

ORIGINAL

Efecto de la inmunoterapia con el bacilo de Calmette-Guérin sobre la capacidad migratoria e invasiva del cáncer escamoso de cabeza y cuello en un modelo *in vitro* 3D



Keyliz Peraza Cruces^{a,*}, Carolina Sánchez Rodríguez^a, Luis Gutiérrez Guédez^b y Ricardo Sanz Fernández^a

^a Hospital Universitario de Getafe., Getafe, Madrid, España

^b Hospital Universitario Severo Ochoa, Leganés, Madrid, España

Recibido el 7 de septiembre de 2014; aceptado el 12 de enero de 2015

Disponible en Internet el 16 de febrero de 2015

PALABRAS CLAVE

Cáncer escamoso de cabeza y cuello;
Metaloproteinasas;
Bacilo de Calmette-Guérin;
Invasión;
Migración

Resumen El cáncer escamoso de cabeza y cuello se caracteriza por su tendencia a la invasión local y a distancia, además de una alta predisposición a la aparición de segundas neoplasias. El proceso de invasión y metástasis es complejo y tiene múltiples etapas. Las metaloproteinasas de matriz 2 y 9, se sobreexpresan en el cáncer escamoso de cabeza y cuello donde actúan degradando la membrana extracelular favoreciendo así la invasión tumoral y la metástasis. El bacilo de Calmette-Guérin (BCG) ha sido usado como inmunomodulador en el tratamiento de algunos tipos de cáncer con buenos resultados. El propósito de este estudio es determinar el efecto de la activación inmune mediada por el BCG sobre la migración e invasión usando un modelo *in vitro* 3D de cultivos de células tumorales de faringe cocultivadas con células mononucleares de sangre periférica en contacto o no con el BCG. Para determinar la expresión de las metaloproteinasas y p53 se realizó Western blot y para la migración e invasión, kits comerciales. Los resultados muestran disminución en la expresión de metaloproteinasas, p53 y en la migración en el grupo BCG.

© 2014 AEBM, AEFA y SEQC. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Head and neck squamous cell carcinoma;
Metalloproteinase;

Effect of immunotherapy with bacillus Calmette-Guérin on migratory and invasive capacity in a 3D head and neck squamous cell carcinoma model

Abstract Head and neck squamous cell carcinoma is characterized by local invasion and a propensity for dissemination to cervical lymph nodes and recurrence. Cancer cell invasion and

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: keylizmd@hotmail.com (K. Peraza Cruces).

Bacillus
Calmette-Guérin;
Invasion;
Migration

metastasis represent complex, multistep process. The remodelling of ECM by MMPs is one of the most crucial steps for cancer progression. MMP-2 and MMP-9, are over expressed in head and neck squamous cell carcinoma where they act to degrade the basement membrane thus promoting tumor invasion and metastasis. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) has been used as an immunomodulator in treating some cancers with good results. The purpose of this study is to determine the effect of BCG immune activation in migration and metastasis using *in vitro* 3D cultures pharyngeal tumor cells were co-cultured with previously isolated peripheral blood mononuclear cells, in experimental groups or cultured alone. MMPs and p53 was determinate by Western blot and the invasion-migration using commercial assays. Our results showed decreasing expression of MMPs, p53 and significantly reduced migration in BCG group.

© 2014 AEBM, AEFA y SEQC. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

El cáncer escamoso de cabeza y cuello (CECC) es la sexta neoplasia más frecuente a nivel mundial, en España son diagnosticados entre 12000 y 14000 casos nuevos cada año¹. Más del 50 por ciento de estos pacientes presenta una enfermedad localmente avanzada con elevada tendencia a las metástasis, las recidivas y la aparición de segundas neoplasias².

