Efecto de la reducción de la expresión de disquerina en células de carcinoma escamoso cutáneo

Sonia Segura[1], Ramon M Pujol[1], Evelyn Andrades[2], Agustí Toll[3], Gustavo Deza[1], Ramón Gimeno[4], Marta Bódalo[5], Paloma Torres[2], Inmaculada Hernández-Muñoz[2]

1. Departamento de Dermatología, Hospital del Mar, Parc de Salut Mar. Barcelona, España.
2. Grupo de Investigación de Enfermedades dermatológicas inflamatorias y neoplásicas. Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas (IMIM). Barcelona, España.
3. Departamento de Dermatología, Hospital Clínic de Barcelona, Universidad de Barcelona e Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS); Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, España.
4. Laboratorio de Inmunología. Departamento de Patología, Hospital del Mar, Barcelona, España.
5. MARGenomics. Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas (IMIM). Barcelona, España.

Antecedentes

La presencia de metástasis en ganglios linfáticos regionales constituye el marcador pronóstico más importante en la mayoría de los tumores sólidos, pero la mayor parte de los mecanismos moleculares implicados en las etapas iniciales de diseminación de la célula tumoral se desconocen. Alteraciones en la expresión de disquerina (DKC1) se han relacionado con la capacidad de invasión de las células neoplásicas y se han asociado con el pronóstico de pacientes con distintos tipos de tumores. Datos previos de nuestro laboratorio mostraron que el porcentaje de metástasis que expresan DKC1 es menor que el de los carcinomas escamosos cutáneos (CEC) primarios. Estas observaciones sugieren que la disminución de DKC1 favorece la diseminación metastática del CEC.

Objetivos

Caracterizar las alteraciones moleculares y funcionales de la reducción de los niveles de DKC1 en células de CEC, e identificar posibles biomarcadores de la progresión y diseminación metastásica.

Métodos

Los efectos de la disminución de los niveles de DKC1 se estudió en cultivos de la línea celular de CEC UT-SCC12A (generada a partir de un CEC primario que posteriormente metastatizó). La disminución de los niveles de DKC1 se realizó mediante la infección lentiviral de las células UT-SCC12A con shRNA ("short hairpin RNA) inducible por doxiciclina (DOX), y posterior generación de líneas estables mediante su selección con puromicina. La expresión de proteínas se estudió mediante la técnica convencional del western blot. La incorporación de LDL se estudió cultivando las células con LDL marcado con fluorescencia, y los ensayos de migración e invasión se realizaron utilizando cámaras "transwell". La expresión de HMGCS1 (enzima de la vía del colesterol) se estudió mediante inmunohistoquímica en 75 CEC y 33 metástasis.

Resultados

La reducción de los niveles de expresión de DKC1 induce un aumento de los niveles del receptor de LDL y de enzimas de la vía del mevalonato tales como la HMGCS1. (Figura 1). Además, la disminución de los niveles de DKC1 también favorece la migración y la invasión de las células de CEC (Figura 2). El tratamiento de las células con simvastatina, inhibidor del metabolismo del colesterol, bloquea el aumento de la expresión de genes implicados en la transición epitelio-mesénquima (TEM), como la vimentina y el factor de transcripción TWIST, y reduce la capacidad invasiva de las células con niveles bajos de DKC1 (Figura 3).

Los resultados obtenidos mediante tinción inmunohistoquímica de biopsias de CEC mostraron que existe una asociación directa entre la expresión de HMGCS1 y los criterios patológicos de mal pronóstico del CEC (Tabla 1, Figura 4). En concordancia con estos resultados, el porcentaje de metástasis que expresan HMGCS1 es mayor que el de CEC primarios (p=0.012) (Tabla 2).

Figura 1. Western blot de células controles (shCTRL) y depleccionadas de DKC1 (shDKC1), muestra el aumento de expresión del receptor LDL (LDLR) (arriba izda) y proteínas de la vía del mevalonato (arriba dcha). Inmunofluorescencia de células de la línea celular UT-SCC12A incubadas con LDL (abajo), se observa mayor captación de partículas LDL (verde) en las células con niveles reducidos de DKC1 (shDKC1).

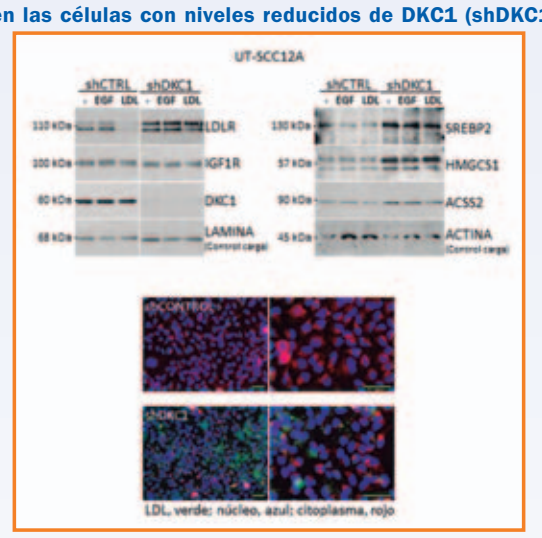

Figura 2. Ensayo de migración e invasión ("transwell") de la línea celular UT-SCC12A. Obsérvese que el grado de migración e invasión de las células depleccionadas de DKC1 (shDKC1) fue mayor que el de las células controles (shCTRL).

