

La expresión reducida de PTEN contribuye con la progresión de los carcinomas de células escamosas cutáneos caninos mediante la activación de la vía mTOR

Sanz Ressel BL^{1,2,*}, **Massone AR**³, **Barbeito CG**^{1,2}

¹Laboratorio de Histología y Embriología Descriptiva, Experimental y Comparada (LHYEDEC), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

²Facultad de Ciencias Veterinarias, CONICET, UNLP, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

³Laboratorio de Patología Especial Veterinaria Dr. Bernardo Epstein, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

***Autor de contacto:**

Sanz Ressel Berenice Liyare, Doctora en Ciencias Veterinarias, Medica Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, 60 y 118 s/n, CP 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina. Tel.:+54 221 4236663. E-mail: lsanzressel@fcv.unlp.edu.ar

Resumen

Los mecanismos moleculares que contribuyen al crecimiento maligno del carcinoma de células escamosas cutáneo (CCEC) en los caninos aún no se conocen bien, lo que limita nuestra capacidad para identificar objetivos moleculares adecuados para el desarrollo de nuevas terapias para estos pacientes. En este sentido, recientemente demostramos que la activación persistente de la vía de señalización fosfatidilinositol3-quinasa/Akt/objetivo de la rapamicina en mamíferos (PI3K/Akt/mTOR) es un evento frecuente en la progresión de los CCEC caninos. En el presente estudio, describimos el patrón de expresión por inmunohistoquímica (IHQ) de la molécula reguladora clave de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR, PTEN, y su relación con la activación de esta vía de señalización mediante la detección IHQ de pS6^{Ser235/236}, en 140 muestras de CCEC caninos mediante el uso de micromatrices de tejidos. Los resultados muestran que la expresión de PTEN está disminuida en algunos pacientes con CCEC, mientras que la expresión de pS6^{Ser235/236} está aumentada. En este contexto, la disminución de la expresión de PTEN puede facilitar la progresión de los CCEC mediante la desregulación de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR. Estos hallazgos proporcionan evidencia importante sobre la naturaleza de las redes de señalización desreguladas en los CCEC caninos, señalando a la vía PI3K/Akt/mTOR como posible diana terapéutica.

Introducción y objetivos:

El carcinoma de células escamosas cutáneo (CCEC) es uno de los tumores malignos más frecuentes de la piel de los caninos^{1,2}. El estudio de los mecanismos moleculares desregulados en estas neoplasias puede proporcionar dianas terapéuticas adecuadas para el desarrollo de nuevas terapias para los pacientes caninos con CCEC. Recientemente hemos demostrado que la activación persistente de la vía de señalización fosfatidilinositol3-quinasa/Akt/objetivo de la rapamicina en mamíferos (PI3K/Akt/mTOR) es un evento frecuente en la progresión de los CCEC caninos³. La actividad aumentada de la vía de señalización de PI3K/Akt/mTOR puede resultar de la regulación negativa de la expresión de la proteína supresora de tumores PTEN, el principal regulador de esta vía de señalización, como se sugirió previamente en humanos⁴. En este sentido, el estudio de las moléculas relevantes en un gran número de muestras tumorales de diferentes pacientes en condiciones técnicas idénticas y estandarizadas puede ayudar a identificar los eventos moleculares clave involucrados en el desarrollo y progresión de los CCEC caninos, para lo cual puede utilizarse la técnica de micromatrices de tejidos incluidos en parafina (MMT). Por lo tanto, en el presente trabajo se determinó el patrón de expresión por inmunohistoquímica (IHQ) de PTEN y su relación con la activación de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR mediante la detección IHQ de pS6^{Ser235/236} en 140 muestras de CCEC caninos mediante el uso de micromatrices de tejidos.