El proceso invasivo tumoral se acompaña de una pérdida progresiva de la homeostasis local y una alteración de la arquitectura tisular. Las células tumorales inducen profundas alteraciones, tanto en las células estromales como en la matriz extracelular a través de varios mecanismos, entre los que se encuentra la secreción de diferentes moléculas, destacando las metaloproteinasas de matriz (MMP). Estudios realizados *in vitro* e *in vivo* resaltan que el remodelado de la matriz extracelular por MMP es uno de los pasos cruciales para la progresión del cáncer y que las MMP 2 y 9 son enzimas clave en este proceso, debido a que degradan el colágeno tipo IV, que es el componente estructural más importante de las membranas basales³. La sobreexpresión de estas MMP ha sido observada en el CECC⁴, lo que ha llevado a considerarlas un blanco terapéutico.

Las MMP están estrechamente reguladas en su transcripción, secreción, activación e inhibición por diversos estímulos, como citoquinas, factores de crecimiento, agentes químicos, estrés oxidativo, el gen p53 e interacciones con la matriz extracelular⁵.

La inmunoterapia es un tratamiento que mediante la manipulación, activación o estimulación del sistema inmune, se emplea en el tratamiento de distintas enfermedades, entre ellas el cáncer. El bacilo de Calmette-Guérin (BCG) es un modulador de la respuesta biológica ampliamente aceptado en el tratamiento del cáncer superficial de vejiga y el melanoma, donde actúa promoviendo la activación inmunológica y la liberación de mediadores antitumorales⁶, los cuales actúan como reguladores de la transcripción, secreción, activación e inhibición de las MMP, por tanto, el propósito de este estudio es estudiar el efecto del tratamiento con BCG sobre la proliferación, invasión y migración tumoral en un modelo *in vitro* 3D de CECC.

Métodos

Cultivo de células de carcinoma escamoso de faringe

Las células tumorales de faringe FaDu, se obtuvieron comercialmente en ATCC (Manassas, EE. UU.), criopreservadas a una concentración de $4,5 \times 10^6$ células/ampolla. Las células se cultivaron siguiendo las instrucciones de la casa comercial en Eagle's Minumun Essential Medium ATCC-formulated específico para estas células, al cual se le adicionó: suero bovino fetal 10% y penicilina-estreptomicina 1% (Lonza). Los cultivos de FaDu se usaron entre el segundo y sexto pase. Para obtener cultivos 3D se realizó la siembra de las células tumorales sobre una placa tratada previamente durante 30 minutos con 200 μ l de Matrigel™ (BD Biosciences), consistente en una membrana basal solubilizada compuesta de: laminina (componente principal), colágeno IV, proteoglicanos, heparán sulfato, y entactin/nidogen; creándose una capa gelatinosa en la que el tumor crece de forma similar a la que lo hace *in vivo*.

Obtención y cultivo de células mononucleares de sangre periférica

Las células mononucleares se obtuvieron a partir de la sangre de donantes sanos, previo consentimiento informado del paciente. Las células mononucleares (PBMC, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) se aislaron mediante un gradiente de Ficoll-paque® siguiendo las indicaciones del fabricante.). El pellet resultante fue resuspendido en medio RPMI (Lonza) suplementado con 10% de suero bovino fetal, 100 IU/ml penicilina y 0,1 mg/ml de estreptomicina. Las PBMC se cultivaron a una densidad de $2,5 \times 10^5$ cel/ml.

Bacilo de Calmette-Guérin

La vacuna del BCG Oncotice® (MERCK SHARP & DOHME) se obtuvo comercialmente. La presentación es en polvo liofilizado para instilación intravesical que contiene $2-8 \times 10^8$ UFC de BCG de la cepa Tice. La concentración utilizada en los experimentos fue de 20 mg/ml.

