

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Odontología
Escuela Profesional de Odontología



**Estudio de la aproximación proteómica, en el cultivo celular de la línea
SCC-4 de carcinoma oral en comparación con cultivo celular de células
escamosas de la cavidad oral: Una visión de marcador molecular temprana.**
Arequipa, 2025

Tesis presentada por el Bachiller:

Montoya Rodriguez, Sebastiam Rodrigo

ORCID: 0009-0004-8537-4657

para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista

Asesor (a):

Dr. Obando Pereda, Gustavo Alberto

ORCID: 0000-0001-6044-1551

Arequipa – Perú

2025

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

ODONTOLOGIA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 24 de Abril del 2025

Dictamen: 015191-C-EPO-2025

Visto el borrador del expediente 015191, presentado por:

2020701781 - MONTOYA RODRIGUEZ SEBASTIAM RODRIGO

Titulado:

ESTUDIO DE LA APROXIMACIÓN PROTEÓMICA, EN EL CULTIVO CELULAR DE LA LÍNEA SCC-4 DE CARCINOMA ORAL EN COMPARACIÓN CON CULTIVO CELULAR DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LA CAVIDAD ORAL: UNA VISIÓN DE MARCADOR MOLECULAR TEMPRANA. AREQUIPA, 2025

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

CIRUJANO DENTISTA

**06292199 - DE LOS RIOS FERNANDEZ ENRIQUE MANUEL
DICTAMINADOR**



**30862017 - FIGUEROA BANDA RUFO ALBERTO
DICTAMINADOR**



**29546298 - PONCE SOTO LUIS ALBERTO
DICTAMINADOR**



Estudio de la aproximación proteómica, en el cultivo celular de la línea SCC-4 de carcinoma oral en comparación con cultivo celular de células escamosas de la cavidad oral: Una visión de marcador mole

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Católica de Santa María	11%
	Trabajo del estudiante	
2	hdl.handle.net	3%
	Fuente de Internet	
3	repositorio.ucsm.edu.pe	1%
	Fuente de Internet	
4	1library.co	1%
	Fuente de Internet	
5	Olivares Niño, Geovanny. "Potencial antitumoral e inmunomodulador de productos naturales en cáncer oral", Universidad El Bosque (Colombia)	1%
	Publicación	
6	patents.google.com	1%
	Fuente de Internet	

DEDICATORIA

A **Dios**, por ser mi guía constante e incondicional en todo el trayecto de mi vida, por darme salud, fuerza y perseverancia en los momentos difíciles logrando salir adelante, iluminando día a día cada paso de este camino académico y por darme la claridad en los momentos de incertidumbre, sin su presencia en mi camino, nada de esto habría sido posible.

A mi Madre **Angela María Rodríguez Rojas**, porque en tu mirada siempre encontré la calma, y en tu amor, la fuerza para continuar, siendo el pilar de mi vida, mi ejemplo a seguir, ejemplo de amor incondicional, entrega incansable y fe silenciosa. Tu fortaleza y ternura han sido el faro que ha guiado cada uno de mis pasos. Este logro también es tuyo.

A mi Padre **Marco Antonio Montoya Alvarez**, por enseñarme que el verdadero compromiso se demuestra en el silencio de cada esfuerzo, en la constancia diaria y en la integridad con la que se enfrenta la vida. Tu presencia ha sido guía y respaldo, y tu amor, ha sido uno de los motores más poderosos en este recorrido. Este logro también es tu reflejo.

A mi Hermana **Camila Alejandra Montoya Rodríguez**, por ser mi compañera de vida y de sueños, la luz en momentos difíciles y alegría en los más simples. Tu confianza en mí ha sido impulso en los días difíciles y tu amor, un refugio constante que solo tú entenderías.

A mis Abuelos **Julio Estanislao Montoya Sanchez, Alejandrina Leonidas Alvarez Dueñas y Zoila Elisea Rojas de Rodríguez** por ser raíz y refugio, por enseñarme con su ejemplo que el amor, la paciencia y la sabiduría son herencias valiosas que no se olvidan, por sus palabras llenas de calma, por sus abrazos que sanan y por su fe constante en mí.

A mis tías **Karina, Monica, Tina, Roxana y Ana**, a mis tíos **Alex, Manuel, Luis**, a mi primo **Joaquin**, a mis primas **Valeria, Jimena, Veronica, Sthephanie** y a mi sobrina **Sophie**, por ser una familia que abraza, acompaña y celebra, por darme su cariño constante, por cada palabra de aliento y por estar presentes en este viaje, aún en la distancia.

Dedico este trabajo con especial cariño a mi tío, **Dr. Luis Alberto Ponce Soto**, quien fue un pilar fundamental en este camino. Su guía, apoyo constante y generosidad hicieron posible que esta meta se cumpliera. Gracias por creer en mí y acompañarme en cada paso

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Católica de Santa María**, especialmente a la Facultad de Odontología, por forjar en mí los valores, habilidades y principios que hoy me permiten dar un paso firme hacia la vida profesional.

Quiero expresar un profundo y especial agradecimiento al **Dr. Luis Alberto Ponce Soto** y al **Dr. Gustavo Alberto Obando Pereda**, por acompañarme con generosidad, paciencia y compromiso a lo largo del desarrollo de este trabajo. Su guía constante, su disposición incondicional y sus valiosos consejos no solo enriquecieron este trabajo, sino también mi formación profesional y personal. Gracias por estar presentes en cada etapa, por creer en mí y por compartir su conocimiento con tanta dedicación.

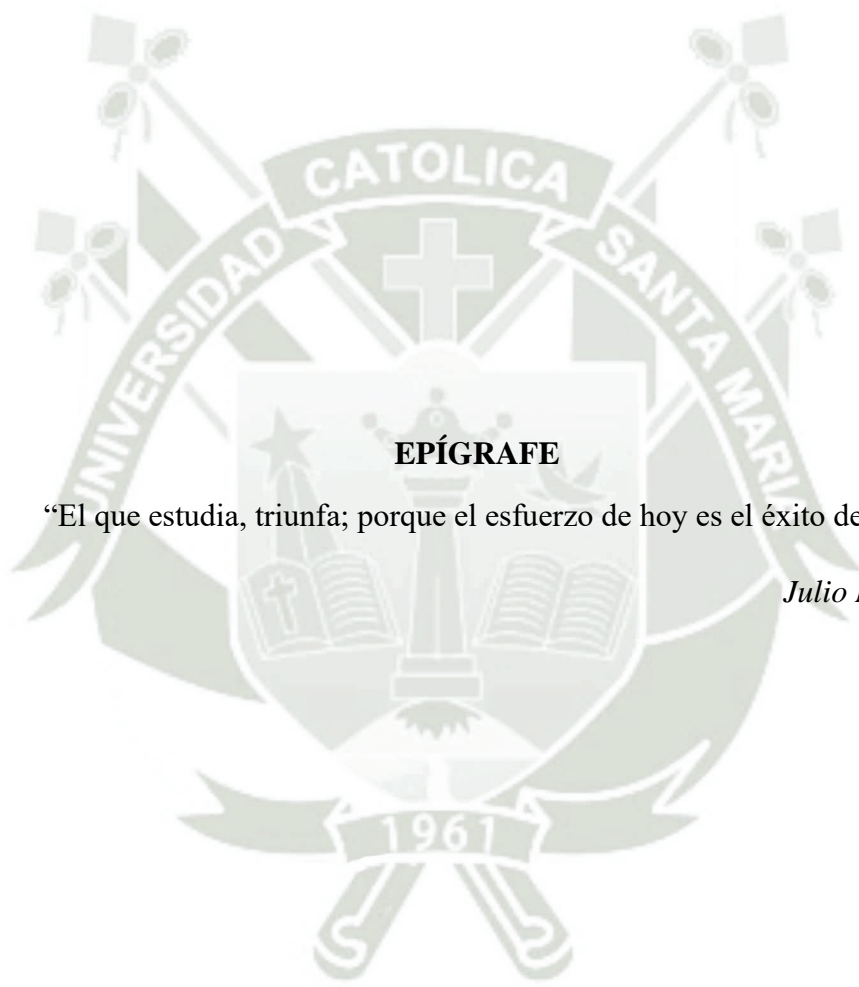
Mi más sincero agradecimiento a mi tío, **Dr. Luis Alberto Ponce Soto**, quien fue mi guía, mi apoyo incondicional y mi mayor impulso durante todo este proceso. Gracias por dedicarme tu tiempo con paciencia infinita y por transmitirme tus conocimientos con una generosidad que solo alguien con un corazón tan grande como el tuyo podría tener.

Mi más sincero agradecimiento a mis **Dictaminadores**, por el tiempo, la dedicación y el criterio académico con los que revisaron este trabajo. Sus observaciones y aportes no solo enriquecieron el contenido, sino que también contribuyeron de manera significativa a mi crecimiento como profesional.

A mis **amigos**, por ser compañía en los días difíciles, alegría en los momentos de descanso y apoyo sincero en cada etapa de este camino. Gracias por las palabras de aliento, por la paciencia, las risas compartidas y los momentos inolvidables.

Y, por supuesto, el agradecimiento más profundo y sentido va para mi **familia**, mi mayor fuente de fuerza, amor y motivación, por ser el sostén que me acompañó en cada paso de este camino, por creer en mí en todo momento y por brindarme un hogar lleno de valores, comprensión y esperanza.

A mis padres **Marco** y **Angela**, a mi hermana **Camila** y a mis abuelos **Julio**, **Aleja** y **Zoila**, por ser la fuerza constante en mi vida, por su amor incondicional, por su apoyo sin límites y por cada sacrificio hecho para verme llegar hasta aquí. Gracias por enseñarme con su ejemplo lo que significa la dedicación, la paciencia y la perseverancia. Este logro es el reflejo de su entrega, de su fe en mí y de los valores que me han inculcado. No hay palabras suficientes para expresar mi gratitud, muchas gracias a todos.



EPÍGRAFE

“El que estudia, triunfa; porque el esfuerzo de hoy es el éxito de mañana”

Julio Montoya

RESUMEN

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es la neoplasia maligna más común de la cavidad oral y representa un importante problema de salud pública debido a su elevada incidencia, agresividad local y capacidad de generar metástasis regionales. Su desarrollo está influenciado por factores de riesgo como el consumo de tabaco, alcohol e infección por virus del papiloma humano (VPH), pero también por múltiples alteraciones moleculares. A pesar de los avances en el manejo clínico y quirúrgico, la tasa de supervivencia a cinco años se ha mantenido sin mejoras significativas, en parte debido a la ausencia de biomarcadores moleculares específicos que permitan una detección precoz y una adecuada predicción del pronóstico. En este contexto, la investigación proteómica se presenta como una herramienta innovadora para identificar moléculas clave implicadas en la progresión del COCE.

Esta investigación tiene como objetivo principal determinar, mediante aproximación proteómica la expresión proteica temprana en cultivo celular SCC-4 de carcinoma oral. Para ello, se utilizaron técnicas de electroforesis bidimensional (2D SDS-PAGE) y espectrometría de masas (ESI-Q-TOF-MS/MS) en cultivos celulares de líneas SCC-4 y SCC-9, así como en tejidos sanos.

Según los resultados, el análisis permitió identificar tres proteínas relevantes: queratina tipo II citoesquelética 4 (KRT4), heat shock cognate 71 kDa protein (HSC70) y fibrinogen beta chain (FGB). Estas proteínas mostraron patrones de expresión alterados en comparación con los tejidos controles, sugiriendo su implicancia en procesos clave del desarrollo tumoral como la diferenciación celular, la evasión de la apoptosis, y la promoción de la migración e invasión tumoral. Los resultados sugieren que la pérdida de expresión de KRT4 y la sobreexpresión de HSC70 y FGB podrían estar relacionadas con la progresión del COCE, lo que convierte a estas proteínas en posibles biomarcadores diagnósticos y pronósticos.

Se concluye que la aproximación proteómica constituye una herramienta útil para la caracterización molecular del carcinoma oral, ofreciendo nuevas perspectivas para el diagnóstico temprano y el desarrollo de terapias dirigidas.

Palabras claves:

Carcinoma oral, proteómica, biomarcadores.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common malignant neoplasm of the oral cavity and represents a significant public health problem due to its high incidence, local aggressiveness, and potential for regional metastasis. Its development is influenced by risk factors such as tobacco use, alcohol consumption, and infection with human papillomavirus (HPV), as well as by multiple molecular alterations. Despite advances in clinical and surgical management, the five-year survival rate has remained largely unchanged, partly due to the absence of specific molecular biomarkers that enable early detection and accurate prognostic prediction. In this context, proteomic research presents itself as an innovative tool for identifying key molecules involved in the progression of OSCC.

The main goal of this research is to determine, through a proteomic approach, the early protein expression profile in SCC-4 cell cultures of oral carcinoma. For this, techniques such as two-dimensional electrophoresis (2D SDS-PAGE) and mass spectrometry (ESI-Q-TOF-MS/MS) were used on SCC-4 and SCC-9 cell lines, as well as on healthy tissue samples.

According to the results, the analysis identified three relevant proteins: keratin, type II cytoskeletal 4 (KRT4), heat shock cognate 71 kDa protein (HSC70), and fibrinogen beta chain (FGB). These proteins exhibited altered expression patterns compared to control tissues, suggesting their involvement in key processes of tumor development, such as cellular differentiation, apoptosis evasion, and promotion of cellular migration and invasion. The results suggest that the loss of KRT4 expression and the overexpression of HSC70 and FGB may be related to OSCC progression, making these proteins potential diagnostic and prognostic biomarkers.

It is concluded that the proteomic approach is a useful tool for the molecular characterization of oral carcinoma, offering new perspectives for early diagnosis and the development of targeted therapies.

Keywords:

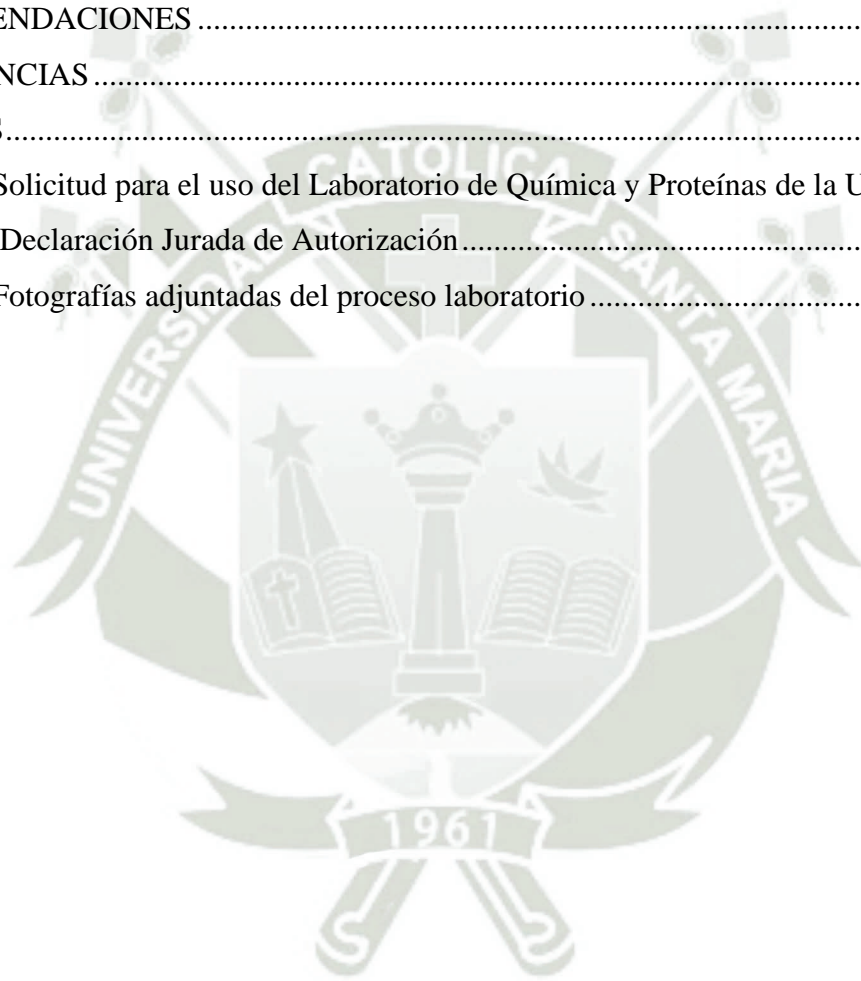
Oral carcinoma, proteomics, biomarkers.

