Estudio de expresión y de la función transcripcional del complejo de ARN nucleolares de pequeño tamaño (snoRNAs) y de sus proteínas reguladoras (disquerina) en carcinomas escamosos cutáneos primarios y metastásicos

Ramon M Pujol[1], Evelyn Andrades[2], Agustí Toll[3], Gustavo Deza[1], Sonia Segura[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

Los mecanismos epigéneticos representan un factor fundamental en la capacidad metastásica de las células neoplásicas. La expresión de los ARN no codificantes de pequeño tamaño (sncRNAs)(microARNs y snoRNAs) se ha relacionado con la proliferación, apoptosis, diferenciación y capacidad de invasión de las células neoplásicas. Se desconoce el papel de los ARNsnucleolares de pequeño tamaño (snoRNAs) y de proteínas relacionadas con su estabilidad funcional en la progresión y diseminación del carcinoma escamoso cutáneo (CEC).

Objetivos

Caracterizar posibles mecanismos epigenéticos que facilitan la metástasis del CEC y el papel de los snoRNAs y sus proteínas reguladoras como posibles biomarcadores. Estudio transcripcional de las vías moleculares alteradas por la pérdida de expresión de snoRNAs en la progresión y diseminación metastásica.

Métodos

Se estudió la expresión de sncRNAs pequeños mediante el array miRNA 4.0 en 22 CEC primarios, de los cuales 10 habían evolucionado a metástasis confirmadas histológicamente (MCEC), y 12 no metastásicos (NoMCEC). Se analizó la expresión inmunohistoquímica de disquerina (DKC1) en 41 biopsias de MCEC, 48NoMCEC y 33 metástasis. Los efectos de la disminución de los niveles de DKC1 se estudiaron en cultivos de líneas celulares de CEC (SCC12, SCC13, UT-SCC12A y UT-SCC12B), y los cambios transcripcionales mediante el array de expresión Clariom S.

Resultados

El análisis supervisado de los scnRNAs evidenció un déficit en la expresión de snoRNAs (SNORNA 10,18,40,64) en MCEC en comparación con los NoMCEC (Tabla 1, Figura 1). Dichos resultados fueron validados en una cohorte de 47 NoMCEC. Los niveles de DKC1, que forma complejos con los snoRNAs y estabiliza su expresión, fueron inferiores en las metástasis que en los tumores primarios (30 % vs. 70 %, p=0,0001). (Tabla 2, Figura 2). La reducción de los niveles de DKC1 en líneas celulares de CEC ocasiona la adopción de un fenotipo mesenquimal con mayor capacidad invasiva (Figura 3). Los cambios transcripcionales asociados a la reducción de DKC1 muestran una activación de la vía del mevalonato y la reducción de la expresión de genes reguladores del ciclo celular (Figura 4).

Figura 1. Análisis no supervisado de la expresión de sncRNAs en NoMCEC (izquierda, en verde) y MCEC (derecha, en rojo), identificados mediante el "*array*" de expresión miRNA 4.0 (Applied Biosystems).

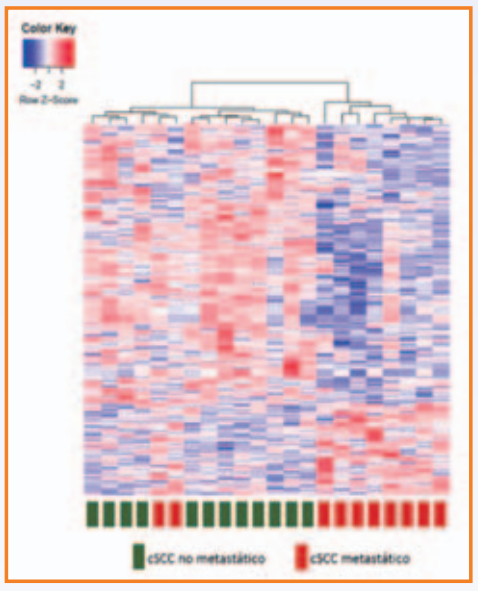
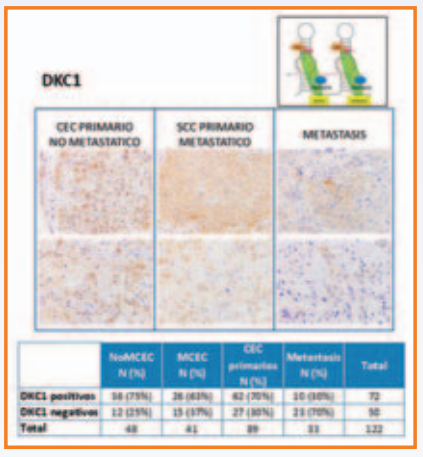


Figura 2. Detección de la expresión de DKC1 mediante inmunohistoquímica en muestras representativas de NoMCEC, MCEC y en metástasis linfáticas.



