

## Expresión de las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II y moléculas co-estimuladoras en carcinomas orales *in vitro*

### *Expression of Major Histocompatibility Complex class II and costimulatory molecules in oral carcinomas in vitro*

Mariana Villarroel Dorrego <sup>(1)</sup>, Paul M Speight <sup>(2)</sup>, A William Barrett <sup>(3)</sup>

(1) Departamento de Patología, Medicina y Cirugía Bucal, Universidad Santa María, e Instituto de Investigaciones Odontológicas, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

(2) Department of Oral Pathology, School of Clinical Dentistry, University of Sheffield, Claremont Crescent, Sheffield S10 2TA, United Kingdom

(3) Department of Histopathology, Queen Victoria Hospital, Holtye Road, East Grinstead, West Sussex RH19 3DZ, United Kingdom

#### Correspondencia / Address:

Mariana Villarroel Dorrego

Facultad de Odontología, Módulo 10. Universidad Santa María

Vía Mariches. Caracas-Venezuela

Fax: 0058- 2129780403

E-mail: mvillarroeldorrego@cantv.net

Recibido / Received: 4-06-2004 Aceptado / Accepted: 11-02-2005

#### Indexed in:

-Index Medicus / MEDLINE / PubMed

-EMBASE, Excerpta Medica

-Índice Médico Español

-IBECs

Villarroel-Dorrego M, Speight PM, Barrett AW. Expression of Major Histocompatibility Complex class II and costimulatory molecules in oral carcinomas *in vitro*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2005;10:188-95.  
© Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - ISSN 1698-4447

## RESUMEN

El descubrimiento de que el epitelio escamoso estratificado que cubre la mucosa oral podía expresar moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II en varias condiciones patológicas de tipo inflamatorio abrió la posibilidad de que los queratinocitos orales sean células inmunológicamente activas, las cuales pueden funcionar con "células presentadoras de antígenos". Para una efectiva activación de los linfocitos T, las células presentadoras de antígenos requieren, además de la expresión de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II, señales co-estimuladoras. El propósito del presente estudio fue determinar la expresión de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II y las moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 y CD86 en queratinocitos bucales normales y derivados de carcinomas de células escamosas. Usando citometría de flujo en queratinocitos cultivados de mucosa oral sana y siete líneas celulares derivadas de carcinomas orales, fue confirmado que los queratinocitos expresan moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II después de estimulación con IFN $\gamma$  *in vitro*. Todas las líneas celulares expresaron constitutivamente CD40, por el contrario, CD80 y CD86 universalmente fueron negativos. La ausencia de estas últimas moléculas pudiera ser la causa por la cual los carcinomas orales escapan de la vigilancia inmunológica y pueden crecer, invadir y hacer metástasis pese al sistema inmunológico.

**Palabras clave:** CD40, CD80, CD86, Complejo Mayor de Histocompatibilidad, epitelio oral, carcinoma oral.

## ABSTRACT

Recognition in the 1980's that keratinocytes can express class II molecules of the Major Histocompatibility Complex (MHC) first raised the possibility that these cells might have an immunological function, and may even act as antigen presenting cells (APC). For effective T lymphocyte activation, APC require, in addition to MHC II, appropriate costimulatory signals. The aim of this study was to determine the expression of MHC class II and the co-stimulatory molecules CD40, CD80 and CD86 in keratinocytes derived from healthy oral mucosa and oral carcinomas. Using flow cytometry, it was confirmed that oral keratinocytes "switch on" expression of MHC class II molecules after stimulation with IFN $\gamma$  *in vitro*. All keratinocyte lines expressed CD40 constitutively; by contrast, CD80 and CD86 were universally absent. Loss of CD80 and CD86 may be one means whereby tumours escape immunological surveillance..

**Key words:** Costimulatory molecules, CD40, CD80, CD86, Major Histocompatibility Complex, oral epithelium, oral squamous cell carcinoma.

## INTRODUCTION

Keratinocytes are the cells that form the bulk of the stratified squamous epithelium which covers the skin and mucous membranes of the upper aerodigestive and female genital tracts. Keratinocytes are able to express MHC class II molecules, thus they might have an immunological function and even act as antigen presenting cells (APC). Subsequently, the importance of the membrane-bound costimulatory proteins in immune potency became apparent. Among membrane-bound costimu-

## INTRODUCCION

Los queratinocitos son células que forman el epitelio plano estratificado que recubre la piel y las membranas mucosas del tracto aerodigestivo y genital femenino. Los queratinocitos son capaces de expresar moléculas del Complejo Mayor de Histo-compatibilidad (CMH) lo cual ha sugerido la posibilidad de que estas células tengan una función inmunológica, e inclusive puedan actuar como células presentadoras de antígenos (CPA). Así mismo, han cobrado mucha importancia en inmunología las moléculas co-estimuladoras, las cuales son determinantes de la respuesta celular. Entre las señales co-estimuladoras existen, al menos dos, que son indispensables para la activación de las células T: CD80/CD86 y el receptor CD28 y CD40 y su ligando CD40L (CD154) (1).

CD80, es una proteína de 60 kD, miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) y fue el primer ligando de CD28 identificado (2). CD86, es una proteína de 80 kD, miembro de la misma familia que CD80 (3,4). En general, la estructura de CD80 es muy similar a la de CD86 (5). Ambas poseen dos dominios extracelulares parecidos al de las Ig, un dominio de transmembrana y una terminación citoplasmática.

La expresión de CD80 y CD86 es casi exclusiva de los tejidos linfoides. Las células que las expresan son las células de Langerhans (6), los monocitos (3) y los linfocitos B activados (7). CD80 está ausente en CPA inactivas, en cambio CD86 está expresada constitutivamente en estas células pero en muy bajos niveles (8) y es rápidamente regulada después de la presentación antigénica (9). Esto sugiere que CD86 inicia la respuesta inmune y CD80 la amplifica y regula (10).

Las moléculas del CMH clase II inducen la expresión de CD86 y CD28, con la activación simultánea de CD40 y CD40L. CD40 es una glucoproteína de 48 kD que pertenece a la superfamilia de los receptores de factor de necrosis tumoral. En humanos, CD40 es compuesta por un dominio extracelular de 171 aminoácidos, un dominio de transmembrana de 22 aminoácidos, y una terminación citoplasmática de 62 aminoácidos (11). CD40 se expresa generalmente en CPA y en algunas células no linfoides como los fibroblastos y los queratinocitos (12).