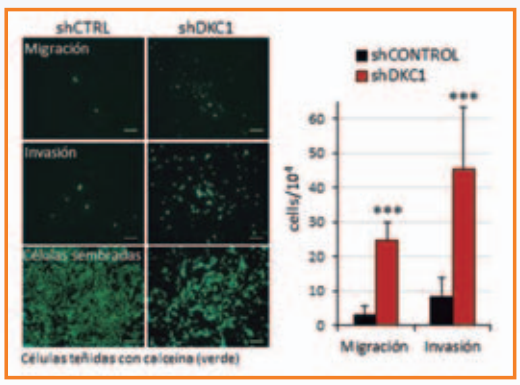

Figura 3. Western blot (arriba) y ensayo funcional "transwell" (abajo) de extractos de células UT-SCC12A cultivadas en presencia de simvastativa, para detectar la expresión de proteínas implicadas en la TEM.

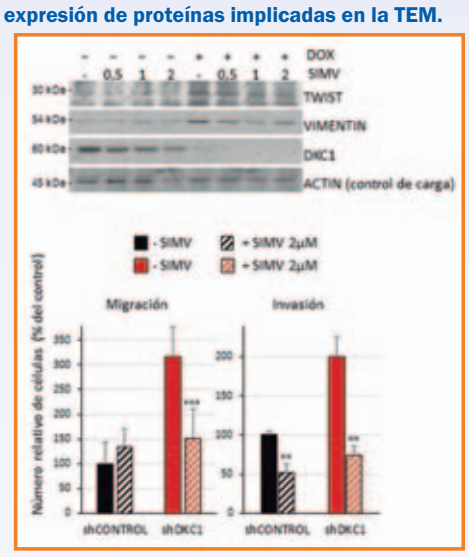

Figura 4. Inmunohistoquímica de HMGCS1. Tres tumores primarios con áreas de marcaje positivo para HMGCS1

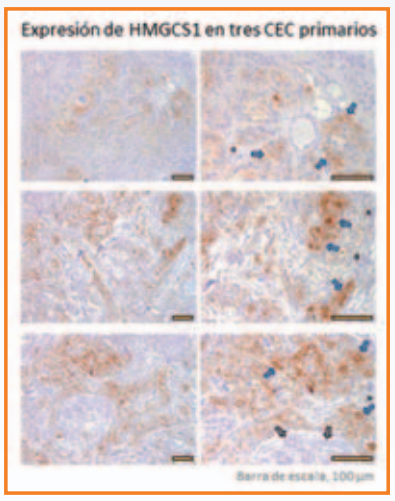

Tabla 1. Correlación de la expresión de HMGCS1 con variables histológicas.

	HMGCS1 Negativo (N = 60)	Positivo (N = 15)	Total (N = 75)	p-valor
Variables patológicas				
Diferenciación				0.38
Alta	17 (28.3%)	6 (40.0%)	23 (30.7%)	
Moderada	36 (60.0%)	9 (60.0%)	45 (60.0%)	
Baja	7 (11.7%)	0 (0.0%)	7 (9.3%)	
Profundidad (mm)				0.063
Media (SD)	6.38 (3.60)	8.22 (3.47)	6.74 (3.63)	
Mediana (Q1, Q3)	6.5 (4.0, 7.8)	9.0 (4.5, 10.5)	7.0 (4.0, 8.0)	
Min, Max	0.7, 19.0	3.3, 14.0	0.7, 19.0	
N (% No perdidos)	60 (100.0%)	15 (100.0%)	75 (98.7%)	
Tamaño (cm)				0.001
Media (SD)	2.11 (1.51)	3.24 (1.06)	2.32 (1.50)	
Mediana (Q1, Q3)	1.8 (1.2, 2.5)	3.0 (2.4, 4.0)	2.0 (1.4, 3.0)	
Min, Max	0.6, 10.0	1.5, 5.1	0.6, 10.0	
N (% No perdidos)	58 (96.7%)	13 (86.7%)	71 (93.4%)	
Clark, n (%)				0.547
3	12 (20.3%)	2 (14.3%)	14 (19.2%)	
4	28 (47.5%)	6 (42.9%)	34 (46.6%)	
5	9 (15.3%)	1 (7.1%)	10 (13.7%)	
6	10 (16.9%)	5 (35.7%)	15 (20.5%)	
Estadiaje				
TNM				0.012
1	28 (48.3%)	1 (7.7%)	29 (40.8%)	
2	27 (46.6%)	11 (84.6%)	38 (53.5%)	
3	3 (5.2%)	1 (7.7%)	4 (5.6%)	
BWH				0.100
1	22 (37.9%)	2 (14.3%)	24 (33.3%)	
2a	28 (48.3%)	7 (50.0%)	35 (48.6%)	
2b	3 (5.2%)	1 (7.1%)	4 (5.6%)	
3	5 (8.6%)	4 (28.6%)	9 (12.5%)	

Tabla 2. Expresión de HMGCS1 en CEC primario y metástasis.

	CEC primarios N (%)	Metastasis N (%)	Total	p-valor
HMGCS1 positivos	15 (20%)	16 (44%)	31	0.012
HMGCS1 negativos	60 (80%)	20 (55%)	80	
Total	75	36	111	

Conclusiones

La disminución de los niveles de DKC1 en el CEC induce la expresión de marcadores de la TEM, favoreciendo la diseminación metastática que está condicionada a la activación del metabolismo del colesterol. Estos resultados indican que algunas células presentes en el tumor primario adquieren cambios metabólicos que eventualmente les permitirán migrar y adaptarse a los nutrientes presentes en el ganglio linfático.

Hospital del Mar

Parc de Salut MAR Barcelona