

UCH-FC
Biotecnología
S687
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR NEOGENINA-1 Y SUS LIGANDOS
EN PIEL SANA Y EN NEOPLASIA ASOCIADA A CARCINOMA BASOCELULAR**

Seminario de título
entregado a la Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al título de
Ingeniero en Biotecnología Molecular

Natalia Solís Salazar

Enero, 2013

Santiago, Chile

Directora del Seminario de Título: Dra. Verónica Palma Alvarado



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de título, presentado por la Srta. Natalia Solís Salazar

“EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR NEOGENINA-1 Y SUS LIGANDOS EN PIEL SANA Y EN NEOPLASIA ASOCIADA A CARCINOMA BASOCELULAR”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dra Verónica Palma

Directora Seminario de Título

Comisión de Evaluación



Dr. Alvaro Glavic

Presidente

Dr. Alejandro Roth



AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a importantes personas que han sido parte de este proceso.

En mi familia, a mis tatas, Adriana y Juan, a mis padres Carlos y Patricia que sin su comprensión en este proceso, hubiese sido muy difícil llevarlo a cabo. En especial, agradezco el apoyo fundamental de mi hermana Macarena y de mi esposito Luis, en múltiples aspectos de este seminario, tanto emocionales como de trabajo.

En el laboratorio, a mi tutora la profesora Verónica Palma cuya guía y experiencia resultó muy importante en este logro. A todos los miembros del laboratorio, en especial a Paulina, Andrea, Pablo, Matías y al "NEO team" en general. A los miembros de los laboratorios de Alvaro Glavic y Miguel Allende.

A los integrantes de mi comisión evaluadora por su comprensión y celeridad en la corrección de este manuscrito.

A los doctores Patricio Gac, Ivan Gallegos y a sus equipos por su enorme ayuda en la recolección y caracterización de las muestras.

A mis amigos, los peces Ester, Fabián, Valentina y a Daniel "Juan" por su apoyo emocional a lo largo de este trabajo.



Índice de contenidos

I.- INTRODUCCIÓN	1
Cáncer de piel.	1
Histopatología del BCC	4
Vía Sonic Hedgehog/Gli.	6
Los factores de transcripción GLI.	7
Rol de la señalización HH/GLI en la piel.	8
Vínculo entre Carcinoma Basocelular y la vía de señalización SHH/GLI.	12
Neogenina-1	13
NEO-1 y sus ligandos.	14
NEO-1 , un receptor de dependencia.	15
NEO-1 y cáncer.	16
Netrinas y RGM en el contexto del cáncer.	17
Hipótesis.	19
Objetivo general.	19
Objetivos específicos.	19
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS	20
Muestras.	20
Histología.	20
Inmunohistoquímica.	21
V.- RESULTADOS	24
Caracterización de los tejidos patológicos.	24
Evaluación de la expresión de los componentes de la vía SHH/GLI.	27
Evaluación de la expresión del receptor NEO-1 y sus ligandos.	36
Evaluación de la expresión del marcador de proliferación PCNA	48
Resumen de resultados	51
VI.- DISCUSIÓN	55
Evaluación de la sobreactivación de la vía SHH/GLI en tejido patológico	56

Expresión de NEO-1 y sus ligandos	58
Perfil de expresión de marcadores de proliferación.	60
Proyecciones	61
VII.- CONCLUSIONES	63
VIII.- BIBLIOGRAFÍA	64
IX.- Material Suplementario	70
Material suplementario 1	70
Material suplementario 2	71
Material suplementario 3	72
Material suplementario 4	73

Índice de tablas

Tabla 1. Anticuerpos primarios.	22
Tabla 2. Anticuerpos secundarios.	22
Tabla 3. Diagnósticos asociados a muestras patológicas.	27
Tabla 4. Resumen de resultados en muestras controles.	53
Tabla 5. Resumen de resultados en muestras patológicas	54

Índice de figuras

Figura 1. Histología de la piel.	2
Figura 2. Clasificación de carcinoma basocelular.	3
Figura 3. Diagrama de la vía de señalización Hedgehog simplificada.	7
Figura 4. Ciclo de crecimiento piloso.	9
Figura 5. Estructura de NEO-1 y sus ligandos.	13
Figura 6. Histología de tejido sano y patológico.	26
Figura 7. El receptor PTCH-1 se expresa en muestras de piel de pacientes con BCC.	29

Figura 8. El receptor PTCH-1 se expresa a nivel celular en muestras de piel sana y patológica.	30
Figura 9. La expresión del factor de transcripción GLI-1 es coincidente con otro marcador de la vía activa, PTCH-1, en la mayoría de los casos evaluados.	32
Figura 10. El factor de transcripción GLI-1 se encuentra enriquecido en la región citoplasmática y nuclear en muestras sanas y neoplásicas.	33
Figura 11. El ligando SHH es expresado en focos tumorales de algunas muestras neoplásicas.	35
Figura 12. Las células neoplásicas y de la epidermis del tejido sano resultan positivas para el ligando SHH.	36
Figura 13. El anticuerpo H-175 para NEO-1 resulta ser el más adecuado para tinciones dérmicas.	37
Figura 14. El receptor NEO-1 se expresa tanto en tejido sano como neoplásico asociado a BCC.	40
Figura 15. Expresión de NEO-1 se asocia a células neoplásicas que forman la empalizada de los nódulos.	41
Figura 16. La expresión del ligando NTN-1 se vincula fuertemente con la misma de los reporteros de la vía.	43
Figura 17. NTN-1 presenta una marca difusa posiblemente localizada en espacios intercelulares.	44
Figura 18. La expresión de NTN-4 no se asocia al aumento en los niveles de los reporteros de la vía SHH/GLI.	45
Figura 19. NTN-4 presenta una marca localizada en espacios intercelulares y membrana.	46
Figura 20. Expresión intensa de RGM-A se corresponde con algunas muestras que presentan elevada señal de blancos de la vía SHH/GLI.	47
Figura 21. RGM-A presenta un patrón de localización celular diverso.	48
Figura 22. La expresión de PCNA está presente en todos los tejidos neoplásicos, localización predicha para este marcador.	50

Lista de abreviaturas

BCC: Carcinoma Basocelular.

BMP: Proteína Morfogenética del Hueso.

DAB: 3, 3' Diaminobenzidina.

DCC: Ausente en Cáncer Colorectal.

DEIS: Departamento de Estadística e Información de Salud.

DHH: Desert Hedgehog.

dpc: días post coito.

EGF: Factor de Crecimiento Epidermal.

FGF: Factor de Crecimiento Fibroblástico.

FSH: Hormona folículo Estimulante.

Hh: Hedgehog.

H&E: Hematoxilina – Eosina.

IHH: Indian Hedgehog.

mRNA: Ácido Ribonucleico mensajero.

NEO-1: Neogenina-1.

NTN-1: Netrina-1.

NTN-4: Netrina-4.

ORS: Hoja externa de la raíz.

PBS: Solución Tampón de Fosfato.

PBT: PBS suplementado con Triton al 0,1%.

PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular.

PTCH-1: Patched-1.

RGM: Molécula de Guía Repulsiva.

SHH: Sonic Hedgehog.

SMO: Smoothened.

Solución AB: Solución Biotina-Avidina.

UV: Radiación Ultravioleta.

RESUMEN

El cáncer constituye la segunda causa de muerte a nivel mundial, por lo que resulta un interesante foco de investigación biomédica. Una de las variantes más frecuentes es el cáncer de piel, cuya tasa de morbilidad aumenta año a año. El carcinoma basocelular (BCC), corresponde a la neoplasia más recurrente en la piel, donde el principal factor de riesgo está dado por la exposición a la radiación ultravioleta. Si bien las causas de esta patología son multifactoriales, molecularmente apuntan a un grupo de vías de señalización.

Existen amplios antecedentes que relacionan causalmente una sobreactivación de la vía de señalización SHH/GLI con el BCC. Esta red de señalización resulta fundamental en diversos procesos del desarrollo, en tanto que en el adulto se ha vinculado principalmente a la mantención de nichos de células troncales. La principal mutación encontrada en pacientes con BCC se localiza a nivel de PTCH-1, receptor del ligando SHH, que provoca una sobreactivación constitutiva de la vía. Resulta de gran interés, determinar nuevos efectores de la vía.

Recientemente, se reportó a Neogenina-1 (NEO-1) como blanco transcripcional de la vía SHH/GLI. NEO-1 es un receptor de membrana asociado a funciones de guía axonal, angiogénesis y homeostasis de hierro. Ha sido descrita la expresión de este receptor en diversos tipos de cáncer, obteniéndose resultados variables en cada caso, proponiendo su utilización como biomarcador de pronóstico.

Todos los antecedentes señalados, hacen de NEO-1 y sus ligandos, candidatos relevantes para ser evaluados en tejidos de pacientes con BCC. Los resultados obtenidos en este seminario de título muestran por primera vez, la expresión de NEO-1 en piel; más aún, indican que hay sobreexpresión del receptor en muestras neoplásicas, y por último, que la expresión de NEO-1 se relaciona con la sobreactivación de la vía SHH/GLI en la mayoría de los casos. Además, se observó aumento en la expresión de NTN-1, un ligando de NEO-1, en la condición patológica respecto a la condición sana, lo que es consistente con funciones propuestas para este ligando como oncogen. Si bien, queda por determinar si este escenario involucra a NEO-1 como mediador de este rol, este receptor aparece como un interesante marcador en la pronóstico de este cáncer.

ABSTRACT

Cancer represents the second most important cause of death in the world, and is therefore an interesting biomedical research topic. One of the most common variants is skin cancer, whose morbidity rate increases continuously. Basal Cell Carcinoma (BCC) is the most common skin neoplasia, and while the major risk factor is ultraviolet rays exposure, and the causes of this pathology are multifactorial, they point to involvement of a narrow group of signaling pathways.

Previous research defines a role for SHH/GLI overexpression in BCC. This signaling network is central to diverse developmental processes, and in adults has been related to maintenance of stem cell niche. The main mutation found in BCC is located in PTCH-1, the receptor for the HH ligands, therefore provoking a pathway overactivation. Thus, it would be very interesting to discover new pathway effectors.

Recently, Neogenin-1 (NEO-1) has been reported as a SHH/GLI transcriptional target. NEO-1 is a membrane receptor associated with axonal guidance, angiogenesis and iron homeostasis. Its expression in different cancer has been reported, albeit with variable results, but still, it has been proposed as a prognosis biomarker.

These background makes NEO-1 and its ligands suitable candidates to be evaluated in BCC patients. The results presented in this thesis show, for the first time, the expression of NEO-1 in skin, and the overexpression of NEO-1 in neoplastic samples, is related with a SHH pathway overactivation in most of the cases. It has been also found an elevated expression of NTN-1, a NEO-1 ligand, in pathologic conditions, consistent with proposed function as oncogene. It would be interesting to address if this scenario involves NEO-1 as partner in this role. Nevertheless, NEO-1 receptor appears as an interesting prognosis marker in this cancer type.

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un término usado para referirse a un grupo variado de enfermedades, que tienen como principal característica el descontrol en la proliferación celular, llevando a la formación de tumores e incluso, a la muerte. Constituye la quinta causa de muerte en el mundo [OMS, 2008] y la segunda en E.E.U.U [CDC, 2010]. En Chile se han reportado 97.930 defunciones durante el año 2010 por esta causa [DEIS, Ministerio de Salud de Chile]. Esta enfermedad es capaz de afectar distintas zonas del cuerpo, de ellas, el área más común y recurrente es la piel.

Cáncer de piel

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 más superficial.

Estas capas se pueden observar a través de la tinción de hematoxilina eosina en una muestra de piel humana, como se muestra en la figura 1, en donde 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. Por su parte, la dermis se compone de dos capas, la dermis papilar y reticular, siendo la capa papilar la que se encuentra conectada al estrato basal de la epidermis. La hipodermis, en tanto, está constituida por dos capas, la areolar y lamelar, que son abundantes en adipocitos [Kanikatis, 2006].

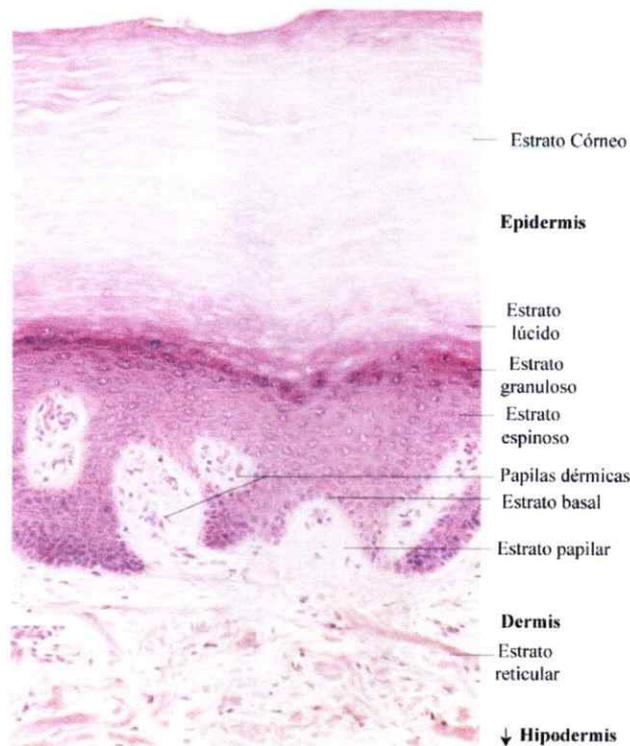


Figura 1. Histología de la piel. Piel sana humana teñida con hematoxilina-eosina, permitiendo observar las distintas capas, destacándose la capa más superficial, la epidermis y luego, la dermis e hipodermis o capa subcutánea [Geneser, 1985].

El cáncer de piel se clasifica en dos grupos principales, la forma melanoma y la no melanoma, esta distinción describe en términos generales la presencia o ausencia de pigmento en la zona afectada. Si bien los cánceres de tipo no melanoma son los más recurrentes, los de tipo melanoma son los más agresivos [Athar y col, 2006; Stecca y col, 2007]. Existen variados factores de riesgo para los diferentes tipos de cáncer de piel, siendo el principal la exposición a la radiación ultravioleta (UV), manifestándose en la mayoría de los casos precisamente en zonas de la piel expuestas al sol, tales como cara, cuello y brazos.

La forma más común de cáncer de piel no melanoma es el carcinoma basocelular (BCC), que afecta a 750 mil personas sólo en Estados Unidos cada año y se ha observado en creciente aumento durante las últimas décadas [Athar y col, 2006]. El carcinoma basocelular incluye una amplia variedad de morfologías, las que se clasifican en dos grandes grupos de tumores: diferenciados e indiferenciados, como se indica en la figura 2. Dentro del primer grupo, el subgrupo más recurrente son los carcinomas basocelulares de crecimiento indolente y entre ellos los del tipo nodular y micronodular [Crowson, 2006].

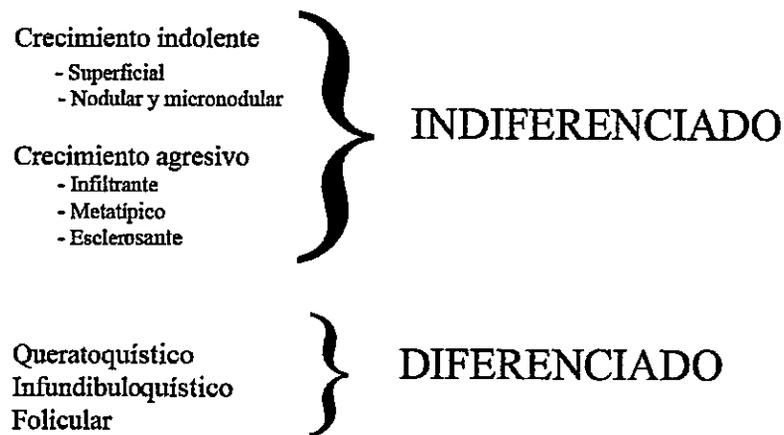


Figura 2. Clasificación de carcinoma basocelular. Esta patología se agrupa en base a su grado de diferenciación. En segunda instancia, si corresponde a un caso indiferenciado, éste se agrupará de acuerdo al crecimiento y morfología que presente, en tanto que si es un caso diferenciado, este se clasificará según el linaje al cual se diferenció [Crowson, 2006].

Histopatología del BCC

En el grupo indiferenciado, se encuentran dos grupos que se separan de acuerdo a su crecimiento, ya sea indolente o agresivo. En el primer grupo se encuentran los tipos histológicos superficiales, nodulares y micronodulares; en tanto que en el segundo grupo se ubican los de histología infiltrante, metatípico y morfforme o esclerosante. Mientras que en la clasificación diferenciado, se encuentran los de histología keratoquística, infundifuloquística y folicular. A menudo, la histología del BCC se presenta como una mezcla de estos patrones y no como uno en particular [Crowson, 2006].

Los carcinomas que presentan histología superficial se caracterizan por la proliferación de células de la capa basal que forman un eje paralelo a la superficie epidérmica, en donde hay presencia de retracción de las células basales en empalizada del estroma adyacente. En tanto, el tipo nodular que representa la forma más común de BCC, en el que se observan nidos tumorales pequeños a grandes que penetran en la región dérmica papilar o reticular, acompañados de separación del estroma. La forma micronodular es similar a la histología nodular; sin embargo el tamaño de los nidos es menor y su dispersión es más amplia. Al considerar los carcinomas de crecimiento agresivo, se encuentran los de histología infiltrante que se caracterizan por una fibrosa matriz de colágeno en la que se encuentran inmersos nidos tumorales de forma y tamaño irregulares, principalmente redondos y alargados. De esta misma forma, los BCC metatípicos presentan nidos tumorales de forma irregulares, en donde dentro de ellos se observa queratinización citoplasmática. Estos dos últimos tipos a menudo se presentan en forma conjunta con la histología nodular. En cambio, el grupo esclerosante consiste en focos tumorales de formas variables, pero con bordes

redondos que se encuentran embebidos en un denso estroma de colágeno, que presenta leves retracciones.

En los grupos histológicos de la división de BCC diferenciados, se encuentra el tipo keratoquístico que presenta diferenciación a lo largo del eje pilosebáceo, evidenciando nidos tumorales redondos que presentan keratinización central y consecuente degeneración. Los de tipo infundibuloquístico, por su parte, presentan nódulos de células basales en proliferación formando un continuo con la epidermis, que están rodeados de cúmulos de keratina. Por último, se encuentran los de histología folicular los que muestran diferenciación a elementos de la matriz del folículo piloso en la región cercana a los nidos de células basales, observándose células de bordes difusos y sin núcleo (ghost cell) [Crowson, 2006].

Aun cuando la patología del BCC es pleimórfica, se han asociado diversos marcadores moleculares a este tipo de cáncer, tales como Ber-EP4 que corresponde a una glicoproteína de superficie ampliamente distribuida en células epiteliales, SMA (del inglés, Smooth Muscle Actin) que presenta una señal fuerte en la mayoría de los casos de BCC y Bcl-2, que constituye un marcador de apoptosis que ha mostrado resultados contradictorios y se asocia principalmente a formas de crecimiento agresivo de BCC [Miller, 2004; Mateoiu y col, 2011].

Si bien la etiología del carcinoma basocelular es multifactorial, como se verá más adelante, existen múltiples evidencias que señalan a la vía de señalización de Hedgehog (Hh) como un desencadenante central en esta enfermedad.

Vía Sonic Hedgehog/Gli

La vía de Hedgehog (Hh) se descubrió en *Drosophila melanogaster*, en donde se describió como una red de señales esencial en procesos de segmentación corporal y polaridad larval [Nüsslein-Volhard & Wieschaus 1980]. Esta vía de señalización es una de las más importantes durante el desarrollo embrionario, teniendo un papel crucial en la formación de patrones neuronales en el tubo neural, en el desarrollo de la simetría derecha-izquierda y en la morfogénesis de diversos órganos tales como pulmones, piel, pelo y dientes [Sanchez-Camacho y col, 2005].

