

La hiperplasia epidérmica observada en carcinoma basocelular podría involucrar la migración e invasión colectiva de los queratinocitos: posible papel del receptor CD44 y la tirosina quinasa c-Src en su forma activada

ADRIANA DE LA¹ TORRE, LUZ MARINA CARRILLO¹, HÉCTOR ROJAS², RICHARD RAMÍREZ¹, OSCAR REYES¹, ENRIQUE ARCINIEGAS^{1*}

Resumen:

Introducción: La migración colectiva es un proceso complejo donde grupos de células que mantienen sus contactos entre sí se mueven juntas como una unidad multicelular a través de matrices extracelulares, siendo reactivada durante la progresión tumoral.

Objetivos: Determinar los eventos celulares relacionados con la migración colectiva de queratinocitos basales y suprabasales en biopsias de piel de pacientes con carcinoma basocelular superficial, morfeiforme y piel normal. **Metodología:** En este estudio se realizó el análisis histológico *in vivo* de 6 biopsias de pacientes con carcinoma basocelular superficial y 5 biopsias de carcinomas basocelulares morfeiformes que exhibían una epidermis hiperplásica, comparadas con 3 biopsias de piel normal. Se realizó microscopía confocal para analizar la presencia de CD44 y p-c-Src. **Resultados:** La observación a mayor aumento de estas biopsias demostró que algunas células basales y suprabasales de la epidermis estaban organizadas en grupos multicelulares orientados hacia la dermis papilar y muchas de ellas se mantenían juntas a través de puentes o uniones intercelulares. La microscopía confocal reveló la presencia de CD44 delineando los márgenes y puentes intercelulares de células basales y suprabasales que estaban orientadas hacia la dermis papilar, mientras que c-Src activado se localizó en las uniones célula-célula exhibiendo un patrón similar al de CD44, encontrándose además en las protrusiones membranales donde la presencia de CD44 aparecía interrumpida. **Conclusiones:** La hiperplasia observada en biopsias examinadas de carcinomas basocelulares podría involucrar la migración e invasión colectiva de algunos queratinocitos basales y suprabasales hacia la dermis, donde CD44 y p-c-Src posiblemente desempeñan un papel importante.

Palabras clave: *migración colectiva, carcinoma basocelular, epidermis hiperplásica.*

Epidermal hyperplasia observed in basocellular cancer could involve migration and collective invasion of keratocytes: possible role of the CD44 receptor and C-Src tyrosine kinase in its activated form

Abstract:

Background: Collective cell migration is a complex process in which groups of cells that have retained their contacts with each other move together as a unit multicellular through extracellular matrices, and being reactivated during tumor progression. **Objective:** To determine the cellular events associated with collective migration in basal and suprabasal keratinocytes in skin biopsies from patients with superficial basal cell carcinoma,

¹ Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela;

² Instituto de Inmunología, Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela.

Correo electrónico: earciniegasbeta@yahoo.com

* Autor para correspondencia

morphoeic, and normal skin. **Methods:** In this study the presence of CD44 and p-c-Src was examined by confocal microscopy in 6 biopsies of patients with diagnostic of superficial basal cell carcinoma and 5 with diagnostic of morphoeic basal cell carcinoma biopsies exhibiting a hyperplastic epidermis and compared with 3 normal skin biopsies. Results: Histological analysis of these biopsies showed that basal and suprabasal cells of the epidermis were organized into multicellular groups oriented toward papillary dermis and many of them stuck together through intercellular bridges or junctions. Confocal microscopy revealed the presence of CD44 and delineating margins of basal cell intercellular bridges and suprabasal that were oriented toward the papillary dermis, whereas activated c-Src was localized to cell-cell junctions exhibiting a similar pattern of CD44, and in the membrane protrusions where the presence of CD44 appeared interrupted. **Conclusion:** The observed hyperplasia of basal cell carcinomas examined biopsies could involve collective migration and invasion of some basal and suprabasal keratinocytes into the dermis, where CD44 and pc-Src possibly play an important role.

Key words: *collective cell migration, basal cell carcinoma, epidermal hyperplasia.*

Introducción

Los carcinomas de piel representan la forma más común de cáncer en humanos. Para finales de 2011 la incidencia anual del cáncer de piel tipo no melanoma estimada por la Sociedad Americana de Cáncer fue de un millón de nuevos casos por año de los cuales 80% estaría representado por carcinoma de células basales (CBC)^{1,2}. El CBC es un tumor epitelial maligno con bajo potencial metastásico, pero con riesgo significativo de invasión local, destrucción tisular y recurrencia que consiste de células parecidas a aquellas residentes en el estrato basal³. Existen factores predisponentes al desarrollo y la progresión de este carcinoma siendo la exposición intermitente a las radiaciones ultravioleta contenidas en la luz solar el factor etiológico más importante. Otros factores de riesgo incluyen una avanzada edad, historia familiar de cáncer de piel, alteraciones genéticas tal y como las que se evidencian en el síndrome de Gorlin, inmunosupresión, radioterapia, CBC previos y las radiaciones ionizantes. Es así como la mayoría de los CBC se originan en la epidermis e invaden la dermis en forma de cordones o nódulos, dando lugar a varios patrones morfológicos de crecimiento y de diferenciación lo que ha permitido su clasificación en: CBC superficial, nodular, micronodular fibroepitelial, morfeiforme o esclerosante, infiltrante y basoescamoso¹⁻⁴, siendo considerados como agresivos los últimos 4 patrones histológicos.

En relación con la capacidad invasiva y de diferenciación de las células tumorales, recientes estudios *in vitro* han propuesto que muchos tipos de carcinomas podrían contener zonas de células organizadas cohesivamente a manera de "unidades multicelulares" con movimiento activo. Este movimiento activo es conocido como migración colectiva⁵⁻⁷. Este fenómeno es considerado como un proceso complejo y heterogéneo que permite que grupos de células que han retenido sus contactos entre sí, se desplacen juntas como una unidad multicelular a través de matrices extracelulares bi o tri-dimensionales⁸. Este proceso también facilita el movimiento pasivo de aquellas células tipo "no migratorias" que también podrían estar conformando el llamado grupo multicelular, lo que le permitiría aumentar su capacidad invasiva y su potencial metastásico^{5,6}. Cabe destacar que cuando los contactos intercelulares se debilitan, las células se separan del grupo y dependiendo del microambiente que encuentren se

diseminan como células individuales^{5,6}. La migración colectiva suele ocurrir durante la morfogénesis, pero también parece ser reactivada durante la reparación tisular y la progresión de muchos tumores, razón por la cual este proceso es en la actualidad objeto de numerosos estudios^{5,6,8}. Sin embargo los aspectos moleculares, mecánicos y celulares del movimiento colectivo activo y pasivo, así como sus implicaciones en la progresión del cáncer siguen siendo desconocidos⁸.

El receptor CD44 ha sido identificado en numerosas células y tejidos que incluyen la piel e involucrado en numerosos procesos celulares tales como regulación del crecimiento, movimiento activo y sobrevida^{8,10}. CD44 es una glicoproteína transmembranal que funciona no solo como receptor para el ácido hialurónico y otros glicosaminoglicanos, sino también para otros ligandos que incluyen colágenos, lamininas y fibronectina¹¹. Además de este papel, estudios recientes han indicado que este receptor podría participar en la progresión de muchos tumores^{12,13}. En este contexto, estudios previos han sugerido un posible papel para este receptor durante el proceso de estratificación de la epidermis¹⁴ y la inflamación cutánea¹⁵. Sin embargo, sus funciones precisas en todos estos procesos requieren de una investigación más profunda.

