *Cancer Stem Cells*), una sub población de células pluripotentes que tienen propiedades de auto renovación, iniciación tumoral, migración y metástasis (6). Varios reportes han relacionado este tipo celular con la mantención y renovación del tumor, incluso después del tratamiento (7-9)

Sin embargo, aun no existe un consenso sobre la verdadera participación de estas células y su identificación y caracterización es aun un reto experimental en el que no se ha podido establecer un protocolo estandarizado que permita confirmen su identidad (10).

En este estudio se lograron identificar *in situ* los marcadores de diferentes células progenitoras: *Tumour-Related Antigen [TRA]-1-60*, *Stage-Specific Embryonic Antigen-4 [SSEA-4]*, SOX2, NANOG y OCT4, en muestras de tejido cáncer de cavidad oral con anticuerpos con fluorescencia.

La presencia de estos marcadores sugiere la participación de las células progenitoras tumorales en la evolución de este tipo de cáncer.

Materiales y Métodos

En este estudio se incluyeron muestras de tejido de pacientes diagnosticados con cáncer escamocelular de cavidad oral y regiones adyacentes, provenientes del Departamento de Patología del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de la ciudad de Neiva, Colombia (Tabla 1).

El material fijado e incluido en parafina para obtener cortes histológicos de 5 μm de espesor que fueron teñidos de forma convencional con Hematoxilina & Eosina, lo que permitió identificar las lesiones y clasificarlas histopatológicamente en Carcinoma Escamocelular Moderadamente Diferenciado o Carcinoma Escamocelular Bien Diferenciado.

Inmunofluorescencia

Para la marcación de inmunofluorescencia se usaron cortes histológicos representativos de las lesiones, los cuales fueron desparafinizados e hidratados convencionalmente. El bloqueo de uniones inespecíficas se logró incubando las láminas con BSA 3% por 1h a temperatura ambiente. Se usó cloruro de amonio 50 mM en PBS 1% durante para disminuir la fluorescencia endógena de la muestra.

Se emplearon los siguientes anticuerpos primarios, relacionados con células madre tumorales: Los anticuerpos monoclonales Anti-TRA-1-60, y Anti-SSEA4, desarrollados en ratón y los anticuerpos policlonales Anti-SOX2; Anti-Nanog; Anti-Oct4, provenientes de Abcam Inc. (Cambridge, MA, USA).

En los controles negativos se omitió el anticuerpo primario. Como anticuerpo secundario para los anticuerpos primarios se usó un anti IgG de ratón desarrollado en asno, acoplado a Alexa Fluor 555, mientras que para los anticuerpos

policlonales se uso un anti IgG de Conejo desarrollado en cabra, acoplado a Alexa Fluor 488, de Abcam Inc. (Cambridge, MA, USA). Finalmente se uso el medio de montaje acuoso con DAPI (ab 104139, Abcam, Cambridge, MA, USA) por 5 min y enseguida se realizo la observación en el microscopio con lámpara de fluorescencia.

Captura y Análisis de Imagen

Una vez detectadas las regiones de interés, fueron analizadas en el microscopio Axio Imager Z2, dotado de lámpara de fluorescencia y con los filtros correspondientes DAPI, FITC o DsRed las imágenes fueron capturadas con la cámara AxioCam ICM 1 con el objetivo 40x (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Las imágenes que fueron adquiridas en diferentes filtros con el Software ZEN (blue edition) (Carl Zeiss, Jena, Germany), posteriormente analizadas y combinadas usando el Software FIJI (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda).

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a las normas del Comité de Ética Bioética e Investigación del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva, cuya aprobación esta bajo el registro no 003-001.