Posteriormente, se describió el mecanismo de señalización de Hh que se encuentra altamente conservado desde invertebrados hasta mamíferos [Ingham & Placzek 2006]. En estos últimos, la vía funciona a través de la unión de uno de sus tres ligandos homólogos a Hh: Sonic (SHH), Indian (IHH) o Desert Hedgehog (DHH) al receptor Patched-1 (PTCH-1). En ausencia de ligando, PTCH-1 reprime la vía, a través de la inactivación de su correceptor Smoothened (SMO). La unión del ligando por PTCH-1, libera la represión sobre SMO, activando una cascada de señalización que resulta en la estabilización y activación de los factores de transcripción GLI, los que ingresan al núcleo y regulan la transcripción de genes blanco [Weitzman 2002]. La vía de transducción de la señal Hh se encuentra diagramada en la figura 3.

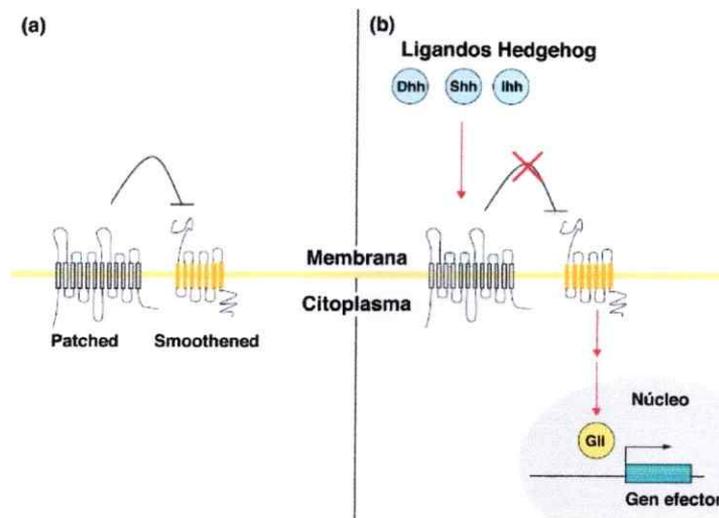


Figura 3. Diagrama de la vía de señalización Hedgehog simplificada. A. En ausencia de ligando, PTCH-1 reprime a SMO, manteniendo así la vía inactiva. **En B** se muestra la condición en presencia de ligando, donde uno de los ligandos Hh se une a PTCH-1 y libera a SMO de la represión, y gatillando la cascada de señalización que activa los factores de transcripción GLI 1 y 2, los cuales actúan uniéndose a regiones reguladoras de genes blanco y promueven la transcripción [Weitzman 2002].

Los factores de transcripción GLI

Los factores de transcripción GLI son los principales mediadores de la señalización Hedgehog, ellos existen en 3 isoformas en mamíferos que se denominan GLI-1, GLI2 y GLI3. Estas proteínas presentan 5 dominios de unión tipos dedos de zinc. Hasta el momento, se ha mostrado que GLI-1 es el único factor de transcripción de esta familia que existe tan sólo en su forma activadora, ya que tanto GLI2 como GLI3 poseen un rol dual como activador o represor que varía de acuerdo al procesamiento de su extremo C-terminal [Huntzicker y cols, 2006; Ryan & Chiang, 2012].

GLI-1 y PTCH-1, al mismo tiempo, corresponden a genes blanco de la vía SHH/GLI, y son frecuentemente utilizados experimentalmente para evidenciar su activación. Por su parte, GLI2 se ha descrito como la principal forma activadora de esta familia de factores de transcripción, mientras que GLI3 se caracteriza por encontrarse mayoritariamente en su forma represora en mamíferos [Park y cols, 2000]. Otro nivel de regulación se genera al tener una expresión diferencial en distintos tejidos y tipos celulares, como ocurre en el tubo neural y en la formación de extremidades durante el desarrollo embrionario [Methot N. and Basler K, 1999; Bai C.B. y cols, 2004].

Rol de la señalización HH/GLI en la piel

En la piel, la vía de señalización de HH/GLI juega un importante papel en la regulación del desarrollo de folículos pilosos y glándulas sebáceas, y en la mantención de nichos de células troncales.

El desarrollo del folículo piloso y las glándulas sebáceas, anexos de la epidermis, se encuentra controlado por una compleja y organizada comunicación entre vías de señalización tales como BMP (del inglés, Bone Morphogenic Protein), Notch, Wnt, FGF (del inglés, Fibroblast Growth Factor), EGF (del inglés, Epidermal Growth Factor) y SHH, las que se coordinan para formar a partir de un epitelio monoestratificado, un epitelio multiestratificado junto a estructuras accesorias [Fuchs, 2007].

La piel se forma a partir del epitelio ectodermal, en donde a partir de una única capa que producto de varias señalizaciones da lugar a la epidermis y la placoda dermal. La primera producirá un epitelio multiestratificado de 4 capas, en tanto que la segunda resultará en la formación del folículo piloso y la glándula sebácea. Una vez que todas las estructuras alcanzan su arquitectura definitiva, comienza el ciclo del crecimiento

piloso. Este ciclo comienza con la primera fase anágena en donde el tallo del pelo está creciendo y sobresale del nivel de la epidermis, posteriormente tiene lugar la fase catágena o de degeneración, en donde los dos tercios inferiores del folículo sufren apoptosis. Luego, tiene lugar la fase telógena o de reposo en la cual la papila dermal se encuentra dormante ubicándose cercana al “bulge” o protuberancia, nicho de células troncales. Una vez completado ese estado de dormancia, diversas señales contribuyen a la activación de las células troncales entrando en una fase altamente proliferativa como es la fase anágena, haciendo que un nuevo pelo crezca [Fuchs, 2007]. Cada una de estas fases se esquematiza en la figura 4 que se indica a continuación.

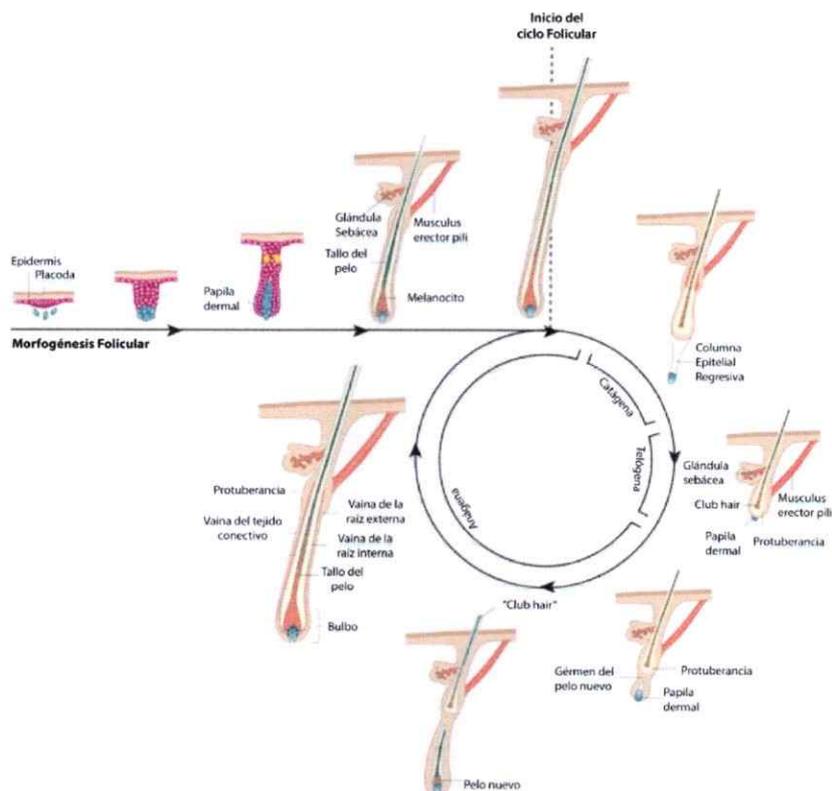


Figura 4. Ciclo de crecimiento piloso (página anterior). El esquema muestra que luego de la primera fase anágena en donde se obtiene la estructura final del folículo piloso, éste progresa a la fase catágena en donde gran parte del folículo piloso degenera y entra a la etapa de reposo o fase telógena en donde la papila dermal se ubica cercana a un nicho de células troncales conocido como “bulge” o protuberancia [Modificado de Fuchs E, 2007].

La señalización SHH controla el crecimiento y morfogénesis del epitelio del folículo piloso, debido en parte a la regulación a nivel de los factores de transcripción GLI [Karlsson y col, 1999]. La inducción de los genes blanco de la vía ocurren normalmente sólo en la fase anágena del folículo piloso, en respuesta a la presencia del ligando SHH. El folículo piloso está constituido por varias hojas epiteliales concéntricas, la más externa de ellas denominada hoja externa de la raíz (ORS de su sigla en inglés). Se ha demostrado la expresión de Sox9, gen blanco de la vía, en una zona restringida de la piel correspondiente a la ORS y al “bulge”, nicho de células troncales pilosas; la inactivación tejido específica de Sox9 ha mostrado que este gen es crucial para la diferenciación del pelo. La delección de este gen en la piel lleva a la ausencia de pelo externo [Vidal y col, 2005].

Con respecto a los sebocitos, células que al diferenciarse generan la glándula sebácea se ha demostrado que la inhibición de la vía Hedgehog, reprime el desarrollo de estas células, mientras que la activación provoca el aumento tanto en tamaño como en número de glándulas sebáceas [Allen y col, 2003]. Adicionalmente, se ha observado una elevada expresión de IHH en sebocitos diferenciados, mientras que los progenitores de dichas células presentan altos niveles de GLI-1, sugiriendo un mecanismo de señalización paracrina. En este sentido, la inhibición de la vía Hh

produce la supresión del crecimiento y la inducción de la diferenciación [Niemann y col, 2003; Chiang y col, 1999].

El rol de la vía de señalización SHH/GLI también ha sido estudiado en el contexto de la mantención del nicho de células troncales en la piel, con el uso de ratones transgénicos que sobreexpresaban cada uno de los ligandos Hedgehog bajo el promotor de queratina 14, que corresponde a un marcador de queratinocitos basales en proliferación. Este trabajo mostró el rol de Shh en la morfogénesis epidermal ensayado en el estado embrionario 18.5 dpc, observándose hipertrofia de células progenitoras epidermales. Sin embargo, cuando se realizó un injerto de piel neoplásica en un ratón silvestre, el tejido de éste último contribuía con un nuevo ambiente de señalización que inhibía la señal de Shh, provocando una diferenciación en el tejido, llevando a la pérdida de la capacidad de renovación de la piel asignándole un rol fundamental a esta vía en la mantención de células troncales multipotentes epidermales [Fan y col, 1997; Oro y col, 1997]. Por otra parte, durante la etapa adulta, Hedgehog se ha vinculado principalmente a la diferenciación de un grupo específico de células troncales del folículo piloso, y paralelamente, participa de la proliferación de células ubicadas en la glándula sebácea [Fuchs & Horsley, 2008].

Dado que esta red de señalización controla diferentes procesos en nichos de células troncales en el adulto, se ha asociado con variadas neoplasias, tales como cáncer de piel (melanomas y no melanomas), meduloblastoma, rabdosarcoma y otros tumores que se relacionan con disfunciones en diversos componentes de la vía SHH/GLI. Se han descrito mutaciones de pérdida de función en PTCH-1, mutaciones de ganancia de función a nivel de SMO y algunas otras a nivel de los factores de transcripción GLI [Iwasaki y col, 2012].

Vínculo entre Carcinoma Basocelular y la vía de señalización SHH/GLI

Las primeras señales de la relación entre la vía de señalización SHH/GLI y el carcinoma basocelular provinieron del descubrimiento de la mutación de pérdida de función en PTCH-1 en el síndrome de Gorlin. Este síndrome se caracteriza por la presencia recurrente de carcinomas basocelulares, junto a otras neoplasias tales como meduloblastoma, meningioma, rabiomioma y fibroma de ovario y corazón [Johnson y col, 1996]. Sin embargo, la mayoría de los casos de BCC son esporádicos y no están asociados al síndrome anteriormente mencionado, manifestándose en zonas de la piel expuestas al sol. Aún así, en estos casos, también se han descrito mutaciones en PTCH-1 [Li y col, 2011]. Adicionalmente, se considera que el 70% de los BCC presenta disfunción en el receptor de SHH [Li y col, 2011].

Se han mostrado mutaciones en otros componentes de la vía de SHH, principalmente en el ligando SHH, en el correceptor SMO y los factores de transcripción GLI. El ligando SHH, tiene actividad mitogénica sobre las células basales de la piel, su sobreexpresión genera focos tumorales en la epidermis y otras manifestaciones cancerígenas emulando lo que ocurre en el síndrome de Gorlin [Oro y col, 1997]. Por su parte, las mutaciones de ganancia de función en el correceptor SMO, contribuiría entre un 6 y un 21% de los casos esporádicos de BCC. En tanto que anomalías en los factores de transcripción GLI-1 y GLI2, principales formas activadoras en mamíferos, llevan a la expresión constitutiva de la vía de señalización y la presencia de carcinoma basocelular. En síntesis, existe numerosa evidencia que la vía de señalización SHH/GLI a diferentes niveles, resulta crítica en el origen y la progresión del BCC [Li y col, 2011].

En base a estos antecedentes, resulta importante determinar nuevos posibles blancos que se encuentren mediando la acción de SHH durante la génesis y progresión del carcinoma basocelular. Recientemente, se reportó en un trabajo del laboratorio, la identificación de nuevos blancos transcripcionales de la vía de señalización SHH/GLI, dentro de los que se destaca el gen Neogenina-1 [Milla y col, 2012].

Neogenina-1

Neogenina-1 (NEO-1) corresponde a un receptor de membrana de 1461 aminoácidos, perteneciente a la familia de las inmunoglobulinas, el cual presenta una región extracelular que tiene cuatro dominios de inmunoglobulinas y seis de fibronectina, seguido de una región intermembrana y un tallo citoplasmático, tal como se muestra en la figura 5.

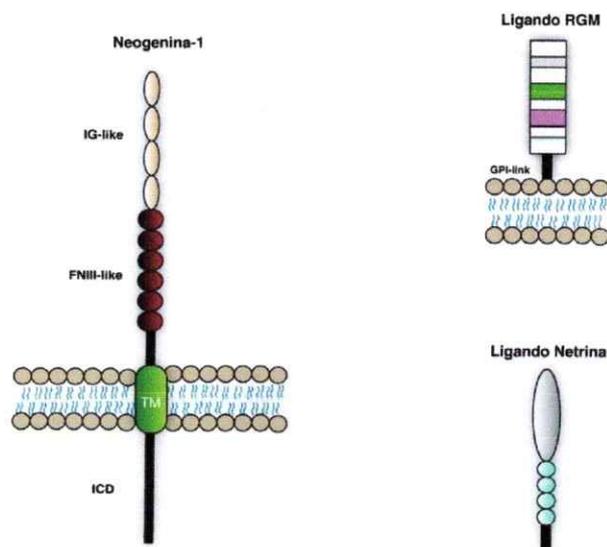


Figura 5. Estructura de NEO-1 y sus ligandos. El esquema muestra en el lado izquierdo, la estructura del receptor NEO-1, el cual está constituido por dominios de inmunoglobulina (Ig), fibronectina (FnIII), una región intermembrana (TM) y una región

intracelular (ICD). Mientras que en el sector derecho, se indica la arquitectura prototípica de los ligandos de la familia RGM y Netrina con sus dominios de señalización. [Wilson & Key, 2007].

Inicialmente esta proteína fue descrita como homóloga a Deleted in Colorectal Cancer (DCC), otro receptor asociado a procesos de guía neuronal y supervivencia celular durante el desarrollo [Vielmetter y col, 1994]. Hoy en día se sabe que NEO1, posee variadas funciones distintas de las que realiza su homólogo DCC, entre las que se encuentran adhesión celular, angiogénesis, homeostasis de hierro, morfogénesis de la glándula mamaria y miogénesis [Wilson & Key, 2007].

NEO-1 y sus ligandos

El ligando primeramente descrito para NEO-1 fue netrina-1 (NTN-1), en base a su alta homología con DCC, que utiliza el mismo mecanismo de señalización. Sin embargo, posteriormente se observó que su interacción con otras señales era aún más específica, como con las moléculas asociadas a guía repulsiva como RGM. En la familia de las netrinas, ha sido descrita la interacción de NEO-1 con netrina-1 y netrina-4 (NTN-4) [Rajagopalan y col, 2004]; ambos ligandos presentan estructuras y funciones muy similares, coordinando procesos de quimioatracción o quimirepelente dependientes del contexto, migración celular, adhesión celular y angiogénesis. La familia de moléculas RGM por su parte, se ha mostrado principalmente en su rol de guía repulsiva durante el desarrollo y homeostasis del hierro, siendo actividades conducidas directamente por NEO-1 [Rodríguez A. y cols, 2007].

NEO-1, un receptor de dependencia.

Una función particularmente interesante de esta proteína, es la que la ubica en un grupo recientemente descrito como de "receptores de dependencia". Este tipo de receptores generan una señal de muerte celular programada dependiendo de la presencia o no de su ligando, con diferentes funciones durante el desarrollo y en la adultez [Bredesen y col, 2005]. Para NEO-1, se ha demostrado que en presencia de su ligando produce señales de supervivencia; mientras que, en ausencia de él, gatilla una cascada de señalización que lleva a la apoptosis. Esta función fue estudiada en el tubo neural de embrión de pollo, en donde se observó que la sobreexpresión de NEO-1 induce muerte celular, condición que es disminuida al sobreexpresar RGM-A, uno de sus ligandos, en forma conjunta [Matsunaga y col, 2004a]. Sin embargo, otro estudio realizado en *Xenopus borealis* en estado de 2 células, reportó el funcionamiento inverso. En él, la sobreexpresión del ligando RGM-A indujo muerte celular, señal que es eliminada al bloquear la acción de NEO1, indicando que la apoptosis producida es mediada por este receptor [Shin & Wilson, 2008]. En síntesis, estos antecedentes indican que la función de receptor de dependencia es dependiente del contexto celular en donde se evalúe.

Los receptores de dependencia han sido descritos recientemente con un importante rol en el cáncer, en donde regularían las señales de supervivencia o muerte celular, que controlan la progresión de la enfermedad [Goldschneider y Mehlen, 2010].

NEO-1 y cáncer

El rol de NEO1 en cáncer permanece en activa investigación. En cuanto a esto, ha sido evaluada su expresión en diversas neoplasias, obteniendo resultados variables. Es así

como en la evaluación en carcinoma celular escamoso esofágico, se describió un aumento en su expresión en relación al tejido sano. En ese estudio, se evaluó a través de microarreglos de mRNA la expresión diferencial de distintos genes, en donde el transcrito de *NEO-1* se encontró sobreexpresado y asociado directamente con el grado de diferenciación tumoral, proponiéndose el rol de oncogen [Hu y col, 2001]. Otra observación que sostiene esta línea de argumentación, se encuentra en un estudio realizado en líneas celulares de cáncer ovárico, donde se mostró un aumento de la expresión de *NEO-1* al ser tratadas con hormona folículo estimulante (FSH), situación que no ocurre en células controles bajo el mismo tratamiento. En este trabajo, se propone su contribución en el crecimiento celular, el aumento en la proliferación y en la disminución en la actividad de caspasa-3 y por tanto, en la apoptosis [Ho y col, 2003].