Basados en estas evidencias, en este estudio preliminar examinamos aquellos eventos *in vivo* relacionados con el proceso de migración colectiva que podrían estar ocurriendo en los queratinocitos basales y suprabasales en términos de su morfología, orientación y organización en biopsias de piel de pacientes con diagnóstico de CBC superficial o CBC morfeiforme que exhibían una epidermis engrosada o hiperplásica.

Como lo mencionamos, CD44 ha sido involucrado en la regulación del crecimiento celular, movimiento activo y sobrevida^{9,10}, por lo tanto en este estudio evaluamos por inmunofluorescencia la presencia y la localización de esta glicoproteína transmembranal en las biopsias que exhibían una epidermis hiperplásica. c-Src es una enzima tirosina quinasa que cuando es activada y fosforilada no solo puede regular el crecimiento y la sobrevida celular sino también puede promover la reorganización del citoesqueleto y la disminución de la adhesión célula-MEC y los

contactos célula-célula, facilitando la expansión, migración, diferenciación y transcripción¹⁶⁻¹⁸. Tomando en cuenta que CD44, a través de su dominio citoplásmico, se asocia estructural y funcionalmente a c-Src¹⁹, en este estudio también investigamos si la forma activada o fosforilada de esta proteína oncogénica estaba presente en esas biopsias.

Materiales y métodos

En este estudio se seleccionaron once (11) biopsias de pacientes con el diagnóstico de carcinoma basocelular (CBC), 6 del sexo masculino y 5 del sexo femenino, cuyas edades oscilaban entre 41 a 75 años con un promedio de 61 años. Las biopsias fueron obtenidas de los archivos del Laboratorio de Dermatopatología del Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina (SAIB). El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Bioética local de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki. Estas biopsias habían sido fijadas en formaldehído al 10% en solución amortiguadora de fosfato, deshidratadas y embebidas en parafina. Para el estudio retrospectivo, transversal y descriptivo fueron incluidos 6 casos de CBC superficial y 5 casos correspondientes a CBC morfeiforme o esclerosante. La localización anatómica de los mismos incluyó 4 CBC superficiales en cara y 2 en tórax anterior, así como 4 CBC morfeiformes en cara y 1 en tórax anterior. De estas biopsias se seleccionaron solo los casos de CBC exhibiendo una epidermis hiperplásica que incluían 3 CBC superficiales localizados en cara y 1 en tórax anterior y 3 CBC morfeiformes localizados en cara. Una epidermis hiperplásica fue definida como aquella epidermis con un grosor promedio igual o superior a 100 μ m medido desde el borde inferior del estrato córneo hasta el borde inferior del estrato basal, observado con un objetivo de 10x. El grosor fue determinado usando un software de captura, edición y procesamiento de imágenes, Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Tres biopsias obtenidas de pacientes que acudieron a un centro de cirugía estética fueron incluidas como controles correspondientes a piel normal.

Análisis histológico

Secciones desparafinadas de 4 mm de espesor fueron colocadas sobre láminas cubiertas de silano y procesadas para tinción con hematoxilina y eosina (H&E) siguiendo los métodos convencionales. Las secciones fueron examinadas con un microscopio invertido IX-70 Olympus (Olympus America Inc., Melville, NY) empleando objetivos de 10X y 40X. Las imágenes fueron capturadas usando el software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

Mediciones del grosor de la epidermis

Las mediciones de las epidermis hiperplásicas fueron realizadas en al menos cuatro campos por cada biopsia que habían sido observados y capturados utilizando un microscopio invertido Olympus con un objetivo de 10X (Olympus America Inc.). El grosor fue medido a partir de las imágenes capturadas empleando un software de captura, edición y procesamiento de imágenes Image Pro Plus. Las medidas fueron determinadas a partir de los valores de R1 y R2 y expresadas como el promedio de los grosores (T, thickness) máximos y mínimos obtenidos e incluían las desviaciones estándar correspondientes (Figura 1).

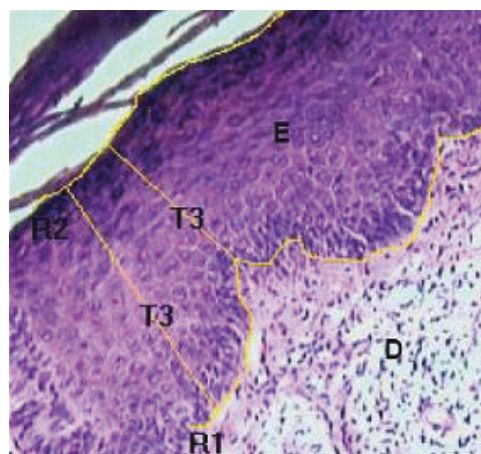


Fig. 1
CBC superficial

Figura 1.
Sección histológica de un CBC superficial contrastada con hematoxilina y eosina (H&E) en donde se muestra la epidermis hiperplásica. R1 y R2 = Longitud de las trazas amarillas que aparecen delineando las dos superficies de la epidermis. T3 = Representa el promedio de 3 valores máx y mín del grosor (Thickness) de la epidermis por campo. E= epidermis; D= dermis

Inmunofluorescencia indirecta

Las secciones fueron desparafinadas en xilol, re-hidratadas en una serie de concentraciones decrecientes de etanol y equilibradas en PBS por 10 min. Las inespecificidades de los anticuerpos fueron bloqueadas incubando las secciones en PBS conteniendo 2% de albúmina de suero bovino (BSA) por 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente, fueron incubadas toda la noche en una cámara húmeda a 4°C con los siguientes anticuerpos: Un anticuerpo monoclonal IgG1 de ratón anti - CD44 de humano (clon A3D8) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) o un anticuerpo monoclonal IgG3 de ratón anti-fosfo-c-Src producido contra el residuo Tyr419 de humano (Clon 9A6) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA). Después de lavados sucesivos en PBS, un anticuerpo secundario conjugado Alexa Fluor 488 IgG de cabra anti-ratón (Invitrogen, Molecular Probes, OR) fue aplicado por 30 min a temperatura ambiente, manteniendo las secciones en la oscuridad. Las mismas fueron lavadas nuevamente en PBS y cubiertas con medio montante Immu mount (Shandon, Pittsburgh, PA). Los controles negativos fueron producidos omitiendo el anticuerpo primario y colocando en su lugar PBS. Las imágenes de inmunofluorescencia fueron capturadas con un microscopio invertido Olympus 1X81 (Fluo-View) (Olympus America Inc.) configuración láser de barrido. La intensidad de la inmunofluorescencia en función de la distancia fue analizada haciendo uso del programa FV10.ASW versión 02.01.01.04 (Olympus America Inc.). La fluorescencia normalizada (Fn) fue calculada aplicando la fórmula $F_n = \frac{f - f_{mín}}{f_{máx} - f_{mín}}$, en donde $f_{mín}$ y $f_{máx}$ representan las frecuencias mínimas y máximas, respectivamente.

Tabla 1.