Grado de Diferenciación del Carcinoma Escamo Celular	Rango de Edad (años)	Casos	Genero	Localización Anatómica
Bien Diferenciado	(38-92) x = 61.93	16	5 ♀ 11 ♂	Lengua (12), Amígdala (1), Laringe (3)
Moderadamente Diferenciado	(41-93) x = 65.23	13	4 ♀ 9 ♂	Lengua (7), Amígdala (1), Laringe (3), Labio (2)
Pobrementemente Diferenciado	(60-76) x = 66.6	3	3 ♂	Lengua (1), Amígdala (1), Labio (1)

Tabla 1. Resumen de las principales características encontradas en la muestra seleccionada por conveniencia de pacientes con Carcinoma Escamocelular de Cavidad Oral. Se muestra el grado de diferenciación del tumor, rango y promedio de edad, genero y localización de la lesión.

Resultados

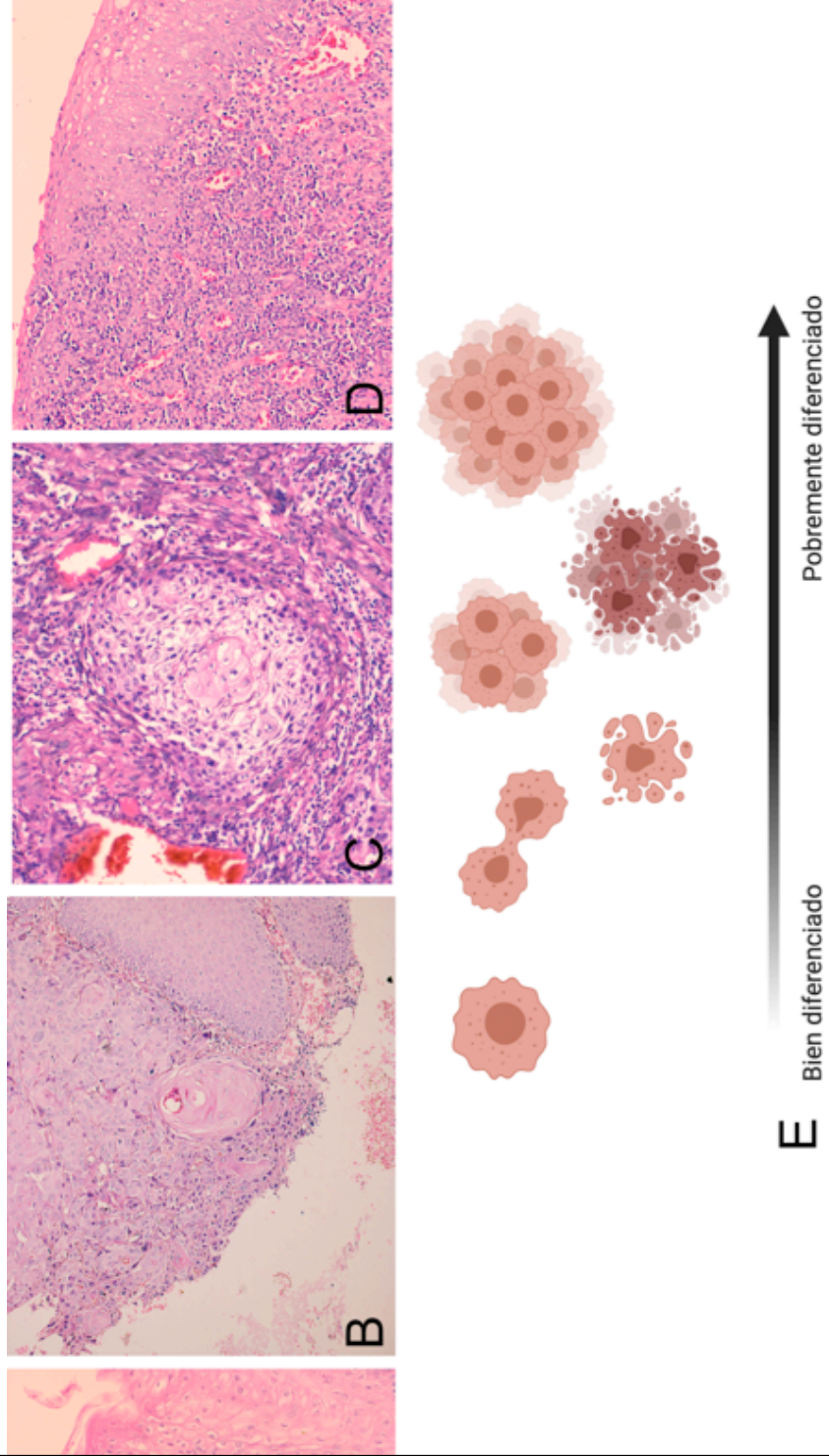
El análisis histológico comparativo, fue posible apreciar las alteraciones del tejido acorde con los diferentes grados de diferenciación del tumor (Figura 1). Es posible identificar las alteraciones celulares y perdida de organización del tejido a medida que el tejido pierde su grado de diferenciación (Fig. 1B, 1C y 1D).