En contraposición a las observaciones descritas anteriormente, un trabajo realizado en adenocarcinoma de pulmón reveló a través de perfiles de expresión, una baja en los niveles de *NEO-1* fuertemente asociada a una menor tasa de supervivencia, en donde se propone un rol como supresor de tumores [Berrar y col, 2005]. Apoyando esta hipótesis, otro trabajo reportó la disminución de *NEO-1* en los tejidos de cáncer de mama. En este estudio, se observó una fuerte expresión del receptor en tejido de mama sano, en tanto que un 93% de los tejidos patológicos mostró niveles bajos o inexistentes de la expresión del receptor. Adicionalmente, se determinaron grupos de tumorigenicidad, en donde conforme al aumento de agresividad del tumor, *NEO-1* disminuía en su expresión [Lee y col, 2005]. Asimismo, en un estudio publicado este año, se observó la disminución de la expresión de *NEO-1* en glioma, vinculándose al rol de mantención de la etapa de latencia del tumor. Ensayos posteriores mostraron

que la sobreexpresión del receptor en una línea celular de glioma, provocó la apoptosis de las mismas [Wu y col, 2012].

Estos antecedentes en conjunto sugieren un rol ya sea como supresor de tumores u oncogen de NEO-1, dependiendo del tipo de cáncer en donde se evalúe. Una de las posibles explicaciones para el comportamiento dual de este receptor en cáncer puede estar referida a su relación con sus ligandos, Netrinas y RGM.

Netrinas y RGM en el contexto del cáncer

NTN-1 es el ligando más estudiado en el contexto del cáncer. Es así como, se ha descrito una alta expresión en neuroblastoma, bloqueando la actividad pro-apoptótica del receptor UNCB5H, y por lo tanto, contribuyendo al crecimiento del tumor. Más aún, se señala su valor pronóstico al estar especialmente aumentado en neuroblastomas con mayor malignidad [Delloye-Bourgeois y col, 2009b]. Resultados similares fueron obtenidos por el mismo grupo, al evaluar la expresión de este ligando en cáncer de pulmón de tipo células no pequeña ("non-small cell lung cáncer"), encontrando una alta expresión de NTN-1 en un 47% de los casos patológicos estudiados [Delloye-Bourgeois y col, 2009a]. Adicionalmente, estudios realizados en muestras de cáncer de mama, hígado, próstata, riñón, meningioma, glioblastoma y adenoma de pituitaria revelan una mayor expresión de NTN-1 en relación a las muestras sanas, proponiéndose incluso su uso como biomarcador con valor pronóstico en estos tipos de cáncer [Ramesh y col, 2011]. También, se ha descrito la presencia en altos niveles de esta proteína en tejidos con cáncer gástrico; en tal estudio, se observó que los niveles plasmáticos de NTN-1 en pacientes con esta enfermedad eran mayores al compararlos con los sanos y con los pacientes al término de la quimioterapia [Kefeli y col, 2012]. Por

último, recientemente se describió la presencia de netrina-1 en glioblastoma, donde tendría un rol dual: promoviendo la angiogénesis y la invasión al resto del tejido por parte de la células del glioblastoma [Shimizu y col, 2012].

Por su parte, los niveles de expresión de NTN-4 se han descrito elevados en casos de cáncer de mamas invasivos [Esseghir y col, 2007]. Mientras que, al ensayarse su actividad en líneas celulares de cáncer de colón se observó que la sobreexpresión de esta netrina, inducía disminución en el crecimiento tumoral, proponiéndose como un interesante candidato como blanco terapéutico [Eveno y col, 2011]. En glioblastoma, este ligando se encontró en menores niveles de expresión y asociado a un tiempo de sobrevida bajo [Hu y col, 2012]. Recientemente, se reportó la sobreexpresión de este ligando en líneas celulares de cáncer colorectal, en donde se observó disminución en la progresión tumoral y la inhibición del crecimiento tumoral primario [Eveno y col, 2013].

En cuanto a la familia de RGM, también ligandos de NEO-1, se ha descrito la inactivación de RGM-A en casos de cáncer de colon, mediante mecanismos epigenéticos y mutaciones [Li y col, 2009]. Adicionalmente, se describió el rol de cada una de las moléculas de esta familia: RGM-A, RGM-B y RGM-C en la carcinogénesis de líneas celulares neoplásicas de próstata; en este estudio se observó que RGM-A participaría en la disminución de la adhesión matriz-célula, en tanto que RGM-B y RGM-C, contribuirían al crecimiento y la adhesión celular, pero sólo la forma B de este ligando, disminuiría las capacidades de migración e invasión de las células cancerígenas [Li y col, 2012a]. Posteriormente, en un trabajo del mismo grupo, se señaló el rol de RGM-B en células de cáncer de mamas, en donde el ligando estaría

asociado a la disminución en la proliferación, adhesión y migración de células tumorales [Li y col, 2012b].

La relación, recientemente descrita entre la vía de señalización de SHH y NEO-1, hace que resulte especialmente interesante estudiar sus contribuciones en diferentes tipos de cáncer. SHH es crucial para la génesis y progresión de tumores particularmente en Sistema Nervioso Central y en la piel. En este último sistema no se conocen antecedentes que avalen el vínculo SHH/NEO-1, por lo que representa una atractiva oportunidad para estudiar una posible relación y determinar un posible valor en la prognosis de BCC.

Hipótesis

Existe una relación directa entre la sobreactivación de la vía de SHH/GLI y la expresión del receptor NEO-1 y sus ligandos NTN-1, NTN-4 y RGM-A en carcinoma basocelular humano.

Objetivo general

Evaluar la expresión de NEO-1 y sus ligandos NTN-1, NTN-4 y RGM-A en función del estado de activación de la vía de SHH/GLI en BCC humano.

Objetivos específicos

- 1.- Evaluar la expresión de NEO- 1, sus ligandos NTN-1, NTN-4 y RGM-A y los componentes de la vía SHH/GLI en piel humana sana.
- 2.- Evaluar la expresión de NEO- 1, sus ligandos NTN-1, NTN-4 y RGM-A y los componentes de la vía SHH/GLI en piel de pacientes con BCC.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Los tejidos patológicos y controles fueron obtenidos a partir de biopsias realizadas a pacientes. Las muestras patológicas se obtuvieron de pacientes diagnosticados con algunas de las variantes de carcinoma basocelular, en tanto que las muestras controles se obtuvieron a partir de pacientes a los que se les realizó alguna intervención por un motivo distinto de un diagnóstico dermatológico. Las edades de los pacientes seleccionados para este estudio oscilaron entre los 20 y los 85 años. Las personas fueron informadas de este trabajo a través de un formulario de consentimiento informado para el uso de sus muestras, contando con la aprobación del comité de ética respectivos (Material Suplementario 4). Los tejidos fueron obtenidos como parte de un trabajo de colaboración con el Hospital Clínico de la Universidad de Chile, a cargo del Dr. Patricio Gac y el Dr. Iván Gallegos. Se consideraron muestras frescas y tejidos incluidos en parafina. Las muestras son nombradas de forma arbitraria con letra C para los tejidos sanos y con BCC para los tejidos patológicos. A lo largo de este seminario se trabajó con 5 muestras sanas y 8 patológicas. Las muestras C2 y BCC1 se encontraron altamente dañadas, por lo que, sólo se utilizaron para pruebas piloto, en tanto que en la muestra BCC2 sólo fue posible evaluar los anticuerpos PTCH-1 y NEO-1, debido a la baja disponibilidad de muestra.

Histología

Las muestras procesadas de tejido incluido en parafina se cortaron en un micrótopo Leica, de grosor de 5-6 μm de grosor para análisis de histología e inmunohistoquímica. En primera instancia, se eliminó la parafina de cada corte, disponiendo los portaobjetos

en un contenedor que se ubicó en un baño a 60°C durante 30 min, seguido de tres lavados con xilol 100%, y posteriormente, lavados en etanol en concentraciones decrecientes de 100%, 95%, 90%, 75%, 50%, 30%, hasta llegar a agua, para posteriormente realizar los ensayos requeridos. La histología de cada muestra se confirmó por medio de la tinción de hematoxilina-eosina. Esta técnica consistió en depositar la solución de hematoxilina en las muestras, estando éstas ya desparafinadas, se incubó por 1 min, y luego se lavó con abundante agua. Posteriormente, se agregó la solución de eosina, la que se incubó por 30 s. y nuevamente, se lavó con agua, para posteriormente deshidratar y montar.

Inmunohistoquímica

Teniendo los cortes desparafinados, se realizó una incubación con solución citrato pH 3-3,5 para desenmascarar el antígeno (Vector Biosystems) durante 30 min a 80°C, seguido de la eliminación de la peroxidasa endógena por medio de la solución que contenía: 3% H₂O₂, 50% Metanol en Tampón Fosfato (PBS, por el acrónimo en inglés). Luego, se realizaron sucesivos lavados con PBS o PBS suplementado con Tritón al 0.1%(PBT), según sí se quiere localizar un antígeno en la membrana o en el citoplasma y núcleo, respectivamente. Al término de este paso, se bloquearon las proteínas inespecíficas, incubando con una solución de suero de caballo al 5% en PBS/PBT (Vector Biosystems) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó en el anticuerpo primario (indicados en la tabla 1) diluido en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C.

Proteína	Anticuerpo	Fuente	Dilución	Proveedor
Patched 1	G-19	Cabra	1:100	Santa Cruz Biotechnology
Gli 1	H-300	Conejo	1:50	Santa Cruz Biotechnology
Shh	H-160	Conejo	1:100	Santa Cruz Biotechnology
NEO-1	H-175	Conejo	1:50	Santa Cruz Biotechnology
NEO-1	C-20	Cabra	1:50	Santa Cruz Biotechnology
Netrina 1	H-104	Conejo	1:100	Santa Cruz Biotechnology
Netrina 4	HYR01	Cabra	1:50	R & D Systems
RGM- A	AF2459	Cabra	1:200	R & D Systems
PCNA	13-3900	Ratón	1:100	Invitrogen
Caspasa 3	Asp175	Conejo	1:500	Cell Signaling Technology

Tabla1. Anticuerpos primarios. Tabla que indica los anticuerpos primarios utilizados a lo largo de este seminario de título.

En el segundo día del experimento, se realizaron lavados sucesivos con PBS o PBT, seguido de la incubación con el anticuerpo secundario biotinilado diluido en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente.

Anticuerpo	Fuente	Dilución	Proveedor
Anti-ratón y conejo	Caballo	1gota en 5 mL	Vectastain
Anti-cabra	Conejo	1:400	Vector

Tabla 2. Anticuerpos secundarios. Tabla indicando los anticuerpos secundarios utilizados en la realización de este seminario de título.

Después de la incubación con anticuerpo secundario, se procedió a lavar con PBS o PBT y posteriormente, se incubó en solución AB (Vectastain) durante 30 min a temperatura ambiente, seguido de un último lavado antes del revelado. El proceso de revelado se realizó incubando con una solución de DAB en su diluyente (ImmPact DAB, Vector). Posteriormente, se deshidrataron las muestras, lavando en concentraciones crecientes de etanol a partir de agua, luego, se lavó con xilol 3 veces, para luego montar con Entellan (Merck). Las muestras fueron observadas en microscopio óptico Olympus BX51 y fotografiadas con el objetivo de 10x para una imagen de la arquitectura del tejido y en 100x, para el detalle de cada nódulo tumoral.

III. RESULTADOS

Caracterización de los tejidos patológicos

En primera instancia, se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina (H&E) con el objetivo de caracterizar estructuralmente cada tejido a ser analizado posteriormente en cuanto a su expresión de proteínas. La solución de hematoxilina corresponde a una solución de color morado de características catiónicas que se une a organelos de carga negativa, marcando principalmente núcleos; en tanto que la eosina es una solución de color rosado intenso de características aniónicas que se asocia a organelos de carga positiva, señalando mayormente citoplasma y matriz extracelular.

En la figura 6 se muestran tinciones H&E realizadas a muestras de tejido sano y patológico, nombradas como C (como control) y BCC, respectivamente. En el tejido sano, las epidermis han sido orientadas hacia la parte superior, en las diferentes imágenes, y se aprecian de color violeta oscuro de la marca nuclear de hematoxilina por la alta densidad celular. En la zona media inferior, en tanto, se destaca la dermis que se presenta de color rosado, propio de la eosina, que marca principalmente la matriz de colágeno de esa zona. Además, es posible visualizar claramente el límite entre la epidermis y la dermis, observándose hendiduras de la capa basal en la dermis papilar como se ve en el caso C4 y C6. En la muestra C3 se muestran estructuras accesorias como la glándula sebácea, que se dispone de forma arborizada y glándulas sudoríparas cercanas a la glándula sebácea.

La tinción en el tejido patológico permitió reconocer patrones indicativos consensuados para clasificar BCC. Para facilitar la asociación, en la tabla 3 se indica los diagnósticos correspondientes a cada muestra patológica.

Los tejidos de BCC, en general muestran una estructura que presenta una morfología epidérmica similar a una condición sana. En la muestra correspondiente al paciente BCC2 se observan nódulos organizados en forma de racimos que poseen gran cantidad de células con bajo contenido citoplasmático, que penetran en la región dérmica. En tanto, en el tejido BCC3, se muestran grupos celulares de tamaño y forma irregular que se expanden en torno a la sección de un folículo piloso. En torno a los focos tumorales se observan fisuras en el tejido, señal clave que contribuye en el diagnóstico de esta patología. En el ensayo para la muestra BCC4, se visualiza una discontinuidad en el tejido que genera una cavidad a partir de la cual, se originan diversos focos tumorales que se introducen hasta una zona cercana a la hipodermis; nuevamente, se repite la observación de fisuras en el tejido circundante a los nidos tumorales. Marcas de color negro en la superficie corresponden a cúmulos de pigmento en esa zona.

En el tejido BCC5, a diferencia de las muestras de los otros pacientes, se observa una amplia marca de eosina, coincidente con el diagnóstico en donde se indica alto grado de queratinización. Sin embargo, en la región más cercana a la epidermis se observan focos densamente compactados de formas irregulares que exhiben mayor marca de hematoxilina. En esta muestra, se observan giros del tejido en los cuales, en sus bordes hay grupos celulares neoplásicos cercanos a fisuras de dimensiones variables.

En la muestra BCC6, se observan grupos tumorales embebidos en matriz densa, mostrado en color rosado que rodea los nódulos, patrón característico de esta variante. En el tejido BCC7, se observan grupos de tumores altamente compactados, en su centro se ven focos de diferenciación hacia el linaje escamoso. En la muestra BCC8, se ven nódulos de mucho mayor tamaño en relación a las muestras anteriores, en

donde se repite el patrón de fisuras en el tejido en los bordes mayores. En la última muestra patológica, BCC9, se visualizan grupos celulares de contorno no definido y otros dispersos entre ellos, en torno a giros del tejido.

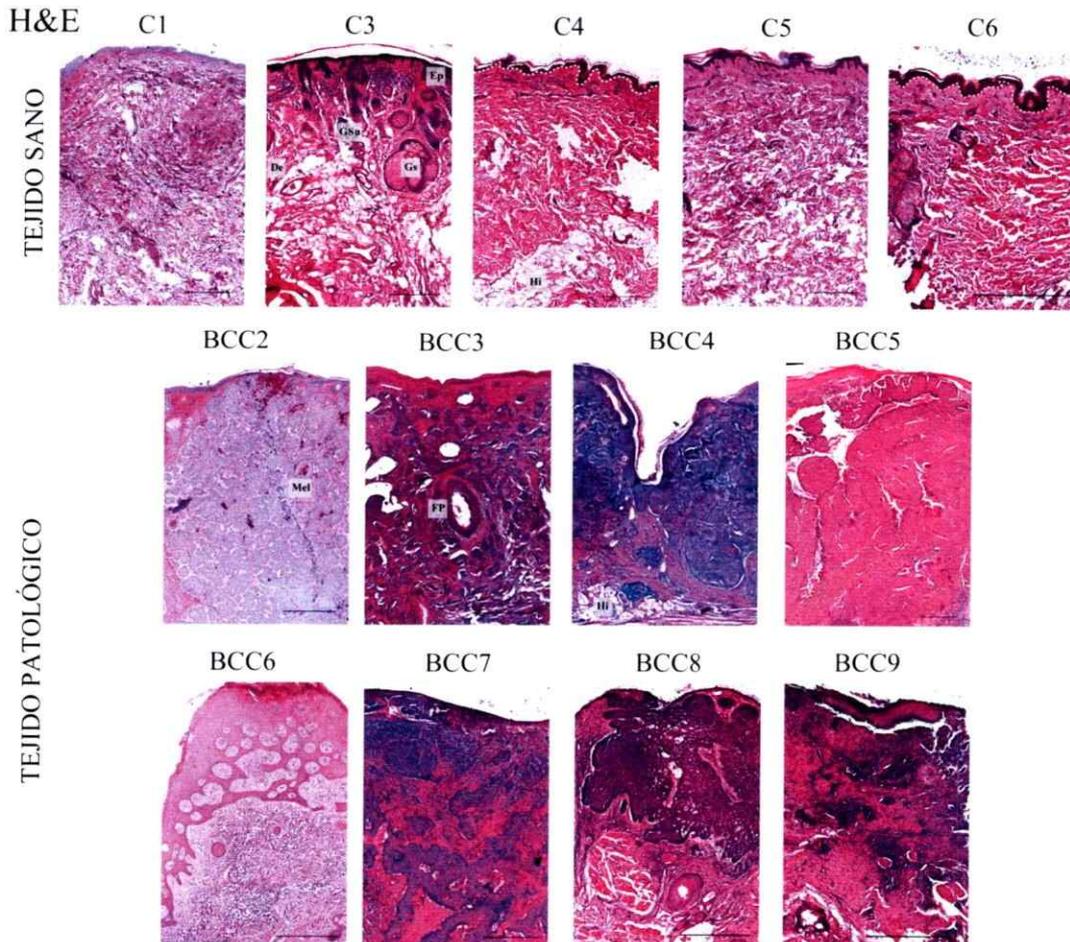


Figura 6. Histología de tejido sano y patológico. Tinción de H&E para visualizar la arquitectura del tejido en cada caso, en donde en violeta se observan núcleos y en rosado se muestra citoplasma y matriz extracelular. En la parte superior se ubican las muestras provenientes de pacientes sanos, mientras que en la zona media e inferior se

ubican las muestras correspondientes a pacientes con carcinoma basocelular. La barra indica 500 μm .

Muestra	Diagnóstico
BCC2	BCC micronodular.
BCC3	BCC micronodular y morfeiforme.
BCC4	BCC nodular, micronodular y morfeiforme.
BCC5	BCC erosionado con queratinización extensa.
BCC6	BCC nodular morfeiforme.
BCC7	BCC con diferenciación escamosa y focos esclerosantes.
BCC8	BCC nodular.
BCC9	BCC nodular y morfeiforme.

Tabla 3. Diagnósticos asociados a muestras patológicas. Se indica tipo histológico de BCC de cada muestra. Análisis histológico realizado por la Unidad de Anatomía Patológica de Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

Evaluación de la expresión de los componentes de la vía de SHH/GLI

El siguiente paso correspondió a identificar elementos de la vía de señalización SHH/GLI en las muestras, de modo de poder agrupar en tejidos patológicos vinculados o no a la sobreactivación de la red de señalización.

En la figura 7, se muestra una inmunohistoquímica para reconocer la presencia del receptor PTCH-1, blanco transcripcional de la vía, con el fin de evidenciar un aumento en la activación de ésta.

En los tejidos controles, se aprecia la expresión del receptor principalmente asociada a la epidermis exhibiendo una señal reticular y homogénea en todas sus capas. De acuerdo a lo reportado en la literatura, este receptor se ubicaría en la capa basal de epidermis y folículo piloso, datos que se corroboran en este seminario de título [Adolphe y col, 2006]. También, se visualiza una marca débil, pero localizada en torno a los folículos pilosos y glándulas sebáceas como se observa en la muestra C3. En los tejidos de pacientes con BCC, en tanto, se obtienen resultados variables. En el caso BCC2, no hay marca del anticuerpo, tan sólo señales inespecíficas de melanófagos en el estroma que circunda los nódulos. En la muestra BCC3, se observa una señal intensa y homogénea en los focos tumorales cercanos a la superficie, además de marcar folículos pilosos, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas. En la muestra de BCC4, la principal marca se acumula en torno a glándulas sebáceas, mientras que los nidos tumorales presentan una marca débil en los de mayor tamaño (marco de línea continua) y casi inexistente en los de menor tamaño (marco de línea discontinua). En el caso BCC5, se observa una señal reticulada y concentrada en los bordes de los tumores de mayor tamaño. En el tejido BCC6 en tanto, no se observa señal en los nódulos superiores, mientras se denota una débil señal en las células que rodean los nódulos del lado izquierdo. En el caso BCC7, se advierte una señal intensa en el estroma circundante a los nódulos; mientras que en los últimos dos casos, no se percibe marca alguna en los focos tumorales, tan sólo en las glándulas sebáceas y folículos pilosos, como se observó con anterioridad.