La expresión de CD80 y CD86 ha sido observada en líneas celulares derivadas de carcinomas gástricos, esofágicos, colorectales y hepáticos los cuales han sido previamente estimulados con interferón gamma (IFN $\gamma$ ) (13,14). Estas moléculas, por lo contrario, no han podido ser observadas ni *in vitro* ni *in vivo* en carcinomas de cabeza y cuello (15-18). La expresión de CD40, al contrario de CD80 y CD86, ha sido observada en numerosas líneas celulares derivadas de carcinomas de diferentes sitios anatómicos (19), sugiriendo la importancia de esta molécula en el proceso de carcinogénesis. La presencia de CD40 en líneas celulares derivadas de carcinomas de cabeza y cuello ha sido observada previamente (15,18,20,21), sin embargo, el rol de CD40 en estos queratinocitos permanece desconocido.

La importancia de CD80 y CD86 en la respuesta inmunológica contra las neoplasias malignas es ilustrada por estudios donde la expresión de CMH clase II en ausencia de CD80 y CD86 limita la activación de linfocitos T CD4+, a niveles tales que se promueve la progresión tumoral (22,23). Las razones por las que el tumor crece en presencia de linfocitos es desconocido.

latory pathways, two of the critical interactions are between CD80/CD86 and their receptor CD28, and CD40 and its ligand CD40L (CD154) (1).

CD80, a 60 kD protein, is a member of the immunoglobulin (Ig) superfamily and was the first ligand to be identified for CD28 (2). CD86, a 80 kD protein, a member of the same family, was subsequently recognized (3,4). The overall structure of CD80 is very similar to CD86 (5). Both molecules have two Ig-like extracellular domains, a transmembrane domain, and a cytoplasmic tail.

CD80 and CD86 expression is almost exclusively restricted to lymphoid tissues, primarily on "professional" APC, including Langerhans cells (6), monocytes (3) and activated B cells (7). CD80 is absent in resting APC, in contrast to CD86 which is constitutively expressed at low levels (8) and rapidly upregulated after antigen presentation (9). This leads to the notion that CD86 may initiate the immune response, whereas CD80 may serve to regulate and amplify it (10).

Signals delivered through the cytoplasmic tail of MHC class II molecules induce CD86 and CD28 upregulation, amplification and interaction, with simultaneous activation of CD40-CD40L. CD40 is a 48 kD phosphorylated glycoprotein belonging to the tumour necrosis factor receptor superfamily. In humans, CD40 is composed of a 171 amino acid extracellular domain, a 22 amino acid transmembrane domain, and a 62 amino acid cytoplasmic tail (11). CD40 is expressed by "professional" APC, as well as some non-lymphoid cells such as fibroblasts and keratinocytes (12).

Expression of CD80 and CD86 has been observed on cell lines derived from gastric, oesophageal, colorectal and hepatic carcinomas which have been stimulated with IFN $\gamma$  (13,14). By contrast, these costimulatory molecules have not been observed on head and neck, including oral, squamous cell carcinomas either *in vivo* or *in vitro* (15-18).

Expression of CD40, contrary to CD80 and CD86, has also been found on numerous cell lines derived from carcinomas from different anatomical sites (19), raising the question of the role of CD40 in carcinogenesis. Presence of CD40 on head and neck carcinoma cell lines has been observed previously (15,18,20,21) however, the role of CD40 on oral keratinocytes remains unclear.

The apparent significance of CD80 and CD86 in the host response to malignant neoplasia is illustrated by findings which showed that MHC class II expression, in the absence of CD80 and CD86, limited CD4+ T cell activation to levels which were insufficient to induce tumour regression (22,23). The reason for tumour growth in the presence of lymphocytes is uncertain. It has been suggested that the immune response kills "less dangerous" cells, thus favouring the selection of a particularly malignant phenotype of tumour cells, that the immune system is suppressed by the carcinogenic stimulus, that the tumour produces suppressive factors which inhibit the immune response, and/or the tumour escapes recognition by host T lymphocytes through loss of MHC class II or costimulatory molecules (24-26).

The aim of this study was to determine the expression of MHC class II and the costimulatory molecules CD80, CD86 and CD40 in keratinocytes derived from oral squamous cell carcinomas.

Se ha sugerido que la respuesta inmune destruye células menos “dañinas”, lo cual favorece a un fenotipo maligno de células tumorales, que el sistema inmune es suprimido por un estímulo carcinogénico, que el tumor produce factores supresivos que inhiben la activación linfocitaria y/o que el tumor escapa del reconocimiento inmunológico a través de la pérdida de moléculas co-estimuladoras (24-26).

El objetivo del presente trabajo fue determinar si los queratinocitos derivados de carcinomas orales expresaban las moléculas involucradas en la activación linfocitaria: CMH clase II y las moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 y CD40.

## MATERIALES Y MÉTODOS

*Líneas de queratinocitos orales.* En el presente trabajo se estudiaron una línea de queratinocitos derivada de mucosa oral sana y siete líneas celulares de queratinocitos derivadas de carcinomas orales.

Los cultivos de queratinocitos orales normales (NOK) fueron realizados por el método directo (27). Fragmentos de mucosa bucal sana, obtenida de exodoncias o cirugías periodontales, fueron sumergidos rápidamente en alcohol, buffer fosfato salino (PBS) y finalmente en medio para cultivo de queratinocitos. El epitelio fue separado del conectivo y cortado en pequeños trozos, de aproximadamente 1mm<sup>3</sup> de tamaño, y sembrados en frascos de cultivo celular de 25cm<sup>2</sup>. Los queratinocitos fueron cultivados en medio de cultivo para queratinocitos (medio Dulbecco's modified Eagle's con piruvato de sodio y 1000mg/l glucosa suplementado con nutrient mixture F-12 (HAM) con L-glutamina, 10% suero fetal bovino (GlobePharm), factor de crecimiento epidérmico (Sigma), hidrocortisona, insulina, adenina, penicilina, estreptomomicina y anfotericina B (Gibco) en una incubadora humificada, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y de aire al 95% a 37° C. La contaminación por fibroblastos fue identificada morfológicamente y removida mecánicamente(27). El fenotipo celular fue verificado con inmunotinciones para citoqueratinas. Las líneas celulares humanas de queratinocitos derivados de carcinomas orales de células escamosas (COCE) H103, H157, H314, H357, H376, H400, H413 también fueron utilizadas(28). Las características de estas líneas celulares se resumen en la tabla 1. La línea celular FC-7 (linfocitos B transformados con el virus Epstein Barr) fue incluida y utilizada como control positivo.