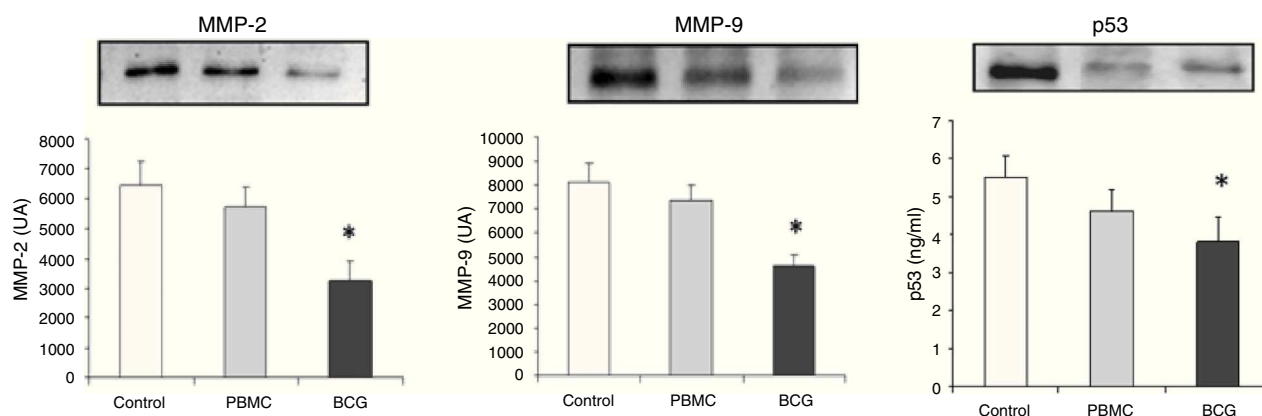


Figura 1 El BCG disminuye la expresión de p53 y de las metaloproteinasas de matriz 2 (MMP-2) y 9 (MMP-9) en las células tumorales FaDu. Los cultivos de FaDu en 3 D se cocultivaron con PBMC (1×10^5 cel./ml) y con PBMC activadas con el BCG (20 mg/ml) durante 48 h. Los datos se presentan la media $\pm$ sem de al menos cuatro experimentos independientes expresados como unidades arbitrarias (UA), (MMP-2 y MMP-9) y ng/ml (p53). * $p < 0,05$ vs. control y PBMC para MMPs. * $p < 0,001$ vs. control y PBMC para p53.

Western blot

La extracción de proteínas y el Western blot se llevaron a cabo en los lisados celulares como se describió previamente⁷. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-MMP2, anti-MMP-9 y anti-p53 (anticonejo policlonal; dilución 1/1000 Abcam, Cambridge, UK). Las bandas inmunorreactivas se detectaron mediante el kit de quimioluminiscencia SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (PIERCE, Rockford, IL, EE. UU.) y se cuantificaron usando el software Chemi-Imager 5.5 de AlphaInnotech (San Leandro, CA, EE. UU.). El análisis densitométrico es representativo de la media de varios experimentos.

Ensayo de migración celular (Wound Healing Assay)

Para estimar la capacidad de la célula de proliferar y migrar en diferentes condiciones de cultivo, se utilizó el kit 24-Well Wound Healing Assay de Cell Biolabs, Inc., en el cual se colocan inserts de plástico, dentro de cada pocillo de una placa de 24, creando un campo con una separación definida de 0,9 mm para la medición de las tasas migratorias. Las células migratorias son capaces de extenderse y, finalmente, invadir y cerrar la zona abierta. La proliferación celular y las tasas de migración se determinaron tras 48 horas de incubación, valorando mediante microscopía óptica.

Ensayo de invasión

Las propiedades invasivas de las células FaDu se examinaron mediante el kit 24 Well Cell Invasion Assay (Basement Membrane, Colorimetric Format) de Cell Biolabs, Inc, basado en el principio de la cámara de Boyden, siguiendo las recomendaciones del fabricante. El tiempo de incubación para el experimento fue de 24 horas. La densidad óptica fue cuantificada a 560 nm.

Grupos de estudio

Los grupos experimentales del estudio fueron: *control*: células tumorales FaDu en 3 D; *PBMC*: células tumorales FaDu en

Matrigel (3 D) cocultivadas (separadas a través de una membrana semipermeable) con PBMC; *BCG*: células tumorales FaDu en Matrigel (3 D) cocultivadas (separadas a través de una membrana semipermeable) con PBMC y BCG.

Resultados

El BCG disminuye los niveles de las MMP 2 y 9 en las células tumorales

Dado que diversos estudios muestran que MMP-2 y MMP-9 desempeñan un rol esencial en la degradación de la matriz extracelular, realizamos la medición de sus niveles en los extractos proteicos de las células FaDu para observar los cambios que se producían tras la activación inmune mediada por BCG. En la [figura 1](#), se observa una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) de la enzimas MMP-2 y MMP-9 para el grupo BCG respecto a los grupos control y PBMC.