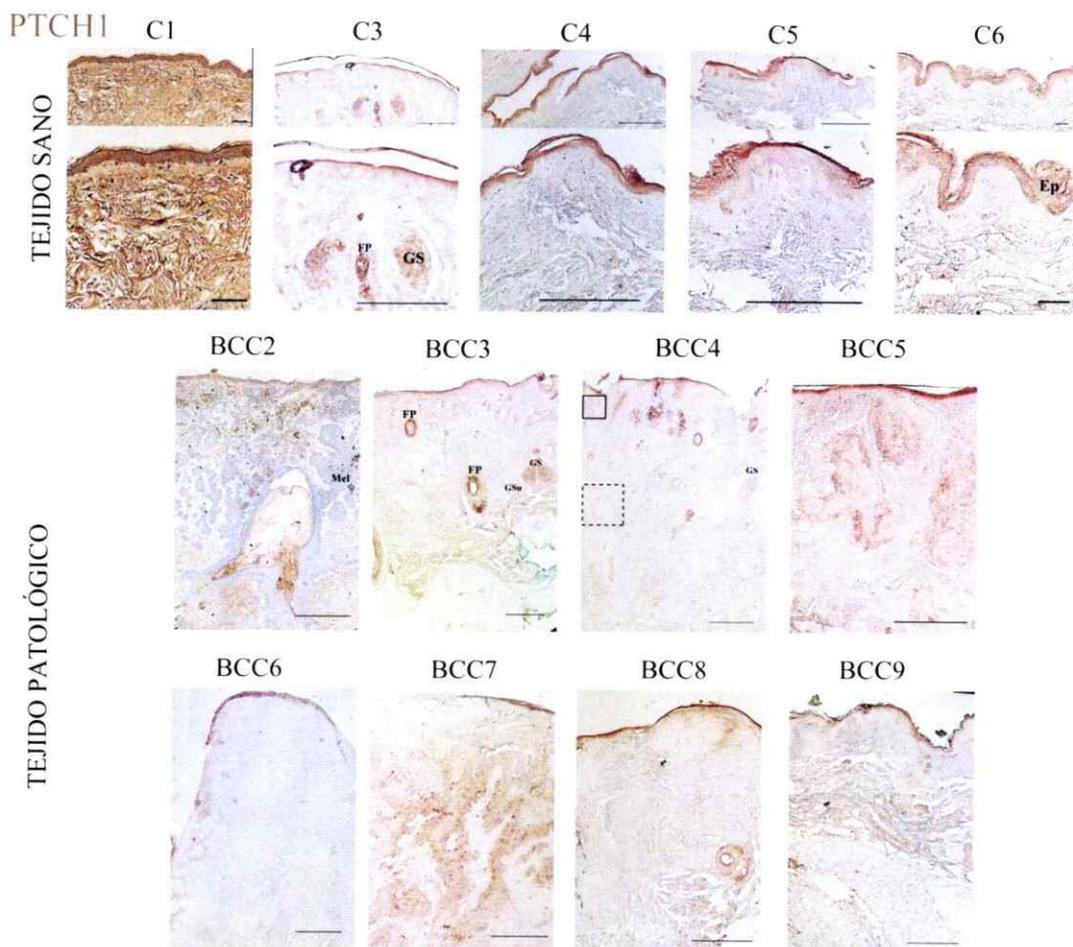


Figura 7. El receptor PTCH-1 se expresa en muestras de piel de pacientes con BCC. Ensayo en que se evalúa la expresión del receptor de SHH y blanco de la vía tanto en tejidos sanos como patológicos. En 5 de 8 casos patológicos evaluados se observa expresión de PTCH-1, a diferencia de lo que ocurre en las muestras BCC2, BCC8 y BCC9. La barra corresponde a 500 μm , excepto en muestras C1 y C6, en donde es 100 μm .

En varias de las muestras sanas y patológicas se puede observar señal específica de PTCH-1 a nivel celular, tanto a nivel de la epidermis como en los focos tumorales, tal como se muestra en la figura 8.

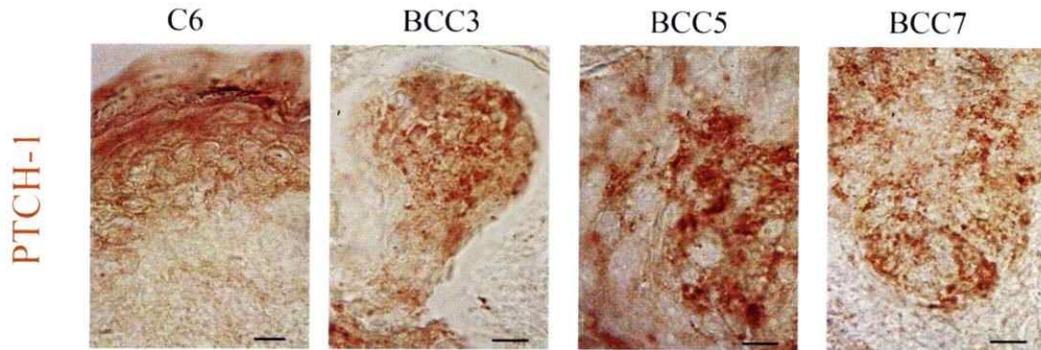


Figura 8. El receptor PTCH-1 se expresa a nivel citoplasmático en muestras de piel sana y patológica. Las células marcadas en las muestras patológicas corresponden a células neoplásicas que conforman el foco tumoral. La barra indica 10 μm .

En el ensayo realizado para el receptor PTCH-1, se observó en 5 de 8 casos neoplásicos evaluados, elevada expresión respecto a la misma región del tejido sano.

En el siguiente experimento que se muestra en la figura 9, se evaluó la expresión del factor de transcripción GLI-1, también blanco de la vía de señalización, que permite confirmar los resultados obtenidos de la expresión de PTCH-1.

En los tejidos controles se advirtió señal de GLI-1 principalmente en la epidermis y en las estructuras accesorias como folículo piloso y glándulas sebáceas, como se muestra en la muestra C3.

Dentro de los casos patológicos, el tejido BCC3 muestra una marca fuerte en los grupos tumorales, que se hace más intensa en sus bordes; de la misma forma, se identifica señal en glándulas y folículo piloso. En el siguiente caso, se observa marca débil en nódulos ubicados en región izquierda de la imagen, mientras en la muestra BCC5, se distingue una fuerte expresión del factor de transcripción localizada en los nódulos anteriormente vistos que coinciden con la fuerte expresión del receptor PTCH-1. En la muestra BCC6, no se observa marca del anticuerpo en los nódulos ni en su vecindad, sólo una débil señal asociada a la epidermis. En la muestra BCC7, se muestra una señal débil focalizada principalmente en las capas más externas de cada foco tumoral (recuadro línea continua). En el tejido BCC8, se muestra una marca fuerte de GLI-1 en el tumor mayormente presente en los bordes y en la capa limitante hacia la demis. En el último tejido, no se advierte señal del anticuerpo en ninguna región particular de la muestra.

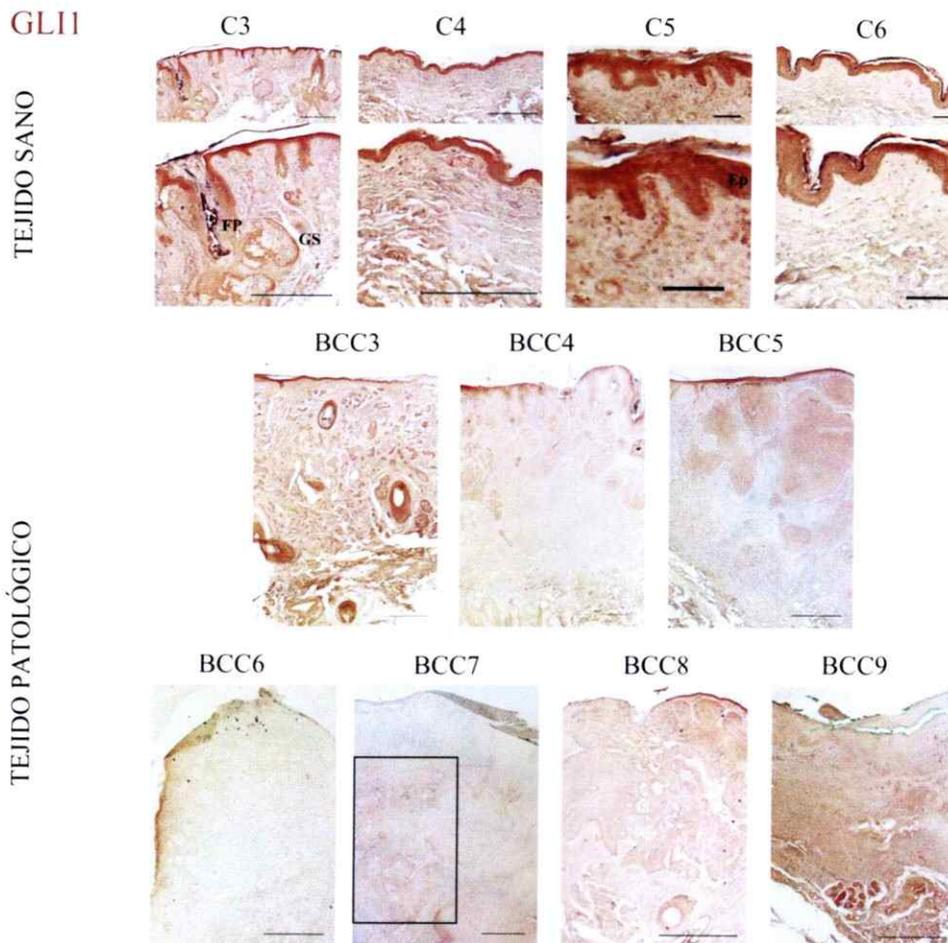


Figura 9. La expresión del factor de transcripción GLI-1 es coincidente con otro marcador de la vía activa, PTCH-1, en algunos casos evaluados. En 5 de 7 casos patológicos se observó un incremento en la señal del factor de transcripción, con respecto a la misma área del tejido control. Barra en las figuras representa 500 μm , excepto en C5 y C6 en donde corresponde a 100 μm .

En imágenes en mayor resolución se muestra la expresión de GLI-1 que tiene un patrón diverso, variando entre citoplasmático y nuclear.

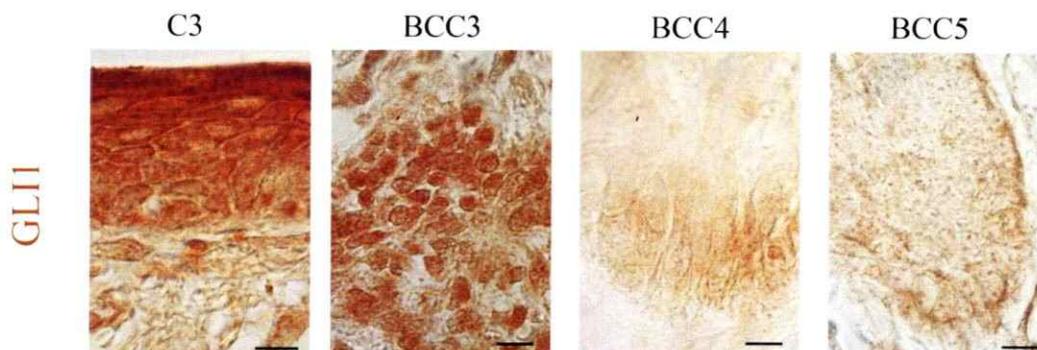


Figura 10. El factor de transcripción GLI-1 se encuentra enriquecido en la región citoplasmática y nuclear en muestras sanas y neoplásicas. La imagen del tejido control corresponde a células de la epidermis, en tanto que la fotografía de los tejidos patológicos son células neoplásicas de los bordes de los nódulos. La barra indica 10 μm .

En base a los resultados anteriormente mostrados, se puede señalar que las muestras BBC3, BCC4, BCC5 y BCC7 presentan sobreactivación de la vía de señalización SHH/GLI, evaluada mediante la expresión de sus proteínas blanco PTCH-1 y GLI-1.

Si bien los reporteros de la vía, PTCH-1 y GLI-1, se encuentran activos en algunos BCC, es importante determinar la presencia del ligando SHH, con el fin de establecer una posible relación entre los diferentes componentes de la vía en la activación de la señal.

En todos los tejidos controles se observa expresión de SHH a nivel de la epidermis en donde en el primer caso se observa una amplia y difusa expresión que va desde la epidermis, incluyendo folículo piloso y glándula sebácea, más células estromales de la dermis; mientras que en las muestras siguientes sólo se advierte marca a nivel de la epidermis, y que en la muestra C5 se torna casi inexistente.

En el primer caso patológico mostrado se observa elevada expresión de SHH en nódulos que se ubican en región intermedia entre epidermis y glándulas sebáceas. En el siguiente caso, no se advierte señal del ligando, salvo en región comparable al caso control como es la epidermis. En el caso BCC5, se distingue una señal muy débil en el nódulo de mayor tamaño (cuadro línea discontinua), mientras que los otros nódulos tienen ausencia de la marca. Los próximos dos casos clínicos no muestran marca del anticuerpo evaluado; en paralelo se evidencia una fuerte señal de SHH en el caso BCC8 que se concentra en la región nodular más cercana a la epidermis. El último caso patológico no muestra indicios de presencia del ligando.

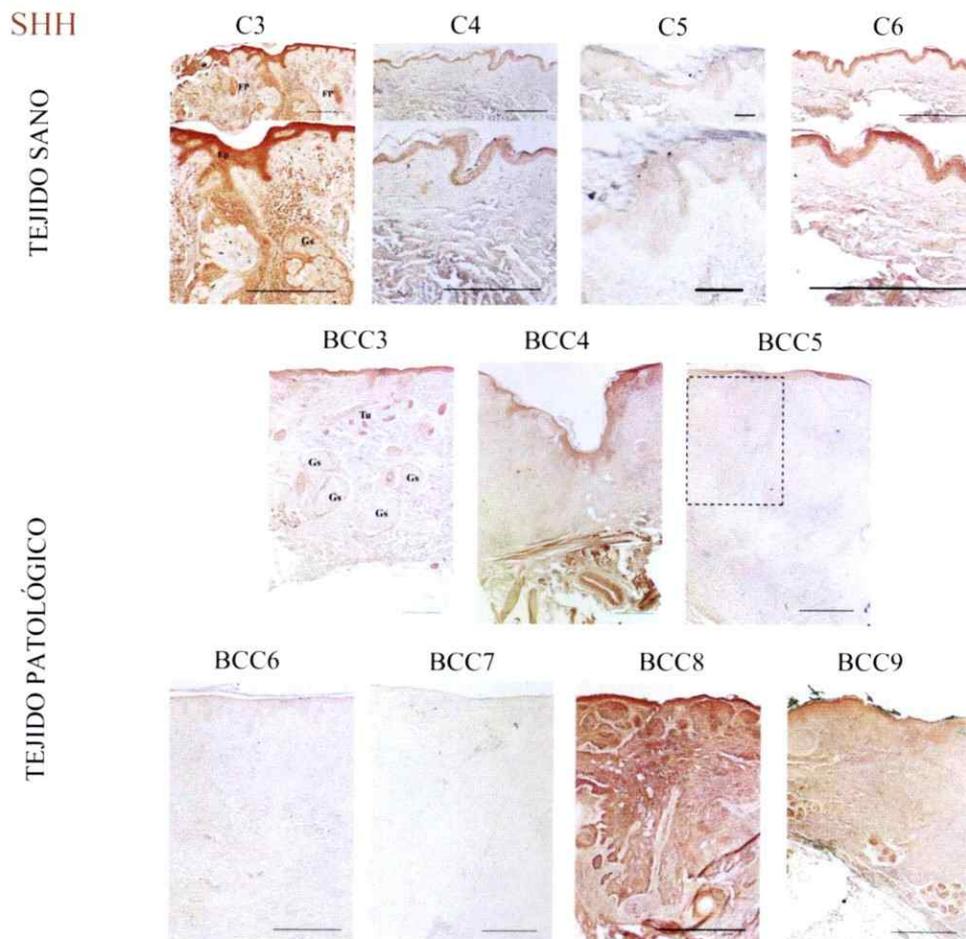


Figura 11. El ligando SHH es expresado en focos tumorales de algunas muestras neoplásicas. En las muestras controles se advierte señal principalmente a nivel de la epidermis, en tanto que en algunos tejidos neoplásicos, se observa marca homogénea a lo largo de todo el nódulo. La barra de las figuras corresponde a 500 μm , excepto en C5, BCC3 y BCC4 en donde es equivalente a 100 μm .

A nivel celular se distingue señal del ligando en las células neoplásicas que forman el nódulo, a diferencia de las células estromales circundantes que carecen de esta marca.

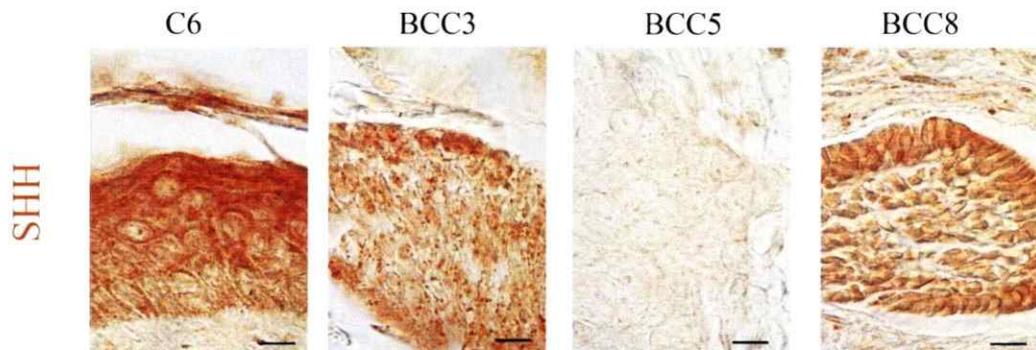


Figura 12. Las células neoplásicas y de la epidermis del tejido sano resultan positivas para el ligando SHH. La expresión del ligando en muestras sanas se localiza en la epidermis, mientras que en tejido neoplásico se ubica en las células tumorales y no hay marca en células estromales que circundan el nódulo. La barra indica 10 μm .

En síntesis, de los cuatro casos (BCC3, BCC4, BCC5 y BCC7) que presentan elevados niveles de PTCH-1 y GLI-1, sólo dos de ellos, BCC3 y BCC5, exhiben niveles altos de expresión del ligando SHH, que se vincularía con la sobreactivación de la vía. Sin embargo, en los casos en que no se observan niveles elevados del ligando, se infiere posibles mutaciones a nivel del receptor PTCH-1, como ha sido ampliamente descrito, que gatillarían una sobreactivación independiente de ligando.

Evaluación de la expresión del receptor NEO-1 y sus ligandos.

Dado que recientemente se reportó a NEO-1 como blanco transcripcional de la vía SHH/GLI, el próximo paso consistió en determinar el perfil de expresión del receptor en tejido sano, el que no ha sido reportado en la literatura, y en muestras patológicas de BCC. En este órgano ha sido descrita la expresión de DCC, un gen homólogo a NEO-

1, el que se muestra principalmente asociado a queratinocitos de la capa basal de la epidermis y del folículo piloso [Combates y col, 1997].