Medidas del grosor de la epidermis en CBC superficial y morfeiforme

	n	Grosor de la epidermis (µm) (Media +/- DS)
CBC superficial	4	163,68 +/- 0,0163
CBC morfeiforme	3	143,84 +/- 0,0158
Piel normal	2	51,31 +/- 0,0027

n = número de casos.
Los valores son el promedio del grosor +/- desviación estándar

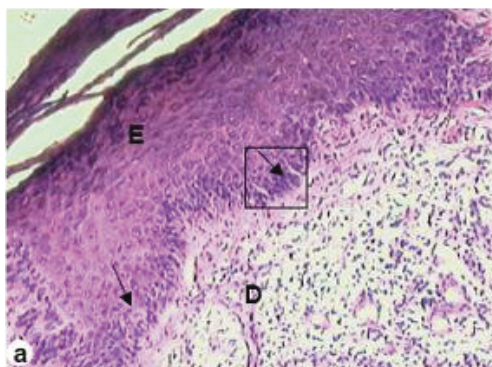


Fig. 2a
CBC Superficial

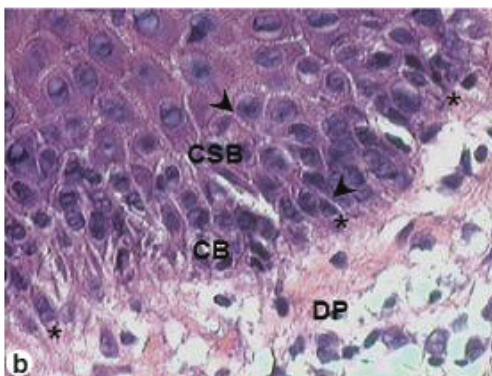


Fig. 2b
CBC Superficial



Fig. 2c
CBC Morfeiforme

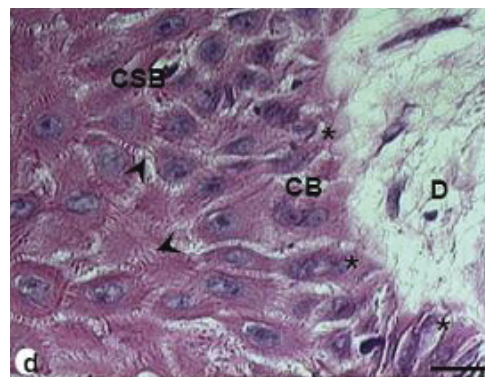


Fig. 2d
CBC Morfeiforme

Figura 2.

superficial (a,b) y de un CBC morfeiforme (c,d) exhibiendo la epidermis engrosada. A mayor aumento (b,d) es posible distinguir a las células queratinocíticas basales (CB) y suprabasales (CSB) organizadas como un grupo multicelular orientado hacia la dermis papilar (DP); algunas de ellas aumentadas de tamaño exhibiendo un núcleo prominente con alto contenido de cromatina; otras en mitosis. La mayoría de las CB y CSB parecen mantenerse juntas a través de puentes intercelulares (cabezas de flechas en "b" y "d"). Note que algunas CB extienden protrusiones membranales (asteriscos) y parecen separarse y migrar hacia la DP (b,d). Las flechas en "a" y "c" indican la dirección de la migración.
Barra = 60µm (a,c); 10µm (b,d).

Resultados

En este estudio, el análisis histológico de las biopsias de piel de pacientes con diagnóstico de CBC superficial o CBC morfeiforme que exhibían engrosamientos importantes de la epidermis (Fig. 2a, c) los cuales fueron cuantificados y expresados como el promedio de los grosores máximos y mínimos registrados (Tabla 1, Fig. 1), mostró que en algunas zonas las células queratinocíticas basales y suprabasales estaban organizadas en capas cohesivas o grupos multicelulares orientadas hacia la dermis papilar, posiblemente migrando e invadiendo esa región. Algunas de ellas aumentadas de tamaño y exhibiendo un núcleo prominente con alto contenido de cromatina, mientras que otras mostraban frecuentes mitosis (Figs.2b, d). Cabe destacar que la

mayoría de las células basales y suprabasales parecían mantenerse juntas a través de puentes intercelulares, los cuales son considerados en la actualidad como uniones transitorias o restos de complejos de uniones intercelulares que le permiten a las células tumorales mantenerse juntas durante la migración colectiva (Figs. 2b, d). Adicionalmente, fue posible distinguir células basales extendiendo protrusiones membranales o lamelipodios sugestivos de baja adhesión y migración colectiva; algunas de ellas parecían haberse separado del estrato basal y migrado como células individuales (Figs. 2b, d).

Inmunolocalización in vivo de CD44

En este estudio evaluamos la presencia y localización de esta glicoproteína de superficie por inmunofluorescencia en las biopsias de pacientes con diagnóstico de CBC superficial o CBC morfeiforme que exhibían una epidermis engrosada o hiperplásica.

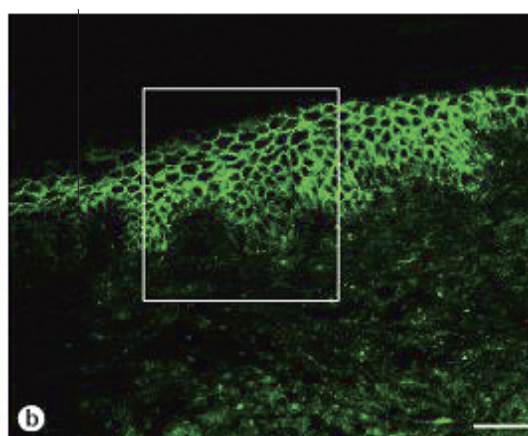
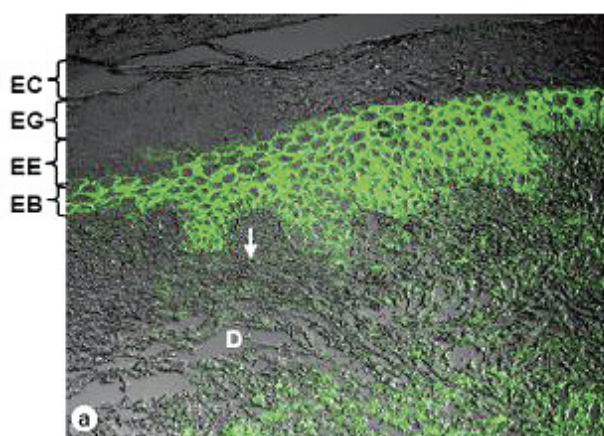