*Anticuerpos.* Todos los anticuerpos primarios fueron monoclonales de ratón anti-humano. Para la fenotipificación de los NOK, anti- panel de citoqueratinas, el cual identifica las citoqueratinas 5, 6, 8, y 17, clon MNF116 (Dako) fue utilizado en una concentración 1:100. Para la identificación del CMH clase II, CD40, CD80 y CD86, los siguientes anticuerpos fueron utilizados: anti- HLA clase II (DP+DQ+DR) clon IQU9 (Novocastra) dilución 1:200; anti-CD40 clon LOB7/6 (Serotec) dilución 1:100; anti-CD80/B7-1 clon DAL-1 (Serotec) y L307.4 (BD Pharmingen) ambos a una dilución de 1:20 y finalmente anti- CD86/ B7-2 clon BU63 (Serotec) y clon IT2.2 (BD Pharmingen) diluidos 1:20.

*Citometría de Flujo.* Cuando los queratinocitos cultivados formaron una capa confluyente, se añadió 500U/ml de IFN $\gamma$  a cada frasco de cultivo y se incubaron en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%

## MATERIALS AND METHODS

*Oral keratinocyte lines.* Primary cultures from oral healthy mucosa and seven established cellular lines derived from oral squamous cell carcinomas were included in this study. Normal oral keratinocyte (NOK) were prepared as outgrowths from redundant normal mucosal tissue obtained with permission during minor oral surgical procedures. Cultures were established by the direct explant method (27). Biopsy material was soaked briefly in alcohol, phosphate buffer saline (PBS) and finally in keratinocyte growth medium (Dulbecco's modified Eagle's media with sodium pyruvate and 1000mg/l glucose supplemented with nutrient mixture F-12 [HAM] with L-glutamine, 10% foetal bovine serum, epidermal growth factor, hydrocortisone, insulin, adenine, penicillin, streptomycin and amphotericin B). Epithelium was removed and cut into small pieces, approximately 1mm<sup>3</sup> in size, and seeded in 25cm<sup>2</sup> flasks. Tissue was left to adhere and then cultured in keratinocyte growth medium. Cells were cultured at 37° C in a humidified incubator in 5% CO<sub>2</sub>/95% air and microscopically examined daily until they were confluent. Contaminating fibroblasts were identified morphologically and removed mechanically (27). Keratinocyte phenotype was verified by cytokeratin immunostaining. H103, H157, H314, H357, H376, H400, H413 human keratinocyte cell lines derived from oral squamous cell carcinomas (OSCC) were also analysed (28). Clinical features of carcinoma lines are summarized in Table 1. The FC-7 Epstein Barr virus-transformed B cell line was included as a positive control.

*Antibodies.* All antibodies were monoclonal mouse anti-human and were diluted in PBS. For NOK phenotyping anti-pan cytokeratin clone MNF116 (Dako), which identifies cytokeratins 5, 6, 8 and 17, was used at 1:100 dilution. For MHC class II, CD40, CD80 and CD86, the following antibodies were used: anti- HLA class II (DP+DQ+DR) clone IQU9 (Novocastra) at a concentration of 1:200; anti-CD40 clone LOB7/6 (Serotec) at a concentration of 1:100; anti-CD80/B7-1 clone DAL-1 (Serotec) and L307.4 (BD Pharmingen) both at 1:20 dilution and finally anti- CD86/ B7-2 clone BU63 (Serotec) and clone IT2.2 (BD Pharmingen) diluted at 1:20.

*Flow cytometry.* When the keratinocytes were confluent, IFN $\gamma$  was added to each flask and cells cultured in a humidified incubator in 5% CO<sub>2</sub>/95% air at 37° C for 36 hours. Cholera toxin was omitted from the culture medium to prevent competitive inhibition with IFN $\gamma$  (29). Approximately 1x10<sup>6</sup> cells/ml were incubated with primary antibodies diluted in PBS for one hour at room temperature with constant agitation. Negative controls included omission of the primary antibody, or incubation with a primary antibody of identical immunoglobulin (Ig) isotype. The positive control was the FC-7 cell line. After one hour the cells were incubated with the secondary goat anti-mouse R-phycoerythrin-conjugated F(ab')<sub>2</sub> or rabbit anti-mouse fluorescein isothiocyanate-conjugated F(ab')<sub>2</sub> Ig fragments (Dako) for 30 minutes. Cells were finally washed three times with fresh medium and analysed using a Becton Dickinson FACScan 420 flow cytometer running Cell Quest™ software. Background levels were calibrated before each experiment using the negative control samples. 1x10<sup>4</sup> “events” were recorded for each sample.

y de aire al 95% a una temperatura de 37° C por 36 horas. La toxina de cólera fue omitida del medio de cultivo para prevenir inhibición competitiva con el IFN $\gamma$  (29).

Una vez transcurrido el período de estimulación con IFN $\gamma$ , 1x10<sup>6</sup> células/ml aproximadamente fueron incubadas con los anticuerpos primarios por una hora a temperatura ambiente con agitación constante. Se usaron como controles negativos las mismas células pero omitiendo la incubación con el anticuerpo primario y a cambio se utilizó una inmunoglobulina de igual isotipo. Los controles positivos fueron células FC-7, las cuales expresan todos los marcadores a estudiar. Después de una hora, las células fueron incubadas con el anticuerpo secundario de chivo anti-ratón fragmento F(ab')<sub>2</sub> conjugado con R-ficoeritrina (RPE) (Dako) o con el anticuerpo secundario de conejo anti-ratón fragmento F(ab')<sub>2</sub> conjugado con fluoresceína isotiocianate (FITC) (Dako) por 30 minutos. Las células fueron finalmente lavadas tres veces y resuspendidas en medio de cultivo para ser trasferidas a tubos Falcon para su análisis. Fue utilizado un citómetro de flujo Becton Dickinson FACScan 420 y los resultados adquiridos y analizados con el software Cell Quest™. El background fue calibrado antes de cada experimento usando los controles negativos. 1x10<sup>4</sup> "eventos" fueron analizados y grabados para cada muestra. Los datos fueron recolectados en forma de histogramas y gráficos de punto (*dot plot*). La media y la mediana de la intensidad de fluorescencia así como los porcentajes de eventos positivos fueron obtenidos después del análisis de los gráficos, usando el mismo software.