En el laboratorio, se encuentran disponibles dos anticuerpos para diferentes epítomos de NEO-1. En primera instancia, se evaluó cuál de ellos otorgaba una mejor señal en piel, como se muestra en la figura 13, en donde el anticuerpo H-175 genera una marca intensa.

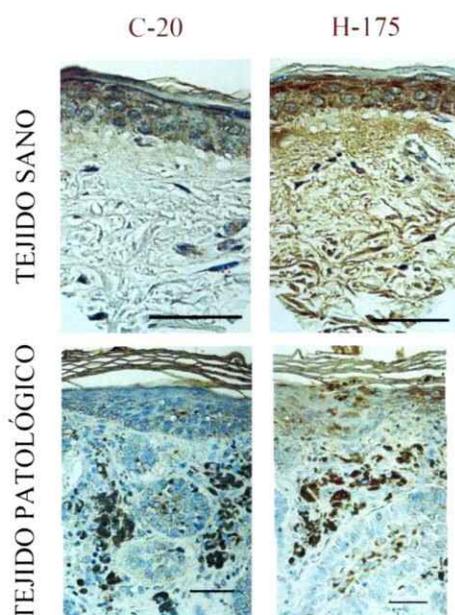


Figura 13. El anticuerpo H-175 para NEO-1 resulta ser el más adecuado para tinciones dérmicas. La señal del anticuerpo C-20 se observa débilmente en comparación con la del anticuerpo H-175. La barra indica 20 μm .

En la figura 14, se muestra la inmunohistoquímica realizada para detectar la expresión del receptor NEO-1. En el tejido sano se observa marca citoplasmática principalmente a nivel de la epidermis, en ella se muestra la capa córnea negativa, en tanto que el

resto de las capas se presenta con señal. Especialmente, en la muestra C3, se advierte señal del anticuerpo en la región circundante al folículo piloso y glándula sebácea. En el folículo, se distingue marca de NEO-1 en la capa más interna y cercana al pelo.

En los tejidos patológicos se observa expresión débil del receptor NEO-1 en la epidermis comparado con la misma en los tejidos sanos. En la muestra BCC2 se advierte señal diferencial entre dos áreas tumorales, en donde una ubicada hacia el lado izquierdo presenta una marca mayor difusa en la zona media, mientras que en la zona derecha se observa ausencia o baja señal. La marca en esta muestra se concentra en el área tumoral más cercana a la epidermis (indicado con línea discontinua), en donde hay algunos nódulos con marca en sus bordes. Se percibe también indicios de melanófagos en estroma que rodea a los nódulos, principalmente resultan evidentes en zona de nódulos menos marcados. En el caso BCC3, se observa marca principalmente a nivel de la epidermis y folículos pilosos, además de los focos tumorales de pequeño tamaño ubicados entre estas dos zonas, que presentan separación del tejido circundante tal como se observó en casos anteriores. En la muestra BCC4, se observa marca del anticuerpo en la epidermis que forma una cavidad junto a tumores de menor tamaño localizados principalmente en la zona izquierda de la imagen que se ubican en torno a giros del tejido (línea discontinua). En el próximo caso, sólo se distingue señal a nivel de la epidermis, con ausencia de marca en el resto de las capas. En el tejido BCC6, se observa una amplia marca en la epidermis, más nódulos de formas irregulares marcados que se ubican en el borde derecho inferior, en donde la marca se acumula en sus bordes (línea discontinua). En la muestra patológica BCC7, se percibe una señal intensa del anticuerpo a nivel de la

epidermis. También se evidencia una marca difusa en la región media más cercana a la superficie correspondiente a los nódulos tumorales, que se hace más débil en las capas más internas(línea discontinua). En el caso BCC8, se observa una señal intensa en el nido tumoral de mayor tamaño que se ubica cercano a la superficie, observándose señal acumulada en el centro de los tumores de la zona media (línea discontinua). En la última muestra patológica, sólo se advierte una tenue marca a nivel de la epidermis que es casi inexistente.

En resumen, la expresión de NEO-1 es detectable en tejido sano, asociándose principalmente a epidermis y en menor medida al folículo piloso y glándulas sebáceas. Mientras en tejido neoplásico, se observa presencia del receptor en la mayoría de los focos tumorales. Las muestras en que se evidenció sobreactivación de la vía de señalización, ya sea por medio de la expresión de PTCH-1 o GLI-1, presentan mayor expresión de NEO-1, situación que no ocurre en muestras como la BCC9 que no muestran rasgos de mayor nivel de genes blancos clásicos de la vía.

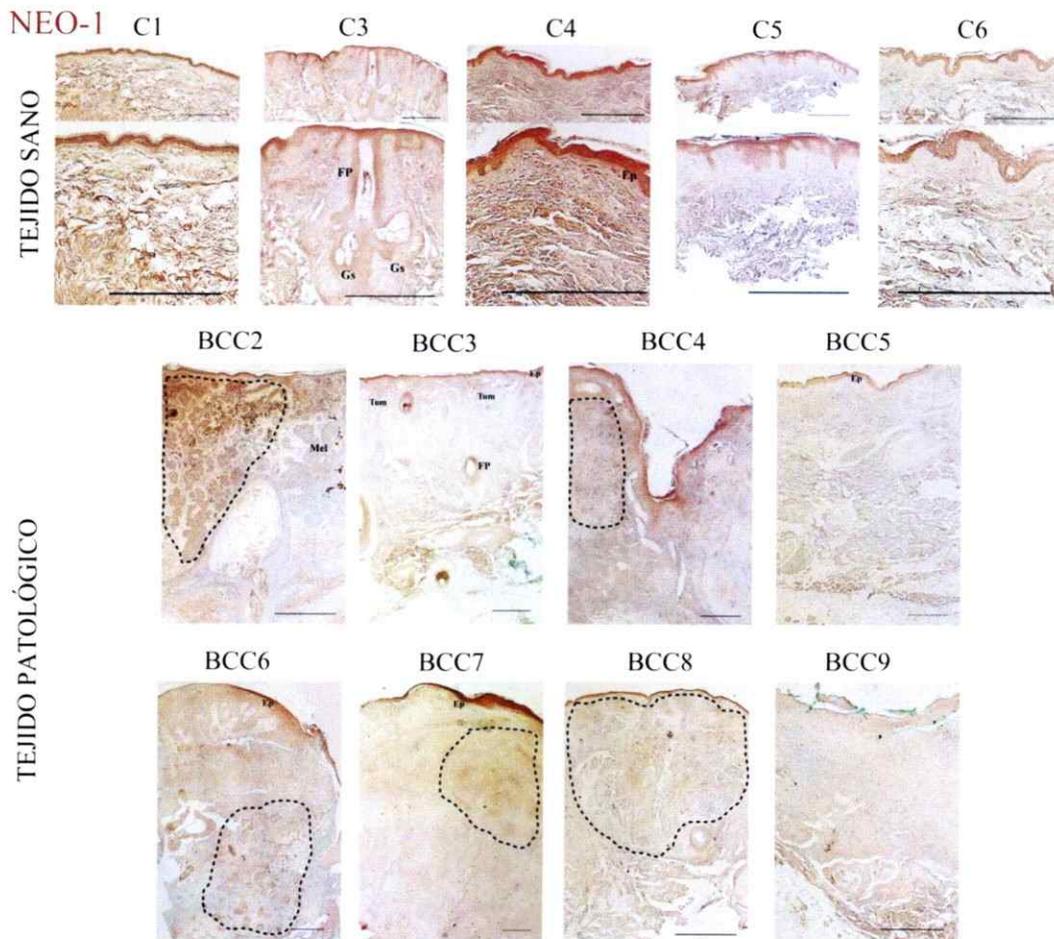


Figura 14. El receptor NEO-1 se expresa tanto en tejido sano como neoplásico asociado a BCC. El patrón de NEO-1 se asemeja al de los genes blanco de la vía de señalización SHH/GLI, observándose en estructuras accesorias de la piel, como folículo pilosos y glándulas. La barra de las figuras corresponde a 500 μm .

En imágenes en mayor aumento, como lo mostrado en figura 15, se observó marca citoplasmática de NEO-1; además de la señal intensa de este marcador en las células que forman la empalizada de cada uno de los focos tumorales.

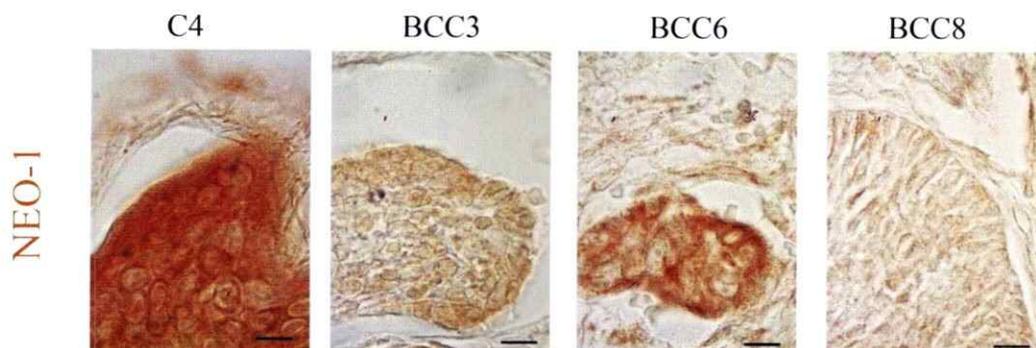


Figura 15. Expresión de NEO-1 se asocia a células neoplásicas que forman la empalizada de los nódulos. Las células de la epidermis resultan positivas para la expresión de NEO-1, mientras que en las muestras neoplásicas, las células más marcadas corresponden a las que limitan la masa tumoral. La barra corresponde a 10 μm .

Dado que no se encuentra reportada la expresión de los ligandos de NEO-1 en piel, la siguiente etapa consistió en determinar los perfiles de expresión de NTN-1, NTN-4 y RGM-A.

El perfil de expresión de NTN-1 en muestras sanas y patológicas se muestra en la figura 16. En los tejidos sanos, se observa en dos de ellos (muestras C4 y C6) señal fuerte a nivel de la epidermis, mientras que en uno (tejido C3), hay ausencia total de señal.

En las muestras patológicas se observa expresión variable del ligando, al igual que en los controles. En la muestra BCC3 hay marca intensa del anticuerpo en epidermis, folículo piloso, glándulas sudoríparas y tumores de pequeño tamaño ubicados en la región cercana a la epidermis. Los nódulos tumorales marcados poseen señal homogénea en su superficie. En el caso BCC4, se distingue una señal muy intensa en

la epidermis en la zona que forma la cavidad, más una señal tenue en nódulos localizados al lado izquierdo de la hendidura, que se concentra hacia el centro de ellos otorgando una marca reticular (línea discontinua). En el tejido BCC5, se percibe una marca intensa y homogénea en los lóbulos de la masa tumoral ubicada en la cercanía de la epidermis (línea discontinua). En tanto que en la siguiente muestra, se observa marca densa en las capas más externas de la epidermis, además de en los nidos tumorales de forma irregulares ubicados en las capas que se infiltran en la demis reticular (línea discontinua). En el caso BCC7 se visualiza señal difusa del ligando en región nodular e internodular, organizándose en torno a una irregularidad del tejido de forma levemente cuadrada (línea discontinua). La muestra BCC8 presenta elevados niveles de expresión del ligando que se concentra en la zona limitante del tumor con la demis reticular, especialmente en los bordes dentados del tejido neoplásico (línea discontinua). En el tejido BCC9, se observa una ténue marca en algunas regiones de la epidermis y carencia de ésta, en los nódulos tumorales.

La marca de NTN-1 da indicios del ligando que se expresaría en mayor medida en relación a los otros ligandos de NEO-1, en la piel y que podría estar señalizando a través de NEO-1. El perfil de expresión de este ligando en el tejido patológico, muestra un aumento en relación a las muestras sanas y se concentra en los focos tumorales, correlacionados en la mayoría de los casos con la presencia del receptor NEO-1 y con el aumento en los blancos transcripcionales clásicos de la vía, PTCH-1 y GLI-1.

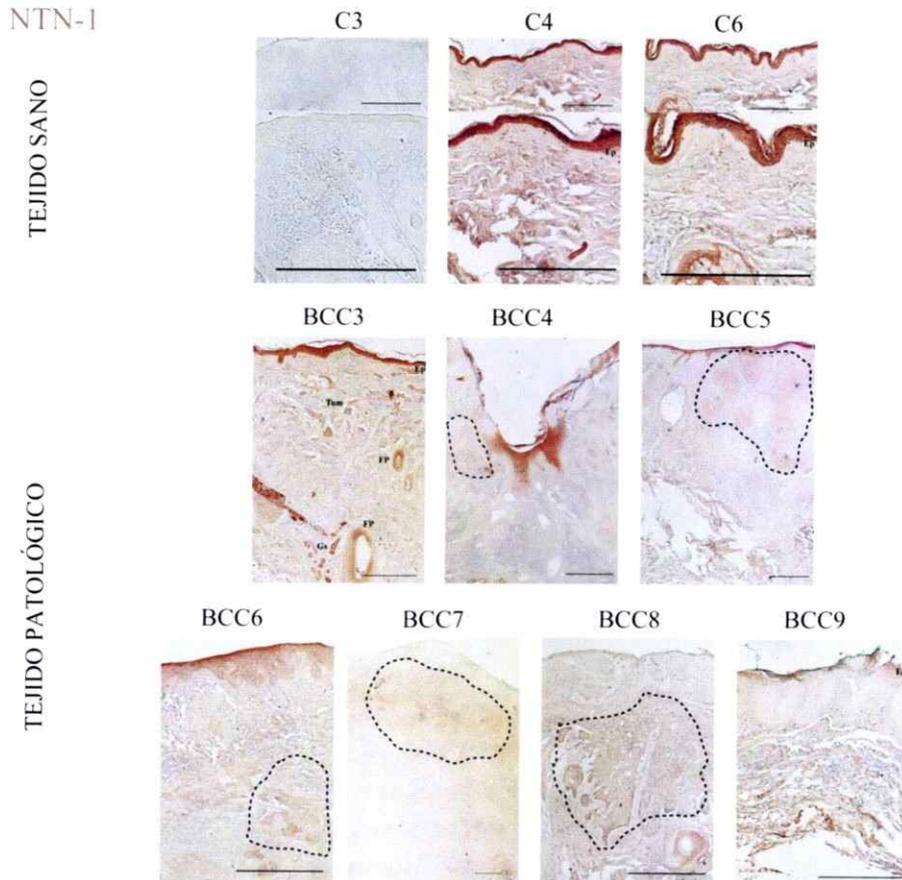


Figura 16. La expresión del ligando NTN-1 se vincula fuertemente con la misma de los reporteros de la vía SHH/GLI. NTN-1 posee una elevada expresión en las mismas muestras que presentan elevados niveles de PTCH-1 y GLI-1, observándose esta correlación en 6 de 7 casos patológicos ensayados. La barra indica 500 μ m.

En imágenes en mayor aumento como las que se muestran en la figura 17 se observa en tejido sano, señal compacta y asociada a primera vista a la membrana, en tanto que en muestras patológicas se advierte marca difusa en los focos tumorales presumiblemente ubicada en espacios intercelulares (indicado con flechas).

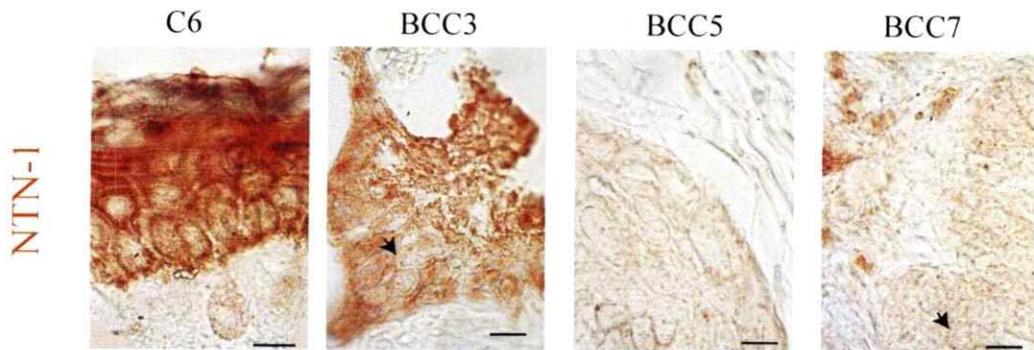


Figura 17. NTN-1 presenta una marca difusa posiblemente localizada en espacios intercelulares. En muestras controles, la señal se restringe a las células de la epidermis, en tanto que en las muestras patológicas, se advierte marca con patrón difuso a lo largo de los nódulos. Barra indica 10 μ m.

La evaluación de la presencia del ligando Netrina-4 en tejidos sanos y neoplásicos se indica en la figura 18. En la mayoría de los tejidos controles, se percibe marca principalmente a nivel de la epidermis y, en el tejido C3 se observa señal en folículo piloso.

En los tejidos neoplásicos, se observa marca variable. En los casos BBC6, BCC7 y BCC8 hay ausencia de marca en todas las capas del tejido; en las muestras BCC3 y BCC9 se observa una señal tenue a nivel sólo de la epidermis, pero con ausencia de marca en los focos tumorales, mientras que en los tejidos BCC4 y BCC5 se observa señal en los nidos tumorales. En la muestra BCC4 se muestra la señal débil en el interior de los nódulos, que disminuye en la zona más profunda observándose como una banda de color más claro. En el caso BCC5, se observa marca intensa localizada en el interior de los lóbulos que componen el tumor.

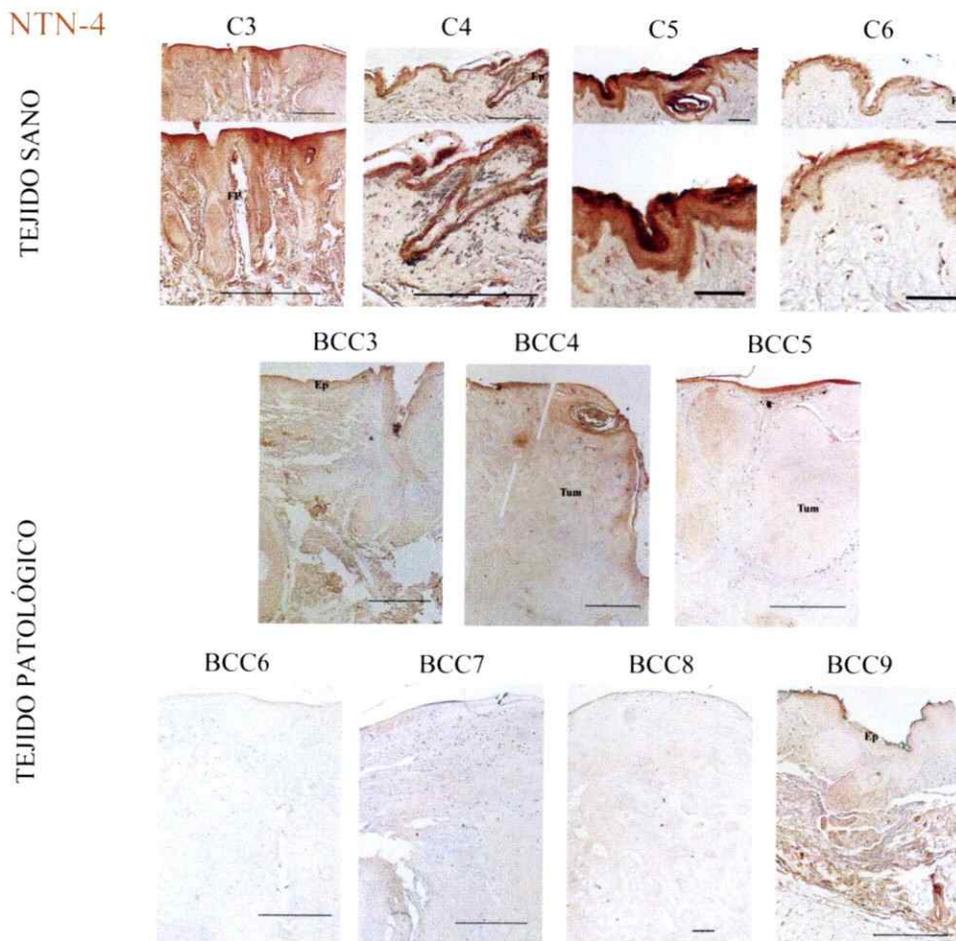


Figura 18. La expresión de NTN-4 no se asocia al aumento en los niveles de los reporteros de la vía SHH/GLI, excepto en el caso BCC5. NTN-4 se expresa en la epidermis y estructuras anexas como folículo piloso y glándulas sebáceas en tejido sano. Las muestras neoplásicas por su parte, presentan una marca débil y difusa del marcador. Barra indica 500 μ m a excepción de los casos C5, C6 y BCC8.

