

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**EVALUACIÓN DE NEOGENINA-1 COMO GEN BLANCO DE LA
VÍA SONIC HEDGEHOG EN CARCINOMA BASOCELULAR**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster
en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica Clínica y memoria
para optar al Título de Bioquímico por:

BÁRBARA SOFÍA CASAS ATALA

Directora de Tesis

Dra. Verónica Palma

Co-dirección

Dra. Daniela Seelenfreund

SANTIAGO – CHILE

Abril, 2015

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER Y TÍTULO DE BIOQUÍMICO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por la candidata:

BÁRBARA SOFÍA CASAS ATALA

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, área de especialización en Bioquímica Clínica; y al título de Bioquímico, en el examen público rendido el día

Directora de Tesis:

Dra. Verónica Palma Alvarado

Co-directora de Tesis:

Dra. Daniela Seelenfreund Hirsch

Comisión Informante de Tesis:

Dra. Carmen Romero Osses

Dra. Jenny Fiedler Temmer

Dr. Álvaro Glavic Maurer

A mi familia, que amo con locura.

A Emiliano Matías Molina Reyes.

AGRADECIMIENTOS

Me es difícil encontrar a quién no agradecer por el desarrollo de esta tesis, que para mí corresponde no sólo al culmino de un camino que comenzó hace mucho, sino al comienzo de otro, que espero sea tanto o más gratificante que este. Me siento muy afortunada y agradezco a todos quienes se han cruzado en mi camino, pero quisiera agradecer en esta ocasión y de forma especial, a aquellos sin los cuales todo esto hubiera sido imposible.

En primer lugar, agradezco enormemente a mi familia, a todos y cada uno (¡vaya, qué somos muchos!), por su amor incondicional, por comprenderme y conocerme en aspectos que ni si quiera yo lo logro, por apoyarme en cada paso y alentarme ante cada dificultad, por ser mi nido y mi refugio, por mantenerme con los pies en la tierra, por enseñarme todo lo que es importante, por hacernos cada día mejores personas. Porque durante todo este largo proceso estuvieron presentes y me soportaron sin si quiera pedirlo, por abrazarme cada vez que lloro (que es un fenómeno frecuente), porque los amo con todo mi corazón.

A mis padres, de quienes espero haber heredado el espíritu, la entrega, el compañerismo, el coraje y la disciplina. De quienes aprendí no sólo a afrontar la adversidad sino a crecer con ella y disfrutarla, a nadar contra la corriente, a ser feliz con lo bueno y cambiar lo malo, a aprender de todo y de todos. Les agradezco por ser mis guías y mis compañeros, por ser mis raíces...porque no podría haber deseado mejores padres que los que tengo.

Agradezco a todos mis profesores de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas por compartir con nosotros aquello que les apasiona. A mis compañeros de carrera, que hicieron de ésta una de las etapas más maravillosas que he vivido.

A mis amigos cercanos por su apoyo incondicional, por darme ánimos siempre, por hacerme sentir que puedo lograrlo todo.

Quiero agradecer a mi tutora Verónica Palma, por recibirme en el laboratorio y guiarme durante el desarrollo de esta tesis, por el apoyo y la exigencia. Por su preocupación humana y por la confianza entregada.

A mi co-tutora D. Seelenfreund y a los miembros de mi comisión evaluadora de tesis, A. Glavic, J. Fiedler y C. Romero, por su compromiso y ayuda, que permitió que esta tesis sea lo que es hoy.

A todos los miembros del laboratorio de Células Troncales y Biología del Desarrollo, por el apoyo científico y emocional. Por todos los seminarios, los comentarios y las preocupaciones. Al Neo-team, ¡vamos que se puede!. A G. Zavala por recibirme y enseñarme cuando llegué al laboratorio; a C. Prieto por ayudarme a desenredar mis datos, por todas las discusiones y conversaciones; a L. Solano y A. Arros, por toda su ayuda y por su amistad.

Al grupo de Biología del Desarrollo en general y a los más cercanos en particular, por acompañarnos mutuamente en los éxitos y los fracasos, por toda su hermosura. A E.Molina por su compañía y apoyo incondicional, por toda su asistencia en Photoshop.

Quiero agradecer también a los miembros del laboratorio del Dr. Brandon Wainwright, C. Adolphe, L. Genovessi, M. Kojic, A. Koon, J. Conaway, por su recibimiento y ayuda durante mi estadía en Australia. A mis *roommates* C. Cortés, E. Elgueta, V. Pont y E. Vlasova por ser mi familia australiana.

A P.Gac, P.Cabané e I.Hurtado del Hospital Clínico de la Universidad de Chile; a E. Bustamante y J. Wettlin de la Fundación Arturo López Pérez, por su enorme colaboración en la obtención y entrega de muestras.

A todas las personas que tuvieron la enorme voluntad de participar en este proyecto como donantes y son los responsables anónimos de esta tesis. A los animales que fueron sacrificados durante este proceso.

Y por último, pero no menos importante. Agradezco al financiamiento entregado por el Departamento de Postgrado y Postítulo de la Universidad de Chile que permitió mi estadía de investigación en el Laboratorio del Dr B. Wainwright en la Universidad de Queensland Australia. Y el financiamiento entregado por CONICYT, dinero de todos los chilenos, que subvencionó mis estudios de Magíster. Espero haber sido una buena elección para ambos.

Desde el fondo de mi corazón, gracias.

Bárbara Sofía Casas Atala

ÍNDICE GENERAL

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER Y TÍTULO DE BIOQUÍMICO	I
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE GENERAL	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
BECAS Y FINANCIAMIENTO	X
ABREVIATURAS	XI
RESUMEN	XIV
ABSTRACT	XV
I. INTRODUCCIÓN	1
1. Cáncer, una de las enfermedades con mayor incidencia a nivel mundial.....	1
2. Carcinoma Basocelular Cutáneo (BCC), uno de los cánceres más comunes en la población caucásica.....	2
3. Sonic Hedgehog, un factor involucrado en tumorigénesis.....	9
4. Neol1, un receptor de dependencia blanco de la vía de Shh/Gli.....	17
5. Neol1 y su expresión en neoplasia.....	20
6. Neol1, un potencial blanco terapéutico en Carcinoma Basocelular.....	22
II. HIPOTESIS	25
III. OBJETIVOS	25
1. OBJETIVO GENERAL.....	25
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	26
1. Obtención de Muestras.....	26
a) Humanas.....	26
i. Sanas.....	26

ii. Patológicas.....	26
b) Murinas.....	27
2. Cultivo.....	27
a) Tratamiento con ciclopamina.....	29
3. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.....	29
4. Extracción de DNA y Genotipificación.....	30
5. PCR cuantitativo.....	30
6. Histología.....	33
7. Inmunotinción.....	33
a) IHQ.....	34
b) IF.....	34
8. Microscopía y análisis de imágenes.....	35
9. Análisis estadístico.....	35
V. RESULTADOS.....	37
1. Evaluación de la expresión de NEO1 y sus ligandos en muestras de piel de pacientes con BCC que poseen sobre activación de la vía SHH/GLI.....	37
a) <i>NEO1</i> , sus ligandos y reporteros de la vía SHH/GLI se expresan en piel sana humana.....	37
b) <i>NEO1</i> aumenta en BCC.....	39
c) Los ligandos de NEO1 se expresan en BCC y sus niveles de mRNA se correlacionan con los de <i>NEO1</i>	41
d) Niveles de mRNA de <i>NEO1</i> y ligandos se correlacionan con actividad de la vía SHH/GLI.....	46
2. Evaluación de la relación entre NEO1 y la proliferación y/o agresividad tumoral en BCC.....	50
a) Niveles de mRNA de <i>NEO1</i> se asocian con agresividad tumoral.....	50
b) La distribución celular de NEO1 en BCC varía con el subtipo histomorfológico.....	52

3. Evaluación de los niveles de NEO1 en la progresión tumoral de BCC murino SHH dependiente.....	55
a) Ratones <i>K14:Ptch1lox/lox</i> generan BCC de tipo agresivo.....	55
b) El mRNA de <i>Neol</i> y sus ligandos se detecta en piel sana de ratón.....	57
c) Los niveles de mRNA de <i>Neol</i> disminuyen en la progresión de BCC murino....	57
VI. DISCUSIÓN.....	64
1. NEO1, un conocido receptor de guía axonal, se expresa en piel humana.....	65
2. GLI1, reportero clásico de la vía SHH/GLI, varía en BCC.....	68
3. NEO1 se comporta como un receptor de dependencia en BCC.....	71
4. NEO1 como efector de la vía SHH/GLI.....	75
5. Diferencias en los niveles de NEO1 tienen relación con agresividad tumoral....	76
6. NEO1 y SHH/GLI son importantes en el surgimiento tumoral y disminuyen con la progresión.....	81
VII. CONCLUSIONES.....	85
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	86
IX. ANEXOS.....	92
1. Documentos.....	92
a) Consentimiento Informado para la obtención de muestras sanas en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile.....	92
b) Consentimiento Informado para la obtención de muestras patológicas en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile.....	95
c) Consentimiento Informado para la obtención de muestras en la Fundación Arturo López Pérez.....	98
2. Figuras.....	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Epidermis y cáncer de piel.....	4
Figura 2. Principales subtipos de BCC.....	6
Figura 3. Vías transduccionales de la señalización de Hedgehog.....	11
Figura 4. Deleción condicional de <i>Ptch1</i> en células basales genera BCC.....	16
Figura 5. Estructura de Neogenina-1 y sus ligandos.....	18
Figura 6. Modelo propuesto del rol de NEO1 en BCC.....	24
Figura 7. Genotipificación de los ratones utilizados para obtención de muestras de piel.....	28
Figura 8. El mRNA de <i>NEO1</i> se detecta en piel sana humana	38
Figura 9. BCC presenta activación de la vía SHH/GLI.....	40
Figura 10. NEO1 aumenta en nódulos de BCC.....	42
Figura 11. Los niveles de mRNA de <i>NEO1</i> se correlacionan con los niveles de sus ligandos <i>NTNI</i> y <i>RGMA</i> en BCC.	44
Figura 12. Tanto NEO1 como sus ligandos se encuentran en los nódulos tumorales del BCC.....	45
Figura 13. Niveles de mRNA de <i>NEO1</i> y ligandos se correlacionan con los niveles de <i>GLII</i>	47
Figura 14. La inhibición de la vía SHH/GLI <i>ex vivo</i> permite modular los niveles de mRNA de <i>NEO1</i> y ligandos.....	49
Figura 15. Los niveles de mRNA de <i>NEO1</i> varían entre BCC indolente y agresivo....	51
Figura 16. NEO1 varía su patrón de distribución en los subtipos de BCC.....	53
Figura 17. Modelo <i>K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}</i> genera BCC de tipo micronodular que progresa con la edad del ratón.....	56
Figura 18. El mRNA de <i>Neo1</i> y sus ligandos se detecta en piel control murina.....	58
Figura 19. La vía SHH/GLI se encuentra sobre-activada en BCC murino.....	60
Figura 20. Los niveles de Neo1 disminuyen con la progresión tumoral.....	60
Figura 21. Los niveles de mRNA de <i>Rgma</i> disminuyen con la progresión tumoral en correlación con los niveles de <i>Neo1</i>	62

Figura 22. Neo1 se localiza en las células basales de la piel de ratón y disminuye cambiando su distribución celular en BCC.....	63
Figura A1. No existen variaciones significativas en los niveles de mRNA acorde al origen de la muestra control.....	100
Figura A2. No existen diferencias significativas los niveles de mRNA entre hombres y mujeres.....	101
Figura A3. Niveles de ligandos Rgm se correlacionan con los niveles de Neo1 en piel sana de ratón.....	102
Figura A4. Los niveles de mRNA de <i>Ntn1</i> , <i>Ntn4</i> , <i>Rgmb</i> varían durante el ciclo folicular.....	103
Figura A5. Los niveles de mRNA de los ligandos de <i>Neo1</i> se correlaciona con los niveles de <i>Gli1</i> en ratones <i>K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}</i>	104
Figura A6. Correlación entre niveles de mRNA de Neo1 y sus ligandos.....	105
Figura A7. Los ligandos de NEO1, NTN1 y RGMA se encuentran en las células basales de la epidermis.....	106

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Subtipos morfohistológicos de las muestras BCC.....	28
Tabla 2. Partidores utilizados para la amplificación por PCR cuantitativo de cDNA humano.....	32
Tabla 3. Sondas Taqman utilizadas para la amplificación de cDNA murino.....	32

BECAS Y FINANCIAMIENTO

1. Becas

- i. Abril 2012 – Febrero 2014: Beca otorgada por CONICYT para Estudios de Magíster en Chile.
- ii. Julio 2014 – Agosto 2014: Beca “Ayudas para estadías cortas de investigación en el extranjero para tesis de Doctorado y Magíster de la Universidad de Chile” otorgada por el Departamento de Posgrado y Postítulo de Universidad de Chile.

2. Financiamiento

- i. Proyecto FONDECYT Regular N° 1140697 “*AUTOCRINE PRODUCTION OF BOTH NETRIN AND ITS RECEPTOR NEOGENIN 1 MEDIATES TUMORIGENESIS IN SONIC HEDGEHOG (SHH)/GLI DRIVEN NEOPLASIA*” otorgado a la Dra. Verónica Palma.

ABREVIATURAS

°C	Grado Celsius
µm	Micrómetros
ACP	Análisis de componentes principales
aprox.	Aproximadamente
BCC	Carcinoma Basocelular
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BMP	<i>Bone Morphogenic Proteins</i>
BrdU	5-Bromo-2-desoxiuridina
BSA	albúmina de suero bovina
CDK1	Ciclina dependiente de quinasa 1
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
cols.	Colaboradores
Ct	Ciclo umbral o <i>threshold</i>
Cyc	Ciclopamina
DAB	3,3-diaminobenzadina
DCC	<i>Deleted in Colorectal Cancer</i>
DEIS	Departamento de Estadística e Información en Salud
Dhh	Desert hedgehog
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótido
Dr.	Doctor
Dra.	Doctora
ETOH	Etanol
FALP	Fundación Arturo López Pérez
Fig.	Figura
FnIII	Fibronectina tipo 3
<i>g</i>	Constante de gravitación

G2/M	Fase <i>Growth</i> o <i>Gap 2</i> /Mitosis
Gapdh	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
Gli	<i>Glioma associated oncogenes</i>
h	Horas
H&E	Hematoxilina-eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
HCUCH	Hospital Clínico de la Universidad de Chile
Hh	Hedgehog
Hip	Huntingtin interacting protein
IARC	Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer
ID	Identificación
IF	Inmunofluorescencia
Ig	Inmunoglobulina
Ihh	Indian hedgehog
IHQ	Inmunohistoquímica
mg	Miligramo
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
min	Minutos
Minsal	Ministerio de Salud
ml	Mililitro
mm ²	Milímetro cuadrado
MPF	Factor promotor de la mitosis
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
n	Número muestral
N°	Número
NBCCS	Síndrome de Carcinoma Basocelular Nevoide
NEO1	Neogenina-1
NTN	Netrina
P/S	Penicilina y Estreptomicina

P13	13 días posnatal
P20	20 días posnatal
P29	29 días posnatal
pb	Pares de bases
PBS	tampón fosfato salino
PCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Ptch	Patched
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa
R	Coefficiente de correlación
RGM	Molécula de guía repulsiva
RNA	Ácido ribonucleico
S	Fase de síntesis
<i>s.b.</i>	Estrato basal (<i>stratum basale</i>)
<i>s.c.</i>	Estrato córneo (<i>stratum corneum</i>)
<i>s.s.</i>	Estrato espinoso (<i>stratum spinosum</i>)
SFB	Suero Fetal Bovino
Shh	Sonic Hedgehog
shRNA	Ácido ribonucleico interferente <i>small hairpin</i>
Smo	Smoothened
T°	Temperatura
UNC5	<i>Uncoordinated 5</i>
UV	Ultravioleta

RESUMEN

El **Carcinoma Basocelular Cutáneo (BCC)**, un tipo de cáncer de piel, es una de las **neoplasias más frecuentes en el ser humano**. Es causado por una desregulación de la vía Sonic Hedgehog/Gli (Shh/Gli), cuya señalización juega un rol importante en la proliferación y mantenimiento de nichos celulares troncales. Comúnmente el BCC se caracteriza por ser poco metastático, sin embargo es capaz de dañar significativamente el tejido y existen subtipos de gran agresividad y recurrencia. Por esto se hace necesario entender mejor esta patología y buscar nuevos blancos terapéuticos y/o marcadores tumorales que ayuden a mejorar la prognosis y tratamiento de esta enfermedad.

Recientemente se reportó que la proteína *Neogenina-1 (NEO1)* es un **blanco transcripcional de la vía Shh/Gli**. NEO1 es un receptor transmembrana de Netrinas y RGM con funciones contexto y ligando dependientes. Se ha postulado que NEO1 pertenece a la familia de receptores de dependencia, entre otras funciones. La habilidad de estos receptores de gatillar apoptosis en ausencia de ligando se ha propuesto como un mecanismo de supresión tumoral, implicado tanto en proliferación como sobrevida de células tumorales. Diversos antecedentes indican que la expresión de *NEO1* varía en distintos tipos de cáncer, relacionándose con su grado de proliferación, indiferenciación, agresividad y sobrevida. Estos antecedentes junto a un estudio piloto desarrollado en el laboratorio de la Dra. Palma que indica la presencia de NEO1 en muestras de BCC, permiten postular que: **“Los niveles de expresión receptor de dependencia NEO1 y su(s) ligando(s) varían en la progresión del BCC ligado a la sobre-activación de la vía de señalización SHH/GLI”**. Para comprobar esta hipótesis se analizó la expresión de mRNA de *NEO1* y sus ligandos por PCR cuantitativo y por inmunotinciones en muestras de pacientes con BCC y muestras de piel sana correlacionándolos con la actividad de la vía SHH/GLI; se evaluó la relación entre los niveles de *NEO1* y sus ligandos con la agresividad tumoral; y por último se analizaron las variaciones de este receptor, sus ligandos y reporteros la vía Shh/Gli en un modelo murino de BCC.

Como principales resultados se observó la presencia de *NEO1* y sus ligandos en piel sana y en BCC y se comprobó que los niveles de *NEO1* y sus ligandos *NTN1* y *RGMA* se correlacionan positivamente con los niveles de *GLII*, un conocido reportero de la vía SHH/GLI. La inhibición de la vía SHH/GLI *ex vivo* produce una disminución de los niveles de mRNA de estos genes. Notablemente, los niveles de expresión de *NEO1*, *RGMA* y *GLII* son menores en las muestras correspondientes a subtipos más agresivos; en la progresión tumoral del BCC murino, dichos niveles disminuyen conforme avanza la enfermedad. El aumento de NEO1 y sus ligandos en las muestras de BCC indolentes podría guardar relación con su rol de receptor de dependencia, promoviendo la proliferación de las células tumorales. En tanto la disminución de NEO1 en subtipos agresivos, guarda relación a lo observado con otros blancos transcripcionales de la vía Shh/Gli y podría estar relacionado con eventos tumorigénicos adicionales.

Se concluye que NEO1 y sus ligandos se encuentran aumentados en BCC en correlación con la actividad de la vía SHH/GLI. NEO1 disminuye en casos agresivos de BCC lo que lo podría postular como un potencial marcador pronóstico tumoral.

ABSTRACT

Basal Cell Carcinoma of the skin (BCC), a type of skin cancer, is one of the most common cancers in humans. It is mainly caused by a deregulation of Sonic Hedgehog/Gli (Shh/Gli) pathway, which plays an important role in proliferation and maintenance of stem cell niches. Commonly, BCC is rarely metastatic, nevertheless it can cause large tissue damage and some aggressive subtypes with great recurrence are known. Therefore a deeper knowledge of this disease is required combined with the search for new therapeutic targets and/or tumor markers that might contribute to improve prognosis and treatment of this pathology.

Recently it has been reported that *Neogenin-1 (NEO1)*, a transmembrane receptor, is a transcriptional target of Shh/Gli pathway. NEO1 is a receptor of Netrin and RGM ligands and has both context and ligand dependent functions. NEO1 has been postulated as a death dependence receptor. In the absence of ligand interaction this kind of receptors can trigger apoptosis; process that has been proposed as a tumor suppression mechanism that could be altered in cancer promoting either proliferation or survival of tumor cells. NEO1 and ligand expression have been reported to vary in different types of cancer, in relation to the degree of tumor proliferation, differentiation, aggressiveness and survival. In addition, a pilot study developed in Dra. Palma's laboratory shows presence of NEO1 in BCC samples. These findings lead us to propose that: **“Neogenin-1 and ligand levels of expression vary in BCC tumor progression, relating with SHH/GLI pathway overactivation”**. To test this hypothesis both NEO1 and ligand mRNA levels were quantified by qPCR and assessed by immunostaining on human BCC and healthy skin samples, correlating these results with SHH/GLI pathway activity; correlation between NEO1 and ligand levels with aggressiveness was assessed; and finally, variations in NEO1, ligand and SHH/GLI readouts levels were assessed in a BCC mouse model.

As key results, presence of NEO1 and ligand was detected in healthy skin and in BCC. *NEO1* and ligands (*NTN1* and *RGMA*) mRNA levels presented a positive correlation with *GLII* levels, a classical SHH/GLI readout. Pharmacological inhibition of SHH/GLI pathway *ex vivo* decreased mRNA levels of these genes. Noteworthy, *NEO1*, *RGMA* and *GLII* levels were found to be significantly lower in aggressive subtypes of BCC and, in addition, a decrease their levels with tumor progression was observed.

The increase of NEO1 and ligand in BCC samples could be related with its role as a death dependence receptor, promoting tumor cell proliferation. Meanwhile the decrease of NEO1 in aggressiveness could be related with additional tumorigenic events similar to what has been reported for other SHH/GLI transcriptional targets.

In conclusion, NEO1 and its ligand are upregulated in BCC in relation to deregulation of the SHH/GLI pathway. NEO1 is decreased in aggressive BCC subtypes; therefore it is possible to evaluate NEO1 as a potential prognosis marker.

I. INTRODUCCIÓN

1. Cáncer, una de las enfermedades con mayor incidencia a nivel mundial.

Cáncer es el nombre genérico dado a un grupo de patologías, conocidas como tumores malignos o neoplasias, que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo y que se caracterizan por la proliferación descontrolada de células anormales que se extienden por sobre los límites normales, pudiendo invadir tejidos adyacentes y también propagarse a otros órganos (proceso conocido como metástasis).

Los datos recopilados por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, del inglés **I**nternational **A**gency for **R**esearch on **C**ancer) permiten predecir que 1 de cada 5 personas en el mundo tendrá algún tipo de cáncer durante su vida y que 1 de cada 9 personas fallecerá a causa de algún tipo de cáncer (IARC, 2008). En Chile el cáncer es la segunda causa de muerte en la población alcanzando un 27% del total de defunciones para el año 2010 (DEIS, 2012). Estas estadísticas dan cuenta de una enfermedad que se ha vuelto extremadamente agresiva durante los últimos años, razón por la cual actualmente es un tema de importancia a nivel gubernamental para el desarrollo de políticas de salud pública y se ha desarrollado como un gran foco de investigación en todo el mundo.

Es por ello que hoy en día se ha vuelto crucial entender los factores moleculares y genéticos que guían la génesis y el desarrollo de esta enfermedad con el fin de desarrollar terapias que se dirijan de manera específica a estos factores y permitan mejorar los índices de diagnóstico temprano y pronóstico de supervivencia. La inserción

de un nuevo biomarcador de mayor sensibilidad que permita una detección precoz del cáncer podría aumentar significativamente la sobrevida del paciente; la detección oportuna de esta patología amplía la posibilidad de tratamientos no invasivos, pudiendo mejorar en muchos casos la calidad de vida de los pacientes oncológicos.

2. Carcinoma Basocelular Cutáneo (BCC), uno de los cánceres más comunes en la población caucásica.

La piel es uno de los órganos más extensos del cuerpo y el cáncer cutáneo una de las neoplasias malignas más comunes en la población caucásica a nivel mundial (IARC, 2008). Su incidencia en Estados Unidos ha aumentado en un 2,8% al año entre el 2005 y el 2009 (American Cancer Society, 2013). En Chile la incidencia de este tipo de neoplasia varía acorde a la localización y el sexo, teniendo una tasa de incidencia (por cada 100.000 habitantes) del 74,7 y 59,5 en hombres y mujeres de la Región de Antofagasta respectivamente, contrastada con una incidencia de 19,1 y 20,9 en hombres y mujeres de la provincia de Valdivia respectivamente (Minsal, 2012).

La piel corresponde a un epitelio poliestratificado en la que se distinguen 3 capas principales: la epidermis, la dermis y la hipodermis o tejido subcutáneo, siendo la primera de ellas la capa más externa. Además de estas capas forman parte de este órgano también otras estructuras como la glándula sebácea y el folículo piloso. La piel constituye la primera barrera frente a las adversidades del medio ambiente, estando la epidermis y el folículo piloso en constante renovación; en ambos existen nichos de células troncales que posibilitan este proceso. Recientemente se ha planteado que la

existencia de células troncales podría guardar relación con el desarrollo de números cánceres epiteliales (Fig. 1).

La epidermis presenta varias capas entre las que se encuentran: el estrato córneo, granuloso, espinoso y basal, y es en esta última capa en donde se encuentran células en estado altamente proliferativo. Las células que componen la capa basal, son las que se diferencian y mueven hacia capas superiores para renovar la epidermis (Blanpain & Fuchs, 2009; Fuchs, 2007; Kasper y cols., 2012; Schneider y cols., 2009).

Los cánceres a la piel se dividen normalmente en dos grupos: melanoma y no-melanoma. El melanoma cutáneo maligno es responsable del mayor porcentaje de mortalidad, sin embargo el cáncer no-melanoma es el de mayor incidencia entre los cánceres cutáneos (Elder, 1995). El cáncer de piel no-melanoma se refiere principalmente al Carcinoma Basocelular (BCC), Carcinoma Espinocelular y otros tumores menos frecuentes como linfomas, Carcinomas de las Células de Merkel, Sarcoma de Kaposi, angiosarcomas, Enfermedad de Paget e histiocitomas malignos (Madan y cols. 2010).

El BCC corresponde a una de las neoplasias más frecuentes en el ser humano y tiene, junto con el carcinoma espinocelular, prevalencia universal con la edad (Madan y cols. 2010). Clínicamente el BCC aparece como nódulos telangectásicos con o sin ulceración o como parches endurecidos, eritematosos o ulcerados con un borde discreto, en algunos casos pigmentado. Morfológicamente incluye a un grupo de tumores intraepidérmicos con fenotipo de célula basal que se extienden hacia la dermis.

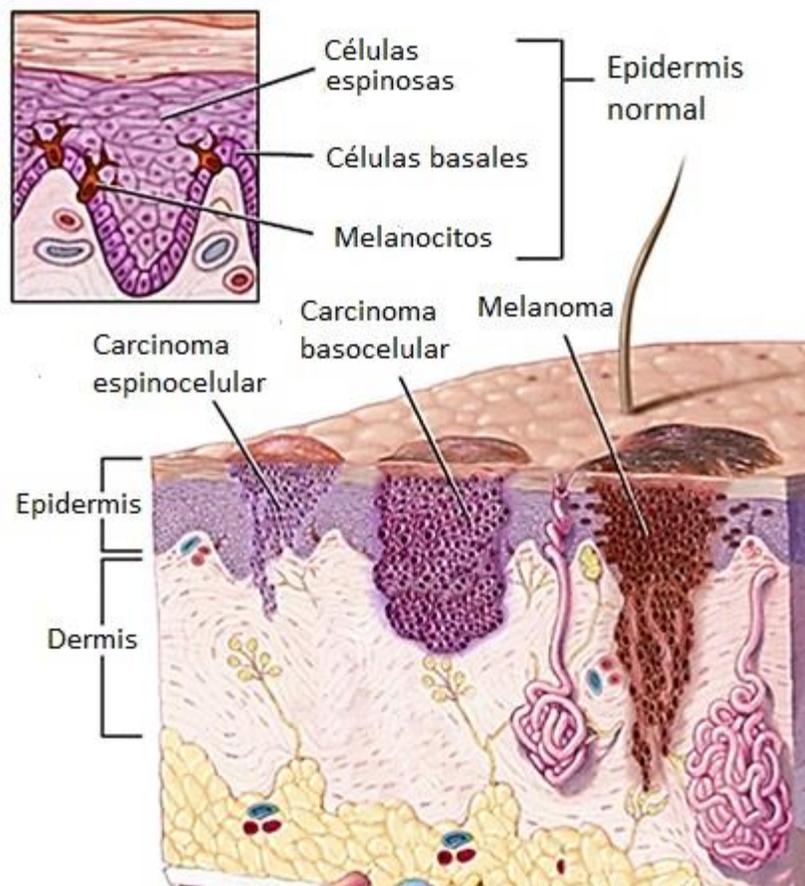


Figura 1. Epidermis y cáncer de piel. La epidermis, constituye la capa más externa de la piel, y consta de 3 estratos principales: el estrato córneo (*s.c.*) que corresponde a la capa más externa compuesta principalmente de células muertas; estrato espinoso (*s.s.*) constituido por las células espinosas y el estrato basal (*s.b.*) constituido por las células basales de la epidermis. El carcinoma basocelular se origina en las células basales, que son las que proliferan y se diferencian a las capas superiores. A medida que las células se mueven hacia la superficie se vuelven células espinosas, que son las que se expanden en el carcinoma espinocelular. El melanoma se origina a partir de la transformación de células pigmentadas llamadas melanocitos (Modificado de Mayo Foundation MER; Fuchs, 2007).

La incidencia de BCC está asociada a la exposición con radiación UV. Es por ello que se desarrolla principalmente en la piel expuesta al sol, aumenta con la edad y es más común en fenotipos con piel clara, siendo de riesgo tanto la exposición aguda como la acumulación de radiación a lo largo de la vida. El BCC es muy común en adultos mayores y resulta raro en la palma de la mano, planta del pie y en niños. Riesgos adicionales son la radiación ionizante, el arsénico y la supresión inmune (Kasper y cols. 2012; Wong y cols. 2003).

A nivel histopatológico el BCC puede ser clasificado en diversos subtipos: superficial, nodular, micronodular, infiltrante y esclerosante, los cuales difieren no sólo en su morfología sino en su comportamiento y patrón de crecimiento. Es por ello que se han diferenciado entre BCC de subtipo indolente: superficial y nodular; y de tipo agresivo: micronodular, infiltrante y esclerosante (Fig. 2) (Kasper y cols., 2012; Yu y cols., 2008). La correcta identificación entre estos subtipos es importante en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del BCC.

El BCC de subtipo indolente, en especial el nodular, es la forma más común en la que se encuentra esta neoplasia en la población, por lo que se describe al BCC como un tipo de cáncer poco metastático. Sin embargo, al no ser tratado, es capaz de dañar considerablemente el tejido circundante.