ÍNDICE

DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
EPÍGRAFE	
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	2
PLANTEAMIENTO TEÓRICO.....	2
1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	3
1.1. Determinación del problema	3
1.2. Enunciado del problema.....	4
1.3. Descripción del problema.....	4
1.3.1 Área de Conocimiento	4
1.3.2 Operacionalización de Variables	4
1.3.3 Interrogantes Básicas	5
1.3.4 Taxonomía de la Investigación (Diseño de la Investigación).....	5
1.4. Justificación.....	5
1.4.1 Originalidad	5
1.4.2 Interés Personal	5
1.4.3 Relevancia	6
1.4.4 Actualidad.....	6
1.4.5 Factibilidad	6
2. OBJETIVOS	7
2.1 Objetivo general	7
2.2 Objetivo específico.....	7
3. MARCO CONCEPTUAL.....	8
3.1. Conceptos Básicos.....	8
3.1.1. Carcinoma oral de Células Escamosas	8
3.1.2. Electroforesis de proteínas.....	9
3.1.3. SDS-PAGE o 1D SDS-PAGE	9
3.1.4. Electroforesis bidimensional (2-DE/2D-PAGE)	10
3.1.4.1. Primera dimensión: Isoelectric focusing (IEF)	10

3.1.4.2. Segunda dimensión: SDS-PAGE	11
3.1.5. Espectrometría de masas: (MS/MS).....	11
3.1.5.1. Ionización por electrospray (ESI).....	12
3.1.6. Secuenciamiento de proteínas	12
3.2. Análisis de antecedentes investigativos	13
3.2.1. Antecedentes internacionales	13
3.2.2. Antecedentes nacionales.....	16
3.2.3. Antecedentes locales.....	17
4. HIPÓTESIS.....	17
CAPÍTULO II PLANTEAMIENTO OPERACIONAL	18
1. TÉCNICAS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACIÓN.....	19
1.1. Técnicas.....	19
1.1.1. Cultivo de células	19
1.1.2. Recolección de tejidos y preparación de muestras	19
1.1.3. Electroforesis bidimensional 2D SDS-PAGE	19
1.1.4. Identificación de proteínas mediante nano-HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS ..	20
1.1.5. Análisis estadístico	21
1.2. Instrumentos	21
1.2.1 Instrumentos documentales	21
1.2.2 Instrumentos mecánicos	21
1.3. Materiales	21
2. CAMPO DE VERIFICACIÓN.....	21
2.1. Ubicación Espacial	21
2.2. Ubicación Temporal.....	22
2.3. Población/muestra	22
2.4. Unidades de Estudio.....	22
2.4.1 Criterios de inclusión.....	22
2.4.2 Criterios de exclusión	22
2.5. Consideraciones éticas	22
3. ESTRATEGIA DE RECOLECCIÓN DE DATOS	23
3.1. Organización de la información	23
3.2. Recursos	23
3.3. Validación del Instrumento	23
4. ESTRATEGIA PARA MANEJAR LOS RESULTADOS.....	23

4.1. Plan de procesamiento.....	23
4.1.1. Tipo de procesamiento.....	23
4.1.2. Operaciones del procesamiento.....	23
4.2. Plan de análisis de los datos	24
CAPÍTULO III RESULTADOS	25
DISCUSIÓN.....	43
CONCLUSIONES	47
RECOMENDACIONES	48
REFERENCIAS	49
ANEXOS.....	54
Anexo 1 Solicitud para el uso del Laboratorio de Química y Proteínas de la UCSM	55
Anexo 2 Declaración Jurada de Autorización.....	56
Anexo 3 Fotografías adjuntadas del proceso laboratorio.....	57



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Péptidos identificados por mass spectrometry ESI-Q-TOF_MS/MS y Analizados por el Software DNA Star. Ver. 6.0.....	30
Tabla 2. Identificación de los spots, después de analizar por espectrometría de masas ESI-QTOF MS/MS. En la base de datos <i>UniProtKB/Swiss-Prot</i>	31
Tabla 3. Análisis de secuencias en base de datos NCBI usando el programa BLAST-P Protein search, para los péptidos Ce-1, Ce-2 y Ce-3, obtenidos de cultivo celular de células escamosas de la línea celular SCC-4 de carcinoma oral.....	34
Tabla 4. Cinética de crecimiento y desarrollo de las líneas de células de carcinoma oral cáncer escamosas de las líneas celulares SCC-4 y SCC-9.	42



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Primera dimensión: Isoelectric focusing (IEF)	11
Figura 2. Segunda dimensión: SDS-PAGE	11
Figura 3. Electroforesis bidimensional (2D) del extracto de proteínas expresadas de cultivo celular de células escamosas de la cavidad oral.....	26
Figura 4. Imagen tridimensional del gel de electroforesis bidimensional del mapa de referencia del cultivo celular de células epiteliales escamosas de la cavidad oral	27
Figura 5. Electroforesis bidimensional (2D) del extracto de proteínas expresadas de cultivo celular de células escamosas de la línea celular SCC-4 de carcinoma oral.....	28
Figura 6. Imagen tridimensional del gel de electroforesis bidimensional (2D) del extracto de proteínas expresadas de cultivo celular de células escamosas de la línea celular SCC-4 de carcinoma oral	29
Figura 7. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida obtenido por digestión trípica, del spot Ce-1 (Query_9599270), con otras proteínas de la familia P19013.5 (Keratin, type II cytoskeletal 4), P07744.2 (Keratin, type II cytoskeletal 4), Q6IG00.1 (Keratin, type II cytoskeletal 4).....	32
Figura 8. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida obtenido por digestión trípica, del spot Ce-2 (Query_6455765), con otras proteínas de la familia Q9W6Y1.1 (Heat shock cognate 71 kDa protein), Q5NVM9.2 (Heat shock cognate 71 kDa protein), P63017.1 (Heat shock cognate 71 kDa protein).....	33
Figura 9. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida obtenido por digestión trípica, del spot Ce-3 (Query_6965150), con otras proteínas de la familia P02675.2 (Fibrinogen beta chain), Q8K0E8.1 (Fibrinogen beta chain), P14480.4 (Fibrinogen beta chain)	33
Figura 10. (Ce-1) Keratin, type II cytoskeletal 4	35
Figura 11. (Ce-2) Heat shock cognate 71 kDa protein.....	36
Figura 12. (Ce-3) Fibrinogen beta chain isoform 1 preproprotein.....	37
Figura 13. Curvas de desarrollo de células de cáncer oral de la línea SCC-4. Cada valor del gráfico lineal muestra claramente el desarrollo significativo de la viabilidad al aumentar el desarrollo en el crecimiento celular. Los datos se representan como	

la media \pm DE de tres experimentos independientes. En círculo rojo el conteo en destaque para el crecimiento celular.....	39
Figura 14. Curvas de desarrollo de células de cáncer oral de la línea SCC-9. Cada valor del gráfico lineal muestra claramente el desarrollo significativo de la viabilidad al aumentar el desarrollo en el crecimiento celular. Los datos se representan como la media \pm DE de tres experimentos independientes. En círculo azul, el conteo en destaque para el crecimiento celular.....	39
Figura 15. Curvas de desarrollo de células de cáncer oral de las líneas SCC-4 y SCC-9. Cada valor del gráfico lineal muestra claramente el desarrollo significativo de la viabilidad al aumentar el desarrollo en el crecimiento celular. Los datos se representan como la media \pm DE de tres experimentos independientes. En círculo verde, el conteo en destaque para el crecimiento celular.	40
Figura 16. Micrografías que muestran cambios morfológicos en células de las líneas de carcinoma oral	41
Figura 17. Cabina de Eflujo	57
Figura 18. Desinfección de la cabina de Eflujo	58
Figura 19. Preparación de cultivo	59
Figura 20. Introducción de cultivo a la estufa.....	60
Figura 21. Retirando el cultivo de la estufa	61
Figura 22. Cultivo en estufa	62

INTRODUCCIÓN

El cáncer oral representa un problema de salud pública a nivel mundial, siendo el carcinoma oral de células escamosas (COCE) la forma histológica más frecuente, con aproximadamente el 90% de los casos diagnosticados. Esta neoplasia se origina en el epitelio escamoso de la cavidad oral y se caracteriza por su capacidad invasiva, su tendencia a la recurrencia local y su potencial para diseminarse hacia los ganglios linfáticos cervicales (1).

A pesar de los avances en diagnóstico y tratamiento, la supervivencia a cinco años de los pacientes con COCE continúa siendo limitada, en gran parte debido a su detección tardía. La enfermedad suele pasar desapercibida en estadios tempranos, ya que puede presentarse como una lesión indolora o una alteración discreta en la mucosa oral, lo que retrasa la intervención médica oportuna (3)

Diversos factores de riesgo han sido identificados en la génesis del COCE, entre ellos el consumo prolongado de tabaco y alcohol, la infección por el virus del papiloma humano (VPH), la exposición crónica a irritantes locales y ciertos factores genéticos y epigenéticos. Sin embargo, en años recientes, ha cobrado relevancia el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en su desarrollo, especialmente aquellos relacionados con la expresión diferencial de proteínas que pueden influir en la proliferación, diferenciación, migración celular y evasión de la apoptosis (1).

El análisis de estas proteínas no solo permite comprender mejor la biología tumoral del COCE, sino que también abre la posibilidad de identificar biomarcadores diagnósticos, pronósticos o terapéuticos que contribuyan a una medicina más precisa y personalizada. En este contexto, la presente investigación busca aportar evidencia sobre el comportamiento de determinadas proteínas asociadas a este tipo de carcinoma, con el fin de enriquecer el conocimiento actual y apoyar el desarrollo de estrategias clínicas más eficaces.



CAPÍTULO I
PLANTEAMIENTO TEÓRICO

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Determinación del problema

La proteómica, como disciplina centrada en el estudio integral de los proteomas, se ha convertido en una herramienta clave para la investigación biomédica. Su relevancia radica en la posibilidad de identificar y comprender proteínas y moléculas efectoras que intervienen directamente en los procesos celulares, lo que permite una mejor interpretación de la fisiología humana (1).

Las enfermedades infecciosas siguen representando un reto importante para la salud pública mundial, afectando a millones de personas cada año. No se trata únicamente de infecciones causadas por agentes patógenos, sino del resultado de una compleja interacción entre múltiples factores propios del microorganismo y del huésped (2).

Para lograr una comprensión más profunda de estas enfermedades, es indispensable adoptar enfoques multidisciplinarios que integren distintas áreas del conocimiento. En la actualidad, se desarrollan estudios detallados orientados a la identificación de biomarcadores y de nuevas dianas terapéuticas y vacunales. Si bien la genómica y la transcriptómica han sido fundamentales en este campo, la incorporación de la proteómica ha ampliado considerablemente las posibilidades de análisis y aplicación en enfermedades infecciosas (3).

La utilidad de esta disciplina se debe a que muchas enfermedades se manifiestan mediante cambios en la expresión, actividad o modificación postraduccional de proteínas. En consecuencia, el estudio proteómico permite asociar directamente estas alteraciones con estados patológicos específicos, lo que favorece tanto el diagnóstico como el desarrollo de tratamientos más precisos (1).

En los últimos años, los avances tecnológicos han permitido optimizar los métodos de separación y análisis de proteínas. Entre ellos destacan la electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (2D-PAGE), la cromatografía líquida y la cromatografía de fluidos, técnicas que han potenciado significativamente la resolución y sensibilidad de los estudios proteómicos.

1.2. Enunciado del problema

Estudio de la aproximación proteómica, en el cultivo celular de la línea SCC-4 de carcinoma oral en comparación con cultivo celular de células escamosas de la cavidad oral: Una visión de marcador molecular temprana. Arequipa, 2025.

1.3. Descripción del problema

1.3.1 Área de Conocimiento

- **Área General** : Ciencias de la Salud.
- **Área Específica** : Odontología.
- **Especialidad** : Biología Celular
- **Línea o Tópico** : Proteómica.

1.3.2 Operacionalización de Variables

Variables	Indicadores	Sub-Indicadores	Sub-indicadores de primer orden
<p>Nivel de expresión proteómico en:</p> <p>a) Proliferación celular en cultivo SCC-4 de carcinoma oral de células escamosas.</p> <p>b) Proliferación celular en cultivo de células escamosas saludables.</p>	<p>Expresión de proteínas asociadas al carcinoma oral de células escamosas en cultivo celular SCC-4 de carcinoma oral.</p>	<p>Proteínas diferenciales en la electroforesis bidimensional 2D (mapa de referencia, control y patológico).</p>	<p>Estudio de homología secuencial para determinar regiones conservadas de proteínas asociadas al carcinoma oral</p>

1.3.3 Interrogantes Básicas

- ¿Cuál es el nivel de expresión proteómica diferencial, en la proliferación celular de cultivo primario de células escamosas de la cavidad oral?
- ¿Cuál es el nivel de expresión proteómica diferencial temprana en cultivo celular SCC-4 de carcinoma oral?

1.3.4 Taxonomía de la Investigación (Diseño de la Investigación)

ABORDAJE	TIPO DE ESTUDIO					DISEÑO	NIVEL
	1. Por la técnica de recolección	2. Por el tipo de dato que se planifica recoger	3. Por el número de mediciones de la variable	4. Por el número de muestras o población	5. Por el ámbito de recolección		
Cuantitativo	Experimental	Prospectivo	Transversal	Comparativo	De laboratorio	Experimental	Explicativo

1.4. Justificación

1.4.1 Originalidad

La investigación es original. El estudio de aproximación proteómica comparativo del tejido de células pre o cancerosas escamosas del tracto oral con tejido sano, no ha sido investigado extensamente. A nivel mundial existen estudios que hablan sobre la expresión proteómica de tejidos orales, mas no existen muchos estudios que decodifiquen el tejido de células escamosas orales, comparando su aproximación proteómica con el tejido saludable.

1.4.2 Interés Personal

La leucoplasia oral se manifiesta clínicamente como una placa blanca en la mucosa que no puede ser atribuida, mediante análisis clínico ni histopatológico, a ninguna otra patología específica. Si bien se reconoce como una de las lesiones premalignas más relevantes del entorno bucal por su potencial de transformación maligna, su base genética aún no ha sido completamente dilucidada. El desarrollo del cáncer oral responde a un proceso complejo y progresivo, en el

que convergen múltiples alteraciones moleculares. Comprender estas bases biológicas ha despertado en mí un profundo interés por aportar desde la investigación al diseño de estrategias clínicas más eficaces en el diagnóstico temprano y tratamiento del cáncer oral.

1.4.3 Relevancia

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) representa una de las neoplasias más frecuentes en la cavidad oral y se encuentra estrechamente relacionado con lesiones potencialmente malignas como la leucoplasia oral. Debido al pronóstico reservado que puede presentar esta lesión y a las dificultades para diferenciarla de estadios tempranos de cáncer, se hace necesario profundizar en la comprensión de los mecanismos moleculares que intervienen en su transformación maligna. La identificación de rutas de señalización alteradas y de proteínas involucradas podría facilitar el desarrollo de estrategias diagnósticas más sensibles y de nuevas dianas terapéuticas.

1.4.4 Actualidad

Durante la transición de leucoplasia oral hacia carcinoma oral de células escamosas, se ha observado un incremento en la formación de microvasos y en la expresión de factores proangiogénicos. Estudios recientes sugieren que las células madre mesenquimales podrían tener una función activa en la configuración del microambiente tumoral. No obstante, su rol específico en la inducción de la angiogénesis, especialmente a nivel de la mucosa oral, aún no ha sido completamente esclarecido. Por ello, resulta fundamental investigar las rutas moleculares y mecanismos implicados en este proceso dentro del entorno tisular alterado.

1.4.5 Factibilidad

El proyecto se considera factible porque el ámbito de recolección del tejido a analizar será de una Clínica local. Los geles para electroforesis se realizaron en el Laboratorio de Química y Proteínas F-401, bajo la supervisión del Dr. Gustavo Obando y colaboración del Dr. Luis Alberto Ponce Soto, especialista en el Área Proteómica, en la Universidad Católica de Santa María. El modelo se envió a

secuenciar y el análisis bioinformático se realizó en el Laboratorio de Química y proteínas en la Universidad Católica de Santa María, bajo el apoyo de la base de datos Mascot.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar por aproximación proteómica la expresión proteica temprana en cultivo celular SCC-4 de carcinoma oral

2.2 Objetivo específico

- Determinar el nivel de expresión proteómica diferencial en la proliferación celular de un cultivo primario de células escamosas de la cavidad oral.
- Determinar el nivel de expresión proteómica diferencial temprana en cultivo celular SCC-4 de carcinoma oral.

3. MARCO CONCEPTUAL

3.1. Conceptos Básicos

3.1.1. Carcinoma oral de Células Escamosas

El carcinoma de células escamosas en la cavidad bucal, cabeza y cuello es uno de los tipos más frecuentes de cáncer vinculado a lesiones precancerosas (14). Actualmente se considera que este cáncer sigue un patrón de desarrollo predecible, precedido por condiciones precancerosas, siendo la leucoplasia oral (OLK) la más común entre ellas (3).

La leucoplasia oral fue inicialmente definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una placa blanca que no podía ser diagnosticada de manera clínica ni patológica como ninguna otra afección en la mucosa bucal. La capacidad de la leucoplasia oral para volverse maligna se ha demostrado con la progresión desde metaplasia sin displasia a displasia de bajo grado, displasia de alto grado y, finalmente, a carcinoma invasivo (17).

Estudios indican que el riesgo de desarrollar tumores malignos es de 8 a 10 veces más alto en individuos con leucoplasia oral en comparación con aquellos que no la padecen. Este riesgo aumenta a medida que la displasia progresa en sus distintas etapas. Existe una necesidad urgente de entender los factores moleculares y las vías de señalización que están involucrados en la transformación de tejido precanceroso a canceroso, lo que permitiría la identificación de nuevos objetivos diagnósticos y terapéuticos (5).

La proteómica es una tecnología consolidada que permite obtener perfiles moleculares, lo que podría acelerar significativamente el estudio del cáncer humano (4). Recientemente, se han logrado importantes avances en la proteómica aplicada al cáncer oral, lo que ha generado diversas aplicaciones en este campo emergente. A través de esta plataforma tecnológica, se han descubierto marcadores proteicos altamente específicos y sensibles para el diagnóstico y pronóstico del cáncer oral al comparar los perfiles proteicos de células cancerosas, tejidos, plasma y saliva con controles adecuados. Sin embargo, existen pocos estudios que analicen la diferencia en los perfiles de expresión proteica entre los tumores y las lesiones precancerosas en diferentes fases de displasia (20).

El desarrollo de herramientas bioinformáticas ha permitido crear bases de datos genómicas y proteómicas accesibles en línea. La ontología genética (GO) y el análisis de rutas se han considerado herramientas poderosas en biología sistemática para entender la complejidad de los perfiles de expresión en los procesos celulares (6).

La ontología genética describe el papel de un gen en un proceso biológico, su función molecular y su localización celular (8). Cada gen está relacionado con diferentes niveles de términos GO, que van desde los más generales y amplios hasta los más específicos. Por lo tanto, perfilar los datos de expresión basados en GO proporciona una nueva perspectiva para comprender los procesos regulatorios clave en el cáncer oral. El análisis de rutas, por su parte, revela las interacciones entre proteínas, lo que permite obtener rápidamente nuevos conocimientos sobre los mecanismos moleculares complejos involucrados en los procesos relacionados con enfermedades (10).

En la presente investigación, vamos a evaluar las diferencias en la expresión de proteínas para identificar posibles biomarcadores del progreso de la enfermedad desde la leucoplasia oral hasta el CCE, con el fin de obtener más información sobre los posibles mecanismos subyacentes a estas transformaciones. Se obtendrá un par de lisados de proteínas de un paciente. Los tejidos se analizarán mediante electroforesis en gel bidimensional SDS-PAGE (2D), seguida de espectrometría de masas en tándem ESI-Q-TOF. Al utilizar este enfoque, posiblemente se puedan identificar nuevos objetivos terapéuticos o marcadores de proteínas para mejorar la supervivencia del paciente.