Al observar la expresión de NTN-4 en mayor aumento, se observa en primera instancia señal localizada en la membrana, tanto en muestras sanas como patológicas. La

marca no se evidencia en niveles equivalentes en todos los tejidos patológicos, como se muestra en tejidos BCC4, BCC5 y BCC8 a modo de ejemplo.

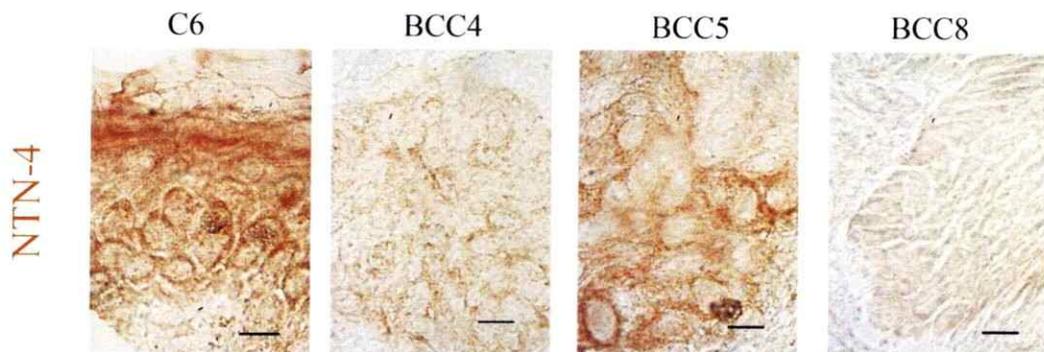


Figura 19. NTN-4 presenta una marca localizada principalmente en la membrana.

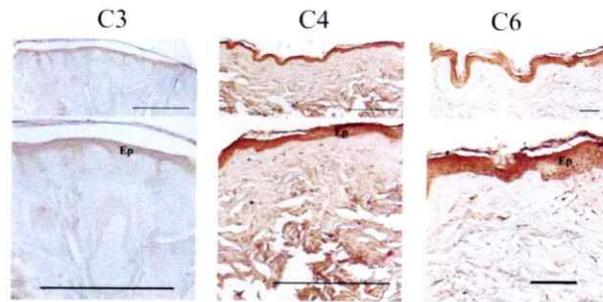
La expresión de NTN-4 se advierte en la membrana en muestras controles, como patológicas. Barra indica 10 μ m.

El último ligando en ser evaluado fue RGM-A; la expresión de esta molécula se muestra en la figura 20. En las muestras de piel sana, este ligando se expresó principalmente en la epidermis, como se observa de forma muy clara en las muestras C4 y C6, y de forma tenue en la muestra C3.

Los tejidos patológicos muestran ausencia de señal de la molécula de guía repulsiva, a excepción de los tejidos BCC5, BCC7 y BCC8. El primero de ellos presenta marca débil del anticuerpo en los lóbulos de la masa tumoral, de forma similar a lo que se observa en la muestra BCC7, que se ve un tanto opacada por los residuos de pigmentos que se encuentran en la zona media. Por otra parte, en el caso BCC8, se indica una señal muy intensa de la expresión de RGM-A en el tumor que se acumula en los extremos más cercanos de la dermis reticular y epidermis. En este caso, también se advierte marca en el folículo piloso ubicado en la región inferior.

RGM-A

TEJIDO SANO



TEJIDO PATOLÓGICO

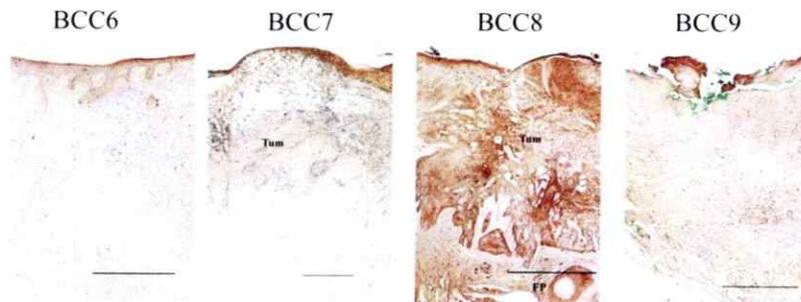
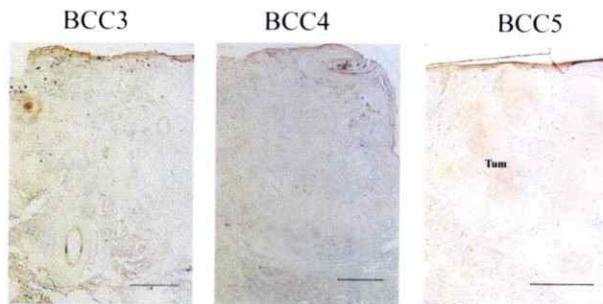


Figura 20. Expresión intensa de RGM-A se corresponde con algunas muestras que presentan elevada señal de blancos de la vía SHH/GLI. Muestras BCC5 y BCC8, y en menor medida BCC7, expresan elevados niveles del ligando, las que también exhiben mayor señal de PTCH-1 o GLI-1. La barra indica 500 μm , en C6 corresponde 100 μm .

Imágenes en mayor magnificación muestran un amplio espectro de localización celular para el ligando RGM-A, variando entre señal de membrana y citoplasmática.

Adicionalmente, la mayoría de los tejidos patológicos no expresa el ligando, tal como se ejemplifica para la muestra BCC3.

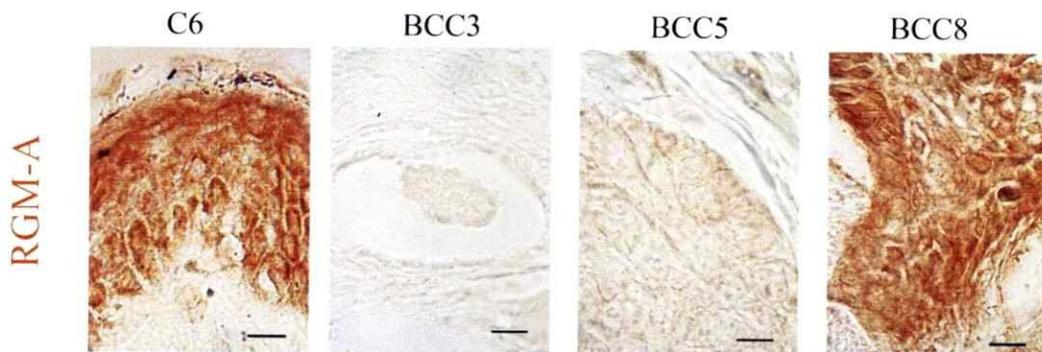


Figura 21. RGM-A presenta un patrón de localización celular diverso variando entre señal de membrana y citoplasmática. La marca del ligando RGM-A en muestras controles se localiza en capas de la epidermis, mientras que en tejido patológico se ubica en la extensión del foco tumoral con distintos niveles. La barra indica 10 μm

Evaluación de la expresión del marcador de proliferación PCNA.

Cómo última etapa se buscó determinar perfiles de expresión del marcador de proliferación PCNA. En la figura 22 se muestra el ensayo realizado para PCNA en tejidos sanos y patológicos, dicho anticuerpo marca nucleos de células en activa síntesis de DNA, principalmente durante fase S, en concordancia con la literatura, en las muestras controles se observa marca nuclear principalmente a nivel de la epidermis en sus capas basales, además de la señal en el folículo pilosos mostrado en el caso C5 [Toth DP. y cols, 1996].

Todos los tejidos patológicos presentan exacerbada señal de PCNA que varía en la distribución en cada muestra. En el caso BCC3 se observa marca en la epidermis,

folículos pilosos, nódulos tumorales y estroma internodular. En los nidos tumorales se localiza en los bordes, en la gran mayoría de las células que constituyen la empalizada. En la siguiente muestra, se observa una marca débil en el estrato basal de la epidermis, junto a una señal intensa en los nódulos tumorales que se presenta de forma homogénea a lo largo de él y en las células estromales que circundan los nódulos. En el tejido BCC5, en tanto, se percibe fuerte presencia de PCNA en cada uno de los lóbulos que constituyen la masa tumoral, ubicándose principalmente en las capas más externas y en las células estromales ubicadas entre cada uno de los lóbulos. La muestra BCC6, posee indicios marcas proliferativos en la capa basal de la epidermis, adicional a la intensa señal en la región tumoral que se ubica adyacente a una discontinuidad del tejido; la marca en este caso se acumula principalmente en cada uno de los focos tumorales. En el próximo caso, se advierte marca homogénea a lo largo de los nidos tumorales, adicionalmente a la observación de dos tipos de células estromales, unas que poseen elevados niveles de marcaje y se ubican entre nódulos, y otras que poseen menos marca y están encapsuladas dentro del tumor. En el tejido BCC8 se visualiza señal proliferativa de mayor intensidad en los bordes profundos de la masa tumoral de mayor tamaño y en de forma más continua en los nódulos de menor tamaño ubicados en las cercanías de la epidermis. En la última muestra se observa señal principalmente en las células estromales que se ubican en la zona media y en las glándulas sudoríparas en contacto con la hipodermis.

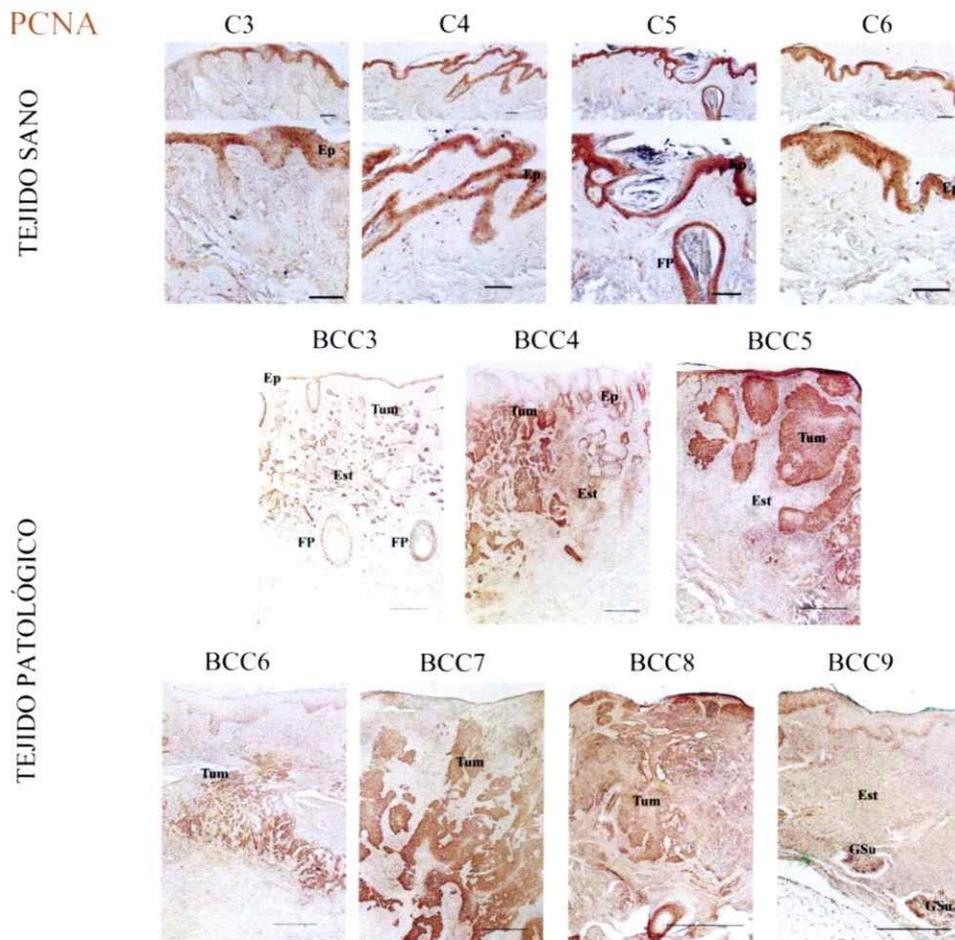


Figura 22. La expresión de PCNA está presente en todos los tejidos neoplásicos, localización predicha para este marcador. La señal de PCNA en las muestras controles se observa a nivel de la epidermis, mientras que en los tejidos patológicos, se muestra la señal en toda la extensión de la masa tumoral, que varía de acuerdo al tipo histológico de cada muestra. La barra en las muestras sanas corresponde a 100 μm , mientras que en tejidos neoplásicos indica 500 μm .

Al observar la expresión de este marcador de proliferación en mayor aumento se advierte la señal en tejido sano en las capas basales de la epidermis, mientras que hay

una marca intensa en las células que forman la empalizada de los nódulos en muestras patológicas, indicadas con flecha. Adicionalmente, se observa células con núcleos prominentes correspondientes con la acumulación de material genético, ampliamente descrito [Crowson, 2006].

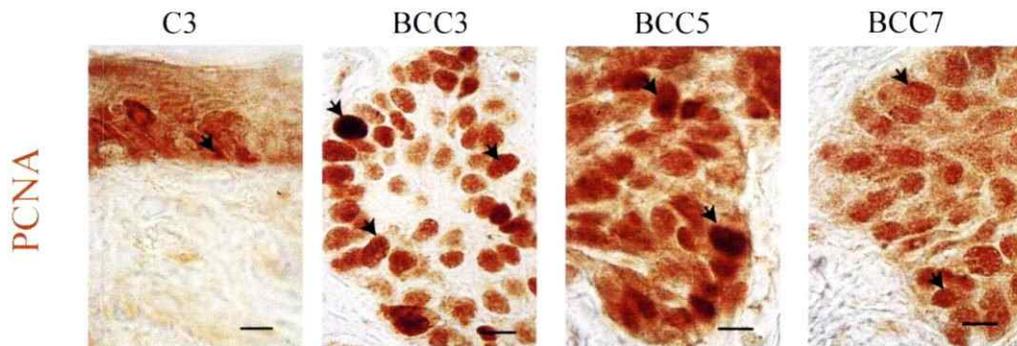


Figura 23. Expresión de PCNA se localiza en células que forman la empalizada de los nódulos tumorales. La marca de PCNA en tejido sano se observa principalmente en la capa basal de la epidermis, en tanto que en muestras neoplásicas, la señal se ubica en las células que limitan la masa tumoral, observándose mayor marca en células de mayor tamaño nuclear. La barra indica 10um.

Resumen de resultados

En síntesis, en algunos casos como BCC3, se observa elevada expresión de los blancos de la vía PTCH-1 y GLI-1, que se corresponde con la marca de NEO-1 en los focos tumorales. También, presenta elevado marcaje para el principal ligando en este órgano, NTN-1, alta expresión de PCNA que presenta una distribución dada por la histología de este cáncer y ausencia de marca de Caspasa-3 clivada, situación esperable para un cáncer que en la mayoría de sus formas no es metastásico. Lo

anteriormente mencionado se muestra en la figura 26 y 27 en donde se exhiben los tejidos sanos y patológicos más representativos.

C3

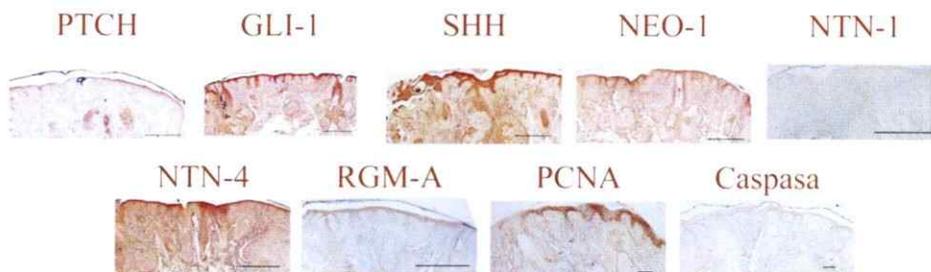


Figura 24. Panel resumen de expresión de marcadores para la muestra sana C3.

La barra indica 500 μm a excepción de los marcadores PCNA y Caspasa-3, en las cuales corresponde a 100 μm .

BCC3

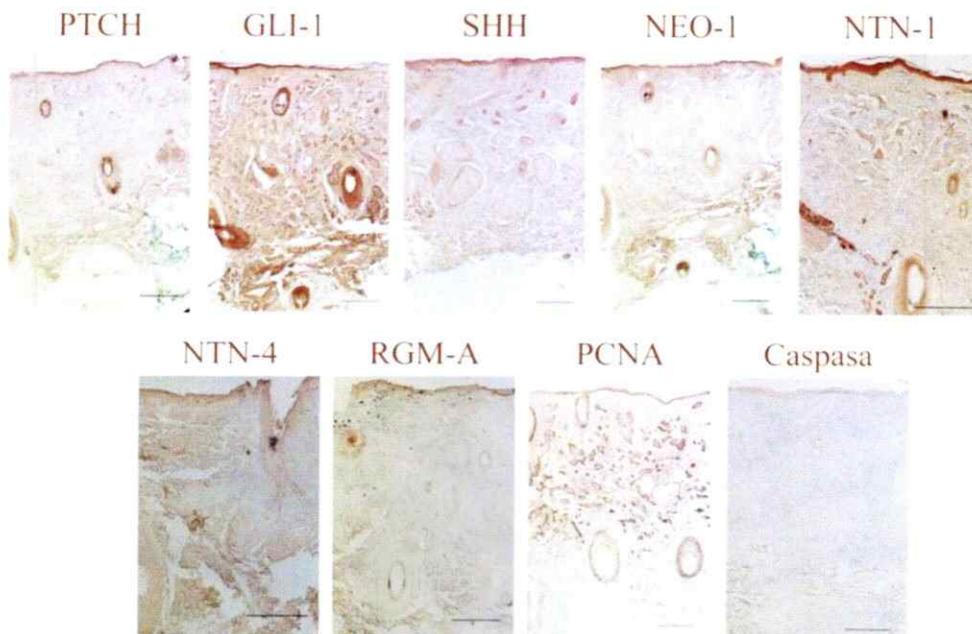


Figura 25. Panel resumen de expresión de marcadores para la muestra neoplásica BCC3 (página anterior). La barra indica 500µm.

A continuación, se muestran dos tablas resumen de los resultados obtenidos de la expresión de cada uno de los marcadores en las muestras sanas y neoplásicas. En la tabla 5, se indica con 0, en donde la señal se representa como basal y equivalente a la misma zona del tejido control, con + en donde se obtuvo una marca débil mayor a la muestra sana y por último, con símbolo ++ en donde la marca fue intensa y elevada respecto al tejido sano. Se consideró como referencia, la región equivalente del tejido sano en que se ubica el tumor, en la mayoría de los casos, ésta corresponde a la demis reticular.

Anticuerpo	C1	C3	C4	C5	C6
PTCH-1	0	0	0	0	0
GLI-1		0	0	0	0
SHH		0	0	-	0
NEO-1	0	0	0	0	0
NTN-1		-	0		0
NTN-4		0	0	0	0
RGM-A		0	0		0
PCNA		0	0	0	0

Tabla 4. Resumen de resultados en muestras controles. Se indica con 0, la expresión basal, en tanto que el signo indica ausencia de señal.