Se ha observado que los BCCs más agresivos presentan un mayor índice apoptótico que aquellos más indolentes. Si bien esto puede considerarse contradictorio, se ha discutido que el BCC se encuentra dentro de los tumores causado más que por un

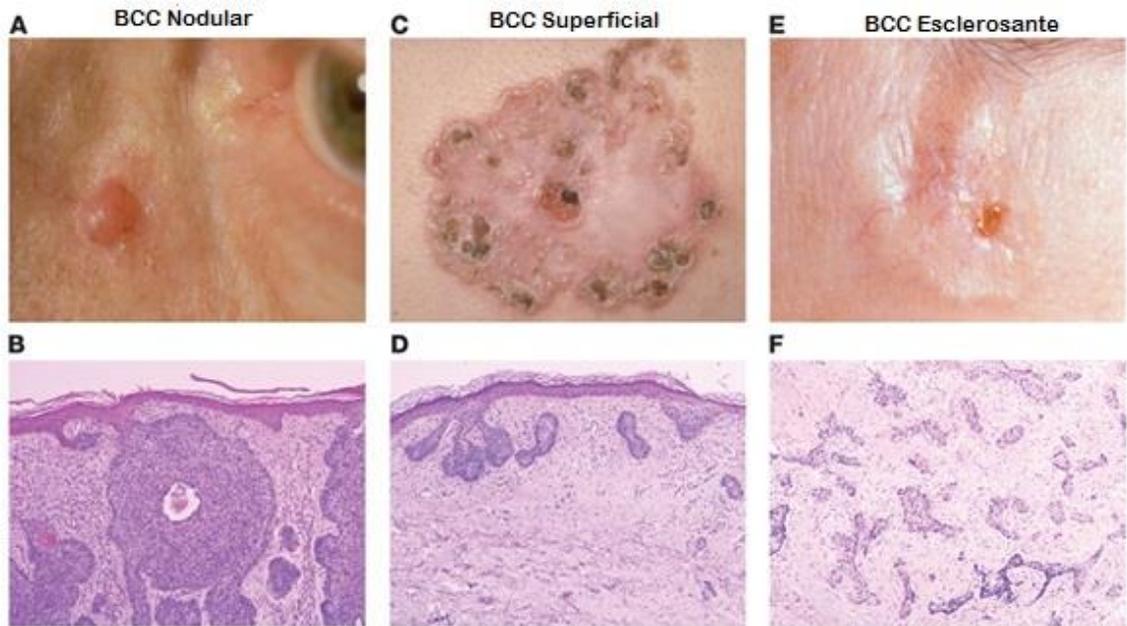


Figura 2. Principales subtipos de BCC. (A, C y E) Vistas macroscópicas de los tumores. (B, D y F) Vistas microscópicas por tinción histológica hematoxilina-eosina (H&E). Se aprecian las diferencias entre la morfología y comportamiento de invasión dermal de los tumores indolentes (A y B) nodular, (C y D) superficial en contraste con un subtipo agresivo esclerosante (E y F). (Modificado de Kasper y cols. 2012)

aumento en la tasa proliferativa, por una disminución de la muerte celular. Este tipo de tumores se caracteriza por poseer células tumorales de lento crecimiento, lo que las expone a los continuos factores de riesgo como la luz UV, permitiendo así nuevos procesos de mutagénesis que afecten a oncogenes y la pérdida de la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 que mantenían el tumor en estado “quiescente” (Crowson y cols. 1996; Tilli y cols. 2002). Estos y otros antecedentes indican que el BCC, si bien en su mayoría es indolente, puede variar enormemente en su comportamiento y desarrollo, por lo que resulta importante comprender los factores moleculares detrás del desarrollo y progresión de esta neoplasia.

La génesis molecular del BCC se ha asociado con la sobre-activación de la vía Sonic Hedgehog/Gli (Shh/Gli), una vía que se encuentra principalmente activa durante la embriogénesis de vertebrados y que en el adulto se encuentra involucrada en la homeostasis de diversos tejidos, entre éstos, en la mantención de la piel, estando vinculada tanto en los procesos de diferenciación de ésta como en el ciclo del folículo piloso (Blanpain & Fuchs, 2009; Ghali y cols., 1999; Lobo y cols. 2007).

La primera asociación entre BCC y la vía Shh/Gli ocurrió con el descubrimiento de que mutaciones de pérdida de función en el receptor canónico de Shh, Patched1 (*PTCH1*), se relacionaban con el Síndrome de Carcinoma Basocelular Nevoide (NBCCS, del inglés **N**evoid **B**asal **C**ell **C**arcinoma **S**ndrome), también conocido como Síndrome de Gorlin. Los pacientes con este síndrome poseen una mutación de *PTCH1* en la línea germinal y son susceptibles a desarrollar BCC y meduloblastomas (Li y cols., 2011).

Se ha reportado que *Ptch1* posee un rol en la regeneración cutánea al limitar el tamaño del compartimiento de células progenitoras y permitir la diferenciación del linaje celular que forma el folículo piloso. La pérdida de *Ptch1* en células basales promueve la proliferación celular y limita la diferenciación de éstas, produciendo un fenotipo tipo BCC. Por tanto, la pérdida de *Ptch1* es suficiente para producir la formación de tumores cutáneos, identificándose un posible origen del BCC en la células basales o en la zona del *bulge* del folículo piloso (Adolphe y cols., 2006; Villani y cols., 2010). Sumado a esto se ha observado que alteraciones en otros componentes de la vía *Shh*, como mutaciones de ganancia de función del co-receptor *Smoothed* (*Smo*) y anomalías en los factores de transcripción activadores *Gli1* y *Gli2* también producen BCC (Li y cols., 2011). Sin embargo, no se ha determinado si el desarrollo tumoral, producido por la desregulación de la vía *Shh/Gli*, es debido al control directo del ciclo celular a través de *Gli* o si existen otros efectores intermedios que pudiesen ser responsables de este efecto.

Recientemente se ha observado que sumado al aumento en la proliferación, las mutaciones frecuentes de *PTCH1* en pacientes con BCC producen un aumento en la apoptosis, sugiriendo que podrían existir interacciones con otras vías u otros factores río abajo de *Shh* que actúen compensando la acción de *Ptch1* y por lo tanto sean relevantes en el proceso carcinogénico (Lois, 2012).

3. Sonic Hedgehog, un factor involucrado en tumorigénesis.

Los miembros de la familia proteica de señalización Hedgehog (Hh) participan en el desarrollo embrionario de muchos órganos y grupos celulares, dirigiendo procesos como diferenciación celular, *patterning*, supervivencia y proliferación. Las mutaciones en esta vía pueden causar malformaciones congénitas severas como holoprocéfalia y fenotipos de ciclopía (Dahmane y cols. 1997; Ghali y cols. 1999; Chiang 1996).

Los cambios patológicos en número celular, como ocurre en el cáncer, parecen resultar de la formación de patrones anormales de tejidos y órganos, indicando que la morfogénesis, homeostasis y los procesos tumorales están íntimamente conectados (Altaba, Mas, & Stecca, 2007). Algunos reportes recientes han vinculado a Hh con procesos carcinogénicos, mediante la identificación de mutaciones en variados componentes de la vía particularmente en tumores cerebrales y cutáneos (Johnson & Scott, 1998).

En mamíferos la vía de señalización Hh/Gli actúa a través de alguno de sus tres ligandos: Indian hedgehog (Ihh), Desert hedgehog (Dhh) y Sonic hedgehog (Shh), los cuales difieren en su afinidad al receptor Ptch1, siendo Shh el más ampliamente expresado. Ptch posee dos homólogos, Ptch1 y Ptch2, en donde se ha estipulado que la actividad mayoritaria es llevada a cabo por Ptch1. La vía Shh activa a la familia de factores transcripcionales Gli (del inglés, Glioma Associated Oncogenes), Gli1, Gli2 y Gli3. Gli1 es un potente activador transcripcional, Gli2 es tanto un activador como un represor y Gli3 es principalmente represor. Las proteínas Gli completas poseen acción

activadora, mientras que el procesamiento mediante corte proteolítico, le confiere a Gli2 y Gli3 una actividad represora. Gli1 carece del dominio represor N-terminal por lo que se postula que su función exclusiva sería amplificar la señal Hh (Aza-Blanc y cols. 1997).

En la vía Hh canónica Ptch1 inhibe a la proteína de membrana Smoothened (Smo) en ausencia de ligando, manteniéndola en un estado inactivo; en estas circunstancias las formas represoras de Gli2 y/o Gli3 ingresan al núcleo e inhiben la transcripción de los genes blanco (Fig. 3A). La unión del ligando Hh a Ptch1 libera la inhibición y se produce disminución de formas Gli represoras y una acumulación de la forma activada de Gli2 y el activador Gli1 lo que permite la transcripción de los genes blanco, entre los que se encuentra *ptch1*, *gli1* y *hip1* (Figura 3 A). La regulación positiva de Gli1 es regulada por la retroalimentación inhibitoria que producen Ptch1 y Hip1, regulando de esta forma el tiempo y la potencia de la señalización (Altaba y cols., 2007).

Existe evidencia reciente de que las proteínas de la vía Shh/Gli pueden tener funciones adicionales a través de vías llamadas "no-canónicas" que incluyen componentes de esta vía pero presentan interacciones con otros componentes, interacciones atípicas entre sí o bien sus efectos son independientes de la transcripción por Gli (Fig. 3).

Un ejemplo de esto es la implicación de la vía de Shh/Gli en la regulación del ciclo celular, en particular en la transición G2/M (Fig. 3B). La transición G2/M es

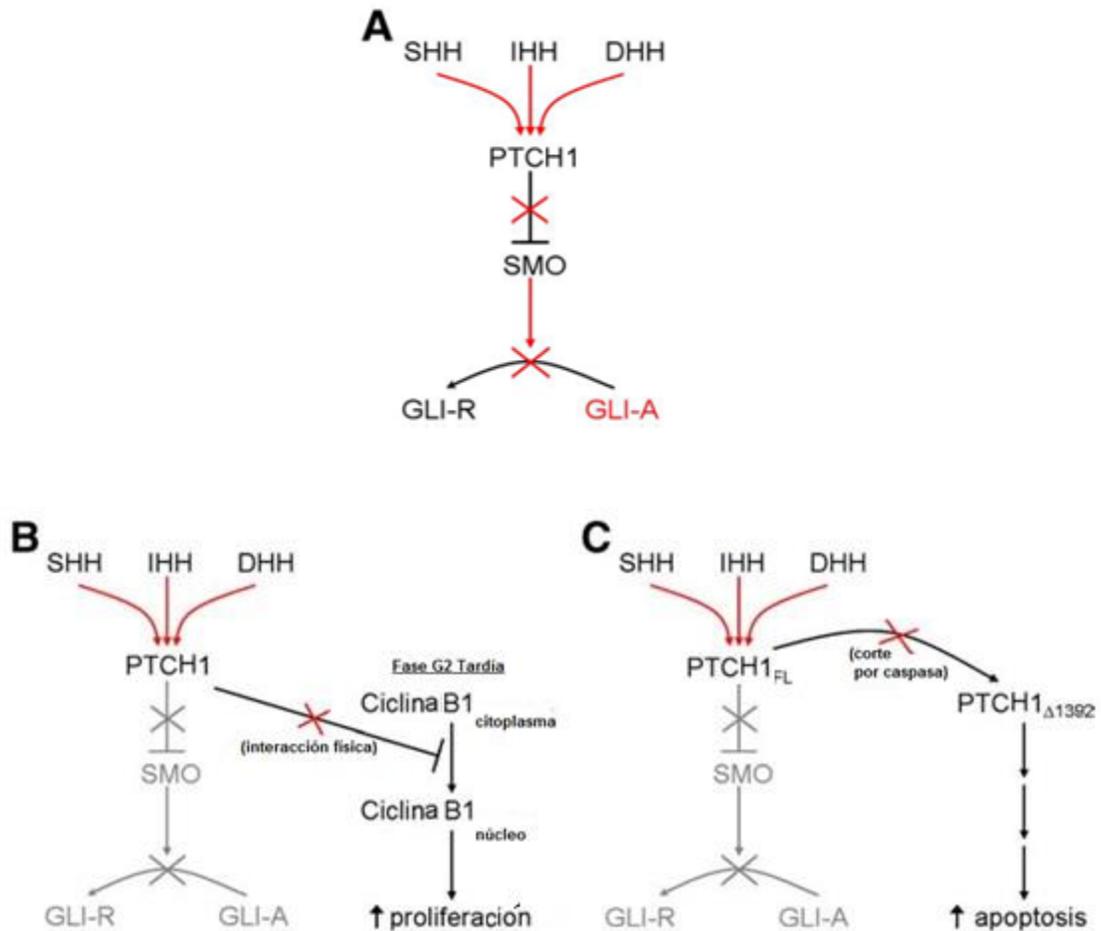


Figura 3. Vías transduccionales de la señalización de Hedgehog. (A) Vía canónica de Hedgehog: en vertebrados, la unión de Shh, Ihh y Dhh a Ptc1 libera la inhibición que éste induce sobre SMO, evitando el procesamiento de los factores transcripcionales Gli a su forma represora (GLI-R) y permitiendo la acumulación de factores activadores (GLI-A) los que promueven la expresión de los genes blancos de la vía Hh. (B) Vía no canónica Hh-Ptc1-Ciclina B1: En la fase G2 tardía Ptc1 secuestra a Ciclina B1 evitando que MPF promueva la entrada a mitosis, la unión de los morfógenos Hh a Ptc1 inhibe su interacción con ciclina B1 y permite que ésta ingrese al núcleo promoviendo la transición G2-M. (C) Actividad de receptor de dependencia de Ptc1: El corte mediante caspasas del extremo C-terminal citoplasmático de Ptc1 (en el residuo 1392 de Ptc1 en ratón) induce la apoptosis en las células que lo expresan. La unión de los ligandos evita este corte por caspasa y la apoptosis, generando una dependencia del morfógeno para la sobrevivencia de la célula (modificado de Jenkins 2009).

mediada por el Factor Promotor de la Mitosis (MPF, del inglés **M**-phase **P**romoting Factor) que está compuesto por CDC2 (CDK1) y ciclina B1. Cuando no es activado por Shh, Ptch1 interactúa con ciclina B1 en la fase G2 tardía y evita su translocación al núcleo, actuando como un supresor de tumores en el punto G2/M. Sin embargo, en presencia de Shh ciclina B1 es liberada de Ptch1 pudiendo viajar al núcleo y permitiendo la entrada a mitosis (Barnes y cols., 2005).

Se ha postulado que Ptch1 es un receptor de dependencia. Los receptores de dependencia inducen muerte celular programada cuando no están unidos a su ligando, generando así dependencia del ligando para ejercer su función en procesos tales como supervivencia, proliferación, guía axonal, entre otros. Pertenecen a una familia estructuralmente diversa de receptores de membrana que comparten ciertas funciones como inducir la muerte celular programada o apoptosis, de manera dependiente del corte por caspasas, en ausencia de su ligando, e inhibir estos efectos apoptóticos cuando los ligandos están presentes. La propiedad que presentan estos receptores de gatillar apoptosis, se ha propuesto como un mecanismo de supresión tumoral condicional, implicándose tanto en migración como supervivencia de células tumorales en el proceso de metástasis (Mehlen & Guenebeaud 2010). La familia de receptores de dependencia incluye además a DCC (del inglés, **D**eleted in **C**olorectal **C**ancer)/Neogenina-1, y a receptores de la familia UNC5, entre otros (Jenkins, 2009).

Las evidencias muestran que Ptch1 induce apoptosis mediante corte por caspasas, acción que es revertida en presencia de Shh (Fig. 1C). Esta observación en conjunto con

su acción como supresor de tumores y su vinculación con cáncer, sustentan la hipótesis de que Ptch1 es un receptor de dependencia.

Además de su rol en el desarrollo, la actividad de Shh es importante en la regulación de la proliferación y mantenimiento de nichos celulares troncales en el adulto, los cuales se encuentran en prácticamente todos los tejidos. Las células troncales poseen similitudes con las células tumorales, en particular en su estado indiferenciado y capacidad de autogeneración, por lo que es posible pensar que las vías relacionadas a esas características son comunes entre ambos tipos celulares. Debido a esta y otras similitudes entre ambas, se ha propuesto que las células troncales tienen potencial tumorigénico y que los factores que regulan la mantención de la troncalidad de estos nichos son responsables de mantener un equilibrio proliferativo homeostático que al quebrarse podría desencadenar un proceso canceroso (Lobo y cols., 2007; Reya y cols., 2001; Ruiz i Altaba y cols., 2002).

Se ha relacionado la modificación de los componentes de la vía de Shh con el desarrollo de cánceres de diferentes orígenes tisulares tales como BCC, meduloblastoma, neuroblastoma, glioma cerebral y rhabdomyosarcoma. Se ha visto que el aumento desregulado de la señalización de esta vía está asociado con cánceres del tracto digestivo, cáncer pancreático y cáncer pulmonar de células no pequeñas (Daya-Grosjean & Couvé-Privat, 2005). Entre estas patologías el BCC es la neoplasia más común causada por una desregulación de la vía de Shh.

En relación a como la desregulación de la vía produciría BCC, se ha explicado principalmente por el rol de *Ptch1* como supresor de tumores en la transición G2/M. La activación patológica de la vía Shh-*Ptch1*-Ciclina B1 podría superar este punto de control y promover la proliferación desregulada, induciendo transformación celular (Barnes y cols., 2005). Sumado a esto, se ha observado en queratinocitos que Shh también puede promover la proliferación en la transición G1/S al bloquear a CDK1A (p21) el cual induce la detención del ciclo celular (Roy, 2002). Además se ha observado que *Gli2* es capaz de inducir la transición G1/S y antagonizar la diferenciación de las células epidermales, esto debido probablemente al control transcripcional de Ciclina D1 por parte de la vía Shh/*Gli* (McMillan & Matsui, 2012; Regl y cols., 2004). Sumado a esto, se ha reportado a *c-myc*, un gen vinculado a la transición G1/S e implicado en diferentes tipos de cáncer, como un blanco transcripcional de la vía Shh/*Gli*; más aún se ha propuesto que a su vez éste puede regular la transcripción de *Gli1* y por lo tanto la cascada de activación de la vía Shh/*Gli* (Benaud & Dickson, 2001; Milla y cols., 2012; Yoon y cols., 2013).

Con el objetivo de estudiar el BCC y también poder evaluar nuevos fármacos para su tratamiento se han desarrollado diversos modelos, entre los que destacan los ratones con deleciones heterocigotas para *Ptch1* (*Ptch1*^{-/+}) (analizado en Nitzki y cols. 2012). Estos ratones muestran susceptibilidad al desarrollo de meduloblastoma y rabdomiosarcoma. El 33% de los ratones *Ptch1*^{-/+} presenta, luego de 3 a 17 meses, proliferaciones celulares basaloides similares a las encontradas en la piel no expuesta al sol de los pacientes con BCNS. Luego de un tratamiento repetitivo con radiación UV el

100% de los ratones genera BCC en la piel, en comparación con un 0% en ratones silvestres. Sin embargo, este tratamiento es largo y genera BCC en forma muy lenta, frente a lo cual se han generado nuevos modelos que permiten acelerar la carcinogénesis y además posibilitan la investigación de etapas definidas en el desarrollo del BCC (Corcoran & Scott 2001).

El grupo del Dr. Brandon Wainwright (Universidad de Queensland, Australia) ha conseguido obtener un ratón nulo para *Ptch1* por delección condicional del exón 3 frente a la activación del promotor de *Keratina 14* (*K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}*). La K14 se expresa de manera significativa en las células basales de la piel y se sobre expresa en el BCC, por lo que el uso de este promotor permite la delección tejido específica del receptor, sin afectar el desarrollo de otros órganos y tejidos para los cuales la actividad de *Ptch1* es vital, generando BCC entre los 24 a 28 días posnatal (Villani y cols., 2010) (Fig. 4). Esto constituye un gran adelanto frente a otros modelos y permite el estudio de nuevos factores que afecten el desarrollo de BCC en un contexto de alta activación de Shh.

La importancia de la vía de Shh en proliferación y supervivencia, así como la reciente relevancia que se ha otorgado a las vías "no-canónicas", hacen que resulte interesante analizar otros componentes y genes regulados por Shh que den cuenta de sus funciones.

El año pasado se reportó la identificación de nuevos blancos transcripcionales de la vía de señalización de Shh entre los que destaca el gen *Neogenina-1* (*Neo1*), cuya regulación por Shh se comprobó mediante ensayos de pérdida y ganancia de función tanto *in vitro* como *in vivo* (Milla y cols., 2012). Asimismo se ha comprobado la

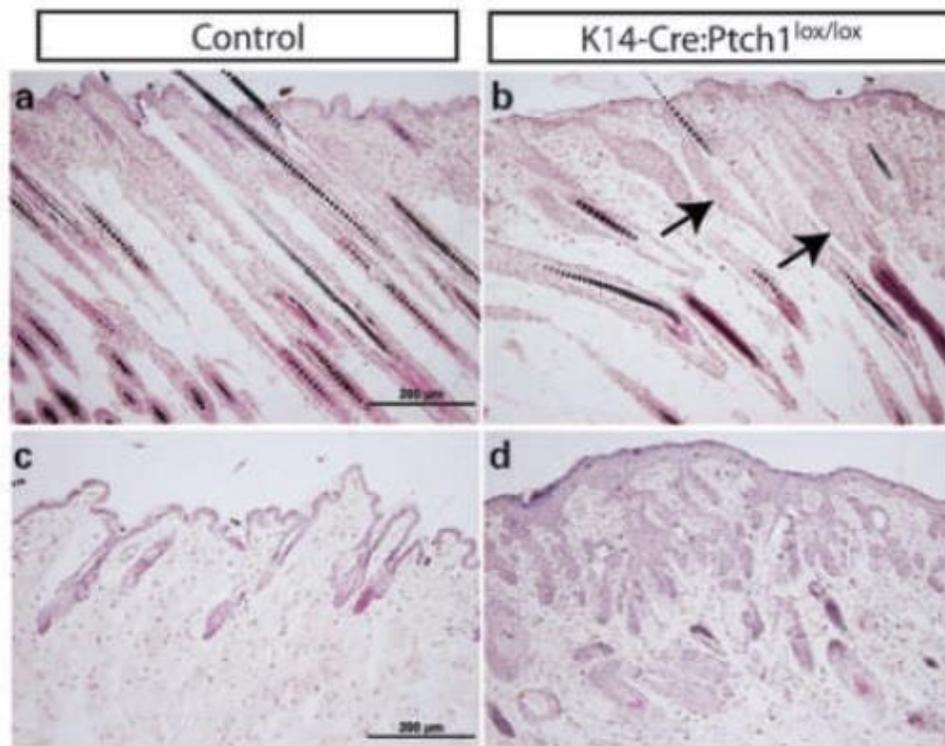


Figura 4. Delección condicional de *Ptch1* en células basales genera BCC. Comparado con el control silvestre (a) ya en p10 se evidencia una expansión de las células que forman la capa exterior del folículo piloso (flechas) en la piel de ratones K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}. La piel adulta mantiene su estructura normal (c), mientras que la piel con delección de Ptch1 progresa a lesiones agresivas de BCC (d) (Tomado de Villani y cols., 2010).

existencia de un sitio funcional de unión al factor transcripcional Gli2 en la secuencia genómica de *NEO1* (Milla y cols. 2014).

4. Neo1, un receptor de dependencia blanco de la vía de Shh/Gli.

La proteína Neo1 es un receptor celular miembro de la familia de las inmunoglobulinas. Originalmente fue aislada de *tectum* óptico de embrión de pollo e identificada como un homólogo de DCC, un receptor de Netrinas involucrado en migración celular y guía neuronal.

Neo1 posee un dominio extracelular con 4 dominios tipo inmunoglobulina (Ig) seguido de 6 dominios de fibronectina tipo 3 (FnIII), un único dominio transmembrana y una cola citoplasmática con 3 dominios conservados llamados P1, P2 y P3 (Fig. 5A). La secuencia génica de *Neo1* se traduce en variadas isoformas de esta proteína por el procesamiento de su transcrito mediante *splicing* alternativo, siendo la correspondiente a la isoforma más larga, de 1461 aminoácidos, la secuencia convencional de *Neo1*; esta secuencia posee 27 exones y 26 intrones (Vielmetter y cols., 1997).

La expresión de Neo1, al igual que la de DCC, se concentra principalmente en neuronas en proceso de diferenciación y a lo largo del sistema nervioso central. Sin embargo, se ha observado que Neo1 también se localiza en muchos tejidos en desarrollo donde no hay expresión de DCC, como el corazón, intestino, pulmón, páncreas y cartílago (Wilson & Key, 2007).

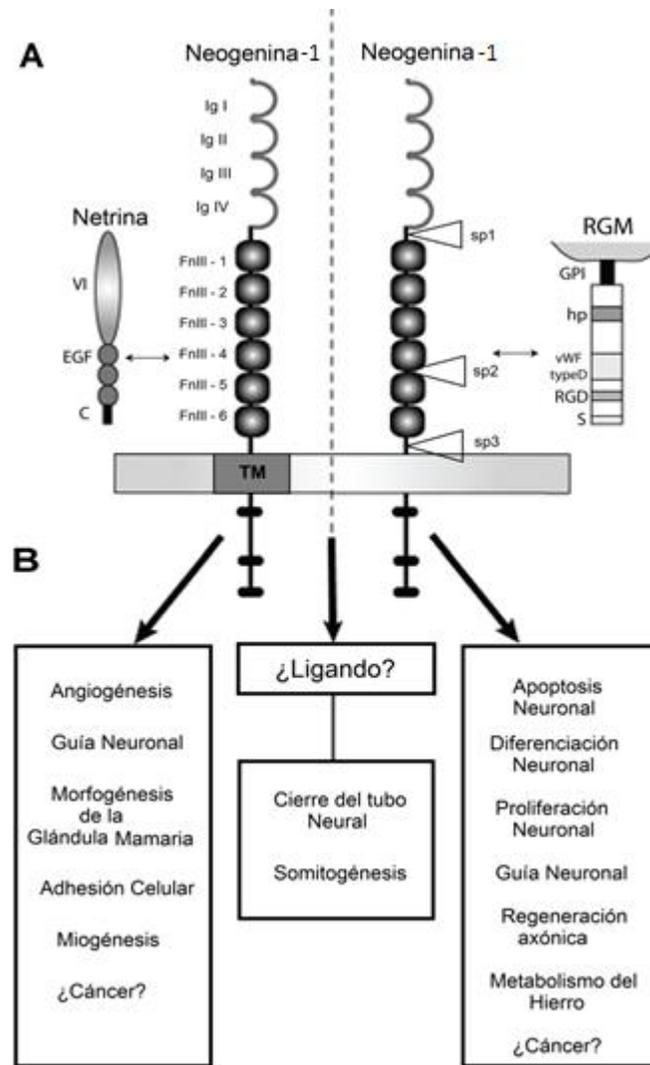


Figura 5. (A) Estructura de Neogenina-1 y sus ligandos: Neogenina-1 posee cuatro *loops* tipo Ig y seis repeticiones de FnIII, un dominio transmembrana (TM) y una región intracelular con tres dominios P; tiene al menos cuatro sitios de *splicing* (sp) y un sitio consenso para el corte con caspasa-3. Las Netrinas -1 a la -4 son proteínas secretadas con un péptido señal amino-terminal, seguido por un dominio globular tipo laminina (VI) y tres repeticiones del dominio de factor de crecimiento epidérmico (EGF); la región C-terminal (C) posee alta variabilidad entre especies. Los ligandos RGM poseen un péptido señal N-terminal (S), un motivo RGD (relacionado con interacciones célula-célula), un dominio tipo factor de von Willebrand (vWF), una región hidrofóbica (hp) y un anclaje GPI C-terminal. **(B) Interacción de Neogenina-1 con sus ligandos:** Se ha demostrado la interacción de los dominios FnIII de Neogenina-1 con Netrina y RGM en diferentes procesos. (Modificada de Wilson & Key 2007).

Debido a su homología con DCC, Neo1 fue identificado como un receptor de Netrinas, pudiendo unirse a Netrina-1 (Ntn1), Netrina-3 (Ntn3) y Netrina-4 (Ntn4), con mayor afinidad que su homólogo en el caso de Ntn3 y Ntn4 (Wang y cols. 1999). Actualmente se sabe que, a diferencia de DCC, Neo1 es también un receptor de alta afinidad por Moléculas de Guía Repulsiva (RGM, del inglés **R**epulsive **G**uidance **M**olecule). La familia de la RGM está compuesta por 3 miembros (RGM A, RGM B y RGM C) y corresponden a co-receptores de alta afinidad específicos por BMPs (del inglés **B**one **M**orphogenetic **P**roteins) (Rajagopalan y cols., 2004).

Actualmente se ha descubierto que la activación de Neo1 posee resultados diferentes dependiendo del tipo de ligando al que se una y el contexto celular en el que se encuentre (Fig. 5B). Cabe destacar que muchas de las funciones de Neo1, en particular las que ocurren en el sistema nervioso central, como lo son la proliferación, diferenciación, apoptosis y guía neuronal, se solapan con funciones de la vía de señalización de Shh, lo que soporta de mayor manera la relación regulatoria encontrada entre ambas vías (Goldschneider & Mehlen, 2010; Wilson & Key, 2007).

Se ha comprobado en tubo neural de embrión de pollo que Neo1, al igual que DCC y Ptch1, es un receptor de dependencia. El dominio citoplasmático de Neo1 posee un sitio de corte por caspasa-3 que, en ausencia de su ligando RGM, puede ser cortado induciendo apoptosis mediada por caspasas; esta acción es inhibida en presencia de RGM, permitiéndose la supervivencia (Matsunaga y cols., 2004).

5. Neol y su expresión en neoplasia

Dadas sus funciones en sobrevivencia y desarrollo, y su rol como receptor de dependencia, resulta interesante analizar el comportamiento de Neol en contextos neoplásicos.

En carcinoma celular escamoso esofágico la expresión de *NEO1*, evaluada por medición cualitativa de mRNA, se encuentra aumentada con respecto al tejido sano, en una relación proporcional al grado de diferenciación del tumor (Hu y cols., 2001). En líneas celulares de cáncer ovárico la expresión de *NEO1* aumenta, a diferencia de líneas no tumorales, bajo el tratamiento con hormona folículo estimulante; la expresión de *NEO1* se relaciona en este trabajo con el aumento en la proliferación y disminución en la apoptosis, evaluada mediante la disminución de la actividad de caspasa-3 (Ho y cols., 2003).

En nuestro laboratorio, se analizó la función de NEO1 en una línea celular de meduloblastoma humano, DAOY. Se observó que al silenciar la expresión de *NEO1* mediante shRNA en los cultivos y evaluar proliferación con fosfoHistona H3 (que permite el marcaje positivo en células en fase M del ciclo celular) existe un aumento significativo de células marcadas, sin embargo, cuando estas células son marcadas con BrdU (marcaje que muestra a las células en fase S), se ve una disminución del número de células en fase S. Estos resultados sugieren que la función de NEO1 sería promover el ciclo celular en la transición G2/M (Milla y cols. 2014).