	NoMCEC N (%)	MCEC N (%)	CEC primarios N (%)	Metastasis N (%)	Total
DKC1 positivos	36 (75%)	26 (63%)	62 (70%)	10 (30%)	72
DKC1 negativos	12 (25%)	15 (37%)	27 (30%)	23 (70%)	50
Total	48	41	89	33	122

Figura 3. Silenciamiento de la expresión de DKC1 en líneas celulares de CEC. Panel superior, western blot; panel inferior, fenotipo de las células UT-SCC12A.

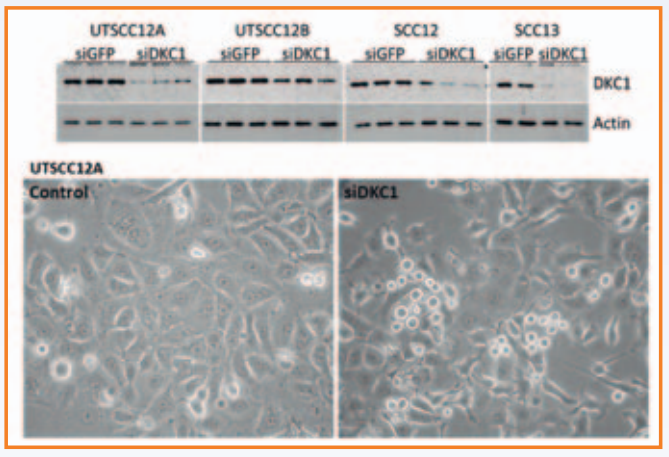


Figura 4. Cambios transcripcionales asociados al silenciamiento de la expresión de DKC1 en líneas celulares de CEC, identificados por "*arrays*" de expresión de RNAs.

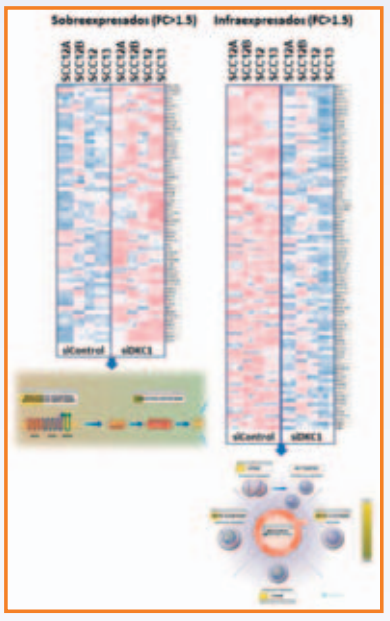


Tabla 1. Resumen de la representación de las diferentes especies de sncRNAs en el "*array*" de sncRNAs y del número y porcentaje de las especies de sncRNAs expresadas en MCEC y NoMCEC. N, número de especies presentes en el array; %, representación relativa de las especies en el array.

sncRNA	Secuencias en el array (N)	Secuencias en el array (%)	NoMCEC vs. MCEC (P<0,05)	Expresión diferencial (%)	Cambio (%)
CD BOX	319	4,6	26	7,9	169,5
H/ACA BOX	155	2,3	53	16,1	710,9
scaRNA	31	0,5	6	1,8	402,4
snoRNA	1491	21,7	79	23,9	93,8
STEM LOOP	2025	29,5	69	20,9	70,8
miRNA	2830	41,2	97	29,4	71,3
5.8s rRNA	10	0,1	0	0	0
Nºsecuencias	**6861**	**100**	**330**	**100**	**1518,7**

Tabla 2. Expresión de DKC1 en CEC primarios (NoMCEC y MCEC) y en metástasis.

	NoMCEC N (%)	MCEC N (%)	CEC primarios N (%)	Metastasis N (%)	Total
DKC1 positivos	36 (75%)	26 (63%)	62 (70%)	10 (30%)	72
DKC1 negativos	12 (25%)	15 (37%)	27 (30%)	23 (70%)	50
Total	48	41	89	33	122

Conclusiones

La pérdida de la función del complejo snoRNA/DKC1 en el CEC da lugar a una activación del metabolismo del colesterol (vía del mevalonato). La evidencia de que dicha activación facilita la progresión y diseminación linfática plantea la posibilidad de nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas específicas en el CEC.

Hospital del Mar

Parc de Salut MAR Barcelona