**Análisis estadístico.** Los datos fueron analizados usando el paquete estadístico SPSS®, versión 11.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). La diferencias entre las medias de dos grupos fue evaluado usando *t* de Student para muestras independientes y las comparaciones de varios grupos fue realizada con el test de ANOVA (usando el test de Bonferroni). Valores *p* menores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

## RESULTADOS

**Expresión de moléculas del CMH clase II en queratinocitos orales.** Los cultivos primarios NOK y la línea celular H357 no expresaron CMH clase II constitutivamente. El resto de las líneas celulares mostraron un nivel de expresión extremadamente bajo. IFN $\gamma$  indujo la expresión de CMH clase II en todas las líneas celulares. IFN $\gamma$  aumentó significativamente la expresión de CMH clase II tanto en queratinocitos normales como en las líneas de carcinoma ( $p \leq 0.01$ ) tanto en la intensidad de la fluorescencia como en el porcentaje de células positivas. Cuando las medias de intensidad de fluorescencia fueron comparadas (bajo tratamiento con IFN $\gamma$ ), no se observó diferencia estadísticamente significativa entre los queratinocitos normales y las líneas de carcinoma, con la excepción de la línea H376, la cual mostró la mayor intensidad de fluorescencia ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, las líneas H376 y H103 mostraron los menores porcentajes de células CMH clase II-positivas (62.5% y 55.85% respectivamente) (Fig. 1).

**Expresión de CD80 y CD86 en queratinocitos orales.** La expresión de CD80 se resume en la Fig. 2. Aunque NOK mostró los menores niveles de CD80, estimulación con IFN $\gamma$  indujo

The data were collected for each sample as a histogram and dot plot, from which mean and median of fluorescence intensity and percentages of positive events were obtained using the same software.

**Statistical analysis.** Data were analyzed using the SPSS® package, version 11.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). The difference in mean values between two groups was evaluated using Student's *t*-test for independent samples and multiple comparisons by ANOVA (using the Bonferroni test). The statistically significant level was set at the 0.05 level (two-tailed).

## RESULTS

**Expression of MHC class II molecules in oral keratinocytes.** Primary cultures of NOK and the H357 line did not express MHC class II constitutively. Very low percentages of positive MHC class II cells were observed on the rest of keratinocyte lines. By contrast, IFN $\gamma$  significantly increased MHC class II expression in NOK and all oral keratinocyte lines ( $p \leq 0.01$ ) when geometric means of fluorescence intensity and percentage of labelled cells were compared. When IFN $\gamma$ -stimulated geometric means of fluorescence were compared, no statistically significant difference was found between NOK and cell lines, with the exception of H376, which showed the highest MHC class II fluorescence intensity ( $p < 0.05$ ). However, H376 and H103 lines showed the lowest relative percentage of labelled cells (62.5% and 55.85% respectively) (Fig. 1).

**Expression of CD80 and CD86 on oral keratinocytes.** All cell lines derived from OSCC showed virtually no expression of CD80 with or without IFN $\gamma$  treatment, though low levels were detectable on NOK and H376 cells which increased slightly after stimulation with IFN $\gamma$ . There were no statistically significant differences between these and the other lines, either when analysed for fluorescence intensity or relative percentages of positive cells (Fig. 2).

Marginally higher, though still minimal, levels of CD86 were detected on keratinocyte lines. However, a statistically significant increase ( $p = 0.05$ ) in CD86 expression was observed on NOK after stimulation with IFN $\gamma$  (0.68% to 6.24%) (Fig. 3).

**Expression of CD40 on oral keratinocytes.** All cell lines constitutively expressed CD40 (Fig. 4). When geometric means of fluorescence intensity were compared, NOK expressed a similar level of CD40 as the H357 cell line. However, H357 showed a significantly higher percentage of CD40-positive cells ( $p = 0.025$ ). The other keratinocyte lines expressed constitutive levels of CD40 statistically significantly higher than NOK both in terms of fluorescence intensity and percentages of positive cells. IFN $\gamma$  caused a statistically significant increase in the fluorescence intensity CD40 expression on NOK and all keratinocyte lines except H413 (Fig. 4). However, percentages of positive cells were unchanged.

## DISCUSSION

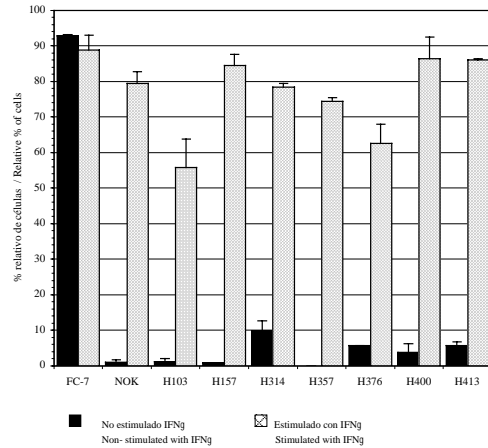
The results of these experiments are consistent with previous data, in that there was lack of constitutive MHC class II antigen in cultures of NOK (18, 30) and most keratinocyte lines (31, 32). The induction of MHC class II molecules on keratinocytes

**Tabla 1.** Características clínicas de las líneas derivadas de COCE

Línea celular	Lugar del tumor	Grado histopatológico
H103	Lengua	Bien diferenciado
H157	Carrillo	Bien diferenciado
H314	Piso de boca	Moderadamente diferenciado
H357	Lengua	Bien diferenciado
H376	Piso de boca	Bien diferenciado
H400	Proceso alveolar	Moderadamente diferenciado
H413	Carrillo	Moderadamente diferenciado