Fig. 3a y 3b
CD44
CBC Superficial

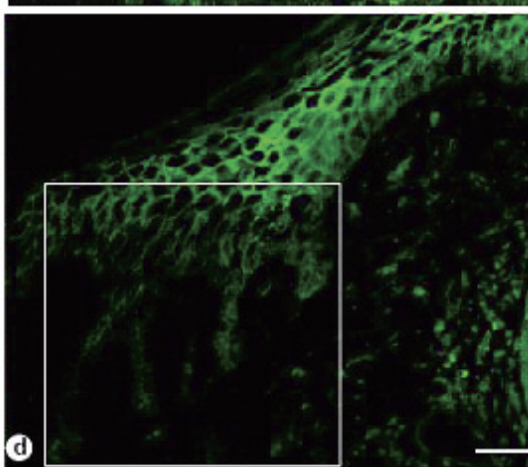
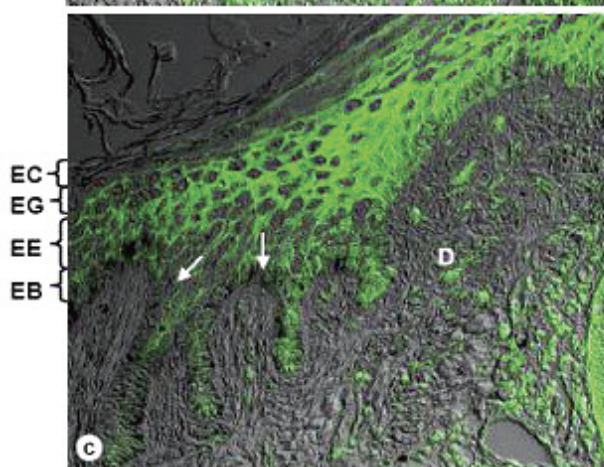


Fig. 3c y 3d
CD44
CBC Morfeiforme

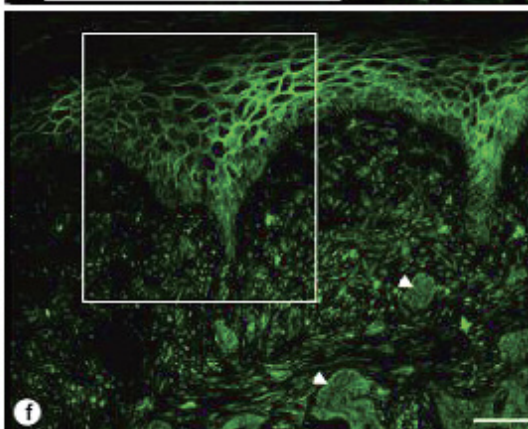
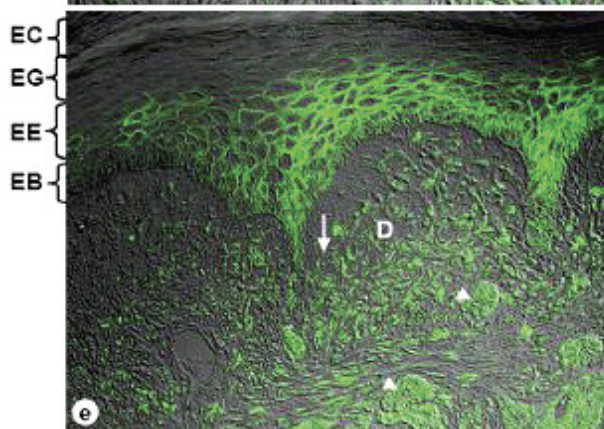


Fig. 3e y 3f
CD44
CBC Morfeiforme

El contraste por interferencia diferencial (en inglés *Differential Interference Contrast*, DIC) y la inmunofluorescencia, ambos analizados por microscopía confocal reveló una fuerte inmunoreactividad para CD44 la cual estaba localizada en los engrosamientos de la epidermis (Figs. 3a-f). Específicamente, esta glicoproteína fue hallada restringida a los estratos basal y espinoso delineando los márgenes y los puentes intercelulares de las células basales y suprabasales que estaban orientadas hacia la dermis papilar (Fig. 3a-f), mientras que otras células aparecían dispuestas

en forma de cordones e invadiendo la dermis papilar (Fig 3e). De manera interesante, la presencia de CD44 se observó interrumpida en aquellas células basales que exhibían protrusiones membranales o lamelipodios y que parecían estar separándose y migrando hacia la dermis papilar (Figs. 3g-j), así como también en aquellas células basales que probablemente, acompañadas de algunas suprabasales, habían invadido colectivamente esa región (Figs. 3k,l). Cuando la intensidad de la fluorescencia en función de la distancia fué examinada en tres regiones de esas biopsias y

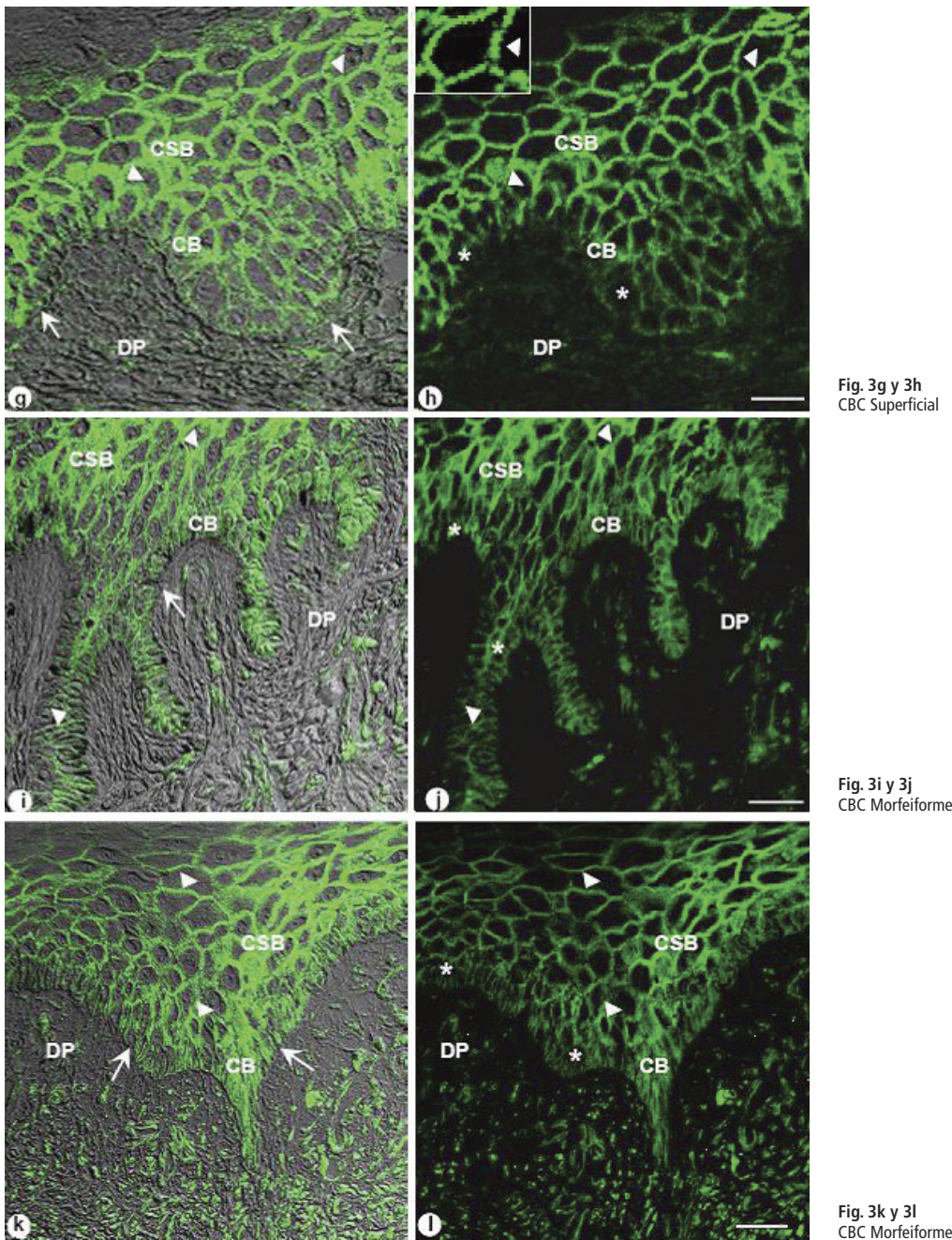


Fig. 3g y 3h
CBC Superficial

Fig. 3i y 3j
CBC Morfeiforme

Fig. 3k y 3l
CBC Morfeiforme

Figura 3.