Por otro lado, en un análisis retrospectivo de pacientes con adenocarcinoma de pulmón se reportó que existe una baja expresión de *NEO1* en la patología, asociándose los niveles bajos de expresión de esta proteína a bajas tasas de supervivencia. En un estudio hecho en cáncer de mama en tanto, se observa una fuerte expresión en tejido sano comparado con niveles bajos o nulos en tejido tumoral, advirtiéndose que la expresión de *NEO1* disminuía de manera inversa a la agresividad tumoral (Berrar y cols., 2005; Lee y cols., 2005).

Estos antecedentes indican que la expresión de *NEO1* se encuentra aumentada en unos tipos de cáncer relacionada con procesos de proliferación celular; y disminuida en otros ligada a agresividad y progresión tumoral. Esto indica que *NEO1* podría jugar un rol ya sea como gen supresor de tumores o como oncogén dependiendo del contexto celular.

Estas disimilitudes podrían estar asociadas a la descripción de *NEO1* como un receptor de dependencia. Se ha postulado que estos pueden dar ventajas selectivas ya sea por la producción autocrina exacerbada del ligando, pérdida de la función del receptor o pérdida de componentes complementarios pro-apoptóticos (Mehlen y cols., 2011). Las diferencias en expresiones en los distintos tipos de cáncer podrían estar ligadas a una desregulación en la expresión de los ligandos y/o a la presencia de una señalización *Shh/Gli* activa en las diferentes patologías.

6. Neo1, un potencial blanco terapéutico en Carcinoma Basocelular

La reciente relación establecida entre NEO1 y la vía de señalización Shh, hace que resulte interesante conocer la relación existente entre ambos en el contexto tumoral. El aumento en la actividad de la vía Shh se relaciona con el desarrollo de neoplasias en el sistema nervioso central, músculo y piel, siendo el BCC cutáneo uno de los cánceres con mayor incidencia a nivel mundial.

En un estudio reciente realizado en nuestro laboratorio se reportó por primera vez la relación entre la presencia del receptor NEO1 y NTN1 con la sobre activación de la vía de SHH/GLI en muestras patológicas de BCC, mediante la evaluación por inmunohistoquímica de cortes histológicos de pacientes (Solís, 2013). Sin embargo, el bajo número de muestras no permitió obtener resultados concluyentes respecto a la presencia de NEO1 y sus ligandos en BCC. El estudio anterior, sin embargo, se constituye como una primera aproximación para dilucidar cuál es el rol de NEO1 en el BCC.

La principal terapia en este tipo de neoplasia es la extirpación quirúrgica del tumor, provocando daño del tejido y cicatrices permanentes, lo que es altamente indeseable dado que el BCC se localiza comúnmente en regiones expuestas de la piel como lo es el rostro. Sumado a esto, muchas veces la cirugía se vuelve una complicación mayor cuando el tumor se ubica en regiones cercanas al ojo, boca, nariz y orejas, afectando las capacidades cotidianas de los pacientes. Terapias no invasivas incluyen inmunomoduladores y agentes quimioterapéuticos, los cuales poseen innumerables

efectos secundarios y daño en la piel al ser usados en forma tópica (Nitzki y cols., 2012). Es por ello que actualmente se han estudiado moléculas capaces de inhibir a componentes de la vía Shh/Gli (principalmente inhibidores de Smo), con los que se observa una buena respuesta en la disminución de la masa tumoral. Sin embargo, la vía Shh/Gli posee importancia no sólo en el desarrollo, sino que también en la mantención de tejidos troncales en el adulto, por lo que este tipo de tratamiento resulta aún inespecífico y también presenta los efectos secundarios de terapias anteriores (Iwasaki y cols., 2012). Por lo tanto, resulta importante investigar el papel de efectores río debajo de Shh en el desarrollo de esta neoplasia. Todos estos antecedentes indican que Neo1 podría estar actuando como efector de la vía Shh/Gli en BCC y su actividad estar posiblemente relacionada con la progresión tumoral de esta neoplasia (Fig. 6).

La vinculación de Neo1 a BCC sería un primer paso para el estudio de esta proteína como un marcador tumoral, que potencialmente permitiría detectarlo de forma temprana, permitiendo un tratamiento precoz y un mejor seguimiento de los pacientes afectados.

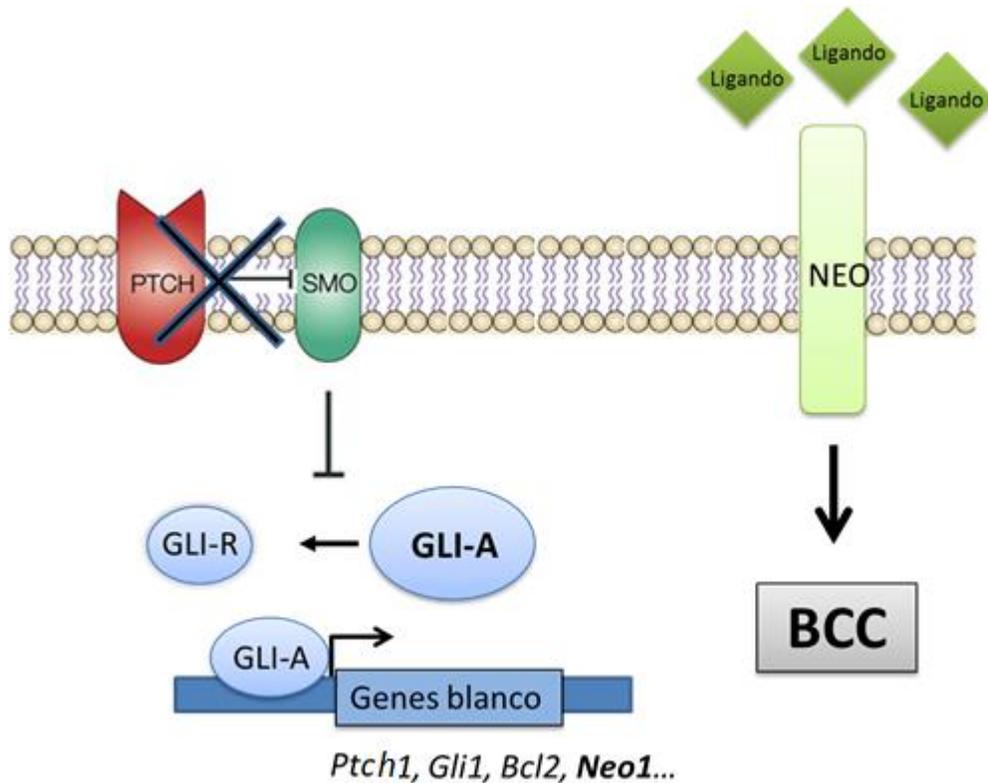


Figura 6. Modelo propuesto del rol de NEO1 en BCC. Debido a la sobre-activación de vía SHH/GLI, principalmente por la mutación del gen *PTCH1*, se promueve la acumulación de los factores GLI activadores (GLI-A) por sobre los represores (GLI-R) lo que produce la transcripción de los genes blanco de la vía. Sumado a los blancos clásicos como *Ptch1*, *Gli1* y *Bcl2*, la activación de la vía produciría un aumento en la transcripción de *Neo1*, posiblemente asociado a aumento en la expresión de alguno de sus ligandos. El complejo de señalización ligando-receptor produciría señales de sobrevida y proliferación que promoverían la aparición y/o mantención del BCC.

II. HIPÓTESIS

Los niveles de expresión génica y proteica del receptor de dependencia Neogenina-1 y su(s) ligando(s) varían en la progresión del Carcinoma Basocelular ligado a la sobre-activación de la vía de señalización SHH/GLI.

III. OBJETIVOS

1. GENERAL

Evaluar los niveles de expresión de Neogenina-1 y sus ligandos RGM y Netrinas en relación a la actividad de la vía de señalización SHH/GLI en la progresión del Carcinoma Basocelular (BCC).

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Evaluar la expresión de NEO1 y sus ligandos en piel sana y BCC humano en relación a la activación de la vía de señalización SHH/GLI.
- ii. Evaluar la relación entre los niveles de NEO1 y sus ligandos con la proliferación y/o agresividad tumoral en BCC humano.
- iii. Determinar si en el curso del desarrollo tumoral existen variaciones progresivas en los niveles de *Neol* utilizando un modelo murino de BCC Shh -dependiente.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención de Muestras:

a) Humanas:

Las muestras humanas fueron obtenidas por medio de una colaboración con la Fundación Arturo López Pérez (FALP) y el Hospital Clínico de la Universidad de Chile (HCUCH), previa autorización de los pacientes a través de la firma de un Consentimiento Informado aprobado por los Comités de Ética de ambas instituciones (Documentos Anexos 1).

i. Sanas:

Se consideró como control sano, muestras de piel sin lesiones provenientes de 15 sujetos sin enfermedades relacionadas a este órgano. Del total de muestras, 10 fueron extraídas del cuello de los sujetos durante tiroidectomías y 5 del bajo vientre durante abdominoplastías. De los 15 sujetos 14 corresponden al sexo femenino y 1 al masculino, variando sus edades entre 30 y 60 años.

ii. Patológicas.

Tejidos patológicos frescos fueron obtenidos a partir de biopsias realizadas a 37 sujetos diagnosticados con BCC. Todas las muestras, a excepción de una que fue extirpada de la escápula, fueron extirpadas de distintas zonas de la cabeza y cuello. De los 37 sujetos participantes en este estudio 10 pertenecen al sexo femenino y 27 al masculino, variando sus edades entre 44 y 94 años, siguiendo una distribución normal con una mediana y media de 66 años. Según los criterios establecidos por el servicio de

Anatomía Patológica de la FALP dichas muestras se clasificaron en subtipos histopatológicos (Tabla 1).

b) Murinas:

El trabajo con muestras murinas fue logrado gracias a una colaboración con el laboratorio del Doctor Brandon Wainwright de la Universidad de Queensland (Brisbane, Australia) y todos los experimentos descritos con estas muestras se realizaron durante una pasantía en dicho laboratorio y cumplieron con las normativas de cuidado de animales de dicha institución.

Los ratones mutantes *K14Cre:Ptch1^{lox/lox}* fueron obtenidos a partir de la cruce de machos C57 *K14Cre:Ptch1^{lox/+}* con hembras C57 *Ptch1^{lox/lox}*. Las camadas se genotipificaron en día postnatal 7 (P7) por PCR de DNA obtenido de la cola de los ratones (Fig. 7). Cuatro camadas produjeron ratones con la mutación deseada, con un total de 7 ratones mutantes. Se usó como controles ratones silvestres provenientes de la misma camada. Los ratones fueron sacrificados en P13, P20 y P29.

Las muestras fueron: guardadas en medio DMEM (Gibco, Life Technologies) y utilizadas frescas para cultivo; o guardadas en *RNAlater* (QIAGEN) hasta su utilización para extracción de RNA; o fijadas y parafinadas para análisis histológico.

2. Cultivo

Muestras de BCC humanas obtenidas como se indica en el punto 1.a).ii. fueron cultivadas como explantes según lo descrito por Bradbeer M y cols. (1988). De forma resumida, la muestra mantenida en DMEM fue cortada en cubos de 2 mm² aprox. y se

Subtipo Histológico	n	Porcentaje (%)
Nodular	11	29,7
Nodular infiltrante	7	18,9
Nodular morfeiforme	1	2,7
Superficial	2	5,4
Micronodular	1	2,7
Infiltrante	4	10,8
Mixto	1	2,7
Sin diagnóstico a la fecha	10	27

Tabla 1. Subtipos morfohistológicos de las muestras BCC. Número y porcentaje de subtipos de BCC dentro del total de las muestras analizadas.

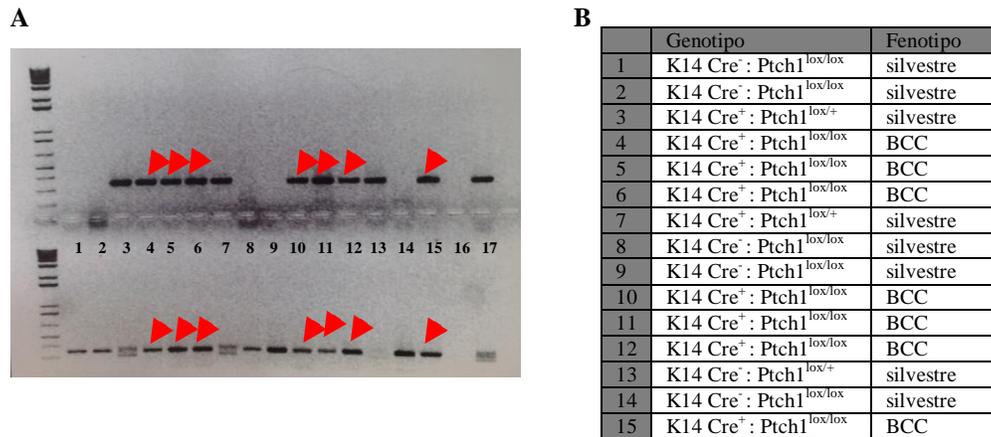


Figura 7. Genotipificación de los ratones utilizados para obtención de muestras de piel. (A) Gel de agarosa 1% muestra los amplicones del PCR realizado para la identificación de secuencias Cre (arriba, 350 pb) y Ptch1lox (abajo). En este último se puede distinguir la inserción homocigota (una banda de 350 pb) o heterocigota (dos bandas a 350 y 300 pb) de las secuencias lox en el gen de *Ptch1*. Carriles 1 al 6 corresponden a ratones sacrificados en P13, carril 7 al 12 sacrificados en P20 y carril 13 al 15 en P29. Carril 16 control negativo y 17 positivo para Cre y Ptch1 heterocigoto. (B) Genotipos y fenotipos de todos los ratones utilizados. 1-6= P13, 7-12= P20, 13-15= P29.

colocó sobre insertos de cultivo (membrana de poro de 0.45 μm) dejándolos adherirse por deshidratación parcial durante 5 min, luego de esto se adicionó medio DMEM suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) 20% y antibióticos (P/S: Penicilina Estreptomycin) permitiendo su cultivo en una interfaz líquido-aire.

a) Tratamiento con ciclopamina

Se inhibió la actividad de la vía SHH/GLI mediante el uso de un antagonista farmacológico, ciclopamina (Infinity Pharmaceuticals), en explantes de BCC. Para ello se cultivó los explantes con medio de cultivo base (DMEM + 20% SFB + P/S) más ciclopamina en una concentración final de 10 μM o vehículo Etanol 0.01%, durante 48 horas. Luego de esto las muestras fueron recolectadas en solución RLT (Qiagen) para la posterior extracción de RNA.

3. Extracción de RNA y síntesis de cDNA

Las muestras fueron homogenizadas mecánicamente y el RNA fue extraído utilizando RNA-Solv (Omega Bio-Tek) con un tratamiento previo con proteinasa K según las instrucciones del fabricante. En caso de las muestras utilizadas para generar explantes el RNA total fue extraído utilizando un kit comercial especializado en este tipo de muestras (RNeasy Fibrous Tissue Minikit, Qiagen).

Para la síntesis de cDNA 1 μg de RNA se trató con DNasa I (DNasa I, *Buffer* DNasa 10x, Agua DEPC; Invitrogen, procesados según las instrucciones del fabricante) para eliminar contaminaciones con DNA. Luego de esto se sintetizó cDNA utilizando Random primers e incubando la reacción (*Random primers*, tampón de reacción,

RNAsin, dNTPs, Transcriptasa Reversa, Agua DEPC; RevertAid) durante 60 minutos a 42°C y 10 minutos a 72°C. El cDNA se conservó a -20 para su uso posterior.

4. Extracción de DNA y Genotipificación

Un trozo de cola fue obtenido de los ratones descritos en 1.b a los 7 días de nacidos (P7), fue incubado en Buffer de Lysis (PBS, Triton) y 5µl de proteinasa K a una concentración de 10 mg/ml durante una noche a 60°C, luego se agregó 50µl de Acetato de Sodio a pH 5,2 y 1 ml de ETOH, se incubó a -20°C por 30 min y se centrifugó a 13000xg durante 30 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado y se lavó el precipitado con ETOH 70%, se centrifugó a 13000xg por 30 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se permitió que se secase el pellet a temperatura ambiente. El DNA fue re suspendido en 400µl de agua nanopura durante toda una noche a 4°C.

Los ratones fueron genotipificados para la presencia de la proteína Cre y la secuencia lox en el gen de *Ptch1*. Para ello se realizó un PCR convencional incubando 2µl de DNA en mix de amplificación (dNTPs, Buffer, MgCl₂, TaqPolimerasa, Life Technologies) y partidores específicos diseñados por el laboratorio del Dr. Brandon Wainwright siguiendo las indicaciones del fabricante.

5. PCR cuantitativo

Para cuantificar los cambios en los mRNA producidos en las distintas condiciones, las muestras fueron analizadas por la técnica de PCR en tiempo real/cuantitativo.

Para las muestras humanas se diseñaron partidores específicos para la detección de cada uno de los transcritos y se estandarizó la concentración óptima de estos de modo

que la eficiencia de amplificación en todos los casos fuera del $100\% \pm 10\%$ (Tabla 2). Se incubó la concentración requerida de partidores, 10 μ l de Mix SyberGreen (Agilent Technologies) en un total de 20 μ l de reacción en un termociclador (Agilent Technologies, Genexpress) según las instrucciones del fabricante. Mediante la utilización del reactivo SyberGreen, el cual emite fluorescencia cuando se une al DNA doble hebra, se puede detectar los productos de amplificación por PCR en el mismo instante que son producidos.

Para las muestras murinas se utilizaron ensayos de expresión de genes con Taqman (Life Technologies), los cuales comprenden partidores y sondas fluorescentes diseñados específicamente para cada uno de los genes (Tabla 3) y *Taqman Master Mix* (Life Technologies). La amplificación fue llevada a cabo en un termociclador ViiA7 (Life Technologies) según las instrucciones del fabricante. Las sondas Taqman poseen un fluoróforo en un extremo y un apagador (quencher) en el otro, éstas se unen de forma específica a una secuencia central en los amplicones de una hebra y son degradadas al ocurrir la síntesis de la hebra complementaria, lo que permite la separación del fluoróforo y el apagador, y por ende produce fluorescencia.

Para la cuantificación de los niveles de cada transcrito se utilizó el método del $\Delta\Delta C_t$, en el cual se compara el C_t (ciclo en el cual el nivel de fluorescencia supera el umbral o threshold) del gen de interés con un gen normalizador (ΔC_t), cuya expresión no varía en el experimento, para posteriormente comparar las muestras experimentales con las muestras controles ($\Delta\Delta C_t$). En esta tesis se utilizó como gen normalizador *GAPDH* y los resultados fueron expresados como relativos a la cantidad de mRNA de *GAPDH* o a la

Gen	Secuencia Partidor Forward (5'-3')	Secuencia Partidor Reverse (5'-3')	T° annealing (°C)	Eficiencia (%)	R
<i>GADPH</i>	CAAGAAGGTGGTGAAGCAGGC	CCACCACCCTGTTGCTGTAG	60	90,4	0,997
<i>PTCH1</i>	GGTGAAGTTGGAGGACGAG	CGCTTCTGTGGTCAGATTAG	60	99,8	0,997
<i>GLI1</i>	GGAGAAGCGTGAGCCTGAATC	TGGATGTGCTCGCTGTTGATG	60	103	0,999
<i>NEO1</i>	GCTTCATCAAATTGACGTGGCGGA	AGATGTACACGGTCGCTGGCATT	60	91,7	0,998
<i>NTN1</i>	TGCAAGAAGGACTATGCCGTC	GCTCGTGCCCTGCTTATACAC	60	93,9	0,998
<i>NTN4</i>	TCAGCACAAACAGAAAGGACA	GGATGGCAGGAACACGGTTTG	60	91,7	0,999
<i>RGMa</i>	ATGGATGGGTATGGGAGAG	TGCACCTGAGGATCTTGAC	60	90,2	0,998
<i>RGMb</i>	TTGGGTATCAGTGACCTCATGAGC	AAAAGGTAAGTGGGAGGGTCTGG	60	101	0,991
<i>BCL2</i>	GAACTGGGGGAGGATTGTGG	CCGTACAGTTCACAAAGGC	60	91,1	0,993
<i>UNC5b</i>	GGGCTGGAGGACTACTGGTG	TGCAGGAGAACCTCATGGTC	60	92,7	0,994

Tabla 2. Partidores utilizados para la amplificación por PCR cuantitativo de cDNA humano. Cada par de partidores, cuya secuencia se indica en la tabla, fue ensayado a una temperatura de *annealing* 60° y su concentración fue estandarizada de modo de verificar que la amplificación se realizase con una eficiencia mayor al 90% a diferentes concentraciones de templado. Se indica la eficiencia lograda para cada par de partidores y el R de la curva de eficiencia construida en base a diluciones seriadas de templado.

Gen	N° Catálogo/ Assay ID
<i>Gapdh</i>	4352339E
<i>Gli1</i>	Mm00494654_m1
<i>Neo1</i>	Mm00476326_m1
<i>Ntn1</i>	Mm00500896_m1
<i>Ntn4</i>	Mm00480462_m1
<i>Rgma</i>	Mm00624998_m1
<i>Rgmb</i>	Mm00724273_m1

Tabla 3. Sondas Taqman utilizadas para la amplificación de cDNA murino. Se indica el número de catálogo para cada sonda utilizada. Estas fueron ensayadas a una temperatura de annealing de 60°C.

cantidad de mRNA del gen de interés de las muestras de piel sana (control) normalizado por *GAPDH*.

6. Histología

Las muestras de piel control humana y todas las muestras murinas fueron fijadas en PFA 4% durante 12-24 h, deshidratadas (lavados en concentraciones crecientes de etanol y luego xilol) e incluidas en bloques de parafina. Dichos bloques fueron seccionados en un micrótopo Leica con un grosor de 7 μ m aproximadamente y montados sobre portaobjetos silanizados (3-trietoxisilil-propilamina, Merck). Cortes histológicos de muestras humanas de BCC fueron obtenidos a través de los servicios de Anatomía Patológica del HCUCH y de la FALP.

Los cortes fueron desparafinados durante 1 h a 60°C seguidos de 3 lavados con xilol 100% y rehidratados mediante la incubación en concentraciones decrecientes de etanol.

La histología fue analizada mediante tinción hematoxilina-eosina (H&E), para lo cual los cortes rehidratados fueron incubados en hematoxilina, lavados, incubados en eosina, lavados, deshidratados y montados utilizando el medio de montaje Entellán (Merck).

7. Inmunotinción

Para caracterizar la distribución tisular de las proteínas de interés se observó su presencia mediante inmunohistoquímica (IHQ) y/o inmunofluorescencia (IF) utilizando los siguientes anticuerpos primarios: NEO1 H175 (Santa Cruz Biotechnology) dilución

1:50, PCNA 13-3900 (Invitrogen) dilución 1:100, RGMA AF2459 (R&D Systems) dilución 1:100, NTN1 H-104 (Santa Cruz Biotechnology) dilución 1:100.

En forma resumida, los cortes fueron desparafinados y rehidratados. Se realizó el desenmascaramiento antigénico incubando los cortes en Solución Desenmascaradora de Antígeno en base a citrato (Vector Biosystems), durante 3 min a 100°C.

a) IHQ:

Se eliminó la actividad de la peroxidasa endógena incubando por 30 min en una solución con un 3% de H₂O₂ en tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés). Se lavó con PBS y se bloqueó la unión a proteínas inespecíficas incubando con una solución de PBS con un 4% suero de caballo, 1% BSA y 0,02% Triton (Sigma) durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó en el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Seguido de esto se lavó con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado diluido en solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavó con PBS. Se incubó con solución ABC (Vector Biosystems) durante 30 min a temperatura ambiente y se reveló con DAB (Merck). Se realizó una co-tinción nuclear con hematoxilina. Los cortes fueron deshidratados y montados con entellán.

b) IF

Se lavó con PBS y se bloqueó la unión a proteínas inespecíficas incubando con una solución de PBS con un 4% suero de caballo, 1% BSA y 0.02% Triton (Sigma) durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó en el primer anticuerpo primario

(NEO1, NTN1, RGMA) diluido en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Se lavó con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario biotilado diluido en solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente y luego durante 30 min con un fluoróforo a elección unido a estreptavidina. Si es que hubiere un segundo anticuerpo primario (PCNA) este fue incubado durante 1 h a temperatura ambiente, lavado e incubado un anticuerpo secundario unido a un fluoróforo a elección (Alexa488 o Alexa594) durante 1 h, los núcleos fueron identificados por tinción con Dapi durante 5 min. Posterior a esto los cortes fueron lavados y montados en medio de montaje Dako (Agilent Technologies).

8. Microscopía y análisis de imágenes.

Las IHQ y H&E fueron observadas en un microscopio Olympus BX51 y fotografiadas con el uso del programa Motic Images Plus v2.0 (Motic China Group CO., LTD.). Se cuantificó la cantidad relativa de proteína mediante análisis colorimétrico (IOD) de las tinciones por IHQ utilizando el programa Image Pro Plus v6.0.0.260 (Media Cybernetics).

Las IF fueron observadas en un microscopio confocal (Carl Zeiss 710) y fotografiadas utilizando el programa de adquisición de imágenes Zen (Carl Zeiss). Dichas imágenes fueron procesadas utilizando el programa ImageJ (NIH).

9. Análisis estadístico

Se utilizó el programa Prism v5.0 (GraphPad Software) para realizar el análisis estadístico descriptivo de los datos; evaluar normalidad mediante el test de D'Agostino-

Pearson; analizar correlaciones entre variables mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman y para analizar significancia entre grupos muestrales mediante el test Mann-Whitney o Kruskal-Wallis con post test de Dunn .Valores de $P < 0.05$ fueron considerados significativos.

Se utilizó el programa Past v3.01 (Ø, Hammer and D.A.T. Harper) para realizar el Análisis de Componentes Principales (ACP).

V. RESULTADOS

1 Evaluación de la expresión de NEO1 y sus ligandos en muestras de piel de pacientes con BCC que poseen sobre activación de la vía SHH/GLI.

a) *NEO1*, sus ligandos y reporteros de la vía SHH/GLI se expresan en piel sana humana

A la fecha, no existía conocimiento de la expresión de *NEO1* ni de ninguno de sus ligandos en piel sana humana ni en BCC, por lo que para evaluar si éste se encontraba sobre-expresado en este tipo de cáncer y establecer criterios de normalidad se cuantificó primeramente el mRNA de *PTCH1*, *GLI1*, *BCL2*, *NEO1*, *NTN1*, *NTN4*, *RGMA* y *RGMB* de forma relativa a la cantidad de mRNA de *GAPDH* en 15 muestras de piel sana obtenidas de sujetos sometidos a cirugías no relacionadas.

Los reporteros clásicos de la vía de SHH/GLI, *GLI1*, *PTCH1* y *BCL2* poseen niveles detectables de mRNA en un gran porcentaje de las muestras control (80%, 100% y 93% respectivamente) con una importante variación entre muestras y tendiendo a valores bajos en la mayoría de los casos (Fig. 8A).

El mRNA de *NEO1* se detecta en el 100% de las muestras control, presenta una distribución normal según el test de normalidad D'Agostino & Pearson y alcanza valores relativamente altos con respecto a los niveles de *GAPDH*. Por el otro lado, el mRNA de sus ligandos: *NTN*, *NTN4*, *RGMA* y *RGMB*, se detecta en el 93%, 47%, 67% y 85% del total de las muestras control respectivamente, siendo sus valores relativamente bajos en comparación con *GAPDH* y presentando grandes variaciones entre muestras (Fig. 8B).

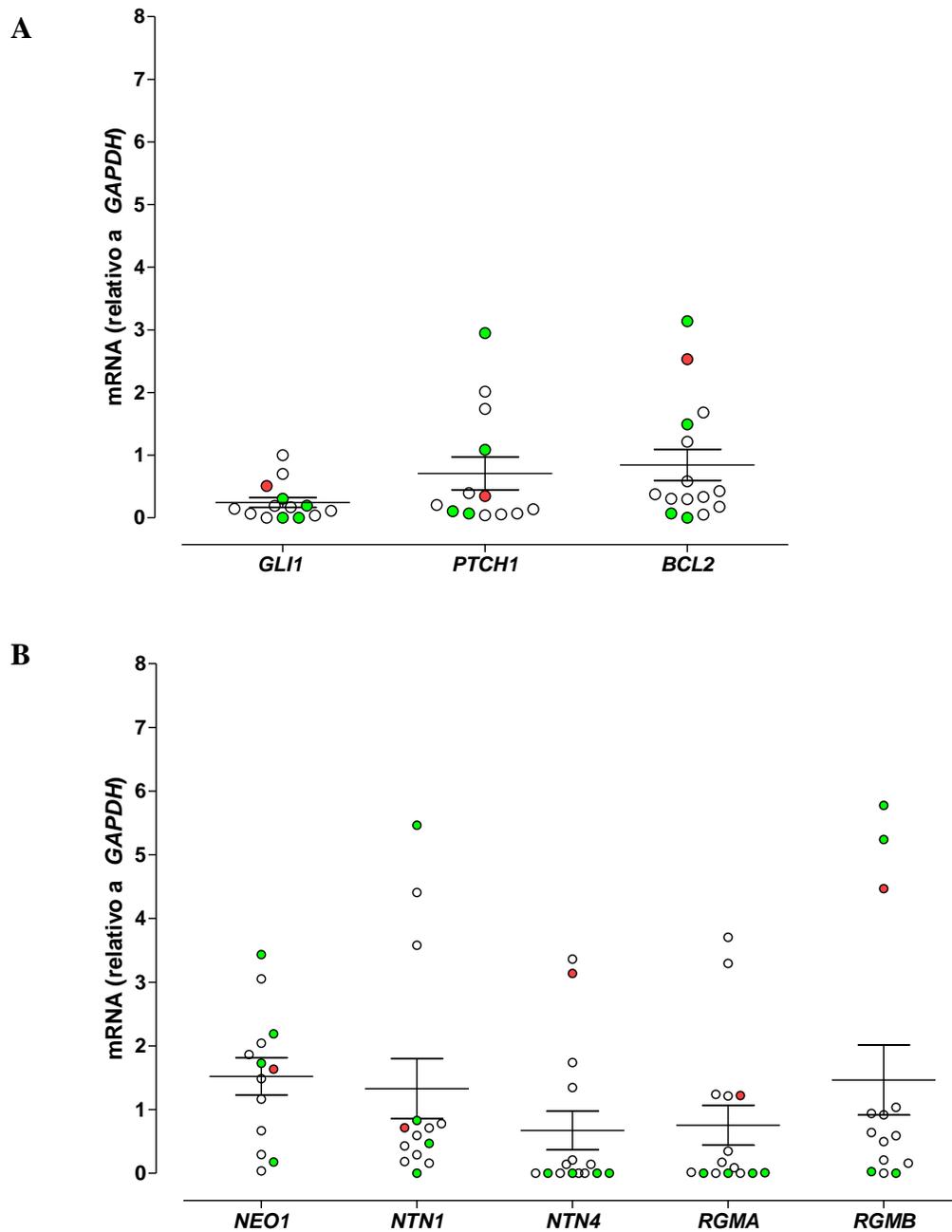


Figura 8. EL mRNA de *NEO1* se detecta en piel sana humana. Muestras de piel sana (control) fueron obtenidas de 14 mujeres y 1 hombre (●), de la zona del cuello (○) o del bajo vientre durante abdominoplastías (●). (A) Cuantificación de los niveles de mRNA relativo a los niveles de *GAPDH* de los reporteros de la vía SHH/GLI: *GLI1*, *PTCH1* y *BCL2*; en piel control humana. (B) Cuantificación de los niveles de mRNA relativo a los niveles de *GAPDH* de *NEO1* y sus ligandos (*NTN1*, *NTN4*, *RGMA* y *RGMB*) en piel control.