Materiales y Métodos:

Los bloques de tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina correspondientes a CCEC de caninos (n=150) fueron recuperados de los archivos del Laboratorio de Patología Especial Veterinaria Dr. Bernardo Epstein, FCV, UNLP. Sobre las secciones teñidas con hematoxilina y eosina (H-E) correspondiente a cada muestra, se realizó la marcación de las áreas de tejido de interés para la posterior construcción de las MMT. El método utilizado para la construcción de las MMT fue el descrito por Hewitt (2004)⁵, utilizando un arrayer de tejido semiautomático (TM Arrayer TM, Pathology Devices, Inc.) y un diámetro de núcleo de 1 mm. Una vez finalizadas las MMT, se obtuvieron secciones de 5 µm que fueron coloreadas con H-E para evaluar la calidad de las MMT; solo 10/150 de los CCEC incluidos en las MMT fueron excluidos de análisis posteriores debido a su daño o pérdida durante el procesamiento. Posteriormente, se obtuvieron nuevas secciones de 5 µm para IHC, la cual se realizó utilizando anticuerpos primarios contra PTEN (PTEN; Biocare Medical) y pS6^{Ser235/236} (S6 fosforilado en Ser235/236; Cell Signaling Technologies). Para el revelado se utilizaron anticuerpos secundarios biotinilados y el complejo de avidina-biotina o fosfatasa alcalina, utilizando como cromógenos 3,3'-diaminobenzidina o Warp Red, respectivamente. Las secciones se escanearon a 40x usando el Aperio CS ScanScope (Leica Biosystems Imaging Inc.) y se cuantificaron usando los algoritmos de análisis de imágenes disponibles en el software ImageScope (Leica Biosystems Imaging Inc.). Las diferencias en la reactividad inmunohistoquímica entre los CCEC y los controles de piel canina normal se analizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis para poblaciones no gaussianas (ANOVA no paramétrico) seguida de la prueba posterior de Dunn (software Statgraphics, con un valor de $P < 0,05$ y una confianza del 95%).

Resultados

La inmunomarcación de PTEN mostró una tinción citoplasmática y, ocasionalmente, nuclear limitada a las células de los estratos basal y espinoso en 110/140 (79,29%) de los CCEC. Asimismo, se observó que todos los CCEC que evidenciaron una expresión reducida o ausente de PTEN (27/30; 90%) mostraron la activación persistente de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR, determinada por la inmunodetección de pS6^{Ser235/236}. Cuando el porcentaje de células positivas cuantificados en los casos de CCEC se evaluó frente a los controles de piel normal, la prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas para PTEN ($P < 0.01$).

Discusión y conclusiones

Los resultados demuestran que la actividad de PTEN, la principal molécula implicada en la regulación de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR, se encuentra desregulada durante el proceso de carcinogénesis epidérmica en algunos pacientes caninos, similar a lo informado previamente en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello humanos⁶. En este contexto, la disminución de la expresión de PTEN puede facilitar la progresión de los CCEC caninos mediante la activación persistente de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR y, en consecuencia, la desregulación de las funciones celulares clave en las que está implicada esta vía. Estos hallazgos proporcionan información valiosa que señala a esta vía de señalización como un potencial objetivo terapéutico para el desarrollo de nuevas terapias para pacientes caninos con CCEC.

Bibliografía

1. Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter VK. Skin Diseases of the Dog and Cat Clinical and Histopathologic Diagnosis. 2nd ed. Blackwell Science Ltd; 2005.
2. Goldschmidt MH, Goldschmidt KH. Epithelial and Melanocytic Tumors of the Skin. In: Meuten DJ, editor. Tumors in Domestic Animals [Internet]. 5th ed. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2016. p. 88–141.
3. Sanz Ressel BL, Massone AR, Barbeito CG. Immunohistochemical expression of selected phosphoproteins of the mTOR signalling pathway in canine cutaneous squamous cell carcinoma. *Vet J*; 2019 245:41-48.
4. Molinolo, A. A., Amornphimoltham, P., Squarize, C. H., Castilho, R. M., Patel, V. GJ. Dysregulated Molecular Networks in Head and Neck Carcinogenesis. *Oral Oncol.* 2009;45(4–5):324–34.
5. Hewitt SM. Design, construction, and use of tissue microarrays. In: *Methods in Molecular Biology*. New Jersey: Humana Press; 2004. p. 61–72.
6. Squarize, C.H., Castilho, R.M., Abrahao, A.C., Molinolo, A., Lingen, M.W., Gutkind, J.S. PTEN deficiency contributes to the development and progression of head and neck cancer. *Neoplasia*. 2013;15: 461-471.