3.1.2. Electroforesis de proteínas

La electroforesis es una técnica utilizada para separar y analizar ácidos nucleicos, siendo fundamental en los laboratorios para aislar y manipular fragmentos de ADN clonados. Se considera un elemento esencial en diversos protocolos de biología molecular, que permiten estudiar cómo los ácidos nucleicos interactúan y desempeñan su función en células y tejidos (11).

3.1.3. SDS-PAGE o 1D SDS-PAGE

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) es una técnica ampliamente utilizada para lograr una separación precisa en mezclas complejas de proteínas. Este procedimiento desnaturaliza las proteínas antes de someterlas a electroforesis. Aunque SDS-PAGE permite determinar las características

estructurales covalentes de las proteínas separadas, las propiedades funcionales de estas se pierden durante el proceso, lo que incluye la eliminación de iones metálicos unidos de manera no covalente. El SDS-PAGE es la tecnología más comúnmente empleada para obtener separaciones analíticas de alta resolución en mezclas de proteínas (7).

El SDS, un detergente utilizado en este método, desnaturaliza las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas no unidas por enlaces disulfuro, recubriéndolas con una carga negativa que se relaciona con su longitud, lo que facilita la estimación de sus pesos moleculares (8)

3.1.4. Electroforesis bidimensional (2-DE/2D-PAGE)

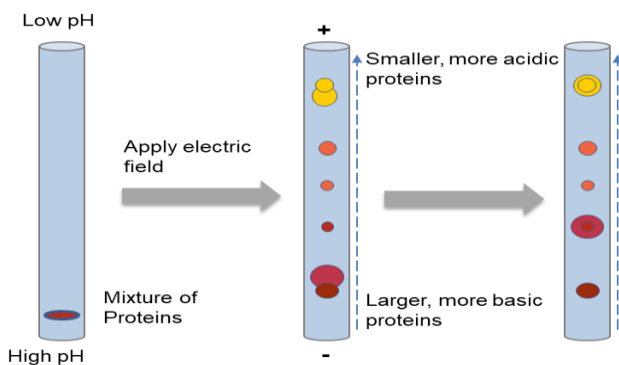
La electroforesis bidimensional en gel (2-DE o 2D-PAGE) es una técnica fundamental en proteómica. Permite separar una mezcla compleja de proteínas utilizando dos propiedades distintas de estas. En la primera dimensión, conocida como "enfoque isoeléctrico" (IEF), las proteínas se separan según su punto isoeléctrico (pI). En la segunda dimensión, que implica SDS-PAGE, las proteínas se separan en función de su peso molecular relativo (9).

3.1.4.1. Primera dimensión: Isoelectric focusing (IEF)

En la primera dimensión, las proteínas se separan según sus puntos isoeléctricos. El pI se define como el pH en el cual la carga neta de la proteína es cero. Las proteínas con carga neta positiva migran hacia el cátodo, reduciendo gradualmente su carga positiva hasta alcanzar su pI. En contraste, las proteínas con carga neta negativa migran hacia el ánodo, perdiendo gradualmente su carga negativa hasta llegar a su pI (Ilustración 1). Para ello, se carga una mezcla de proteínas en el extremo básico de un gel con gradiente de pH. Al aplicar un campo eléctrico, las proteínas se separan de acuerdo con sus cargas, concentrándose en las posiciones donde el valor del pI coincide con el pH circundante. Las proteínas de mayor tamaño se desplazan más lentamente a través del gel, pero eventualmente alcanzan a las proteínas más pequeñas con la misma carga (12).

Figura 1

Primera dimensión: Isoelectric focusing (IEF)



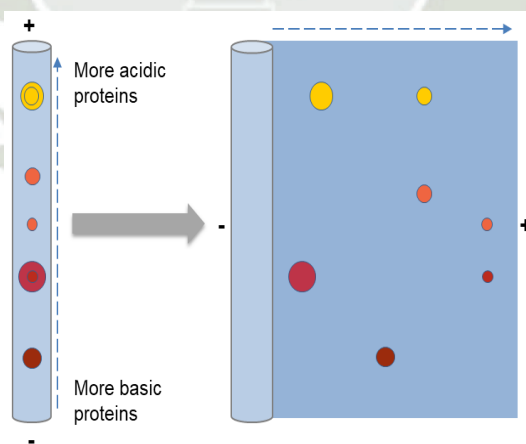
Nota: Jacob RJ et al, 2006 (10)

3.1.4.2. Segunda dimensión: SDS-PAGE

En la segunda dimensión, las proteínas se separan sobre un gel, que puede estar dispuesto de manera plana o vertical. En esta etapa se emplea el SDS-PAGE, donde las proteínas de menor tamaño se desplazan más rápidamente debido a que experimentan menos resistencia (11).

Figura 2

Segunda dimensión: SDS-PAGE



Nota: Jacob RJ et al, 2006 (10)

3.1.5. Espectrometría de masas: (MS/MS)

La espectrometría de masas es una técnica analítica que proporciona información cualitativa, sobre la estructura molecular, y cuantitativa, sobre la concentración o masa molecular, después de que las moléculas se convierten en iones (15).

Las moléculas de interés son las primeras en ser introducidas en la fuente de ionización del espectrómetro, donde se ionizan, adquiriendo una carga positiva o negativa. Posteriormente, los iones se desplazan a través del analizador de masas y se distribuyen en diferentes áreas del detector en función de su relación masa/carga (m/z) (16).

Una vez que los iones llegan al detector, se generan señales que son registradas por un software. Este software presenta las señales gráficamente como un espectro de masas, que refleja la abundancia relativa de las señales en función de la relación m/z (13).

3.1.5.1. Ionización por electrospray (ESI)

La ionización por electrospray (ESI) emplea energía eléctrica para facilitar la transferencia de iones desde una solución a la fase gaseosa antes de su análisis mediante espectrometría de masas. Este proceso permite que las especies iónicas sean analizadas con mayor sensibilidad mediante ESI/MS (12).

Recientemente, la ESI ha ganado relevancia en laboratorios clínicos debido a su sensibilidad, robustez y fiabilidad en estudios, especialmente cuando se compara con otras técnicas. En combinación con la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que se utiliza para fraccionar las moléculas antes del análisis por espectrometría de masas, la ESI-MS se ha establecido como una técnica poderosa, capaz de analizar tanto moléculas grandes como pequeñas de diversas polaridades en muestras biológicas complejas (13)

3.1.6. Secuenciamiento de proteínas

En el campo de la proteómica, se emplean diversas técnicas que comprenden diferentes metodologías experimentales, tales como la electroforesis bidimensional, la cromatografía líquida y la espectrometría de masas (18). La combinación de estas técnicas se utiliza para estudiar las proteínas en una variedad de organismos. Sin embargo, las muestras pueden presentar complejidades que afectan su procesamiento y análisis posterior, como el rango dinámico de la expresión proteica y dificultades en la detección de proteínas asociadas a membranas (22).

La secuenciación de proteínas se refiere al proceso práctico mediante el cual se determina la secuencia de aminoácidos de una proteína, ya sea en su totalidad o en parte. Este proceso es crucial para la identificación de proteínas (19).

La estructura primaria de una proteína está conformada por una secuencia lineal de aminoácidos, representados por letras mayúsculas, las cuales indican los diferentes aminoácidos que componen la proteína. Además, esta estructura describe la disposición de los puentes disulfuro y señala las posiciones de los aminoácidos N-terminal y C-terminal, asignándoles números (21).

Por su parte, la estructura secundaria de la proteína se refiere al patrón espacial que adoptan ciertos segmentos de la secuencia de aminoácidos. En esta fase, algunas secuencias se organizan formando hélices alfa, láminas beta o giros, siendo estas tres las más comunes, aunque no las únicas (25).

El estudio de la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas puede resultar complejo, aunque varios estudios destacan su importancia para que la proteína desempeñe adecuadamente su función biológica (23)

3.2. Análisis de antecedentes investigativos

3.2.1. Antecedentes internacionales

- **Bostanci N., Bao K.**

Título: Contribution of proteomics to our understanding of periodontal inflammation.

Fuente: Proteomics 2017. 17, (3-4). Publicado el 19 de diciembre de 2016. doi: <https://doi.org/10.1002/pmic.201500518>.

Resumen: Las enfermedades periodontales conllevan la destrucción inflamatoria de los tejidos de soporte dental (periodontales) y pueden eventualmente provocar la pérdida de piezas dentales. La enfermedad periodontal grave (o periodontitis) afecta aproximadamente al 10% de la población mundial. La periodontitis no solo deteriora gravemente la calidad de vida de las personas al deteriorar la dentición, sino que también afecta negativamente la salud sistémica. El presente artículo de revisión destaca los avances logrados en nuestra comprensión de las enfermedades periodontales inflamatorias mediante el uso de tecnologías proteómicas. La nueva información proviene de estudios clínicos e in vitro: los primeros investigan muestras de saliva y líquido crevicular gingival en pacientes con enfermedad periodontal, mientras que los segundos utilizan modelos de interacción célula huésped/tejido-bacteria/biopelículas relevantes para la enfermedad periodontal. Se

puede obtener una amplia gama de información sobre los perfiles proteicos, la cual es útil, pero debe validarse individualmente mediante métodos basados en anticuerpos sensibles de referencia. El desarrollo de las tecnologías de plataforma proteómica empleadas ayudará a completar con mayor amplitud y profundidad los perfiles proteicos de la enfermedad periodontal. Los datos recopilados hasta ahora resaltan la importancia de alejarse del concepto de que un puñado de proteínas son responsables de la patogénesis de la enfermedad y comenzar a aceptar que existen “firmas” de proteínas y vías asociadas que conducen a esto (40).

- Rodríguez Vargas, Alvarado Garnica, García Contreras

Título: Cancer stem cells in oral squamous cell carcinoma.

Fuente: Rev Cient Odontol. 2022 Jun 27;10(2):e106. Publicado el 27 de junio de 2022. doi: <https://doi.org/10.21142/2523-2754-1002-2022-106>

Resumen: Las células madre cancerosas (CMC) representan una subpoblación de células cancerosas que se cree que inician e impulsan la progresión del cáncer. En modelos animales, las CMC xenotrasplantadas han demostrado la capacidad de producir tumores. Desde su aislamiento inicial en cánceres hematológicos, se han identificado CMC en diversos cánceres sólidos humanos, incluyendo el carcinoma oral de células escamosas (COCE). Además de sus propiedades tumorígenas, se ha demostrado que las vías de señalización desreguladas relacionadas con las células madre —miembro de la familia Wnt (Wnt), proteína homóloga del locus neurogénico Notch (Notch) y hedgehog— confieren a las CMC características como la autorrenovación, la plasticidad fenotípica y la quimiorresistencia, lo que contribuye a la recurrencia y al fracaso del tratamiento. En consecuencia, las CMC se han convertido en dianas para nuevos agentes terapéuticos, algunos de los cuales se encuentran actualmente en diferentes fases de ensayos clínicos. Cabe destacar que los inhibidores de moléculas pequeñas de la vía de señalización hedgehog, como vismodegib y glasdegib, han sido aprobados para el tratamiento del carcinoma basocelular y la leucemia mieloide aguda, respectivamente. Otras estrategias para erradicar las CSC incluyen compuestos naturales, sistemas de administración de nanofármacos, la focalización mitocondrial y del microambiente de las CSC, la autofagia, la hipertermia y la inmunoterapia. A pesar de la extensa documentación sobre las CSC en el CCE desde su primera demostración en el CCE de cabeza y cuello (CCE) en 2007, ninguno de estos nuevos enfoques farmacológicos ha entrado

aún en ensayos clínicos para pacientes con CCE. Esta revisión narrativa resume la evidencia in vivo e in vitro de las CSC y las vías de señalización relacionadas con las CSC en el CCE, destacando su papel en el fomento de la quimiorresistencia y la resistencia a la inmunoterapia. Además, aborda los desafíos metodológicos y analiza futuras líneas de investigación para mejorar los sistemas experimentales y avanzar en los estudios sobre las CSC (41).

- Hui Ye, Anxun Wang, Tianwei Yu, Shihu Sheng

Título: Proteomic based identification of manganese superoxide dismutase 2 (SOD2) as a metastasis marker for oral squamous cell carcinoma

Fuente: Cancer Genomics Proteomics. 2008 Mar-Apr; 5(2): 85–94. Publicado el 23 de junio de 2010. doi: <https://doi.org/10.7759/cureus.38514>.

Resumen: La metástasis es un evento crítico en la progresión del carcinoma oral de células escamosas (COCE). Para identificar biomarcadores proteómicos para la metástasis del COCE, se examinaron 3 líneas celulares pareadas de COCE (UM1/UM2, 1386Tu/1386Ln, 686Tu/686Ln) con diferente potencial metastásico. Entre estas 3 líneas celulares, UM1, 1386Ln y 686Ln exhibieron un mayor grado de potencial metastásico que sus líneas celulares pareadas UM2, 1386Tu y 686Tu, respectivamente, medido usando un ensayo de invasión celular in vitro. Se identificaron un total de 40 proteínas con expresión diferencial usando un enfoque proteómico 2D-PAGE/MS. Los candidatos proteicos seleccionados (superóxido dismutasa 2 y proteína de choque térmico 27) se investigaron más a fondo mediante el método de inmunohistoquímica (IHC) usando muestras de tejido de pacientes con COCE independientes. Se observaron aumentos estadísticamente significativos en la tinción IHC para el superóxido dismutasa de manganeso 2 (SOD2) en la enfermedad metastásica ganglionar en comparación con el carcinoma escamoso de células escamosas primario asociado. Por lo tanto, nuestros resultados indicaron que los niveles elevados de SOD2 se asocian con la metástasis ganglionar en el carcinoma escamoso de células escamosas y podrían proporcionar valores predictivos para el diagnóstico de metástasis (42).

- Xiqiang Liu, Anxun Wang, Lorenzo Lo Muzio, Xiaofeng Zhou, Hui Ye

Título: Deregulation of manganese superoxide dismutase (SOD2) expression and lymph node metastasis in tongue squamous cell carcinoma.

Fuente: Liu et al. BMC Cancer 2010, 10:365. Publicado el 09 de julio de 2010. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-365>.

Resumen: Antecedentes: La metástasis ganglionar es un evento crítico en la progresión del carcinoma escamocelular de lengua (CCE). La identificación de biomarcadores asociados con el proceso metastásico proporcionaría información pronóstica crucial para facilitar la toma de decisiones clínicas. Estudios previos han demostrado que la desregulación de la expresión de la superóxido dismutasa de manganeso (SOD2) es un evento frecuente en el CCE y podría estar asociada con una mayor invasión celular. El objetivo de este estudio es evaluar con mayor detalle si el nivel de expresión de SOD2 se correlaciona con el estado metastásico en pacientes con CCE. **Métodos:** En primer lugar, examinamos la expresión de SOD2 a nivel de ARNm en 53 muestras de TSCC y 22 controles normales, basándonos en un análisis agrupado de conjuntos de datos de microarrays existentes. Para confirmar nuestras observaciones, examinamos la expresión de SOD2 a nivel proteico en una cohorte adicional de pacientes con TSCC (n = 100), así como en 31 displasias premalignas, 15 mucosas linguales normales y 32 metástasis ganglionares mediante inmunohistoquímica (IHQ). **Resultados:** El nivel de ARNm de SOD2 en el tejido tumoral primario presenta una correlación inversa con la metástasis ganglionar en la primera cohorte de pacientes con CET. El nivel de proteína SOD2 en el tejido tumoral primario también presenta una correlación inversa con la metástasis ganglionar en la segunda cohorte. La desregulación de la expresión de SOD2 es un evento común en el CET y parece estar asociada con la progresión de la enfermedad. El análisis estadístico reveló que la expresión reducida de SOD2 en el tejido tumoral primario se asocia con la metástasis ganglionar en ambas cohortes examinadas. **Conclusiones:** Nuestro estudio sugirió que la desregulación de SOD2 en TSCC tiene valores predictivos potenciales para la metástasis de los ganglios linfáticos y puede servir como un objetivo terapéutico para pacientes con riesgo de metástasis (43).

3.2.2. Antecedentes nacionales

No se han encontrado antecedentes nacionales.

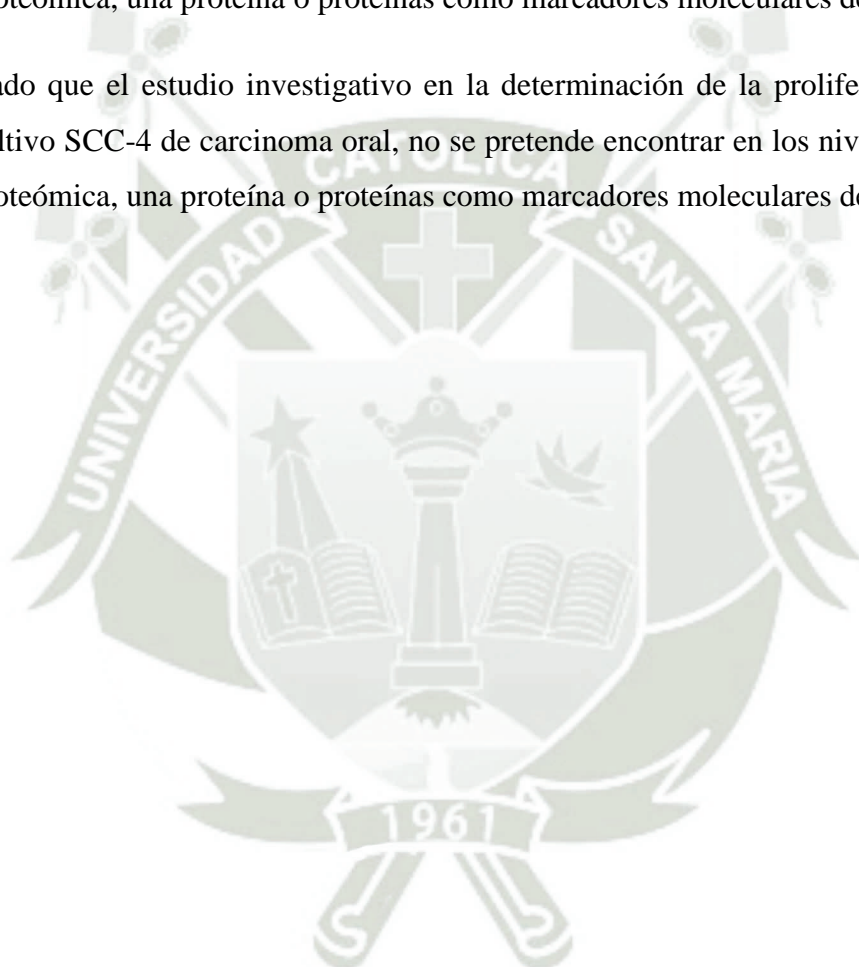
3.2.3. Antecedentes locales

No se han encontrado antecedentes nacionales.