En el estadio bien diferenciado fue posible identificar algunas perlas de queratina (Fig. 1B), totalmente desarrolladas densas y eosinofílicas, rodeados por células en la región externa (Fig. 1B). En el estadio moderadamente diferenciado se destaca la infiltración de células, probablemente neutrófilos, hacia la parte central los cuales comienzan a formar espacios entre la región central. La región periférica de la perla comienza a presentar infiltración celular (Fig. 1C)

En el estadio pobrementemente diferenciado (Fig. 1D) se destacan neutrófilos, células inflamatorias, linfocitos entre otros y el tejido se torna mas basófilo, y su arquitectura se ha perdido totalmente. La figura 1E, resume la evolución de la lesión, es notable la progresión de las alteraciones celulares y el aumento del numero de núcleos, y su alteración de tamaño a medida que progresa el tumor (Fig. 1E)

Marcadores de Células Tumorales Progenitoras

Las reacciones de inmunofluorescencia detectaron marcadores específicos de las células tumorales progenitoras. Esta se encontró en diferentes regiones del tejido (Figura 2). La marcación permitió detectar los núcleos celulares (DAPI) permitiendo reconocer regiones de epitelio, además se encontró el marcador OCT presente en regiones basales del tejido cercanas a este (flecha, figura 2A), la marcación para la proteína Nanog, que es expresada por células tumorales progenitoras, se encontró de forma difusa entre algunos núcleos de células epiteliales (Fig. 2B). Los marcadores Sox (Flecha, Figura 2C), y SEEA4 (Flecha, figura 2D) fueron detectados en algunas regiones cercanas del epitelio. Mientras que el *Tumour-Related Antigen* (TRA) alrededor de regiones vascularizadas (Flecha, Figura 2E)



Por aumento de tejido normal (A), y Carcinoma Escamocelular de Cavidad Oral, bien diferenciado (B) moderadamente diferenciado (D). Esquema del aumento de las alteraciones nucleares proporcionales a la pérdida de