Superposición de imágenes de microscopía de interferencia diferencial (a,c,e,g,i,k) e imágenes de fluorescencia (b,d,f,h,j,l) obtenidas con un microscopio confocal, de cortes desparafinados de una zona de un CBC superficial (a,d,g,h) y de dos zonas de un CBC morfeiforme (c-f, i-l) inmunomarcadas con anti-CD44 exhibiendo la epidermis engrosada. En ambos carcinomas (a-f) es posible distinguir una fuerte inmunoreactividad para CD44 restringida a las células de los estratos basal (EB) y espinoso (EE), particularmente en aquellas orientadas hacia la dermis (D). Las flechas indican la dirección de la migración. Las cabezas de flechas en figura "e" señalan ocasionales nidos que representan cordones de células basales y suprabasales seccionados transversalmente. EG = estrato granuloso. EC = estrato córneo. Barra = 120µm. A mayor aumento es posible distinguir al CD44 delineando los márgenes y los puentes intercelulares (cabezas de flechas) de las células basales (CB) y suprabasales (CSB). Note que la presencia de CD44 se observa interrumpida en aquellas células basales que exhiben protrusiones membranales (asteriscos) y parecen separarse y migrar hacia la dermis papilar (DP) (g-l), así como también en aquellas CB y CSB que han invadido esa región (k,l). Las flechas señalan las discontinuidades en la membrana basal (g,i,k). El inserto destaca los puentes intercelulares. Barra = 40µm.

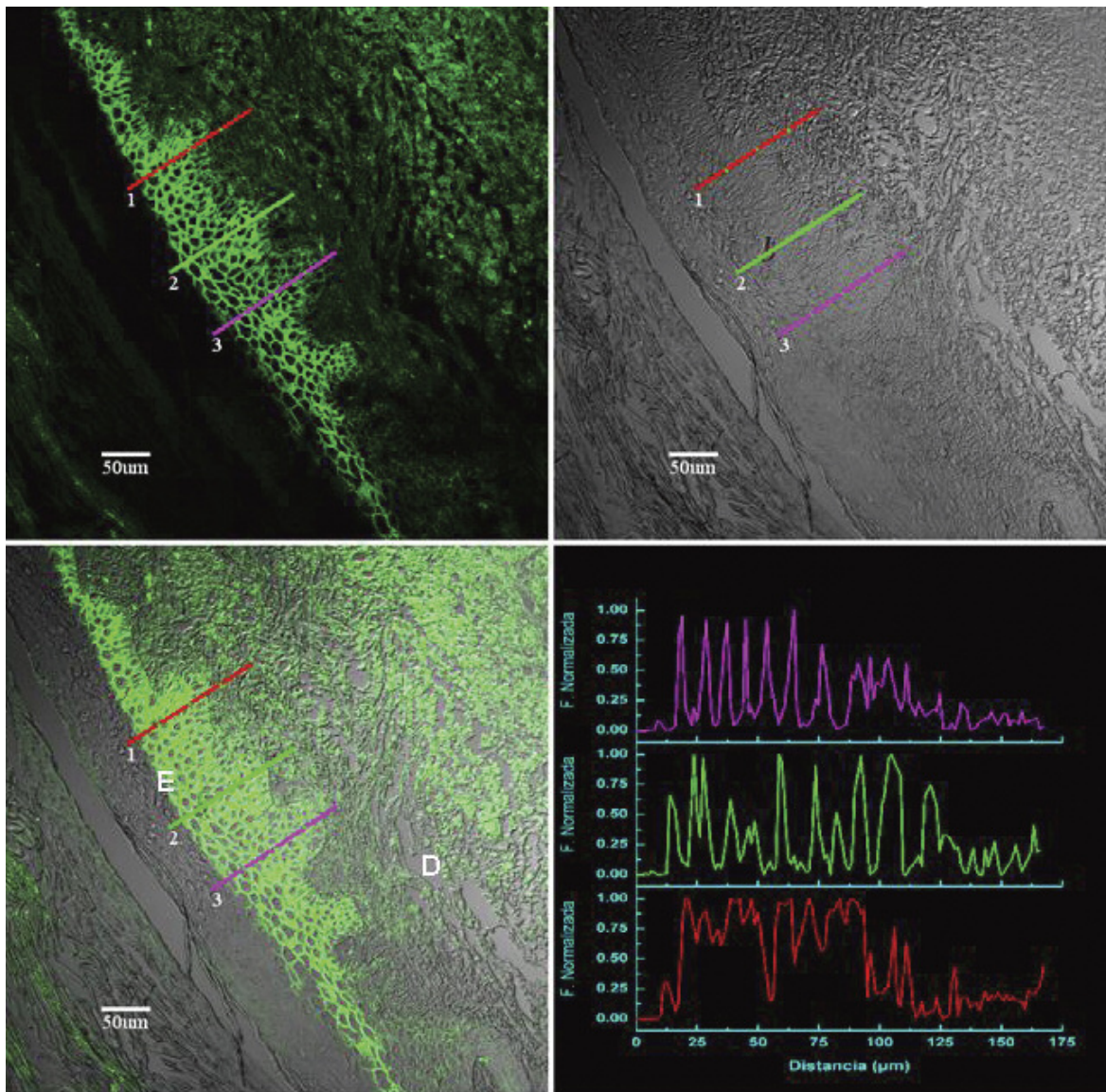


Fig. 4a
CD44
CBC Superficial

comparada con la biopsias obtenidas de piel normal, encontramos que ella era mayor en las biopsias de CBC que en las de piel normal si comparamos los perfiles de fluorescencia normalizada observada en un CBC y con la de una piel normal (compare Fig. 4a con Fig. 4b). Adicionalmente, en las secciones en las cuales el anticuerpo primario fue omitido o reemplazado por PBS (control negativo) no se detectó inmunoreactividad (Figura no mostrada).

Inmunolocalización in vivo de p-c-Src

En este estudio también investigamos si la forma activada o fosforilada de c-Src estaba presente en las biopsias de CBC superficial y CBC morfeiforme que exhibían la epidermis engrosada o hiperplásica.

Inmunolocalización con anti-fosfo c-Src (p-c-Src) (Tyr419) demos-

tró que esta tirosina quinasa estaba localizada en los márgenes y puentes intercelulares de las células basales y supra-basales que conformaban los estratos basal y espinoso, respectivamente (Figs. 5a-d). De manera importante, p-c-Src también estaba presente en los lamelipodios o protrusiones de aquellas células que estaban migrando hacia la dermis papilar (Figs. 5e-h).