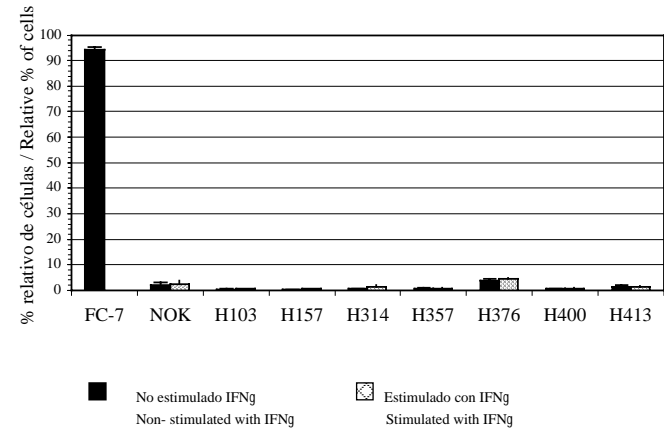
**Table 1.** Clinical features of oral squamous cell carcinoma cell lines

Cell line	Site of tumour	Pathology of primary tumours
H103	Tongue	Well differentiated
H157	Buccal mucosa	Well differentiated
H314	Floor of the mouth	Moderately differentiated
H357	Tongue	Well differentiated
H376	Floor of the mouth	Well differentiated
H400	Alveolar process	Moderately differentiated
H413	Buccal mucosa	Moderately differentiated



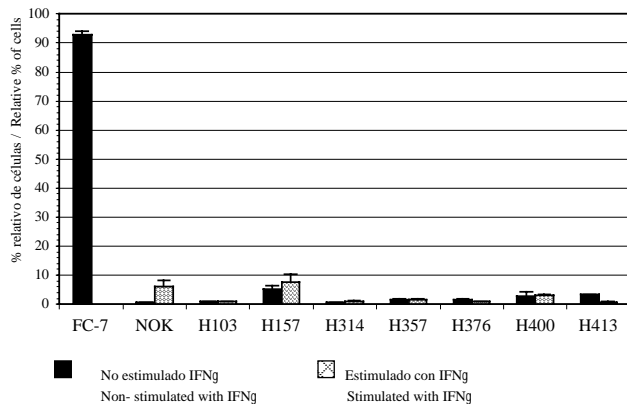
**Fig. 1** Porcentaje relativo de NOK o derivados de COCE CMH clase II positivos analizados por citometría de flujo. FC-7 corresponde al control positivo. Las barras de error representan los errores estándar de la media de tres o cuatro experimentos.

Relative percentage of MHC class II positive keratinocytes by flow cytometry. FC-7 corresponds to positive control. Error bars represent standard error of mean of three or four experiments.



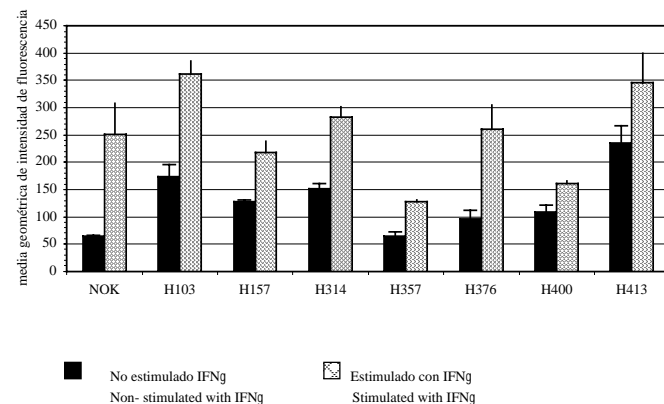
**Fig. 2.** Expresión de CD80 en queratinocitos orales. Porcentaje relativo de NOK o derivados de COCE CD80 positivos analizados por citometría de flujo. Barras corresponden a la media de los experimentos realizados por triplicado y las barras de error corresponden al error estándar de la media.

Relative percentage of CD80-positive keratinocytes by flow cytometry. FC-7 corresponds to positive control. Error bars represent standard error of mean of three or four experiments.



**Fig. 3.** Expresión de CD86 en queratinocitos bucales. Porcentaje relativo de NOK o derivados de COCE CD86 positivos analizados por citometría de flujo. Barras corresponden a la media de los experimentos realizados por triplicado y las barras de error corresponden al error estándar de la media.

Relative percentage of CD86-positive keratinocytes by flow cytometry. FC-7 corresponds to positive control. Error bars represent standard error of mean of three or four experiments.



**Fig 4.** Comparación de la media geométrica de intensidad de fluorescencia de CD40 en queratinocitos orales. Barras corresponden a la media de los experimentos realizados por triplicado y las barras de error corresponden al error estándar de la media. P< 0.05 (\*).

Comparison of geometric mean of fluorescence intensity of CD40 on oral keratinocytes. Bars correspond to mean of triplicate experiments and error bars correspond to standard error of the mean. P< 0.05 (\*).

mayores niveles de expresión de CD80 en estas células que en otras líneas derivadas de carcinomas. En general, todas las líneas derivadas de COCE mostraron niveles muy bajos o nulos de CD80 con o sin tratamiento de IFN $\gamma$ .

Al igual que CD80, la expresión de CD86 (Fig. 3) no pudo ser detectada en NOK ni tampoco en las líneas derivadas de COCE constitutivamente. Un aumento de la expresión de CD86 estadísticamente significativo ( $p=0.05$ ) fue observado en NOK después de la estimulación con IFN $\gamma$  (de 0.68% a 6.24%). Muy similar a CD80, CD86 no fue expresado o lo fue en niveles muy bajos en todas las líneas de queratinocitos. Sin embargo, en general, la expresión de CD86 siempre fue ligeramente mayor que CD80.

**Expresión de CD40 en queratinocitos orales.** La expresión de CD40 en queratinocitos orales está ilustrada en la Fig. 4. Todas las líneas celulares expresaron CD40. Cuando la media geométrica de intensidad de fluorescencia fue comparada, NOK expresaron el mismo nivel de CD40 que la línea H357. Sin embargo, H357 mostró mayor porcentaje de células CD40-positivo ( $p=0.025$ ). Las restantes líneas celulares expresaron niveles constitutivos de CD40 estadísticamente más elevados que NOK. El aumento de la expresión de CD40 fue inducido por IFN $\gamma$  en todas las líneas celulares. IFN $\gamma$  causó un incremento estadísticamente significativo en todas las líneas a excepción de H413.