Con respecto al origen de la obtención de las muestras, de un número muestral total de 15, 10 fueron extraídas de la zona del cuello durante tiroidectomías y 5 del bajo vientre durante abdominoplastías, no observándose diferencias significativas (Figura A1). Del total de los controles, 14 corresponden al sexo femenino y uno al sexo masculino, encontrándose los valores obtenidos para este dentro del rango de variaciones esperadas para cada analito cuantificado (Fig. 8).

b) *NEO1* aumenta en BCC

Como ha sido reportado anteriormente, la vía SHH/GLI se encuentra activa en BCC a diferencia de otros tumores epiteliales, lo que ha sido identificado tradicionalmente mediante la detección del transcrito de *GLII* por hibridación *in situ* en cortes de biopsia (Dahmane y cols. 1997; Ghali y cols. 1999) y/o por PCR cuantitativo (Bonifas y cols. 2001; Hatta y cols. 2005).

Con el fin de corroborar el diagnóstico de BCC dependiente de SHH se evaluó la presencia *GLII* por RT-PCR cuantitativo en las 37 muestras patológicas analizadas. Es importante mencionar que como resultado de esto no hubo niveles detectables de este transcrito en 5 de las muestras, las cuales por tanto fueron excluidas del resto de los análisis (Fig. 9A). De éstas, 2 correspondían a subtipos agresivos de BCC y 3 no tenían un subtipo diagnosticado a la fecha. Luego de esto, los niveles de *GLII* del total de las muestras tumorales se cuantificaron de forma relativa a las muestras control encontrándose este transcrito significativamente aumentado en BCC (Fig. 9B).

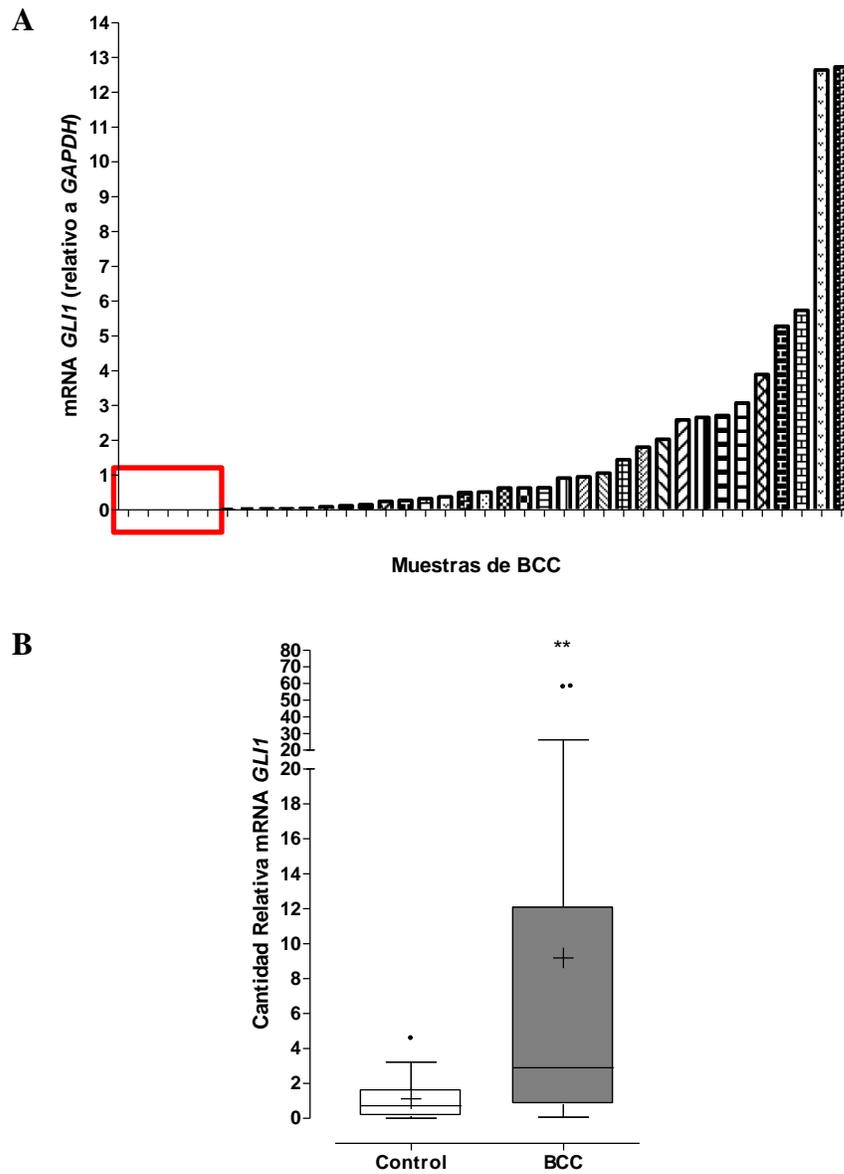


Figura 9. BCC presenta activación de la vía SHH/GLI. (A) Cuantificación de los niveles de mRNA de *GLI1* relativo a los niveles de *GAPDH* en BCC (n= 37); del total de las muestras analizadas 5 no poseían niveles detectables de *GLI1* (□). (B) Cuantificación del mRNA de *GLI1* en cada muestra de BCC (n=32) de forma relativa a los niveles de las muestras control (n=15). ** $P < 0,01$; test de Mann-Whitney.

Se cuantificó el mRNA de *NEO1* en las muestras BCC de forma relativa a los niveles de las muestras control. Se puede observar que los niveles de dicho transcrito tienden a ser mayores en BCC respecto al control, existiendo, sin embargo, grupos en los que éstos son similares al control y muestras puntuales cuyos niveles son considerablemente más altos y se escapan de la dispersión central de datos (Fig. 10A).

A partir del análisis estadístico de los datos de las muestras patológicas de BCC podemos establecer cuartiles de expresión de mRNA de *NEO1*, siendo el cuartil IV el de mayor expresión y el I el que presenta niveles más bajos. A continuación se realizaron IHQ para *NEO1* en biopsias correspondientes a muestras pertenecientes a distintos cuartiles y muestras control. *NEO1* se detecta en las células basales de la epidermis (*stratum basale, s.b.*) control y en nódulos tumorales de BCC (Fig. 10B), ambas zonas que poseen alta proliferación. A partir de estas tinciones se cuantificó la presencia de la proteína *NEO1* por análisis colorimétrico (IOD), encontrándose significativamente aumentado en aquel grupo perteneciente al cuartil con altos niveles de mRNA y con valores similares al control para cuartiles de menor expresión (Fig. 10C).

c) Los ligandos de *NEO1* se expresan en BCC y sus niveles de mRNA se correlacionan con los de *NEO1*

El mRNA de los ligandos de *NEO1*: *NTN1*, *NTN4*, *RGMA* y *RGMB* fue igualmente cuantificado en las muestras tumorales. Se comprueba que, al igual que en las muestras control, existe un grupo considerable de muestras BCC con valores no detectables para

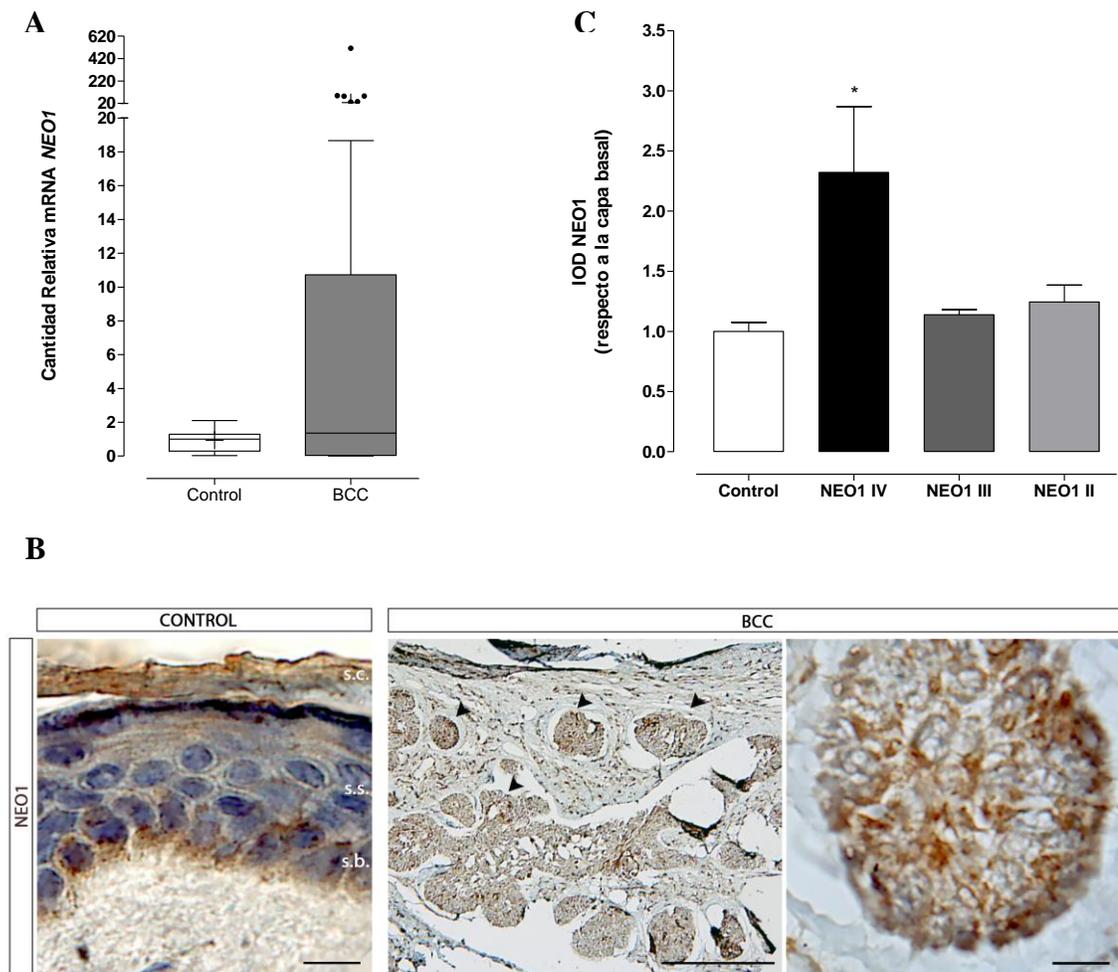


Figura 10. NEO1 aumenta en nódulos de BCC. (A) Cuantificación de los niveles de mRNA de *NEO1* en BCC (n= 32) relativo a los niveles de las muestras control (n= 15). El gráfico de cajas y bigotes nos permite observar la distribución por cuartiles de los datos, siendo el cuartil I el con menor expresión. (B) IHQ contra NEO1 en piel sana (CONTROL, barra= 25 μ m) y en BCC (panel central, barra 500 μ m y ampliación de un nódulo en el panel izquierdo, barra= 25 μ m), co-tinción con Hematoxilina. En el recuadro izquierdo se indican las principales capas de la epidermis: *stratum corneum* (s.c.), *stratum spinosum* (s.s.) y *stratum basale* (s.b.). (C) La intensidad de color de IHQ contra NEO1 realizadas a muestras control (n=3) y BCC (n= 12) correspondientes al II, III y IV cuartil de expresión de mRNA fueron cuantificadas. El gráfico muestra los valores de IOD de las células basales (s.b) de las muestras control y los nódulos tumorales (cabeza de flechas negras indican algunos de los nódulos en B) de las muestras BCC. * $P < 0,05$; test de Mann-Whitney

estos transcritos y en caso de detectarse, los niveles son relativamente bajos en la mayoría de las muestras. Sin embargo, cabe destacar que existen muestras para las cuales los niveles de mRNA de *NTN1*, *NTN4* y/o *RGMA* es alta (Fig. 11A). Notablemente, en relación a la expresión conjunta de receptor y ligando, se puede observar que para las muestras con valores altos de *NEO1* existe siempre expresión detectable de al menos uno de los ligandos y que en general sus niveles son mayores a los de las muestras control. El cálculo del coeficiente de correlación de Spearman nos indica que existe una correlación positiva y significativa entre *NEO1* y sus ligandos *NTN1* y *RGMA* (Fig. 11B).

Para observar cómo era la distribución de *NEO1* y sus ligandos en el tejido tumoral se realizaron IF contra *NEO1*, *NTN1* y *RGMA* en cortes de biopsias de BCC. Se analizaron 5 biopsias en las cuales el nivel de mRNA de *NEO1* se encontraba aumentado, de ellas una poseía niveles altos de mRNA tanto de *NTN1* como de *RGMA*, dos poseían niveles altos de *RGMA* y no detectables de *NTN1* y dos poseían niveles altos de *NTN1* y no detectables de *RGMA*. En Figura 12 se observan nódulos tumorales correspondientes a la muestra con niveles de mRNA detectables tanto para *NTN1* como para *RGMA* y corresponde a una muestra representativa de la ubicación tanto de ligando como receptor observada en las otras biopsias, la cual coincide para ambos en las células basales tumorales y no en el estroma (Fig. 12B). Sumado a la coincidencia de expresión en los nódulos tumorales, en esta figura se observa que *NEO1* se distribuye en toda la célula tumoral teniendo mayor tinción en el citoplasma, *NTN1* se encuentra en el citoplasma y

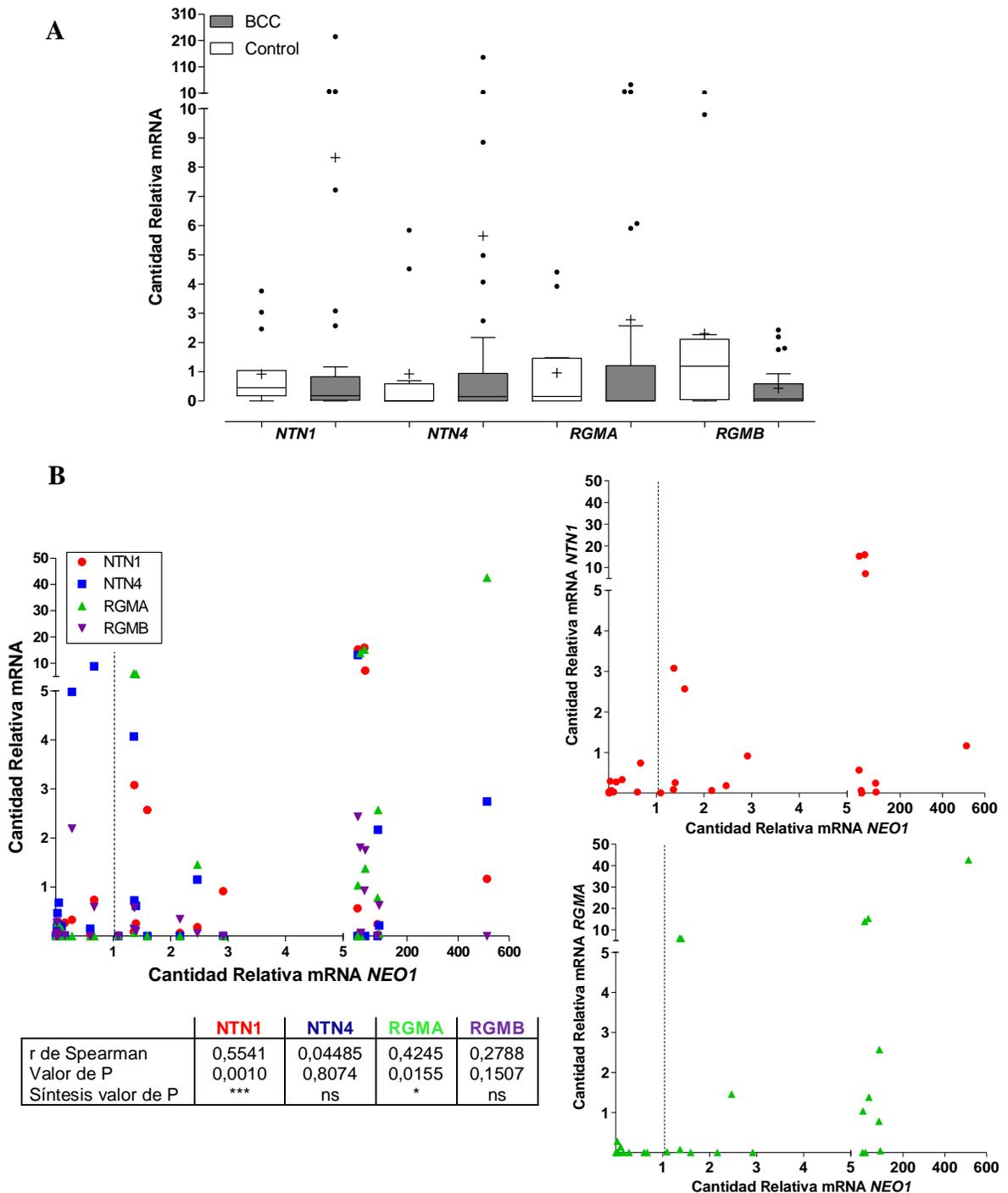


Figura 11. Los niveles de mRNA de *NEO1* se correlacionan con los niveles de sus ligandos *NTN1* y *RGMA* en BCC. (A) Cuantificación de los niveles de mRNA de *NTN1*, *NTN4*, *RGMA* y *RGMB* en BCC (n= 32) relativo a los niveles de las muestras control (n= 15). (B) Niveles de mRNA de *NTN1*, *NTN4*, *RGMA* y *RGMB* en relación a los niveles de *NEO1* en BCC (gráfico izquierdo). Se muestra el coeficiente de correlación de Spearman y los valores de P para cada uno de los ligandos (tabla). Niveles de mRNA de *NTN1* (derecho arriba) y *RGMA* (derecha abajo) en función de *NEO1*. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; * $P \leq 0,001$; ns= no significativo.**

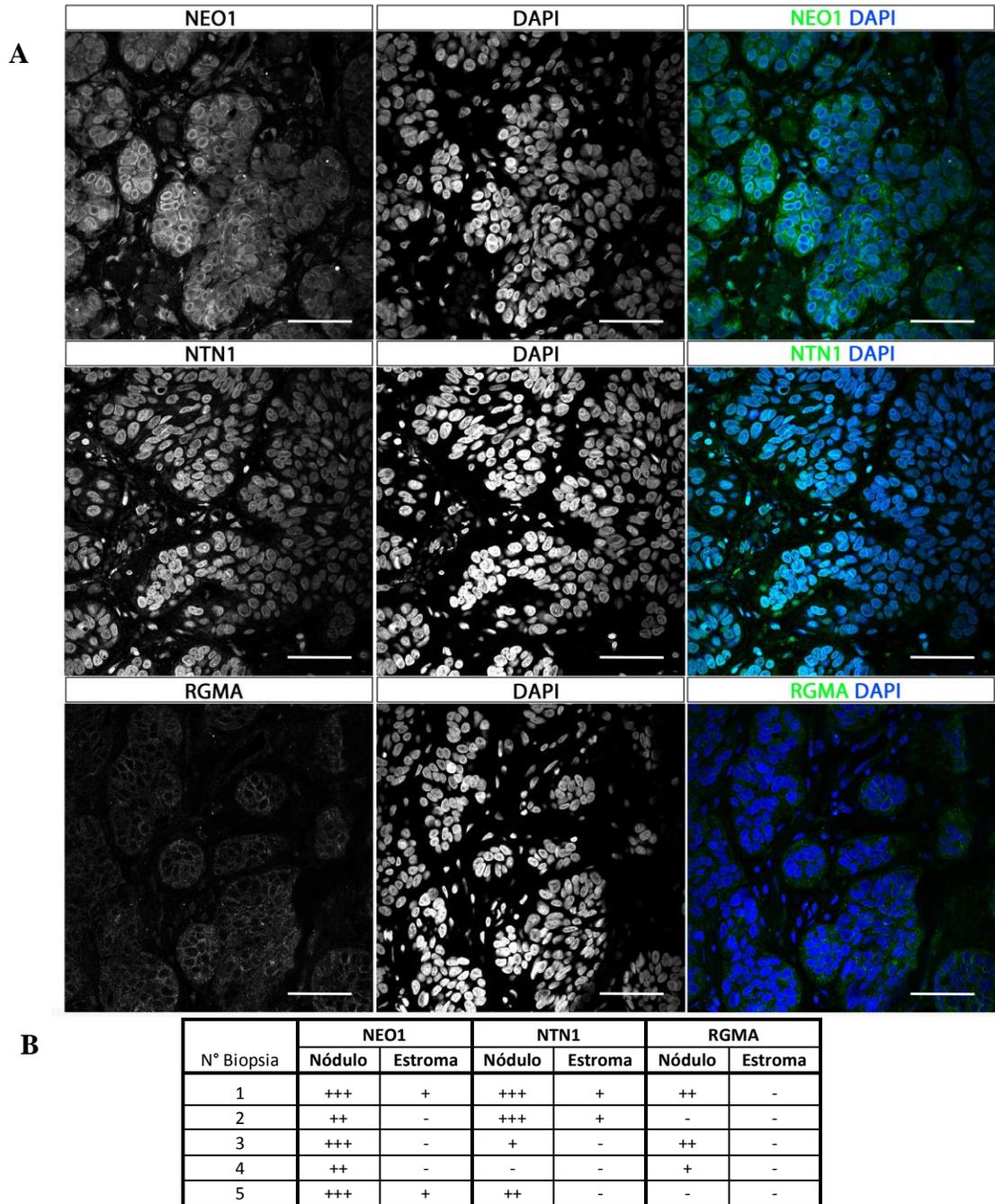


Figura 12. Tanto NEO1 como sus ligandos se encuentran presentes en los nódulos tumorales del BCC. (A) IF contra NEO1, NTN1y RGMA (verde) en una biopsia de BCC. Se muestran fotografías representativas de nódulos tumorales (barra= 50 μ m). Se usó DAPI (azul) para tinción nuclear. (B) Tabla que indica la tinción relativa de NEO1, NTN1 y RGMA tanto en los nódulos tumorales como en el estroma de IFs realizadas a 5 biopsias que poseían altos niveles de mRNA de *NEO1*.

en algunos casos puede observarse en el núcleo, RGMA tiene una clara distribución en la membrana celular (Fig. 12).

d) Niveles de mRNA de *NEO1* y ligandos se correlacionan con actividad de la vía SHH/GLI.

Dada la ubicación concurrente de *NEO1* y sus ligandos en las células basales tumorales, se quiso evaluar si la expresión de ambos guardaba relación con la actividad de la vía SHH/GLI. Para ello, como primera aproximación se calculó el coeficiente de correlación de Spearman (para datos no paramétricos) entre los niveles de mRNA de *NEO1* y sus ligandos con los del reportero de la vía SHH/GLI, *GLI1*, tanto para muestras control como para BCC.

En las muestras control no existe correlación entre los niveles de mRNA de *NEO1* y *GLI1*, estando los valores para ambas variables dispersos en la gráfica. Por el contrario, en las muestras de BCC se observa que altos niveles de *GLI1* se corresponden con altos niveles de *NEO1*, existiendo entre ellos una correlación positiva significativa con un coeficiente de correlación (r) de Spearman de 0,6271 (Fig. 13A).

Con respecto a los ligandos, estos presentan en general niveles bajos en las muestras control, los cuales no se correlacionan con los niveles de *GLI1*. A pesar de la gran variabilidad, podemos notar que, de forma similar a lo observado en 13A para *NEO1*, valores altos de *GLI1* se condicen con valores altos de alguno de los ligandos, existiendo una correlación positiva y significativa de *GLI1* con *NTN1* y *RGMA* (Fig. 13B).

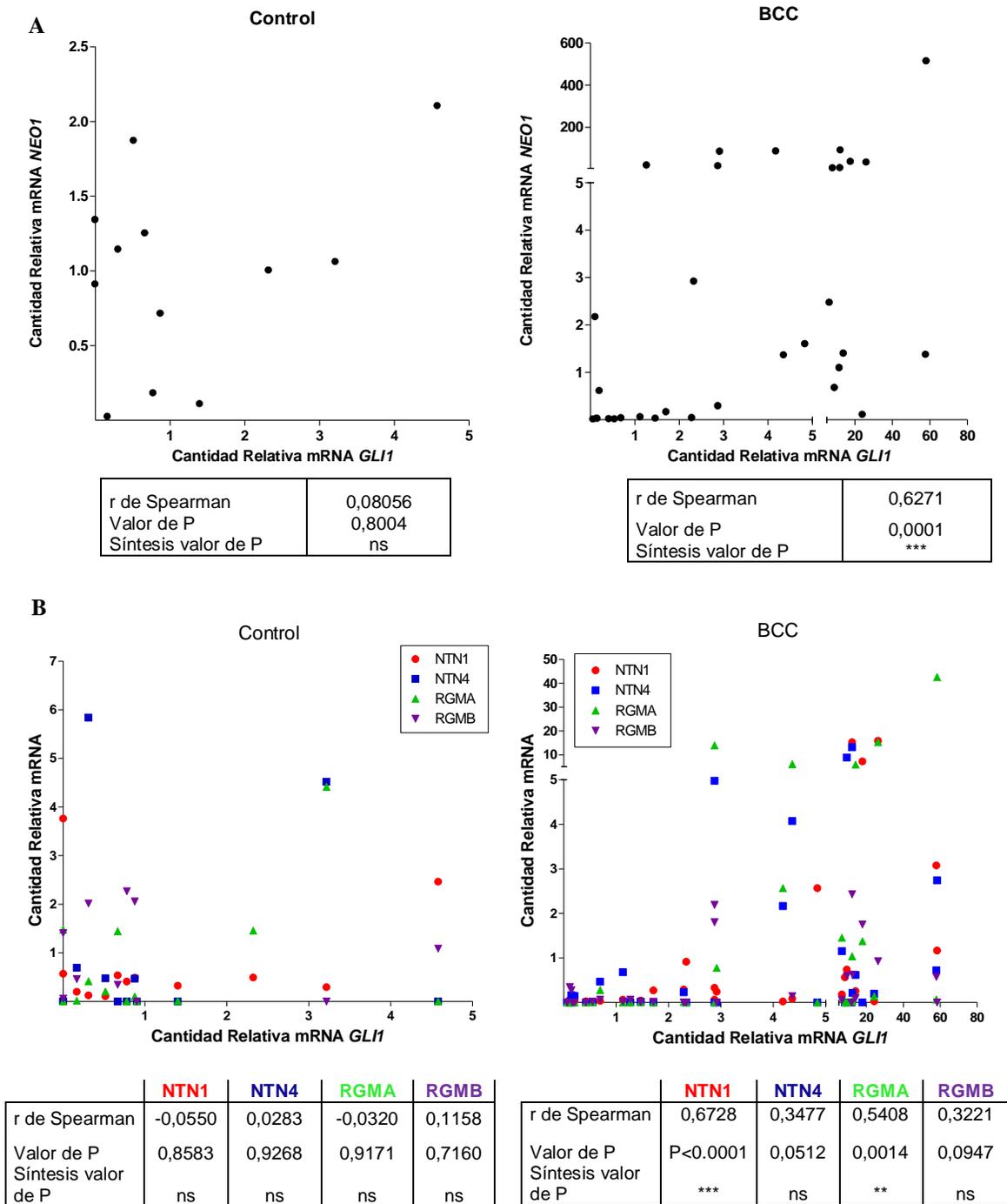


Figura 13. Niveles de mRNA de *NEO1* y ligandos se correlacionan con los niveles de *GLI1*. Niveles de mRNA en función de *GLI1* (gráficos) de muestras control (n= 15) y BCC (n= 32), en la tabla se indica el coeficiente de correlación (r) de Spearman y los valores de P. (A) *NEO1* (●) en función de *GLI1*. (B) *NTN1* (●), *NTN4* (■), *RGMA* (▲) y *RGMB* (▼) en función de los niveles de *GLI1*. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P \leq 0,001$; ns= no significativo.

Dada la existencia de una correlación positiva y significativa, se evaluó si la inhibición de la vía SHH/GLI en un modelo de BCC *ex vivo* podría modular los niveles de NEO1 y ligandos.

Explantos de BCC fueron incubados con el inhibidor de la vía SHH/GLI ciclopamina 10 μ M por 48 h; posterior a esto se cuantificó la cantidad de mRNA de *NEO1*, *NTN1*, *NTN4*, *RGMA* y *RGMB*. Los niveles de *GLII*, *PTCH1* y *BCL-2* fueron cuantificados para evaluar la actividad de la vía SHH/GLI. El tratamiento fue efectivo, comprobándose una disminución en los niveles de mRNA de los tres reporteros de la vía SHH/GLI evaluados en comparación con el control vehículo (etanol 0,1%). La inhibición de la vía produce un descenso significativo de los niveles de *NEO1* y en relación a los ligandos, sólo logra disminuir significativamente los niveles de *NTN1*. El mRNA de *UNC5B*, otro receptor de NTN sin relación conocida con la vía SHH/GLI fue cuantificado como control y no muestra ningún cambio luego del tratamiento con el inhibidor (Fig. 14A). Los valores basales de cada uno de estos transcritos varían mucho entre cada muestra, siendo el tratamiento con ciclopamina capaz de inhibir los niveles de *GLII*, *NEO1* y *NTN1* independiente de los niveles iniciales de transcrito. Para *RGMA* este no es el caso, siendo los niveles iniciales mucho más bajos. A pesar de esto el 60% de las muestras disminuyen los niveles de *RGMA* luego del tratamiento (Fig. 14B).