4. HIPÓTESIS

Ho Dado que el estudio investigativo en la determinación de la proliferación celular de cultivo SCC-4 de carcinoma oral, se pretende encontrar en los niveles de expresión proteómica, una proteína o proteínas como marcadores moleculares de expresión.

H1 Dado que el estudio investigativo en la determinación de la proliferación celular de cultivo SCC-4 de carcinoma oral, no se pretende encontrar en los niveles de expresión proteómica, una proteína o proteínas como marcadores moleculares de expresión.





CAPÍTULO II
PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

1. TÉCNICAS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACIÓN

1.1. Técnicas

1.1.1. Cultivo de células

Se mantienen dos líneas celulares de carcinoma de células escamosas orales (SCC-4, SCC-9) en medio Eagle modificado de Dulbecco (Invitrogen), complementado con suero fetal bovino al 10% (Invitrogen), y 100 unidades por litro de penicilina y 10 mg por litro de estreptomina (32).

1.1.2. Recolección de tejidos y preparación de muestras

Se obtiene dos pares de tejidos saludables de dos pacientes en la Clínica Happy Dent. Las muestras se examinan histológicamente mediante tinción con hematoxilina y eosina (HE), y el estadio clínico se determina por la tinción como tejido sano.

Se excluyen los pacientes que mostraron aparente muestra de tejido patológico por exploración visual.

1.1.3. Electroforesis bidimensional 2D SDS-PAGE

La electroforesis bidimensional en gel se lleva a cabo siguiendo el procedimiento descrito previamente (40). La concentración de proteínas en los sobrenadantes se mide utilizando un kit de proteínas Bio-Rad. Todas las muestras pareadas se analizan de forma cuantitativa en conjunto. Se aplican 1 mg de proteína por muestra en tiras de gradiente no lineales de pH 5 a 9 en los vasos de muestra, con los extremos básico y ácido (31).

El proceso comienza a 200 V y el voltaje se incrementa gradualmente hasta 8000 V a una velocidad de 4 V/min, manteniéndose constante durante 3 horas más (aproximadamente 150,000 Vh en total). La separación en la segunda dimensión se realiza en geles de poliacrilamida-SDS al 12%. Los geles (180 x 200 x 1,5 mm³) se procesan a 40 mA por gel. Posteriormente, las proteínas se fijan en una solución de metanol al 50% con ácido fosfórico al 5% durante 2 horas (34)

Los geles se tiñen con Silver Stain (Plata) durante 12 horas, y se visualizan las manchas proteicas. Cada experimento se repite dos veces para asegurar la precisión del análisis.

Las imágenes se escanean utilizando un escáner de luz blanca GS-800 de alta calidad (Bio-Rad, 400–750 nm). Las proteínas cuya expresión varía se identifican utilizando el software PD-Quest 2DE (Bio-Rad, EE.UU.) (30).

La cantidad de cada mancha en el gel se normaliza como un porcentaje del total de todas las manchas en ese gel y se evalúa en términos de densidad óptica (OD). La prueba t de Student se aplica para comparar el volumen relativo de las manchas entre dos grupos. Se seleccionan los puntos significativos que muestran cambios consistentes y una diferencia mínima de 2,0 veces ($p < 0,05$) para el análisis posterior mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS) (29).

1.1.4. Identificación de proteínas mediante nano-HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS

Las manchas proteicas se extraen manualmente y se digieren utilizando tripsina bovina de grado secuencial (V511A, Promega). Las muestras proteicas se someten a procesos de reducción, alquilación y digestión con tripsina siguiendo protocolos estándar, tal como se describió previamente. Los digestos tripticos se analizan utilizando un sistema nano-HPLC acoplado a un espectrómetro de masas Q-TOF Primer (Q-TOF, Micromass, Manchester, Reino Unido), equipado con una fuente de ionización por electrospray (25).

Los espectros se recopilan hasta alcanzar una relación señal/ruido satisfactorio. En el caso de MS/MS, se consideran solo los picos de carga doble o superior en el rango de masas de 400 a 1600 m/z. Se seleccionan los iones con una intensidad de detección superior a 10 cuentas por segundo para generar espectros de iones mediante disociación inducida por colisión (CID) (26).

Los productos de autólisis de tripsina y los iones precursores derivados de queratina se excluyen automáticamente. Se seleccionan tres iones MS/MS para cada escaneo de encuesta. Los datos para extraer la información de picos, utilizados para crear la lista de picos MS/MS, provienen de un espectro combinado (26).

Los archivos "pk1 list" generados por el software de ProteinLynx 2.2.5 (Waters) incluyen los valores de masa, intensidad y carga de los iones precursores (con carga +2 o +3 en este estudio). Estos archivos se analizan con el motor de búsqueda MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) contra la base de datos de proteínas SWISS-PROT. Las proteínas se identifican basándose en dos o más péptidos cuya puntuación de iones

supera el umbral de $p < 0,05$, indicando un nivel de confianza del 95% para los péptidos coincidentes (27).

1.1.5. Análisis estadístico

Cada muestra se procesa en dos repeticiones utilizando geles 2D y espectrometría de masas ESI-Q-TOF-MS/MS en tiempo real. Los resultados obtenidos en los análisis individuales mostraron una buena correlación entre ellos, sin desviaciones inesperadas. La comparación de los resultados se realizó mediante la prueba t de Student no apareada, con una significancia establecida en $p < 0,05$. Los cálculos se llevaron a cabo utilizando el software SPSS versión 11.5 (28).

1.2. Instrumentos

1.2.1 Instrumentos documentales

a) Especificación

- Uso de protocolos establecidos para cultivo celular

1.2.2 Instrumentos mecánicos

- Estufa
- Baño María
- Mini Centrífuga
- Bortex
- Sonicador

1.3. Materiales

- Base de dato como Scopus, Scielo, Pubmed, Science Direct
- Pymol, Dna Star, BLAST, UniProtKB/Swiss-Prot

2. CAMPO DE VERIFICACIÓN

2.1. Ubicación Espacial

La investigación se realizó en el Laboratorio de Química de Proteínas (LAQUIP) de la Universidad Católica de Santa María, institución ubicada en Yanahuara, Arequipa-Perú.

2.2. Ubicación Temporal

Esta investigación se realizó entre el mes de julio del año 2024 y abril del año 2025, fue una investigación de corte transversal, por lo tanto, las variables se estudiaron en un solo periodo de tiempo.

2.3. Población/muestra

En la presente investigación se estudió 2 muestras de tejido en la proliferación celular de cultivo primario de carcinoma oral de células escamosas.

- **Población A:** 1 muestra de cultivo celular de la línea SCC-4 correspondiente a carcinoma oral.
- **Población B:** 1 muestra de cultivo celular de tejido primario de células escamosas sanas.
- **Técnica de muestreo probabilístico:** Muestreo aleatorio simple.

2.4. Unidades de Estudio

2.4.1 Criterios de inclusión

- Cultivo celular de células escamosas saludables.

2.4.2 Criterios de exclusión

- Células escamosas de la cavidad oral con posibles sospechas de carcinoma oral.

2.5. Consideraciones éticas

El presente trabajo tiene como objetivo analizar la proliferación celular de cultivo celular de la línea SCC-4 de carcinoma oral y analizar a través de una plataforma proteómica, a fin de conocer las proteínas expresadas. Esta plataforma tecnológica se ha utilizado para descubrir marcadores proteicos altamente sensibles y específicos para el diagnóstico y pronóstico del cáncer oral comparando los perfiles proteicos de las células cancerosas.

3. ESTRATEGIA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

3.1. Organización de la información

Antes de iniciar el estudio será necesario:

- Autorización del coordinador principal del Laboratorio de Proteínas del Vicerrectorado de Investigación de la UCSM (Anexo 1).
- Coordinación con los encargados del laboratorio específico.

3.2. Recursos

- **Físicos:** Ambiente físico del Laboratorio de Química y Proteínas de la UCSM.
- **Humanos:** El equipo de investigación se compone de:
 - **Estudiante:** Montoya Rodriguez, Sebastian Rodrigo
 - **Asesor:** Dr. Obando Pereda, Gustavo Alberto.
- **Económicos:** Se obtendrán las unidades de estudio (experimentación), a través de muestra obtenida de una clínica local. Los recursos económicos son propios del investigador para el uso del laboratorio.

3.3. Validación del Instrumento

Debido al tamaño de la población y muestra no se realizó prueba piloto.

4. ESTRATEGIA PARA MANEJAR LOS RESULTADOS

4.1. Plan de procesamiento

4.1.1. Tipo de procesamiento

Se empleó un procesamiento computarizado utilizando programas como Mascot y Pattern lab como base de datos para el análisis de secuencia.

4.1.2. Operaciones del procesamiento

- **Clasificación:** La información obtenida de los instrumentos aplicados fueron ordenados en una matriz de sistematización
- **Codificación:** Para el procesamiento computarizado fue necesario haber realizado el análisis de proteómica de las muestras

- **Conteo:** Se utilizó matrices de recuento
- **Tabulación:** No se elaboró
- **Graficación:** No se elaboró

4.2. Plan de análisis de los datos

Variable investigativa	Tipo de variable	Escala por escala de medición	Estadística Descriptiva (Medidas de tendencia central y de dispersión)	Estadística
Nivel de expresión proteómica en cultivo celular de la línea SCC-4 de carcinoma oral	Cuantitativo	De razón	Ninguna	Ninguna
Nivel de expresión proteómica en la proliferación celular de cultivo primario de oral de células escamosas saludables.				



1. Electroforesis bidimensional 2D de cultivo celular de células escamosas de epiteliales de la cavidad oral. Mapa de referencia (Control).

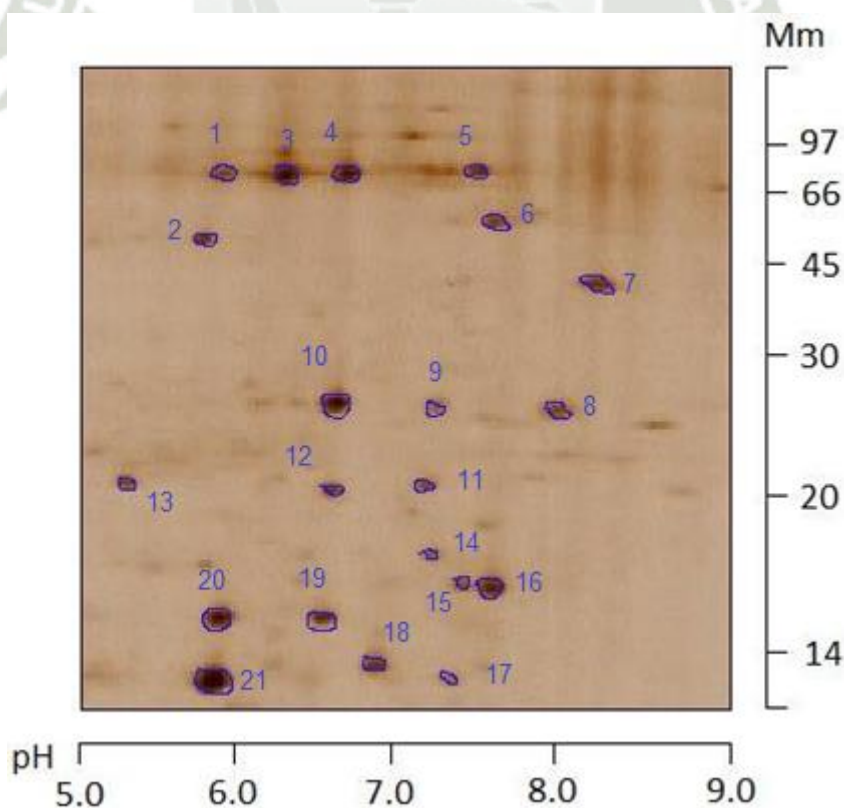
El gel bidimensional (2D) de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de la figura 1 muestra el extracto de proteínas expresadas de cultivo celular de células escamosas de la cavidad oral y analizadas bajo su punto isoeléctrico y masa molecular con ayuda de software PD Quest Basic versión 8.0.1 (Bio Rad Ca. USA), coloreado con plata.

No fueron identificados a través de sus secuencias, este procedimiento se reservó para las proteínas procedentes del cultivo celular SCC-4.

La figura 1 correspondiente a la muestra control de cultivo celular de células escamosas de la cavidad oral, muestra 21 “spots”, siendo los rangos de masas en torno a los 14 a 66 kDa y pI entre 5.0 y 9.0

Figura 3.

Electroforesis bidimensional (2D) del extracto de proteínas expresadas de cultivo celular de células escamosas de la cavidad oral.



Los “spots” identificados se mantuvieron en los rangos de 5.0 a 9.0 de pI y masas en torno de 14 a 97 kDa respectivamente.

Figura 4.

Imagen tridimensional del gel de electroforesis bidimensional del mapa de referencia del cultivo celular de células epiteliales escamosas de la cavidad oral

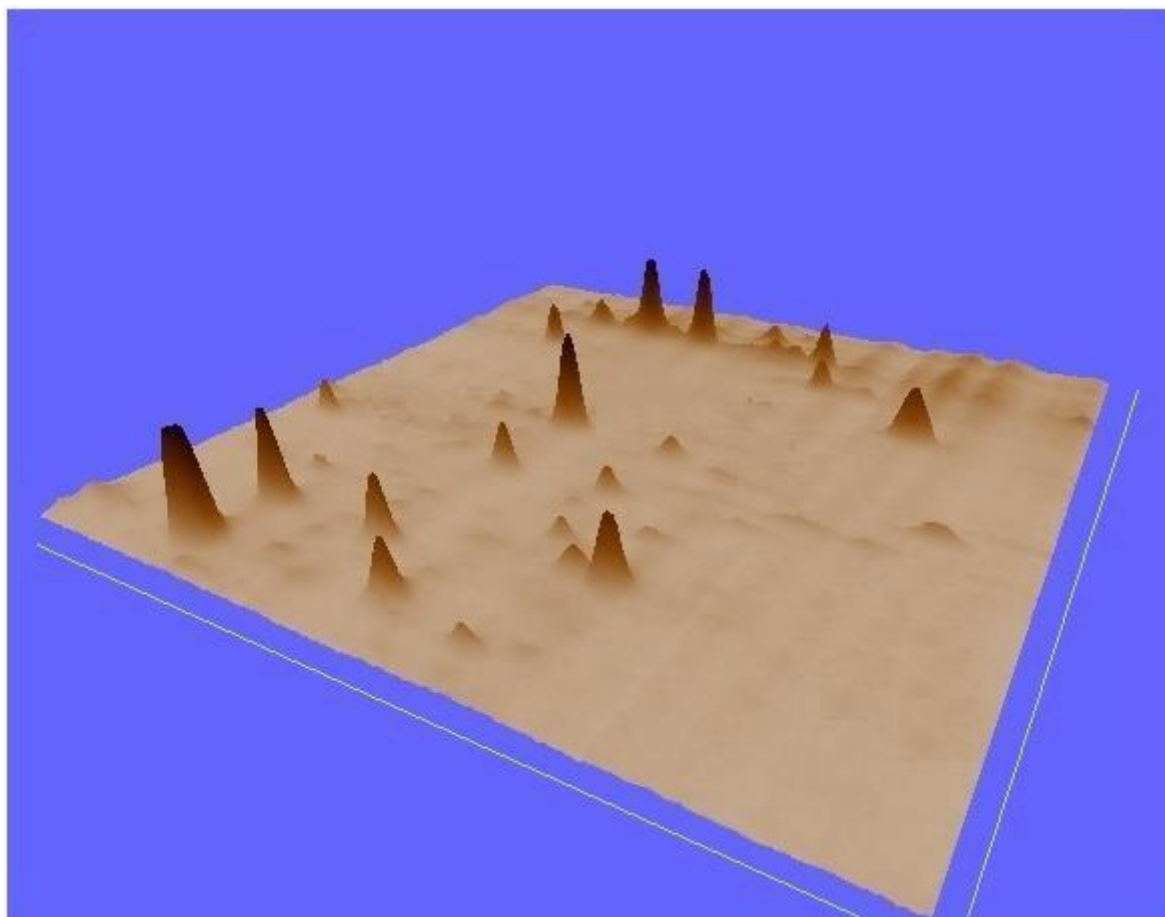


Imagen obtenida con el software PD Quest Basic versión 8.0.1 (Bio Rad Ca. USA), coloreado con plata.

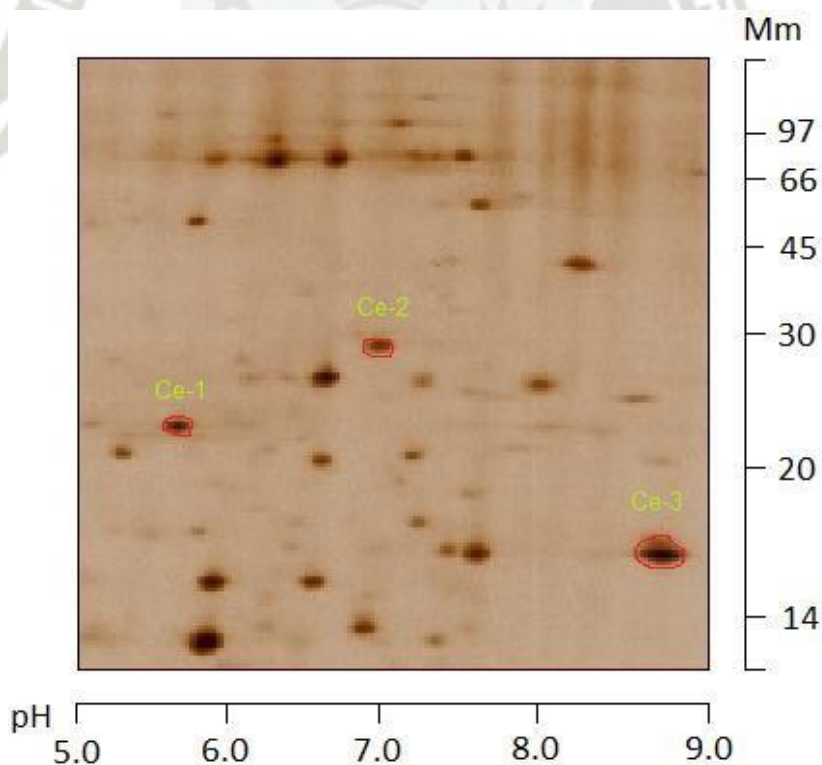
2. Electroforesis bidimensional 2D de cultivo celular de la línea celular SCC-4 de carcinoma oral. Estudio (carcinoma).