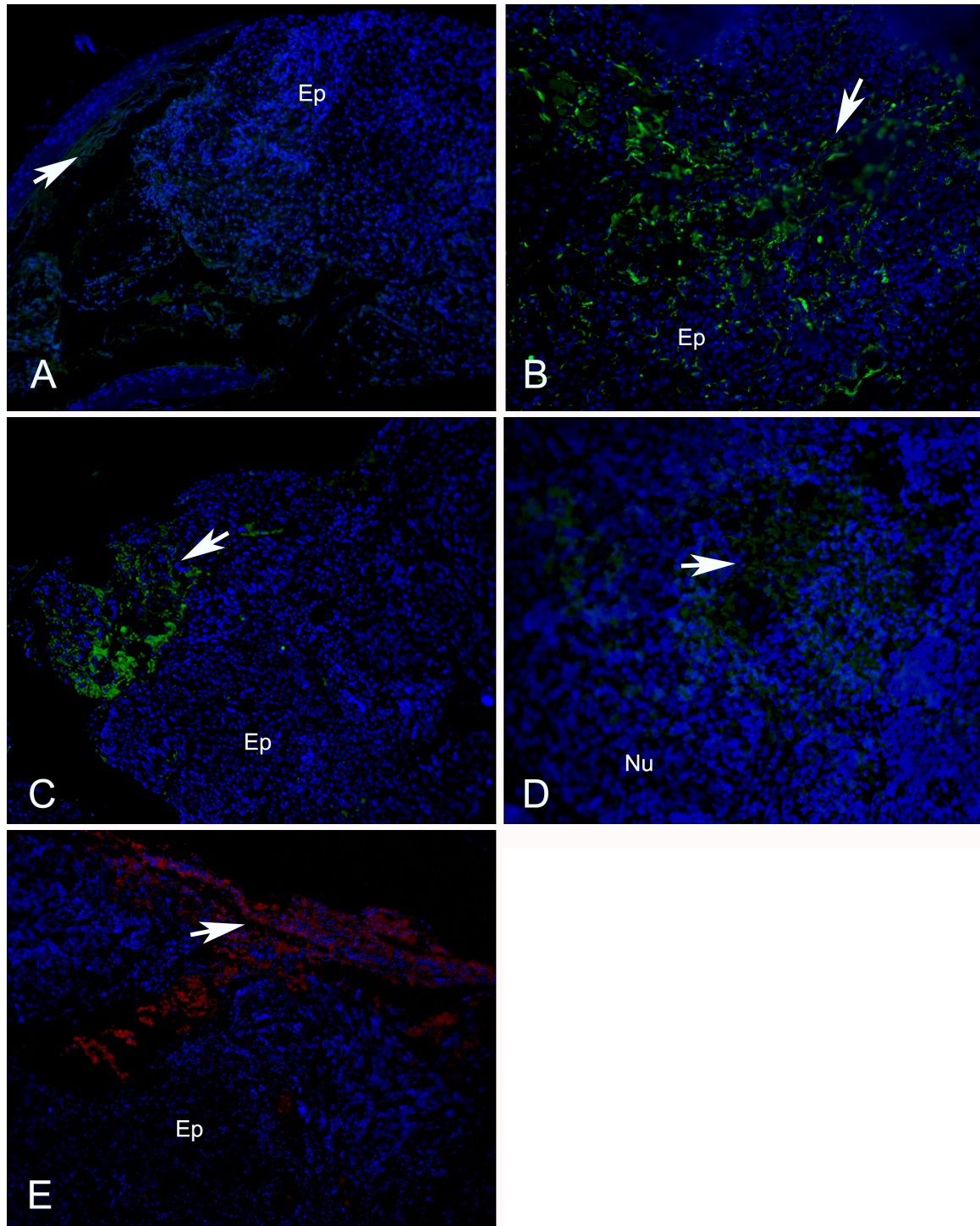


Figura 2. Identificación por la técnica de inmunofluorescencia de marcadores de células tumorales en cortes histológicos de muestras de carcinoma escamocelular de cavidad oral. Marcación *in situ* de **OCT4** (Fig A), **NANOG** (Fig B) **SOX2** (Fig C), *Stage-Specific Embryonic Antigen-4 [SSEA-4]* (Fig D) y *Tumour-Related Antigen [TRA]-1-60* (Fig E). Magnificación 10x.

Discusión

Estudios recientes han validado el papel patofisiológico de las células tumorales progenitoras en el mantenimiento a largo plazo de algunos tipos de cáncer (11)

Las células tumorales progenitoras son pequeñas poblaciones de células que comparten algunas características moleculares con las células normales progenitoras. Se han aislado de diferentes tipos de cáncer incluyendo el Carcinoma Escamocelular de cavidad oral (8).