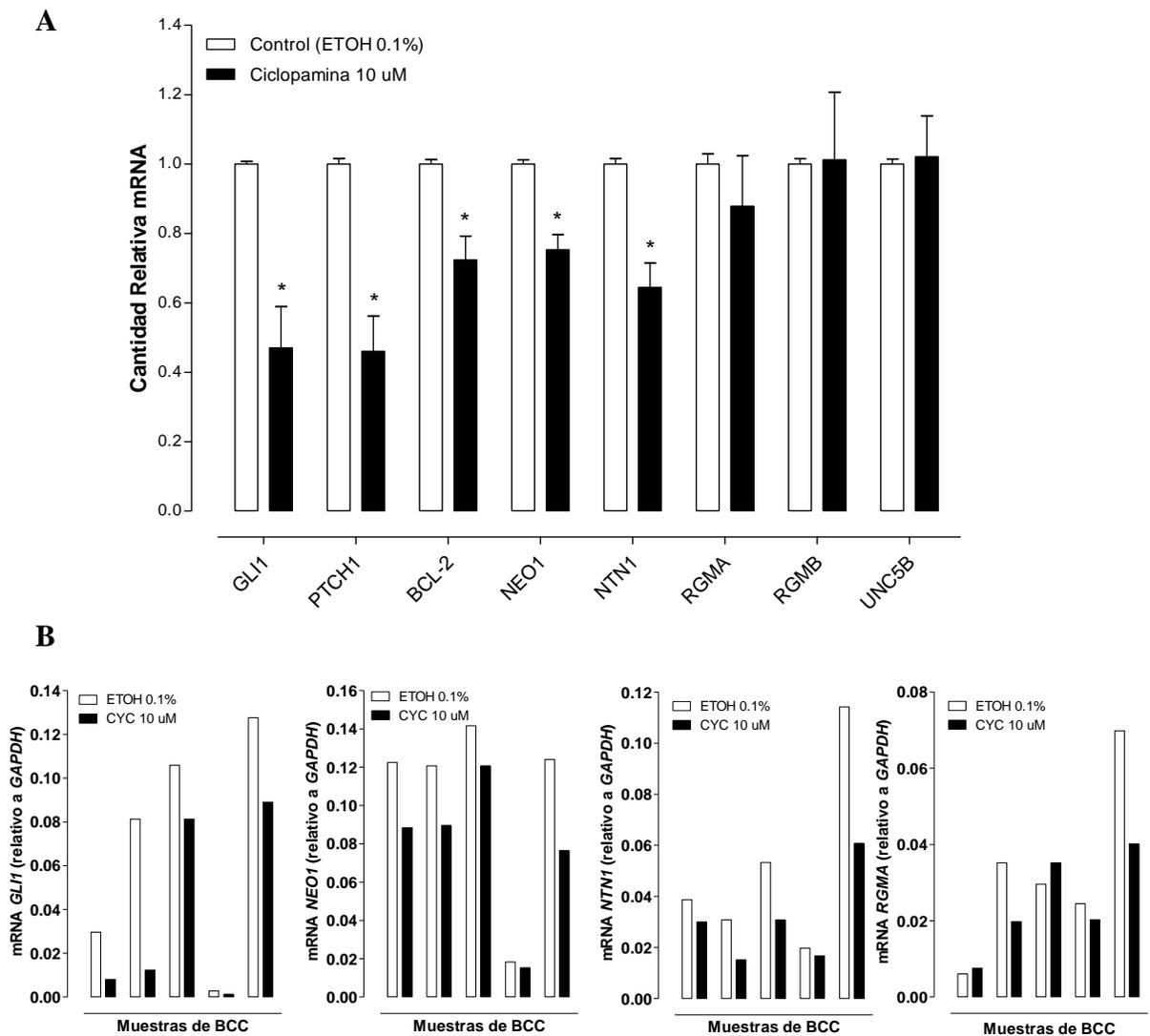


Figura 14. La inhibición de la vía SHH/GLI *ex vivo* permite modular los niveles de mRNA de NEO1 y sus ligandos. Explantes de BCC cultivados en DMEM + SFB 20% y tratados con ciclopamina 10 μ M (CYC) o etanol 0.1% (ETOH 0.1%) como control vehículo, durante 48 h. (A) Cuantificación del mRNA de *GLI1*, *PTCH1*, *BCL2*, *NEO1*, *NTN1*, *NTN4*, *RGMA*, *RGMB* y *UNC5B* de las muestras tratadas con ciclopamina de forma relativa al muestras control vehículo (ETOH 0,1%). N= 5. * $P < 0,05$; según test de Mann-Whitney. (B) Cuantificación del mRNA de *GLI1*, *NEO1*, *NTN1* y *RGMA* de forma relativa al mRNA de *GAPDH*, para cada muestra tratada con ETOH 0,1% o ciclopamina 10 μ M.

2 Evaluación de la relación entre *NEO1* y la proliferación y/o agresividad tumoral en BCC.

a) Niveles de mRNA de *NEO1* se asocian con agresividad tumoral

El BCC se clasifica en diversos subtipos según su apariencia histomorfológica, los cuales se asocian con comportamientos agresivos (micronodular, infiltrante, esclerosante) o indolentes (nodular, superficial).

Dada la alta variación de niveles de mRNA de los distintos genes analizados entre las muestras de BCC, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con el objetivo de correlacionar estos datos con características de agresividad otorgadas por el análisis anatomopatológico realizado por el servicio de anatomía patológica de la FALP. El ACP corresponde a un análisis de multivariantes que permite conocer el peso que tiene cada una de las variables y, en relación al total de ellas, explicar la variabilidad de las muestras. Esto permite reducir dichas variables en componentes, agrupando en ellos aquellas variables que se correlacionan entre sí.

Según los resultados del ACP, la mayor parte de la variabilidad entre muestras se explica por las dos primeras componentes principales, las cuales muestran que existen buenas correlaciones entre los niveles de mRNA de *GLII*, *NEO1* y *RGMA* para la componente 1 y entre *NTN4* y *RGMB* para la componente 2. Los valores de *PTCH1*, *NTN1* y *BCL2* no tienen peso en explicar la variabilidad entre muestras para ninguna de las componentes (Figura 15 A).

A

	PC 1	PC 2
PTCH1	-0.075498	-0.12923
GLI1	0.50714	-0.035109
NEO1	0.5544	-0.30387
NTN1	0.057702	0.15273
NTN4	0.23318	0.61049
RGMA	0.59346	-0.067611
RGMB	0.088191	0.69849
BCL-2	-0.10984	-0.035268

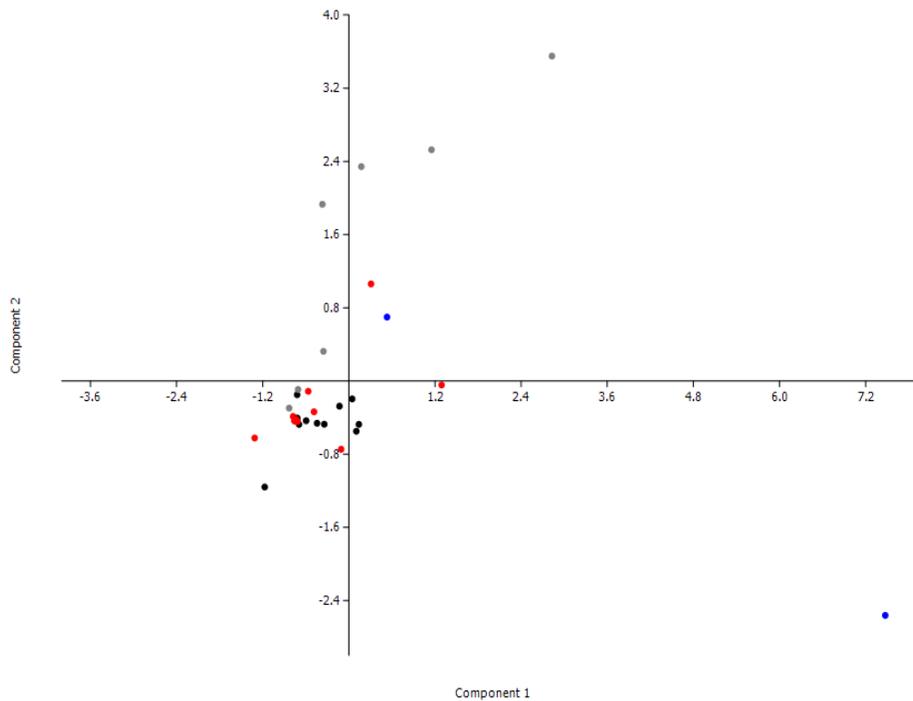
B

Figura 15. Los niveles de mRNA de *NEO1* varían entre BCC indolente y agresivo. ACP realizado a los niveles de transcrito obtenidos en las muestras de BCC (n= 32). (A) Tabla que muestra el peso de cada una de las variables en las dos primeras componentes, las variables que se correlacionan de forma significativa se muestran en verde. (B) Grafica del componente 2 en relación al componente 1, muestra la distribución de los diferentes subtipos de BCC: Nodular (●), Superficial (●) y Agresivo (●). (● = muestras sin subtipo diagnosticado).

Al graficar los dos primeros componentes del ACP podemos observar que existe una agrupación diferente entre los BCC indolentes y agresivos. Los BCC nodulares son negativos para la componente 2, es decir tienen niveles bajos de mRNA de *NTN4* y *RGMB* en relación al conjunto de BCC's y valores variables para la componente 1. Los dos casos de tipo superficial poseen negativos o positivos de la componente 2 pero ambos tienen un gran valor para la componente 1. Por el contrario los BCC de tipo agresivo son en su mayoría negativos para ambas componentes, poseen los menores niveles de *GLI1*, *NEO1*, *RGMA*, *NTN4* y *RGMB* (Figura 15B).

b) La distribución celular de NEO1 en BCC varía con el subtipo histomorfológico.

Los diferentes subtipos agresivos e indolentes de BCC difieren en sus características histológicas. Por ello, se evaluó mediante IF si es que existían diferencias en la distribución de la proteína NEO1 en los distintos tipos de tumor.

Los BCC de tipo indolente como el nodular y superficial se caracterizan por presentar grandes tumores sólidos, cercanos a la epidermis con alta proliferación, observable por la presencia de PCNA. En ellos NEO1 posee una marca fuerte en las células del estrato basal y en el interior de los nódulos tumorales. Los BCC de tipo agresivo, como los infiltrantes y micronodulares, infiltran la dermis generando una gran destrucción del tejido, son positivos para PCNA y a diferencia de los indolentes la marca de NEO1 en ellos es tenue (Figura 16A).

Al analizar con una mayor resolución la expresión de NEO1 en distintas biopsias de

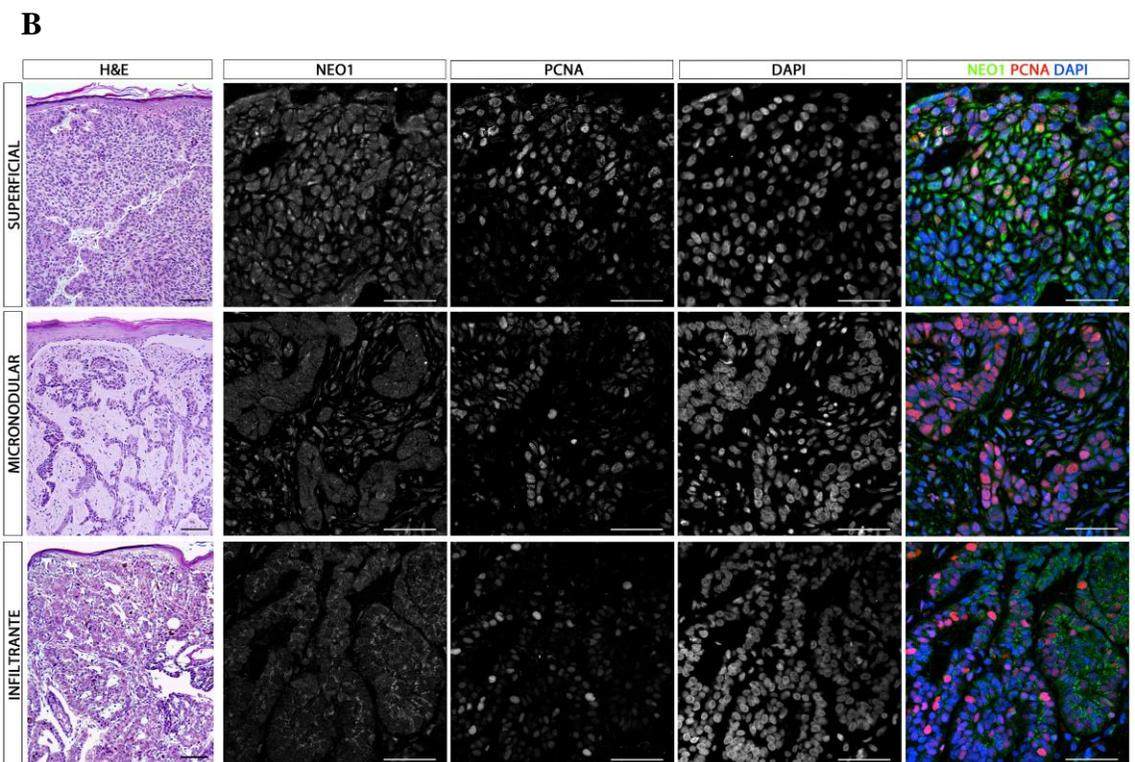
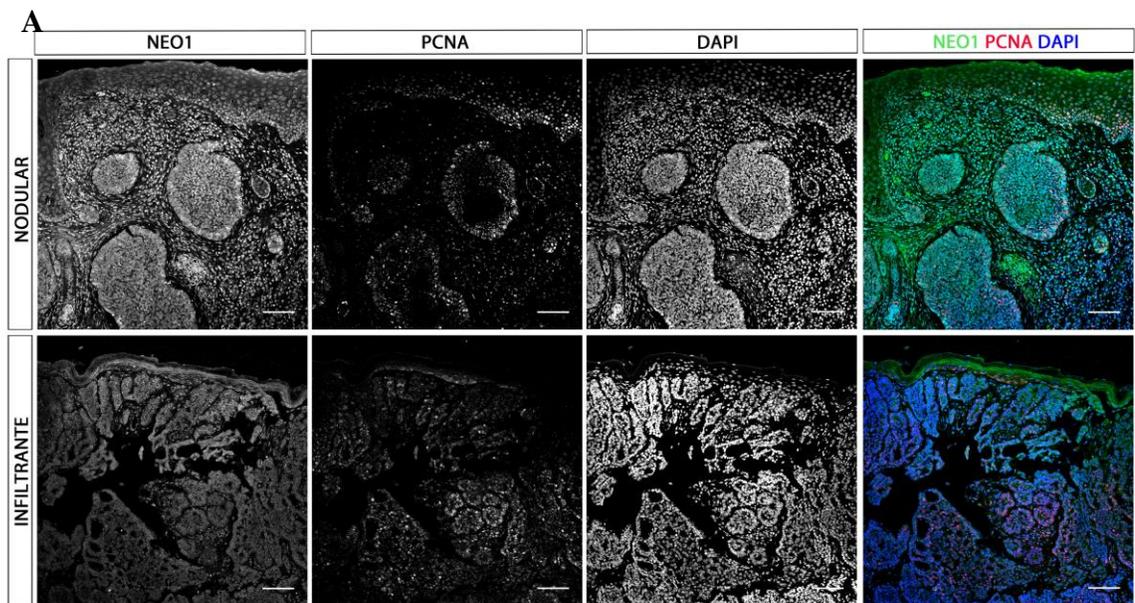


Figura 16. NEO1 varía su patrón de distribución en los subtipos de BCC. (A) IF de NEO1(verde) y PCNA (rojo) en cortes histológicos de BCC Nodular e Infiltrante (barra= 200 μ m) (B) H&E de cortes histológicos de BCC superficial, micronodular e infiltrante (columna izquierda, barra= 250 μ m), IF contra NEO1(verde) y PCNA (rojo) en nódulos tumorales de dichos cortes (barra= 50 μ m). Se usó DAPI (azul) para tinción nuclear.

BCC se puede ver que en el caso del tumor superficial, al igual que lo observado para en el nodular, existe una marca fuerte en los nódulos tumorales en los cuales NEO1 se ve con una distribución focalizada citoplasmática y en algunas células se nota marca nuclear. En ambos casos observados de tumores agresivos, micronodular e infiltrante, la marca es notablemente menos intensa y más difusa (Figura 16B).

3. Evaluación de los niveles de NEO1 en la progresión tumoral de BCC murino

SHH dependiente.

a) Ratones *K14:Ptch1^{lox/lox}* generan BCC de tipo agresivo

Dada la relación observada en BCC humano entre los niveles de NEO1 y la agresividad, quisimos observar si existían cambios en éstos durante la progresión tumoral. Para ello, se utilizó un modelo murino transgénico *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}*, el cual posee una delección condicional del gen *Ptch1* en las células basales de la epidermis. El aumento en la actividad de la vía SHH/GLI debido a la delección de *Ptch1* en estas células genera lesiones tipo BCC, las cuales se agravan a medida que transcurre el tiempo.

A las dos semanas de nacidos los ratones mutantes poseen un fenotipo claro con piel malformada en las orejas y escasez de pelo en todo el cuerpo. Ya al mes se observa caída del pelo en la cabeza, piel delgada y escamosa en el vientre y las extremidades (Fig. 10A). Estos ratones poseen una disminución de tamaño y su comportamiento es menos activo que los ratones que no tienen la mutación deseada y no presentan el fenotipo BCC (Control).

Se tomaron muestras de piel y de oreja de ratones *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}* y control de distintas edades (P13, P20 y P29) y se hizo un análisis histológico mediante tinción por H&E. Se observa que estos ratones generan BCC de tipo micronodular, el cual es agresivo y se infiltra a la dermis (Fig. 17B).

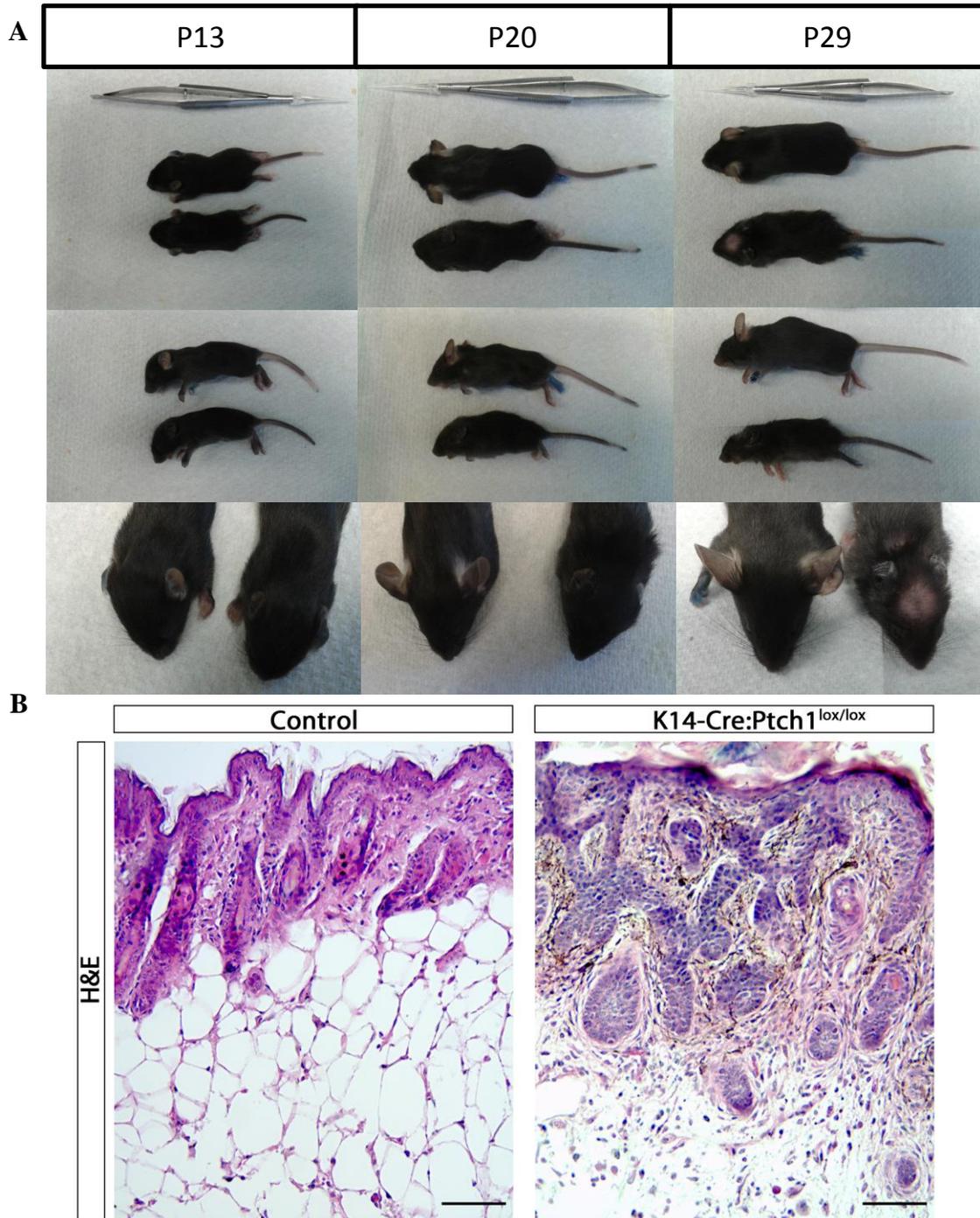


Figura 17. Modelo *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}* genera BCC de tipo micronodular que progresa con la edad del ratón. (A) Fotografías de ratones representativos Control (arriba o izquierda) y *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}* (abajo o derecha) a los 13, 20 y 29 días de nacidos. (B) H&E de cortes parafinados de oreja de ratón P13 control y *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}*, co-tinción con Hematoxilina (barra= 100 μ m).

b) El mRNA de *Neo1* y sus ligandos se detecta en piel sana de ratón

Con el objetivo de ver si los genes evaluados en piel sana humana se expresaban en ratón, se realizaron extracciones de RNA a partir de piel sana de ratones de diferentes edades y se cuantificó el mRNA de *Gli1*, *Neo1*, *Ntn1*, *Ntn4*, *Rgma* y *Rgmb* de forma relativa al mRNA de *Gapdh*.

A diferencia de los humanos, las fases de desarrollo del folículo piloso se encuentran definidas según la edad del ratón, encontrándose en fase anágena (crecimiento) de la morfogénesis del folículo piloso en P13, telógena (descanso) en P20 y anágena en P29 (Lin y cols., 2009).

Se puede observar que en las muestras control existen variaciones en la cantidad de mRNA de los distintos genes analizados dependiendo de la fase folicular en la que se encuentren. Para *Gli1* y *Rgma* dichas variaciones son leves, por el contrario vemos cambios en los valores de *Neo1*, *Ntn4* y *Rgmb* entre la fase anágena y telógena. *Ntn1* posee niveles casi no detectables en piel control, siendo éstos mayores en la fase telógena (Fig. 18). Sumado a esto existe una correlación positiva y significativa entre los niveles de mRNA de *Neo1* y *Rgma* (Fig. A3).

c) Los niveles de *Neo1* disminuyen en la progresión de BCC murino

A la fecha los estudios en modelos murinos de BCC causados por sobre-activación de la vía SHH/Gli han descrito un alza en ésta observada en el aumento de *Gli1*, ya sea mediante hibridación *in situ* o RT-PCR, sin hacer referencia a la cinética del aumento de *Gli1* o su relación con el avance o grado de agresividad de la enfermedad.

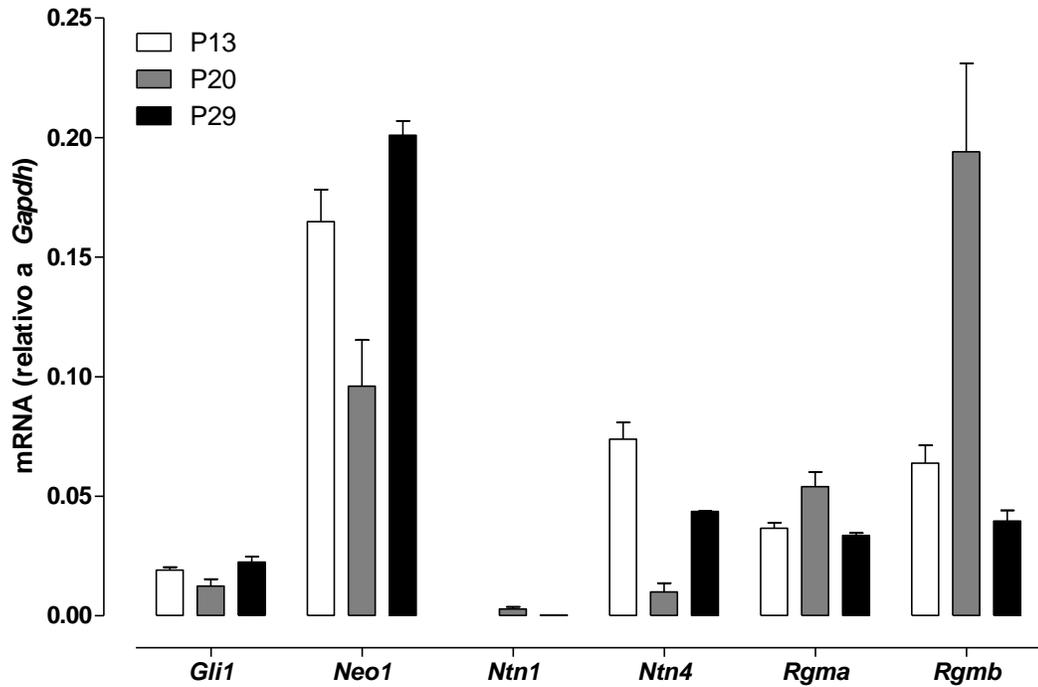


Figura 18. El mRNA de *Neo1* y sus ligandos se detecta en piel control murina. Cuantificación de los niveles de mRNA de *Gli1*, *Neo1*, *Ntn1*, *Ntn4*, *Rgma* y *Rgmb* en piel de ratón control (n= 8) en forma relativa a los niveles de *Gapdh*, al día posnatal P13, P20 y P29. No hubo significancia según test de Mann-Whitney.

Para corroborar que la vía SHH/GLI se encuentra sobre-activada en el modelo murino utilizado, se cuantificó el mRNA de *Gli1* de muestras de piel de ratones *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}* y control.

Se comprueba que en los ratones *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}* los valores de *Gli1* son significativamente mayores que los de su respectivo control etario. Más allá de esto, podemos observar que para los ratones P29, los cuales poseen un mayor grado de BCC, los niveles de *Gli1* son mayores al control, pero han disminuido con respecto a *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}* P13, que posee un menor grado de BCC (Fig. 19).

Los niveles de mRNA de *Neol* y sus ligandos también fueron cuantificados en piel de ratones *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}* y control. Los niveles de *Neol* se encuentran significativamente disminuidos en piel *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}* con respecto a sus respectivos controles etarios control, más aún se observa una disminución de sus niveles en *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}* a medida que progresa la edad del ratón y por ende el grado de BCC (Fig. 20A). Al igual que en BCC humano, existe una correlación positiva y significativa entre los niveles de mRNA de *Gli1* y los niveles de *Neol* (Fig. 20B).

Para los niveles de mRNA de *Ntn1*, *Ntn4* y *Rgmb* los valores tanto de controles como *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}* poseían grandes variaciones entre las distintas edades y fases foliculares, no observándose diferencias claras entre la piel control y tumoral (Fig. A4). Sin embargo, se observa que los niveles de todos estos ligandos se correlacionan significativamente con los niveles de *Gli1* (Fig.A5). En el caso de *Rgma*, este transcrito posee un comportamiento similar al observado para *Gli1* (Fig. 19), estando significativamente aumentado en *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}* con respecto al su control etario y

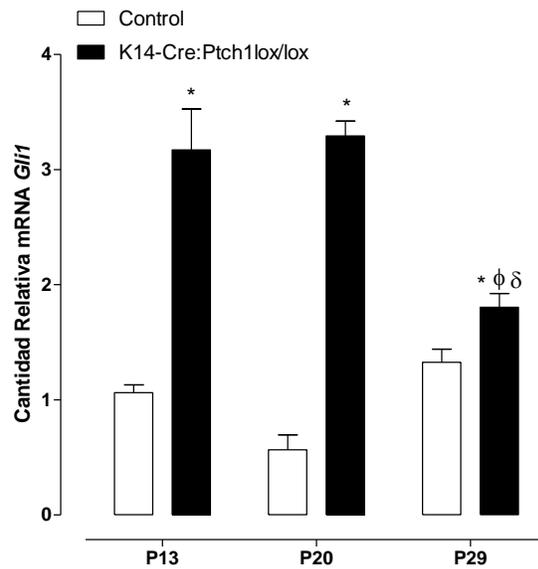


Figura 19. La vía SHH/GLI se encuentra sobre-activada en BCC murino. Cuantificación de los niveles de mRNA de *Gli1* de piel de ratón *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}* (n= 7) y Control (n=8) relativo a los niveles de piel de ratón control P13, al día posnatal P13, P20 y P29. $P < 0.05$ vs. control etario (*), *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}* P13 (ϕ), *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}* P20 (δ); según test de Mann-Whitney.

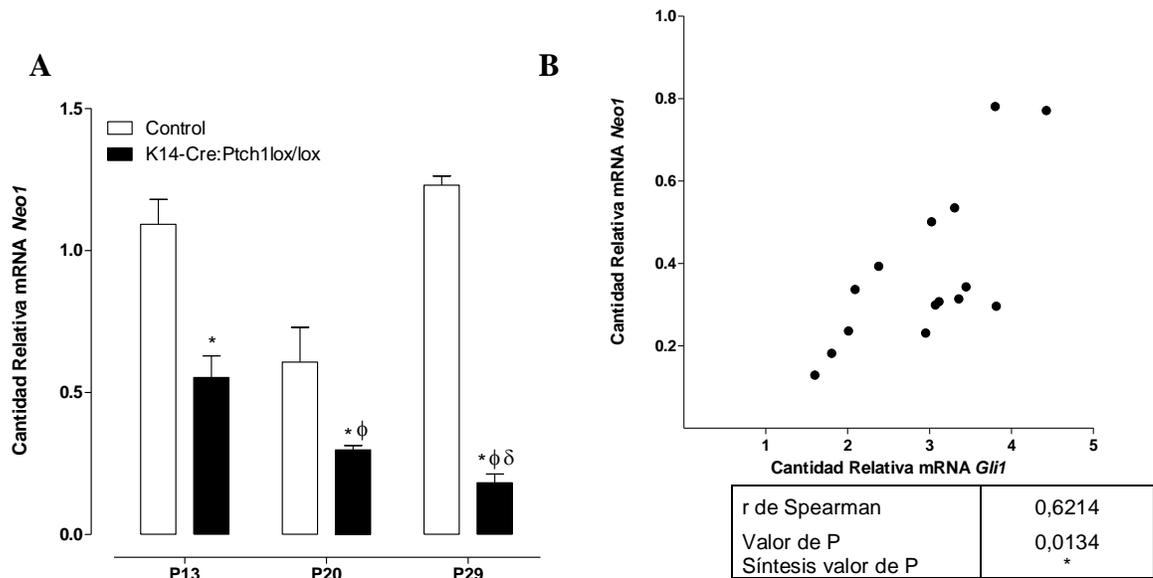


Figura 20. Los niveles de mRNA de *Neo1* disminuyen con la progresión tumoral. Cuantificación de los niveles de mRNA de piel de ratón *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}* (n= 7) y Control (n=8) relativo a los niveles de piel de ratón control P13, al día posnatal P13, P20 y P29. (A) mRNA de *Neo1* relativo a los niveles de control P13. $P < 0.05$ vs. control etario (*), *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}* P13 (ϕ), *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}* P20 (δ) según test de Mann-Whitney. (B) Niveles de mRNA de *Neo1* en función de *Gli1* (gráfico) de las muestras *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}*, en la tabla se indica el coeficiente de correlación (r) de Spearman y los valores de P. * $P < 0,05$.

disminuido en *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}* P29 con respecto a etapas más tempranas de BCC como *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}* P13 (Fig. 21A).