El gel bidimensional (2D) de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de la figura 2 muestra el extracto de proteínas expresadas de cultivo celular de células escamosas de la línea celular SCC-4 de carcinoma oral y analizadas bajo su punto isoeléctrico y masa molecular con ayuda de software PD Quest Basic versión 8.0.1 (Bio Rad Ca. USA), coloreado con plata.

El software PD Quest Basic versión 8.0.1 (Bio Rad Ca. USA), reporta, cuando realizado los estudios de sobre posición de los geles bidimensionales 2D entre el control y el estudio (carcinoma), la evidencia claramente de la presencia de 3 proteínas denominadas como Ce-1, Ce-2 y Ce-3 respectivamente.

Figura 5.

Electroforesis bidimensional (2D) del extracto de proteínas expresadas de cultivo celular de células escamosas de la línea celular SCC-4 de carcinoma oral.



Los “spots” identificados se mantuvieron en los rangos de 5.0 a 9.0 de pI y masas en torno de 14 a 97 kDa respectivamente.

Figura 6.

Imagen tridimensional del gel de electroforesis bidimensional (2D) del extracto de proteínas expresadas de cultivo celular de células escamosas de la línea celular SCC-4 de carcinoma oral

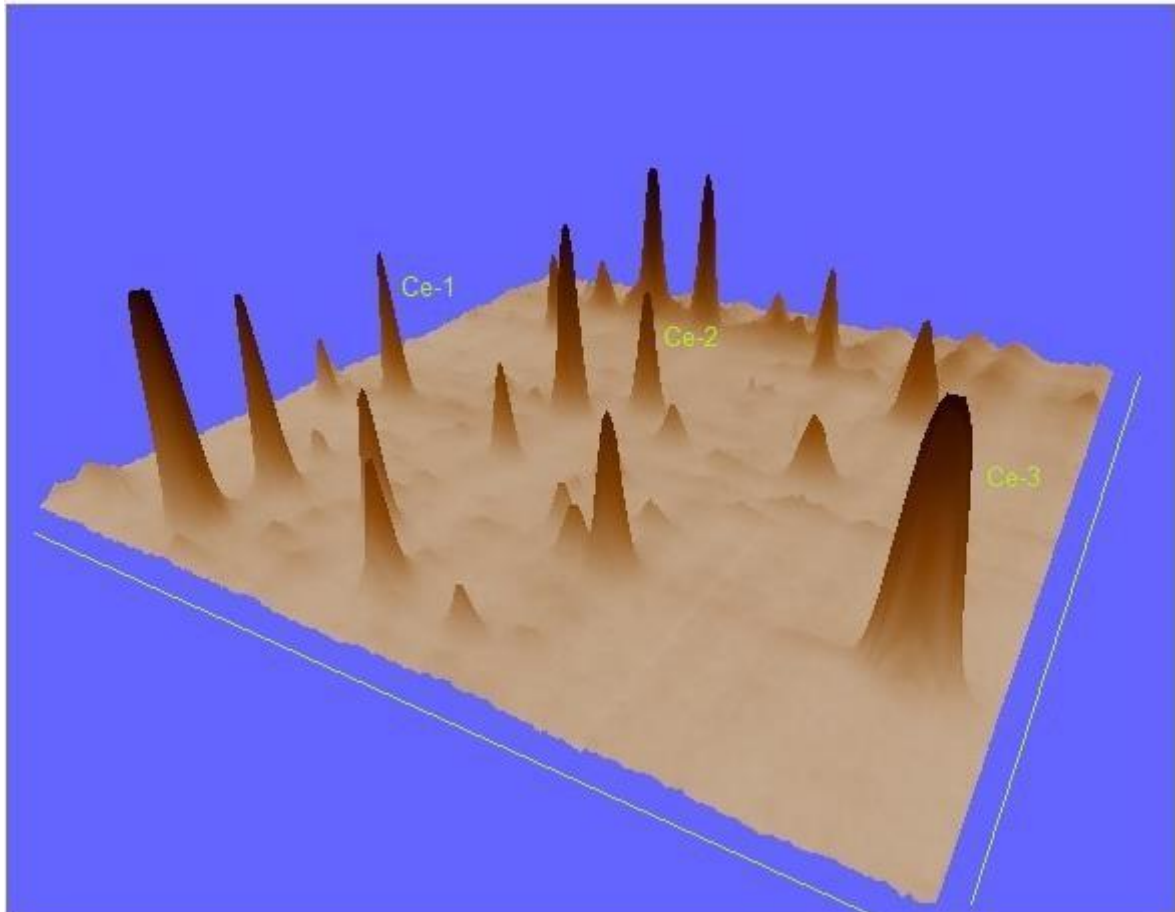


Imagen obtenida con el software PD Quest Basic versión 8.0.1 (Bio Rad Ca. USA), coloreado con plata. Fueron identificadas como Ce-1, Ce-2 y Ce-3 respectivamente.

3. Caracterización estructural de los spots estudiados Ce-1, Ce-2 y Ce-3 procedentes de cultivo celular de células escamosas de la línea celular SCC-4 de carcinoma oral.

Los spots en estudio fueron digeridos por separado con tripsina bovina y los péptidos tripticos obtenidos, fueron separados en cromatografía líquida de interacción hidrofóbica con una columna HiTrap.

Fueron obtenidos 12 picos proteicos, (datos no mostrados), de los cuales fueron escogidos al azar y por ser los más extensos, 3 picos identificados como Ce-1, Ce-2 y Ce-3 respectivamente, los cuales fueron colectados manualmente y liofilizados.

Posteriormente el secuenciamiento de cada péptido fue realizado por espectrometría de masas en tándem ESI-Q-TOF/MS/MS. Los datos obtenidos fueron procesados usando el software Mascot MS/MS Ion Search (www.matrixscience.com). La tabla 1 muestra las masas y la secuencia deducida de cada una de los péptidos obtenidos por clivaje triptico.

Tabla 1.

Péptidos identificados por mass spectrometry ESI-Q-TOF_MS/MS y Analizados por el Software DNA Star. Ver. 6.0.

N	SPOT	ACCESSION	Secuencia del Péptido	Mm	pI
1	Ce-1	NP_002263.3	... QLDTLGNDKGRLQSELKTMQDSVEDF KTKYEEEINK...	4230.63	4.48
2	Ce-2	NP_00109827 0.1	... SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDKSENV QDLLLLDVTPLSLGIETAGGVMTVLIK ...	5481.28	3.68
3	Ce-3	NP_005132.2	... KGGTSEMYLIQPDSSVKPYRVYCDMN TENGGWTVIQNRQDGSVDFGRK ...	5557.13	4.92

Los residuos de Lisina (K) y Arginina (R) fueron deducidos del clivaje por la tripsina.

No fueron discriminados los residuos de Leucina (L) e Isoleucina (I) en ninguna de las secuencias reportadas, pues no son distinguibles en el espectro CID (Disociación Inducida por Colisión) de baja energía. Debido a la calibración externa aplicada a todos los espectros, no fue

posible resolver la diferencia 0,036 Da entre los residuos de Glutamina (Q) y Lisina (K) excepto para las lisinas que fueron deducidas en base al clivaje de la tripsina (Tripsina cliva en el extremo carboxiterminal de la Lisina o Arginina).

Cada péptido secuenciado, fue sometido a la base de datos del NCBI usando el programa BLAST-p protein search en la base de datos *UniProtKB/Swiss-Prot* como una búsqueda específica de proteínas básicas a través del motor de búsqueda complementario Mascot (Tabla 2), las mismas que fueron identificadas como pertenecientes a la familia de proteínas Keratin, type II cytoskeletal 4, Heat shock cognate 71 kDa protein, Fibrinogen beta chain isoform 1 preproprotein

Tabla 2.

Identificación de los spots, después de analizar por espectrometría de masas ESI-QTOF MS/MS. En la base de datos *UniProtKB/Swiss-Prot*.

	Spot	Molécula	Organismo	ACCESION
1	Ce-1	Keratin, type II cytoskeletal 4	<i>Homo Sapiens</i>	NP_002263.3
2	Ce-2	Heat shock cognate 71 kDa protein	<i>Oryzias latipes</i>	NP_001098270.1
3	Ce-3	Fibrinogen beta chain isoform 1 preproprotein	<i>Homo Sapiens</i>	NP_005132.2

4. Estudio de homología secuencial por espectrometría de masas ESI-Q-TOF-MS/MS de los péptidos Ce-1, Ce-2 y Ce-3 procedentes de cultivo celular de células escamosas de la línea celular SCC-4 de carcinoma oral.

La homología secuencial de los péptidos determinados por espectrometría de masa en ESI-Q-TOF-MS/MS, Ce-1, Ce-2 y Ce-3 procedentes de cultivo celular de células escamosas de la línea celular SCC-4 de carcinoma oral, muestran similitud con otras secuencias.

Las secuencias de los demás péptidos indican y es parte de regiones altamente conservadas como variables de las proteínas estudiadas. Las figuras 5, 6 y 7 muestra la homología secuencial de Ce-1 (Query_9599270), Ce-2 (Query 6455765) y Ce-3 (Query 69656150) con otras proteínas correspondientes a la familia de proteínas de cada péptido consultado en el BLAST.

Para la homología secuencial de Ce-1 se muestra una gran similitud con otra secuencia, según el BLAST, como se muestra en la figura 5. La secuencia consenso ...QLDTLGNDKG RLQSELKTMQ DSVEDFKTKY EEEINK... es parte de una región altamente conservada (secuencia en rojo).

Figura 7.

Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida obtenido por digestión trípica, del spot Ce-1 (Query_9599270), con otras proteínas de la familia P19013.5 (Keratin, type II cytoskeletal 4), P07744.2 (Keratin, type II cytoskeletal 4), Q6IG00.1 (Keratin, type II cytoskeletal 4)

<input checked="" type="checkbox"/>	Query_9599270	1	-----QLDTLGNDKGRQLQSELKTMQDSVEDFKTKYEEEEI	34
<input checked="" type="checkbox"/>	P19013.5	152	IDKVQFLEQQNKVLETKWNLLQQQTTTTSSKNLEPLFFETYLSVLRKQLDTLGNDKGRQLQSELKTMQDSVEDFKTKYEEEEI	231
<input checked="" type="checkbox"/>	P07744.2	161	IDKVRFLQKQNKVLETKWNLLQQQTTTTSPKSLDPFFETYINALRKNLDTLSNDKGRQLQSELKMMQDSVEDFKTKYEEEEI	240
<input checked="" type="checkbox"/>	Q6IG00.1	161	IDKVRFLQKQNKVLETKWNLLQQQTTTTSPRNLDPFFETYINALRKNLDTLSNDKGRQLQSELKLMQDSVEDFKTKYEEEEI	240
<input checked="" type="checkbox"/>	Query_9599270	35	NK-----	36
<input checked="" type="checkbox"/>	P19013.5	232	NKRTAAENDFVVLKKDVAAYLNKVELEAKVDSLNDENFLKVLVDAELSQMTHVSDTSVVLSDMNNRNLDLDSIIAEV	311
<input checked="" type="checkbox"/>	P07744.2	241	NKRTAAENDFVVLKKDVAAYMIKVELEAKMESLKDEINFRVLYEAEALQMQTHVSDTSVVLSDMNNRNLDLGIIAEV	320
<input checked="" type="checkbox"/>	Q6IG00.1	241	NKRTAAENDFVVLKKDVAAYMIKVELEAKMESLKDEINFRVLYEAEALQMQTHVSDTSVVLSDMNNRNLDLGIIAEV	320

Para la homología secuencial de Ce-2 se muestra una gran similitud con otra secuencia, según el BLAST, como se muestra en la figura 6. La secuencia consenso SINTPEAVAY GAAVQAAILS GDKSENVQDL LLLDVTPLSL GIETAGGVMV VLIK..... es parte de una región altamente conservada (secuencia en rojo).

Figura 8.

Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida obtenido por digestión tróptica, del spot Ce-2 (Query_6455765), con otras proteínas de la familia Q9W6Y1.1 (Heat shock cognate 71 kDa protein), Q5NVM9.2 (Heat shock cognate 71 kDa protein), P63017.1 (Heat shock cognate 71 kDa protein)

<input checked="" type="checkbox"/>	Query_6455765	1	-----SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDKSENVQDLLLLDVTPLS	39
<input checked="" type="checkbox"/>	Q9W6Y1.1	321	LRDAKMDKGQIHDIVLVGGSTRIPKIQKLLQDFNFKELNKSINPDEAVAYGAAVQAAILSGDKSENVQDLLLLDVTPLS	400
<input checked="" type="checkbox"/>	Q5NVM9.2	321	LRDAKLDKSQIHDIVLVGGSTRIPKIQKLLQDFNFKELNKSINPDEAVAYGAAVQAAILSGDKSENVQDLLLLDVTPLS	400
<input checked="" type="checkbox"/>	P63017.1	321	LRDAKLDKSQIHDIVLVGGSTRIPKIQKLLQDFNFKELNKSINPDEAVAYGAAVQAAILSGDKSENVQDLLLLDVTPLS	400
<input checked="" type="checkbox"/>	Query_6455765	40	LG IETAGGVMTVL I K-----	54
<input checked="" type="checkbox"/>	Q9W6Y1.1	401	LG IETAGGVMTVL I KRNTT I PTKQTQTF T T YSDNQPGVLNQVYE - VGAMTKDNLLGKFELTGIPPA - LWCPQIEVTFDI	478
<input checked="" type="checkbox"/>	Q5NVM9.2	401	LG IETAGGVMTVL I KRNTT I PTKQTQTF T T YSDNQPGVLIQVYEGERAMTKDNLLGKFELTGIPPAPRGVPPQIEVTFDI	480
<input checked="" type="checkbox"/>	P63017.1	401	LG IETAGGVMTVL I KRNTT I PTKQTQTF T T YSDNQPGVLIQVYEGERAMTKDNLLGKFELTGIPPAPRGVPPQIEVTFDI	480

Para la homología secuencial de Ce-3 se muestra una gran similitud con otra secuencia, según el BLAST, como se muestra en la figura 7. La secuencia consenso ...KGGETSEMYL IQPDSSVKPY R V Y C D M N T E N G G W T V I Q N R Q D G S V D F G R K... es parte de una región altamente conservada (secuencia en rojo).

Figura 9.

Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida obtenido por digestión tróptica, del spot Ce-3 (Query_6965150), con otras proteínas de la familia P02675.2 (Fibrinogen beta chain), Q8K0E8.1 (Fibrinogen beta chain), P14480.4 (Fibrinogen beta chain)

<input checked="" type="checkbox"/>	Query_6965150	1	KGGETSEMYLIQPDSSVKPYRVYCDMNTENGGWTVIQNRQDGSVDFGRK-----	49
<input checked="" type="checkbox"/>	P02675.2	247	KGGETSEMYLIQPDSSVKPYRVYCDMNTENGGWTVIQNRQDGSVDFGRKWDYPYKQGFGNVATNTDGKNYCGLPGEYWLGN	326
<input checked="" type="checkbox"/>	Q8K0E8.1	237	KGGETSEMYLIQPDTSIKPYRVYCDMKTENGGWTVIQNRQDGSVDFGRKWDYPYKKGFGNIATNEDAKKYCGLPGEYWLGN	316
<input checked="" type="checkbox"/>	P14480.4	235	KGGETSEMYLIQPDTSKPYRVYCDMKTENGGWTVIQNRQDGSVDFGRKWDYPYKKGFGNIATNEDTKKYCGLPGEYWLGN	314

5. Caracterización de Proteínas en Formato Fasta

Tabla 3.

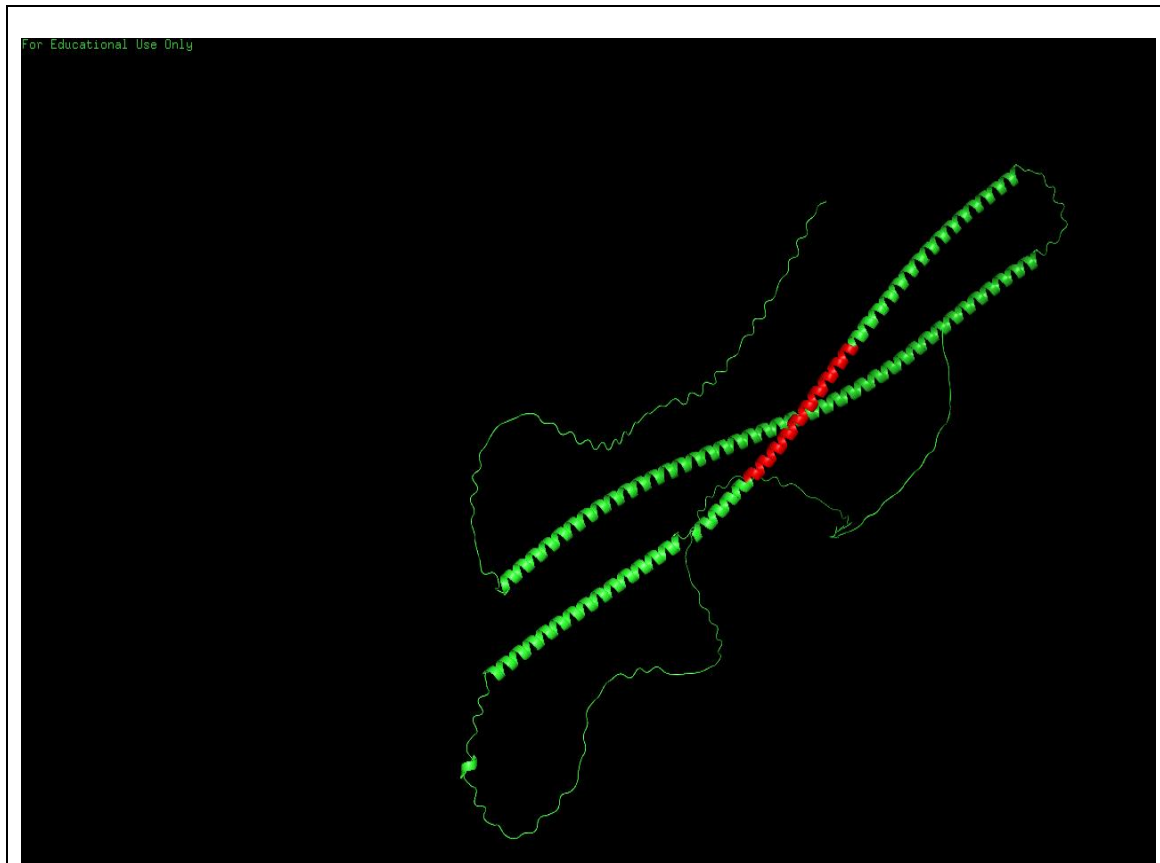
Análisis de secuencias en base de datos NCBI usando el programa BLAST-P Protein search, para los péptidos Ce-1, Ce-2 y Ce-3, obtenidos de cultivo celular de células escamosas de la línea celular SCC-4 de carcinoma oral.