## DISCUSION

Los resultados de este estudio coinciden con investigaciones previas, en las que no ha sido observada que la presencia de CMH clase II en queratinocitos normales (18,30) y neoplásicos con la excepción de la línea H314 constitutivamente (31,32). La presencia de moléculas del CMH clase II también fue observada universalmente tras la activación con IFN $\gamma$ . El mismo nivel de CMH clase II fue observado en queratinocitos normales y neoplásicos, lo cual fue reportado previamente por Farmer *et al.* (18). La inducción de moléculas del CMH clase II en los queratinocitos de la mucosa oral y piel normal después de la exposición a IFN $\gamma$  *in vitro* ha sido bien estudiada previamente (18,30,31,33-36) y fue completamente reproducible en este trabajo.

Trabajos de inmunohistoquímica de carcinomas de boca, piel, cuello uterino y laringe (31,18,37) han corroborado estos hallazgos *in vivo*. Usando un modelo experimental de carcinogénesis oral, Matthews *et al.* (38) demostraron que la expresión de las moléculas del CMH clase II en queratinocitos orales se observaba en las primeras etapas de la transformación maligna.

La expresión de CD40 observada en este trabajo es consistente con reportes previos de CD40 en líneas epiteliales orales (18). Un incremento en la expresión de CD40 en la superficie de los queratinocitos fue observado en todas las líneas gracias al tratamiento con IFN $\gamma$ . Esta misma regulación ha sido estudiada por Farmer *et al.* (18) y Vonderheide *et al.* (17). IFN $\gamma$  fue capaz de mejorar la expresión de CD40 en términos de intensidad de tinción sin embargo el porcentaje de células CD40-positivo se mantuvo similar. El aumento de esta molécula, dependiente de IFN $\gamma$ , pareciera ser un hallazgo general ya que ha sido observado tanto en queratinocitos de piel y de boca (18,39) y en una diversa gama de carcinomas derivados de otros lugares anatómicos (40). La presencia de CD40 tanto en condiciones normales como en estados neoplásicos induce a pensar si esta

from normal oral mucosa and skin following exposure to IFN $\gamma$  *in vitro* is well established (18,30,31,33-36) and was reproducible in this study. That the same levels of MHC class II expression were observed on stimulated NOK and stimulated keratinocyte lines is also in accordance with previous studies (18). Immunohistochemistry of squamous cell carcinomas of oral, skin, cervical and laryngeal epithelium (31,18,37) have corroborated these findings *in vivo*. Using an oral squamous cell carcinoma model, Matthews *et al.* (38) demonstrated that expression of MHC class II by oral keratinocytes was induced during the first stages of carcinogenesis.

The expression of CD40 observed in this study, and upregulation in intensity of expression after IFN $\gamma$  stimulation, is also consistent with previous reports on oral (17,18) and skin keratinocytes (39) and a diverse range of carcinomas (40), and raises the question as to whether CD40 is expressed not only at a "resting" level, but also in an activated state.

Expression of CD80 has not been studied on normal oral mucosa *in vivo* or *in vitro* previously. Absence or very low expression of CD80 and CD86 on keratinocyte lines found in this study was consistent with previous studies of keratinocytes derived from head and neck carcinomas (15,17,18,20), but it is noteworthy that IFN $\gamma$  induced minimal or no upregulation on either NOK or keratinocyte lines derived from OSCC. This absence may have biological significance. Although research in the early 1990's suggested that keratinocytes induce T lymphocyte proliferation independent of costimulatory signals (41-43) later reports, such as that of Thomas *et al.* (25,44), associated the loss of CD80 by oral keratinocytes with the early development of OSCC, and considered it a marker for tumour progression and aggressiveness. Others support the view that establishment of CD80 and CD86 on tumour cells induces and/or increases T lymphocyte responses (25,44-47), and several workers have concluded that the absence of CD80 and CD86 on keratinocytes, oral and epidermal, is the major limitation to driving T lymphocyte activation (15,17,48). Thus the ability of some squamous cell carcinomas to evade the host's defences may be because of the failure of keratinocytes to express CD80 and CD86.

An *in vivo* scenario can be proposed whereby an antigenic challenge to the oral epithelium is met by T lymphocytes which are activated by a "professional" APC, for example the local Langerhans cell population, as a result of which cytokines are released and oral keratinocytes, which are already CD40-positive, upregulate CD40 and start to express MHC class II. If CD86 and CD80 are also induced, an immune response is propagated. If keratinocytes fail to express CD86 and CD80, the malignant cells are able to evade host defences, grow and invade. Hence oral stratified squamous epithelium may act as an immunological organ not only as a physical barrier, but also through complex molecular and cellular mechanisms involving keratinocytes and leucocytes, both intra- and extra-epithelial.

molécula cumple distintas funciones en cada escenario o si la expresión constitutiva es meramente de reposo y requiere de un proceso de activación.

Dado que los queratinocitos fueron capaces de expresar moléculas del CMH clase II y CD40, la siguiente pregunta sería si la ausencia de CD80 o CD86, dos moléculas esenciales de la función inmunitaria, son la causa del escape de los tumores orales a la vigilancia inmunológica.

Las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 no se expresan constitutivamente en queratinocitos orales en condiciones normales *in vitro*. La expresión de CD80 no ha sido evaluada previamente en la mucosa oral ni *in vivo* ni *in vitro*. La ausencia de CD86 fue consistente con observaciones previas de Farmer et al. (18). Sin embargo, es interesante resaltar que los queratinocitos normales respondieron al IFN $\gamma$  con una ligera expresión de CD80 y CD86 lo cual no ocurrió con las líneas derivadas de COCE. Las líneas celulares derivadas de COCE mostraron ausencia o niveles constitutivos muy bajos de CD80 y CD86, los cuales no fueron inducidos por la acción de IFN $\gamma$ . La ausencia o expresión mínima de CD80 y CD86 es consistente con previos trabajos realizados en queratinocitos de carcinomas de cabeza y cuello (15,17,18,20).