Discusión

El presente estudio *in vivo* provee evidencias que nos permiten sugerir que la hiperplasia epidérmica o los engrosamientos de la epidermis observados en las biopsias de pacientes con diagnóstico de CBC superficial o CBC morfeiforme además de incluir la proliferación de algunos queratinocitos basales y suprabasales, también podría involucrar de manera importante la migración e

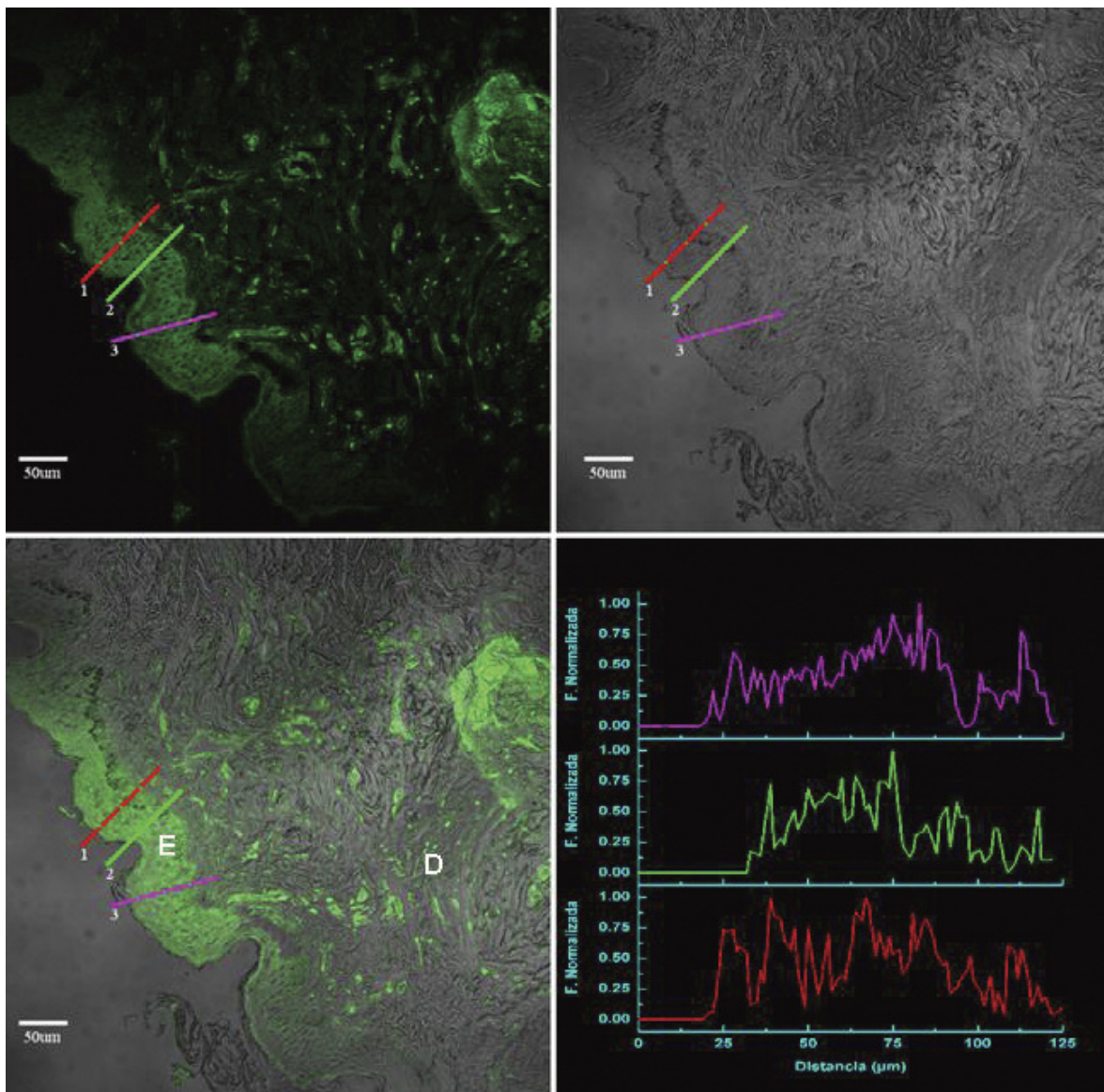


Fig. 4b
CD44
Piel normal

Figura 4.

Imágenes de microscopía de interferencia diferencial e imágenes de fluorescencia obtenidas de un corte de CBC superficial (a) y de un corte de piel normal inmunomarcadas con anti-CD44. Las líneas a color indican la fluorescencia total en función de la distancia, mientras que las gráficas muestran la fluorescencia normalizada (Fn) expresada en unidades arbitrarias.

invasión colectiva de estas células hacia la dermis, donde CD44 y la forma activada o fosforilada de la tirosina quinasa c-Src (p-c-Src) parecen desempeñar un papel crucial.

Esta afirmación estaría basada principalmente en nuestro análisis histológico el cual mostró que en algunas zonas de la epidermis, las células basales y suprabasales estaban organizadas en capas cohesivas o multicelulares que parecían estar migrando hacia la dermis papilar, manteniéndose juntas a través de puentes intercelulares o uniones célula-célula. De igual manera nuestro

análisis también permitió distinguir algunas células basales extendiendo protrusiones membranales o lamelipodios indicando que tanto una adhesión moderada como la migración colectiva podrían estar ocurriendo. Es importante señalar que actualmente estos eventos celulares son considerados como relevantes para la migración e invasión colectiva la cual, de acuerdo con algunos estudios recientes, parece ocurrir no solo durante la morfogénesis y la reparación tisular, sino también durante la progresión de muchos tumores^{5,6,8}. Como se mencionó al principio, en este estudio también investigamos la presencia y localización de CD44