Desciende p53 con el tratamiento con BCG en las células tumorales

En función de los resultados anteriores y en base al hecho de que p53 se encuentra asociada al aumento de la secreción y activación de MMP-2, se midió su expresión en las células FaDu. Como se observa en la [figura 1](#), la expresión de proteína p53 (55 kDa) obtenidos por Western blot en las células tumorales FaDu son significativamente menores en el grupo BCG respecto al control y al grupo PBMC ($p < 0,001$).

El BCG disminuye la capacidad migratoria tumoral

Para determinar si los niveles de MMP-2, MMP-9 encontrados se correlacionaban con la capacidad migratoria tumoral se realizó el ensayo de migración (Wound Healing), cuya representación esquemática se muestra en la [figura 2A](#); a medida que las células tumorales comienzan a migrar van cerrando la brecha o cicatriz preformada, esta migración puede expresarse porcentualmente según los hallazgos observados al microscopio. En la [figura 2B](#) se observan las

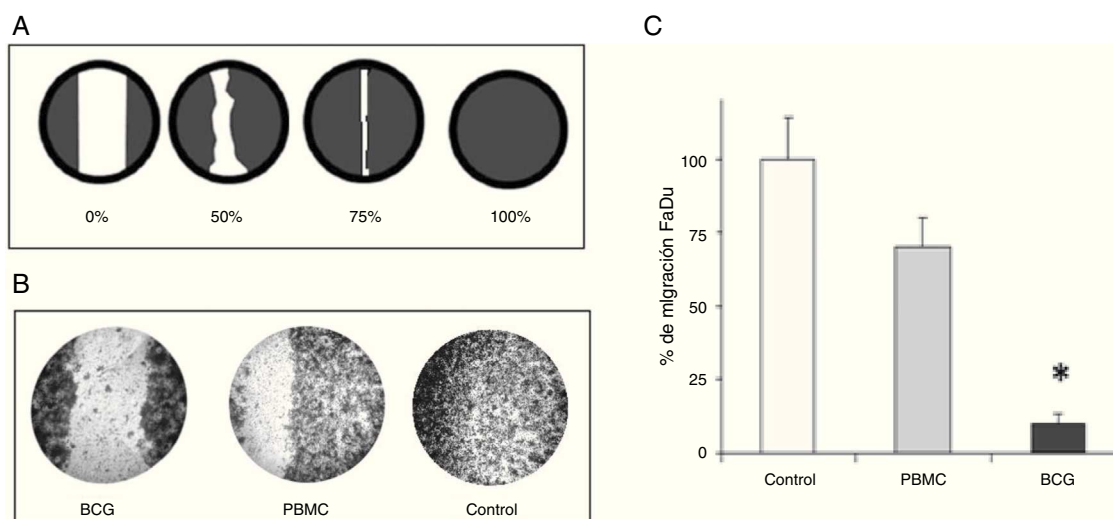


Figura 2 Ensayo de migración celular (Wound Healing). Las células se cultivaron 24 horas hasta formar una monocapa en cuyo momento se retiraron los inserts para comenzar el ensayo. Las células fueron monitoreadas bajo contraste de fase, y teñidas tras 48 h para determinar el porcentaje de cierre (0, 50, 75, y 100%, figura A). B) Se observa el comportamiento de las células tumorales según los grupos de estudio. C) Porcentaje de migración por grupos obtenido durante el ensayo. En el grupo BCG se observa escasa migración (* $p < 0,01$ vs. control y PBMC) y un descenso cualitativo de la población celular.

imágenes captadas durante los experimentos para cada uno de los grupos que luego son representadas en forma gráfica en la [figura 2 C](#). Como puede observarse en estas imágenes, el grupo control tras 48 horas de incubación tiene un porcentaje de cierre cercano al 100%, el grupo PBMC se acerca al 70% y en el grupo BCG no se produjo migración de las células ($p < 0,01$). Además se observó un descenso cualitativo de la población celular respecto a los otros dos grupos.