La ausencia de CD80 y CD86 en queratinocitos derivados de carcinomas orales podría ser un hallazgo de gran importancia. Aunque los estudios de hace varios años sugirieron que los queratinocitos podrían inducir la activación linfocitaria en ausencia de señales co-estimuladoras(41-43), estudios más recientes, como los de Thomas *et al.* (25,44), asocian la pérdida de la expresión de CD80 por queratinocitos orales como la primera evidencia de desarrollo de carcinomas, considerándolo un marcador de progresión e invasión tumoral. Otros autores apoyan la idea de que el re-establecimiento de la expresión de CD80 y CD86 en tumores induce o incrementa la respuesta linfocitaria anti-tumoral (25,44-47) y finalmente varios trabajos han sugerido que la ausencia de CD80 y CD86 en queratinocitos, orales o epidérmicos, es la mayor limitación en la activación linfocitaria (15,17,48). De esta manera, la expresión de CD80 y CD86 por queratinocitos orales podría promover una efectiva destrucción tumoral, y la habilidad de algunos tumores de evadir las defensas del huésped es causada por la incapacidad de expresar estas moléculas co-estimuladoras.

Un escenario *in vivo* puede entonces ser propuesto: la célula tumoral es considerada por las CPA, en este caso las células de Langerhans, un antígeno y éstas presentan el mismo a los linfocitos provocando su activación y la producción de citocinas por parte de los queratinocitos. Los queratinocitos ya expresan niveles de CD40, pero esta molécula es incrementada como resultado de la acción de las citocinas y así empiezan a expresar moléculas del CMH clase II, CD86 y CD80 y de esta forma amplifican y propagan la respuesta inmunitaria. Si los queratinocitos no pueden expresar CD80 y CD86 no se puede dar el proceso de respuesta inmunitaria y los queratinocitos neoplásicos burlan a los linfocitos.

Si este es realmente el caso, el epitelio estratificado oral trabaja como un órgano inmunológico y no solamente como una barrera física, desarrollando un mecanismo inmunológico molecular y celular complejo que involucra queratinocitos y linfocitos.

## BIBLIOGRAFIA/REFERENCES

1. Appleman LJ, Boussiotis VA. T cell anergy and costimulation. *Immunol Rev* 2003;192:161-80.
2. Yokochi T, Holly RD, Clark EA. B lymphoblast antigen (BB-1) expressed on Epstein-Barr virus-activated B cell blasts, B lymphoblastoid cell lines, and Burkitt's lymphomas. *J Immunol* 1982;128:823-7.
3. Azuma M, Ito D, Yagita H, Okumura K, Phillips JH, Lanier LL et al. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 1993;366:76-9.
4. Freeman GJ, Gribben JG, Boussiotis VA, Ng JW, Restivo VA, Jr., Lombard LA et al. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* 1993;262:909-11.
5. Henry J, Miller MM, Pontarotti P. Structure and evolution of the extended B7 family. *Immunol Today* 1999;20:285-8.
6. Symington FW, Brady W, Linsley PS. Expression and function of B7 on human epidermal Langerhans cells. *J Immunol* 1993;150:1286-95.
7. Valle A, Aubry JP, Durand I, Banchereau J. IL-4 and IL-2 upregulate the expression of antigen B7, the B cell counterstructure to T cell CD28: an amplification mechanism for T-B cell interactions. *Int Immunol* 1991;3:229-35.
8. Chambers CA. The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited. *Trends Immunol* 2001;22:217-23.
9. Schweitzer AN, Borriello F, Wong RC, Abbas AK, Sharpe AH. Role of costimulators in T cell differentiation: studies using antigen-presenting cells lacking expression of CD80 or CD86. *J Immunol* 1997;158:2713-22.
10. Najafian N, Khoury SJ. T cell costimulatory pathways: blockade for autoimmunity. *Expert Opin Biol Ther* 2003;3:227-36.
11. Vogel LA, Noelle RJ. CD40 and its crucial role as a member of the TNFR family. *Semin Immunol* 1998;10:435-42.
12. Gaspari AA, Sempowski GD, Chess P, Gish J, Phipps RP. Human epidermal keratinocytes are induced to secrete interleukin-6 and co-stimulate T lymphocyte proliferation by a CD40-dependent mechanism. *Eur J Immunol* 1996;26:1371-7.
13. Li J, Yang Y, Inoue H, Mori M, Akiyoshi T. The expression of costimulatory molecules CD80 and CD86 in human carcinoma cell lines: its regulation by interferon gamma and interleukin-10. *Cancer Immunol Immunother* 1996;43:213-9.
14. Tatsumi T, Takehara T, Katayama K, Mochizuki K, Yamamoto M, Kanto T et al. Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) on human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997;25:1108-14.
15. Lang S, Whiteside TL, Lebeau A, Zeidler R, Mack B, Wollenberg B. Impairment of T-cell activation in head and neck cancer *in situ* and *in vitro*: strategies for an immune restoration. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;125:82-8.
16. Lang S, Atarashi Y, Nishioka Y, Stanson J, Meidenbauer N, Whiteside TL. B7.1 on human carcinomas: costimulation of T cells and enhanced tumor-induced T-cell death. *Cell Immunol* 2000;201:132-43.
17. Vonderheide RH, Butler MO, Liu JF, Battle TE, Hirano N, Gribben JG et al. CD40 activation of carcinoma cells increases expression of adhesion and major histocompatibility molecules but fails to induce either CD80/CD86 expression or T cell alloreactivity. *Int J Oncol* 2001;19:791-8.
18. Farmer I, Freysdottir J, Dalghous AM, Fortune F. Expression of adhesion and activation molecules in human buccal epithelial cell lines and normal human buccal epithelium *in situ*. *J Oral Pathol Med* 2001;30:113-20.
19. Ottaiano A, Pisano C, De Chiara A, Ascierio PA, Botti G, Barletta E et al. CD40 activation as potential tool in malignant neoplasms. *Tumori* 2002; 88: 361-6.
20. Posner MR, Cavacini LA, Upton MP, Tillman KC, Gornstein ER, Norris CM, Jr. Surface membrane-expressed CD40 is present on tumor cells from squamous cell cancer of the head and neck *in vitro* and *in vivo* and regulates cell growth in tumor cell lines. *Clin Cancer Res* 1999;5:2261-70.
21. Loro LL, Ohlsson M, Vintermyr OK, Liavaag PG, Jonsson R, Johannessen AC. Maintained CD40 and loss of polarised CD40 ligand expression in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2001;21:113-7.
22. Schwartz RH. Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J Exp Med* 1996;184:1-8.
23. Byrne SN, Halliday GM. High levels of Fas ligand and MHC class II in the absence of CD80 or CD86 expression and a decreased CD4+ T cell infiltration, enables murine skin tumours to progress. *Cancer Immunol Immunother* 2003; 52:396-402
24. Rice SQ, Crane IJ, Scully C, Prime SS. Production of a suppressor of lymphocyte proliferation by two human oral carcinoma cell lines. *Scand J Immunol* 1992;36:443-52.
25. Thomas DW, Matthews JB, Patel V, Game SM, Prime SS. Inflammatory cell