Anticuerpo	BCC2	BCC3	BCC4	BCC5	BCC6	BCC7	BCC8	BCC9
PTCH-1	0	++	+	++	+	++	0	0
GLI-1		++	+	++	0	+	++	0
SHH		++	0	+	0	0	++	0
NEO-1	++	+	++	0	++	+	++	0
NTN-1		++	+	+	++	+	++	0
NTN-4		0	+	++	0	0	0	0
RGM-A		0	0	+	0	+	++	0
PCNA		++	++	++	++	++	++	+

Tabla 5. Resumen de resultados en muestras patológicas. Se resume las señales obtenidas en cada muestra por cada marcador, es así como 0 indica un valor equivalente a la señal que se obtiene en el tejido sano (0 en tabla anterior), + se asocia a una señal débil mayor que la muestra sana y ++ se refiere a una marca intensa aumentada en relación al tejido sano.

IV. DISCUSIÓN

El cáncer constituye uno de las principales causas de muerte a nivel mundial. Es por esto que cualquier estudio en esta área resulta interesante en base a las abismantes estadísticas de morbilidad y mortalidad provocado por esta enfermedad. Particularmente, el cáncer de piel constituye la neoplasia que se presenta con mayor frecuencia en la población caucásica, un ejemplo de esto lo constituye el BCC. Esta patología se caracteriza por la proliferación exacerbada de las células basales de la epidermis, pleiomórfica y que en general no causa metástasis, pero puede llegar a ser muy agresivo localmente.

El BCC ha sido ampliamente descrito en el contexto de la vía de señalización SHH/GLI, en donde se han reportado diversas mutaciones en componentes de la vía, las que provocan una señalización constitutiva independiente del ligando en la mayoría de los casos. Las principales mutaciones descritas se han referido al receptor PTCH-1, el cual en este estado, no es capaz de ejercer represión sobre el correceptor SMO y por lo tanto, la vía se encuentra aberrantemente activa [Li y col, 2011].

Un blanco transcripcional de la vía de SHH/GLI, recientemente reportado es NEO-1, receptor de membrana que se ha vinculado a funciones de angiogénesis, guía axonal y homeostasis de hierro, dependiendo de los ligandos con que interactúe. Se ha evaluado la expresión de esta proteína en diversos cáncer, si bien se han obtenido resultados que varían en cada caso, se ha propuesto su uso como biomarcador de prognosis [Hu y col, 2001; Ho y col, 2003; Lee y col, 2005; Berrar y col, 2005; Wu y col, 2012].

En base a estos antecedentes, en este trabajo se evaluó por primera vez la expresión de NEO-1 y sus ligandos en tejido sano y neoplásico proveniente de pacientes diagnosticados con carcinoma basocelular. Por primera vez también, se estableció una posible relación entre NEO-1 y la sobreactivación de la vía SHH/GLI en BCC, a pesar del bajo número de muestras ensayadas.

Evaluación de la sobreactivación de la vía SHH/GLI en tejido patológico

En primera instancia se ensayó la actividad de la red de señalización Hedgehog en los tejidos de BCC, comparándolos con los sanos. Se observó un aumento en la expresión de los dos blancos de la vía evaluados, PTCH-1 y GLI-1, en 4 de 8 casos ensayados. Por otra parte, se advierte especialmente un caso (BCC9) en donde no hay expresión aumentada de ninguno de los dos marcadores evaluados. En los casos restantes se observa expresión variable entre marcadores o no es posible determinar la sobreactivación de la vía por falta de antecedentes.

La expresión del receptor PTCH-1 observada en muestras de tejido sano es consistente con lo reportado en la literatura, en donde se observa tinción principalmente en la epidermis y en el folículo piloso [Adolphe y col, 2006]. La expresión de PTCH-1 en las muestras patológicas también se corresponde con lo observado a través de hibridación *in situ* en trabajos anteriores, en los cuales la marca se localiza en los nódulos tumorales, especialmente en las células que forman la empalizada [Tojo y col, 1999].

En tanto la expresión del factor de transcripción GLI-1, en tejido sano, se advierte en la región de la epidermis y en una región particular del folículo piloso que se ajusta a lo mostrado en la literatura mediante inmunohistoquímica, en donde esta proteína se

expresaría en una subpoblación de células mesenquimales del folículo piloso. En los tejidos neoplásicos se observó marca principalmente a lo largo de toda la superficie nodular que se corresponde con lo observado en el mismo reporte anterior [Ghali y col, 1999]. Intracelularmente la señal se observa a nivel citoplasmático en la mayoría de los casos, en tanto que, en algunos de ellos, también se observó marca nuclear, esta distribución es consistente con lo mostrado anteriormente [Ghali y col, 1999].

Tal como se ha señalado en otros estudios la elevada actividad de la vía SHH/GLI no se encuentra restringida a un tipo histológico en particular en la neoplasia de BCC, sino que es amplia y coincidente a lo mostrado en este seminario.

Los niveles de expresión del ligando SHH se han reportado sin cambios en el tejido neoplásico, sin embargo, en el presente trabajo se evidencian señales de sobreexpresión del ligando en 3 muestras ensayadas con respecto a los tejidos sanos, considerando que en los controles negativos no se aprecia marca [Tojo y col, 2002]. Estos resultados son consistentes con lo mostrado en el ratón que sobreexpresa el ligando bajo el promotor de queratina 14, marcador de células epidermales, en el cual se observó neoplasias de características similares al carcinomas basocelular [Oro y col, 1997].

Estos resultados muestran que la sobreactivación de la vía de señalización puede estar dada a distintos niveles, de ella la más reportada es la mutación de pérdida de función de PTCH-1, seguida de mutaciones de ganancia de función de SMO y por último, mutaciones a nivel de los factores de transcripción GLI, todas ellas actuando de forma independiente del ligando. En paralelo, este aumento en la actividad también puede estar dado por aumento en la expresión del ligando que señala a través de

componentes de la vía en estado silvestre, como se observó en los casos BCC3, BCC6 y BCC8.

Expresión de NEO-1 y sus ligandos

NEO-1 corresponde a un receptor de membrana asociado a diversas funciones en el desarrollo y en la homeostasis celular. Durante este año, un trabajo del laboratorio identificó a este gen como blanco de la vía de SHH/GLI, lo que motivó el estudio de su expresión en este tipo de cáncer [Milla y col, 2012].

Es importante señalar que la expresión de NEO-1 no ha sido descrita en piel, por lo que este seminario de título constituye la primera aproximación en este tejido. Aún cuando, en este órgano ha sido descrita la expresión de DCC, un gen homólogo a NEO-1, el que se muestra principalmente asociado a queratinocitos de la capa basal de la epidermis y del folículo piloso en ratón [Combates y col, 1997].

Se observó que en tejido sano, la señal se localiza en la epidermis y en el folículo piloso en la capa más cercana al pelo, presumiblemente en alguna capa ubicada en la cercanía de la ORS, región responsiva a la señalización de la vía SHH/GLI. Se determinó el patrón de expresión del receptor en tejido de pacientes con BCC, lo que mostraron en su mayoría, un aumento en relación al tejido control. Esta elevada señal se correlaciona en varios casos con la sobreactivación de la vía SHH/GLI, lo que corroboraría la hipótesis propuesta. Adicionalmente, se observa señal de membrana y citoplasmática en la expresión de NEO-1, esta última presumiblemente asociada al clivaje por γ -secretasa del dominio intracelular del receptor [Goldschneider y cols, 2008].

Entonces, en base a lo reportado en la literatura la expresión de DCC y NEO-1 no resultan excluyentes, ya que ambos se localizan en regiones como la epidermis y el folículo piloso; todo esto teniendo en consideración que DCC ha sido descrito en tejido de ratón, mientras que en este estudio se evaluó en muestras de piel humana.

Sin embargo, la expresión de NEO-1 no sólo se encuentra regulada por la vía de SHH/GLI, sino que también por otra red ampliamente descrita en contextos de control del ciclo celular como es la vía Rb/E2F. Durante el año 2011 se describió este vínculo en el escenario de la migración neuronal, en donde en condiciones basales la proteína Rb se encuentra formando un complejo junto al factor de transcripción de la familia E2F, en tanto que en ausencia de Rb, el factor E2F se encuentra libre y promueve la transcripción de diversos genes entre los que se describió NEO-1 [Andrusiak y col, 2011]. Adicionalmente, resulta interesante lo mostrado en un ensayo realizado en una línea celular de keratinocitos humanos, en donde al aumentar la expresión del factor de transcripción GLI2 se obtiene una expresión elevada de varios genes que controlan el ciclo celular entre los que se encuentra E2F1, una proteína perteneciente a la familia de factores de transcripción E2F [Regl y col, 2004]. A partir de estos precedentes se puede especular que NEO-1 estaría siendo regulado por la vía de SHH/GLI a dos niveles: El primero de forma directa en donde una proteína GLI se une a la región promotora del gen *NEO-1*, mientras que la segunda es de forma indirecta en donde el factor E2F se une al promotor de *NEO-1* [Regl y col, 2004].

En relación a los resultados obtenidos para los ligandos del receptor NEO-1, se observó que NTN-1 se encontró en niveles elevados en la mayoría de los casos patológicos, mientras que NTN-4 y RGM-A sólo lo hicieron de forma débil. La señal de NTN-1 es variable entre las muestras controles, esta variabilidad puede ser explicada

por las distintas regiones corporales de donde se obtuvo la piel. La expresión aumentada de NTN-1 se ha mostrado en variados tipos de cáncer, lo que sumado a las observaciones de este trabajo, se confirma el rol propuesto de oncogen. Recientemente, se ha reportado una isoforma de NTN-1 cuya localización nuclear, se le ha asignado un papel en la proliferación neoplásica [Delloye-Bourgeois C. y cols, 2012] .Adicionalmente, resultados preliminares del laboratorio señalan a NTN-1 como posible gen candidato sujeto a la regulación de la vía SHH/GLI (datos no publicados, tesis Paulina Falcón). Esto último también se vincula con el rol de receptor de dependencia de NEO-1, indicando que la red de señalización SHH/Gli se encontraría modulando tanto el receptor como el ligando, de forma que en la condición patológica de sobreactivación constitutiva, el ligando estaría disponible para la interacción con el receptor, gatillando señales de sobrevida en todo momento.

Perfil de expresión de marcadores de proliferación.

La expresión del marcador de proliferación PCNA, es consistente con lo mostrado en la literatura, en donde se observó que todas las muestras de BCC ensayadas exhibían tinción. En este seminario de título se mostró que la diferencia en cada muestra se basa en la distribución de la tinción dada por la histología [Mateoiu y col, 2011].

En síntesis, los resultados mostrados en este seminario de título, muestran la sobreexpresión de los componentes de la vía SHH/GLI, NEO-1 y NTN-1 en tejido neoplásico asociado a algunos casos de BCC. La sobreactivación de la vía da cuenta de los niveles elevados de NEO-1 en un 75% de los casos, las muestras restantes pueden presentar distinto estado de la enfermedad, lo que genera mayor variabilidad en la expresión. El aumento en la expresión del marcador NEO-1, es coincidente con lo

observado en otros modelos neoplásicos como parte del trabajo del laboratorio, en donde se evidenciaron resultados similares en líneas celulares de meduloblastoma. Por otra parte, el aumento en la expresión de NTN-1, se corresponde con la sobreactivación de la vía en la totalidad de los casos ensayados, lo que presume de NTN-1 un nuevo gen candidato a la regulación por parte de la vía SHH/GLI. Estas observaciones apoyan el uso como biomarcador de prognosis tanto del receptor NEO-1 como de su ligando NTN-1.

Proyecciones

Se ha reportado evidencia que señala a la familia de proteínas morfogénicas óseas, BMP como ligando para el receptor NEO-1, específicamente BMP-2, BMP-4, BMP-6 y BMP-7 [Hagihara y col, 2011]. Esta familia de proteínas ha sido descrita con un importante rol durante el desarrollo y en la tumorigénesis del cáncer de piel [Sharov y col, 2009] por lo resultaría interesante evaluar su expresión en muestras de carcinoma basocelular, esperando encontrar sobreexpresión del ligando en estos tejidos.

Adicionalmente, se hace necesario realizar un estudio de niveles de expresión génica que compare entre tejido de piel sano y patológico de BCC que muestre una correspondencia con los resultados obtenidos en este seminario de título.

Teniendo en consideración los antecedentes mostrados, resulta interesante evaluar la expresión de DCC en muestras sanas y neoplásicas de BCC, que permita determinar su perfil en torno a estructuras como el folículo piloso, y si junto con NEO-1 se ubican en capas excluyentes.

Este estudio constituye una primera etapa de evaluación de estos marcadores de las vías de SHH/GLI y NEO-1 en piel. El próximo paso en esta línea es aumentar el

número de muestras tanto controles como neoplásicas, a fin de corroborar estos resultados

V. CONCLUSIONES

- La mayoría de las muestras neoplásicas de BCC muestran sobreactivación de la vía SHH/GLI.
- Se evidenció, por primera vez en este seminario, presencia del receptor NEO-1 en muestras de tejido sano de piel.
- En este trabajo se muestra una correlación de expresión de NEO-1 con la sobreactivación de la vía SHH/GLI en muestras patológicas.
- Se observó expresión diferencial de NEO-1 al comparar muestras con sobreactivación de la vía y sin ella en muestras de BCC.
- Se mostró elevada expresión de NTN-1 en casos patológicos de BCC que se vincula más directamente a la sobreactivación de la vía SHH/GLI.

VI. 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.

Allen M, Grachtchouk M, Sheng H, Grachtchouk V, Wang A, Wei L, Liu J, Ramirez A, Metzger D, Chambon P, Jorcano J, Dlugosz A.A. 2003. Hedgehog signaling regulates sebaceous gland development. *The American Journal of Pathology*. 163(6):2173-8

Andrusiak M. G, McClellan K. A, Dugal-Tessier D, Julian L. M, Rodrigues S. P, Park D. S, Kennedy T. E, Slack R. S. 2011. Rb/E2F regulates expression of neogenin during neuronal migration. *Molecular and cellular biology*. 31(2): 238-47.

Athar M, Tang X, Lee J.L, Kopelovich L, Kim A.L. 2006. Hedgehog signaling in skin development and cancer. *Experimental Dermatology*. 15:667-677

Bai CB, Stephen D, Joyner AL. 2004. All mouse ventral spinal cord patterning by hedgehog is Gli dependent and involves an activator function of Gli3. *Developmental Cell*. 6(1):103-15

Berrar D, Sturgeon B, Bradbury I, Downes CS, Dubitzky W. 2005. Survival trees for analyzing clinical outcome in lung adenocarcinomas based on gene expression profiles: identification of neogenin and diacylglycerol kinase alpha expression as critical factors. *Journal of Computational biology*. 12(5):534-44.

Bredesen D. E, Mehlen P, Rabizadeh S. 2005. Receptors that mediate cellular dependence. *Cell death and differentiation*. 12(8):1031-43.

Centers for disease control and prevention (CDC). Deaths and mortality, medio en línea. <http://www.cdc.gov/nchs/fastats/deaths.htm>. Consultado el viernes 11 de enero de 2013.

Chiang C, Swan RZ, Grachtchouk M, Bolinger M, Litingtung Y, Robertson EK, Cooper MK, Gaffield W, Westphal H, Beachy PA, Dlugosz AA. 1999. Essential role for Sonic hedgehog during hair follicle morphogenesis. *Developmental Biology*. 205(1):1-9.

Combates N. J, Chuong C. M, Stenn K. S, Prouty S. M. 1997. Expression of two Ig family adhesion molecules in the murine hair cycle: DCC in the bulge epithelia and NCAM in the follicular papilla. 109(5):672-8

Crowson A.N, 2006. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. *Modern Pathology*. 19, S127-S147.

Delloye-Bourgeois C, Brambilla E, Coissieux MM, Guenebeaud C, Pedeux R, Firlej V, Cabon F, Brambilla C, Mehlen P, Bernet A. 2009a. Interference with netrin-1 and tumor cell death in non-small cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 101(4):237-47

Delloye-Bourgeois C, Fitamant J, Paradisi A, Capellen D, Douc-Rasy S, Raquin M. A, Stupack D, Nakagawara A, Rousseau R, Combaret V, Puisieux A, Valteau-Couanet D, Bénard J, Bernet A, Mehlen P. 2009b. Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. *The Journal of experimental medicine.* 206(4):833-47

Delloye-Bourgeois C, Goldschneider D, Paradisi A, Therizols G, Belin S, Hacot S, Rosa-Calatrava M, Scoazec JY, Diaz JJ, Bernet A, Mehlen P. 2012. Nucleolar localization of a netrin-1 isoform enhances tumor cell proliferation. *Science Signaling.* 5(236):ra57.

Esseghir S, Kennedy A, Seedhar P, Nerurkar A, Poulosom R, Reis-Filho JS, Isacke CM. 2007. Identification of NTN4, TRA1, and STC2 as prognostic markers in breast cancer in a screen for signal sequence encoding proteins. *Clinical Cancer Research.* 13(11):3164-73.

Eveno C, Broqueres-You D, Feron JG, Rampanou A, Tijeras-Raballand A, Ropert S, Leconte L, Levy BI, Pocard M. 2011. Netrin-4 delays colorectal cancer carcinomatosis by inhibiting tumor angiogenesis. *The American Journal of pathology.* 178(4):1861-9

Eveno C, Contreres JO, Hainaud P, Nemeth J, Dupuy E, Pocard M. 2013. Netrin-4 overexpression suppresses primary and metastatic colorectal tumor progression. *Oncology reports.* 29(1):73-8

Fan H, Oro A. E, Scott M. P. y Khavari P. A. 1997. Induction of basal cell carcinoma features in transgenic human skin expressing sonic hedgehog. *Nature Medicine.* 3(7):788-92

Fuchs E. 2007. Scratching the surface of skin development. *Nature.* 445(7130): 834-42

Fuchs E. y Horsley V. 2008. More than one way to skin... *Genes & Development.* 22(8):976-985.

Geneser F. 1985. Atlas de Histología. Pp 90. Editorial Médica Panamericana.

Ghali L, Wong S. T, Green J, Tidman N, Quinn A. G. 1999. GLI-1 protein is expressed in basal cell carcinomas, outer root sheath keratinocytes and a subpopulations of mesenchymal cells in normal human skin. *The Journal of Investigative Dermatology.* 113(4): 595-9.

Goldschneider P, Rama N, Guix C, Mehlen P. 2008. The neogenin intracellular domain regulates gene transcription via nuclear translocation. *Molecular and cellular biology.* 28(12):4068-79.

Goldschneider P. and Mehlen P. 2010. Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. *Oncogene.* 29(13):1865-82.

Hagihara M, Endo M, Hata K, Higuchi C, Takaoka K, Yoshikawa H, Yamashita T. 2011. Neogenin, a receptor for bone morphogenic protein. *The Journal of biological chemistry.* 286 (7): 5157-65.

Ho S.M, Lau K. M, Mok S. C, 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, Wong J, Srivastava G. 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. *Clinical Cancer Research.* 7(8):2213-21.

Hu Y, Ylivinkka I, Chen P, Li L, Hautaniemi S, Nyman TA, Keski-Oja J, Hyytiäinen M. 2012. Netrin-4 promotes glioblastoma cell proliferation through integrin β 4 signaling. *Neoplasia.* 14(3):219-27.

Huntzicker E.G, Estay I.S, Lokteva L.A, Jackson P.K, Oro A.E. 2006. Dual degradation signals control Gli protein stability and tumor formation. *Genes and development.* 20(3):276-81.

Ingham, P.W.and Placzek M. 2006. Orchestrating ontogenesis: variations on a theme by sonic hedgehog. *Nature Review Genetics.* 11:841-850

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-e178.