El BCG no modifica la capacidad invasiva tumoral de las FaDu

La invasión implica no solo procesos de migración sino además, requiere que la célula posea la capacidad para unirse y degradar componentes de la matriz extracelular. Como se muestra en la [figura 3](#), existe una tendencia invasiva similar entre los grupos.

Discusión

Los tratamientos del CECC comprenden cirugía, radioterapia, quimioterapia o una combinación de ellas, sin embargo, al momento del diagnóstico el 80% de los pacientes presentan estadios avanzados de la enfermedad y las opciones son limitadas y altamente incapacitantes. Muchos pacientes con CECC requieren después del tratamiento, rehabilitación, fisioterapia, logopedia o cirugía reconstructiva⁸. El tratamiento con nuevas terapias basadas en anticuerpos monoclonales parece prometedor pero no permiten controlar las recidivas ni la aparición de segundas neoplasias, hecho común a este tipo de tumores. Además, existen inhibidores sintéticos específicos de las distintas familias de proteasas, como las MMP, que han demostrado su capacidad para bloquear la invasión tumoral en distintos modelos *in vitro* e *in vivo*. Algunos de estos inhibidores se utilizan ya en ensayos clínicos para el tratamiento de distintos tumores, sin embargo pueden presentar importantes efectos

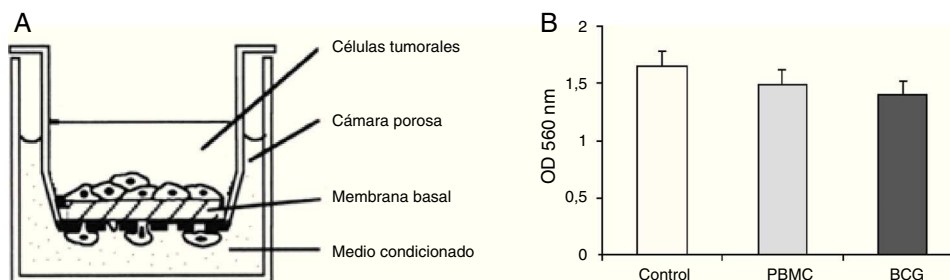


Figura 3 Ensayo de invasión celular. A) Se muestra un esquema representativo de la cámara porosa cubierta de membrana basal, a través de la cual pueden pasar las células con capacidad invasiva. B) Se observa el comportamiento de las células tumorales según los grupos de estudio. Las células migratorias en la parte inferior de la membrana de policarbonato se tiñeron y cuantificaron a 560 nm OD después de la extracción. No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

secundarios no mostrando beneficios en la supervivencia ni en el aumento del tiempo de progresión de la enfermedad⁹. La inmunoterapia con el BCG se emplea con buenos resultados en el carcinoma de células transicionales de vejiga debido a que permite tratar el carcinoma *in situ*, reducir el número y frecuencia de las recurrencias tumorales y prevenir la progresión de la enfermedad, por tanto, este estudio se centró en determinar el efecto del tratamiento con BCG sobre la migración e invasión en el CECC.

Los resultados obtenidos en el estudio deben ser interpretados teniendo en cuenta la representación de los grupos experimentales. El grupo control representa la forma en la que se comporta el tumor, el grupo PBMC el comportamiento del sistema inmune ante el tumor y el grupo BCG representa el efecto de la activación inmunológica (inmunoterapia) sobre el tumor.