Los niveles de mRNA de *Rgma* se correlacionan positiva y significativamente tanto con los niveles de *Gli1* como con los de su receptor *Neol* (Fig. 21B y C). El cálculo de los coeficientes de correlación de Spearman no arroja valores significativos para los demás ligandos (Fig. A6).

Para evaluar su distribución tisular se realizaron IF contra NEO1 de piel de ratón control y *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}*. En piel control NEO1 tiene una marca fuerte y con presencia citoplasmática y nuclear en las células basales de la epidermis, las cuales son proliferativas, siendo en su mayoría positivas para PCNA, también se puede observar algo de marca en algunas células del estroma. Por el contrario, en BCC de los ratones *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}*, NEO1 posee una inmunotinción débil, siendo ésta dispersa similar a lo observado en BCC agresivo humano (Fig. 22).

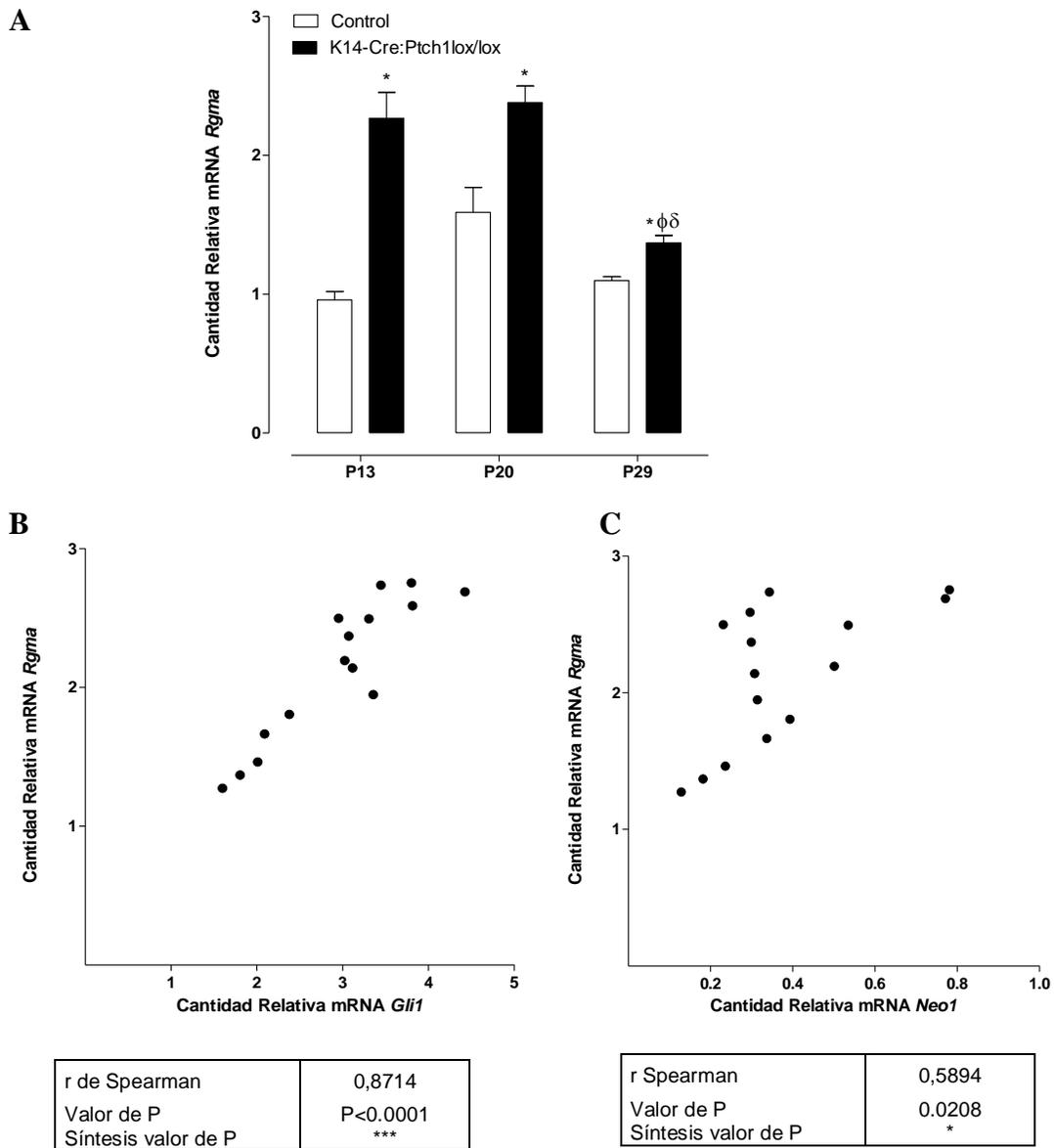


Figura 21. Los niveles de mRNA de *Rgma* disminuyen con la progresión tumoral en correlación con los niveles de *Neo1*. Cuantificación de los niveles de mRNA de piel de ratón *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}* (n= 7) y Control (n=8) relativo a los niveles de piel de ratón control P13, al día posnatal P13, P20 y P29. (A) mRNA de *Rgma* relativo a los niveles de control P13. $P < 0.05$ vs. control etario (*), *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}* P13 (ϕ), *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}* P20 (δ) según test de Mann-Whitney. (B y C) Niveles de mRNA de *Rgma* en función de *Gli1* y *Neo1* (gráficos B y C respectivamente) de las muestras *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}* (n=7), en la tabla se indica el coeficiente de correlación (r) de Spearman y los valores de P. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.

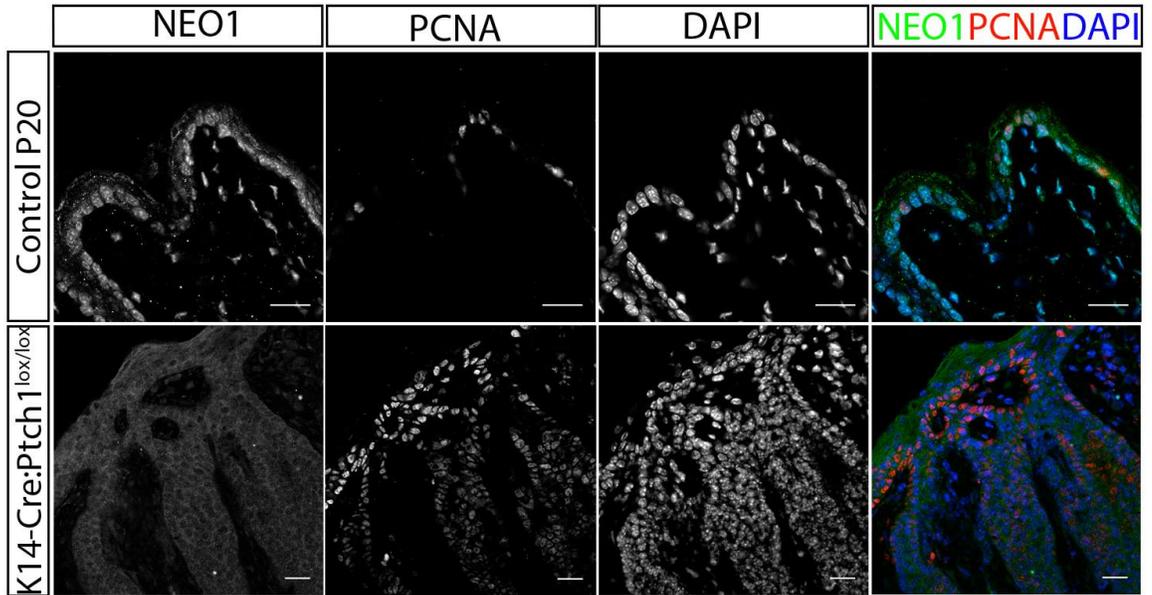


Figura 22. Neo1 se localiza en las células basales de la piel de ratón y disminuye cambiando su distribución celular en BCC. IF contra Neo1 (verde), PcnA (rojo) en cortes parafinados de piel de ratón Control y *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}* P20. Se muestra la epidermis hacia arriba (barra= 20 μ m). Se usó Dapi (azul) para tinción nuclear.

VI. DISCUSIÓN

El BCC es uno de los cánceres más frecuentes en la población caucásica y se relaciona principalmente con una sobre-activación de la vía SHH/GLI. El BCC puede causar una gran destrucción del tejido, ocurriendo generalmente esto en el rostro el cual se encuentra altamente expuesto al sol, que corresponde a uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad. Sumado a esto, se reportan de forma común casos de reincidencia luego de las cirugías o al uso de fármacos inhibidores de la vía SHH/GLI (Daya-Grosjean & Couvé-Privat, 2005; Iwasaki y cols., 2012; Kasper y cols., 2012; Wong y cols., 2003). Es por ello que se hace indispensable comprender el desarrollo de esta enfermedad e identificar posibles blancos y/o marcadores que permitan el tratamiento efectivo y el diagnóstico diferencial de este cáncer.

Dado que la vía SHH/GLI se encuentra sobre-activada en este tipo de neoplasia, en esta tesis se quiso evaluar en BCC un blanco transcripcional de esta vía, el receptor de dependencia NEO1, el cual se ha encontrado desregulado en diferentes tipos de cáncer. Se postuló que NEO1 podría estar aumentado en BCC de forma similar a lo reportado en otra neoplasia causada por sobre-activación de SHH/GLI, el meduloblastoma. Junto con eso se pretendió indagar si existía una relación entre la expresión de dicho receptor y sus ligandos con la progresión tumoral, en particular con el proceso de proliferación, dado que se había demostrado que la ausencia del receptor causa el arresto del ciclo celular en G2/M en una línea celular de meduloblastoma (Milla y cols. 2014).

1. NEO1, un conocido receptor de guía axonal, se expresa en piel humana.

A la fecha no existían estudios referentes a la expresión de *NEO1* ni de ninguno de sus ligandos en piel a excepción de un trabajo en el cual se observa la presencia de NEO1 en un cultivo primario de fibroblastos y se la relaciona con estrés por roce (Mackley y cols., 2006). Fuera de eso la descripción de su rol en condiciones fisiológicas se ha encontrado principalmente avocada a su actividad en guía axonal y desarrollo del sistema nervioso (Wilson & Key, 2007).

Por esta razón el primer objetivo fue evaluar la expresión de todos estos genes en piel sana y luego comparar dichos niveles con los encontrados en BCC. Para ello se cuantificó los niveles de mRNA de *NEO1*, *NTN1*, *NTN4*, *RGMA* y *RGMB* en conjunto con los niveles de los reporteros de la vía SHH/GLI, *GLII*, *PTCH1* y *BCL2*. Si bien resulta deseoso observar los niveles de proteínas, se optó por analizar el mRNA dado que la cantidad demuestra obtenida era escasa y el uso del PCR en tiempo real nos permitió analizar múltiples analitos con poca muestra. Sumado a esto, la recolección y el traslado de las muestras pudo ser realizado en RNAlater, el cual puede manejarse hasta por 1 semana a temperatura ambiente, facilitando este proceso. No obstante se observó la presencia de las proteínas NEO1, RGMA y NTN1 mediante IHQ e/o IF y se comprobó para el caso de NEO1 que los niveles de RNA se condicen con la cantidad de proteína observada por IHQ (Fig. 3 A y C). Cabe destacar que tanto para los análisis de muestras humanas como los realizados posteriormente en muestras murinas fueron efectuados sobre la biopsia completa, por lo que existen diferencias tanto en el número de células tumorales por cantidad total de muestra y la cantidad de epidermis sana en

cada una de ellas. Es posible que esto último sea causal de un porcentaje de la variación en los niveles de mRNA de los distintos genes analizados.

Como control sano se obtuvieron muestras de piel extirpadas durante cirugías no relacionadas. Dado que los BCC ocurren en su mayoría en las zonas de la cara y el cuello, se quiso utilizar muestras controles de esa zona, por lo que se utilizó piel del cuello extirpada durante tiroidectomías. No existen estudios que descarten una vinculación entre los problemas tiroideos y el BCC o la expresión de NEO1 y sus ligandos por lo que se decidió tener también otro tipo de muestras no relacionadas con ninguna enfermedad, para ello se obtuvo piel sana de la zona del bajo vientre extirpadas durante abdominoplastías. Se comprobó que no existen diferencias significativas en los niveles de mRNA para los genes analizados acorde a su lugar de obtención (Fig. A1). Es sabido que hormonas sexuales afectan tanto el crecimiento, las características del vello y el ciclo del folículo piloso en diferentes lugares del cuerpo; existen zonas en las cuales hay diferentes sensibilidades a andrógeno; reportes indican diferencias regionales en la actividad de 5 α -reductasa, enzima convertidora de testosterona a dihidrotestosterona; y estrógenos son capaces de regular la transición entre diferentes etapas del folículo piloso(Oh & Smart, 1996; Stenn & Paus, 2001). Indeseablemente casi el total de las muestras controles fueron donadas por pacientes de sexo femenino, por lo que no fue posible obtener un número comparable de muestras de ambos sexos. Por esta razón no se puede descartar que existan variaciones en los niveles de mRNA de los diferentes genes analizados entre hombres y mujeres. No obstante, la única muestra donada por un individuo de sexo masculino se ubica en el rango de variaciones esperadas para la

cuantificación de cada analito. Sumado a lo anterior, no se observaron diferencias significativas en BCCs proveniente de hombres y mujeres (Fig. A2).

Si bien se sabe que la vía SHH/GLI participa en el ciclo del folículo piloso, variando sus niveles en condiciones fisiológicas no se han establecido rangos de expresión normal para sus reporteros. En el desarrollo de esta tesis se observó que tanto para los reporteros de la vía SHH/GLI como para *NEO1* y sus ligandos existían muestras en las cuales no había niveles detectables de mRNA, en aquellas en las que si existía los niveles eran relativamente bajos en comparación con *GAPDH* y presentaban grandes variaciones entre las diferentes muestras, en especial en los niveles de los ligandos de *NEO1*, *NTN1*, *NTN4*, *RGMA* y *RGMB* en los cuales se puede observar que existen muestras que escapan la tendencia central (Fig.1). Lamentablemente en este estudio no contamos con acceso a la ficha clínica de las muestras control, pero cabe la posibilidad de que dichas muestras pertenezcan a donantes de mayor edad o con diferentes hábitos de exposición al sol. Sin descartar esto último, se observa que a excepción de un caso las muestras que se escapan de las tendencias son de diferentes donantes para cada gen, por lo que podrían pertenecer a la distribución normal en un número mayor de muestras y dichas variaciones corresponder con funcionalidades de las proteínas codificadas por estos genes en el ciclo del folículo piloso o en los procesos de diferenciación y regeneración de la epidermis, procesos que están activos permanentemente (Blanpain & Fuchs, 2009; Schneider y cols., 2009). La detección de estos transcritos en piel sana propone un rol para ellos más allá de la guía axonal, en condiciones fisiológicas de la piel humana, que queda aún por ser dilucidado. Apoyando esto último, se encontró que en piel sana de

ratón los niveles de mRNA de estos genes variaban según la edad de los ratones la cual está asociada al ciclo del folículo piloso, por lo cual es probable que estén involucrados en el ciclo o sean regulados por él (Fig. 18 y Fig. A2) (Lin y cols., 2009).

Como ya ha sido ampliamente descrito, la vía SHH/GLI participa en el desarrollo del folículo piloso y se mantiene activa regulando el ciclo folicular, regulando la proliferación de las células troncales ubicadas en la zona del *bulge* del folículo piloso (Oro & Higgins, 2003). Bajo el supuesto de que esta vía podría ser capaz de regular la transcripción de *NEO1* y sus ligandos, la activación de la vía podría implicar un rol de estas proteínas en procesos en los cuales se ha visto su participación en otros tejidos, como proliferación y migración/adhesión, en células epidermales y foliculares durante el ciclo del folículo piloso y mantención de la capa basal, tanto en condiciones fisiológicas como posiblemente en la transformación de estas células en cáncer.

2. GLI1, reportero clásico de la vía SHH/GLI, varía en BCC

El BCC se ha descrito ampliamente como un tumor epitelial caracterizado por la desregulación de la vía SHH/GLI. Tanto a nivel clínico como en investigación se ha estipulado que el BCC, a diferencia de otros tumores epiteliales, se caracteriza por tener presencia de GLI1, uno de los principales reporteros de la actividad de la vía SHH/GLI1. Esto ha sido identificado tradicionalmente por la detección del transcrito de GLI1 ya sea por hibridación *in situ* o PCR (Bonifas y cols., 2001; Hatta y cols., 2005). Debido a esto, en esta tesis se eliminaron del estudio 5 muestras de BCC ya que no poseían niveles detectables de *GLI1* (Figura 2A) reduciendo el número muestral a 32.

Como ya señalado, la vía de SHH/GLI se encuentra activa en BCC, demostrado por la presencia de GLI1, sin embargo en los trabajos en los que se ha cuantificado GLI1 no se hace referencia a los niveles de estos en las distintas muestras y tampoco se comparan con muestras de piel sana. En uno de los primeros trabajos en los que se identificó la proteína GLI1 en BCC, se puede observar que existen variaciones en los niveles de ella en las distintas muestras analizadas y que también varían en piel sana y queratinocitos aislados (Ghali y cols., 1999). Sin embargo, dichas variaciones no fueron analizadas en mayor profundidad. En trabajos posteriores en los que se cuantificó el mRNA de *GLII* por qPCR, se comprueba la presencia de este transcrito en BCC y también se observan variaciones entre muestras, existiendo en algunos casos diferencias de 20 veces en los niveles de *GLII*, sin embargo, tampoco se analizan en mayor medida ni se comparan con los niveles en piel sana, la cual expresa *GLII* en condiciones fisiológicas (Bonifas y cols., 2001; Hatta y cols., 2005). En el desarrollo de esta tesis observamos que si bien existe un aumento significativo en los niveles de mRNA de *GLII* en las muestras de BCC con respecto a la piel control existe una alta variabilidad en los niveles de este transcrito en las diferentes muestras (Fig. 2B). Esto no había sido reportado antes, considerándose al inicio de esta tesis que todos los BCC debieran tener niveles de *GLII* mayores al control, cosa que no resultó ser así. Este descubrimiento nos indica que pueden existir diferencias en la influencia que tenga la actividad de la vía SHH/GLI en el desarrollo y/o mantenimiento de los diferentes tumores. Respecto a esto se ha asociado la actividad de la vía a la progresión del ciclo celular en las células epidermales, este proceso es cíclico en el folículo piloso, por lo que la vía debe ser

inhibida a modo de mantener la homeostasis del tejido, lo que implicaría que los niveles de *GLII* puedan variar dependiendo del contexto proliferativo en el que se encuentren las células. Se han reportado diversas proteínas y vías que participan en la regulación de la vía SHH/GLI, lo que podría estar vinculado a la expresión diferencial de genes que se han descrito como regulados por esta vía. La variación de los niveles de *GLII* en los casos de BCC observados en esta tesis, podría dar cuenta de mutaciones accesorias que estén afectando a los reguladores de la vía SHH/GLI (Stecca & Ruiz i Altaba, 2010). Un ejemplo de esto es el gen supresor de tumores p53. Se estima que el 50% de los BCC poseen mutaciones en p53, en condiciones fisiológicas p53 inhibe la actividad de SHH/GLI evitando la transición G₂/M del ciclo celular. Mutaciones en este gen son conducentes a un aumento en la actividad de la vía produciendo una desregulación en la proliferación de las células epiteliales y generación de cáncer (Bolshakov y cols., 2003; Li y cols., 2014). La sumatoria entre ambas mutaciones puede conllevar a una mayor actividad de la vía y por consiguiente niveles mayores de *GLII*. Si bien mutaciones en p53 y un aumento en la vía SHH/GLI pueden relacionarse directamente con la aparición de este tipo de cáncer, los resultados de esta tesis sugieren que esto se cumple tan sólo para los subtipos indolentes de BCC o bien en el *onset* tumoral dado que se encontró una correlación negativa entre los niveles de *GLII* y la agresividad del tumor en muestras humanas de BCC (Fig. 15). Sumado a esto en las muestras de ratones *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}*, los niveles de *Gli1* tienden disminuir a edades mayores del ratón, es decir, a mayor progresión del cáncer (Fig. 19). Esto se condice con lo reportado en la literatura, en que se ha observado que variantes agresivas de BCC tienden a tener

mayores niveles de p53 que variantes no agresivas (Ansarin y cols., 2006), lo que implicaría que en estos tumores p53 estaría inhibiendo a la vía SHH/GLI y de esta forma disminuyendo los niveles de GLI1. Se ha observado también que BCL-2, una proteína antiapoptótica, la cual recientemente se ha reportado como blanco transcripcional de la vía SHH/GLI, se encuentra disminuida en las variantes agresivas de BCC (Bigelow y cols., 2004; Crowson y cols., 1996); esto podría estar explicado por una disminución en la actividad de la vía SHH/GLI en estas variantes. Tanto BCL-2 como p53 participan en el punto de control frente a daño del DNA en la regulación del ciclo celular, el cual ocurre frente a la exposición a UV, uno de los principales factores de riesgo del BCC (Aszterbaum y cols., 1999; Danial, 2007; Li y cols., 2014). La observación conjunta de lo reportado en la literatura, sumado a lo descrito en esta tesis, nos podría indicar que durante la progresión tumoral y en los casos más agresivos de BCC, los procesos proliferativos ya no están vinculados a la acción de la vía SHH/GLI ni necesariamente a la transición G2/M que es regulada por esta vía. Probablemente existan mutaciones accesorias que afecten el ciclo celular en otros puntos de control y que confieran a la célula tumoral ventajas en los procesos de migración e invasión, más allá de una proliferación descontrolada.

3. NEO1 se comporta como un receptor de dependencia en BCC

En el análisis de las muestras de BCC se observó que los niveles de mRNA de *NEO1* se encuentran aumentados al considerar el total de las muestras tumorales en comparación con las muestras de piel sana (Fig. 3A). Sin embargo, cabe destacar que existe un cantidad de muestras no menor que tiene niveles similares al control o

levemente aumentados en relación a este, lo cual a priori es inconsistente con el hecho de que NEO1 es un blanco de la vía SHH/GLI la cual se encuentra sobre-activada en este contexto. Dada esta discrepancia fue necesario analizar si la variación de los niveles de *NEO1* guardaba relación con el nivel de sobre-activación de la vía SHH/GLI y si es que dichas variaciones eran capaces de dar cuenta la progresión tumoral o de otros procesos como grados de agresividad de las diferentes muestras. Todos estos puntos serán discutidos más adelante.

La extracción de RNA fue realizada desde el tejido completo tanto en las muestras de piel sana como en las de BCC, por lo que se desconocía si es que *NEO1* era expresado ubicuamente en todo el tejido o poseía expresiones diferenciales. Se observó por IHQ que para el caso de la piel sana, existía presencia de *NEO1* sólo en la capa basal de la epidermis (Fig. 3B). La capa basal corresponde a la capa más interna de la epidermis, está compuesta por células en alta proliferación que se diferencian a células de las capas superiores, formando un nicho troncal (Blanpain & Fuchs, 2009). En el tumor *NEO1* se concentra principalmente en los nódulos tumorales, los cuales están compuestos por células con similitudes morfológicas a las células basales de la epidermis (Fig.3B). A la fecha no se ha establecido un origen celular claro para el BCC, habiendo distintos estudios que sugieren su surgimiento a partir de la zona del *bulge* del folículo piloso y otros que sustentan su aparición a partir de las células basales (Adolphe y cols., 2006; Villani y cols., 2010). Se ha observado que las células basales expresan en condiciones fisiológicas *GLI1*, *PTCH1* y otros blancos de la vía SHH/GLI, los cuales también se encuentran en los nódulos de BCC (Solís 2013). La descripción de *NEO1* en

ambas estructuras sustenta un posible origen del BCC a partir de la transformación de las células basales.

NEO1 se ha propuesto como miembro de la familia de los receptores de dependencia, la cual se caracteriza por tener señales positivas de proliferación y sobrevida en presencia del ligando y desencadenar la apoptosis en ausencia de este (Goldschneider & Mehlen, 2010; Matsunaga y cols., 2004). La hipótesis propuesta sugiere que un aumento de *NEO1* en conjunto con su(s) ligando(s) para promover el desarrollo del BCC. Dado que se encontró que en más de la mitad de las muestras los niveles de mRNA de *NEO1* estaban aumentados (Fig. 3A), se quiso evaluar si existía una correspondencia con los niveles de los ligandos, lo que podría estar promoviendo la sobrevida en esta neoplasia. Al analizar el total de las muestras se concluye que existen grandes variaciones en los niveles para las distintas muestras, existiendo muchos casos en los que la cantidad de mRNA no fue detectable y siendo en general los niveles bajos, similares al control. Sin embargo, cabe destacar que existen muestras en los cuales los niveles de los ligandos son mayores al control (Fig. 4A). Al comparar el nivel de mRNA de los ligandos con respecto al nivel de mRNA de *NEO1* para cada muestra se puede comprobar que en todos los casos en los que los niveles de *NEO1* eran superiores al control existe al menos un ligando que tenga niveles superiores al control (Fig.4 B), lo cual sustenta un comportamiento como receptor de dependencia en BCC, pudiendo en este contexto en unión con alguno de sus ligandos, promover la proliferación celular y/o aumentar la sobrevida del tumor. Cabe recordar que NEO1 y sus ligandos no se encuentran aumentados en todas las muestras tumorales, por lo que o NEO1 en baja

expresión y ausencia de ligando, podría estar gatillando apoptosis en menor medida. Al calcular el coeficiente de correlación de Spearman entre los niveles de mRNA de *NEO1* y sus ligandos se comprueba que existe una correlación positiva para *NTN1* y *RGMA*, postulando a estos dos como los ligandos de dependencia de *NEO1* en BCC. La significancia de esta correlación indica una alta probabilidad de que el alza en *NEO1* promueva un alza en los ligandos, viceversa, o que exista otro proceso que produce los cambios de ligando y receptor en conjunto. Esta posible dependencia es sustentada por el hecho de que las IF realizadas a los ligandos en BCC muestran la presencia de estos en los nódulos tumorales, al igual que *NEO1* (Fig. 5). Esto es además observado en IHQ de *NTN1* y *RGMA* en piel sana humana en la cual se observa que están presentes en las células basales de la epidermis, al igual que *NEO1* (Fig. A7). Esto sugiere la expresión de ambas proteínas en la misma célula y una señalización autocrina, a diferencia de lo descrito para otros pares ligando-receptor en BCC y otras neoplasias, en las que se observa el receptor siendo expresado en la célula tumoral y el ligando secretado por las células estromales (Sneddon y cols., 2006; Villani y cols., 2010). Sin embargo, como resultado de esta tesis tan solo puede corroborarse la presencia de ambos en las células basales tumorales; la expresión de ambas proteínas en la misma célula debería corroborarse mediante una hibridación *in situ* de los transcritos de *NEO1* y sus ligandos en estas biopsias. Si bien *NTN1* regula procesos cruciales durante el desarrollo como la guía axonal y migración celular, así como ha mostrado recientemente promover la supervivencia celular en el cáncer, aun no se han descrito las vías de señalización que regulan su transcripción en mamíferos. En este sentido, existen antecedentes *in vivo* en

pez cebra que evidencian la regulación que ejerce la vía Shh/Gli sobre los niveles transcripcionales del homólogo de NTN1, Net1a. De manera complementaria, un análisis genómico, en el que se utilizaron muestras provenientes de pacientes con meduloblastoma originado por la sobre-activación de la vía SHH/GLI, arrojó un aumento significativo en *NTN1* (datos no publicados, Laboratorio de Células Troncales y Biología del Desarrollo, Universidad de Chile) por lo que proponemos a NTN1 como nuevo blanco transcripcional directo de la vía Shh/Gli capaz de actuar como factor de sobrevida en cáncer.

4. NEO1 como efector de la vía SHH/GLI

Ha sido reportado que NEO1 es un blanco transcripcional de la vía SHH/GLI (Milla y cols., 2012), por lo que al estar la vía sobre-activada se esperaba que hubiera un aumento en los niveles de mRNA de *NEO1*. Sin embargo, los resultados de esta tesis indicaron que los niveles de *GLII*, utilizado como indicador de la actividad de la vía SHH/GLI varían en las distintas muestras. Los niveles de mRNA de *NEO1* también poseían grandes diferencias entre muestras, por lo que se quiso evaluar si existía alguna correlación entre los cambios en los niveles de *GLII* y los de *NEO1*. Sumado a esto, dada la existencia de correlaciones entre ligando y receptor, se evaluó si también si existía una correlación entre la actividad de la vía SHH/GLI y los niveles de los ligandos de *NEO1*.

Se encontraron correlaciones positivas y significativas entre *GLII* y *NEO1*, *NTN1* y *RGMA* (Fig. 6). Dado el antecedente de que *NEO1* es un blanco transcripcional de la vía

SHH/GLI nos podría indicar una posible regulación de la expresión de estos ligandos por parte de la vía. Posterior a esto se ensayó la inhibición de la vía SHH/GLI con el uso del antagonista farmacológico ciclopamina en explantes de BCC y se observó que la inhibición de la vía SHH/GLI disminuía los niveles de mRNA de *NEO1* y *NTN1* (Fig.7A). Para el caso de *RGMA* se observó que en el 60% de los casos existía una disminución de los niveles después del tratamiento, por lo que no se puede descartar una modulación por parte de la vía para este gen y tampoco la existencia de otros mecanismos que estén regulando los niveles de *RGMA* en el tejido tumoral (Fig. 7B). Estos resultados indican que *NEO1* y sus ligandos aumentan en BCC en correlación con la actividad de la vía de SHH/GLI. Sin desmedro de lo anterior, cabe destacar que hubiese sido deseable evaluar el cambio en los niveles de proteína luego del tratamiento para establecer una relación funcional entre ambas cosas, sin embargo, no fue posible realizar Western Blot ni inmunotinciones debido a que sólo se puede obtener muestras frescas luego de realizada la biopsia y guardado una contramuestra en el servicio de anatomía patológica, lo que se traduce en tamaños muy reducidos de las muestras tumorales.