Experimentalmente se logro identificar la presencia de diferentes marcadores de células tumorales. Comenzando por **OCT4**, cuya expresión en tejido tumoral ha sido relacionado con el potencial tumorigenico y con características clínicas de agresividad como metástasis y progresión tumoral. También actúa en la renovación de las células madre embriológicas y mantiene la pluripotencia de estas a través de la interacción con factores de transcripción como Stat3, Zic3 y HeX1.(12)

Siu y colaboradores, encontraron que la expresión de Oct-4 en combinación con Nanog y CD133 muestran un peor pronostico y tasa de sobrevivida en cáncer escamocelular, indicando su utilidad como marcador pronostico y de invasión (13)

Los demás marcadores como NANOG, SOX2, *Stage-Specific Embryonic Antigen-4* [SSEA-4] y *Tumour-Related Antigen* [TRA]-1-60, fueron identificados en el tejido tumoral lo que sugiere un posible rol en el inicio y desarrollo de la patología

Las terapias anti cáncer actuales no eliminan las células tumorales de una forma uniforme. Células con características tumorales, como de lento crecimiento, pueden mantener el crecimiento del tumor y ser responsables por la resistencia a las terapias y ocasionar la recidiva tumoral. Por tal razón nuevas terapias deben ser creadas para erradicar todas las células tumorales de una forma uniforme.

Declaración de contribución de los autores

M.C.C, y M.G.F han contribuido con el diseño e implementación de la investigación, así como con el análisis y redacción del manuscrito.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos al servicio de Patología del Hospital Universitario, Hernando Moncaleano Perdomo, Neiva – Huila. Colombia

Apoyo Financiero

Este estudio fue realizado con el soporte financiero de la Vicerrectoría de Investigaciones y Proyección Social de la Universidad Surcolombiana – Neiva, Huila

Conflicto de Intereses

Los autores declaran no poseer conflicto de intereses con el estudio realizado.

1. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):309-16.
2. Noble AR, Greskovich JF, Han J, Reddy CA, Nwizu TI, Khan MF, et al. Risk Factors Associated with Disease Recurrence in Patients with Stage III/IV Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity Treated with Surgery and Postoperative Radiotherapy. *Anticancer Res.* 2016;36(2):785-92.
3. Liao CT, Lin CY, Fan KH, Wang HM, Ng SH, Lee LY, et al. Identification of a high-risk group among patients with oral cavity squamous cell carcinoma and pT1-2N0 disease. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012;82(1):284-90.
4. Kalyankrishna S, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2006;24(17):2666-72.
5. Huang CG, Lee LA, Liao CT, Yen TC, Yang SL, Liu YC, et al. Molecular and serologic markers of HPV 16 infection are associated with local recurrence in patients with oral cavity squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2017;8(21):34820-35.
6. Simple M, Suresh A, Das D, Kuriakose MA. Cancer stem cells and field cancerization of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2015;51(7):643-51.
7. Bhutia SK, Naik PP, Praharaj PP, Panigrahi DP, Bhol CS, Mahapatra KK, et al. Identification and Characterization of Stem Cells in Oral Cancer. In: Turksen K, editor. *Stem Cell Niche: Methods and Protocols.* New York, NY: Springer New York; 2019. p. 129-39.
8. Shin KH, Kim RH. An Updated Review of Oral Cancer Stem Cells and Their Stemness Regulation. *Crit Rev Oncog.* 2018;23(3-4):189-200.
9. Patel SS, Shah KA, Shah MJ, Kothari KC, Rawal RM. Cancer stem cells and stemness markers in oral squamous cell carcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(20):8549-56.
10. Wolmarans E, Boy SC, Nel S, Mercier AE, Pepper MS, editors. *Cancer Stem Cells in Head and Neck Carcinomas: Identification and Possible Therapeutic Implications* 2018; Cham: Springer International Publishing.
11. Beck B, Blanpain C. Unravelling cancer stem cell potential. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(10):727-38.
12. Tsai LL, Yu CC, Chang YC, Yu CH, Chou MY. Markedly increased Oct4 and Nanog expression correlates with cisplatin resistance in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2011;40(8):621-8.
13. Siu A, Lee C, Dang D, Lee C, Ramos DM. Stem cell markers as predictors of oral cancer invasion. *Anticancer Res.* 2012;32(4):1163-6.