- infiltrate associated with primary and transplanted tumours in an inbred model of oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med* 1995;24:23-31.
26. Eck SC, Turka LA. Generation of protective immunity against an immunogenic carcinoma requires CD40/CD40L and B7/CD28 interactions but not CD4(+) T cells. *Cancer Immunol Immunother* 1999;48:336-41.
  27. Kedjarune U, Pongprerachok S, Arpornmaeklong P, Ungkusonmongkhon K. Culturing primary human gingival epithelial cells: comparison of two isolation techniques. *J Craniomaxillofac Surg* 2001;29:224-31.
  28. Prime SS, Nixon SV, Crane IJ, Stone A, Matthews JB, Maitland NJ et al. The behaviour of human oral squamous cell carcinoma in cell culture. *J Pathol* 1990;160:259-69.
  29. Friedman RM, Vogel SN. Interferons with special emphasis on the immune system. *Adv Immunol* 1983;34:97-140.
  30. Li J, Farthing PM, Thornhill MH. Cytokine regulation of major histocompatibility complex antigen expression by human oral and skin keratinocytes. *Arch Oral Biol* 1996;41:533-8.
  31. Crane IJ, Rice SQ, Luker J, de Gay L, Scully C, Prime SS. The expression of MHC antigens on cultured oral keratinocytes and relationship to malignancy. *Br J Exp Pathol* 1988;69:749-58.
  32. Mutlu S, Matthews JB, Midda M, Scully C, Prime SS. MHC antigen expression in human oral squamous carcinoma cell lines. *J Pathol* 1991;165:129-36.
  33. Basham TY, Nickoloff BJ, Merigan TC, Morhenn VB. Recombinant gamma interferon induces HLA-DR expression on cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1984;83:88-90.
  34. Basham TY, Nickoloff BJ, Merigan TC, Morhenn VB. Recombinant gamma interferon differentially regulates class II antigen expression and biosynthesis on cultured normal human keratinocytes. *J Interferon Res* 1985;5:23-32.
  35. Volc-Platzer B, Leibl H, Luger T, Zahn G, Stingl G. Human epidermal cells synthesize HLA-DR alloantigens in vitro upon stimulation with gamma-interferon. *J Invest Dermatol* 1985;85:16-9.
  36. Savage NW, Walsh LJ, Seymour GJ. Expression of class I and class II major histocompatibility complex antigens on oral mucosal epithelium. *J Oral Pathol* 1987;16:153-7.
  37. Schwartz R, Momburg F, Moldenhauer G, Dorken B, Schirmacher V. Induction of HLA class-II antigen expression on human carcinoma cell lines by IFN-Gamma. *Int J Cancer* 1985;35:245-50.
  38. Matthews JB, Pitigala-Arachchi A, Crane IJ, Scully C, Prime SS. The relationship between epithelial Ia expression and the inflammatory cell infiltrate during experimental oral carcinogenesis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1988;413:521-8.
  39. Peguet-Navarro J, Dalbiez-Gauthier C, Moulon C, Berthier O, Reano A, Gaucherand M et al. CD40 ligation of human keratinocytes inhibits their proliferation and induces their differentiation. *J Immunol* 1997;158:144-52.
  40. Young LS, Eliopoulos AG, Gallagher NJ, Dawson CW. CD40 and epithelial cells: across the great divide. *Immunol Today* 1998;19:502-6.
  41. Mutis T, de Bueger M, Bakker A, Ottenhoff TH. HLA class II+ human keratinocytes present Mycobacterium leprae antigens to CD4+ Th1-like cells. *Scand J Immunol* 1993;37:43-51.
  42. de Bueger M, Bakker A, Goulmy E. Human keratinocytes activate primed major and minor histocompatibility antigen specific Th cells in vitro. *Transpl Immunol* 1993;1:52-9.
  43. Pawelec G, Kalbacher H, Pohla H, Boshell M, Max H, Friccius H et al. Requirements for stimulation or anergy induction in alloreactive human T cell clones. *Cell Immunol* 1994;158:241-52.
  44. Thomas GR, Chen Z, Enamorado I, Bancroft C, Van Waes C. IL-12- and IL-2-induced tumor regression in a new murine model of oral squamous-cell carcinoma is promoted by expression of the CD80 co-stimulatory molecule and interferon-gamma. *Int J Cancer* 2000;86:368-74.
  45. Yang G, Hellstrom KE, Mizuno MT, Chen L. In vitro priming of tumor-reactive cytolytic T lymphocytes by combining IL-10 with B7-CD28 costimulation. *J Immunol* 1995; 155(8):3897-903.
  46. Baskar S, Glimcher L, Nabavi N, Jones RT, Ostrand-Rosenberg S. Major histocompatibility complex class II+B7-1+ tumor cells are potent vaccines for stimulating tumor rejection in tumor-bearing mice. *J Exp Med* 1995;181:619-29.
  47. Wang YC, Zhu L, McHugh R, Graham SD, Jr., Hillyer CD, Dillehay D et al. Induction of autologous tumor-specific cytotoxic T-lymphocyte activity against a human renal carcinoma cell line by B7-1 (CD80) costimulation. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1996;19:1-8.
  48. Grousson J, Concha M, Schmitt D, Peguet-Navarro J. Effects of CD40 ligation on human keratinocyte accessory function. *Arch Dermatol Res* 1998; 290:325-30.