

2017 Octubre, 7(1): 1-1

ESTUDIO DEL GEN RHBDD2 COMO MARCADOR PRONÓSTICO/PREDICTIVO FRENTE AL TRATAMIENTO NEOADYUVANTE EN EL CÁNCER COLORRECTAL

Palma S, Garcia Fabiani MB, Abba MC, Lacunza E.

CINIBA (Centro Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas). sabi_palma@hotmail.com

Introducción

El cáncer colorrectal (CCR) es una enfermedad heterogénea a nivel molecular. El 5-Fluorouracilo (5-Fu) constituye la principal droga empleada como primera línea de tratamiento. En estudios previos, determinamos que el gen RHBDD2 se sobreexpresa en estadios avanzados del CCR, que se induce frente al tratamiento con 5-Fu y que se asocia al proceso de Respuesta a Estrés del Retículo Endoplasmático, fundamentalmente a la vía del UPR.

El aumento de expresión de RHBDD2 en estadios avanzados del CCR y su inducción frente al 5Fu hacen del gen/proteína un target interesante a evaluar como marcador del seguimiento al tratamiento.

Objetivos

Evaluar en pacientes con cáncer de recto la expresión de RHBDD2 antes y después del tratamiento neoadyuvante. Establecer el efecto fenotípico de la expresión diferencial (sobreexpresión y silenciamiento) de RHBDD2 en líneas celulares de cáncer colorrectal y su comportamiento ante el tratamiento con 5-Fu.

Materiales y métodos

IHQ: Se evaluó la expresión de RHBDD2 en tumores de recto de pacientes que recibieron tratamiento neoadyuvante (5-Fu + Radioterapia). Se incluyó un total de 28 muestras: 14 biopsias pretratamiento + 14 piezas quirúrgicas post-tratamiento.

Efecto del 5Fu sobre dos líneas celulares de CCR de subtipos moleculares diferentes: Se emplearon dos líneas celulares de cáncer colorrectal con características moleculares distintivas: las Caco2, provenientes de un adenocarcinoma colorrectal estadio II con baja expresión endógena de RHBDD2 y las HCT116 derivadas de un carcinoma colorrectal estadio IV con alta expresión de RHBDD2.

Para determinar la susceptibilidad de ambos modelos celulares al 5-Fu las células fueron tratadas durante 6, 12 y 24hs con concentraciones crecientes de la droga (5, 10 y 20uM). Mediante RTPCR se determinó para cada punto la expresión de RHBDD2 y de los genes del UPR: CHOP y BIP.

Desarrollo de modelos in vitro para la sobreexpresión y el silenciamiento estables de RHBDD2: La línea celular Caco2 fue transfectada establemente con un vector de sobreexpresión TOPO3.1. Las células establemente transfectadas fueron seleccionadas con geneticina. Las HCT116 fueron infectadas con partículas lentivirales conteniendo un plásmido transportador de un shRNA dirigido contra el ARN del gen RHBDD2. Las células establemente transfectadas fueron seleccionadas con puromicina. Ambos sistemas fueron confirmados midiendo la expresión de RHBDD2 mediante RTPCR, ICQ y Western Blot. Se evaluó además la expresión del gen CHOP, efector final del UPR.

Ensayo de estría: Para evaluar migración y proliferación celular sobre los sistemas establecidos realizamos el ensayo de cierre de la herida. Se efectuó una estría sobre la monocapa y se evaluó su evolución bajo el microscopio óptico durante los tiempos 0, 8, 24, 30 y 48hs.

Efecto del silenciamiento de RHBDD2 frente al tratamiento con 5-Fu: las HCT116 silenciadas fueron tratadas con 10uM de 5-Fu durante 6hs, luego se determinó el número de células vivas a los 4, 8 y 12 días.

Resultados

En las muestras de tumor, la expresión de RHBDD2 se vio significativamente afectada luego del tratamiento neoadyuvante. El 100% de las muestras pre-tratadas expresaron RHBDD2 con una intensidad moderada/alta y la mayoría (86%) mostró un porcentaje de expresión elevada (70-100%). En las muestras post-tratadas se observó una disminución marcada y significativa de la expresión de RHBDD2. Sin embargo, hubo un grupo de muestras que no redujo la expresión de RHBDD2 luego del tratamiento. Interesantemente, estas muestras mostraron una asociación significativa con el desarrollo de metástasis ganglionar y/o a distancia.

Las líneas celulares Caco2 y HCT116 respondieron al tratamiento inmediato con 5-Fu mediante la inducción de la expresión de RHBDD2 y los genes de UPR.

La sobreexpresión de RHBDD2 aumentó la migración y la proliferación celular en el ensayo de cierre de la herida, mientras que su silenciamiento redujo ambas variables. La expresión del gen del UPR, CHOP, se ve disminuída ante la sobreexpresión de RHBDD2 y aumentada ante su silenciamiento, revelando un posible mecanismo de regulación que involucraría a ambos genes.

El silenciamiento de RHBDD2 hizo a las HCT116 más susceptibles al tratamiento con 5-Fu.

Conclusiones

La expresión diferencial de RHBDD2 en tumores de recto frente al tratamiento neo-adyuvante permitiría estratificar a los pacientes entre respondedores y no respondedores a la terapia, a fin de que reciban un tratamiento más específico y adecuado.