Lista de proteínas es formato FASTA
NP_002263.3 (Ce-1)
>sp P19013.5 K2C4_HUMAN RecName: Full=Keratin, type II cytoskeletal 4; AltName: Full=Cytokeratin-4; Short=CK-4; AltName: Full=Keratin-4; Short=K4; AltName: Full=Type-II keratin Kb4 MIARQQCVRGGPRGFSCGSAIVGGGKRGAFSSVSMSSGGAGRCSSGGFGSRSLYNLRGNKSI SMSVAGSRQGACFGGAGGFGTGGFGGGFGGSFSGKGGPGFPVCPAGGIQEVNTINQSLTPL HVEIDPEIQKVRTEEREQIKLLNKFASFIDKVFLEQQNKVLETKWNLLQQQTSTSSKNL EPLFETYLSVLRKQLDTLGNKGRQLQSELKTMQDSVEDFKTKYEEEINKRTAAENDFVVLK KDVDAAAYLNKVELEAKVDSLNDINFLKVLDAELSQMQTHVSDTSVVLSDMNNRNLDL DSIIAEVRAQYEEIAQRSKAEAEALYQTKVQQLQISVDQHGDNLKNTKSEIAELNRMIQRLR AEIENIKKQCQTLQVSVADAEQRGENALKDAHSKRVELEAALQQAKEELARMLREYQEL MSVKLALDIEIATYRKLLEGEEYRMSGECQSAVSISVVS GSTSTGGISGGLGSGSGFGLSSGF GSGSGSGFGFGGSVSGSSSSKIISTTTLNKRR
NP_001098270.1 (Ce-2)
>sp Q9W6Y1.1 HSP7C_ORYLA RecName: Full=Heat shock cognate 71 kDa protein; AltName: Full=Hsc70.1 MSKGPVAVGIDLGTTYSCVGVFQHGKVEIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVA MNPTNTVFDKRLIGRRFDDHVQSDMNDWPFNVINDNTRPKVQVEYKGETKSFYPEEVS SMVLTKMKEIAEAYLGKTVNNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTISGLNVLRIINEPTAAAI AYGLDKKVGSESNVLIFFDLGGGTFDVSILTIEDGIFEVVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNHFA EFKRKYKDISDNKRAVRLRSACERAKRTLSSSTQASIEIDSLYEGVDFYTSITRARFEELN ADLFRGTLDPVEKSLRDAKMDKGGIHDIVLVGGSTRIPKIQKLLQDFNKGELNKSINPDEA VAYGAAVQAAILSGDKSENVQDLLLDVTPLSLGIETAGGVMTVLIKRNTTIPTKQTQFTT YSDNQPGVLNQQVYEVGAMTKDNNLLGKFELTGIPPALWCPQIEVTFDIDANGIMNVSAVD KSTGKENKITITNDKGRLSKEDIERMVQEAKEYKAEDDVQRDKVSAKNGLESYAFNMKST VEDEKLAGKISDEDKQKILDKCNEVISWLDKNQTAERDEYVHQQKELEKVCNPIITKLYQS AGGMPGGCQRECQEVSELELVLLAVALLDQPLKLIKHSMTSPSKIFTKKTFLKCNMQSIK SVMRLNQFPFITIT
NP_005132.2 (Ce-3)
>sp P02675.2 FIBB_HUMAN RecName: Full=Fibrinogen beta chain; Contains: RecName: Full=Fibrinopeptide B; Contains: RecName: Full=Fibrinogen beta chain; Flags: Precursor MKRMVSWSFHKLKTMKHLNLLLCVFLVKSQGVNDNEEGFFSARGHRPLDKKREEAPSL RPAPPISGGGYRARPAAKAAATQKKVERKAPDAGGCLHADPDLGVLCPTGCQLQEALLQQ ERPIRNSVDELNNNVEAVSQTSSSSSFQMYLLKDLWQKRQKQVKNENNVNEYSSELEKH QLYIDETVNSNIPTNLRVLRILENLRSKIQKLESVSAQMEYCRTPCTVSCNIPVVSQKECE EIIRKGGGETSEMYLIQPDSSVKPYRVYCDMNTENGGWTVIQNRQDGSVDFGRKWDPYKQG FGNVATNTDGKNYCGLPGEYWLGNKISQLTRMGPTELLIEMEDWKGDVKAHYGGFTV QNEANKYQISVNKYRGTAGNALMDGASQLMGENRTMTIHNGMFFSTYDRDNDGWLTS PRKQCSKEDGGGWYNRCHAANPNGRYYWGGQYTWDMAKHGTDDGVVWMNWKGS WYSMRKMSMKIRPFFPQ

6. Modelado estructural y funciones de proteínas

Figura 10.

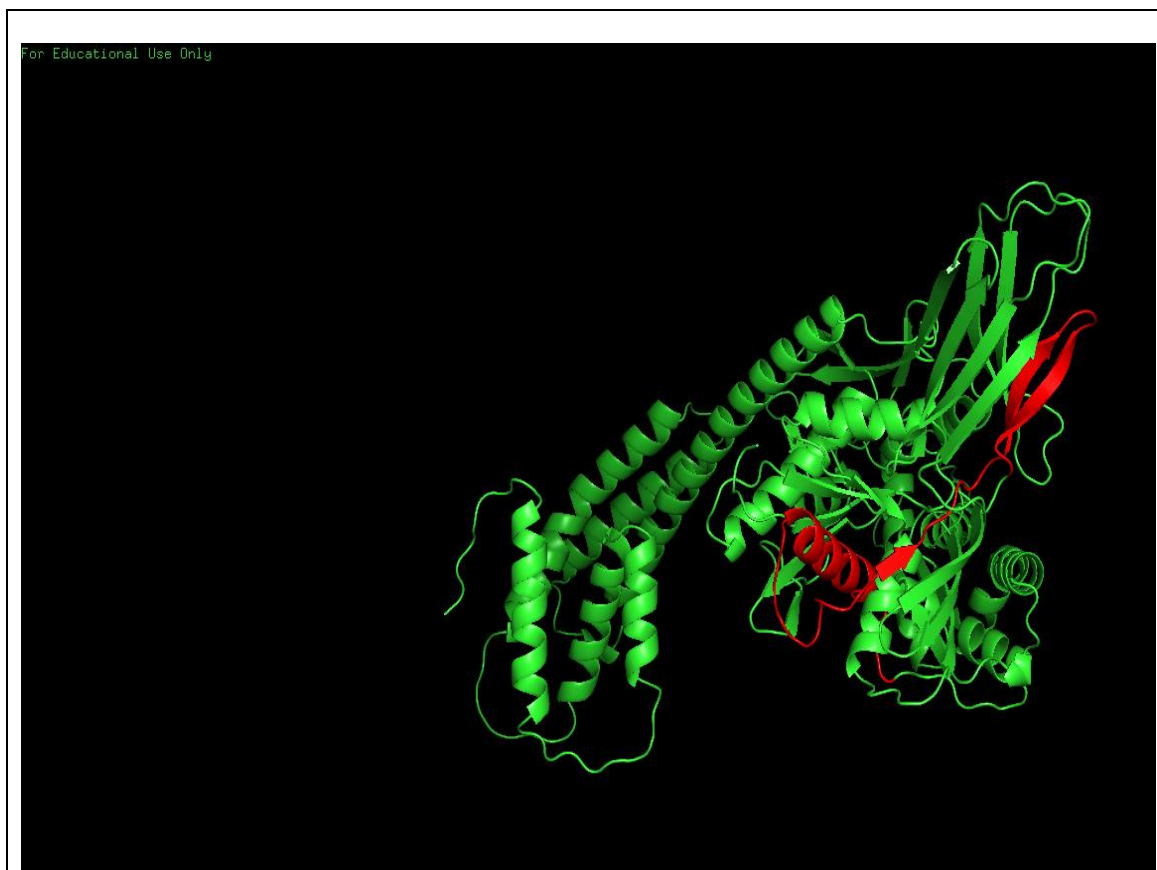
(Ce-1) Keratin, type II cytoskeletal 4



La queratina 4 (KRT4), perteneciente al tipo II del citoesqueleto, se expresa típicamente en epitelios no queratinizados como el de la mucosa oral sana. No obstante, en casos de carcinoma oral de células escamosas (COCE), su presencia tiende a reducirse o a modificarse, lo cual puede estar relacionado con procesos de malignización que impulsan un comportamiento celular más invasivo y menos diferenciado.

Figura 11.

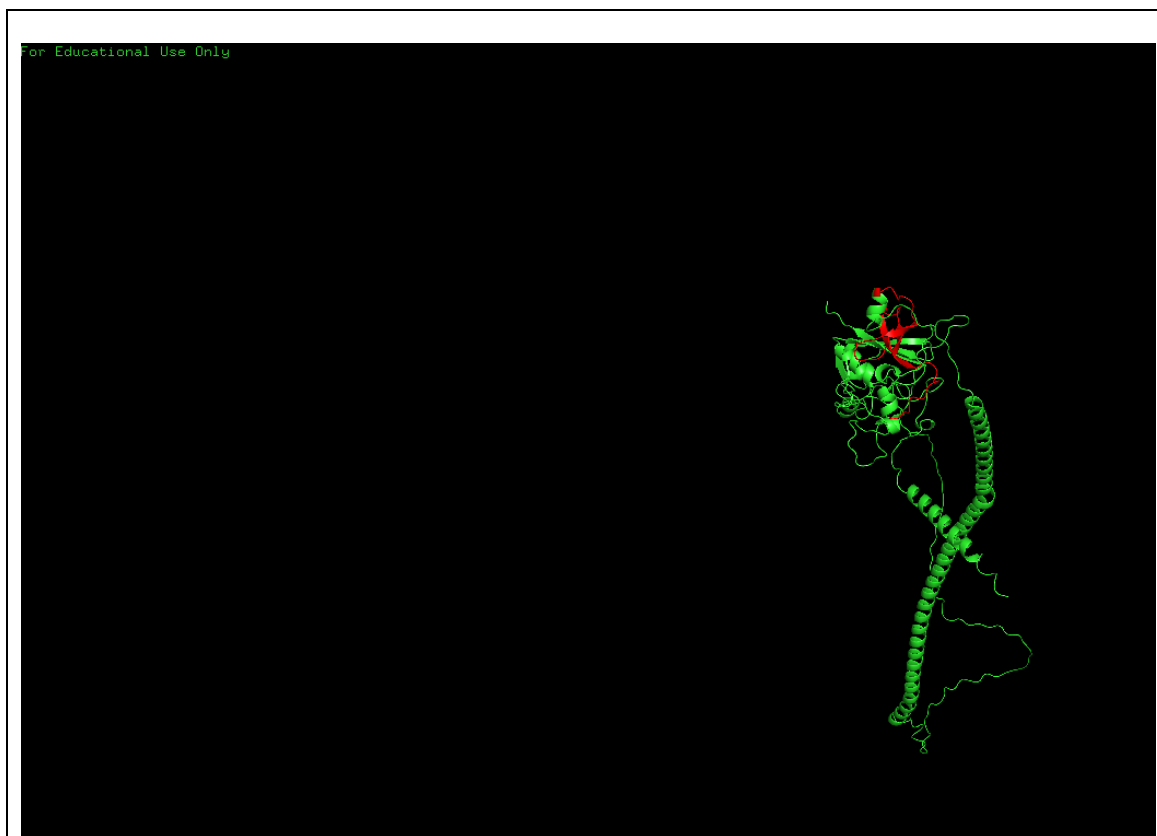
(Ce-2) Heat shock cognate 71 kDa protein



En el carcinoma oral de células escamosas, la proteína HSC70 desempeña un papel clave en la respuesta celular al estrés. Su expresión elevada se ha vinculado con una mayor supervivencia de las células tumorales, gracias a su capacidad para inhibir procesos apoptóticos y sostener la proliferación celular. Asimismo, contribuye al transporte y estabilización de proteínas mal conformadas, lo cual puede favorecer el crecimiento tumoral y su capacidad de diseminación. Estas características la posicionan como un potencial indicador de progresión y agresividad en este tipo de cáncer.

Figura 12.

(Ce-3) Fibrinogen beta chain isoform 1 preproprotein



La subunidad beta del fibrinógeno (FGB) no solo participa en los procesos de coagulación, sino que también se ha vinculado con mecanismos pro-tumorales en el carcinoma oral de células escamosas. Niveles elevados de esta proteína pueden facilitar la migración y adhesión de células neoplásicas, así como la modificación del microambiente tumoral, lo que favorece tanto el desarrollo del tumor como la formación de nuevos vasos sanguíneos. Por ello, FGB podría desempeñar un papel clave en la evolución de esta enfermedad.

7. Crecimiento y desarrollo de células queratinozas de carcinoma oral de las líneas SCC-4 y SCC-9 en función del tiempo.

Los estudios de viabilidad celular de células de carcinoma oral de las líneas SCC-4 y SCC-9 siguieron los protocolos de los Ensayo de viabilidad celular (actividad metabólica) por reducción del compuesto MTT. No fue observado una disminución en la viabilidad celular de estudio, para el caso de ambos linajes.

Se observa un patrón de crecimiento y desarrollo celular esperado, de acuerdo a la figura 1, en el recuento celular a través de microscopia óptica a 100X en rangos de tiempo de: 0, 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48 y 72 respectivamente, para el caso de la línea SCC-4.

El recuento promedio se llevó a cabo a las 24 horas del crecimiento, marcando este desarrollo como la línea base para la expresión de proteínas para el presente estudio.

La Figura 11A, muestra la escala de tiempo para el desarrollo normal y la escala de tiempo para destacar el desarrollo de crecimiento y desarrollo probable para la expresión de proteínas que nos muestre los posibles marcadores moleculares iniciales de expresión para el caso de los modelos de estudio de células de carcinoma oral en cultivo de las líneas SCC-4 y SCC-9.

Figura 13.

Curvas de desarrollo de células de cáncer oral de la línea SCC-4. Cada valor del gráfico lineal muestra claramente el desarrollo significativo de la viabilidad al aumentar el desarrollo en el crecimiento celular. Los datos se representan como la media \pm DE de tres experimentos independientes. En círculo rojo el conteo en destaque para el crecimiento celular.

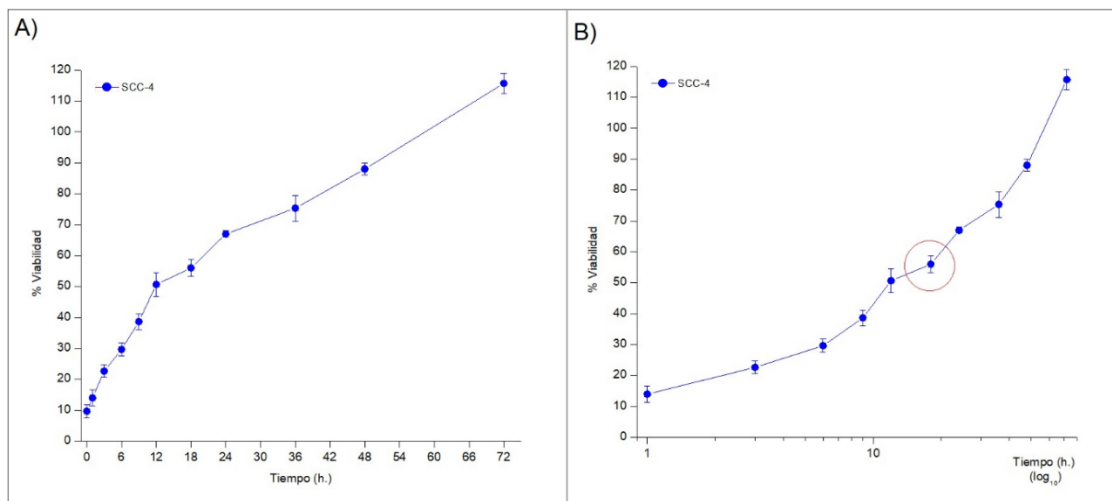


Figura 14.

Curvas de desarrollo de células de cáncer oral de la línea SCC-9. Cada valor del gráfico lineal muestra claramente el desarrollo significativo de la viabilidad al aumentar el desarrollo en el crecimiento celular. Los datos se representan como la media \pm DE de tres experimentos independientes. En círculo azul, el conteo en destaque para el crecimiento celular.