5. Diferencias en los niveles de NEO1 tienen relación con agresividad tumoral

A medida que aumenta la edad de los individuos la morbilidad de esta enfermedad sube enormemente, sin embargo es un cáncer de baja mortalidad dado que rara vez metastiza. El surgimiento del BCC se relaciona principalmente con un aumento de la actividad de la vía SHH/GLI pudiendo ser generado en modelos animales mediante el

aumento en la actividad de esta vía tanto en el la zona del *bulge* del folículo piloso y en las células basales de la epidermis, mediante mutaciones en el gen de *Ptch1*, las cuales se han considerado suficientes para desencadenar este tipo de cáncer (Adolphe y cols., 2006; Villani y cols., 2010). Más aún, se han identificado que cerca del 70% de los casos de BCC humano posee mutaciones en gen del receptor de *PTCHI*. Sin embargo, a pesar de poseer un origen común, el BCC se manifiesta con grandes diferencias histomorfológicas, pudiendo clasificarse en diferentes subtipos los cuales se han caracterizado según su comportamiento agresivo o indolente (Blanpain & Fuchs, 2009; Yu y cols., 2008). El hecho de que a pesar de que se originen todos por un aumento de la vía Hh tengan comportamientos distintos es indicativo de que haya expresiones diferenciales de otros genes o que la actividad de la vía varíe en el progreso de esta enfermedad, que es precisamente lo que fue observado en esta tesis.

Como se discutió anteriormente los niveles de *NEOI* varían entre las diferentes muestras de BCC y se correlacionan con la actividad de la vía SHH/GLI, observándose también gran variabilidad en los niveles de *GLII*. Se encuentra ampliamente descrito en la literatura que la vía SHH/GLI se encuentra activa en BCC, haciéndose detectables los niveles de transcrito de *GLII* a diferencia de otros tumores epiteliales, utilizándose de hecho como marcador diagnóstico (Dahmane y cols., 1997; Ghali y cols., 1999). Sin embargo, a la fecha no se había establecido ninguna relación entre el nivel de activación de la vía, el nivel de expresión de *GLII* y el grado de diferenciación, características morfológicas o agresividad del BCC. Es por ello que con el objetivo de explicar dichas variaciones no esperadas en los niveles de *GLII*, *NEOI* y los ligandos se pretendió

evaluar si es que los niveles de alguno de los genes analizados nos permitían explicar la variabilidad en estas muestras y relacionarlas con la agresividad de estos tumores.

A partir de los resultados del análisis anatomopatológico realizado a biopsias de las muestras de BCC analizadas se pudo establecer por morfología el subtipo de BCC y por consiguiente la agresividad de cada una de las muestras. De los 32 casos estudiados, 10 no poseían un subtipo diagnosticado a la fecha de escritura de esta tesis, sin embargo, dados los protocolos clínicos establecidos en la extirpación de este tipo de tumores, es muy probable que estos correspondieran a subtipos indolentes de BCC o tumores pequeños, que pudiesen ser diagnosticados bajo criterios macroscópicos y no necesitaran un análisis histomorfológico detallado.

Posteriormente se realizó un ACP, el cual es un análisis de multivariantes que nos permite asociar variables en distintas componentes según el peso que posean en explicar la variabilidad de las muestras. El resultado del ACP muestra que al considerar todas las variables se confirma la correlación observada entre *GLII*, *NEO1* y *RGMA*. Más allá de eso se puede observar que los BCC de comportamiento agresivo tienden a tener valores menores de estas tres variables y de todos los ligandos de *NEO1*. Los BCC indolentes presentan distintos niveles de *NEO1/GLII/RGMA* destacándose que los casos de BCC superficial, que es uno de los más indolentes, tienen los valores más altos para estos transcritos (Fig. 8). Esto propone que la vía SHH/GLI se encuentra sobre-activada de manera importante en los casos más indolentes de BCC quizás disminuyendo o perdiendo relevancia su actividad en los casos más agresivos. Así mismo se observa que

a nivel de proteína NEO1 posee expresiones diferenciales entre los casos agresivos e indolentes (Fig. 9).

Se ha propuesto que el BCC progresa principalmente desde la evasión del arresto celular y la inhibición de la apoptosis de nichos troncales en el *bulge* del folículo piloso y en la capa basal de la epidermis, provocando la acumulación de tejido neoplásico en esta capa, lo que resulta en la generación de BCC superficial o nodular, los cuales se caracterizan por mantenerse circunscritos y cercanos a la epidermis, con comportamiento indolente. La expresión de BCL2, una proteína antiapoptótica que es blanco de la vía SHH/GLI, es alta en esta etapa promoviendo la longevidad de estas células lo que expone al tumor a sufrir nuevos procesos mutagénicos que lo hagan progresar a un tumor de crecimiento agresivo. Estos últimos se caracterizan por poseer altas tasas de apoptosis (poseen bajos niveles de BCL2), aumento en la migración y capacidad infiltrativa y aumento en la actividad mitótica (Crowson, 2006; Regl y cols., 2004; Tilli y cols., 2002). *BCL2* es también un blanco transcripcional de la vía SHH/GLI, por lo que el hecho de que tanto *BCL2* como *NEO1* estén disminuidos en los tumores agresivos puede deberse a una disminución en la actividad de la vía SHH/GLI, sustentado por la disminución de los niveles de *GLI1* en tumores agresivos y en la progresión tumoral (Fig. 19), lo que nos estaría indicando la participación de otras vías en este proceso o la presencia de una retroalimentación negativa luego de un punto crítico en la progresión tumoral.

Si bien el mecanismo por el cual actúa NEO1 en presencia de ligando no ha sido dilucidado por completo, se ha propuesto que al ser un receptor de dependencia esta

interacción evitaría la apoptosis, que es lo que podría estar ocurriendo en los casos de BCC indolente con alta expresión de *NEO1* y presencia de ligandos. Se ha descrito también que *GLI2* podría tener un rol en antagonizar la inhibición por contacto de las células epidermales, evitando el arresto celular y la diferenciación y por tanto promoviendo la tumorigénesis, siendo importante en el desencadenamiento del proceso tumorigénico (Regl y cols., 2004). Esto último se ha reportado para cáncer gástrico en el que un aumento de *NEO1* se relaciona con la proliferación y movilidad de las células tumorales (Kim y cols., 2014). *NEO1* es un blanco transcripcional de la vía *SHH/GLI* teniendo sitios de unión al factor de transcripción *GLI2* (Milla y cols. 2014), por lo cual guarda sentido que *NEO1* esté, al igual que *GLI2*, implicado en el surgimiento tumoral, teniendo un rol en las primeras etapas de progresión caracterizadas por bajas tasas de apoptosis.

La disminución de *NEO1* y sus ligandos en los casos agresivos puede dar cuenta de mutaciones secundarias que han ocurrido en el tumor, lo que provoca que al estar ausentes los ligandos y existir presencia de *NEO1* en la membrana celular (Fig. 9) se genere un aumento en la apoptosis característico de este tipo de tumor en etapas agresivas. Sumado a esto se ha visto que *NEO1* posee un rol en adhesión celular durante la organogénesis de la glándula mamaria (Bae y cols., 2009; Srinivasan et al., 2003; Thompson & Hugo, 2012) y se ha reportado que el nivel de mRNA de *NEO1* se encuentra inversamente relacionado con el grado tumoral en cáncer de mama (Xing y cols., 2014). Pese a que en este último trabajo no se analiza a profundidad la función de *NEO1* en este tipo de cáncer si se propone que la disminución de *NEO1*, dado que es un

receptor de dependencia, pueda estar disminuyendo la apoptosis. Esto sería similar a lo observado en otros tipos de cáncer con su homólogo DCC, sin embargo en dicho trabajo no se midieron los niveles de ninguno de sus ligandos, por lo que se desconoce aún la función de NEO1 en este contexto. Es posible que, como se ha visto en diversos tipos de cáncer, se estén recapitulando procesos propios del desarrollo y que la disminución de NEO1 provoque una menor adhesión favoreciendo la transición epitelio-mesénquima y por lo tanto, otorgando mayor capacidad infiltrativa de las células. En BCC podría estar ocurriendo algo similar, mas queda aún por dilucidar los roles que juega NEO1 y sus ligandos en condiciones fisiológicas y cáncer.

6. NEO1 y SHH/GLI son importantes en el surgimiento tumoral y disminuyen con la progresión

Los resultados obtenidos indican que un aumento de NEO1 podría promover el desencadenamiento de BCC y la mantención de BCCs indolentes ligado a la sobre-activación de la vía SHH/GLI, sin embargo también se observa que en casos más agresivos tanto los niveles de NEO1 como la actividad de la vía SHH/GLI se encuentran disminuidos, por lo que es posible que exista una disminución temporal en la progresión de las neoplasias agresivas.

Con el fin de identificar si NEO1 y la vía SHH/GLI disminuyen a medida que progresa la enfermedad se utilizó un modelo murino de BCC, el cual posee una delección condicional del gen *Ptch1* ligada al promotor de *Keratina 14*. Este tipo de keratina se expresa principalmente en las células basales de la epidermis y la delección de *Ptch1* en

estas células genera un fenotipo tipo BCC micronodular, el cual corresponde a un subtipo agresivo. A medida que avanza la edad del ratón progresa el grado tumoral (Villani y cols., 2010).

En esta tesis se cuantificó el mRNA de *Gli1* por PCR cuantitativo en muestras de piel de ratón sana y tumoral y se observó que efectivamente los niveles de *Gli1* se encontraban aumentados con respecto al control en cada una de las edades de extirpación de muestra, sin embargo es destacable que los tumores provenientes de los ratones más adultos, es decir, aquellos tumores más avanzados, disminuían significativamente los valores de *Gli1* con respecto a tumores de ratones con menor edad, es decir, tumores menos avanzados (Fig. 12). Esto tiene similitud con lo observado en BCC humano, en el cual los tumores de subtipo agresivo tienen valores menores de *GLI1* en relación al total de las muestras y realiza la propuesta de que la vía SHH/GLI esté principalmente implicada en el desencadenamiento inicial del BCC y pierda relevancia en etapas más avanzadas de este.

Los niveles de mRNA de *Neol* se encuentran disminuidos en BCC murino con respecto a la piel control y disminuyen significativamente a medida que avanza la edad del ratón y por consiguiente aumenta el grado tumoral. Si bien esto es coherente con la observación hecha en BCC humano de que los niveles de *Neol* son menores en BCC agresivo, hubiera sido esperable encontrar *Neol* aumentado en etapas tempranas, en las cuales el tumor aún no ha desarrollado características agresivas, lo que sustentaría la hipótesis de que tanto la vía SHH/GLI como *Neol* son importantes en desencadenar el proceso tumoral. Sin embargo, este modelo produce BCCs infiltrativos desde temprano

y no se puede descartar que *Neol* estuviese alto quizás a una edad anterior a la observada en esta tesis. No obstante lo anterior se comprueba que sigue existiendo una correlación positiva y significativa entre los niveles de mRNA de *Neol* y *Gli1* (Fig. 13B), por lo que cabe la posibilidad de que estuviese aumentado a edades más tempranas y también de que los niveles de *Gli1* puedan disminuir aún más en edades más tardías. Sumado a esto se observa que uno de los ligandos definidos como principales en BCC humano, *Rgma*, posee niveles de mRNA mayores al control pero al igual que *Gli1* disminuyen a medida que avanza la progresión tumoral. Los niveles de dicho ligando guardan correlación tanto con los niveles de *Gli1* como de *Neol* (Fig. 14), indicando que en este modelo también podría haber una regulación por parte de la vía SHH/GLI en la transcripción de los ligandos de *Neol* y que *Rgma* pudiese estar actuando como factor de dependencia para *Neol* en etapas tempranas del BCC para luego ser perdidos en etapas más avanzadas del tumor, esto se condice con la observación de una correlación positiva y significativa entre *Neol* y *Rgma* en piel sana de ratón (Fig. A3). No obstante la correlación observada entre los niveles de mRNA de *Neol* y *Rgma* y su posible vinculación con la vía SHH/GLI, la observación de que los niveles de *Rgma* se mantengan elevados a pesar de que los de *Neol* hayan disminuido puede indicar que *Rgma* esté participando de algún otro proceso o en vinculación con otras vías tanto en piel sana como en BCC. En este sentido es sabido el rol que juega la señalización de BMP en el desarrollo y mantenimiento de la piel; *Rgma*, siendo un receptor de BMPs podría, de manera conjunta o independiente de *Neol*, estar participando de alguno de estos procesos (Fuchs, 2007; Kasper y cols., 2012; Sneddon y cols., 2006).

La observación de NEO1 en IF de muestras murinas es similar a lo observado en muestras humanas, en donde NEO1 posee una marca fuerte y localizada en la capa basal de la piel normal, con distribución focalizada y en algunos caso nuclear o perinuclear, lo que podría indicar un rol similar al que posee en BCCs indolentes, posiblemente más ligado a sobrevida y proliferación. Por el contrario la tinción en BCC murino es similar a la observada en BCCs humanos agresivos, con marcas tenues y algo de marca en membrana celular. Esta observación sustenta la observación de que NEO1 posiblemente cumple roles diferentes dependiendo de las características morfológicas del tumor y por ende guardando relación con el grado de agresividad de este.

VII. CONCLUSIONES

- *NEO1* y sus ligandos están presentes en piel sana humana y aumentan su expresión en nódulos tumorales de BCC.
- Los niveles de mRNA de *NEO1* aumentan en forma conjunta con los niveles de sus ligandos *RGMA* y *NTN1*. Los niveles tanto de ligando como receptor se correlacionan con la actividad de la vía SHH/GLI.
- Tanto la actividad de la vía SHH/GLI (niveles de mRNA de *GLI1*) como los niveles de mRNA de *NEO1* y sus ligandos varían en BCC, asociándose niveles altos de todos ellos a subtipos indolentes y bajos niveles a subtipos agresivos de BCC y etapas tardías de la progresión tumoral.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Adolphe, C., Hetherington, R., Ellis, T., & Wainwright, B. (2006). Patched1 functions as a gatekeeper by promoting cell cycle progression. *Cancer Research*, 66(4), 2081–8.
- Altaba, A. R. i, Mas, C., & Stecca, B. (2007). The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends in Cell Biology*, 17(9), 438–447.
- American Cancer Society. (2013) Cancer Facts & Figures 2013 [en línea] N° 500813 <<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-036845.pdf>> [consulta: 27 Marzo 2013]
- Ansarin, H., Daliri, M., & Soltani-Arabshahi, R. (2006). Expression of p53 in aggressive and non-aggressive histologic variants of basal cell carcinoma. *European Journal of Dermatology*, 16(5), 543-547.
- Aszterbaum, M., Epstein, J., Oro, a, Douglas, V., LeBoit, P. E., Scott, M. P., & Epstein, E. H. (1999). Ultraviolet and ionizing radiation enhance the growth of BCCs and trichoblastomas in patched heterozygous knockout mice. *Nature Medicine*, 5(11), 1285–1291.
- Aza-Blanc P Ramírez-Weber FA, Laget MP, Schwartz C, Kornberg TB. (1997) Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. *Cell* 89:1043-1053.
- Bae, G., Yang, Y., Jiang, G., Hong, M., Lee, H., Tessier-lavigne, M., y cols. (2009). Neogenin Regulates Skeletal Myofiber Size and Focal Adhesion Kinase and Extracellular Signal-regulated Kinase Activities In Vivo and In Vitro. *Mol Biol Cell* 20, 4920–4931.
- Barnes, E. a, Heidtman, K. J., & Donoghue, D. J. (2005). Constitutive activation of the shh-ptc1 pathway by a patched1 mutation identified in BCC. *Oncogene*, 24(5), 902–15.
- Benaud, C. M., & Dickson, R. B. (2001). Adhesion-regulated G1 cell cycle arrest in epithelial cells requires the downregulation of c-Myc. *Oncogene*, 20, 4554–4567.
- Berrar, D., Sturgeon, B., Bradbury, I. A. N., Downes, C. S., & Dubitzky, W. (2005). Survival Trees for Analyzing Clinical Outcome in Lung Adenocarcinomas Based on Gene Expression Profiles: Identification of Neogenin and Diacylglycerol Kinase a Expression as Critical Factors. *Journal of Computational Biology*, 12(5), 534–544.
- Bigelow, R. L. H., Chari, N. S., Uden, A. B., Spurgers, K. B., Lee, S., Roop, D. R., ... McDonnell, T. J. (2004). Transcriptional regulation of bcl-2 mediated by the sonic hedgehog signaling pathway through gli-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(2), 1197–205.
- Blanpain, C., & Fuchs, E. (2009). Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(3), 207–17.

- Bolshakov, S., Walker, C. M., Strom, S. S., Selvan, M. S., Clayman, G. L., El-Naggar, A., et al. (2003). p53 mutations in human aggressive and nonaggressive basal and squamous cell carcinomas. *Clinical Cancer Research*, 9(1), 228-234.
- Bonifas, J. M., Pennypacker, S., Chuang, P., McMahon, A. P., Williams, M., Rosenthal, A., et al. (2001). Activation of Expression of Hedgehog Target Genes in Basal Cell Carcinomas. *Journal of investigative dermatology*, 739-742.
- Chiang Chin, Litingtung Ying, Lee Eric, Young Keith E., Corden Jeffrey L., Westphal Heiner, B. P. A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature*, 383, 407-413.
- Corcoran RB, Scott MP. (2001) A mouse model for medulloblastoma and basal cell nevus syndrome. *J Neurooncol*. 53(3):307-18.
- Crowson, A. N. (2006). Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. *Modern pathology*, 19, S127-S147.
- Crowson, A. N., Magro, C. M., Kadin, M. E., & Stranc, M. (1996). Differential Expression of the bcl-2 Oncogene in Human Basal Cell Carcinoma. *Human pathology*, 27(4), 355-359.
- Dahmane, N., Lee, J., Robins, P., Heller, P., & Ruiz I Altaba, a. (1997). Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours. *Nature*, 389(6653), 876-881.
- Danial, N. N. (2007). BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(24), 7254-63.
- Daya-Grosjean, L., & Couvé-Privat, S. (2005). Sonic hedgehog signaling in basal cell carcinomas. *Cancer Letters*, 225(2), 181-92.
- Elder D. (1995) Skin cancer: melanoma and other selected histological types. *Cancer* 75: 245-56.
- Espinoza N.A, (2012) Neogenina 1 actúa como un blanco transcripcional directo de la vía Sonic Hedgehog / Gli en línea celular de neuroblastoma humano. Memoria para optar al título profesional de Bioquímico. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 50p.
- Fuchs, E. (2007). Scratching the surface of skin development. *Nature*, 445(7130), 834-42.
- Ghali, L., Wong, S. T., Green, J., Tidman, N., & Quinn, a G. (1999). Gli1 protein is expressed in basal cell carcinomas, outer root sheath keratinocytes and a subpopulation of mesenchymal cells in normal human skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, 113(4), 595-9.
- Goldschneider, D., & Mehlen, P. (2010). Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. *Oncogene*, 29(13), 1865-82.
- Hatta, N., Hirano, T., & Darius, R. (2005). Molecular diagnosis of basal cell carcinoma and other basaloid cell neoplasms of the skin by the quantification of Gli1 transcript levels, *Journal of cutaneous pathology*, 32(2), 131-136.

- Ho, S.-M., Lau, K.-M., Mok, S. C.-H., & Syed, V. (2003). Profiling follicle stimulating hormone-induced gene expression changes in normal and malignant human ovarian surface epithelial cells. *Oncogene*, 22(27), 4243–56.
- Hu, Y. C., Lam, K. Y., & Law, S. (2001). Identification of Differentially Expressed Genes in Esophageal Squamous Cell Carcinoma (ESCC) by cDNA Expression Array : Overexpression of Fra-1 , Neogenin , Id-1 , and CDC25B Genes in ESCC Advances in Brief Identification of Differentially Expressed Ge. *Clinical Cancer Research*, 7, 2213–2221.
- International Agency for Research on Cáncer (IARC), World Health Organization. Globocan. (2008) Sección de Información en Cáncer <<http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>> [consulta: 27 Marzo 2013]
- Iwasaki, J. K., Srivastava, D., Moy, R. L., Lin, H. J., & Kouba, D. J. (2012). The molecular genetics underlying basal cell carcinoma pathogenesis and links to targeted therapeutics. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 66(5), e167–78.
- Jenkins, D. (2009). Hedgehog signalling: Emerging evidence for non-canonical pathways. *Cellular Signalling*, 21(7), 1023–1034.
- Johnson, R. L., & Scott, M. P. (1998). New players and puzzles in the Hedgehog signaling pathway. *Current Opinion in Genetics & Development*, 8(4), 450–6.
- Kasper, M., Jaks, V., Hohl, D., & Toftgård, R. (2012). Review series Basal cell carcinoma — molecular biology and potential new therapies. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(2), 455–463.
- Kim, S.-J., Wang, Y.-G., Lee, H.-W., Kang, H. G., La, S.-H., Choi, I. J., ... Chun, K.-H. (2014). Up-regulation of neogenin-1 increases cell proliferation and motility in gastric cancer. *Oncotarget*, 5(10), 3386–98.
- Lee, J. E., Kim, H. J., Bae, J. Y., Kim, S. W., Park, J.-S., Shin, H. J., ... Noh, D.-Y. (2005). Neogenin expression may be inversely correlated to the tumorigenicity of human breast cancer. *BMC Cancer*, 5, 154.
- Li, C., Chi, S., & Xie, J. (2011). Hedgehog signaling in skin cancers. *Cellular Signalling*, 23(8), 1235–43.
- Li, Z. J., Mack, S. C., Mak, T. H., Angers, S., Taylor, M. D., & Hui, C.-C. (2014). Evasion of p53 and G2/M checkpoints are characteristic of Hh-driven basal cell carcinoma. *Oncogene*, 33(20), 2674–80.
- Lin, K. K., Kumar, V., Geyfman, M., Chudova, D., Ihler, A. T., Smyth, P., ... Andersen, B. (2009). Circadian clock genes contribute to the regulation of hair follicle cycling. *PLoS Genetics*, 5(7), e1000573.
- Lobo, N. a, Shimono, Y., Qian, D., & Clarke, M. F. (2007). The biology of cancer stem cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23, 675–99.

- Lois P. (2012) Apoptosis inducida por el receptor de dependencia Patched1. Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de Magister en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias.
- Mackley, J. R., Ando, J., Herzyk, P., & Winder, S. J. (2006). Phenotypic responses to mechanical stress in fibroblasts from tendon, cornea and skin, *316*, 307–316.
- Madan V, Lear JT, Szeimies RM. (2010) Non-melanoma skin cancer. *Lancet* 375(9715):673-85.
- Matsunaga, E., Tauszig-Delamasure, S., Monnier, P. P., Mueller, B. K., Strittmatter, S. M., Mehlen, P., & Chédotal, A. (2004). RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival. *Nature Cell Biology*, 6(8), 749–55.
- McMillan, R., & Matsui, W. (2012). Molecular pathways: the hedgehog signaling pathway in cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18(18),
- Mehlen, P., Delloye-Bourgeois, C., & Chédotal, A. (2011). Novel roles for Slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets? *Nature Reviews. Cancer*, 11(3), 188–97.
- Milla, L. a, Arros, A., Espinoza, N., Remke, M., Kool, M., Taylor, M. D., ... Palma, V. (2014). Neogenin1 is a Sonic Hedgehog target in medulloblastoma and is necessary for cell cycle progression. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 134(1), 21–31.
- Milla, L. a, Cortés, C. R., Hodar, C., Oñate, M. G., Cambiazo, V., Burgess, S. M., & Palma, V. (2012). Yeast-based assay identifies novel Shh/Gli target genes in vertebrate development. *BMC Genomics*, 13(1), 2.
- Nitzki, F., Becker, M., Frommhold, A., Schulz-Schaeffer, W., & Hahn, H. (2012). Patched knockout mouse models of Basal cell carcinoma. *Journal of Skin Cancer*, 2012, 907543.
- Oh, H., & Smart, R. C. (1996). An estrogen receptor pathway regulates the telogen-anagen hair follicle transition and influences epidermal cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(October), 12525–12530.
- Oro, A. E., & Higgins, K. (2003). Hair cycle regulation of Hedgehog signal reception. *Developmental Biology*, 255(2), 238–248. [http://doi.org/10.1016/S0012-1606\(02\)00042-8](http://doi.org/10.1016/S0012-1606(02)00042-8)
- Rajagopalan, S., Deitinghoff, L., Davis, D., Conrad, S., Skutella, T., Chedotal, A., ... Strittmatter, S. M. (2004). Neogenin mediates the action of repulsive guidance molecule. *Nature Cell Biology*, 6(8), 756–62.
- Ramdial, P. K., Madaree, A., Reddy, R., & Chetty, R. (2000). bcl-2 protein expression in aggressive and non-aggressive basal cell carcinomas. *Journal of cutaneous pathology*, 27(6), 283-291.

- Regl, G., Kasper, M., Schnidar, H., Eichberger, T., Neill, G. W., Ikram, M. S., ... Aberger, F. (2004). The zinc-finger transcription factor GLI2 antagonizes contact inhibition and differentiation of human epidermal cells. *Oncogene*, 23(6), 1263–74.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(November), 105–111.
- Roy, S. (2002). Hedgehogs tryst with the cell cycle. *Journal of Cell Science*, 115(23), 4393–4397.
- Ruiz i Altaba, A., Sánchez, P., & Dahmane, N. (2002). Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nature Reviews. Cancer*, 2(5), 361–72.
- Schneider, M. R., Schmidt-Ullrich, R., & Paus, R. (2009). The hair follicle as a dynamic miniorgan. *Current Biology : CB*, 19(3), R132–42.
- Sneddon, J. B., Zhen, H. H., Montgomery, K., van de Rijn, M., Tward, A. D., West, R., ... Brown, P. O. (2006). Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(40), 14842–7.
- Solís N. (2013) Evaluación de la expresión del receptor Neogenina-1 y sus ligandos en piel sana y en neoplasia asociada a Carcinoma Basocelular. Memoria para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias.
- Srinivasan, K., Strickland, P., Valdes, A., Shin, G. C., & Hinck, L. (2003). Netrin-1/neogenin interaction stabilizes multipotent progenitor cap cells during mammary gland morphogenesis. *Developmental cell*, 4(3), 371-382.
- Stecca, B., & Ruiz I Altaba, A. (2010). Context-dependent regulation of the GLI code in cancer by HEDGEHOG and non-HEDGEHOG signals. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2(2), 84–95.
- Stenn, K. ., & Paus, R. (2001). Controls of Hair Follicle Cycling. *Physiological Reviews*, 81(1), 449–495.
- Gunasinghe, N. D., Wells, A., Thompson, E. W., & Hugo, H. J. (2012). Mesenchymal–epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 31(3-4), 469-478.
- Tilli, C. M. L., Stavast-Koey, A. J. W., Ramaekers, F. C. S., & Neumann, H. a M. (2002). Bax expression and growth behavior of basal cell carcinomas. *Journal of Cutaneous Pathology*, 29(2), 79–87.
- Vielmetter, J., Chen, X. N., Miskevich, F., Lane, R. P., Yamakawa, K., Korenberg, J. R., & Dreyer, W. J. (1997). Molecular characterization of human neogenin, a DCC-related protein, and the mapping of its gene (NEO1) to chromosomal position 15q22.3-q23. *Genomics*, 41(3), 414–21.
- Villani, R. M., Adolphe, C., Palmer, J., Waters, M. J., & Wainwright, B. J. (2010). Patched1 inhibits epidermal progenitor cell expansion and basal cell carcinoma

- formation by limiting Igfbp2 activity. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 3(10), 1222–34.
- Wilson, N. H., & Key, B. (2007). Neogenin: one receptor, many functions. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(5), 874–8.
- Wong, C. S. M., Strange, R. C., & Lear, J. T. (2003). Basal cell carcinoma. *BMJ: British Medical Journal*, 327(7418), 794.
- Xing, W., Li, Q., Cao, R., & Xu, Z. (2014). Neogenin expression is inversely associated with breast cancer grade in ex vivo. *World journal of surgical oncology*, 12(1), 352.
- Yoon, J. W., Gallant, M., Lamm, M. L. G., Iannaccone, S., Vieux, K.-F., Proytcheva, M., ... Walterhouse, D. (2013). Noncanonical regulation of the Hedgehog mediator GLI1 by c-MYC in Burkitt lymphoma. *Molecular Cancer Research : MCR*, 11(June), 604–15.
- Yu, M., Zloty, D., Cowan, B., Shapiro, J., Haegert, A., Bell, R. H., ... McElwee, K. J. (2008). Superficial, nodular, and morpheiform basal-cell carcinomas exhibit distinct gene expression profiles. *The Journal of Investigative Dermatology*, 128(7), 1797–805.

IX. ANEXOS

1. Documentos

- a) Consentimiento Informado para la obtención de muestras sanas en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

22 MAYO 2013

HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSIDAD DE CHILE



CONSENTIMIENTO INFORMADO
Control piel sana

Título del Proyecto: Evaluación de la expresión del receptor Neogenina 1 y sus ligandos en piel sana y neoplasia asociada a Carcinoma Basocelular.

Investigador Principal: Dra. Verónica Palma
Co-Investigadores: Dr. Patricio Gac, Dr. Iván Gallegos, Dr. Patricio Cabané

Servicio o Departamento: Laboratorio de Células Troncales y Biología del Desarrollo, Facultad de Ciencias, U. de Chile
Departamento de Cirugía, Hospital Clínico U. de Chile
Departamento Anatomía Patológica, Hospital Clínico U. de Chile

Antes de tomar la decisión de participar en la investigación lea atentamente este formulario.

Se me ha invitado a participar de este estudio, como control, que se enmarca dentro de la investigación realizada en el marco del proyecto FONDECYT N° 1110237 y que durará aproximadamente 6 meses, y que mi participación consistirá en la donación de una muestra de piel sana correspondiente a una pequeña muestra (2 mm x 2-3 cm) de piel sana que se extraerá durante la cirugía a la que voy a ser sometido. A esta muestra se le realizarán estudios adicionales, que consistirán en tinciones y estudios histológicos (del tejido) similares a los que se hacen a una muestra de biopsia, además de ver características genéticas de mi piel y su comportamiento (capacidad de crecimiento). Estos estudios adicionales en ningún caso van a comprometer el diagnóstico definitivo (si correspondiera hacer diagnóstico en la cirugía por la cual me opero) y no tendrán costo adicional. El tratamiento planificado y la decisión terapéutica no se verán modificados en ninguna circunstancia por participar en este estudio y las molestias o riesgos que el procedimiento conlleve serán los habituales para este tipo de procedimiento sin molestias o riesgos adicionales para mi salud. Se seleccionará por el patólogo (médico que es encargado de hacer el diagnóstico microscópico/ histológico y definitivo) una pequeña parte de la muestra, para ser donada a este estudio y se realicen estudios adicionales sin costo alguno para mi persona. Se mantendrá la confidencialidad médica del diagnóstico

Versión N°3. Hospital Clínico de la Universidad de Chile.02 de Mayo de 2013 1

en todo momento y sólo se darán datos generales (sexo, edad, etc.) a los investigadores participantes. No se divulgará información personal fuera del grupo de investigación en ningún caso.