Johnson R. L, Rothman A. L, Xie J, Goodrich L. V, Bare J.W, Bonifas J.M, Quinn A.G, Myers R.M, Cox D.R, Epstein Jr, Scott M.P. 1996. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science.* 272(5268):1668-71

Kanikatis J. 2006. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European Journal of Dermatology.* 12(4):390-9

Karlsson L, Bondjers C, Betsholtz C. 1999. Roles of PDGF-A and sonic hedgehog in development of mesenchymal component of the hair follicle. *Development.* 126(12):2611-21

Kefeli U, Yildirim ME, Aydin D, Madenci OC, Yasar N, Sener N, Mert AG, Yuksel S, Ercelep OB, Korkmaz T, Yildiz R, Gumus M. 2012. Netrin-1 concentrations in patients with advanced gastric cancer and its relation with treatment. *Biomarkers.* 17(7):663-7

Lee J.E, Kim H. J, Bae J. Y, Kim S. W, Park J. S, Shin H. J, Han W, Kim S. W, Kang K. S, 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 cancer. *Cellular Signalling*. 23, 1235-1243.

LI VS, Yuen ST, Chan TL, Yan HH, Law WL, Yeung BH, Chan AS, Tsui WY, So S, Chen X, Leung SY. 2009. Frequent inactivation of axon guidance molecule RGMA in human colon cancer through genetic and epigenetic mechanisms. *Journal of cellular biochemistry*. 113(7):2523-31

Li J, Ye L, Kynaston HG, Jiang WG. 2012a. Repulsive guidance molecules, novel bone morphogenetic protein co-receptors, are key regulators of the growth and aggressiveness of prostate cancer cells. *International Journal of Oncology*. 40(2):544-50

Li J, Ye L, Sanders AJ, Jiang WG. 2012b. Repulsive guidance molecule B (RGMB) plays negative roles in breast cancer by coordinating BMP signaling. *Journal of cellular biochemistry*. 113(7):2523-31

Mateoiu C, Pirici A, Bogdan F. 2011. Immunohistochemical nuclear staining for p53, PCNA, Ki-67 and bcl-2 in different histologic variants of basal cell carcinoma. *Romanian journal of morphology and embryology*. 52 (1 Suppl):315-9.

Matsunaga E, Tauszig-Delamasure S, Monnier P. P, Mueller P. K, Strittmatter S.M, Mehlen P, Chédotal A. 2004. RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival. *Nature Cell Biology*. 6(8):749-755

Méthot N, Basler K. 1999. Hedgehog controls limb development by regulating the activities of distinct transcriptional activator and repressor forms of *Cubitus interruptus*. *Cell*. 96(6):819-31.

Miller R. T. 2004. Immunohistochemistry in the Differential Diagnosis of cutaneous Basal Cell Carcinoma and Squamous Cell Carcinoma. *The FOCUS, Immunohistochemistry*.

Niemann C, Unden AB, Lyle S, Zouboulis Ch. C, Toftgård R, Watt FM. 2003. Indian hedgehog and beta-catenin signaling: role in the sebaceous lineage of normal and neoplastic mammalian epidermis. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100 Suppl1:11873-80.

Nüsslein-Volhard, C. and Wieschaus, E. 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. 287: 795-801.

Organización mundial de la salud (OMS). The top 10 causes of death, medio en línea. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>. Consultado el viernes 11 de enero de 2013.

Oro A.E, Higgins K. M, Hu Z, Bonifas J. M, Epstein Jr. E. H, Scott M. P. 1997. Basal cell carcinomas in mice overexpressing sonic hedgehog. *Science*. 276: 817-821.

- Park HL, Bai C, Platt KA, Matise MP, Beeghly A, Hui CC, Nakashima M, Joyner AL. 2000.** Mouse GLI-1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. *Development*. 127(8):1593-605.
- Rajagopalan S, Deitinghoff L, Davis D, Conrad S, Skutella T, Chedotal A, Mueller B. K, Strittmatter S. M. 2004.** Neogenin mediates the action of repulsive guidance molecule. *Nature Cell Biology*. 6(8):756-62.
- Ramesh G, Berg A, Jayakumar C. 2011.** Plasma netrin-1 is a diagnostic biomarker of human cancer. *Biomarkers*. 16(2):172-80
- Regl G, Kasper M, Schnidar H, Eichberger T, Neill G. W, Ikram M. S, Quinn A. G, Philpott M.P, Frischauf A. M, Aberger F. 2004.** The zinc-finger transcription factor GLI2 antagonizes contact inhibition and differentiation of human epidermal cells. *Oncogene*. 23(6): 1263-1274.
- Rodriguez A, Pan P, Parkkila S. 2007.** Expression studies of neogenin and its ligand hemojuvelin in mouse tissues. *The Journal of histochemistry and cytochemistry*. 55(1):85-96.
- Ryan K.E. and Chiang C. 2012.** Hedgehog secretion and signal transduction in vertebrates . *The Journal of Biological Chemistry*. 287 (22):17905-13
- Sanchez-Camacho C, Rodriguez J, Ruiz J. M, Trousse F, Bovolenta P. 2005.** Morphogens as growth cone signalling molecules. *Brain Research Reviews* 49(2): 242-252.
- Sharov A. A, Mardaryev A. N, Sharova T. Y, Grachtchouk M, Atoyan R, Byers H. R, Seykora J. T, Overbeek P, Dlugosz A, Botchkarev V. A. 2009.** Bone morphogenetic protein antagonist noggin promotes skin tumorigenesis via stimulation of the Wnt and Shh signaling pathway. *The American Journal of Pathology*. 175(3):1303-14.
- Shimizu A, Nakayama H, Wang P, König C, Akino T, Sandlund J, Coma S, Italiano J.E, Mammoto A, Bielenberg DR, Klagsbrun M. 2012.** Netrin-1 Promotes Glioblastoma Cell Invasiveness and Angiogenesis by Multiple Pathways Involving Activation of RhoA, Cathepsin B and CREB. *The Journal of biological chemistry*.
- Shin G. J. & Wilson N. H. 2008.** Overexpression of repulsive guidance molecule (RGM) a induces cell death through Neogenin in early vertebrate development. *Journal of molecular histology*. 39 (1):105-13
- Stecca B, Mas C, Clement V, Zbinden M, Correa R, Piguat V, Beermann F. and Ruiz I Altaba A. 2007.** Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI-1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104(14) 5895-5900
- Tojo M, Mori T, Kiyosawa H, Honma Y, Tanno Y, Kanazawa K. Y, Yokoya S, Kaneko F, Wanaka A. 1999.** Expression of sonic hedgehog signal transducers, patched and smoothed, in human basal cell carcinoma. *Pathology International*. 49(8):687-694.

Tojo M, Kiyosawa H, Iwatsuki K, Kaneko F. 2002. Expression of a sonic hedgehog signal transducer, hedgehog-interacting protein, by human basal cell carcinoma. *British Journal of Dermatology*. 146 (1):69-73.

Toth DP, Guenther LC, Shum DT. 1996. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA); prognostic value in the clinical recurrence of primary basal cell carcinoma. *Journal of Dermatological science*. 11(1):36-40

Vidal VP, Chaboissier MC, Lützkendorf S, Cotsarelis G, Mill P, Hui CC, Ortonne N, Ortonne JP, Schedl A. 2005. Sox9 is essential for outer root sheath differentiation and the formation of the hair stem cell compartment. *Current Biology*.15(15):1340-51

Vielmetter J, Ekayyem J, Roman J. M, Dreyer W. J. 1994. Neogenin, an avian cell surface protein expressed during terminal neuronal differentiation, is closely related to the human tumor suppressor molecule deleted in colorectal cancer. *Journal of Cell Biology*. 127(6 Pt 2):2009-20

Weitzman J.B. 2002. Agonizing Hedgehog. *Journal of Biology*. 1(2):7

Wilson N. H, Key B. 2007. Neogenin: One receptor, many functions. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39: 874-878.

Wu X, Li Y, Wan X, Kayira TM, Cao R, Ju X, Zhu X, Zhao G. 2012. Down-regulation of neogenin accelerated glioma progression through promoter Methylation and its overexpression in SHG-44 Induced Apoptosis. *PloS One*. 7(5):e38074

IX.- MATERIAL SUPLEMENTARIO

Material suplementario 1

A continuación, se muestran los controles negativos para cada anticuerpo, en los cuales no se agregó el anticuerpo primario.

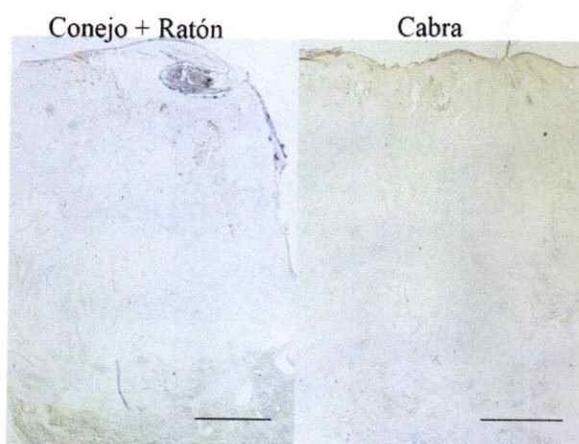


Figura suplementaria 1. Controles negativos de las inmunohistoquímicas. Los tejidos fueron sujetos al mismo procedimiento de inmunohistoquímica, pero sin agregar anticuerpo primario. La barra indica 500um.

Material suplementario 2

En la figura suplementaria 2, se muestra la mayoría de los anticuerpos evaluados a lo largo de este seminario de título, ensayados en cordón umbilical humano como control positivo de los anticuerpos. Estos resultados forman parte de la tesis de magíster de la señorita María Carolina Ortíz.

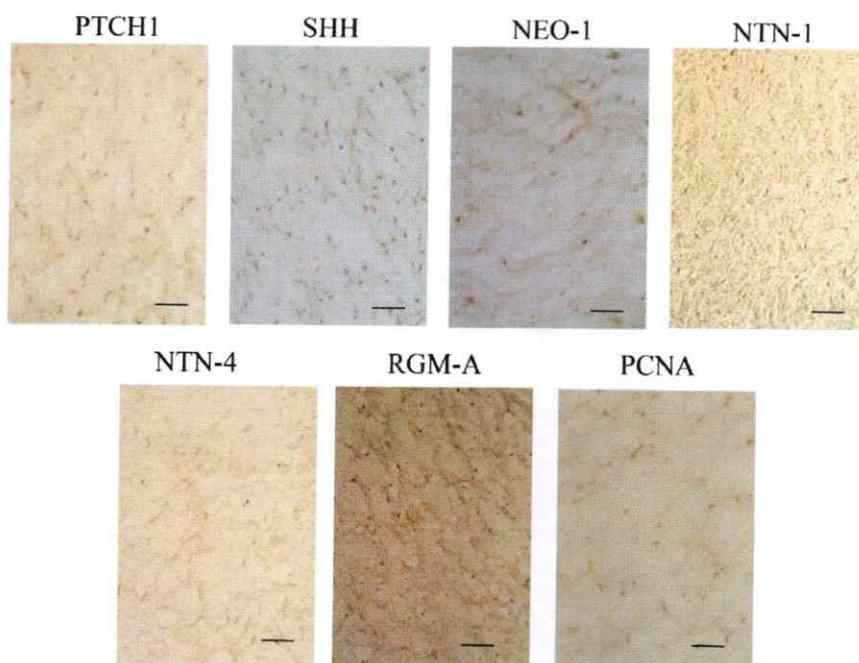


Figura suplementaria 2. Controles de anticuerpos evaluados en cordón umbilical humano. Con el fin de corroborar la expresión de los anticuerpos en otro tejido humano se muestran las inmunohistoquímicas realizadas como parte del trabajo de tesis de magíster de María Carolina Ortíz. La barra indica 50um.

Material suplementario 3

En la siguiente figura se muestra la expresión de DCC en piel de ratón.

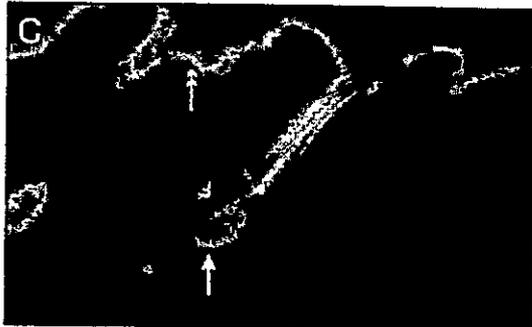


Figura suplementaria 3. DCC se expresa en queratinocitos de la capa basal de la epidermis y del folículo piloso en piel de ratón. Tomado de Combates y col, 1997.

Material suplementario 4

Los próximos documentos corresponden a la acta de aprobación por parte del comité de ética y del director del Hospital Clínico Universidad de Chile.

UNIVERSIDAD DE CHILE
HOSPITAL CLÍNICO
Comité Ética



ACTA DE APROBACION N° 52

SANTIAGO, Noviembre del 2012.

El Comité Ético Científico para Investigación Biomédica (CECEI) en Seres Humanos del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

·Prof. Verónica Anguita Mackay. Académico. Facultad de Medicina.
Dra. Gloria López Stewarts. Médico Endocrinólogo. (no asiste)
Dra. Ana María Madrid S. Médico Gastroenterólogo. Secretaria. (no asiste)
Dra. Teresa Massardo Vega. Médico. Medicina Nuclear.
Dr. Antonio Morales Barria. Médico Gastroenterólogo.
Dr. Juan Carlos Prieto D. Farmacología Clínica. (no asiste)
Srta. Rina Sepúlveda A. Abogado.
Dr. Juan Jorge Silva Solís. Médico Cirujano. Presidente.
Dr. Sergio Valenzuela P. Médico Ginecoobstetra.
Dr. Guillermo Watkins S. Médico Cirujano.

Ha analizado el proyecto denominado: "Evaluación de la expresión del receptor Neogenina I y sus ligandos en piel sana y en neplasia asociada a Carcinoma Basocelular, cuyo investigador principal es la Dra. Verónica Palma. Facultad de Ciencias Universidad de Chile.

Para este efecto tuvo a la vista los siguientes documentos:

- Solicitud de evaluación del proyecto de investigación por Comité de Ética.
- Currículo del investigador.
- Consentimientos informados (2)

El proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos CIOMS 2002, y de las Guías de Buenas Práctica Clínica de ICH 1996.

Sobre la base de esta información el Comité Ético Científico para Investigación Biomédica en Seres Humanos del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, se ha pronunciado de la siguiente manera sobre los aspectos del proyecto que a continuación se señalan:

a) Carácter de la población estudiada:
Población no cautiva, no terapéutica.



- b) Utilidad del Proyecto:
Adecuada, nueva información pronóstica de receptor y vías neuronales.
- c) Riesgos:
No conlleva riesgo ni daño a los sujetos.
- d) Beneficios:
Podrían determinar el valor pronóstico de Neogenina I en cáncer de piel.
- e) Confidencialidad del estudio:
El investigador principal asegura la confidencialidad de los datos, solicitando a los testistas y asistentes de la investigación firmar documento de confidencialidad.
- f) Notificación oportuna de reacciones adversas:
No aplica eventos adversos.
- g) El investigador responsable se compromete a comunicar el resultado del estudio.
- h) El investigador responsable se compromete a enviar semestral y/o anual el informe del estudio.

Por lo tanto el Comité estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

Se aprueban los siguientes documentos que se firman, timbran y fechan por el CECEI:

- Consentimiento informado piel sana, versión N° 2, fecha 03 de Octubre 2012.
- Consentimiento informado muestra patológica, versión N° 2, fecha 03 de Octubre 2012.

- Se adjunta nómina de los integrantes del Comité.

- Se adjunta Declaración de Cumplimiento de las Buenas Prácticas Clínicas.

En virtud de las consideraciones anteriores, el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, el 07 de Noviembre del 2012.




JUAN JORGE SILVA SOLIS
PRESIDENTE
COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO
HOSPITAL CLINICO U. DE CHILE



INTEGRANTES COMITÉ ETICO CIENTIFICO

2012

NOMBRE	ESPECIALIDAD	CARGO	FIRMA
Dr. Juan Jorge Silva Solís	Cirujano	Presidente	
Dra. Ana María Madrid Silva	Gastroenteróloga	Secretaria	
Dr. Sergio Valenzuela Puchulu	Ginecólogo	Integrante	
Srta. Rina Sepúlveda Alfaro	Abogada	Integrante	
Dr. Juan Carlos Prieto Domínguez	Cardiovascular	Integrante	
Dra. Gloria López Stewart	Endocrinóloga	Integrante	



Dr. Guillermo Watkins Sepúlveda	Cirujano	Integrante	<i>[Signature]</i>
Dr. Antonio Morales Barria	Gastroenterólogo	Integrante	<i>[Signature]</i>
Dra. Teresa Massardo	Medicina Nuclear	Integrante	<i>[Signature]</i>
Prof. Verónica Anguita Mackay	Académico Facultad de Medicina	Integrante	<i>[Signature]</i>



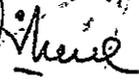
[Signature]
 DR. JUAN JORGE SILVA SOLIS
 PRESIDENTE
 COMITÉ ETICO CIENTIFICO y/o INVESTIGACION
 HOSPITAL CLINICO UNIVERSIDAD DE CHILE

Santiago, 07 de Noviembre 2012.

DECLARACIÓN DE CUMPLIMIENTO DE LAS BUENAS PRACTICAS CLÍNICAS

En conformidad a lo solicitado, cumplo con informarle que el Comité Ético Científico del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, está organizado, actúa y emite sus dictámenes, en pleno acuerdo con la Declaración de Helsinki (1964 y sus modificaciones de 1975, 1983, 1989, 1996, 2000), con las Normas de la "Buena Práctica Clínica" (GCP) establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS,WHO) 1996, la ICH Harmonized Tripartite Guidelines for Good Clinical Practice (1996); por las Normas Éticas Internacionales para las Investigaciones Biomédicas con sujetos humanos (Organización Panamericana de la Salud y por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias médicas (CIOMS), 1996, las Operacional Guidelines for Ethics Committees that review Biomedical Research (WHO, 2000) y por las Regulaciones Nacionales (Norma Técnica Número 57 del 4 de junio del 2001, del Ministerio de Salud del Gobierno de Chile: Regulación de la Ejecución de Ensayos Clínicos que utilizan Productos Farmacéuticos en Seres Humanos); además, se cumple con la ley 20.120 del 22 de Septiembre de 2006, sobre la regulación de la investigación científica en seres humanos y prohíbe la clonación.




DR. JUAN JORGE SILVA SOLÍS
PRESIDENTE
COMITÉ ETICO CIENTIFICO
HOSPITAL CLINICO UNIVERSIDAD DE CHILE

SANTIAGO, Noviembre 07 del 2012.

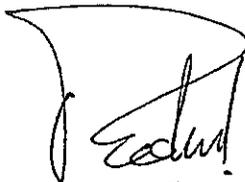
Santiago, 5 - DIC. 2012

APROBACIÓN PARA REALIZACIÓN DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Dr. Carlos Paolinelli G., Director General del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, certifica que ha aprobado la realización del proyecto de investigación denominado "Evaluación de la expresión del receptor Neogenina 1 y sus ligandos en piel sana y en neplasia asociada a Carcinoma Basocelular"

Este estudio ha sido debidamente discutido y aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, según consta en Acta de Aprobación N° 52 del 07 Noviembre de 2012 y será conducido bajo la responsabilidad de la Dra. Verónica Palma Alvarado, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Participa como Co-investigador de nuestro Hospital el Dr. Patricio Gac, del Departamento de Cirugía.

Dado que se han cumplido los requisitos establecidos para conducir estudios en seres humanos en nuestra Institución, este Estudio Clínico cuenta con la autorización de la Dirección del Hospital para su realización, en los términos que establece el protocolo antes mencionado.



DR. CARLO PAOLINELLI GRUNERT
DIRECTOR GENERAL
HOSPITAL CLÍNICO DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE


CSM