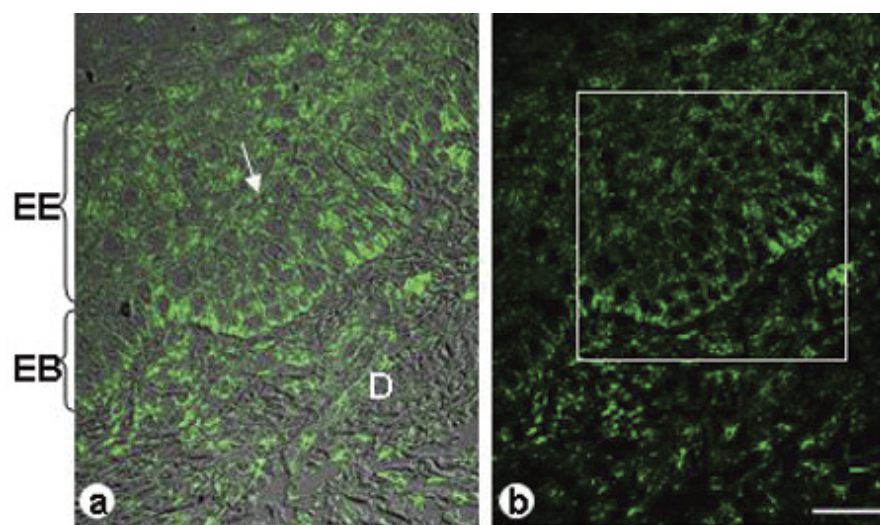


Fig. 5a y 5b
p-c-Src (Tyr419)
CBC Superficial

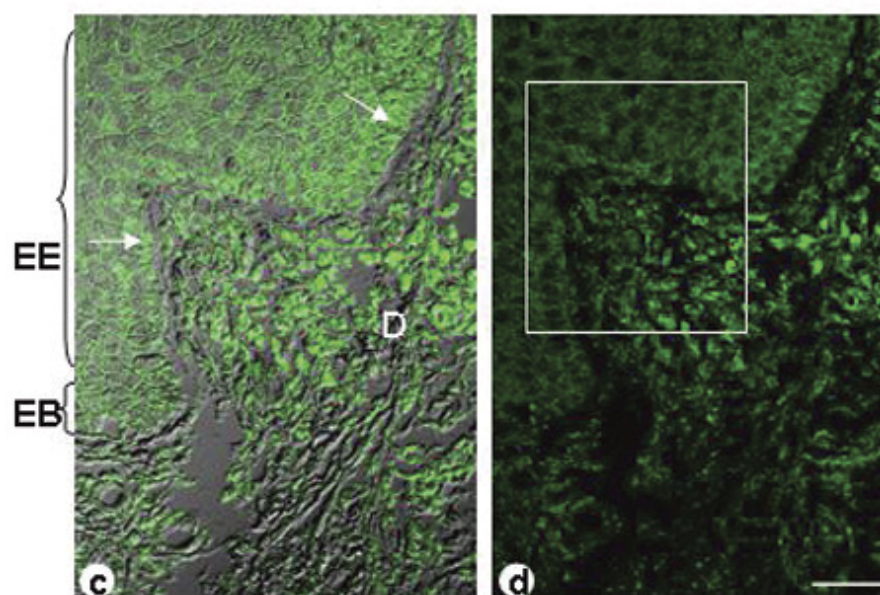


Fig. 5c y 5d
p-c-Src (Tyr419)
CBC Morfeiforme

en las epidermis hiperplásicas o engrosadas. Notablemente, una fuerte inmunoreactividad para CD44 fue detectada exclusivamente en los estratos basal y espinoso delineando los márgenes y los puentes intercelulares de las células basales y suprabasales que estaban orientadas hacia la dermis papilar. Esta inmunoreactividad aparecía interrumpida en aquellas células basales que exhibían protrusiones membranales y parecían estar separándose del estrato basal y migrando hacia la dermis papilar, así como en aquellas que ya habían invadido esa región. A este respecto, resulta importante destacar que en piel normal de humano la expresión de CD44 es generalmente débil y se encuentra restringida en el estrato basal y espinoso²⁰.

La presencia de CD44 en la epidermis hiperplásica es consistente con aquellos estudios relacionados con carcinomas de piel no melanoma que han indicado que esta glicoproteína transmembranal es localizada principalmente en aquellos sitios de invasión celular^{12,13}. Otros estudios también realizados en modelos animales han sugerido que la expresión de CD44 aumenta en los procesos inflamatorios cutáneos agudos y sub-agudos¹⁵. En este contexto, estudios realizados también en modelos animales han demostrado que la exposición a radiaciones UV causa hiperplasia epidérmica caracterizada por acumulación de ácido hialurónico y aumento en la expresión de CD44, sugiriendo que ambas alteraciones podrían ser consideradas como marcadores en el desarrollo temprano de transformación maligna²⁰. En cuanto a la

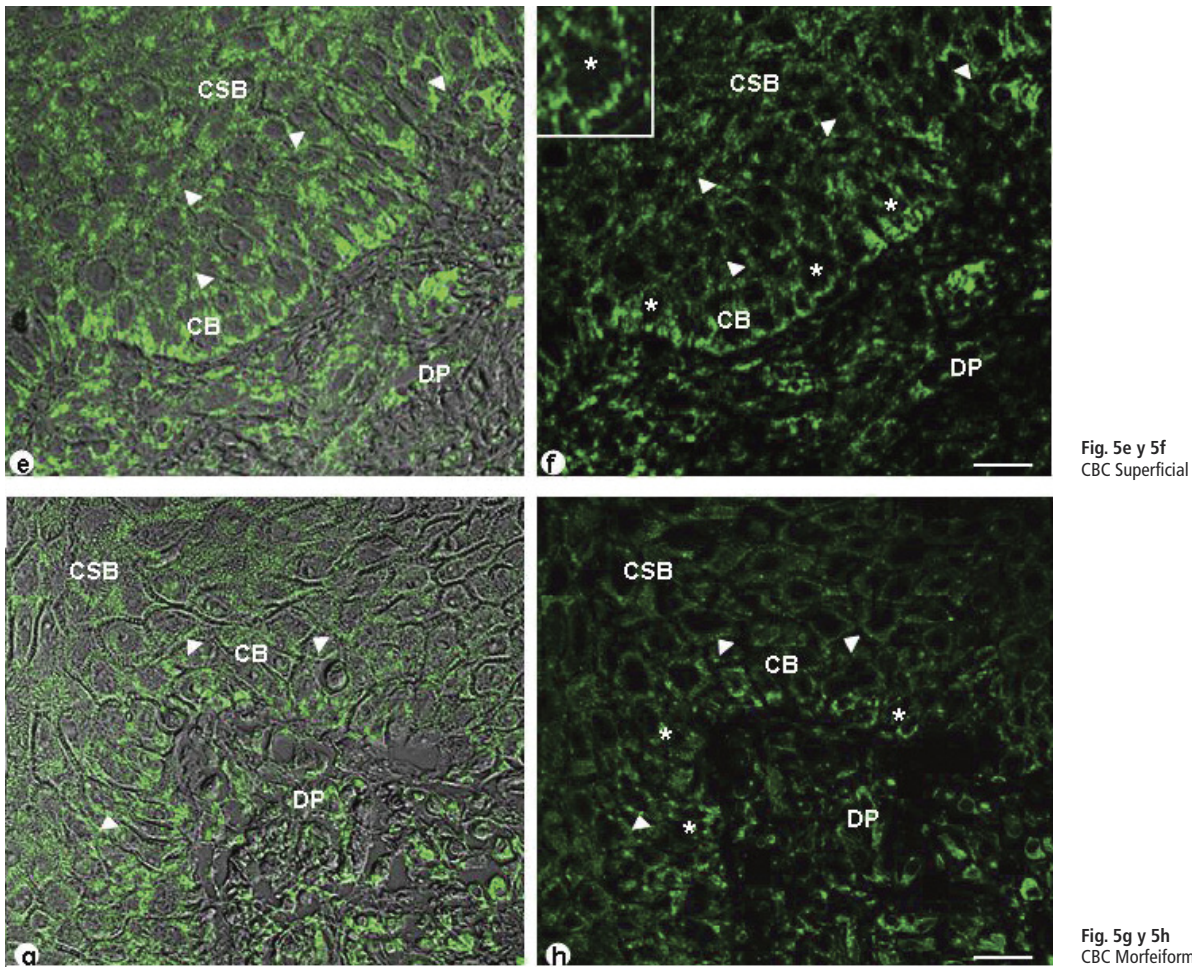


Fig. 5e y 5f
CBC Superficial

Fig. 5g y 5h
CBC Morfeiforme

Figura 5.