Se me ha informado que todas las muestras de tejido serán codificadas con un código numérico para su uso actual o futuro. Los resultados individuales serán anónimos y los resultados de este estudio se mantendrán en reserva y sólo serán de conocimiento de los investigadores.

Se me ha informado que no recibiré ningún beneficio médico o compensación económica por participar en el estudio.

Se me ha solicitado que parte de mi tejido se congele y se almacene para futuros estudios en esta misma línea de trabajo, que puedan surgir.

Estoy de acuerdo SI / NO

Estoy además en conocimiento que de no participar en este estudio o si deseo retirarme de éste, esto no cambiará en nada las prestaciones normales que pudiera requerir por parte de este Hospital.

Se me ha informado que el Investigador tomará medidas para proteger la confidencialidad de mi registro médico y que mi identidad no será divulgada en ninguna publicación que resulte de este estudio.

Si tiene preguntas o preocupaciones sobre este estudio, o experimenta cualquier problema puede comunicarse con

Dr. Patricio Gac al teléfono 9788000

Este estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética Científico y de Investigación del Hospital Clínico de la Universidad de Chile (cualquier consulta llamar a su Presidente Dr. Juan Jorge Silva Solís, al teléfono 9789008) y de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

22 MAYO 2013



Por último señalo, que he leído este formulario y se me permitió realizar todas las preguntas que consideré de mi interés, las que fueron contestadas a mi entera satisfacción. Se me ha permitido consultar con mi médico de familia o pedir la opinión de otro profesional respecto a mi participación en este estudio. Entiendo se me darán copia de este documento. Consiento en participar en esta investigación

Nombre del participante

RUT..... Firma..... Fecha.....

Nombre del testigo (si el estudio lo amerita)

RUT..... Firma..... Fecha.....

Nombre del Investigador o médico designado : Dr. Patricio Gac.....

RUT..... Firma..... Fecha.....

Nombre del Delegado del Director o Ministro de Fe

RUT..... Firma..... Fecha.....



b) Consentimiento Informado para la obtención de muestras patológicas en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

HOSPITAL CLINICO UNIVERSIDAD DE CHILE

22 MAYO 2013

COMITE

CONSENTIMIENTO INFORMADO
Muestra patológica

Título del Proyecto: Evaluación de la expresión del receptor Neogenina 1 y sus ligandos en piel sana y neoplasia asociada a Carcinoma Basocelular.

Investigador Principal: Dra. Verónica Palma
Co-Investigadores: Dr. Patricio Gac, Dr. Iván Gallegos, Dr. Patricio Cabané

Servicio o Departamento: Laboratorio de Células Troncales y Biología del Desarrollo, Facultad de Ciencias, U. de Chile
Departamento de Cirugía, Hospital Clínico U. de Chile
Departamento Anatomía Patológica, Hospital Clínico U. de Chile

Antes de tomar la decisión de participar en la investigación lea atentamente este formulario.

Se me ha informado que padezco (o se sospecha) una enfermedad llamada Carcinoma Basocelular de la piel. Se me ha invitado a participar de este estudio que se enmarca dentro de la investigación realizada en el marco del proyecto FONDECYT N° 1110237 y que durará aproximadamente 6 meses, y que mi participación implica que se realizará la resección y biopsia del tumor. Este procedimiento es el tratamiento indicado por mi médico tratante para este tipo de tumores y se me solicita mediante este consentimiento que done una pequeña parte de la muestra (tumor y margen de piel sana), a la que se le realizarán estudios adicionales, que consistirán en tinciones y estudios histológicos (del tejido) similares a los que se hacen a una muestra de biopsia, además de ver características genéticas de mi tumor y su comportamiento (capacidad de crecimiento).

Estos estudios adicionales en ningún caso van a comprometer el diagnóstico definitivo y no tendrán costo adicional. El tratamiento planificado y la decisión terapéutica no se verán modificados en ninguna circunstancia por participar en este estudio y las molestias o riesgos que el procedimiento conlleva serán los habituales para este tipo de procedimiento sin molestias o riesgos adicionales para mi salud. En suma se trata del tratamiento indicado por mi médico como el adecuado para tratar mi condición y se seleccionará por el patólogo (médico que es encargado de hacer el diagnóstico microscópico/histológico y definitivo) una pequeña parte de la muestra, si y solo si no.

Versión N°3: Hospital Clínico de la Universidad de Chile. 02 de Mayo de 2013

compromete en ninguna forma la idoneidad y exactitud del diagnóstico, para ser donada a este estudio y se realicen estudios adicionales sin costo alguno para mi persona. Se mantendrá la confidencialidad médica del diagnóstico en todo momento y solo se darán datos generales (sexo, edad, etc.) a los investigadores participantes. No se divulgará información personal fuera del grupo de investigación en ningún caso.

Se me ha informado que todas las muestras de tejido serán codificadas con un código numérico para su uso actual o futuro. Los resultados individuales serán anónimos y los resultados de este estudio se mantendrán en reserva y sólo serán de conocimiento de los investigadores.

Se me ha informado que no recibiré ningún beneficio médico o compensación económica por participar en el estudio.

22 MAYO 2013

Se me ha solicitado que parte de mi tejido se congele y se almacene para futuros estudios en esta misma línea de trabajo, que puedan surgir.



Estoy de acuerdo SI / NO

Estoy además en conocimiento que de no participar en este estudio o si deseo retirarme de éste, esto no cambiará en nada las prestaciones normales que pudiera requerir por parte de este Hospital.

Se me ha informado que el Investigador tomará medidas para proteger la confidencialidad de mi registro médico y que mi identidad no será divulgada en ninguna publicación que resulte de este estudio.

Si tiene preguntas o preocupaciones sobre este estudio, o experimenta cualquier problema puede comunicarse con:

Dr. Patricio Gac al teléfono 9788000

Este estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética Científico (cualquier consulta llamar a su Presidente Dr. Juan Jorge Silva Solís, al teléfono 9789008) y de Investigación del Hospital Clínico de la Universidad de Chile y de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Por último señalo, que he leído este formulario y se me permitió realizar todas las preguntas que consideré de mi interés, las que fueron contestadas a mi entera satisfacción. Se me ha permitido consultar con mi médico de familia o pedir la opinión de otro profesional respecto a mi participación en este estudio. Entiendo se me darán copia de este documento. Consiento en participar en esta investigación

Nombre del participante

RUT..... Firma Fecha

Nombre del testigo (si el estudio lo amerita)

RUT..... Firma Fecha

Nombre del Investigador o médico designado : Dr. Patricio Gac

RUT..... Firma Fecha

Nombre del Delegado del Director o Ministro de Fe

RUT..... Firma Fecha

22 MAYO 2013



c) Consentimiento Informado para la obtención de muestras en la Fundación Arturo López Pérez.



FUNDACION ARTURO LOPEZ PEREZ
COMITÉ DE ÉTICA

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto: "Evaluación de la expresión del receptor Neogenina 1 y sus ligandos en piel sana y en neoplasia asociada a Carcinoma Basocelular".

Investigador Principal: Dra. Verónica Palma

a) **Invitación:** El Laboratorio de células troncales y Biología del desarrollo de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile en conjunto con el departamento de Investigación y Desarrollo del Instituto clínico oncológico FALP, le invita a participar de su proyecto "Evaluación de la expresión del receptor Neogenina 1 y sus ligandos en piel sana y en neoplasia asociada a Carcinoma Basocelular".

b) **Objetivo:** Este documento tiene por objeto solicitar su autorización escrita para la donación de parte del tejido que le extraerán en la cirugía a la cual será sometida en la Fundación Arturo López Pérez. Dicho excedente de tejido se utilizará en investigación biomédica relacionada con el cáncer basocelular. Es importante que lea detenidamente esta hoja de consentimiento informado, que entienda su contenido y el objeto de la misma y que, en su caso, haga todas las preguntas que crea preciso acerca de la misma.

c) **Procedimiento:** Si usted acepta participar en este estudio, se le pedirá al médico anatómo patólogo una muestra de tejido (piel) obtenida durante la cirugía, lo cual no tendrá más riesgo para usted que la cirugía a la cual será sometida como parte su tratamiento.

d) **Costos:** Usted no incurrirá en ningún gasto extra, que no sea el de la propia cirugía a la que se será sometido según prescripción médica.

e) **Beneficios:** La participación en este estudio no le significará a usted ningún beneficio directo. Sin embargo, su contribución a este estudio beneficiará al progreso del conocimiento y a la mejora del tratamiento de futuros pacientes.

f) **Libertad de participación:** Usted es libre de participar o no en este estudio, si usted decide no participar en él, no existirá ningún tipo de consecuencias negativas para usted y recibirá la misma atención previamente acordada con su médico tratante.

g) **Compensaciones:** Por nuestra parte no se dará ningún tipo de compensación ya que se utilizará el mismo tejido que se extrae para el diagnóstico de su enfermedad. Además, este estudio se realiza sin fines de lucro.



h) **Confidencialidad:** Toda información derivada de su participación en este estudio será conversada con estricta confidencialidad. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación no incluirá su nombre o identidad.

i) **Derechos del participante:** Si usted requiere otra información sobre su participación en este estudio puede contactar a:

- Dra. Verónica Palma, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile (02) 9787221
- Dra. Eva Bustamante, Fundación Arturo López Pérez, (02) 4457253 / 07-4995745

j) **Consentimiento:** Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y habiendo aclarado todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar del proyecto "Evaluación de la expresión del receptor Neogenina 1 y sus ligandos en piel sana y en neoplasia asociada a Carcinoma Basocelular".

Le Agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina y, de forma especial, en referencia a la investigación sobre la aparición, desarrollo y tratamiento del cáncer.

Nombre del Sujeto

Firma

Fecha

Nombre del Informante

Firma

Fecha

Nombre del Investigador

Firma

Fecha



Si se trata de un paciente incompetente, registrar nombre del paciente y de su apoderado.

2. Figuras

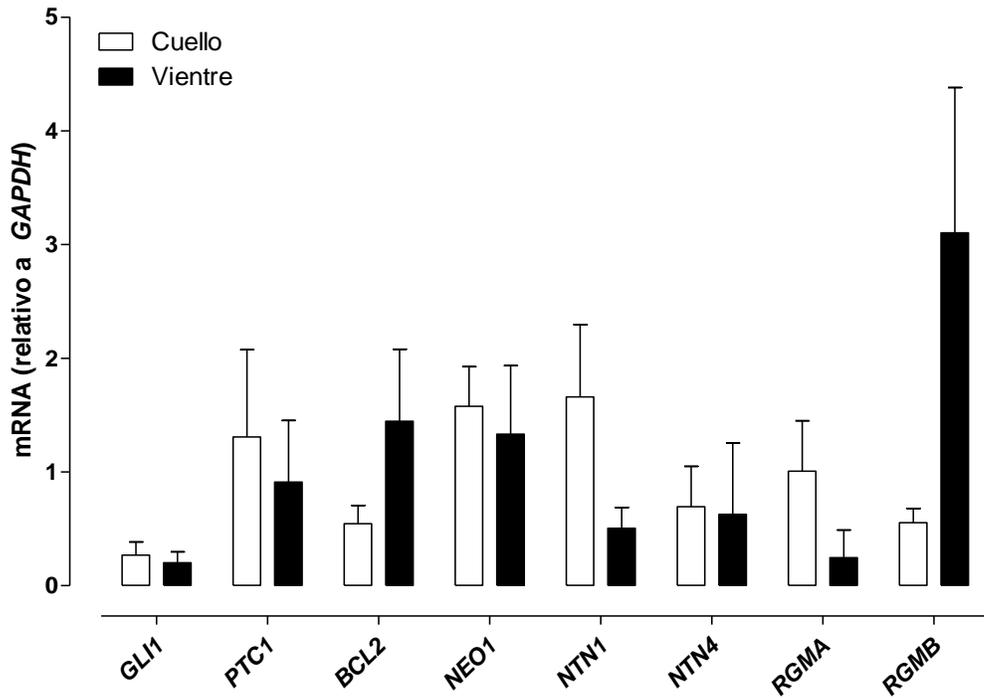


Figura A1. No existen variaciones significativas en los niveles de mRNA acorde al origen de la muestra control. Cuantificación de los niveles de mRNA relativo a los niveles de *GAPDH* de *GLI1*, *PTCH1*, *BCL2*, *NEO1*, *NTN1*, *NTN4*, *RGMA* y *RGMB* en piel sana humana proveniente del cuello (n= 10) o del bajo vientre (n=5). No existen diferencias significativas para ninguno de los genes analizados según test de Mann-Whitney.

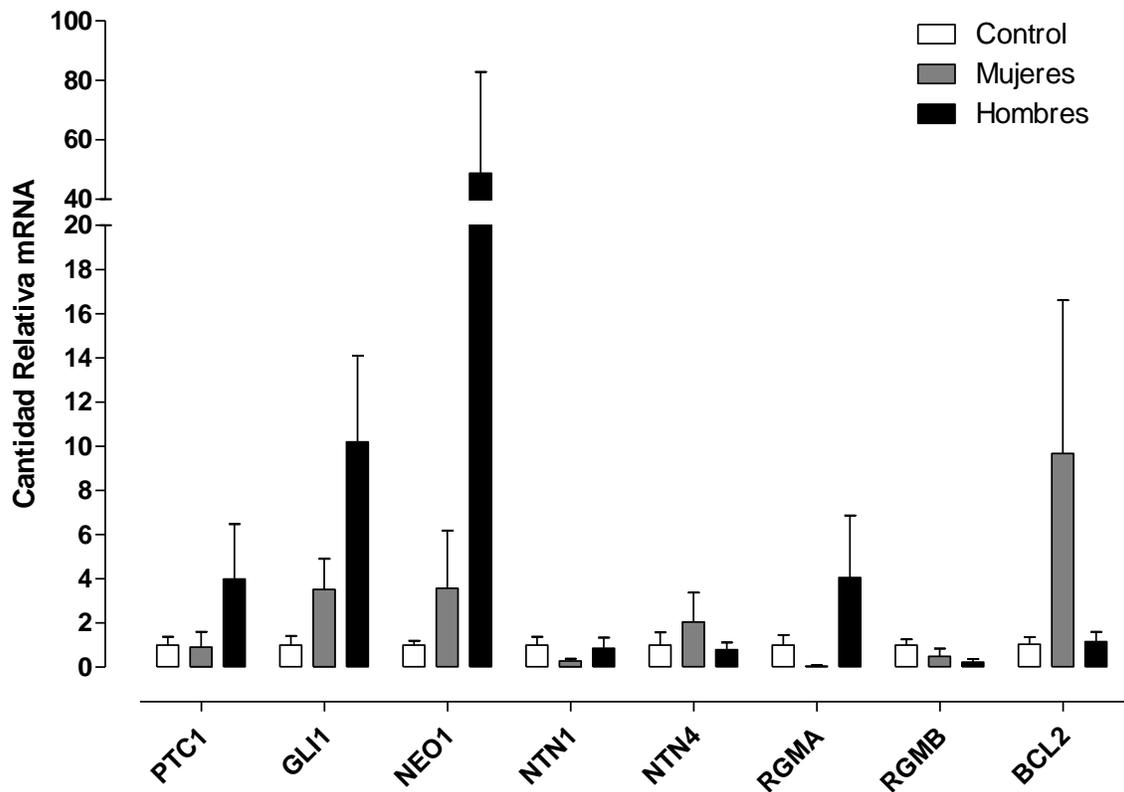
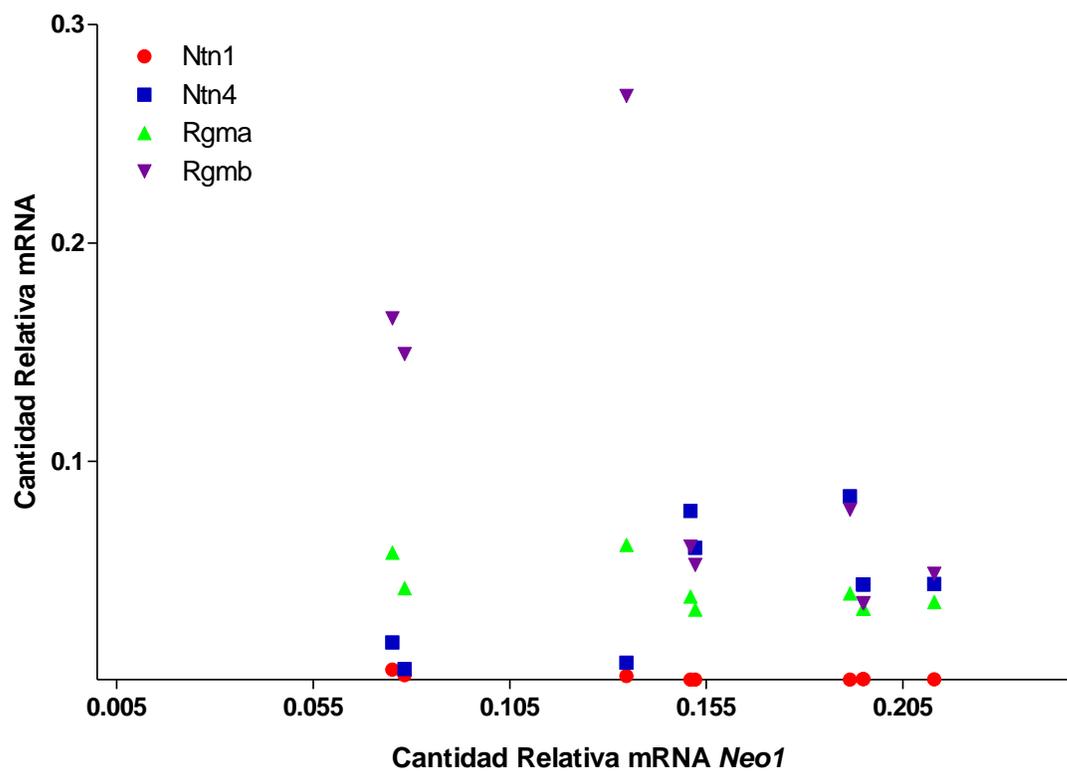


Figura A2. No existen diferencias significativas en los niveles de mRNA entre hombres y mujeres. Cuantificación de los niveles de mRNA relativo a los niveles de *GAPDH* de *GLI1*, *PTCH1*, *BCL2*, *NEO1*, *NTN1*, *NTN4*, *RGMA* y *RGMB* en piel sana humana (Control, n=15), BCC de donantes mujeres (n= 10) y BCC de donantes hombres (n=27). No existen diferencias significativas para ninguno de los genes analizados según test de Mann-Whitney.



	Ntn1	Ntn4	Rgma	Rgmb
r de Spearman	-0,5167	0,4833	-0,7000	-0,8500
Valor de P	0,1618	0,1938	0,0433	0,0061
Síntesis valor de P	n.s.	n.s.	***	**

Figura A3. Niveles de ligandos Rgm se correlacionan con los niveles de Neo1 en piel sana de ratón. Niveles de mRNA de *Ntn1*, *Ntn4*, *Rgma* y *Rgmb* en función de *Neo1* (gráfico) de las muestras de piel control (n=8), en la tabla se indica el coeficiente de correlación (r) de Spearman y los valores de P. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

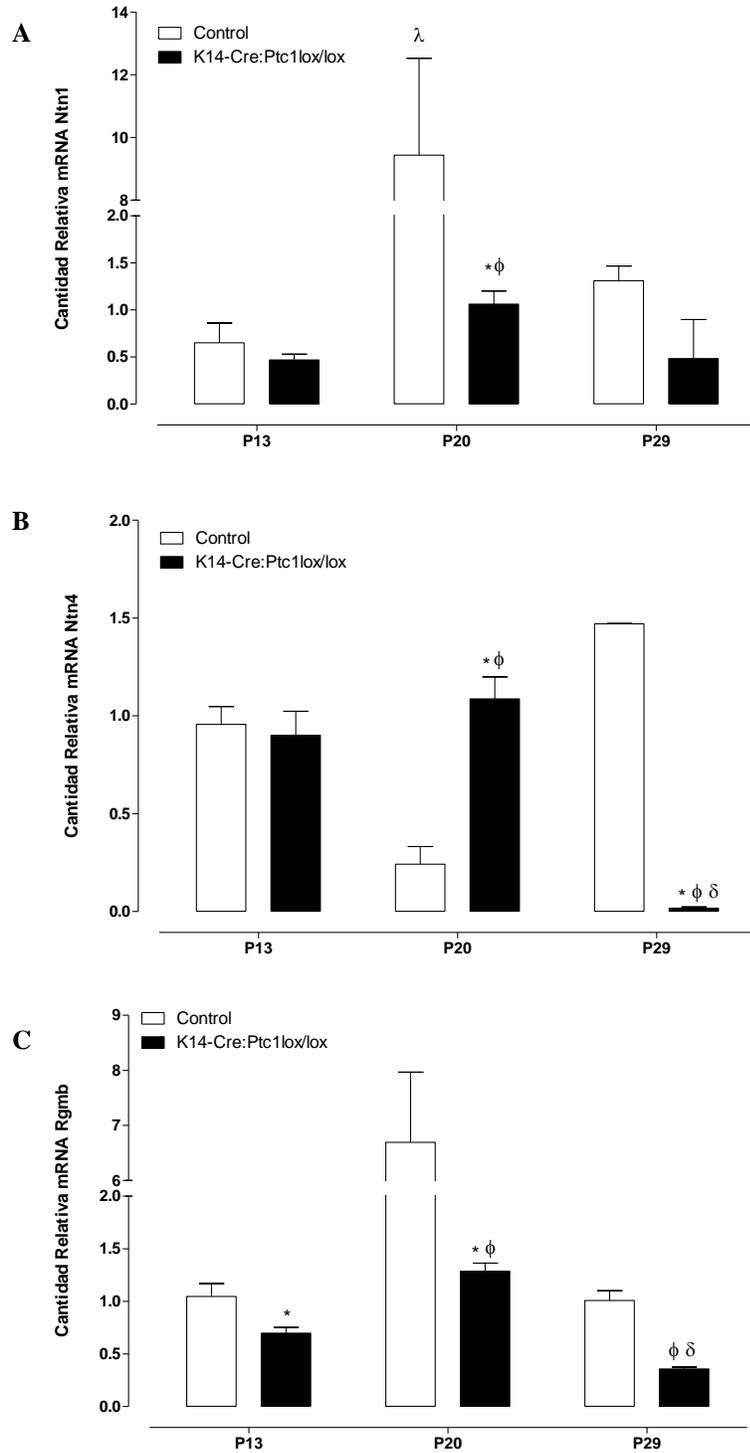
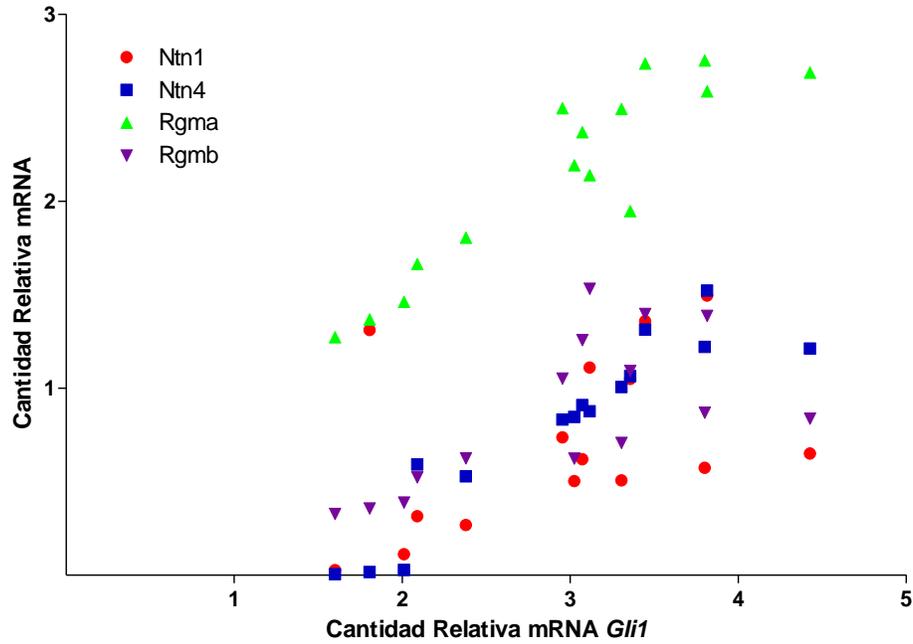
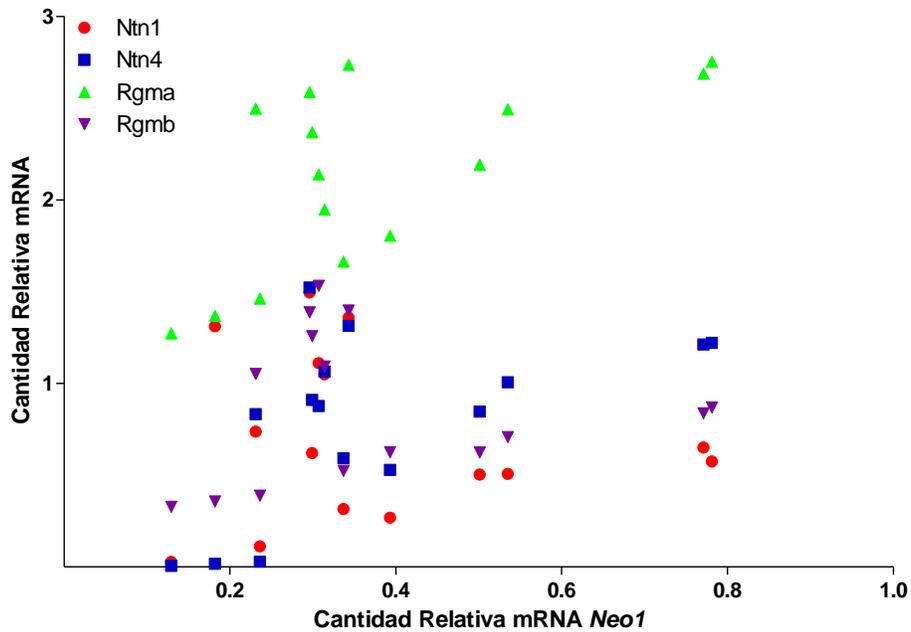


Figura A4. Los niveles de mRNA de Ntn1, Ntn4, Rgmb varían durante del ciclo folicular. Cuantificación de los niveles de mRNA de piel de ratón *K14-Cre:Ptc1^{lox/lox}* (n= 7) y Control (n=8) relativo a los niveles de piel de ratón control P13, al día posnatal P13, P20 y P29. (A) mRNA de *Ntn1* relativo a los niveles de control P13. (B) mRNA de *Ntn4* relativo a los niveles de control P13. (C) mRNA de *Rgmb* relativo a los niveles de control P13. $P < 0.05$ vs. control etario (*), control P13(λ), *K14-Cre:Ptc1^{lox/lox}* P13 (φ), *K14-Cre:Ptc1^{lox/lox}* P20 (δ) según test de Mann-Whitney.



	NTN1	NTN4	RGMA	RGMB
r de Spearman	0,5571	0,9679	0,8714	0,7286
Valor de P	0,0310	P<0.0001	P<0.0001	0,0021
Síntesis valor de P	*	***	***	**

Figura A5. Los niveles de mRNA de los ligandos de Neol se correlaciona con los niveles de *Gli1* en ratones *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}*. Niveles de mRNA de *Ntn1*, *Ntn4*, *Rgma* y *Rgmb* en función de *Gli1* (gráfico) de las muestras *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}* (n=7), en la tabla se indica el coeficiente de correlación (r) de Spearman y los valores de P. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.



	NTN1	NTN4	RGMA	RGMB
r de Spearman	0,2036	0,2036	0,2036	0,2036
Valor de P	0,7808	0,0337	0,0208	0,4668
Síntesis valor de P	ns	*	*	ns

Figura A6. Correlación entre niveles de mRNA de Neo1 y sus ligandos. Niveles de mRNA de *Ntn1*, *Ntn4*, *Rgma* y *Rgmb* en función de *Neo1* gráfico) de las muestras *K14-Cre:Ptch1^{lox/lox}* (n=7), en la tabla se indica el coeficiente de correlación (r) de Spearman y los valores de P. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ns= no significativo.

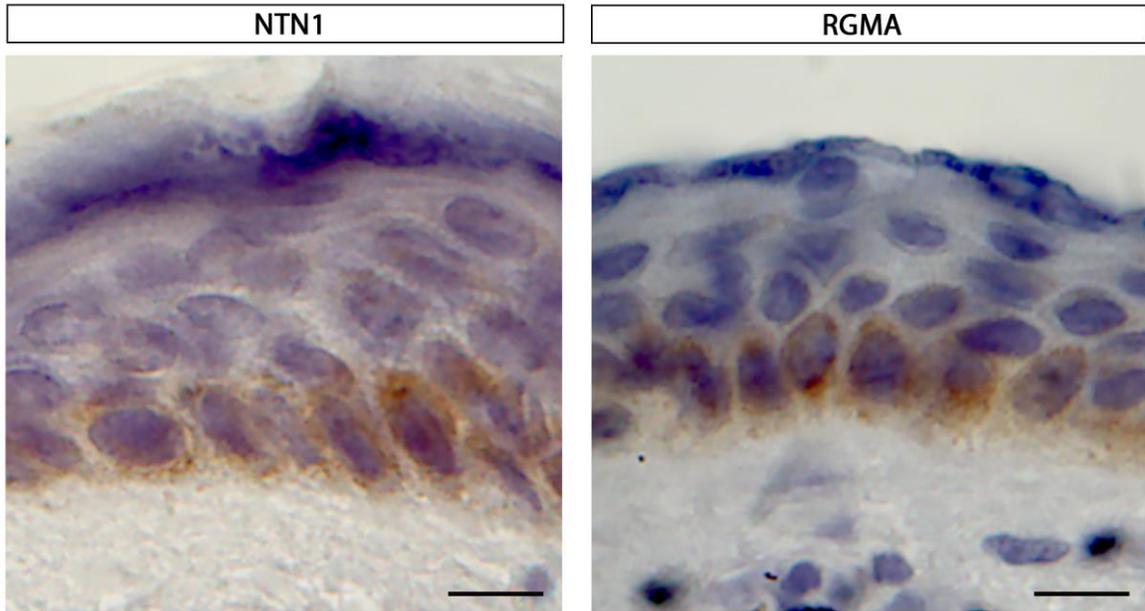


Figura A7. Los ligandos de NEO1, NTN1 y RGMA se encuentran en las células basales de la epidermis. IHQ contra NTN1 (izquierda) y RGMA (derecha) en piel sana humana (barra= 25 μ m), co-tinción con Hematoxilina.