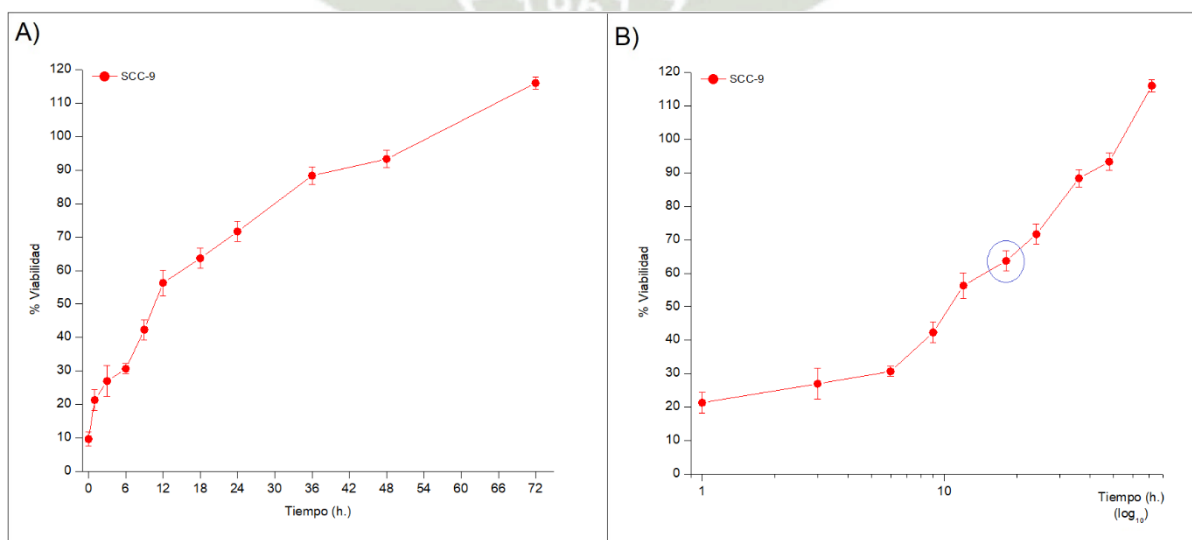
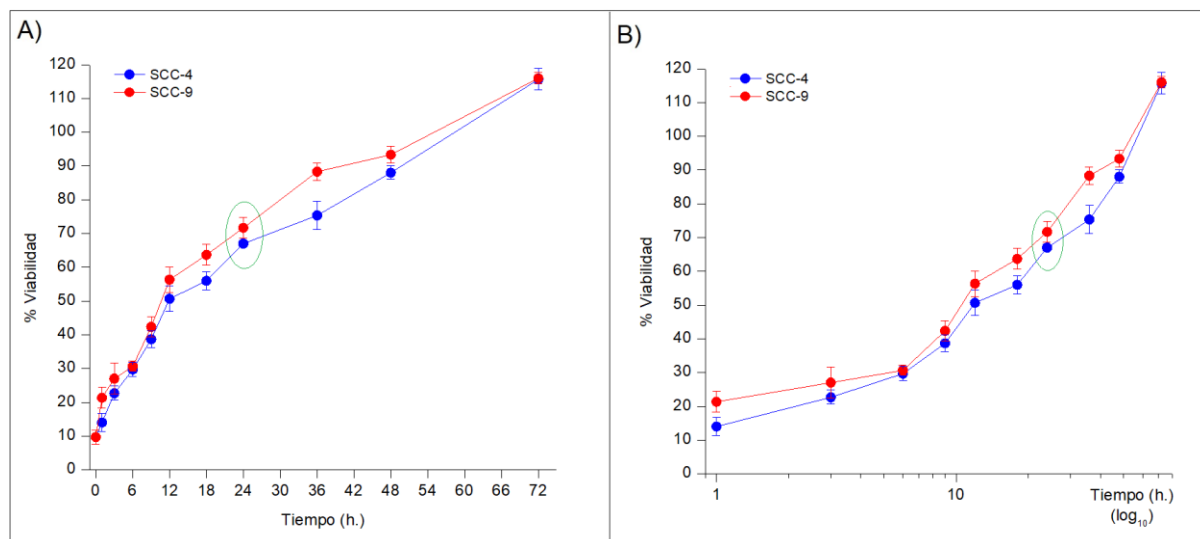


Figura 15.

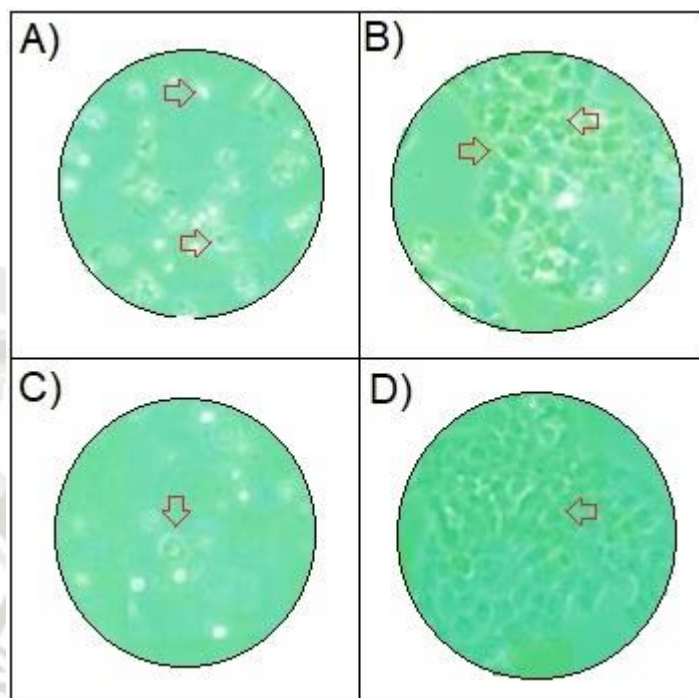
Curvas de desarrollo de células de cáncer oral de las líneas SCC-4 y SCC-9. Cada valor del gráfico lineal muestra claramente el desarrollo significativo de la viabilidad al aumentar el desarrollo en el crecimiento celular. Los datos se representan como la media \pm DE de tres experimentos independientes. En círculo verde, el conteo en destaque para el crecimiento celular.



Agrupadas ambas líneas celulares para estudiar su comportamiento en la cinética de crecimiento, se puede apreciar que siguen un comportamiento semejante, probablemente porque se traten de líneas celulares muy próximas, para el caso de SCC-4 y SCC-9, tal como se evidencia en la figura 13A y 12B.

Figura 16.

Micrográficas que muestran cambios morfológicos en células de las líneas de carcinoma oral



SCC-4 (Fig. 14A y 14B); SCC-9 (Fig. 14C y 14D) de 1 a 72 horas. Como indican las flechas, las células eran más pequeñas, no se desprendieron de las placas de cultivo, y no perdieron su forma original y mostraron un acúmulo de vesículas en la membrana a las 72 horas después del experimento, se hizo un estudio de 2 repeticiones con su respectivo SD \pm .

La observación microscópica reveló cambios morfológicos significativos en los linajes celulares SCC-4 y SCC-9, en su desarrollo y crecimiento, tal como puede mostrar en la figura 14. La proliferación del crecimiento es evidente al observar el acúmulo por campo microscópico.

Las figuras 14A y 14B corresponden a la línea celular SCC-4 y las figuras 14C y 14D corresponden a la línea celular SCC-9.

8. Cinética de crecimiento y desarrollo de las líneas de células de carcinoma oral cáncer escamosas de las líneas celulares SCC-4 y SCC-9.

Para ambas líneas celulares, SCC-4 y SCC-9, se tomó en cuenta para el estudio de expresión proteica con la intención de re-definir posibles marcadores moleculares, el tiempo a las 24 horas, como indicado en la Tabla 4.

Tabla 4.

Cinética de crecimiento y desarrollo de las líneas de células de carcinoma oral cáncer escamosas de las líneas celulares SCC-4 y SCC-9.

Tiempo (h)	Media de Crecimiento SCC-4	SD ± de 3 campos micros.	Media de Crecimiento SCC-9	SD ± de 3 campos micros.
0	9.66667	2.08167	9.66667	2.08167
1	14	2.64575	21.33333	3.05505
3	22.66667	2.08167	27	4.58258
6	29.66667	2.08167	30.66667	1.52753
9	38.66667	2.51661	42.33333	3.05505
12	50.66667	3.78594	56.33333	3.78594
18	56	2.64575	63.66667	3.05505
24	67	1	71.66667	3.05505
36	75.33333	4.16333	88.33333	2.51661
48	88	2	93.33333	2.51661
72	115.66667	3.21455	116	1.73205

DISCUSIÓN

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es el tipo más común de cáncer en la cavidad oral y se origina en el epitelio escamoso. Se caracteriza por su agresividad local y su capacidad de diseminarse a ganglios regionales, lo que afecta el pronóstico del paciente. Su desarrollo está asociado a factores como el tabaquismo, el alcohol y el VPH, pero también a alteraciones moleculares específicas. El COCE constituye la neoplasia maligna más común de la cavidad oral y representa un problema significativo de salud pública debido a su alta incidencia, morbilidad y mortalidad (35). A pesar de los avances en diagnóstico y tratamiento, la tasa de supervivencia a cinco años no ha mejorado de manera sustancial en las últimas décadas. Esto se debe, en parte, a la detección tardía y a la ausencia de biomarcadores moleculares específicos que permitan un diagnóstico precoz, una mejor estratificación del riesgo y una predicción más certera del pronóstico. En ese sentido, el análisis proteómico del COCE abre nuevas posibilidades para comprender mejor su biología y avanzar hacia estrategias terapéuticas más dirigidas (33).

En este estudio, se analiza el rol de ciertas proteínas diferencialmente expresadas, cuya participación podría estar relacionada con la progresión tumoral, aportando información valiosa para la identificación de posibles biomarcadores con utilidad diagnóstica o pronóstica en el COCE, se evaluó la participación de tres proteínas **Queratina tipo II citoesquelética 4 (KRT4)**, **Proteína de choque térmico cognada de 71 kDa (HSC70)** y **Cadena beta del fibrinógeno (FGB)**, en el contexto del carcinoma oral de células escamosas, con el objetivo de identificar posibles asociaciones entre su expresión y el comportamiento tumoral. Cada una de estas proteínas cumple funciones fisiológicas bien definidas en condiciones normales; sin embargo, su alteración en el contexto neoplásico puede contribuir al desarrollo y progresión del cáncer.

En condiciones fisiológicas, la proteína queratina tipo II citoesquelética 4 (KRT4), miembro de la familia de queratinas epiteliales, se encuentra predominantemente en epitelios no queratinizados, como la mucosa oral. Esta proteína desempeña un rol importante en la arquitectura y estabilidad del citoesqueleto epitelial, favoreciendo la cohesión celular y la integridad del tejido. Diversos estudios han demostrado que, en procesos de transformación maligna, las células epiteliales tienden a perder su expresión de KRT4, lo cual sugiere que esta proteína podría actuar como un marcador de diferenciación. En las muestras analizadas, se observó una disminución significativa en la expresión de KRT4 en tejido tumoral, en

comparación con tejido sano. Este hallazgo concuerda con investigaciones previas que evidencian que la pérdida de queratinas específicas es un fenómeno común durante la progresión tumoral. La desregulación de KRT4 podría estar relacionada con la pérdida de cohesión celular, la ruptura de la arquitectura tisular y el aumento de la capacidad de migración, todos ellos eventos que favorecen la invasión tumoral (36).

En el contexto del carcinoma oral de células escamosas (COCE), diversos estudios han demostrado una disminución significativa en la expresión de KRT4. Esta pérdida de expresión se ha asociado con procesos de dediferenciación celular, propios de la progresión tumoral, y puede reflejar una alteración en el fenotipo epitelial normal. Además, la reducción o ausencia de KRT4 suele ir acompañada de un cambio en el perfil de queratinas expresadas, favoreciendo aquellas relacionadas con estados más proliferativos y menos diferenciados. Por ello, KRT4 no solo representa un componente estructural clave en el epitelio sano, sino que también podría tener relevancia como biomarcador en el diagnóstico y estudio del comportamiento biológico del COCE, al indicar posibles cambios en la diferenciación celular durante la carcinogénesis (37).

En el contexto fisiológico, la Heat Shock Cognate 71 kDa Protein (HSC70), también conocida como HSPA8, actúa como una chaperona molecular esencial, participando en el correcto plegamiento de proteínas, el transporte intracelular y el reciclaje de proteínas mal conformadas. Su presencia es constante en las células, donde cumple un rol importante en el mantenimiento de la homeostasis celular. Sin embargo, en condiciones patológicas como el carcinoma oral de células escamosas, se ha evidenciado una elevación en la expresión de HSC70, lo que sugiere su participación activa en la progresión tumoral. Esta sobreexpresión puede favorecer la supervivencia de las células malignas, al ayudarlas a resistir condiciones de estrés del microambiente tumoral, como la hipoxia o la inflamación crónica. Además, se ha propuesto que HSC70 contribuye a la inhibición de la apoptosis, permitiendo que las células tumorales evadan mecanismos de muerte programada y mantengan su proliferación (38)

La participación de HSC70 también ha sido vinculada a procesos relacionados con la migración, invasión y metástasis, características clave en la agresividad del COCE. Por estas razones, esta proteína no solo representa un factor de interés biológico, sino que también ha sido considerada como un posible biomarcador diagnóstico o pronóstico, e incluso como un potencial blanco terapéutico en el tratamiento del carcinoma oral (39).

En condiciones fisiológicas, el fibrinógeno cumple un rol central en la coagulación sanguínea, participando en la formación de coágulos a través de su conversión en fibrina. Esta glicoproteína plasmática está compuesta por tres cadenas: alfa (α), beta (β) y gamma (γ). La cadena beta, codificada por el gen FGB, no solo interviene en procesos hemostáticos, sino que también ha sido implicada en diversos mecanismos asociados al desarrollo tumoral (40).

En el contexto del carcinoma oral de células escamosas, estudios recientes han señalado una elevación en la expresión de la cadena beta del fibrinógeno, lo que sugiere su participación activa en el microambiente tumoral. Esta proteína puede facilitar la migración e invasión celular mediante su interacción con receptores específicos como las integrinas, promoviendo así la diseminación del tumor hacia tejidos adyacentes. Asimismo, se ha observado que su sobreexpresión puede contribuir a procesos inflamatorios crónicos, favoreciendo condiciones que estimulan la angiogénesis y la supervivencia celular. Estas funciones no solo reflejan un papel estructural, sino también una participación funcional en la progresión del tumor, lo que convierte a esta cadena proteica en un potencial biomarcador de diagnóstico o pronóstico en pacientes con COCE (41).

En el desarrollo y progresión del carcinoma oral de células escamosas (COCE), diversas proteínas estructurales y funcionales participan activamente en la transformación maligna del epitelio oral. Entre ellas, las proteínas KRT4, HSC70 y la cadena beta del fibrinógeno han sido señaladas como elementos relevantes por su implicancia en procesos celulares fundamentales (42).

La queratina tipo II citoesquelética 4 (KRT4) es una proteína expresada normalmente en epitelios no queratinizados, como la mucosa oral. En casos de COCE, se ha observado una disminución o pérdida significativa de su expresión, lo cual indica una alteración en la diferenciación epitelial. Esta reducción sugiere una transición hacia un fenotipo menos diferenciado y más proliferativo, característica común en tejidos tumorales (43).

Por otro lado, la Heat Shock Cognate 71 kDa Protein (HSC70), una chaperona molecular de expresión constitutiva, muestra una sobreexpresión en tejidos tumorales orales, lo que contribuye a la supervivencia celular, el evitamento de la apoptosis y la adaptación al estrés celular. Su participación activa en estos mecanismos favorece la progresión tumoral y la agresividad del COCE (39).

Estas tres proteínas, por tanto, no solo presentan patrones de expresión diferentes en el COCE, sino que también actúan en niveles distintos del proceso carcinogénico: KRT4 refleja el grado de diferenciación celular, HSC70 interviene en la supervivencia celular frente al estrés, y FGB modula el entorno extracelular para favorecer el desarrollo tumoral. Esta diversidad funcional sugiere que el análisis conjunto de estas proteínas podría ofrecer un enfoque integral para comprender la progresión tumoral desde distintas dimensiones biológicas (24).

Además, el perfil diferencial de estas proteínas sugiere su potencial uso como biomarcadores, mientras que la pérdida de KRT4 podría indicar una transición epitelio-mesenquimal temprana, la sobreexpresión de HSC70 y FGB puede asociarse con estadios más avanzados del tumor, caracterizados por mayor agresividad, evasión inmune y capacidad de diseminación. La combinación de estos marcadores podría mejorar el poder diagnóstico y pronóstico en pacientes con COCE, y abrir el camino hacia terapias dirigidas más efectivas (36,37).

Finalmente, la cadena beta del fibrinógeno se ha asociado con la modulación del microambiente tumoral, especialmente en procesos de inflamación, angiogénesis y migración celular. Su expresión elevada en tejidos tumorales sugiere que esta proteína no solo actúa como un componente estructural en la coagulación, sino también como un facilitador de la invasión tumoral y la diseminación metastásica (32).

En conjunto, la expresión alterada de estas tres proteínas refleja un desequilibrio en la homeostasis celular normal y evidencia su participación activa en los distintos estadios del carcinoma oral. Por tanto, su análisis contribuye al entendimiento de los mecanismos moleculares implicados en la patogénesis del COCE y refuerza su posible uso como biomarcadores diagnósticos o pronósticos. Este estudio proporciona evidencia sobre la participación de KRT4, HSC70 y FGB en la fisiopatología del carcinoma oral de células escamosas. Su expresión alterada podría reflejar procesos clave como la pérdida de diferenciación, la adaptación al estrés celular y la promoción de la invasión tumoral. Estos resultados abren nuevas posibilidades para el uso de estas proteínas como herramientas diagnósticas y terapéuticas, lo cual resulta fundamental en el manejo integral de una enfermedad con elevada carga clínica y social.

CONCLUSIONES

PRIMERA: El nivel de expresión proteómica diferencial del tejido de células escamosas saludable da como resultado 21 spots con los rangos de 5.0 a 9.0 de pI y masas en torno de 14 a 97 kDa respectivamente.

SEGUNDA: El nivel de expresión proteómica diferencial temprana en la proliferación celular de cultivo celular de la línea SCC-4 correspondiente a carcinoma oral, da como conclusión a 3 spots que corresponden a las proteínas Keratin, type II cytoskeletal 4, Heat shock cognate 71 kDa protein, Fibrinogen beta chain isoform 1 preproprotein, las cuales se podrían considerar como los marcadores iniciales en la proliferación celular de células SCC-4 de carcinoma oral.