Numerosos autores han estudiado el papel de las MMP y más específicamente de MMP-2 y MMP-9 en el CECC, aplicándose abordajes diferentes para determinar la actividad de estas enzimas en la degradación de la matriz extracelular y su valor pronóstico, ya que su activación se relaciona directamente con el potencial de invasión de las células neoplásicas¹⁰. Ruokolainen et al. observaron que MMP-9 es un indicador pronóstico de recidivas y supervivencia en pacientes con CECC¹¹. Nuestros resultados reflejan una sobreexpresión de MMP-2 y MMP-9 en el grupo control, sugiriendo que es secretada por las células tumorales¹¹ lo cual podría atribuirse a un aumento de su síntesis en respuesta a factores presentes en el medio de cultivo, liberados por la célula tumoral y/o a la sobreexpresión de p53, entre otros. La medición de los niveles de MMP-2 y MMP-9 en plasma de pacientes con CECC ha sido usada en algunos estudios, para monitorizar la respuesta al tratamiento y predecir las recurrencias; debido a que se acusa un importante descenso de estas MMP en los respondedores. En el grupo BCG, observamos un descenso estadísticamente significativo de estas enzimas, pudiendo esto evidenciar que se ha producido una respuesta favorable tras la inmunoterapia. Resultados obtenidos por Kageyama et al. sobre un estudio *in vitro* para evaluar si el tratamiento con BCG en presencia de PBMC modificaba el potencial invasivo de las células neoplásicas de vejiga, encontró que BCG no afectaba la secreción de MMP-2 y MMP-9 por parte de las células neoplásicas, pero la coexistencia BCG-PBMC sí incrementaba la producción y secreción de MMP-9 por las PBMC de manera dosis dependiente¹². La razón por la cual la invasión no mostró diferencias entre los grupos aunque descendieran los niveles de las MMP, puede atribuirse a que hay más factores involucrados en este complejo proceso.

Conclusión

La inmunoterapia con BCG disminuye los niveles de MMP-2 y MMP-9 e inhibe *in vitro* la migración de las células tumorales

del CECC, resultado alentador ya que en este tipo de tumor son frecuentes las recidivas y metástasis. Sería interesante corroborar estos resultados en modelos *in vivo* y comprobar si la toxicidad es menor a la que se observa con inhibidores sintéticos.

También es necesario destacar que, como se viene demostrando en la práctica clínica con los cánceres de vejiga y melanoma, cuyos resultados son óptimos y la toxicidad escasa, la terapia con BCG en CECC podría usarse como una herramienta terapéutica eficaz, con escasos efectos secundarios y bajo coste.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Díaz-Rubio E. Atlas integral de tumores de cabeza y cuello. Madrid: You&Us; 2010.
2. Loyo M, Pai SI. The molecular genetics of laryngeal cancer. *Otolaryngol Clin North Am* [Internet]. 2008;41:657–72 [citado 14 May 2014].
3. Rosenthal EL, Matrisian LM. Matrix metalloproteases in head and neck cancer. *Head Neck* [Internet]. 2006;28:639–48.
4. Koontongkaew S. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *J Cancer* [Internet]. 2013;4:66–83.
5. Cascales Angosto M, Álvarez-Gómez JA. Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. *An R Acad Nac Farm*. 2010;76:59–84.
6. Vázquez-Lavista LG, Flores-Balcázar CH, Llorente L. El bacilo de Calmette-Guérin como inmunomodulador en el cáncer de vejiga. *Rev Invest Clin*. 2007;59:146–52.
7. Peiró C, Lafuente N, Matesanz N, Cercas E, Llergo JL, Vallejo S, et al. High glucose induces cell death of cultured human aortic smooth muscle cells through the formation of hydrogen peroxide. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2001;133:967–74 [citado 14 May 2014].
8. Werning JW. Oral Cancer—Diagnosis, Management and Rehabilitation. New York: Thieme Medical Publishers; 2007.
9. Folgueras AR, Pendás AM, Sánchez LM, López-Otín C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol* [Internet]. 2004;48(5-6):411–24 [citado 14 May 2014].
10. Patel BP, Shah SV, Shukla SN, Shah PM, Patel PS. Clinical significance of MMP-2 and MMP-9 in patients with oral cancer. *Head Neck* [Internet]. 2007;29:564–72 [citado 14 May 2014].
11. Ruokolainen H, Pääkkö P, Turpeenniemi-Hujanen T. Expression of matrix metalloproteinase-9 in head and neck squamous cell carcinoma: a potential marker for prognosis. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2004;10:3110–6 [citado 14 May 2014].
12. Kageyama Y, Kawakami S, Fujii Y, Kihara K, Oshima H. Bacillus Calmette-Guérin enhances production and secretion of type IV collagenases in peripheral blood mononuclear cells. *Jpn J Cancer Res* [Internet]. 1997;88:281–8.