Superposición de imágenes de microscopía de interferencia diferencial (a,c,e,g) e imágenes de fluorescencia (b,d,f,h) obtenidas con un microscopio confocal de cortes desparafinados de una zona de un CBC superficial (a,d,g,h) y de una zona de un CBC morfeiforme inmunomarcadas con fosfo-c-Src (Tyr419) (p-c-Src) exhibiendo la epidermis engrosada. En ambos carcinomas una fuerte inmunoreactividad para p-c-Src se distingue en las células de los estratos basal (EB) y espinoso (EE), particularmente en aquellas orientadas hacia la dermis (D). Las flechas indican la dirección de la migración. Barra = 60µm. A mayor aumento se observa a p-c-Src en los márgenes y puentes intercelulares (cabezas de flechas) de las células basales (CB) y suprabasales (CSB), así como también en las protrusiones membranales de las células migrando hacia la dermis papilar (asteriscos, DP). El inserto destaca las protrusiones. Barra = 25µm.

importancia de la preservación de las uniones célula-célula durante la migración colectiva, un estudio reciente realizado con células epiteliales transformadas ha sugerido que la presencia de la proteína p120-catenina, que es un componente de las uniones célula-célula, parece ser necesaria para mantener esas uniones, las cuales son requeridas para la invasión colectiva de las células tumorales *in vivo*²¹. En este mismo orden de ideas, recientemente se ha propuesto que los niveles de expresión de CD44 permitirían que la célula permanezca inmóvil, migre lenta o rápidamente, de manera que estos niveles determinarán si la migración ocurrirá en forma de grupos multicelulares o de manera individual mientras estén o no presentes las uniones célula-célula¹¹.

En este estudio también investigamos la presencia y localización de la forma activada o fosforilada de c-Src en las biopsias que exhibían una epidermis hiperplásica tomando en cuenta que reportes previos han propuesto una asociación entre CD44 y la tirosina quinasa c-Src durante la migración de células tumorales¹⁶ y que una elevada expresión de c-Src activado ha sido recientemente reportada en CBC y cáncer espinocelular y no en piel normal²². De manera interesante, c-Src activado fue localizado en las uniones célula-célula exhibiendo un patrón similar al observado para CD44, así como también en las protrusiones membranales donde la presencia de CD44 aparecía interrumpida. A este respecto, estudios realizados en células tumorales¹⁷⁻¹⁹ y

endoteliales embrionarias²³ han sugerido que cuando c-Src está activado participa durante la adhesión célula-matriz extracelular así como en la formación de las uniones célula-célula activando algunas de las proteínas involucradas en estas uniones tales como α -, β - y p120-cateninas. Basados en nuestras observaciones y en los resultados reportados por otros, creemos que la activación de CD44 (por ejemplo, vía enlace del ácido hialurónico o por efecto de las radiaciones UV) estaría promoviendo la activación de c-Src y que éste a su vez podría activar o fosforilar a algunas de las proteínas que están presentes en las uniones entre queratinocitos tales como α -, β - y p120-cateninas contribuyendo de esta manera, junto con el CD44, al mantenimiento de las uniones célula-célula y que cuando estas uniones comienzan a perderse, como ocurre durante la formación de las protrusiones membranales y la migración e invasión colectiva, la presencia de CD44 se observa interrumpida y la distribución de p-c-Src alterada.

Finalmente, estas consideraciones y aquellas observaciones reportadas por otros, nos permitirían sugerir un posible papel para CD44 y p-c-Src en la hiperplasia epidérmica observada en los CBC examinados en este estudio. ●

Referencias

- Marghoob AA. Skin cancers and their etiologies. *Semin Cutan Med Surg* 2011; 30: S1-5.
- Kasper M, Jaks V, Hohl D, Toftgård R. Basal cell carcinoma - molecular biology and potential new therapies. *J Clin Invest* 2012; 122: 455-63.
- Crowson AN. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. *Modern Pathol* 2006; 19: S127-47.
- Vantucho A and Curik R. Histological types of basal cell carcinoma. *Scripta Med (Brno)*. 2006; 79: 261-70.
- Friedl P, Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2009; 10: 445-57.
- Friedl P, Alexander S. Cancer invasion and the microenvironment: Plasticity and reciprocity. *Cell* 2011; 147: 992-09.
- Kawauchi T. Cell adhesion and its endocytic regulation in cell migration during neural development and cancer metastasis. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 4564-90.
- Llina O and Friedl P. Mechanisms of collective cell migration at a glance. *J Cell Sci* 2009; 122: 3203-08.
- Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 33-45.
- Zöller M. CD44 can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nature Rev Cancer* 2011; 11: 254-67.
- Gritsenko PG, Ilina O, Friedl P. Interstitial guidance of cancer invasion. *J Pathol* 2012; 226: 185-99
- Koert P, Dingemans MD, Steven TP. CD44 is exposed to the extracellular matrix at invasive sites in basal cell carcinomas. *Lab Invest* 2002; 82: 313-322.
- Son KD, Kim TJ, Lee YS, Park GS, Han KT, Lim JS, Kang CS. Comparative analysis of immunohistochemical markers with invasiveness and histologic differentiation in squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma of the skin. *J Surg Oncol* 2008; 97: 615-20.
- Tuhkanen AL, Agren UM, Tammi RH. CD44 expression marks the onset of keratinocyte stratification and mesenchymal maturation into fibrous dermis in fetal human skin. *J Histochem Cytochem* 1999; 47: 1617-24.
- Man M, Elias PM, Man W, Wu Y, Bourguignon LY, Feingold KR, Man MQ. The role of CD44 in cutaneous inflammation. *Exp Dermatol* 2009; 18: 962-68.
- Alper O and Bowden ET. Novel insights into c-Src. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 1119-30.
- Kim LC, Song L, Haura EB. Src Kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature Rev Clin Oncol* 2009; 6: 587-95.
- Guarino M. Src signaling in cancer invasion. *J Cell Physiol* 2010; 223: 14-26.
- Bourguignon LY, Zhu H, Shao L, Chen YW. CD44 interaction with c-Src kinase promotes cortactin mediated cytoskeleton function and hyaluronic acid-dependent ovarian tumor cell migration. *J Biol Chem* 2001; 276: 7327-36.
- Siiskonen H, Torronen K, Kumlin T, Rilla K, Tammi MI, Tammi RH. Chronic UVR causes increased immunostaining of CD44 and accumulation of hyaluronan in mouse epidermis. *J Histochem Cytochem* 2011; 59: 908-17.
- Macpherson IR, Hooper S, Serrels A, McGarry L, Ozanne BW, Harrington K, Frame MC, Sahai E, Brunton VG. p120-catenin is required for the collective invasion of squamous cell carcinoma via a phosphorylation independent mechanism. *Oncogene* 2007; 26: 5214-28.
- Lee JH, Pyon JK, Kin DW, Lee SH, Nam HS, Kim CH, Kang SG, Lee YJ, Park MY, Jeong DJ, Cho MK. Elevated c-Src and c-Yes expression in malignant skin cancers. *J Exp Clin Cancer Res* 2010 ; 29: 116-22.
- Arciniegas E, Carrillo LM, Rojas H, Cardier J. Integrin-mediated endothelial cell adhesion and activation of c-Src, EGFR and ErbB2 are required for endothelial mesenchymal transition. In: *Pulmonary Hypertension: From bench research to clinical challenges*. Edited by Sulica R, Preston I. INTECH open science. 2011; 25-48.