RECOMENDACIONES

Para futuros tesista e investigadores recomiendo:

PRIMERA: Promover el uso de tecnologías de análisis proteómico en el campo de la odontología, integrando estas metodologías en futuras investigaciones clínicas y básicas.

SEGUNDA: Aplicar herramientas de biología molecular en investigaciones odontológicas, integrando técnicas proteómicas como apoyo en la identificación de lesiones potencialmente malignas en la cavidad oral.

TERCERA: Profundizar en la relación entre cambios moleculares y manifestaciones clínicas del COCE, a fin de mejorar la capacidad del profesional odontólogo para diferenciar lesiones benignas de lesiones malignas en etapas tempranas.

CUARTA: Ampliar los estudios sobre biomarcadores proteicos como KRT4, HSC70 y FGB en muestras orales, con el fin de fortalecer el diagnóstico molecular temprano del carcinoma oral de células escamosas y facilitar intervenciones oportunas desde la práctica odontológica.

QUINTA: Complementar el análisis de estudio en virtud de que el fenotipo se basa en el genotipo; en pocas palabras la constitución de las bases nitrogenadas, purinas y pirimidinas que forman parte del ADN de una célula van a determinar el tipo de transducción por parte del ARN y esto a su vez influye en la síntesis de un determinado tipo de proteínas.

REFERENCIAS

1. Saranath D, (Ed) *Contemporary Issues in Oral Cancer*. Oxford University Press, New Delhi; 2000. pp. 30–71. [Google Scholar]
2. Lee JJ, Hong WK, Hittelman WN, Mao L, Lotan R, Shin DM, Benner SE, Xu XC, Lee JS, Papadimitrakopoulou VM, Geyer C, Perez C, Martin JW, El-Naggar AK, Lippman SM. Predicting cancer development in oral leukoplakia: ten years of translational research. *Clin Cancer Res*. 2000;**6**:1702–1710. [PubMed] [Google Scholar]
3. Jaber MA, Porter SR, Speight P, Eveson JW, Scully C. Oral epithelial dysplasia: clinical characteristics of western European residents. *Oral Oncol*. 2003;**39**:589–96. doi: 10.1016/S1368-8375(03)00045-9. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
4. Koike H, Uzawa K, Nakashima D, Shimada K, Kato Y, Higo M, Kouzu Y, Endo Y, Kasamatsu A, Tanzawa H. Identification of differentially expressed proteins in oral squamous cell carcinoma using a global proteomic approach. *Int J Oncol*. 2005;**27**:59–67. [PubMed] [Google Scholar]
5. Kato H, Uzawa K, Onda T, Kato Y, Saito K, Nakashima D, Ogawara K, Bukawa H, Yokoe H, Tanzawa H. Down-regulation of 1D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A protein expression in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2006;**28**:873–81. [PubMed] [Google Scholar]
6. He QY, Chen J, Kung HF, Yuen AP, Chiu JF. Identification of tumor-associated proteins in oral tongue squamous cell carcinoma by proteomics. *Proteomics*. 2004;**4**:271–8. doi: 10.1002/pmic.200300550. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
7. Balys R, Alaoui-Jamali M, Hier M, Black M, Domanowski G, Rochon L, Jie S. Clinically relevant oral cancer model for serum proteomic eavesdropping on the tumour microenvironment. *J Otolaryngol*. 2006;**35**:157–166. [PubMed] [Google Scholar]
8. Xie H, Onsongo G, Popko J, de Jong EP, Cao J, Carlis JV, Griffin RJ, Rhodus NL, Griffin TJ. Proteomics analysis of cells in whole saliva from oral cancer patients via value-added three-dimensional peptide fractionation and tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2008;**7**:486–498. [Google Scholar]
9. Hu S, Arellano M, Boontheung P. Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery. *Clin Cancer Res*. 2008;**14**:6246–6252. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-5037. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
10. Koehn J, Krapfenbauer K, Huber S, Stein E, Sutter W, Watzinger F, Erovic BM, Thurnher D, Schindler T, Fountoulakis M, Turhani D. Potential involvement of MYC-

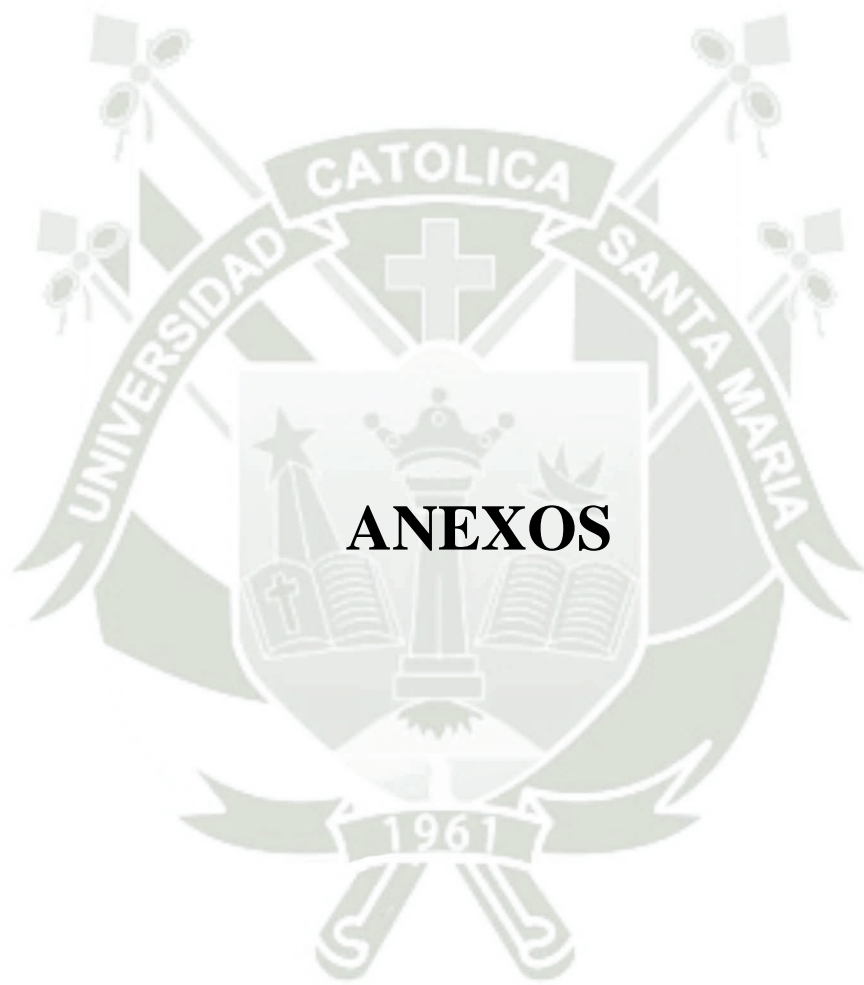
- and p53-related pathways in tumorigenesis in human oral squamous cell carcinoma revealed by proteomic analysis. *J Proteome Res.* 2008;**7**:3818–3829. doi: 10.1021/pr800077a. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
11. Kasamatsu A, Uzawa K, Nakashima D, Kouzu Y, Endo Y, Koike H, Yokoe H, Harada K, Sato M, Tanzawa H. A proteomics approach to characterizing human submandibular gland cell lines by fluorescent two-dimensional differential in-gel electrophoresis. *Int J Mol Med.* 2006;**17**:253–260. [PubMed] [Google Scholar]
 12. Zimmermann U, Balabanov S, Giebel J, Teller S, Junker H, Schmoll D, Protzel C, Scharf C, Kleist B, Walther R. Increased expression and altered location of annexin IV in renal clear cell carcinoma: a possible role in tumour dissemination. *Cancer Lett.* 2004;**209**:111–118. doi: 10.1016/j.canlet.2003.12.002. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
 13. Karanjawala ZE, Illei PB, Ashfaq R, Infante JR, Murphy K, Pandey A, Schulick R, Winter J, Sharma R, Maitra A, Goggins M, Hruban RH. New markers of pancreatic cancer identified through differential gene expression analyses: claudin 18 and annexin A8. *Am J Surg Pathol.* 2008;**32**:188–96. doi: 10.1097/PAS.0b013e31815701f3. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
 14. Celis JE, Rasmussen HH, Vorum H, Madsen P, Honoré B, Wolf H, Orntoft TF. Bladder squamous cell carcinomas express psoriasin and externalize it to the urine. *J Urol.* 1996;**155**:2105–12. doi: 10.1016/S0022-5347(01)66118-4. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
 15. Kesting MR, Sudhoff H, Hasler RJ, Nieberler M, Pautke C, Wolff KD, Wagenpfeil S, Al-Benna S, Jacobsen F, Steinstraesser L. Psoriasin (S100A7) up-regulation in oral squamous cell carcinoma and its relation to clinicopathologic features. *Oral Oncol.* 2009;**45**:731–6. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.11.012. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
 16. Zhou G, Xie TX, Zhao M, Jasser SA, Younes MN, Sano D, Lin J, Kupferman ME, Santillan AA, Patel V, Gutkind JS, Ei-Naggar AK, Emberley ED, Watson PH, Matsuzawa SI, Reed JC, Myers JN. Reciprocal negative regulation between S100A7/psoriasin and beta-catenin signaling plays an important role in tumor progression of squamous cell carcinoma of oral cavity. *Oncogene.* 2008;**27**:3527–3538. doi: 10.1038/sj.onc.1211015. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
 17. Hermani A, De Servi B, Medunjanin S, Tessier PA, Mayer D. S100A8 and S100A9 activate MAP kinase and NF-kappaB signaling pathways and trigger translocation of

- RAGE in human prostate cancer cells. *Exp Cell Res.* 2006;**312**:184–197. doi: 10.1016/j.yexcr.2005.10.013. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar].
18. Stulík J, Koupilova K, Osterreicher J, Knížek J, Macela A, Bures J, Jandík P, Langr F, Dedic K, Jungblut PR. Protein abundance alterations in matched sets of macroscopically normal colon mucosa and colorectal carcinoma. *Electrophoresis.* 1999;**20**:3638–3646. doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(19991201)20:18<3638::AID-ELPS3638>3.0.CO;2-W. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
19. Arai K, Takano S, Teratani T, Ito Y, Yamada T, Nozawa R. S100A8 and S100A9 overexpression is associated with poor pathological parameters in invasive ductal carcinoma of the breast. *Curr Cancer Drug Targets.* 2008;**8**:243–52. doi: 10.2174/156800908784533445. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
20. Lo WY, Lai CC, Hua CH, Tsai MH, Huang SY, Tsai CH, Tsai FJ. S100A8 is identified as a biomarker of HPV18-infected oral squamous cell carcinomas by suppression subtraction hybridization, clinical proteomics analysis, and immunohistochemistry staining. *J Proteome Res.* 2007;**6**:2143–2151. doi: 10.1021/pr060551+. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
21. Kornberg LJ, Villaret D, Popp M, Lui L, McLaren R, Brown H, Cohen D, Yun J, McFadden M. Gene expression profiling in squamous cell carcinoma of the oral cavity shows abnormalities in several signaling pathways. *Laryngoscope.* 2005;**115**:690–698. [PubMed] [Google Scholar]
22. Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays.* 2000;**22**:442–451. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(200005)22:5<442::AID-BIES6>3.0.CO;2-Q. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
23. Hill CP, Masters EI, Whitby FG. The 11S regulators of 20S proteasome activity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2002;**268**:73–89. [PubMed] [Google Scholar]
24. Watts C. The exogenous pathway for antigen presentation on major histocompatibility complex class II and CD1 molecules. *Nat Immunol.* 2004;**5**:685–692. doi: 10.1038/ni1088. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
25. Yewdell JW, Reits E, Neefjes J. Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat Rev Immuno.* 2003;**3**:952–961. doi: 10.1038/nri1250. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
26. Nikaido T, Shimada K, Nishida Y, Lee RS, Pardee AB, Nishizuka Y. Loss in transformed cells of cell cycle regulation of expression of a nuclear protein recognized

- by SLE patient antisera. *Exp Cell Res.* 1989;**182**:284–289. doi: 10.1016/0014-4827(89)90299-1. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
27. Barton LF, Runnels HA, Schell TD, Cho Y, Gibbons R, Tevethia SS, Deepe GS, Jr, Monaco JJ. Immune defects in 28-kDa proteasome activator gamma-deficient mice. *J Immunol.* 2004;**172**:3948–54. [PubMed] [Google Scholar]
28. Sobin LH, Wittekind Ch, (eds) *UICC TNM Classification of Malignant Tumors.* 6. John Wiley and Sons, Inc., NewYork; 2002. [Google Scholar]
29. Wang Z, Jiang L, Huang C, Li Z, Chen L, Gou L, Chen P, Tong A, Tang M, Gao F, Shen J, Zhang Y, Bai J, Zhou M, Miao D, Chen Q. Comparative proteomics approach to screening of potential diagnostic and therapeutic targets for oral squamous cell carcinoma. *Mol Cell Proteomics.* 2008;**7**:1639–1650. doi: 10.1074/mcp.M700520-MCP200. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
30. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence database using mass spectrometric data. *Electrophoresis.* 1999;**20**:3551–3567. doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(19991201)20:18<3551::AID-ELPS3551>3.0.CO;2-2. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
31. Kornberg LJ, Villaret D, Popp M, Lui L, McLaren R, Brown H, Cohen D, Yun J, McFadden M. Gene expression profiling in squamous cell carcinoma of the oral cavity shows abnormalities in several signaling pathways. *Laryngoscope.* 2005;**115**:690–8. [PubMed] [Google Scholar]
32. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 2009;**45**(4–5):309–16.
33. Rivera C. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;**8**(9):11884–94.
34. Takahashi K, Fujioka Y. Expression of cytokeratins in squamous cell carcinoma of the oral cavity: an immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med.* 1991;**20**(2):53–6.
35. Ide M, Matsuura H, Ogawa I, Takata T, Kusama K. Keratin expression in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma: a comprehensive immunohistochemical study. *Histopathology.* 2006;**49**(3):282–9.
36. Daugaard M, Rohde M, Jäättelä M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett.* 2007;**581**(19):3702–10.
37. Calderwood SK, Gong J. Heat shock proteins promote cancer: it's a protection racket. *Trends Biochem Sci.* 2016;**41**(4):311–23.

38. Palumbo JS, Degen JL. Fibrinogen and tumor cell metastasis. *Haemostasis*. 2001;31 Suppl 1:11–5
39. Sahni A, Simpson-Haidaris PJ. Fibrinogen produced by cancer cells stimulates tumor cell adhesion and invasion. *Thromb Haemost*. 2004;91(5):883–92.
40. **Bostanci N., Bao K.** Contribution of proteomics to our understanding of periodontal inflammation.2016. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500518>.
41. Rodríguez Vargas, Alvarado Garnica, García Contreras. Cancer stem cells in oral squamous cell carcinoma. 2022. <https://doi.org/10.21142/2523-2754-1002-2022-106>
42. Hui Ye, Anxun Wang, Tianwei Yu, Shinu Sheng. Proteomic based identification of manganese superoxide dismutase 2 (SOD2) as a metastasis marker for oral squamous cell carcinoma. 2008. <https://doi.org/10.7759/cureus.38514>.
43. Xiqiang Liu, Anxun Wang, Lorenzo Lo Muzio, Xiaofeng Zhou, Hui Ye. Deregulation of manganese superoxide dismutase (SOD2) expression and lymph node metastasis in tongue squamous cell carcinoma. 2010. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-365>





Anexo 1

Solicitud para el uso del Laboratorio de Química y Proteínas de la UCSM

Solicito: Autorización del coordinador principal del Laboratorio de Química y Proteínas de la UCSM

Señor:

Dr. Luis Ponce Soto

Coordinador principal del Laboratorio de Química y Proteínas

Sebastiam Rodrigo Montoya Rodriguez, identificado con DNI 72863249 y el código de alumno 2020701781, bachiller en Odontología.

Ante usted me presento y expongo que, me encuentro en proceso de realización de mi tesis: Estudio de la aproximación proteómica, en la proliferación celular de cultivo primario de carcinoma oral de células escamosas. Arequipa, 2025. Asesorado por el Dr. Obando Pereda, Gustavo Alberto.

Por lo que solicito a usted la autorización para la obtención y proceso de mis muestras para desarrollar mi proyecto, para optar por el título de Cirujano Dentista en la UCSM.

Por lo expuesto, espero acceda a mi solicitud.

Arequipa, 15 de Julio del 2024



Montoya Rodriguez, Sebastiam Rodrigo

DNI 72863249



Vicerrectorado de
Investigación

Anexo 2

Declaración Jurada de Autorización

El que suscribe *Profesor* Luis Alberto Ponce Soto Ph.D. con DNI N°29546298, Docente Investigador y Coordinador del laboratorio de Química de Proteínas del Vicerrectorado de Investigación F-401, de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa.

DECLARO:

Que el trabajo de Investigación denominado: “*Estudio de la aproximación proteómica, en la proliferación celular de cultivo primario de carcinoma oral de células escamosas. Arequipa, 2025.*”, se realizará por el Alumno: *Montoya Rodriguez Sebastian Rodrigo* y docente *Dr. Gustavo Alberto Obando Pereda* en las instalaciones del laboratorio de Química de Proteínas, bajo mi supervisión.

Se expide la presente a solicitud de los interesados para los fines debidos.

Arequipa, 20 de Agosto del 2024.

Atentamente,



Professor Luis Alberto Ponce Soto
Coordinador del Laboratorio de Química de Proteínas
Vicerrectorado de Investigación
Universidad Católica de Santa María

ORCID: 0000-0001-5976-2913
<https://orcid.org/0000-0001-5976-2913>
Other IDs
Scopus Author ID: 8987609300
ResearcherID: B-1328-2017.

vrinvestigacion@ucsm.edu.pe
Teléfono: 382038. Anexo 1111
Universidad Católica de Santa María de Arequipa – Perú

Anexo 3

Fotografías adjuntadas del proceso laboratorio

Figura 17. Cabina de Eflujo



Figura 18. Desinfección de la cabina de Eflujo



Figura 19. Preparación de cultivo



Figura 20. Introducción de cultivo a la estufa



Figura 21. Retirando el cultivo de la estufa



Figura 22. Cultivo en estufa

